

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG

**ĐẶNG BỬU TÙNG THIÊN**

**NGHIÊN CỨU THU NHẬN POLYPHENOL,  
CHLOROPHYLL TỪ RAU MÁ THÌA (*Centella asiatica*  
(L.) Urb) VÀ ỨNG DỤNG TRONG ĐỒ UỐNG**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ**

**KHÁNH HÒA – 2023**

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG

ĐẶNG BỬU TÙNG THIỆN

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

NGHIÊN CỨU THU NHẬN POLYPHENOL,  
CHLOROPHYLL TỪ RAU MÁ THÌA (*Centella asiatica*  
(L.) Urb) VÀ ỨNG DỤNG TRONG ĐỒ UỐNG

Ngành: Công nghệ sau thu hoạch

Mã số: 9540104

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. NGÔ ĐĂNG NGHĨA
2. PGS. TS. VŨ NGỌC BỘI

KHÁNH HÒA - 2023

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan luận án này là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả trong luận án là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

**Tác giả luận án**

**Đặng Bửu Tùng Thiện**

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này,

Trước tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban Giám hiệu, Ban Chủ nhiệm khoa Công nghệ Thực phẩm và Lãnh đạo phòng Sau Đại học - Trường Đại học Nha Trang đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu tại Trường trong những năm qua.

Xin trân trọng cảm ơn Ban Giám hiệu - Trường Cao đẳng Kỹ thuật Công nghệ Nha Trang đã cho phép tôi đi học và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian học tập vừa qua.

Xin gửi lòng biết ơn sâu sắc đến PGS. TS. Ngô Đăng Nghĩa - Viện Công nghệ Sinh học & Môi trường và PGS. TS. Vũ Ngọc Bội - Khoa Công nghệ Thực phẩm - Trường Đại học Nha Trang đã tận tình giúp đỡ và hướng dẫn tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án này.

Xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của các Thầy cô ở Trường Đại học Đà Lạt, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang và Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt.

Cuối cùng, xin ghi nhớ tình cảm của gia đình, đồng nghiệp và bạn bè luôn giúp đỡ, chia sẻ và động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu để hoàn thành luận án.

## MỤC LỤC

|                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....                                                         | v   |
| DANH MỤC CÁC BẢNG.....                                                             | vi  |
| DANH MỤC CÁC HÌNH.....                                                             | vii |
| TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN.....                                        | xii |
| MỞ ĐẦU.....                                                                        | 1   |
| CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....                                                           | 3   |
| 1.1. RAU MÁ THÌA .....                                                             | 3   |
| 1.1.1. Giới thiệu về rau má thìa .....                                             | 3   |
| 1.1.2. Thành phần hóa học của rau má thìa .....                                    | 6   |
| 1.2. GIỚI THIỆU VỀ POLYPHENOL VÀ CHLOROPHYLL .....                                 | 7   |
| 1.2.1. Polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của polyphenol .....                  | 7   |
| 1.2.2. Chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa của chlorophyll .....                | 14  |
| 1.3. KỸ THUẬT TÁCH CHIẾT VÀ THU NHẬN POLYPHENOL,<br>CHLOROPHYLL.....               | 16  |
| 1.3.1. Kỹ thuật tách chiết, thu nhận polyphenol .....                              | 16  |
| 1.3.2. Kỹ thuật tách chiết, thu nhận chlorophyll .....                             | 21  |
| 1.4. KỸ THUẬT SẤY PHUN.....                                                        | 22  |
| 1.4.1. Giới thiệu .....                                                            | 22  |
| 1.4.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sấy phun.....                            | 23  |
| CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ....                           | 26  |
| 2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU.....                                                          | 26  |
| 2.2. PHƯƠNG PHÁP BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM.....                                            | 27  |
| 2.2.1. Bố trí thí nghiệm tổng quát .....                                           | 27  |
| 2.2.2. Bố trí thí nghiệm xác định thông số thích hợp các nội dung nghiên cứu ..... | 29  |
| 2.3. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH .....                                                   | 44  |
| 2.3.1. Phương pháp sinh học phân tử .....                                          | 44  |
| 2.3.2. Phương pháp sinh hóa .....                                                  | 45  |
| 2.3.3. Phương pháp hóa lý .....                                                    | 47  |

|                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.3.4. Phương pháp hóa học .....                                                                          | 49  |
| 2.3.5. Phương pháp vi sinh vật .....                                                                      | 49  |
| 2.3.6. Phương pháp cảm quan .....                                                                         | 50  |
| 2.4. THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT NGHIÊN CỨU.....                                                                 | 51  |
| 2.4.1. Máy và thiết bị nghiên cứu .....                                                                   | 51  |
| 2.4.2. Hóa chất nghiên cứu .....                                                                          | 52  |
| 2.5. XỬ LÝ SỐ LIỆU .....                                                                                  | 53  |
| CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....                                                            | 54  |
| 3.1. ĐỊNH DANH VÀ PHÂN TÍCH MỘT SỐ THÀNH PHẦN HÓA HỌC<br>CHỦ YẾU CỦA RAU MÁ THÌA .....                    | 54  |
| 3.1.1. Định danh rau má thìa .....                                                                        | 54  |
| 3.1.2. Phân tích một số thành phần hóa học chủ yếu của rau má thìa .....                                  | 59  |
| 3.1.3. Xác định thời gian thu hoạch rau má thìa.....                                                      | 62  |
| 3.2. NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH POLYPHENOL VÀ CHLOROPHYLL<br>TỪ RAU MÁ THÌA .....                              | 67  |
| 3.2.1. Xác định thông số chiết tách polyphenol và chlorophyll từ rau má thìa .....                        | 67  |
| 3.2.2. Tối ưu hóa công đoạn chiết tách polyphenol và chlorophyll từ rau má thìa ..                        | 89  |
| 3.3. NGHIÊN CỨU SẤY PHUN TẠO BỘT RAU MÁ THÌA CHỨA<br>POLYPHENOL VÀ CHLOROPHYLL .....                      | 97  |
| 3.3.1. Xác định thông số sấy phun tạo bột rau má thìa.....                                                | 97  |
| 3.3.2. Tối ưu quá trình công đoạn sấy phun tạo bột polyphenol và chlorophyll từ<br>rau má thìa .....      | 127 |
| 3.3.3. Quy trình sấy phun tạo bột rau má thìa chứa polyphenol và chlorophyll.....                         | 134 |
| 3.3.4. Đánh giá biến động hàm lượng polyphenol và chlorophyll của bột rau má<br>thìa trong bảo quản ..... | 139 |
| KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....                                                                                | 145 |
| DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA LUẬN ÁN .....                                                          | 147 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO.....                                                                                   | 148 |
| PHỤ LỤC .....                                                                                             |     |

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

| Chữ viết tắt | Tiếng Anh                                                 | Tiếng Việt                                           |
|--------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| ANOVA        | Analysis of variance                                      | Phân tích phương sai                                 |
| Bx           |                                                           | Độ Brix                                              |
| CM           |                                                           | Chất mang                                            |
| CTAB         | Standard cetyltrimethylammonium bromide procedure         | Qui trình cetyltrimethylammonium bromide chuẩn       |
| DF           | Degree of freedom                                         | Số bậc tự do                                         |
| DM           |                                                           | Dung môi                                             |
| DMF          | Dimethylformamide                                         |                                                      |
| DMSO         | Dimethyl sulfoxide                                        |                                                      |
| DPPH         |                                                           | 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl                        |
| DLS          | Dynamic Light Scattering                                  | Kỹ thuật tán xạ ánh sáng động                        |
| DSC          | Differential scanning calorimetry                         | Đặc tính nhiệt vi sai                                |
| EtOH         |                                                           | Ethanol                                              |
| F test       | Fisher test                                               | Kiểm định theo thống kê Fisher                       |
| HPLC         | High Performance Liquid Chromatography                    | Sắc ký lỏng hiệu năng cao                            |
| ITS          | Internal Transcript Spacer                                |                                                      |
| LC-HRMS      | Liquid chromatography – High resolution mass spectrometry | Sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao                   |
| NCBI         | National Center for Biotechnology Information             | Trung tâm Quốc gia Thông tin Công nghệ Sinh học (Mỹ) |
| NL           |                                                           | Nguyên liệu                                          |
| PSD          | Particle size distributions                               | Phân bố kích thước hạt                               |
| PVP          | Polyvinylpyrrolidone                                      |                                                      |
| TCVN         |                                                           | Tiêu chuẩn Việt Nam                                  |
| w            | Weight                                                    | Khối lượng                                           |
| v            | Volume                                                    | Thể tích                                             |

## DANH MỤC CÁC BẢNG

|                                                                                                              | Trang |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Bảng 2.1. Các mức điều kiện thí nghiệm tối ưu công đoạn chiết.....                                           | 34    |
| Bảng 2.2. Ma trận quy hoạch thực nghiệm tối ưu công đoạn chiết.....                                          | 34    |
| Bảng 2.3. Các mức điều kiện thí nghiệm tối ưu công đoạn sấy phun.....                                        | 40    |
| Bảng 2.4. Ma trận quy hoạch thực nghiệm tối ưu công đoạn sấy phun.....                                       | 41    |
| Bảng 2.5. Tiêu chuẩn xác định độ tan của bột .....                                                           | 48    |
| Bảng 2.6. Chỉ tiêu cảm quan của nước rau má.....                                                             | 50    |
| Bảng 2.7. Danh mục máy và thiết bị nghiên cứu .....                                                          | 51    |
| Bảng 3.1. Kết quả tương đồng vùng matK mẫu nghiên cứu với trình tự có sẵn trên NCBI .....                    | 55    |
| Bảng 3.2. Sự tương đồng vùng ITS giữa mẫu nghiên cứu và các trình tự có sẵn trên NCBI.....                   | 57    |
| Bảng 3.3. Hàm lượng một số hợp chất có hoạt tính sinh học của rau má thu mẫu tại Nha Trang - Khánh Hòa ..... | 59    |
| Bảng 3.4. Thành phần sinh hóa cơ bản của rau má thu mẫu tại Nha Trang - Khánh Hòa .....                      | 59    |
| Bảng 3.5. Kết quả tối ưu hóa công đoạn chiết polyphenol và chlorophyll từ rau má ở .....                     | 90    |
| Bảng 3.6. Hệ số ý nghĩa của mô hình mục tiêu.....                                                            | 92    |
| Bảng 3.7. Độ tan và đặc tính của bột rau má với các loại chất mang .....                                     | 101   |
| Bảng 3.8. Kích thước và độ đa phân tán của bột rau má với các loại chất mang .....                           | 102   |
| Bảng 3.9. Kết quả phân tích nhiệt vi sai của bột rau má với các loại chất mang.....                          | 102   |
| Bảng 3.10. Kết quả tối ưu hóa công đoạn sấy phun tạo bột polyphenol, chlorophyll từ rau má.....              | 127   |
| Bảng 3. 11. Hệ số ý nghĩa của mô hình mục tiêu.....                                                          | 130   |
| Bảng 3.12. Kết quả phân tích cảm quan, độ ẩm và độ tan của bột rau má.....                                   | 137   |
| Bảng 3.13. Kết quả kiểm nghiệm kim loại nặng và vi sinh vật của bột rau má.....                              | 137   |



## DANH MỤC CÁC HÌNH

|                                                                                                                         | Trang |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Hình 1.1. Hình thái cây rau má.....                                                                                     | 3     |
| Hình 1.2. Cấu trúc cơ bản nhóm flavonoid .....                                                                          | 8     |
| Hình 1.3. Một số hợp chất phổ biến nhóm flavonoid.....                                                                  | 10    |
| Hình 1.4. Hợp chất cơ bản nhóm acid phenolic .....                                                                      | 10    |
| Hình 1.5. Một số hợp chất phổ biến nhóm acid phenolic.....                                                              | 11    |
| Hình 1.6. Công thức phân tử chlorophyll.....                                                                            | 14    |
| Hình 2.1. Hình ảnh rau má sấy khô.....                                                                                  | 26    |
| Hình 2.2. Sơ đồ cách tiếp cận các nội dung nghiên cứu .....                                                             | 27    |
| Hình 2.3. Bố trí thí nghiệm xác định độ tuổi thu hoạch rau má ở .....29                                                 |       |
| Hình 2.4. Bố trí thí nghiệm xác định dung môi và phương thức chiết.....                                                 | 30    |
| Hình 2.5. Bố trí thí nghiệm xác định nồng độ dung môi.....                                                              | 31    |
| Hình 2.6. Bố trí thí nghiệm xác định nhiệt độ chiết .....                                                               | 32    |
| Hình 2.7. Bố trí thí nghiệm xác định thời gian chiết.....                                                               | 32    |
| Hình 2.8. Bố trí thí nghiệm xác định tỷ lệ DM/NL .....                                                                  | 33    |
| Hình 2.9. Bố trí thí nghiệm tối ưu chiết polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má.....            | 34    |
| Hình 2.10. Bố trí thí nghiệm xác định chất mang .....                                                                   | 36    |
| Hình 2.11. Bố trí thí nghiệm xác định tốc độ sấy phun .....                                                             | 37    |
| Hình 2.12. Bố trí thí nghiệm xác định nồng độ chất mang .....                                                           | 38    |
| Hình 2.13. Bố trí thí nghiệm xác định nhiệt độ sấy phun.....                                                            | 39    |
| Hình 2.14. Bố trí thí nghiệm xác định áp suất kh ín ín.....                                                             | 40    |
| Hình 2.15. Bố trí thí nghiệm tối ưu sấy phun.....                                                                       | 41    |
| Hình 2.16. Bố trí thí nghiệm xác định công thức đồ uống nước rau má.....                                                | 43    |
| Hình 2.17. Bố trí thí nghiệm đánh giá biến động hàm lượng polyphenol và chlorophyll của bột rau má trong bảo quản ..... | 43    |
| Hình 3.1. Phổ LC-HRMS phân tích dịch chiết rau má.....                                                                  | 61    |

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| H ình 3.2. Ảnh hưởng thời gian thu hoạch đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong dịch chiết rau m á.....                 | 62 |
| H ình 3.3. Ảnh hưởng thời gian thu hoạch đến hoạt t ình chống oxy h óa tổng và hoạt t ình khử sắt của dịch chiết rau m á.....  | 62 |
| H ình 3.4. Ảnh hưởng thời gian thu hoạch đến hoạt t ình bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết rau m á.....                         | 63 |
| H ình 3.5. Ảnh hưởng của dung môi và phương thức chiết đến hàm lượng polyphenol trong dịch chiết rau m á.....                  | 68 |
| H ình 3.6. Ảnh hưởng của dung môi và phương thức chiết đến hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết rau m á.....                 | 68 |
| H ình 3.7. Ảnh hưởng của dung môi và phương thức chiết đến hoạt t ình chống oxy h óa tổng của dịch chiết rau m á.....          | 69 |
| H ình 3.8. Ảnh hưởng của dung môi và phương thức chiết đến hoạt t ình khử sắt của dịch chiết rau m á.....                      | 69 |
| H ình 3.9. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong dịch chiết rau m á.....                 | 74 |
| H ình 3.10. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hoạt t ình chống oxy h óa tổng và hoạt t ình khử sắt của dịch chiết rau m á..... | 74 |
| H ình 3.11. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong dịch chiết rau m á.....                       | 78 |
| H ình 3.12. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt t ình chống oxy h óa tổng và hoạt t ình khử sắt của dịch chiết rau m á.....        | 78 |
| H ình 3.13. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong dịch chiết rau m á.....                | 82 |
| H ình 3.14. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hoạt t ình chống oxy h óa tổng và hoạt t ình khử sắt của dịch chiết rau m á..... | 82 |
| H ình 3.15. Ảnh hưởng của tỷ lệ DM/NL đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong dịch chiết rau m á.....                    | 86 |
| H ình 3.16. Ảnh hưởng của tỷ lệ DM/NL đến hoạt t ình chống oxy h óa tổng và hoạt t ình khử sắt của dịch chiết rau m á.....     | 87 |

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Hình 3.17. Các mặt đáp ứng tối ưu thực nghiệm .....                                                                           | 93  |
| Hình 3.18. Bề mặt tối ưu trùng lắp các mặt đáp ứng.....                                                                       | 93  |
| Hình 3.19. Sắc ký đồ phân tích HPLC asiaticoside trong dịch chiết rau má.....                                                 | 94  |
| Hình 3.20. Sắc ký đồ phân tích HPLC quercetin trong dịch chiết rau má.....                                                    | 95  |
| Hình 3.21. Sắc ký đồ phân tích HPLC acid rosmarinic trong dịch chiết rau má.....                                              | 95  |
| Hình 3.22. Ảnh hưởng số lần chiết đến hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết rau má..... | 96  |
| Hình 3.23. Ảnh hưởng của chất mang đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong bột rau má.....                              | 97  |
| Hình 3.24. Ảnh hưởng của chất mang đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của bột rau má.....                  | 98  |
| Hình 3.25. Hình ảnh bột rau má với chất mang gum arabic dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1.000x .....             | 98  |
| Hình 3.26. Hình ảnh bột rau má với chất mang dextrin dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1.000x .....                | 98  |
| Hình 3.27. Hình ảnh bột rau má với chất mang maltodextrin dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1.000x .....           | 99  |
| Hình 3.28. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má với chất mang dextrin.....                         | 99  |
| Hình 3.29. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má với chất mang maltodextrin.....                    | 99  |
| Hình 3.30. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má với chất mang gum arabic .....                     | 100 |
| Hình 3.31. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má không có chất mang .....                                                           | 100 |
| Hình 3.32. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má với chất mang dextrin .....                                                        | 100 |
| Hình 3.33. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má với chất mang maltodextrin .....                                                   | 101 |
| Hình 3.34. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má với chất mang gum arabic.....                                                      | 101 |
| Hình 3.35. Ảnh hưởng của tốc độ đĩa phun đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong bột rau má.....                        | 107 |

|                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Hình 3.36. Ảnh hưởng của tốc độ đĩa phun đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của bột rau má.....         | 107 |
| Hình 3.37. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má khi tốc độ đĩa phun 15.000 v/p .....            | 108 |
| Hình 3.38. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má khi tốc độ đĩa phun 15.000 v/p .....                                            | 108 |
| Hình 3.39. Ảnh hưởng của nồng độ gum arabic đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong bột rau má.....                  | 112 |
| Hình 3.40. Ảnh hưởng của nồng độ gum arabic đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của bột rau má.....      | 112 |
| Hình 3.41. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má khi nồng độ gum arabic 75 g/l.....              | 113 |
| Hình 3.42. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má khi nồng độ gum arabic 75 g/l .....                                             | 113 |
| Hình 3.43. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong bột rau má.....                        | 117 |
| Hình 3.44. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của bột rau má.....            | 117 |
| Hình 3.45. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má khi nhiệt độ sấy phun 180°C .....               | 118 |
| Hình 3.46. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má khi nhiệt độ sấy phun 180°C .....                                               | 118 |
| Hình 3.47. Ảnh hưởng của áp suất khí nén đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong bột rau má.....                     | 122 |
| Hình 3.48. Ảnh hưởng của áp suất khí nén đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của bột rau má.....         | 122 |
| Hình 3.49. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má khi áp suất kh ín ín 3 kg/cm <sup>2</sup> ..... | 123 |
| Hình 3.50. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má khi áp suất kh ín ín 3 kg/cm <sup>2</sup> .....                                 | 123 |
| Hình 3.51. Các mặt đáp ứng tối ưu thực nghiệm .....                                                                        | 131 |
| Hình 3.52. Bề mặt tối ưu trùng lấp các mặt đáp ứng.....                                                                    | 131 |
| Hình 3.53. Sắc ký đồ phân tích HPLC asiaticoside trong bột rau má.....                                                     | 132 |

|                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| H ình 3.54. Sắc ký đồ ph ân t ích HPLC quercetin trong bột rau m á.....                                             | 133 |
| H ình 3.55. Sắc ký đồ ph ân t ích HPLC acid rosmarinic trong bột rau m á.....                                       | 133 |
| H ình 3.56. Quy tr ình sấy phun tạo bột rau m áth à .....                                                           | 134 |
| H ình 3.57. Ảnh chụp bột sấy phun và ảnh của bột rau m á dưới k ình hiển vi quang học với độ phóng đại 1.000x ..... | 135 |
| H ình 3.58. Ảnh của bột rau m á dưới k ình hiển vi điện tử qu ết (SEM).....                                         | 136 |
| H ình 3.59. Phổ ph ân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau m á ở điều kiện sấy phun tối ưu .....     | 136 |
| H ình 3.60. Phổ nhiệt vi sai của bột rau m á ở điều kiện sấy phun tối ưu.....                                       | 136 |
| H ình 3.61. Ảnh hưởng nồng độ bột rau má và đường saccharose đến điểm cảm quan .....                                | 138 |
| H ình 3.62. Biến động hàm lượng polyphenol trong bột rau m á khi bảo quản.....                                      | 140 |
| H ình 3.63. Biến động hàm lượng chlorophyll trong bột rau m á khi bảo quản .....                                    | 140 |
| H ình 3.64. Biến động hoạt t ình chống oxy h óa tổng của bột rau m á khi bảo quản ....                              | 141 |
| H ình 3.65. Biến động hoạt t ình khử sắt của bột rau m á khi bảo quản .....                                         | 141 |

## TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

**Đề tài luận án:** “Nghiên cứu thu nhận polyphenol, chlorophyll từ rau má thìa (*Centella asiatica* (L.) Urb) và ứng dụng trong đồ uống”.

**Chuyên ngành:** Công nghệ Sau thu hoạch, **Mã số:** 9540104

**Nghiên cứu sinh:** Đặng Bửu Tùng Thiện, **Khóa:** 2015

**Cán bộ hướng dẫn khoa học:**

1. PGS. TS. Ngô Đăng Nghĩa

2. PGS. TS. Vũ Ngọc Bội

**Cơ sở đào tạo:** Trường Đại học Nha Trang

**Nội dung:** Các kết quả mới được bổ sung vào lĩnh vực nghiên cứu:

1) Luận án đã tiến hành định danh loài rau má thìa trồng tại Nha Trang bằng kỹ thuật giải trình tự gen cho thấy mức độ tương đồng DNA là 98,44% - 98,76% so với trình tự vùng matK và 98,21-100% so với trình tự của vùng ITS của loài *Centella asiatica* có trên NCBI.

2) Luận án đã đánh giá thành phần hóa học chủ yếu của rau má thìa trồng tại Nha Trang theo thời gian phát triển cho thấy thời gian thu hoạch thích hợp để rau má thìa có hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa tổng đạt mức cao nhất là thời điểm 75 ngày tuổi. Tại thời điểm 75 ngày tuổi, rau má thìa có hàm lượng polyphenol: 13,56 mg acid galic/g chất khô, hàm lượng chlorophyll: 4,73 mg/g chất khô, hoạt tính chống oxy hóa tổng là 6,06 mg acid ascorbic/g chất khô, hoạt tính khử sắt: 22,89 mg FeSO<sub>4</sub>/g chất khô và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH: 79,48 %. Ngoài ra trong rau má thìa còn chứa một số hợp chất có hoạt tính sinh học như triterpenoid, asiaticoside, quercetin, acid rosmarinic.

3) Luận án đã nghiên cứu chiết polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thìa theo phương pháp ngâm chiết có hỗ trợ sóng siêu âm với dung môi chiết ethanol 95% và xác định được các điều kiện tối ưu cho quá trình chiết: nhiệt độ chiết là 63°C, thời gian chiết là 97 phút, tỷ lệ DM/NL là 52 ml/g. Ở điều kiện tối ưu, dịch chiết rau má thìa có hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng, hoạt tính khử sắt và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH tương ứng là 19,18±0,72 mg acid galic/g chất khô, 7,45±0,16 mg/g chất khô, 13,81±0,31 mg acid ascorbic/g chất khô, 37,31±1,32 mg FeSO<sub>4</sub>/g chất khô và 81,66±3,4%.

4) Luận án đã nghiên cứu sấy phun tạo bột rau má thìa chứa polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa và xác định được các điều kiện thích hợp cho quá trình sấy phun: chất mang là gum arabic, vận tốc đĩa phun: 20.000 v/p, nồng độ gum arabic: 73 g/l, nhiệt độ sấy phun: 177°C, áp suất khí nén: 3,1 kg/cm<sup>2</sup>. Bột rau má thìa sấy phun theo các thông số tối ưu có hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt tương ứng là 28,15±1,13 mg acid galic/g, 10,62±0,27 mg/g, 19,47±0,42 mg acid ascorbic/g và 59,50±2,08 mg FeSO<sub>4</sub>/g, độ ẩm: 5,25%, kích thước hạt trung bình: 137,6 nm, nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử và hoạt tính lần lượt là 168,35°C, 297,09°C, 426,38°C.

5) Luận án đã nghiên cứu bảo quản bột rau má và nhận thấy sau 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ 30°C và 5°C, bột rau má thìa có mức độ suy giảm hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng, hoạt tính khử sắt tương ứng ở nhiệt độ 30°C và 5°C là (21,3%; 16,1%; 21,6%, 25,1%) và (15,3%; 12,2%; 19,0%; 17,3 %).

6) Luận án đã xác định công thức phối trộn tạo đồ uống rau má thìa: tỷ lệ bột rau má thìa: 4%, đường saccharose: 4%. Đồ uống rau má phối trộn theo công thức trên có hoạt tính chống oxy hóa tổng: 67,23±1,44 mg acid ascorbic/100 ml, hoạt tính khử sắt: 195,63±2,99 mg FeSO<sub>4</sub>/100 ml và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH: 64,73±1,47 %.

**CÁN BỘ HƯỚNG DẪN**

**NGHIÊN CỨU SINH**

**PGS. TS. Ngô Đăng Nghĩa**

**PGS. TS. Vũ Ngọc Bội**

**Đặng Bửu Tùng Thiện**

## NEW CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

**Name of thesis:** “Research on obtaining polyphenols, chlorophyll from pennywort (*Centella asiatica* (L.) Urb), and application in beverages”.

**Major:** Post-Harvest technology, **Code:** 9540104

**The student of Ph.D.** Dang Buu Tung Thien, **Course:** 2015

**Science instructors:**

1. Assoc. Prof. Dr. Ngo Dang Nghia      2. Assoc. Prof. Dr. Vu Ngoc Boi

**Training institution:** Nha Trang University

**Key Findings:**

1) The thesis has identified the pennywort by DNA gene analysis. The results show that the DNA of the pennywort collected in Nha Trang - Khanh Hoa has high similarity (98,44% - 98,76%) with *matK* gene and (98,21-100%) with *ITS* gene of *Centella asiatica* on NCBI.

2) The thesis has evaluated the main chemical composition of pennywort collected in Nha Trang - Khanh Hoa. Polyphenol content, chlorophyll content, total antioxidant activity, reduction power activity and DPPH free radical scavenging activity are 13,56 mg gallic acid/g dry weight, 4,73 mg/g dry weight, 6,06 mg ascorbic acid/g dry weight, 22,89 mg FeSO<sub>4</sub>/g dry weight and 79,48 %, respectively. In addition, pennywort also contains biologically active compounds such as triterpenoids, asiaticoside, quercetin, rosmarinic acid.

3) The thesis has extract polyphenols, chlorophyll with antioxidant activity from pennywort by ultrasonic-assisted extraction method in 95% ethanol and estimated optimal extraction conditions of temperature 63°C, time 97 min and the solvent to material 52 ml/g ratio. The extracts of pennywort contained polyphenols, chlorophyll with antioxidant activities of total antioxidant activity, reduction power activity and DPPH free radical scavenging activity that were 19,18±0,72 mg gallic acid/g dry weight, 7,45±0,16 mg/g dry weight, 13,81±0,31 mg ascorbic acid/g dry weight, 37,31±1,32 mg FeSO<sub>4</sub>/g dry weight and 81,66±3,4%, respectively.

4) The thesis has studied spray drying to create pennywort powder containing polyphenols, chlorophyll with antioxidant activity. The suitable spray drying parameters were gum arabic as a carrier material and the spray disc speed of 20.000 rpm. The optimal spray drying conditions were gum arabic concentration 73 g/l, temperature 177°C, pressure 3,1 kg/cm<sup>2</sup>. Pennywort powder contained polyphenol, chlorophyll with total antioxidant activity and reduction power activity are 28,15±1,13 mg gallic acid/g, 10,62±0,27 mg/g, 19,47±0,42 mg ascorbic acid/g and 59,50±2,08 mg FeSO<sub>4</sub>/g, respectively. Pennywort powder represented low moisture content of 5,25%, average particle size of 137,6 nm and had good thermal properties such as temperature of dehydration absorption, temperature of decomposition of functional groups, temperature of complete decomposition being 168,35°C, 297,09°C, and 426,38°C, respectively.

5) The thesis has studied the storage of pennywort powder for 12 months at the temperature of 30°C and 5°C. The results showed that pennywort powder stored at 5°C changed biochemical compounds more slowly than stored at 30°C. After 12 months of storage at 30°C and 5°C, reducing polyphenol content, chlorophyll content, total antioxidant activity, reduction power activity being (21,3%; 16,1%; 21,6%, 25,1%) and (15,3%; 12,2%; 19,0%; 17,3%), respectively.

6) The thesis has determined the formula for mixing to create pennywort juice with pennywort powder 4% and sucrose 4%. Pennywort juice represented good sensory properties and total antioxidant activity, reduction power activity, free radical scavenging activity being 67,23±1,44 mg ascorbic acid/100 ml, 195,63±2, 99 mg FeSO<sub>4</sub>/100 ml, and 64,73±1,47 %.

SCIENCE INSTRUCTORS

Ph.D. Student

## MỞ ĐẦU

Rau m á th à (*Centella asiatica* (L.) Urban) là loài rau quen thuộc, phổ biến trong đời sống, hiện nay chúng được trồng thương mại ở những vùng rau chuyên canh ở nhiều địa phương như Khánh Hòa, Quảng Bình, Thừa Thiên Huế, Quảng Nam, Bình Định, Tiền Giang, ...

Trong thành phần các hợp chất sinh học của rau má có nhiều nhóm chất như protein, glucid, vitamin, khoáng chất (kali, magie, sắt, kẽm, ...) và đặc biệt giàu các loại vitamin (A, C, B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>) [128, 184]. Mặt khác, trong rau má còn có nhiều hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính kháng nấm, trị mụn nhọt, phòng ngừa bệnh tiểu đường, tăng cường miễn dịch, bảo vệ các tổn thương thần kinh, bảo vệ da, chống các tia bức xạ, tăng cường trí nhớ... [172]. Rau m á từ lâu trong y học cổ truyền được sử dụng như một loại dược liệu dùng chữa bệnh. Có được các đặc điểm dược lý trên là nhờ trong rau má có các hợp chất có hoạt tính sinh học như polyphenol, flavanoid, triterpenoid, alkaloid, glycoside, chlorophyll...[128, 184].

Ngày nay con người đang có xu hướng tìm và sử dụng các hợp chất có nguồn gốc từ thực vật, có hoạt tính sinh học để làm thực phẩm tăng cường sức khỏe, với mong muốn giảm thiểu nguy cơ mắc bệnh, phòng ngừa các bệnh mãn tính và bệnh hiểm nghèo [184], trong đó có các sản phẩm thực phẩm từ rau má th à. Gần đây có một số nghiên cứu về polyphenol trên rau má th à nhưng chủ yếu tập trung nghiên cứu một số nhóm chất thuộc nhóm terpenoid (asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid, madecassoside...) [16, 17, 133]. Tuy vậy, hiện chưa có một công trình công bố nào công bố nghiên cứu tách chiết, tạo bột và ứng dụng các hợp chất polyphenol, chlorophyll với hoạt tính chống oxy hóa từ rau má th à trong đồ uống.

Các tỉnh miền Trung và Nam Bộ, do thời tiết thường nắng nóng nên người dân thường xuyên sử dụng các loại nước ép trái cây trong đó có nước ép rau m á theo h ình thức xay và ép truyền thống. Hình thức mua bán, sử dụng nước ép tr ả c ây v à rau m á truyền thống của người dân hiện cũng nảy sinh những vấn đề nhất định về nguy cơ không đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm. Mặt khác, nước ép trái cây và rau má truyền thống do không được chế biến đúng cách nên không thể lưu giữ để sử dụng trong nhiều ngày dẫn đến làm giảm khả năng phân phối và lưu thông sản phẩm trên thị trường. Do vậy, việc nghiên cứu thu nhận dịch chiết từ c ây rau m á th à v à nghiên cứu tạo bột polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má th à bằng kỹ thuật hiện



đại, đáp ứng yêu cầu vệ sinh an toàn thực phẩm, dễ bảo quản, sử dụng để định hướng dùng làm đồ uống thay thế cho nước ép rau má truyền thống là hoàn toàn cần thiết. Do vậy, tôi thực hiện luận án: “*Nghiên cứu thu nhận polyphenol, chlorophyll từ rau má thìa (Centella asiatica (L.) Urb) và ứng dụng trong đồ uống*”.

**\* Mục tiêu của luận án:** Xây dựng được quy trình thu nhận polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thìa (*Centella asiatica (L.) Urb*) trồng tại Nha Trang - Khánh Hòa và tạo được bột rau má sấy phun chứa các hợp chất polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thìa nhằm định hướng ứng dụng trong đồ uống thay thế cho các sản phẩm nước uống rau má truyền thống.

**\* Nội dung của luận án:**

1) *Nghiên cứu xác định điều kiện tối ưu cho quá trình tách chiết polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thìa trồng tại Nha Trang - Khánh Hòa.*

2) *Nghiên cứu xác định điều kiện tối ưu cho quá trình sấy phun tạo bột rau má thìa chứa polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa.*

3) *Nghiên cứu bảo quản bột rau má thìa chứa polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa.*

**\* Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của luận án**

- **Ý nghĩa khoa học:** Luận án đã cung cấp kết quả nghiên cứu mới về thành phần hóa học chủ yếu, hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll và các hoạt tính chống oxy hóa của rau má được trồng tại Nha Trang - Khánh Hòa. Hơn nữa, kết quả của luận án cũng cung cấp các dữ liệu khoa học về kỹ thuật sấy phun tạo bột rau má chứa polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa sử dụng làm đồ uống trong lĩnh vực thực phẩm. Luận án có thể được dùng làm nguồn tài liệu mới phục vụ cho nghiên cứu, giảng dạy về polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thìa nổi tiếng và thực vật nổi chung.

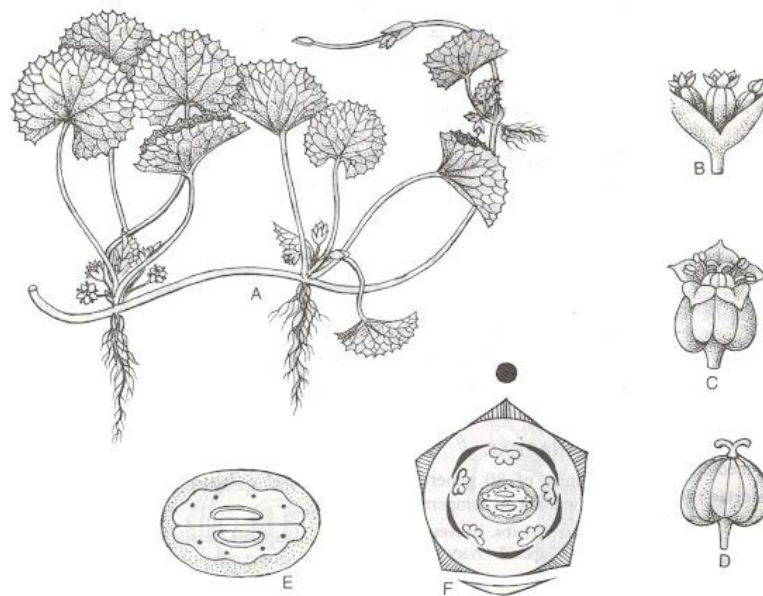
- **Ý nghĩa thực tiễn:** Kết quả nghiên cứu là cơ sở để phát triển và thương mại hóa sản phẩm đồ uống từ rau má thìa dưới dạng bột sấy phun chứa polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa, đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm, tiện lợi trong sử dụng, dễ bảo quản và pha trộn thay thế cho nước ép rau má vỉa hè trong giải nhiệt và tăng khả năng thải độc, giúp tăng cường sức khỏe của người tiêu dùng.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. RAU MÁ THÌA

#### 1.1.1. Giới thiệu về rau má thìa

Rau má thìa (*Centella asiatica* (L), Urban) là loài thực vật có đặc điểm thân bò lan trên đất, màu xanh lục hay lục ánh đỏ, có rễ ở các mấu, lá hình thận màu xanh với cuống dài và phần đỉnh lá tròn, kết cấu lá trơn nhẵn với các gân dạng lưới hình chên vệt, các lá mọc ra từ cuống dài khoảng 5-20 cm và có các cụm hoa đơn mọc ở kẽ lá gồm 1 đến 5 hoa nhỏ. Hoa rau má có màu từ ánh hồng tới đỏ, mọc thành các tán nhỏ tròn nằm gần mặt đất. Mỗi hoa được bao phủ một phần trong hai lá bắc màu xanh. Các hoa lưỡng tính này có đường kính nhỏ khoảng 3mm có trụ trung hoa, hoa có 5 nhị và 2 vòi nhụy.



**Hình 1.1. Hình thái cây rau má [28]**

(A) Cây rau má thìa, (B) Cụm hoa, (C) Hoa, (D) Quả, (E) Quả cắt ngang, (F) Hoa đực

Quả có hình mặt lưới dày đặc, đây là điểm phân biệt rau má thìa với các loài trong chi *Hydrocotyle*, có quả với bề mặt trơn, sọc hay giống như mụn cơm. Bộ rễ bao gồm các thân rễ, mọc thẳng đứng, chúng có màu trắng kem và được che phủ bằng các lông tơ ở rễ [6, 13, 27].

Rau má có tên khoa học là *Centella asiatica* (L.) Urb. (Hoặc *Hydrocotyle asiatica* (L.) Urb.), chúng thuộc giới *Plantae*, Ngành *Magnoliophyta*, lớp *Magnoliopsida*, bộ *Apiales*, họ *Apiaceae*, phân họ *Mackinalyoideae*, chi *Centella*, loài *Centella asiatica* [187].

Ở các địa phương, rau má cũng có nhiều tên khác nhau như: ở Việt Nam có tên *tích huyết thảo* hoặc *liên tiền thảo*, ở Lào là *phanok*, ở Campuchia là *trachiek kranh*, ở Myanma là *Trachiek-kranh*, ở Srilanka và Ấn Độ là *Gotu-kola* [5].

Căn cứ theo đặc điểm thực vật học, ở Việt Nam rau má được tìm thấy các loài như sau [5, 6, 13]:

- Rau má thài ( *Centella asiatica* (L.) Urb.);
- Rau má lông ( *Glechoma hederacea* L.);
- Rau má lá to ( *Hydrocotyle nepalensis* Hook);
- Rau má mỡ ( *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam);
- Cây rau má lá rau muống ( *Emilia sonchifolia* (Linn));
- Cây rau má lá sen ( *Hydrocotyle bonariensis*).

Rau má có nguồn gốc từ Australia, các đảo Thái Bình Dương, New Guinea, Melanesia, Malesia và Châu Á. Hiện nay rau má cũng phân bố nhiều ở các quốc gia Nam Á như Malaysia, Trung Quốc, Srilanka, Ấn độ, Việt nam, Lào, Campuchia, Indonesia... [110, 128].

Ở Việt Nam, rau má mọc tự nhiên khắp nơi từ vùng hải đảo, ven biển đến vùng núi ở độ cao dưới 1800m, thích hợp mọc ở những nơi ẩm ướt như thung lũng, bờ ruộng, ruộng... Vào mùa mưa ẩm, rau má sinh trưởng rất mạnh, nhanh và khỏe, ra hoa quả nhiều vào cuối mùa hè và đầu mùa thu, tái sinh tự nhiên chủ yếu từ hạt. Do có khả năng đề kháng khỏe, cây thường tạo thành từng mọc đám dày đặc.

Rau má thường được trồng trong khoảng thời gian từ 30-35 ngày là có thể thu hoạch lứa đầu tiên nhưng năng suất chưa cao vì cây chưa bò dày, năng suất cao thường từ lần thu hoạch thứ 2, thứ 3 [6].

Trong đời sống, rau má có thể được sử dụng hằng ngày như một loại rau ăn ở dạng nấu canh, luộc, ăn sống, xay làm nước giải khát, sản xuất thành các thức uống công nghiệp... [6].

Trong y học, rau má là thảo dược có tác dụng sát trùng, giải độc, thanh nhiệt, có tính bổ dưỡng cao. Rau má có nhiều khoáng chất, nhiều chất chống oxy hóa nên có thể sử dụng để cải thiện trí nhớ, tăng tuổi thọ, làm máu lưu thông tốt ở tĩnh mạch và mao

mạch, bảo vệ mặt trong của thành mạch và làm tăng tính đàn hồi của mạch máu. Dịch chiết rau m á có tác dụng sát trùng, làm chậm lão hóa và giảm huyết áp. Lugkana Mato và cộng sự đã nghiên cứu và cho rằng sử dụng lượng nhất định dịch chiết rau m á mỗi ngày trong 2 tháng, người già cải thiện rõ rệt khả năng nhớ và trạng thái tinh thần [90].

Trong đông y, rau m á được mô tả có vị hơi đắng, tính ngọt m á, có tác dụng thanh nhiệt giải độc, sát trùng, chữa thổ huyết, tả ly, mụn nhọt, rôm sảy... Toàn bộ cây rau m á có thể sử dụng làm thuốc ở dạng tươi hay phơi khô. Trong trường hợp sử dụng ở dạng khô, người ta thu hoạch cả cây, rửa sạch và phơi khô, khi sử dụng đem thái nhỏ sắc lấy nước uống [2, 5, 6, 13].

Các nghiên cứu cũng cho thấy, trong rau m á có nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học mạnh như hoạt tính bảo vệ tế bào da, ni ên mạc dạ dày, tế bào thần kinh, kháng nấm, kháng vi khuẩn và virus, có hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính khử sắt và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH. Ngoài ra, rau m á còn có tác dụng làm giảm phát triển khối u, giảm nguy cơ bệnh tiêu đường, giảm ung thư gan và ung thư vú... [27, 40]

Các hoạt chất trong rau m á có tác dụng lên một số biểu bì kích thích sự sùng hóa và tác dụng đến sự phân chia tế bào, qua đó làm nhanh lành vết thương ngoài da. Dịch chiết rau m á có tác dụng chống lại sự lão hóa da nên có thể thúc đẩy quá trình tái tạo tế bào da làm cho căng đầy sức sống, bề mặt da đầy đặn, săn chắc và đàn hồi tốt, không xảy ra hiện tượng gấp nếp và chảy nhão [27, 40, 99]. Asiaticosid và madecassosid trong dịch chiết rau m á kích thích sự hình thành Collagen I, madecassosid giúp tiết ra collagen III có tác dụng duy trì làn da mạnh khỏe, ngăn chặn có hiệu quả hiện tượng lão hóa [32, 99, 161] và có hoạt tính bảo vệ tế bào gan rất tốt [188].

Mặt khác, các nghiên cứu về tác dụng của rau m á đã ghi nhận tinh dầu rau m á có tác dụng ức chế được sự phát triển tế bào gây bệnh ung thư [46]. Khả năng chống oxy hóa và kháng ung thư của rau m á cũng được Frederico Pittella và cộng sự nghiên cứu cho thấy phenolic, flavonoid từ dịch chiết rau m á có khả năng chống lại khối u ác tính ở chuột (B16F1) và tế bào ung thư vú ở người (MDA MB-231) [53].

Nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy bột rau m á và dịch chiết của chúng có hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính khử sắt và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH cao. Hoạt tính chống oxy hóa của nó được so sánh tương đồng với các chất chống oxy hóa tổng hợp như BHT, BHA [183], tương đồng với  $\alpha$ -tocopherol [78]. Trong đó thành phần tổng

phenolic có độ tương quan mạnh với hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết, vậy nên có thể nói rằng thành phần tổng phenolic là tác nhân chính cho hoạt tính chống oxy hóa trong rau má [38, 78]. Các nghiên cứu cũng cho thấy, có sự tương quan mạnh giữa các hoạt tính khử sắt, hoạt tính bắt gốc tự do DPPH với thành phần phenolic trong rau má [23].

Rau má còn có tác dụng làm giảm tốc độ oxy hóa của lipid peroxidation (LPO), protein carbonyl (PCO) [100] và hydrogen peroxide [95] trong tế bào não chuột, qua đó có khả năng chống oxy hóa tế bào thần kinh, tức là tham gia bảo vệ tốt các tế bào thần kinh trước các tác nhân oxy hóa. Ngoài ra, nhờ đặc tính dịch chiết rau má có khả năng làm giảm hoạt động của enzyme  $\alpha$ -glucosidase và có hoạt tính bắt gốc tự do cao, nên có thể mở ra tiềm năng ứng dụng để làm thuốc điều trị bệnh tiểu đường và thuốc chống oxy hóa trong tương lai [144].

Những thành phần cho hoạt tính sinh học cao nhất đã được tìm thấy trong rau má là các polyphenol, terpenoid và flavonoid. Những hoạt tính quan trọng này ở rau má đã được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền và được nghiên cứu ứng dụng trong nhiều lĩnh vực ở đời sống hiện đại.

### **1.1.2. Thành phần hóa học của rau má**

Các nghiên cứu cho thấy thành phần hóa học của rau má khá đa dạng, phong phú và có hàm lượng thay đổi tùy theo vị trí địa lý, mùa vụ, điều kiện thổ nhưỡng [59].

Protein trong rau má thường chiếm hàm lượng rất thấp, chỉ khoảng 2% khối lượng khô [59]. Các amino acid chủ yếu được tìm thấy là alanine và serine, bên cạnh đó cũng có  $\gamma$ -aminobutyrate, aspartate, glutamate, histidine, lysine, threonine, arginine, leucine, iso-leucine, valine, methionine, tyrosine, phenylalanine, proline, cystine, glycine [27, 40]. Trong rau má thì carbohydrate có hàm lượng tương đối cao, có thể đạt đến 55% khối lượng khô của nó, trong đó chủ yếu chứa các thành phần như: glucose, mesoinositol, centellose, pectin, arabinogalactan [40].

Các polyphenol trong rau má được tìm thấy chủ yếu là hai nhóm flavonoid và acid phenolic [157]. Các hợp chất thuộc nhóm flavonoid đã được xác định như: apigenin và rutin [30], kaempferol, kaempferol-3-o- $\beta$ -d-glucuronide và Kaempferol 3-p-coumarate [184], quercetin, quercetin-3-o- $\beta$ -d-glucuronide, castillicetin, naringin và luteolin [40]. Các hợp chất thuộc nhóm acid phenolic như: acid rosmarinic, acid

chlorogenic, acid 3,4-di-o-caffeoyl quinic, acid 1,5-di-o-caffeoyl quinic, acid 3,5-di-o-caffeoyl quinic, acid 4,5-di-o-caffeoyl quinic, acid isochlorogenic [24, 40, 163].

Các nghiên cứu cũng cho thấy rằng, các terpenoid là thành phần quan trọng trong cây rau má, đặc biệt trong đó có nhóm triterpenes saponins là thành phần có hoạt tính sinh học tốt, xem như là cây thuốc được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực y học [172]. Các terpenoid phổ biến được tìm thấy trong rau má như triterpenes, asiaticoside, centelloside, madecassoside, brahmoside, brahminoside (saponin glycosides), acid asiatic, acid centellic, acid centoic, madecassic acid, acid terminolic and acid betulic [27, 68].

Các tinh dầu chủ yếu trong rau má là các hợp chất thuộc nhóm terpenoid như  $\beta$ -caryophyllene, trans  $\beta$ -farnesene, germacrene (sesquiterpenes),  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene [27, 68]. Hàm lượng chất béo trong rau má thấp, chiếm khoảng 1,5% khối lượng khô, chúng bao gồm các acid béo không no (acid linoleic, acid linolenic, acid oleic, ... và các acid béo no (acid palmitic, acid stearic...) [27, 68].

Trong rau má thìa cũng chứa nhiều loại vitamin, nhưng nhiều nhất là vitamin C, vitamin B2 và vitamin B3 với hàm lượng tương ứng khoảng 50, 0,2 và 0,1 (mg/100 gam khô) [59]. Bên cạnh đó trong rau má cũng có nhiều loại vitamin khác như: vitamin PP (acid nicotinic), tiền vitamin A ( $\beta$ -carotene),... [19, 40]. Người ta cũng thấy có nhiều khoáng chất trong rau má thìa, trong đó có hàm lượng kali cao (391 mg/100 gam khô), canxi (171 mg/100 gam khô) [59] và có nhiều khoáng chất khác như: photpho (P), sắt (Fe), magie (Mg), mangan (Mn), kẽm (Zn), natri (Na), đồng (Cu) [19, 40]. Trong thành phần hóa học của rau má cũng có cả một số hydrocotylin (một dạng alkaloid), vallerine (chất đắng), phytosterols (campesterol, sitosterol, stigmasterol), resin (8-acetoxycentellin, acid cadinenol, dotriacont-8-en-1-oic, 11-oxoheneicosanyl cyclohexane) [27, 40].

## **1.2. GIỚI THIỆU VỀ POLYPHENOL VÀ CHLOROPHYLL**

### **1.2.1. Polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của polyphenol**

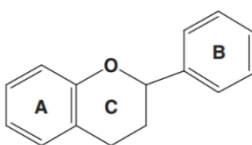
Polyphenol (hay còn gọi là polyhydroxylphenol) là các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên và tồn tại nhiều trong thực vật, mỗi đơn vị cơ bản (monomer) của chúng là một hoặc nhiều vòng phenol, trong đó các vòng benzen gắn với một hoặc nhiều nhóm hydroxyl (-OH) trực tiếp với nguyên tử cacbon trên vòng benzen, các đơn vị này liên kết với nhau tạo thành polyphenol.

Tùy thuộc vào số lượng và vị trí của các nhóm hydroxyl trên vòng benzen mà các tính chất lý hóa học hoặc hoạt tính sinh học thay đổi. Mặt khác, sự hiện diện của các nhóm hydroxyl trong phenol cũng quyết định đến tính chất vật lý của các phenol, qua đó cũng quyết định đến tính chất vật lý của các polyphenol. Các nhóm hydroxyl này hình thành liên kết hydro với các phenol khác và với nước, do đó các phenol có nhiệt độ sôi cao và hòa tan trong nước tốt hơn các hydrocacbon có cùng khối lượng phân tử [2].

Theo Singh A. và cộng sự (2011), polyphenol trong thực vật có chủ yếu 5 nhóm hợp chất sau: stilbenes, lignans, flavonoids, acid fllagic và acid phenolic [157].

Có nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học trên đối tượng rau má, cho đến nay có thể thấy các polyphenol của chúng chủ yếu tồn tại ở hai nhóm flavonoid và acid phenolic.

\* **Flavonoid:** là một nhóm phổ biến của các hợp chất polyphenol tự nhiên, là nhóm hợp chất phổ biến nhất trong trái cây, rau quả và đồ uống có nguồn gốc từ thực vật. Đến nay có hơn 8.000 hợp chất thuộc nhóm flavonoid được xác định, nhiều hợp chất flavonoid đem lại màu sắc hấp dẫn cho hoa, trái cây và lá. Ở thực vật, các hợp chất này có khả năng bảo vệ chống lại tia cực tím, mầm bệnh và các loài động vật ăn lá [26, 50, 112].



**Hình 1.2. Cấu trúc cơ bản nhóm flavonoid**

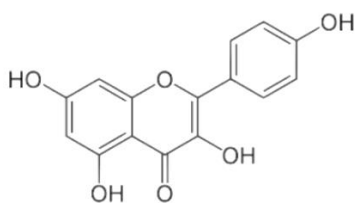
Các flavonoid được quan tâm vì chúng có nhiều lợi ích dinh dưỡng và còn được xem là nhóm hoạt chất dùng trong trị liệu. Cụ thể, chúng có khả năng tăng cường sức khỏe, sức đề kháng, ngăn ngừa bệnh tật, ung thư, có tính kháng viêm, bảo vệ tĩnh mạch, làm giảm xơ vữa động mạch [26, 121].

Flavonoid là dẫn xuất benzo- $\gamma$ -pyrone của phenolic và vòng pyrane, có cấu trúc phổ biến là khung flavonoid cơ bản liên kết với các nhóm hydroxyl (-OH) và methoxyl (-O-CH<sub>3</sub>-). Các nhóm chính của flavonoid có 3 vòng: vòng thơm A được liên kết hợp nhất với vị vòng C, vòng thơm B cũng được liên kết với vị vòng C nhờ liên kết C-C.

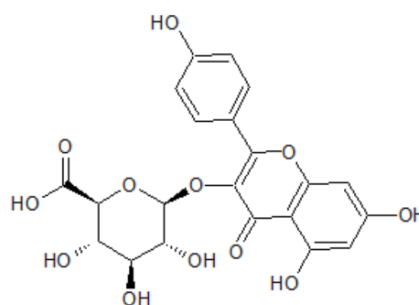
Flavonoid khác nhau nhờ sự sắp xếp của các nhóm bên hydroxyl, methoxyl, glycosid và nhờ sự liên kết giữa các vòng A và B. Dựa trên sự khác biệt về cấu trúc cụ thể, flavonoid được phân loại thành 6 phân nhóm: flavonol, flavones, flavanone, flavanol, anthocyanidin và isoflavone.

Các nhóm hydroxyl được tìm thấy trên cả 3 vòng A, B và C tạo điều kiện để chúng có thể liên kết với carbohydrate. Các flavonoid liên kết với một hoặc nhiều phân tử glucose gọi là glycoside flavonoid, các flavonoid không liên kết với phân tử glucose gọi là aglycones.

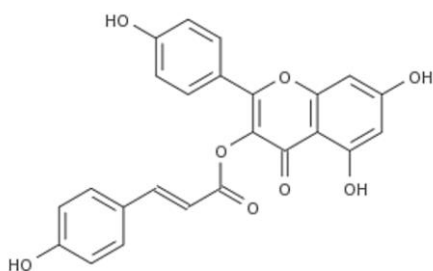
Trong rau má thì có một số hợp chất phổ biến thuộc nhóm flavonoid đã được xác định là kaempferol, kaempferol-3-o- $\beta$ -d-glucuronide, kaempferol 3-p-coumarate, quercetin, quercetin-3-o- $\beta$ -d-glucuronide, castillicetin, apigenin, rutin, luteolin, naringin... [27, 139, 184].



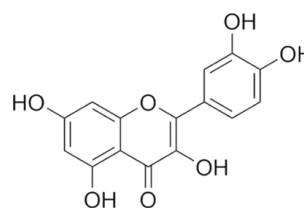
Kaempferol



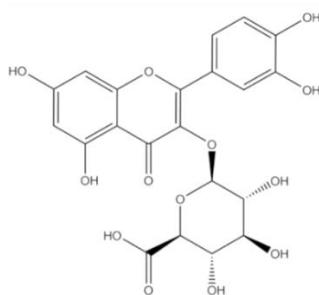
Kaempferol-3-o- $\beta$ -d-glucuronide



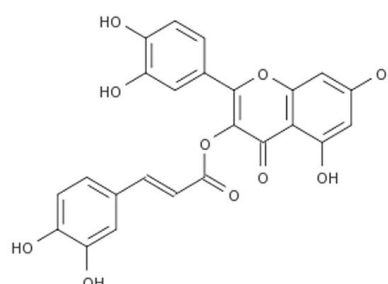
Kaempferol 3-p-coumarate



Quercetin

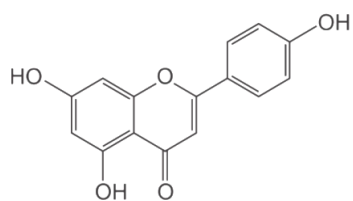


Quercetin-3-o- $\beta$ -d-glucuronide

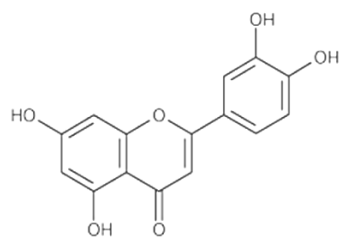


Castillicetin

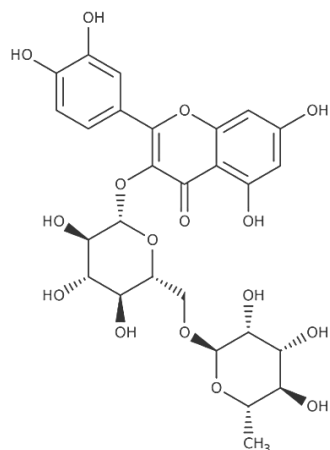




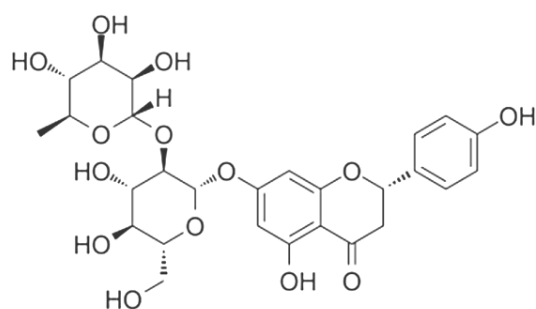
Apigenin



Luteolin



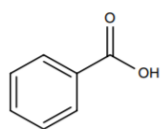
Rutin



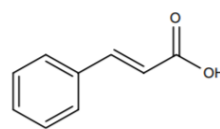
Naringin

**Hình 1.3. Một số hợp chất phổ biến nhóm flavonoid**

\* **Acid phenolic:** Gồm những hợp chất là dẫn xuất của acid benzoic và acid cinnamic. Các dẫn xuất của acid benzoic phổ biến nhất là p-hydroxybenzoic, vanillic, syringic, acid gallic và các dẫn xuất acid cinnamic phổ biến bao gồm p-coumaric, caffeic, ferulic và acid sinapic. Các dẫn xuất này khác nhau về mức độ hydroxyl hóa và methoxyl hóa vòng thơm [174].



Acid benzoic



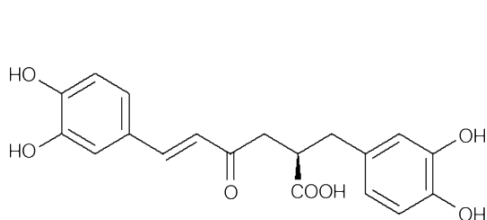
Acid cinnamic

**Hình 1.4. Hợp chất cơ bản nhóm acid phenolic**

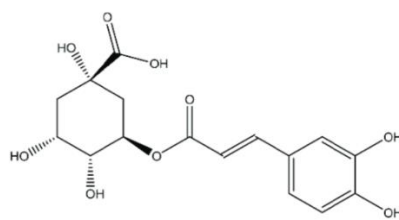
Các acid phenolic có hoạt tính chống oxy hóa cao và có mặt trong hầu hết các loại ngũ cốc, rau và quả. Trong đó acid caffeic có nhiều nhất trong một số loại trái cây dạng quả mọng [104], trong khi acid coumaric thường có tỷ lệ thấp hơn [142] và acid ferulic chiếm 90% tổng lượng acid phenolic trong ngũ cốc [97].

Những acid phenolic có thể ở dạng tự do hoặc liên kết trong cấu trúc. Acid phenolic dạng tự do thường tồn tại ở lớp vỏ quả, ở phần áo hạt và acid phenolic ở dạng liên kết thì liên kết với thành tế bào [138].

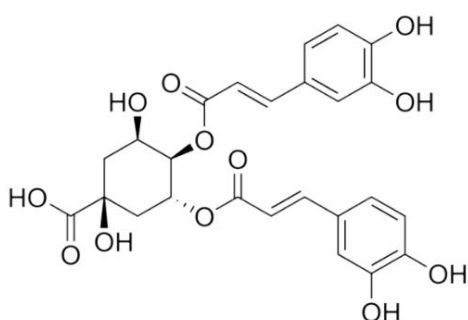
Trong rau má thì, một số acid phenolic đã được tìm thấy như acid rosmarinic, acid chlorogenic, acid 3,4-di-o-caffeoylquinic, acid 1,5-di-o-caffeoylquinic, acid 3,5-di-o-caffeoylquinic, acid 4,5-di-o-caffeoylquinic, acid isochlorogenic... [24, 40, 163].



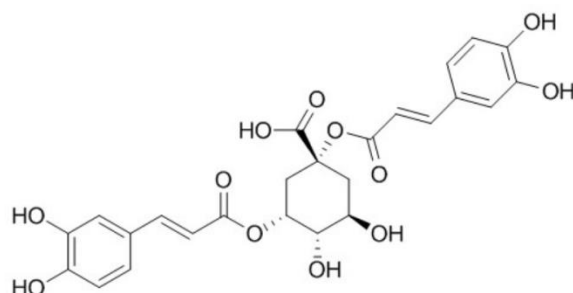
Acid rosmarinic



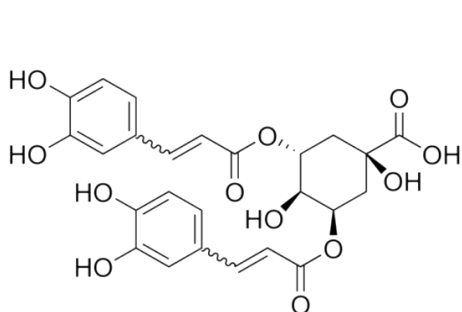
Acid chlorogenic



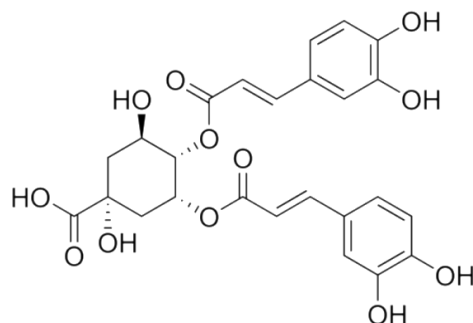
Acid 3,4-di-o-caffeoylquinic



Acid 1,5-di-o-caffeoylquinic



Acid 3,5-di-o-caffeoylquinic



Acid 4,5-di-o-caffeoylquinic

### H ình 1.5. Một số hợp chất phổ biến nhóm acid phenolic

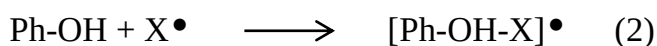
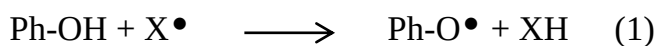
Các polyphenol được biết đến là các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa mạnh, có khả năng chuyển hóa các gốc tự do, chất oxy hóa thành các chất trung hòa. Hàng ngày cơ thể chúng ta tiếp thu rất nhiều các gốc tự do và chất oxy hóa, chúng được tạo ra từ các quá trình chuyển hóa tế bào hoặc tiếp nhận từ các nguồn bên ngoài như: ô nhiễm, khói thuốc lá, bức xạ, thuốc... Các gốc tự do và chất oxy hóa trong cơ thể đóng vai trò kép, có thể có ích hoặc có hại. Xét về mặt có hại, khi tiếp nhận nhiều các gốc tự do và chất oxy hóa thì cơ thể sẽ không thể chuyển hóa hết dẫn đến sự tích tụ chúng. Quá trình

này là nguyên nhân quan trọng có thể dẫn đến sự phát triển các bệnh tật như: ung thư, rối loạn tự miễn dịch, lão hóa, đục thủy tinh thể, viêm khớp dạng thấp, bệnh tim mạch, thoái hóa thần kinh... [86].

Cơ thể con người có một số cơ chế để chống lại sự hiện diện các gốc tự do và các chất oxy hóa bằng cách trung hòa, chuyển hóa chúng nhờ các chất chống oxy hóa. Các chất chống oxy hóa được cơ thể tổng hợp nên hoặc được cung cấp từ bên ngoài thông qua thực phẩm hoặc các chất bổ sung.

Trong các chất chống oxy hóa, các hợp chất nhóm polyphenol cũng có đặc tính nổi bật đó là có hoạt tính chống oxy hóa mạnh. Tiếp cận vấn đề cơ chế chống oxy hóa của các polyphenol dựa trên cơ sở lý thuyết và thực nghiệm cho thấy chúng có thể thực hiện các hoạt động này đối với các gốc tự do, cụ thể gồm các cơ chế sau: Chuyển nguyên tử hydro (HAT: hydrogen atom transfer), chuyển proton kết hợp electron (PCET: proton coupled electron transfer), chuyển một electron sau khi chuyển proton (SET-PT: single electron transfer followed by proton transfer), chuyển proton mất electron (SPLET: sequential proton loss electron transfer), sự hình thành phức hợp cơ bản (RAF: radical adduct formation) và chuyển nguyên tử hydro mất tuần tự proton (SPLHAT: sequential proton loss hydrogen atom transfer) [55, 106].

Các cơ chế trên có thể được tóm lược bằng cách ký hiệu PhOH là công thức chung cho các chất chống oxy hóa thuộc nhóm polyphenol và  $X^\bullet$  là công thức chung cho các chất có bản chất oxy hóa. Ở một điều kiện nhất định các chất chống oxy hóa thuộc nhóm polyphenol (PhOH) sẽ chuyển hydro nguyên tử ( $H^\bullet$ ) sang liên kết với gốc tự do ( $X^\bullet$ ) của các chất oxy hóa để tạo hợp chất (HX) (1) hoặc có thể kết hợp với gốc tự do ( $X^\bullet$ ) của các chất oxy hóa để tạo thành phức hợp giữa chất chống oxy hóa và gốc tự do [Ph-OH-X] $^\bullet$  (2).



Trong các quá trình này, gốc tự do ( $X^\bullet$ ) của các chất oxy hóa sau khi nhận hydro nguyên tử ( $H^\bullet$ ) từ các chất chống oxy hóa thuộc nhóm polyphenol sẽ tạo thành gốc trung hòa XH. Các gốc phenoxyl ( $\text{PhO}^\bullet$ ) sinh ra có thể tiếp tục nhường  $H^\bullet$  để tạo thành quinone hoặc kết hợp với các gốc tự do khác, với các gốc phenoxyl khác để tạo các chất trung hòa. Các phức hợp tạo thành [Ph-OH-X] $^\bullet$  cũng sẽ kết hợp với nhau hoặc các gốc khác để tạo các chất trung hòa [54, 87, 101].

### \* Ứng dụng của polyphenol

Các hợp chất polyphenol là những nhóm chất thứ cấp chủ yếu của thực vật, chúng đa dạng về cấu trúc và chức năng. Hầu hết các polyphenol có nguồn gốc từ quá trình trao đổi chất và chủ yếu từ L-phenylalanin thông qua con đường phenylpropanoid trong thực vật [41]. Polyphenol trong thực vật có vai trò tạo màu sắc cho thực vật, bảo vệ thực vật trước tia cực tím, chống lại sự oxy hóa, bảo vệ thực vật trước sự tấn công của vi sinh vật gây hại [75, 149] và quyết định nhiều đến đặc tính chống oxy hóa, hoạt tính sinh học trong thực vật [41].

Các hợp chất phenol là những chất hoạt động giữ vai trò chủ đạo quyết định đến hương vị, màu sắc của nhiều sản phẩm thực phẩm. Ở một mức độ nhất định, chúng tham gia vào các quá trình tạo ra các cấu tử thơm mới, tạo nên mùi thơm đặc biệt cho thực phẩm [71, 103]. Polyphenol thường có trong thực phẩm và đồ uống có nguồn gốc thực vật, đặc biệt là trà, quả mọng, trái cây họ cam quýt, mận, bông cải xanh, ca cao, trà cà phê và nhiều loại khác [41]. Tuy có nhiều đặc tính tốt, nhưng cũng có cảnh báo về những tác hại của việc tiêu thụ quá nhiều polyphenol, đặc biệt là các hợp chất được phân lập chứ không được tiêu thụ có trong thực phẩm.

Các hợp chất polyphenol nói chung có khả năng chống oxy hóa mạnh và đặc biệt các phenolics được coi là chất chống oxy hóa mạnh mẽ trong các thí nghiệm *in vitro* và được chứng minh là chất chống oxy hóa mạnh hơn vitamin C, vitamin E và carotenoids [120]. Do có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nên nó giúp cơ thể ngăn ngừa stress, ngăn ngừa các bệnh ung thư, tim mạch, các bệnh về mắt, bệnh lão hóa sớm, có khả năng thúc đẩy hoạt động của hệ vi khuẩn có ích trong ruột, ngăn ngừa quá trình chuyển hóa bất lợi, sinh hơi và các rối loạn khác làm cản trở hoạt động của ruột [2]. Polyphenol có tác dụng chống ung thư thông qua một loạt các cơ chế, bao gồm loại bỏ các tác nhân gây ung thư [44], kìm hãm sự phát triển của tế bào ung thư [117] và chu trình phát triển tế bào, thúc đẩy quá trình tự chết của tế bào ung thư (apoptosis) và kìm hãm các hoạt động enzyme [44].

Các polyphenol là các flavonoid có tác dụng bảo vệ não bằng một số cách khác nhau, bao gồm cả việc bảo vệ các tế bào thần kinh để bị tổn thương, tăng cường chức năng tế bào thần kinh hiện có hoặc bằng cách kích thích tái tạo tế bào thần kinh, có khả năng làm giảm thoái hóa thần kinh liên quan đến tích lũy AGEs (Advanced glycation endproducts) trong quá trình bình thường và bất thường của lão hóa não [137].

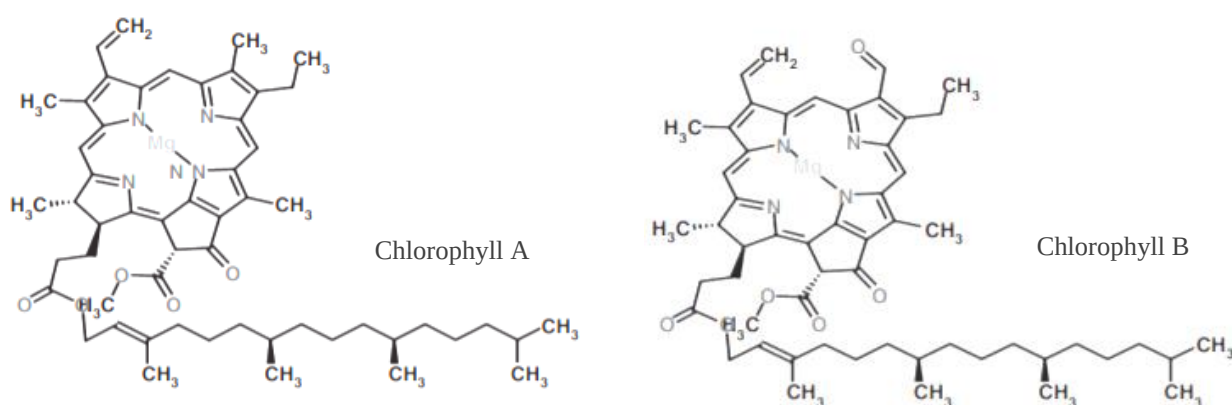
### 1.2.2. Chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa của chlorophyll

Chlorophyll hay chất diệp lục là sắc tố có màu xanh lục được tìm thấy trong nhiều loại thực vật, tảo và vi khuẩn lam. Thuật ngữ diệp lục có nguồn gốc từ tiếng Hy Lạp chloros nghĩa là "xanh" và phyllon có nghĩa là "lá". Lần đầu tiên người ta tiến hành phân lập và đặt tên cho diệp lục bởi dược sĩ người Pháp Joseph Bienaimé Caventou và nhà hóa học người Pháp Pierre-Joseph Pelletier năm 1817 [56].

Chất diệp lục được tạo thành từ cacbon và nitơ nguyên tử cùng với một ion magiê ở vị trí trung tâm. Chất diệp lục được tìm thấy trong hầu hết các phần xanh của thực vật, tức là trong lá thân và trong lục lạp dưới dạng hỗn hợp của màu xanh lục chlorophyll a và màu xanh vàng chlorophyll b, đây là các hợp chất quan trọng trong quá trình quang hợp của cây [127].

Chất diệp lục đầu tiên được dùng để đặt cho lục lạp của thực vật bậc cao, nhưng sau đó nó được mở rộng cho tất cả sắc tố quang hợp porphyrin [173]. Nó thuộc nhóm hợp chất đặc biệt được gọi là tetrapyrroles vì nó chứa bốn vòng pyrrole liên kết với nhau bằng liên kết cộng hóa trị, cũng tương tự như vitamin B12 và Heme phân tử [179]. Ban đầu người ta tìm ra 4 loại chlorophyll gồm: chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll c và chlorophyll d [83]. Sau đó người ta tìm thấy thêm chlorophyll f ở tảo lam, các chlorophyll ở vi khuẩn quang hợp như: bacteriochlorophyll a, bacteriochlorophyll b, bacteriochlorophyll c, bacteriochlorophyll d, bacteriochlorophyll e, bacteriochlorophyll g và chlorophyll tìm được ở hạt bí ngô, lá vàng của cây non mọc nơi thiếu ánh sáng là protochlorophyll và chlorophyll ở khuẩn lưu huỳnh là chlorobium chlorophyll [160].

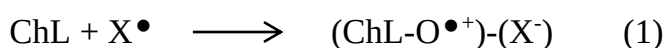
Trong thực vật bậc cao nói chung và trong rau mả thì là nổi bật, chlorophyll tồn tại chủ yếu ở 2 dạng là chlorophyll A và chlorophyll B, chúng có công thức phân tử ở hình 1.6.



Hình 1.6. Công thức phân tử chlorophyll

Chlorophyll cũng được biết đến là chất có hoạt tính chống oxy hóa tốt, ký hiệu ChL là công thức chung cho chất chống oxy hóa thuộc nhóm chlorophyll và  $X^\bullet$  là công thức chung cho các chất có bản chất oxy hóa. Cơ chế chống oxy hóa của chlorophyll được tóm lược như sau:

Ở một điều kiện nhất định các chlorophyll (ChL) sẽ phản ứng và chuyển các chất oxy hóa ( $X^\bullet$ ) [182] (1).



Các phức hợp ( $\text{ChL-O}^{\bullet+})-(X^-)$  có thể tiếp tục liên kết với các gốc tự do của các chất oxy hóa ( $X^\bullet$ ), liên kết với các phân tử chlorophyll khác để tạo nên các hợp chất trung hòa.

### \* Ứng dụng của chlorophyll

Trong tự nhiên, chlorophyll được tìm thấy gọi là diệp lục tố của thực vật, có liên quan tới quá trình quang hợp của cây, có vai trò đặc biệt đối với thực vật và các loại tảo, chúng hấp thu năng lượng ánh sáng mặt trời và chuyển hóa năng lượng ánh sáng mặt trời, nước và carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) thành nguồn nguyên liệu sống chính của chúng là carbohydrate trong cây và giải phóng khí oxy ( $\text{O}_2$ ) vào khí quyển [160].

Chlorophyll cũng là thành phần dinh dưỡng trong thực phẩm, có thể sử dụng với vai trò là phụ gia tạo màu xanh lá tự nhiên cho sản phẩm thực phẩm, thực phẩm chức năng từ chlorophyll như nước uống, viên uống diệp lục tố... làm phụ gia màu cho các sản phẩm như kẹo, gia vị, nước giải khát... [153, 158].

Chlorophyll được sản xuất tạo nên các chế phẩm mỹ phẩm có tác dụng chống oxy hóa, thuốc khử mùi cơ thể, làm giảm hôi miệng, hôi nách, hôi chân, kem dưỡng da, mặt nạ làm đẹp da, xà phòng, kem đánh răng... [96]

Trong y học, các nghiên cứu cho thấy chlorophyll có thể là thành phần các loại thuốc giúp tăng hồng cầu cho cơ thể nhờ cấu tạo hóa học của hồng cầu có tính đồng nhất với chlorophyll [164], giúp thải độc tố khỏi cơ thể [165], kháng vi khuẩn, chống oxy hóa, làm lành vết thương, kích thích hệ thống miễn dịch, thanh lọc máu, giải độc cơ thể, làm sạch ruột, giải độc của gan, ... [52] và ngừa ung thư nhờ có hoạt tính kháng ung thư, có thể hình thành cấu trúc phức hợp trung hòa với chất có thể gây ung thư aflatoxin B1 [126], làm chậm lão hóa tế bào [160, 180].

### 1.3. KỸ THUẬT TÁCH CHIẾT VÀ THU NHẬN POLYPHENOL, CHLOROPHYLL

Tách chiết là quá trình thu nhận các chất có trong một loại nguyên liệu dựa vào tính tan của chất tan trong dung môi và quá trình khuếch tán của chất tan từ nguyên liệu ra môi trường dung môi. Để chiết rút được chất tan với hiệu suất cao, người ta cần lựa chọn được dung môi chiết theo nguyên tắc đảm bảo chất tan hòa tan với hàm lượng cao nhưng phải có hoạt tính cần thiết. Do vậy, tùy thuộc vào loại chất tan, người ta có thể lựa chọn dung môi có bản chất khác nhau: dung dịch đệm, nước cất hay dung môi hữu cơ, ... cho quá trình chiết.

#### 1.3.1. Kỹ thuật tách chiết, thu nhận polyphenol

Để tách chiết polyphenol, hiện nay người ta có thể sử dụng một số kỹ thuật khác nhau:

##### - Ngâm chiết

Ngâm chiết là kỹ thuật thường dùng để tách chiết các hoạt chất sinh học từ thực vật, đặc biệt là các hợp chất phenolic [70]. Nguyên liệu thực vật sau khi xử lý sẽ ngâm trong các dung môi khác nhau: nước, n-hexan, chloroform, benzen, ethanol, methanol, ... [11]. Tuy nhiên, hiệu quả chiết bằng dung môi được quyết định bởi loại dung môi sử dụng, bản chất của polyphenol và tương tác, liên kết của polyphenol với các thành phần thực vật [116]. Vì vậy, khi chọn dung môi chiết phải xem xét vị trí của polyphenol trong cây, nếu các polyphenol chủ yếu tồn tại trong gian bào thì chỉ có thể chiết bằng ethanol hoặc các dung môi hữu cơ có độ phân cực cao [145].

Việc tách chiết các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa bằng các dung môi từ rau má bằng kỹ thuật ngâm chiết cho thấy dịch chiết từ các dung môi có độ phân cực cao sẽ cho dịch chiết có hàm lượng polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa cao, còn đối với dịch chiết bằng dung môi có độ phân cực thấp thì dịch chiết sẽ có hàm lượng polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa không đáng kể [25]. Chẳng hạn, dịch chiết polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa từ lá dâu bằng dung môi có độ phân cực cao như methanol 75% sẽ cho dịch chiết có hàm lượng polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất so với các dung môi khác [15] hoặc thu nhận polyphenol từ lá ngô sẽ cho hiệu quả cao khi chiết bằng kỹ thuật ngâm đậm với dung môi nước [3]. Hoặc quá trình chiết polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa từ đậu nành bằng acetone 70% (v/v), tỷ lệ nguyên

liệu và dung môi là 1: 60 (w/v) với ba chu kỳ với 3 giờ cho mỗi chu kỳ trích ly ở nhiệt độ 40 °C sẽ cho hiệu suất chiết cao nhất [7]. Kết quả nghiên cứu tách chiết polyphenol từ vỏ thân cây quao nước (*Dolichandrone spathacea*) bằng kỹ thuật ngâm chiết cho thấy ethanol 90% là dung môi chiết tách polyphenol tốt nhất khi chiết với tỷ lệ DM/NL là 15/1, nhiệt độ là 60°C và thời gian là 9 giờ [14].

#### **- Tách chiết có hỗ trợ sóng siêu âm**

Sử dụng sóng siêu âm thường có tần số từ 20 kHz đến 10 MHz trong quá trình tách chiết các hoạt chất cũng làm tăng hiệu quả chiết. Kỹ thuật chiết này giúp làm giảm lượng dung môi hữu cơ, ít ảnh hưởng đến môi trường và an toàn đối với sức khỏe con người [176]. Tác dụng của sóng siêu âm là làm căng phòng tế bào, phá vỡ thành tế bào và sự hydrat hóa từ đó làm tăng khả năng tiếp xúc của dung môi chiết với các phân tử hoạt chất dẫn tới cải thiện khả năng khuếch tán, chuyển khối và hiệu quả chiết tách [177]. Việc sử dụng sóng siêu âm trong chiết rút các chất được cho rằng sẽ cải thiện hiệu suất chiết lên tới 35% trong quá trình chiết tách các hợp chất phenolic từ nguồn thực vật [175]. Chẳng hạn, quá trình chiết anthocyanin (một hợp chất thuộc nhóm polyphenol từ nho) bằng kỹ thuật chiết có hỗ trợ sóng siêu âm, chiết thủy tĩnh cao áp và chiết trong điện trường cho thấy cả 3 mẫu chiết đều cho hàm lượng anthocyanin cao gần gấp 2 lần so với mẫu đối chứng chiết theo kỹ thuật ngâm dầm ở 70°C trong 1 giờ. Trong đó, mẫu chiết có hỗ trợ sóng siêu âm cho hàm lượng anthocyanin cao nhất. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, cả 3 mẫu chiết trên đều cho dịch chiết có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn mẫu đối chứng [42].

#### **- Tách chiết có hỗ trợ vi sóng**

Kỹ thuật tách chiết có hỗ trợ vi sóng được các nhà nghiên cứu thực hiện vào những năm 1980. Quá trình chiết này làm tăng nhiệt dung môi nhờ đó phân tách các phân tử hoạt chất từ thực vật vào dung môi chiết [140]. So với các kỹ thuật chiết khác, kỹ thuật chiết có hỗ trợ vi sóng có những ưu điểm như thời gian chiết ngắn, kiểm soát tốt được nhiệt độ, sử dụng ít dung môi, tốc độ chiết cao, tiết kiệm năng lượng, chất lượng sản phẩm tốt và chi phí thấp [60]. Trong kỹ thuật chiết có hỗ trợ vi sóng, nhiệt sinh ra có độ đồng đều khắp trong nguyên liệu chiết. Mặt khác, khi tăng tác dụng của vi sóng và thời gian chiết thì làm tăng hiệu suất thu hồi lượng polyphenol tự do và tăng hoạt tính chống oxy hóa trong quá trình chiết polyphenol [61, 62].



Kỹ thuật tách chiết có hỗ trợ vi sóng có chi phí vận hành thấp, nhanh chóng và có thể được sử dụng trong quy mô sản xuất công nghiệp nhưng quan trọng là phải chọn được nhiệt độ và thời gian chiết phù hợp cho từng loại nguyên liệu.

#### **- Tách chiết trong dung môi có áp lực**

Tách chiết trong dung môi có áp lực là quá trình chiết trong dung môi ở nhiệt độ cao từ 50 đến 200°C và áp suất từ 3,5 đến 20 MPa. Trong kỹ thuật này, mẫu rắn được đóng gói trong túi chiết và sử dụng dung môi hữu cơ hoặc nước ở áp suất, nhiệt độ cao hơn điểm sôi của dung môi [123]. Hiệu suất chiết bằng dung môi có áp lực được cải thiện nhờ làm tăng độ hòa tan của các chất vào dung môi [122]. Ngoài ra, tăng áp suất ở nhiệt độ cao, độ khuếch tán của các chất vào dung môi có thể tăng lên nhờ sự phá vỡ lực Van der Waals, liên kết hydro và lực lưỡng cực giữa các phân tử chất tan [162].

Nghiên cứu sự ổn định của các polyphenol khi chiết trong điều kiện dung môi quá nhiệt, kết quả nghiên cứu cho thấy các chất phenolic được thử nghiệm, hầu hết đều ổn định và có tỷ lệ thu hồi trên 85% khi chiết bằng methanol ở 150°C [125]. Mặt khác khi chiết các polyphenol là catechin và epicatechin từ lá trà và hạt nho có tỷ lệ thu hồi khoảng 95% ở 130°C. Tuy nhiên, hoạt tính của catechin và epicatechin từ hạt nho tốt nhất khi chiết trong dung môi có áp lực bằng methanol so với kỹ thuật ngâm chiết và chiết có hỗ trợ sóng siêu âm ở cùng điều kiện [131].

#### **- Tách chiết cao áp thủy tĩnh**

Kỹ thuật thủy tĩnh cao áp thường sử dụng chất lỏng để tạo cột áp suất 100 ÷ 1.000 MPa trong quá trình chiết. Áp lực này được truyền đi tức thời, đồng đều và không phụ thuộc vào kích thước, hình dạng của vật liệu chiết. Nước là chất lỏng thường dùng để truyền áp lực, trong quá trình xử lý có hoặc không cấp nhiệt. Trước đây, ứng dụng chính của kỹ thuật thủy tĩnh cao áp là thanh trùng thực phẩm nhằm tăng thời hạn lưu trữ và tạo các tính chất đặc trưng cho thực phẩm. Ngày nay, nhiều nghiên cứu tập trung vào các ứng dụng tiềm năng của kỹ thuật thủy tĩnh cao áp đối với việc cải thiện hiệu quả chiết các chất. Jun và cộng sự đã so sánh việc chiết tách polyphenol từ lá trà xanh bằng kỹ thuật chiết thủy tĩnh cao áp và ngâm chiết, kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất chiết polyphenol được quyết định rất lớn bởi mức tăng áp suất, cụ thể khi áp suất tăng từ 100 đến 600 MPa thì hiệu suất chiết tăng từ 15 đến 30% [155]. Cơ chế chính của chiết bằng kỹ thuật thủy tĩnh cao áp là dưới áp lực thủy tĩnh cao, thành tế bào bị phá vỡ, dung môi

sẽ đi vào tế bào làm cho tế bào chất và các hợp chất polyphenol sẽ giải phóng ra môi trường dung môi. Chính cơ chế tác động này làm tăng hiệu suất chiết của kỹ thuật chiết thủy tinh cao áp, ít tác động xấu đến hoạt tính của các chất [155].

#### **- Tách chiết trong điện trường**

Tách chiết trong điện trường là kỹ thuật chiết tách tiên tiến đã được nghiên cứu rộng rãi trong lĩnh vực thực phẩm và hoạt chất sinh học, đây là quá trình chiết tách các chất được thực hiện trong môi trường điện trường, quá trình này không sinh nhiệt. Nghiên cứu sự tác động của điện trường đến quá trình chiết tách anthocyanin trong quá trình lên men rượu nho cho thấy hiệu suất thu hồi anthocyanin tăng hơn 21,5% và 28,6% khi vỏ quả nho được xử lý bằng điện trường tương ứng là 5 và 10 kV/cm so với chiết thông thường [88]. Ngoài ra, khi sử dụng điện trường 5 kV/cm thì hàm lượng anthocyanin nổi lên và polyphenol tổng cao hơn trong quá trình sản xuất rượu vang nho đỏ [132]. Hơn nữa, xử lý bằng điện trường thì sản phẩm rượu vang nho sẽ cho chất lượng cảm quan tốt hơn, cụ thể, cải thiện cảm vị và màu sắc nhờ sự tăng hàm lượng các polyphenol và các anthocyanin trong rượu [45, 89], hoạt tính chống oxy hóa cao khoảng 4 lần so với công dụng kỹ thuật xử lý và việc tăng hoạt tính chống oxy hóa tương quan với sự tăng hàm lượng polyphenol trong mẫu dịch chiết [42]. Như vậy, điện trường có tác dụng tăng khuếch tán chất tan nổi chung, các polyphenol nổi lên vào dung môi trong quá trình chiết. Do vậy, điện trường có thể được coi là kỹ thuật triển vọng để làm tăng hiệu quả quá trình chiết tách [155].

#### **- Tách chiết siêu tới hạn**

Trong kỹ thuật tách chiết siêu tới hạn, cần quan tâm đến chất lưu siêu tới hạn, đây là một dạng vật chất tồn tại trong điều kiện áp suất và nhiệt độ cao hơn điểm tới hạn. Trong điều kiện này, vật chất có trạng thái đặc biệt vừa lỏng vừa khí, cụ thể vừa có thể khuếch tán như chất khí, có thể thấm qua vật chất như chất lỏng. Ngoài ra ở điều kiện nhiệt độ và áp suất gần với điểm tới hạn, thay đổi nhỏ của các thông số này dẫn đến thay đổi lớn về mật độ của vật chất [63].

Chất lưu siêu tới hạn được dùng trong một số trường hợp để thay thế các dung môi hữu cơ là nước và CO<sub>2</sub>. Nếu so sánh với nước thì CO<sub>2</sub> có nhiều ưu điểm hơn, thường được sử dụng vì hoạt động tương đối tốt, có điểm tới hạn vừa phải, cụ thể có nhiệt độ tới hạn của CO<sub>2</sub> là 31,2°C so với nước là 101,1°C và áp suất tới hạn 72,9 atm so với

nước là 217,6 atm. Ngoài ra, CO<sub>2</sub> được xem là an toàn và không cần phải loại trừ dư lượng sau khi chiết, chỉ đơn giản là loại bỏ khi hạ áp suất tại nhiệt độ phòng. Tuy nhiên, CO<sub>2</sub> không thích hợp để chiết xuất các hợp chất phân cực cao như flavonoid vì độ phân cực của CO<sub>2</sub> thấp. Do vậy, các dung môi khác như metanol, ethanol... có nồng độ thấp có thể được sử dụng tạo đồng dung môi để làm tăng hiệu suất chiết trong chiết siêu tới hạn.

Sử dụng kỹ thuật chiết CO<sub>2</sub> siêu tới hạn, metanol làm đồng dung môi để chiết polyphenol từ lá ô liu cho thấy hàm lượng polyphenol tăng theo nhiệt độ, áp suất và nồng độ nhưng đạt cao nhất trong thời gian 140 phút. Kỹ thuật chiết siêu tới hạn với đồng dung môi methanol 10% thu được hàm lượng phenolic cao hơn so với kỹ thuật chiết có hỗ trợ sóng siêu âm với dung môi phân cực thấp (n-hexane, diethylether, ethylacetate), nhưng thấp hơn đáng kể so với dung môi có độ phân cực cao (metanol, ethanol) [82]. Chẳng hạn, nghiên cứu chiết tách isoflavone từ bột đậu nành bằng kỹ thuật chiết siêu tới hạn bằng CO<sub>2</sub> với đồng dung môi metanol 10%, chiết Soxhlet với dung môi ethanol 80% và chiết có hỗ trợ sóng siêu âm với dung môi metanol 70%. Kết quả nghiên cứu cho thấy chiết bằng kỹ thuật siêu tới hạn cho hàm lượng isoflavones thấp nhất là 86,28 gam/gam khô so với chiết có hỗ trợ sóng siêu âm là 311,55 gam/gam khô và so với chiết Soxhlet là 212,86 gam/gam khô [148]. Mặc dù hiệu suất thu hồi isoflavone thấp hơn khi sử dụng kỹ thuật chiết siêu tới hạn, nhưng kỹ thuật chiết này có tính chọn lọc hoạt chất cao và rất ít các tạp chất khuếch tán vào dịch chiết và số bước thực hiện cũng ít hơn.

Tách chiết chất lỏng siêu tới hạn là kỹ thuật chiết được nghiên cứu để thay thế các kỹ thuật chiết sử dụng dung môi hữu cơ, được sử dụng rộng rãi để chiết các hoạt chất từ nguyên liệu rắn trong tự nhiên đặc biệt là chiết các thành phần thực phẩm. Ưu điểm nổi bật của kỹ thuật là sử dụng rất ít hoặc không cần dung môi hữu cơ, chất lượng sản phẩm chiết cao, thời gian chiết ngắn và có tính chọn lọc cao khi chiết, tuy nhiên kỹ thuật này có chi phí đầu tư cao [63, 129].

*Như vậy, để lựa chọn được kỹ thuật tách chiết polyphenol phù hợp với một loại nguyên liệu cần lưu ý đến đặc tính của nguyên liệu, tính chất hóa lý và bản chất của loại dung môi chiết. Mặt khác, trong quá trình chiết tách, người ta có thể sử dụng các biện pháp kỹ thuật như sử dụng siêu âm, khuấy, ... để hỗ trợ làm tăng khả năng chiết rút polyphenol. Hiệu quả của quá trình chiết tách còn tùy thuộc vào chất lượng nguyên liệu cũng như các giải pháp kỹ thuật sử dụng để chiết chọn lọc polyphenol.*

### 1.3.2. Kỹ thuật tách chiết, thu nhận chlorophyll

Hiện có nhiều nghiên cứu tách chiết và định lượng chlorophyll từ các loài thực vật khác nhau bằng các loại dung môi khác nhau. Cụ thể, Hallegraeff, (1978) [109], Abaychi, J.K. và Riley, J.P., (1979) [21], Moed và A.P., Murray (1985) [114], Lichtenthaler, H. K., (1987) [84] đã đề nghị được các kỹ thuật tách chiết và định lượng chlorophyll trong các dung môi khác nhau như acetone, ethanol, methanol, dimethyl formamide (DMF), dimethyl sulfoxide (DMSO), ...

Dimethyl formamide (DMF) là một dung môi cũng khá hiệu quả để chiết chlorophyll so với dung môi methanol, ethanol và acetone [69]. Tách chiết bằng dung môi DMF không cần phá vỡ tế bào thực vật, sắc tố được chiết tách gần như hoàn toàn sau một vài bước ngâm chiết và đảm bảo sự ổn định cho đến 20 ngày khi được lưu trữ trong tối ở 5°C [93]. Tuy nhiên, DMF rất độc hại nên trong sản xuất người ta khuyến khích nên sử dụng nó để tránh các tổn hại đến sức khỏe và môi trường [69, 73]. Chính vì thế, ngày nay, người ta thường sử dụng các dung môi có độ phân cực cao như methanol, ethanol, acetone, dimethyl formamide (DMF) để chiết tách chlorophyll từ thực vật. Việc sử dụng dung môi acetone cho hiệu suất không cao hơn so với metanol hoặc ethanol 95%, nhưng có thể giữ được dịch chiết ổn định, ít làm biến đổi chlorophyll trong quá trình chiết tách và bảo quản [69]. Dung môi methanol thì hiệu quả chiết cao nhưng cho dịch chiết ít ổn định, dễ hình thành các hợp chất chuyển hóa từ chlorophyll [69, 98] nên khi dùng dung môi này phải có cơ chế bảo vệ chlorophyll trong dịch chiết. Ethanol nồng độ cao là dung môi hiệu quả, cho dịch chiết ổn định, ít gây chuyển hóa và thường dùng trong việc tách chiết các chlorophyll từ thực vật [186] và một số loài rong biển [10]. Hơn nữa ethanol không độc, có giá thành rẻ và dễ ứng dụng trong thực phẩm hơn các dung môi acetone hay methanol. Do vậy, người ta thường có xu hướng sử dụng ethanol để chiết chlorophyll trong trường hợp sử dụng trong thực phẩm.

Trong quá trình tách chiết chlorophyll, dung môi hữu cơ sẽ thâm nhập qua màng tế bào và hòa tan lipid cũng như lipoprotein của màng lục lạp [4]. Sau đó là sự phá vỡ tế bào, quá trình này được thúc đẩy nhờ quá trình nghiền nhỏ mẫu hay sử dụng sóng siêu âm, vi sóng, ... Nhờ các kỹ thuật này mà hiệu quả của việc tách chiết chlorophyll bằng dung môi hữu cơ có thể được cải thiện đáng kể [69, 93, 151, 156]. Nếu quá trình chiết mà không có sự phá vỡ tế bào thì chỉ khoảng 25% chlorophyll a được chiết tách [156]. Trong quá trình chiết, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình chiết tách

chlorophyll bằng dung môi như: điều kiện lưu trữ mẫu chiết, dung môi hữu cơ, thời gian chiết và một số yếu tố khác, ... [69, 73, 151].

*Từ các phân tích ở trên cho thấy về bản chất polyphenol là một nhóm hợp chất hữu cơ có cực do vậy có khả năng tan trong nước hoặc dung môi hữu cơ như ethanol. Trong khi đó, chlorophyll là một hợp chất hữu cơ tan tốt trong các dung môi hữu cơ. Do vậy, muốn chiết tách đồng thời cả polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thì để từ đó tạo bột polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa dùng làm thực phẩm thì đề tài phải lựa chọn được một loại dung môi hữu cơ và một phương pháp tách chiết thích hợp cho phép thu nhận được đồng thời cả polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa với hàm lượng cao từ rau má thì. Mặt khác, trong quá trình tách chiết cũng cần quan tâm tới các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết như nhiệt độ chiết, thời gian chiết, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu chiết, ... nhằm đảm bảo cho hiệu suất chiết cao.*

## **1.4. KỸ THUẬT SẤY PHUN**

### **1.4.1. Giới thiệu**

Sấy phun là kỹ thuật làm khô các giọt chất lỏng đã được làm phân tán với kích thước rất nhỏ trong dòng không khí nóng và thu được bột ở dạng hạt mịn, khô [181]. Quá trình sấy phun gồm ba giai đoạn chính là tạo giọt nhỏ (atomization), chuyển từ giọt nhỏ thành hạt (droplet-to-particle) và thu hồi hạt. Quá trình sấy khô giọt lỏng trong không khí ẩm xảy ra qua hai giai đoạn gồm giai đoạn ban đầu là nhiệt độ của lớp hơi nước bão hòa trên bề mặt giọt lỏng xấp xỉ nhiệt độ bầu ướt của không khí và tốc độ sấy không đổi. Giai đoạn hai sự khuếch tán bên trong hạt ra ngoài bề mặt giảm dần và tốc độ sấy giảm dần.

Để thực hiện kỹ thuật này, người ta dịch hóa nguyên liệu, phun dịch nguyên liệu thành các giọt có kích thước rất nhỏ (atomization) trong môi trường nhiệt độ cao để tách ẩm và làm khô chất tan, chuyển chúng về dạng bột trong thiết bị sấy phun. Kỹ thuật sấy phun tạo nên diện tích bề mặt lớn dưới dạng các giọt chất lỏng rất nhỏ, mịn thông qua quá trình tạo giọt nhỏ từ dịch sấy trong buồng sấy tạo ra sản phẩm dạng hạt bột và hình cầu [51, 169].

Kỹ thuật sấy phun phù hợp cho việc tạo bột sản phẩm từ nguyên liệu dạng lỏng có các tính chất lý hóa tốt và bảo tồn được hoạt tính sinh học của sản phẩm [111]. Trong sấy phun, thời gian tiếp xúc nhiệt của giọt dịch sấy rất ngắn, khoảng 5-100 giây, nên ít

bị biến đổi vật chất, đảm bảo được chất lượng các chất dễ bị biến đổi như các chất dinh dưỡng, màu sắc và hương vị [146]. Bột sấy thu hồi bằng kỹ thuật sấy phun có hàm ẩm và hoạt độ nước thấp nên rất ổn định, hàm ẩm và hoạt độ nước phổ biến của bột rau quả sấy phun thường là 2-5% và 0,2-0,6 [77, 154], có hoạt tính kháng vi sinh và chống oxy hóa tốt, ít bị các phản ứng đổi màu, thủy phân, oxy hóa lipid và các biến đổi do tác động của enzyme [102], bột có kích thước hạt nhỏ, dẫn đến sản phẩm có mật độ lớn [66]. Do đó, kỹ thuật sấy phun có thể áp dụng rộng rãi để sản xuất bột trái cây và rau quả trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm [136].

Bên cạnh nhiều ưu điểm, kỹ thuật sấy phun cũng có một số nhược điểm là tuy có thời gian tiếp xúc sấy ngắn nhưng trong sấy phun thường có nhiệt độ sấy tương đối cao là 150-220°C nên có thể biến đổi các hợp chất nhạy cảm nhiệt như là lycopene, beta-carotene, anthocyanin, vitamin C, màu sắc và hương vị [80]. Hơn nữa, dịch sấy giàu đường như nước ép trái cây và rau quả sẽ khó sấy phun trực tiếp vì dễ tạo nên độ keo, gây bám dính thành buồng sấy và sản phẩm keo dính không đạt yêu cầu, trong trường hợp này thường phải bổ sung các chất mang, phụ liệu sấy [29].

Sấy phun có thể kết hợp với các điều kiện hỗ trợ khác như sấy phun có hỗ trợ siêu âm, sấy phun chân không, sấy phun chân không có hỗ trợ siêu âm và sấy phun bằng không khí khô sẽ có nhiều ưu điểm hơn so với sấy phun thông thường [79, 168].

Để thu nhận được bột rau quả có chất lượng, đặc tính lý hóa tốt thì thiết bị sấy phun phải đảm bảo các đặc tính kỹ thuật, phải chọn kỹ thuật và điều kiện sấy phun phù hợp.

#### **1.4.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sấy phun**

Chất lượng bột sản phẩm thu nhận được bằng kỹ thuật sấy phun phụ thuộc vào điều kiện quá trình sấy bao gồm nồng độ dịch sấy, nhiệt độ không khí đầu vào và đầu ra, lưu lượng dòng cấp liệu, lưu lượng và áp suất khí nén, lưu lượng không khí loại cơ cấu phun và tốc độ phun [51, 77], ...

##### **\* Nhiệt độ không khí đầu vào và đầu ra**

Các sắc tố và các hợp chất nhạy cảm có thể bị biến đổi khi sấy phun ở nhiệt độ đầu vào quá cao, cụ thể có nghiên cứu cho thấy là khi nhiệt độ sấy phun cao làm giảm chất lượng bột betacyanin sấy phun từ dịch chiết thanh long [170], làm giảm hàm lượng

phenolic và hoạt tính bất gốc tự do DPPH của bột sấy phun từ nước ép me rừng [108], giảm hàm lượng anthocyanin và hoạt tính chống oxy hóa của bột củ cải đen [113] khi nhiệt độ đầu vào của quá trình sấy phun quá cao.

Đặc tính hóa lý của bột sấy cũng chịu ảnh hưởng đáng kể bởi nhiệt độ sấy. Cụ thể khi tăng nhiệt độ sấy đầu vào sẽ làm thúc đẩy quá trình bay hơi nước nên làm tăng tốc độ sấy, qua đó nâng cao năng suất bột [166], độ ẩm của bột sấy thấp [35] và ảnh hưởng đến mật độ khối của bột [33].

Nhiệt độ tại cyclon, nơi các hạt bột được tách ra khỏi không khí ẩm và lắng xuống đáy của cyclon được xác định là nhiệt độ không khí đầu ra. Nhiệt độ không khí đầu ra cũng là thông số quan trọng trong sấy phun, quyết định đến tốc độ sấy [92]. Khi tăng nhiệt độ không khí đầu ra sẽ làm giảm độ ẩm của bột và tăng năng suất quá trình sấy [105].

#### **\* Loại chất mang**

Sấy phun trực tiếp dịch rau quả thường khó thực hiện do sản phẩm sau sấy dễ bị keo dính, lắng đọng trên thành buồng sấy, nguyên nhân do có các hợp chất có tính keo trong dịch sấy. Chất mang là một trong những phụ liệu quan trọng nhất trong sấy phun nhờ khả năng làm giảm sự keo nhót của dịch sấy, tạo gắn kết các cơ chất trong dịch sấy lên chất mang. Do đó khó có thể sấy phun các dịch sấy từ trái cây, rau quả mà không có chất mang [136]. Ngoài ra, các chất mang trong sấy phun có thể làm tăng năng suất sấy, tăng hiệu suất thu hồi, giảm độ keo dính, giảm độ hút ẩm và bột sấy ổn định hơn.

Các chất mang phổ biến được sử dụng trong sấy phun là về cơ bản các polyme carbohydrate thuộc các nhóm: (1) tinh bột và các dẫn xuất của nó (maltodextrin, dextrin và cyclodextrin...), (2) gum (gum arabic, gum karaya...), (3) cellulose và các dẫn xuất của nó (carboxymethylcellulose, hydroxypropyl methyl cellulose...) [49]. Việc lựa chọn chất mang phụ thuộc vào đặc điểm hóa lý dịch sấy, mục tiêu quá trình sấy và tính an toàn của chất mang đối với thực phẩm, với môi trường. Chất mang phải có độ hòa tan cao trong dịch sấy, có khả năng tạo màng và tạo dung dịch có độ nhớt thấp ngay cả nồng độ cao. Để sấy phun, chất mang phải có phân tử lượng cao, nhiệt độ kết tinh cao và có khả năng bảo vệ các hợp chất nhạy cảm dưới tác động nhiệt độ, oxy, ánh sáng và độ ẩm [47].

Tinh bột và dẫn xuất của nó có đặc tính sử dụng làm chất mang sấy phun tốt như trọng lượng phân tử cao, hòa tan tốt trong nước, độ nhớt thấp, ít bám dính, đặc biệt là đặc tính tạo màng rất quan trọng đối với hiệu quả sấy khô và bảo quản các đặc tính của các hợp chất [107]. Trái ngược với tinh bột, gum có khả năng tạo màng mạnh, nhiệt độ kết tinh thấp. Tương tự, cellulose và các dẫn xuất của nó có đặc điểm tạo màng, hoạt động bề mặt mạnh, nhưng không tiêu hóa được [49]. Trong một số nghiên cứu, protein cũng được sử dụng cùng với tinh bột hoặc dẫn xuất của nó, đặc biệt là wheyprotein, bởi vì nó có khả năng tạo màng và giữ chất dinh dưỡng rất tốt [65].

Các chất mang thường được sử dụng trong sấy phun nước ép trái cây và rau quả là maltodextrin và gum arabic do trọng lượng phân tử cao, nhiệt độ kết tinh cao, độ hòa tan tốt và độ nhớt thấp [136]. Polyphenol và các chất có hoạt tính chống oxy hóa trong bột sấy phun cao hơn khi sử dụng gum arabic làm chất mang sấy các dịch chiết từ rau quả so với các chất mang khác như  $\beta$ -cyclodextrin và maltodextrin [150]. Ngược lại, chất mang là maltodextrin cho bột sản phẩm giữ được hoạt tính chống oxy hóa và độ hòa tan cao hơn gum arabic [113].

#### **\* Nồng độ chất mang**

Qua các nghiên cứu cho thấy, khi thay đổi nồng độ chất mang sẽ tác động đến hàm lượng các hoạt chất và hoạt tính của chúng trong bột sấy. Cụ thể, khi tăng nồng độ chất mang maltodextrin 5-9% sẽ làm giảm hàm lượng phenolic và hoạt tính bắt gốc tự do [108], khi tăng nồng độ maltodextrin 10-17% sẽ làm tăng hàm lượng lycopene trong bột sấy phun từ nước ép ổi nhưng có sự giảm nhẹ khi tăng nồng độ maltodextrin từ khoảng 17-20%.

Mặt khác, khi tăng nồng độ maltodextrin sẽ làm giảm độ ẩm bột do làm tăng tổng hàm lượng chất rắn trong dịch sấy. Cụ thể, độ ẩm giảm từ 2,6% xuống 1,9% khi tăng hàm lượng maltodextrin vào dịch sấy từ 8% đến 16% trong quá trình sấy phun nước ép dâu [76] và sự lưu giữ màu sắc bột betacyanin sấy phun từ rau dền tím tăng khi tăng nồng độ maltodextrin [33].

Từ những nghiên cứu trên cho thấy, khó có đề nghị chung cho nồng độ chất mang cần bổ sung cho dịch sấy trong sấy phun. Chất mang là thành phần gắn kết với các hoạt chất trong dịch chiết nên chúng cũng ảnh hưởng nhiều đến đặc tính và hoạt tính của bột sấy phun [154]. Do đó, nồng độ chất mang phù hợp phụ thuộc vào mục tiêu của sấy phun, loại dịch sấy và loại chất mang.



## CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU

**2.1.1. Rau má thà:** Rau má thà (*Centella asiatica* (L), Urban), thuộc giới *Plantae*, bộ *Apiales*, họ *Apiaceae*, phân họ *Mackinalyoideae* và chi *Centella*.



**Hình 2.1. Hình ảnh rau má sấy khô**

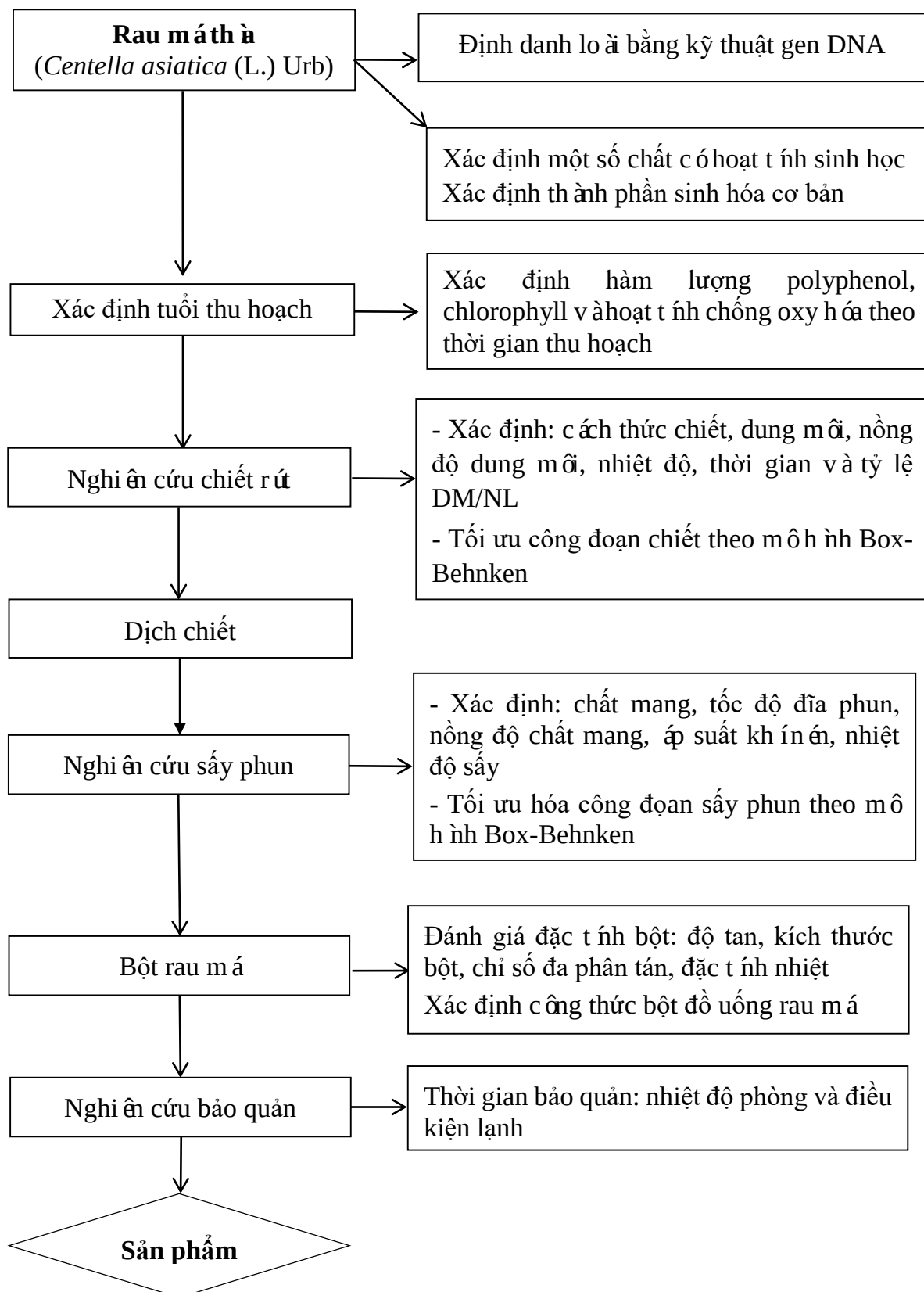
Rau má được trồng ở Nha Trang - Khánh Hòa và được thu mẫu sau khi trồng được 75 ngày tuổi. Sau khi thu hoạch, rau má được xử lý sơ bộ gồm loại bỏ tạp chất, lặt lá già, lặt lá úa và thu nhận lá cuống lá. Sau khi thu nhận và xử lý, rau má được rửa sạch, ly tâm tách nước và được sấy khô bằng tủ sấy trong điều kiện không khí cưỡng bức có bức xạ hồng ngoại công suất  $1.250 \text{ w/m}^3$  ở nhiệt độ  $65^\circ\text{C}$  trong thời gian 8 giờ và đạt độ ẩm 8% [1]. Rau má sau sấy được nghiền nhỏ thành bột với kích thước 1-2 (mm) bằng máy nghiền mẫu phòng thí nghiệm (IKA A11 Basic, Đức), bột được trộn đều cho đồng nhất và bao gói kín không bằng bao bì PA có tráng nhôm, khối lượng 200 gam/túi và được lưu trữ ở nhiệt độ  $-18^\circ\text{C}$  để sử dụng trong quá trình thí nghiệm [57].

**2.1.2. Chất mang:** Các chất mang (chất trợ sấy): maltodextrin, dextrin và gum arabic sử dụng trong nghiên cứu là các phụ gia được Bộ Y tế cho phép sử dụng trong thực phẩm, đạt tiêu chuẩn tinh khiết do Pháp sản xuất, được Công ty TNHH Nam Giang TP. Hồ Chí Minh nhập khẩu và phân phối.

## 2.2. PHƯƠNG PHÁP BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM

### 2.2.1. Bố trí thí nghiệm tổng quát

Cách tiếp cận các nội dung nghiên cứu được trình bày ở hình 2.2.



Hình 2.2. Sơ đồ cách tiếp cận các nội dung nghiên cứu

Mẫu nguyên liệu rau má được sử dụng để giải trình tự gen DNA nhằm định danh, xác định đúng loài rau má cần sử dụng cho quá trình nghiên cứu. Sau khi định danh, tiến hành lấy mẫu rau má phân tích một số thành phần sinh hóa cơ bản và các hợp chất có hoạt tính sinh học cơ bản: hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa qua các giai đoạn sinh trưởng. Kết quả phân tích là cơ sở để đánh giá chất lượng, xác định thời gian thu hoạch nhằm thu được rau má là có hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa cao dùng làm nguyên liệu cho quá trình nghiên cứu.

Để thu nhận các polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa, quá trình nghiên cứu sẽ xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết tách: cách thức chiết, dung môi, nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ DM/NL, ... Kết quả xác định là cơ sở để xác định thông số bên cho quá trình chiết tách và là cơ sở để tiến hành tối ưu hóa công đoạn chiết để thu được dịch chiết rau má có hàm lượng polyphenol và chlorophyll với hoạt tính chống oxy hóa cao nhất.

Dịch chiết rau má là thu nhận theo các điều kiện tối ưu được cô đặc chân không và dịch chiết sau cô đặc được sử dụng để nghiên cứu sấy phun. Trong quá trình nghiên cứu sấy phun sẽ tiến hành xác định các thông số ảnh hưởng đến quá trình sấy phun: loại chất mang, tốc độ đĩa phun, hàm lượng chất mang, nhiệt độ sấy, áp suất khí nén, ... Kết quả thu được là cơ sở để nghiên cứu tối ưu hóa công đoạn sấy phun với mục tiêu thu nhận được bột rau má là chứa polyphenol và chlorophyll với hoạt tính chống oxy hóa và hàm lượng cao nhất.

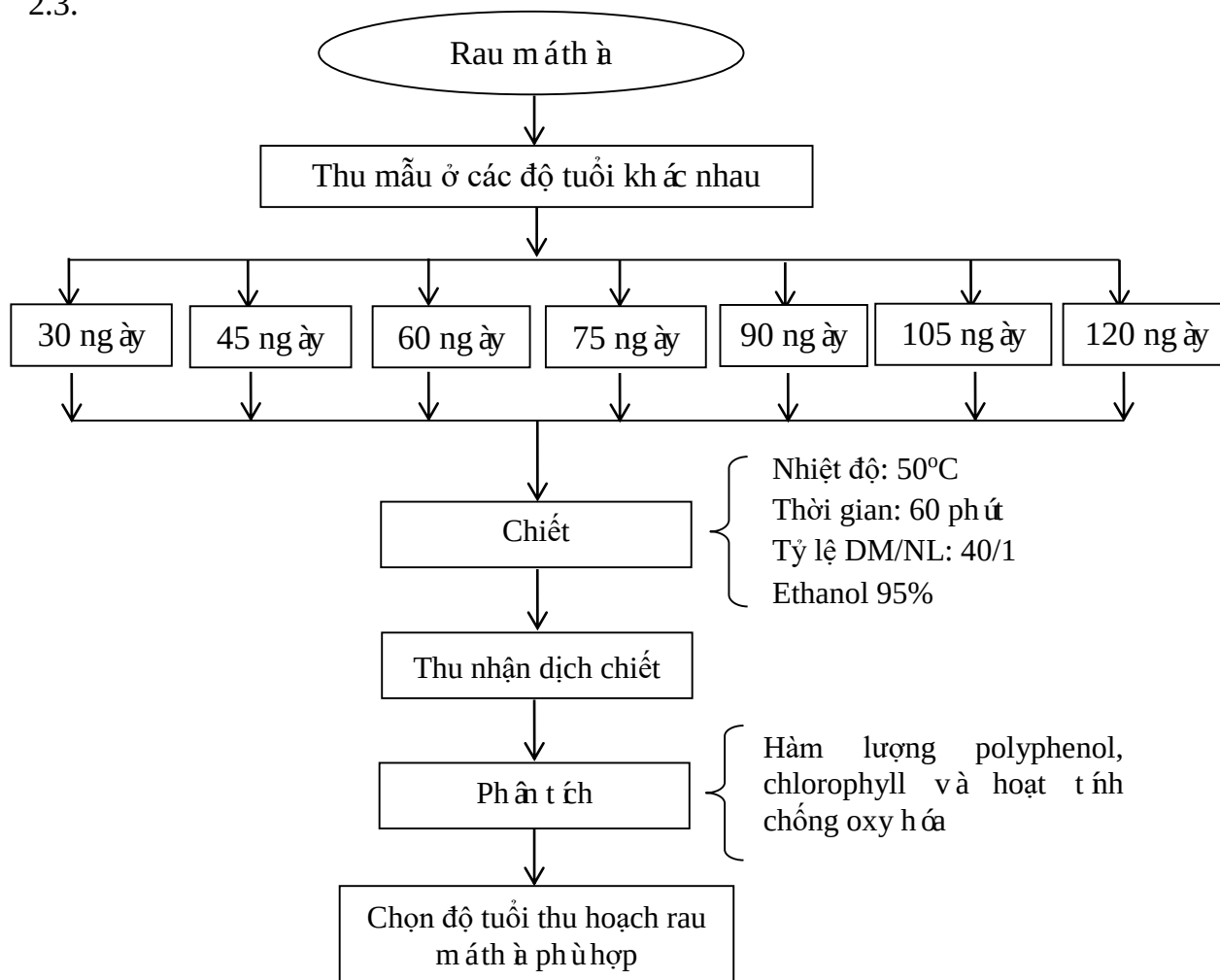
Bột rau má thu nhận sau quá trình sấy phun sẽ được nghiên cứu phối trộn với một số thành phần khác như: đường saccharose, ... Kết quả nghiên cứu là cơ sở để lựa chọn được tỷ lệ các chất phối trộn phù hợp cho sản phẩm bột rau má định hướng dùng trong đồ uống.

Ngoài ra, còn tiến hành nghiên cứu đánh giá sự biến đổi hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa của bột rau má là theo thời gian lưu giữ ở nhiệt độ thường và nhiệt độ lạnh. Kết quả đánh giá là cơ sở để sơ bộ đề xuất chế độ lưu giữ bột rau má phù hợp cho sử dụng làm đồ uống.

## 2.2.2. Bố trí thí nghiệm xác định thông số thích hợp các nội dung nghiên cứu

### 2.2.2.1. Nghiên cứu xác định thời gian thu hoạch rau má thà

Bố trí thí nghiệm xác định thời gian thu hoạch rau má thà đã được trình bày ở hình 2.3.



**Hình 2.3. Bố trí thí nghiệm xác định độ tuổi thu hoạch rau má thà**

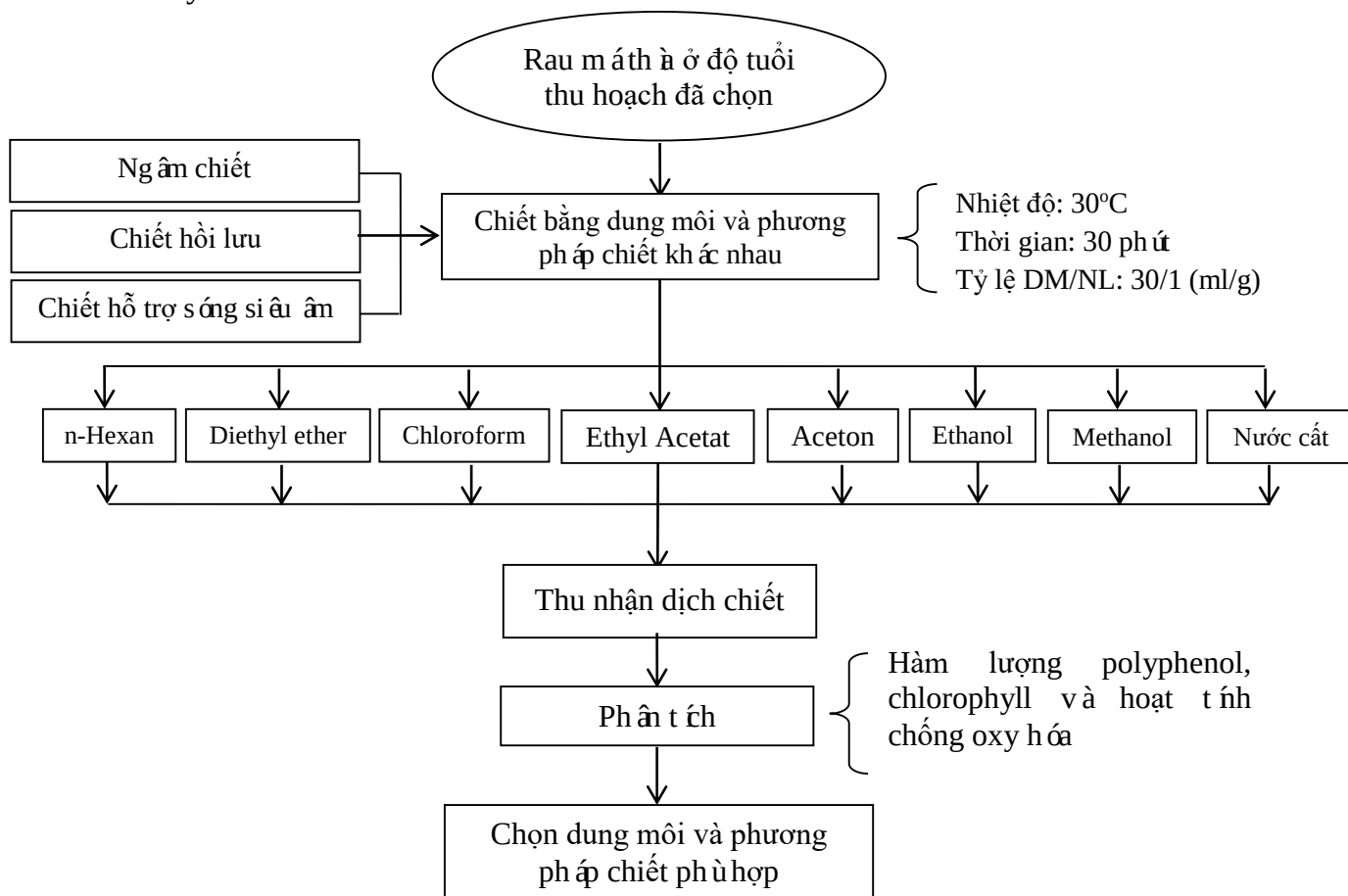
Rau má thà được gieo trồng trên ruộng chuyên canh tác về rau má của Công ty TNHH Thương mại Trang Nông và được thu nhận vào các độ tuổi thu hoạch khác nhau: 30, 45, 60, 75, 90, 105 và 120 ngày tuổi. Sau khi thu hoạch, rau má được rửa sạch, sấy khô bằng thiết bị sấy bơm nhiệt sử dụng bức xạ hồng ngoại ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 8 giờ và nghiền nhỏ để sử dụng trong suốt quá trình nghiên cứu. Bột rau má thà được chiết trong điều kiện có hỗ trợ sóng siêu âm bằng dung môi ethanol 95% với tỷ lệ DM/NL 40/1 trong thời gian 60 phút ở nhiệt độ chiết 50°C. Sau khi chiết rút, lọc thu dịch chiết và xác định hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả xác định hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa cao là cơ sở để lựa chọn độ tuổi thu hoạch rau má thà dùng cho nghiên cứu.

### 2.2.2.2. Nghiên cứu tách chiết polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thà

**\* Xác định các thông số của quá trình chiết polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thà**

**+ Xác định dung môi và phương pháp chiết**

Tiến hành bố trí thí nghiệm xác định dung môi và phương pháp chiết theo sơ đồ trình bày ở hình 2.4.

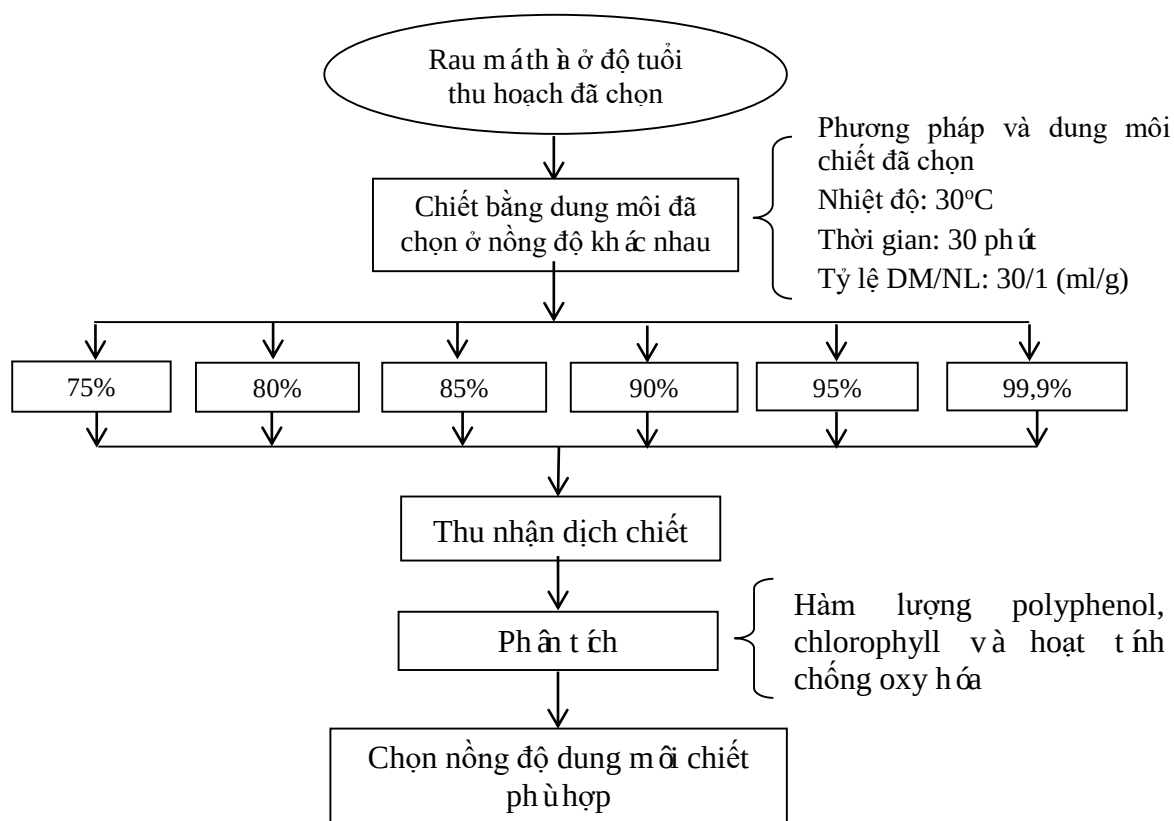


**Hình 2.4. Bố trí thí nghiệm xác định dung môi và phương pháp chiết**

Rau má thà ở độ tuổi thu hoạch đã chọn được sử dụng cho nghiên cứu xác định dung môi và phương pháp chiết. Tiến hành chiết rút polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thà bằng các dung môi chiết có độ phân cực khác nhau: nước cất, methanol, aceton, ethanol, ethyl acetat, chloroform, diethyl ether và n-hexan. Quá trình chiết rút được thực hiện theo 3 phương thức chiết khác nhau: ngâm chiết, chiết hồi lưu và chiết có hỗ trợ sóng siêu âm với tỷ lệ DM/NL 30/1 ml/g trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ chiết 30°C. Sau khi chiết rút, lọc thu dịch chiết và xác định hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả xác định cao là cơ sở để lựa chọn dung môi và phương pháp chiết.

### + Xác định nồng độ dung môi

Từ kết quả thí nghiệm ở trên, tiến hành bố trí thí nghiệm xác định nồng độ dung môi chiết theo sơ đồ trình bày ở hình 2.5.



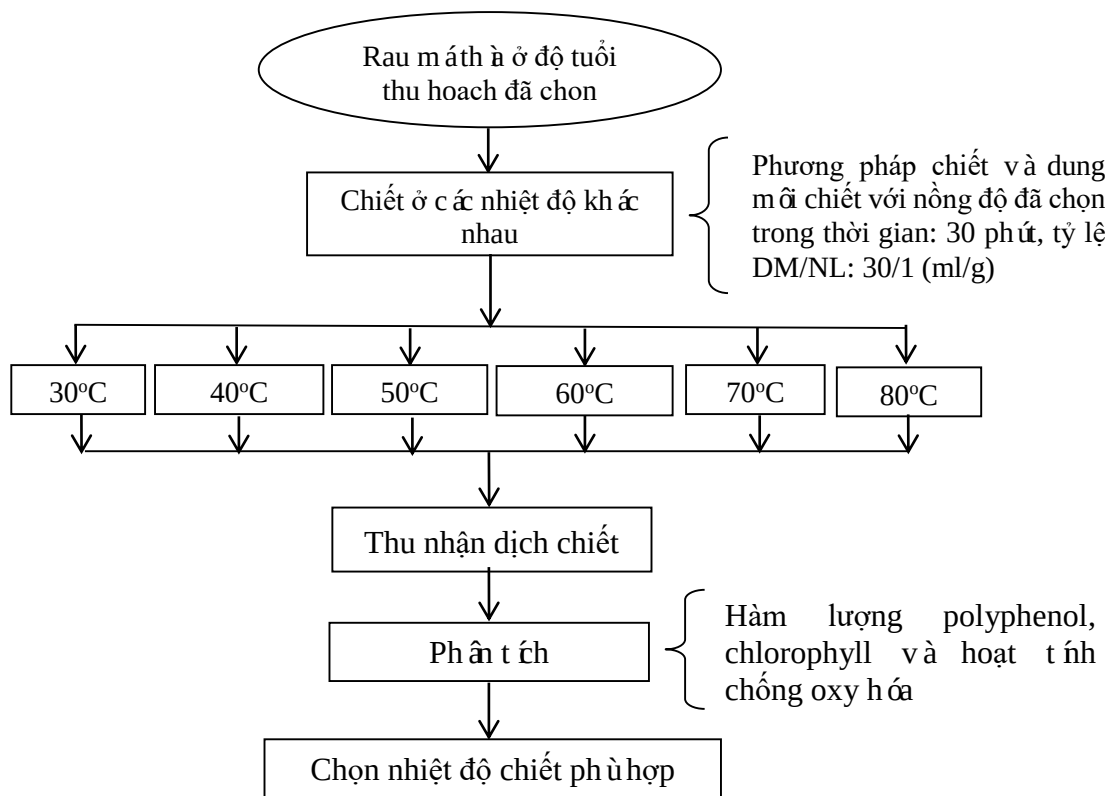
**Hình 2.5. Bố trí thí nghiệm xác định nồng độ dung môi**

Từ sơ đồ bố trí thí nghiệm ở hình 2.5, tiến hành chiết rút các chất từ rau m á th à theo các điều kiện đã chọn ở trên nhưng nồng độ dung môi chiết khác nhau: 75, 80, 85, 90, 95 và 99,9% với tỷ lệ DM/NL là 30/1 trong thời gian chiết 30 phút ở nhiệt độ 30°C. Sau khi chiết rút, lọc thu dịch chiết, xác định hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả xác định cao là cơ sở để chọn nồng độ dung môi chiết.

### + Xác định nhiệt độ chiết

Tiến hành bố trí thí nghiệm xác định nhiệt độ chiết theo sơ đồ trình bày ở hình 2.6.

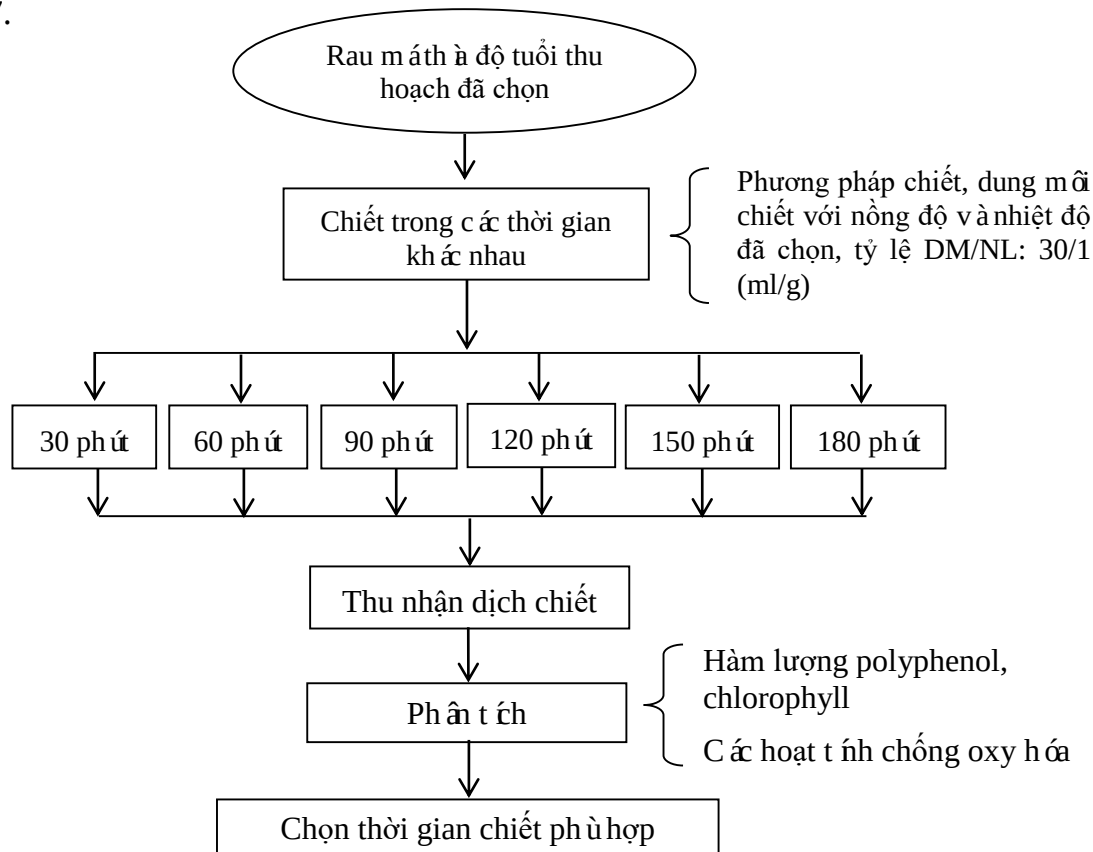
Từ sơ đồ bố trí thí nghiệm, tiến hành chiết rút các chất từ rau m á th à theo các điều kiện đã chọn ở trên nhưng nhiệt độ chiết khác nhau: 30, 40, 50, 60, 70 và 80°C với tỷ lệ DM/NL 30/1 trong thời gian chiết là 30 phút. Sau khi chiết rút, lọc thu dịch chiết và xác định hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả xác định cao là cơ sở để chọn nhiệt độ chiết phù hợp cho quá trình nghiên cứu.



**Hình 2.6. Bố trí thí nghiệm xác định nhiệt độ chiết**

#### + Xác định thời gian chiết

Tiến hành bố trí thí nghiệm xác định thời gian chiết theo sơ đồ trình bày ở hình 2.7.

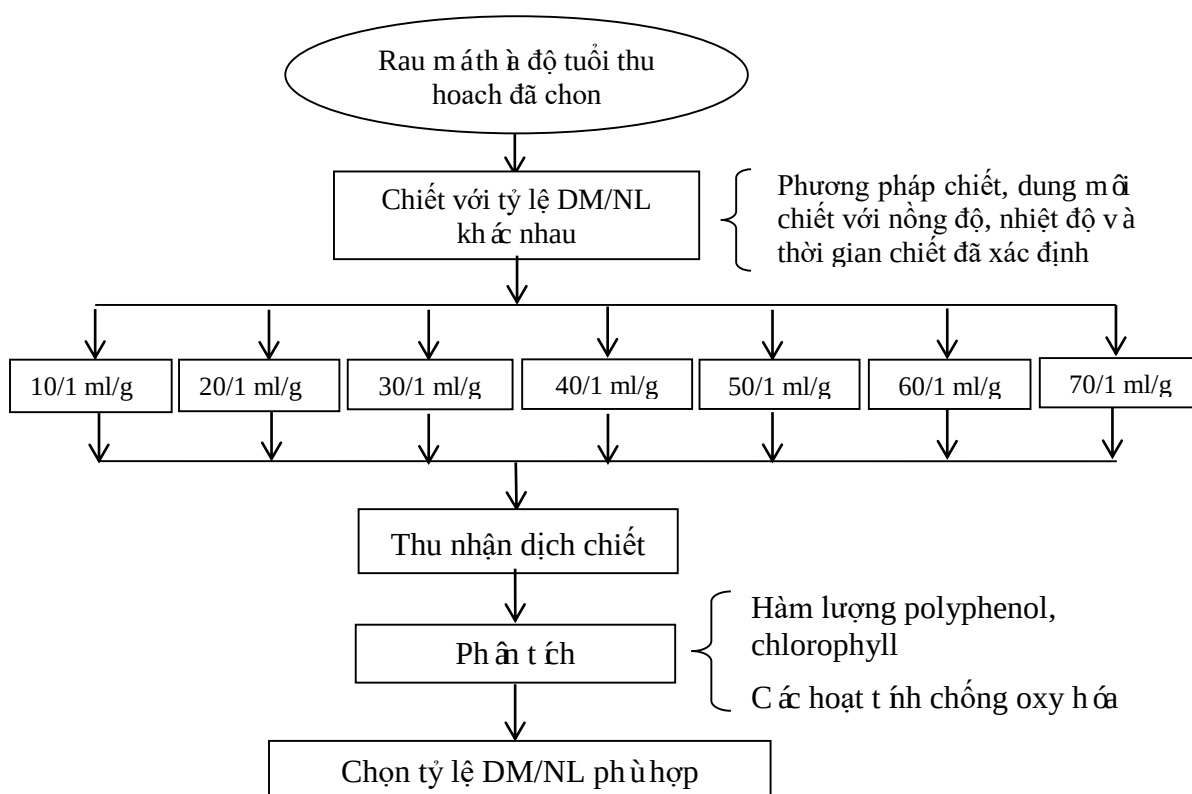


**Hình 2.7. Bố trí thí nghiệm xác định thời gian chiết**

Theo sơ đồ bố trí thí nghiệm ở hình 2.7, tiến hành chiết rút các chất từ rau má thành các thông số đã chọn trong các thí nghiệm trước nhưng thời gian chiết thay đổi khác nhau: 30, 60, 90, 120, 150, 180 phút với tỷ lệ DM/NL 30/1. Sau khi chiết rút, lọc thu dịch chiết và xác định hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả xác định cao là cơ sở để chọn thời gian chiết phù hợp.

#### + Xác định tỷ lệ DM/NL

Từ kết quả thí nghiệm ở trên, tiến hành bố trí thí nghiệm xác định tỷ lệ DM/NL theo sơ đồ trình bày ở hình 2.8.



**Hình 2.8. Bố trí thí nghiệm xác định tỷ lệ DM/NL**

Theo sơ đồ bố trí thí nghiệm ở hình 2.8, tiến hành chiết rút các chất từ rau má thành các thông số đã chọn trong các thí nghiệm trước nhưng tỷ lệ DM/NL thay đổi khác nhau: 10/1, 20/1, 30/1, 40/1, 50/1, 60/1 và 70/1 (ml/g). Sau khi chiết rút, lọc thu dịch chiết và xác định hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả xác định cao là cơ sở để chọn tỷ lệ DM/NL chiết phù hợp.

#### \* Nghiên cứu tối ưu chiết polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má

Thiết kế tối ưu quá trình chiết polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má với mô hình Box-Behnken. Chọn các yếu tố tác động trong quá trình tối ưu gồm: nhiệt độ chiết [ $X_1$ , (°C)], thời gian chiết [ $X_2$ , (phút)] và tỷ lệ DM/NL [ $X_3$ ,

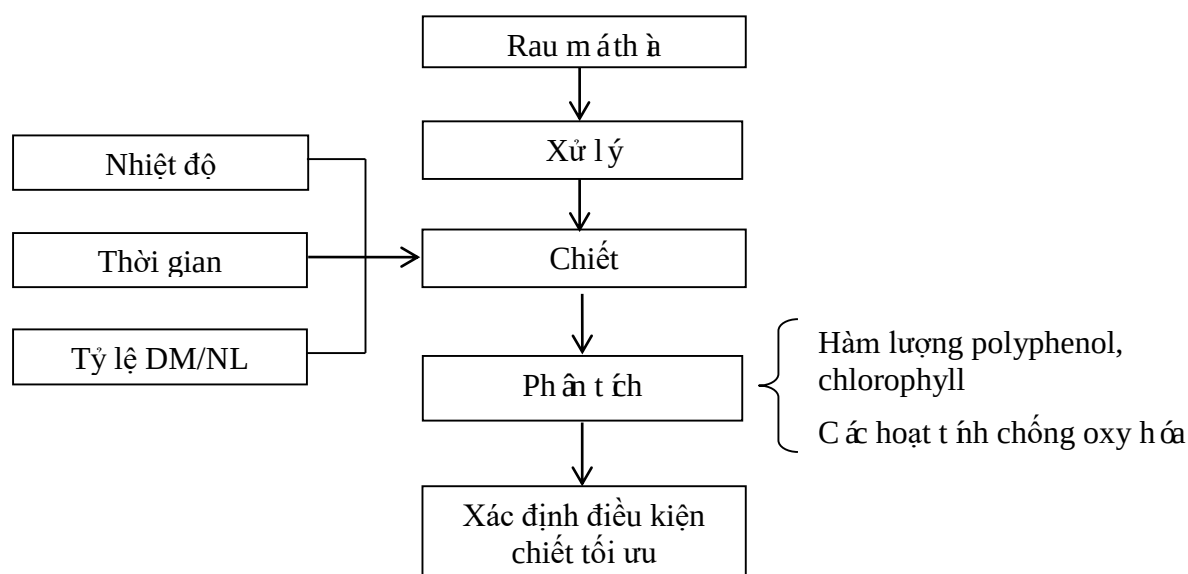


(ml/g)]. Các giá trị thực của các biến  $X_1$ ,  $X_2$  và  $X_3$  được xác định dựa trên các thí nghiệm khảo sát trước đó.

**Bảng 2.1. Các mức điều kiện thí nghiệm tối ưu công đoạn chiết**

| Các mức   | Các yếu tố ảnh hưởng |              |              |
|-----------|----------------------|--------------|--------------|
|           | $X_1$ (°C)           | $X_2$ (phút) | $X_3$ (ml/g) |
| Mức trên  | 1                    | 1            | 1            |
| Mức cơ sở | 0                    | 0            | 0            |
| Mức dưới  | -1                   | -1           | -1           |

Sơ đồ bố trí thí nghiệm tối ưu điều kiện chiết polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa như hình 2.9.



**Hình 2.9. Bố trí thí nghiệm tối ưu chiết polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má**

Các hàm mục tiêu của quá trình tối ưu là hàm lượng polyphenol [ $Y_1$ , (mg acid galic/g chất khô)], hàm lượng chlorophyll [ $Y_2$ , (mg/g chất khô)] và hoạt tính chống oxy hóa tổng [ $Y_3$ , (mg acid ascorbic/g chất khô)].

**Bảng 2.2. Ma trận quy hoạch thực nghiệm tối ưu công đoạn chiết**

| STT | $X_1$ (°C) | $X_2$ (phút) | $X_3$ (ml/g) | $Y_1$<br>(mg acid galic/g chất khô) | $Y_2$<br>(mg/g chất khô) | $Y_3$<br>(mg acid ascorbic/g chất khô) |
|-----|------------|--------------|--------------|-------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------|
| 1.  | -1         | -1           | 0            | -                                   | -                        | -                                      |
| 2.  | 1          | -1           | 0            | -                                   | -                        | -                                      |
| 3.  | -1         | 1            | 0            | -                                   | -                        | -                                      |

|     |    |    |    |   |   |   |
|-----|----|----|----|---|---|---|
| 4.  | 1  | 1  | 0  | - | - | - |
| 5.  | -1 | 0  | -1 | - | - | - |
| 6.  | 1  | 0  | -1 | - | - | - |
| 7.  | -1 | 0  | 1  | - | - | - |
| 8.  | 1  | 0  | 1  | - | - | - |
| 9.  | 0  | -1 | -1 | - | - | - |
| 10. | 0  | 1  | -1 | - | - | - |
| 11. | 0  | -1 | 1  | - | - | - |
| 12. | 0  | 1  | 1  | - | - | - |
| 13. | 0  | 0  | 0  | - | - | - |
| 14. | 0  | 0  | 0  | - | - | - |
| 15. | 0  | 0  | 0  | - | - | - |
| 16. | 0  | 0  | 0  | - | - | - |
| 17. | 0  | 0  | 0  | - | - | - |

Sử dụng phần mềm DesignExpert 12.0 hỗ trợ xử lý tối ưu, kiểm định t và đưa ra được phương trình hồi quy, mô hình toán học và các biểu đồ, đồ thị thể hiện sự ảnh hưởng và mối tương quan giữa các yếu tố gồm: nhiệt độ chiết ( $X_1$ ), thời gian chiết ( $X_2$ ) và tỷ lệ DM/NL ( $X_3$ ) đến hàm lượng polyphenol ( $Y_1$ ), hàm lượng chlorophyll ( $Y_2$ ) và hoạt tính chống oxy hóa tổng ( $Y_3$ ).

Sau khi có kết quả thực nghiệm thì tiến hành phân tích ảnh hưởng các biến độc lập ( $X_i$ ) đến hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa tổng bằng việc thiết lập phương trình hồi quy bậc 2 về mối tương quan giữa biến phụ thuộc và biến độc lập.

Phương trình hồi quy có dạng:  $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$

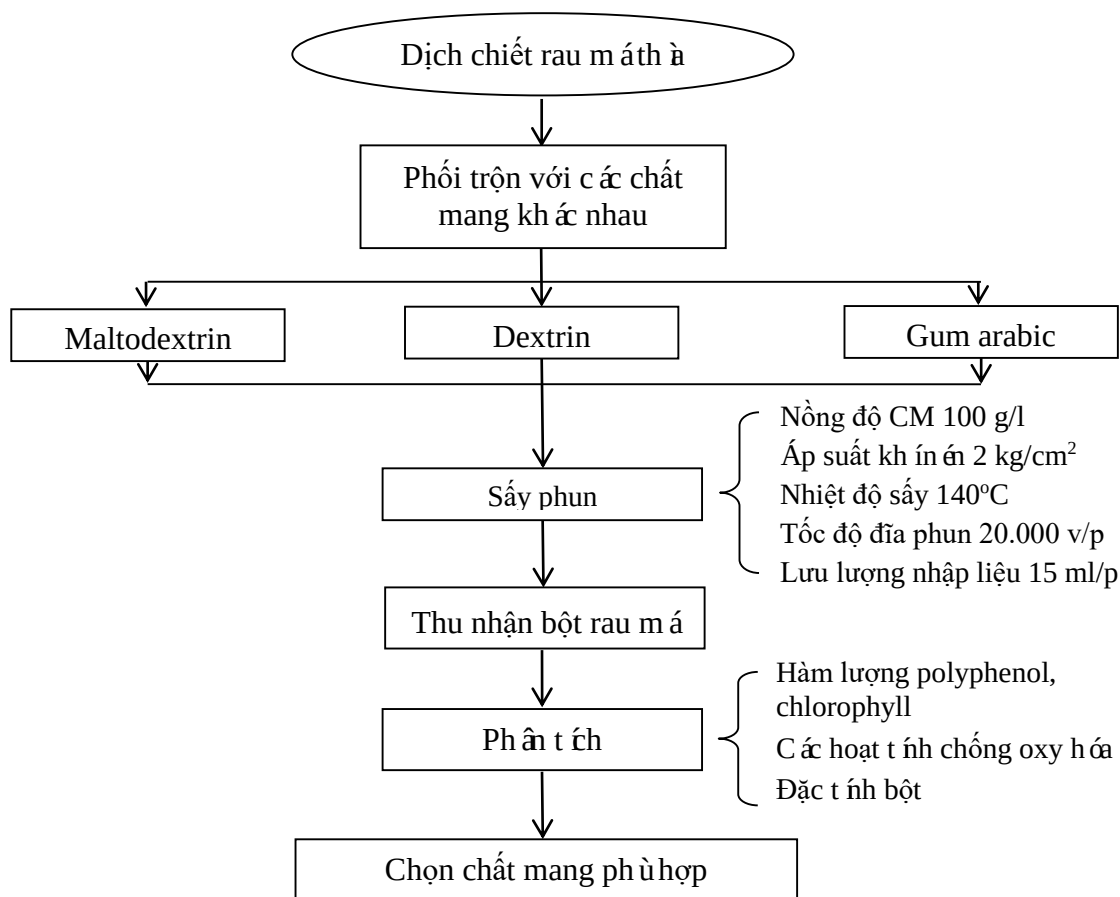
Phần mềm DesignExpert 12.0 sẽ tiến hành đoán và gợi ý các điều kiện tối ưu để chiết tách được hàm lượng polyphenol ( $Y_1$ ), chlorophyll ( $Y_2$ ) và hoạt tính chống oxy hóa tổng ( $Y_3$ ) cao nhất ( $Y_i = [\max]$ ). Tiến hành thí nghiệm để xác định kết quả tối ưu so với kết quả tiên đoán để tìm điều kiện tối ưu cho quá trình chiết polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má

### 2.2.2.3. Nghiên cứu sấy phun tạo bột rau má chứa polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa

#### \* Nghiên cứu xác định thông số quá trình sấy phun

##### + Xác định chất mang

Tiến hành bố trí thí nghiệm xác định loại chất mang cho quá trình sấy phun theo sơ đồ trình bày ở hình 2.10.



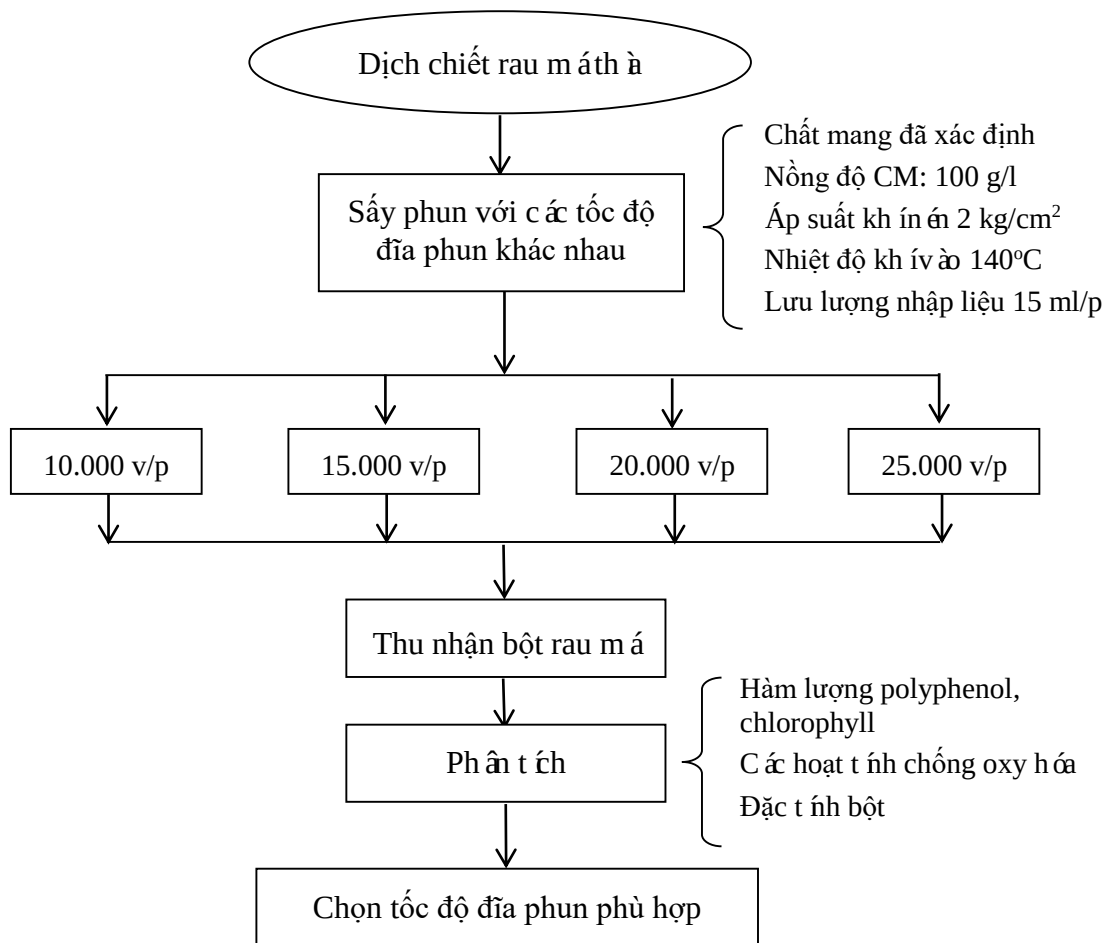
**Hình 2.10. Bố trí thí nghiệm xác định chất mang**

Dịch chiết rau má thái thu nhận trong quá trình chiết ở điều kiện tối ưu được cô đặc chân không ở nhiệt độ 60°C với áp suất chân không 75mBar và nhiệt độ ngưng tụ 5°C đến đạt nồng độ chất khô trong dịch sau cô đặc là 18°Bx.

Theo sơ đồ bố trí thí nghiệm ở hình 2.10, các mẫu dịch chiết rau má thái sau cô đặc được phối trộn 3 loại chất mang (maltodextrin, dextrin và gum arabic) với nồng độ là 100 g/l, áp suất kh ín ín 2 kg/cm<sup>2</sup> tại nhiệt độ sấy 140°C, tốc độ đĩa phun 20.000 v/p và lưu lượng nhập liệu 15 ml/p. Mẫu bột rau má thái thu nhận được sau quá trình sấy phun có hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa cao và đặc tính bột tốt là cơ sở để chọn loại chất mang cho quá trình nghiên cứu sấy phun.

### + Xác định tốc độ đĩa phun

Tiến hành bố trí thí nghiệm xác định tốc độ đĩa phun cho quá trình sấy phun theo sơ đồ trình bày ở hình 2.11.

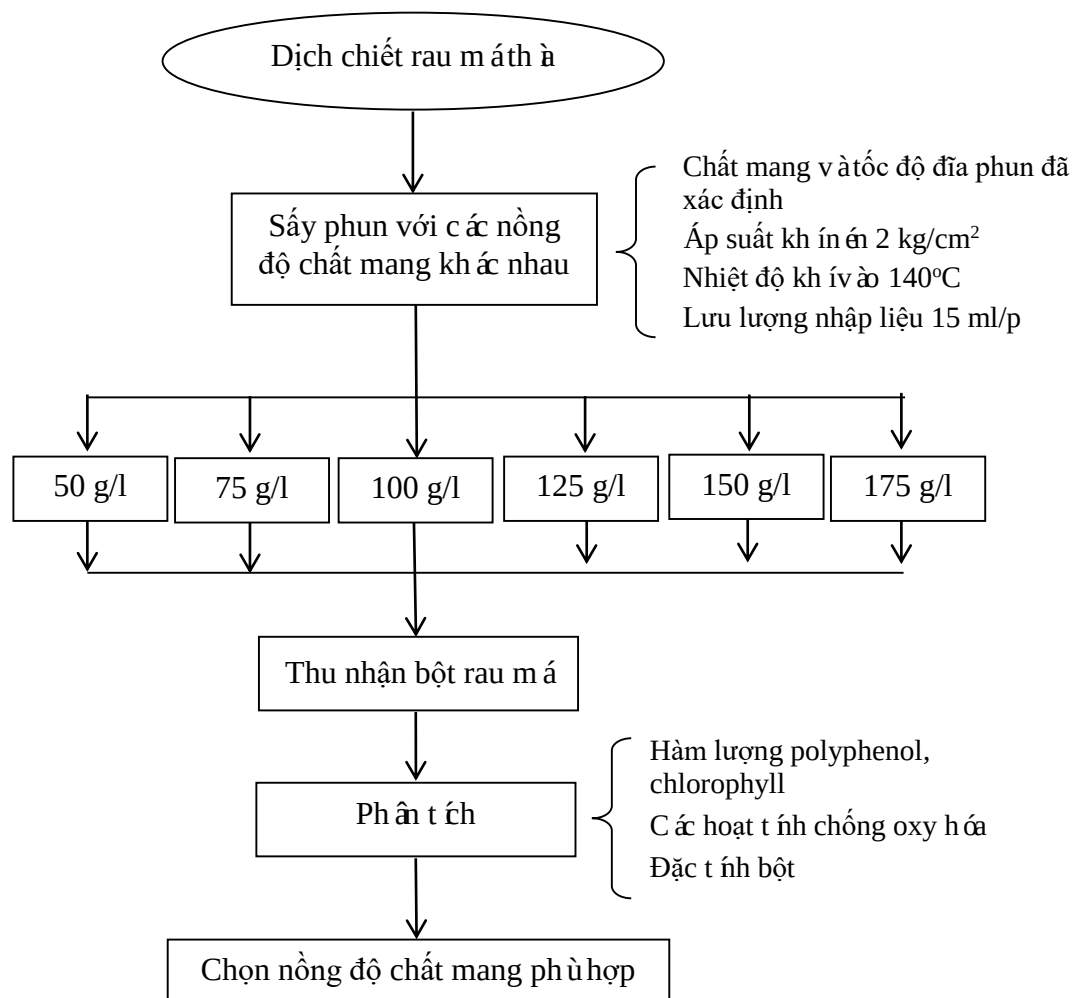


**H ình 2.11. Bô tr íth íng nghiệm xác định tốc độ đĩa phun**

Theo sơ đồ bố trí thí nghiệm ở hình 2.11, các mẫu dịch chiết rau má thà sau cô đặc tiếp tục được nghiên cứu sấy phun với chất mang phù hợp đã xác định, nồng độ chất mang là 100 g/l, áp suất kh ín ín 2 kg/cm<sup>2</sup>, nhiệt độ sấy 140°C, tốc độ đĩa phun 20.000 v/p, lưu lượng nhập liệu 15 ml/p và tại các tốc độ đĩa phun khác nhau: 10.000, 15.000, 20.000 và 25.000 (v/p). Mẫu bột rau má thà thu nhận được sau quá trình sấy phun có hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt t nh chống oxy hóa cao và đặc t nh bột tốt là cơ sở để chọn tốc độ đĩa phun phù hợp cho quá trình sấy phun.

### + Xác định nồng độ chất mang

Tiến hành bố trí thí nghiệm xác định nồng độ chất mang cho quá trình sấy phun theo sơ đồ trình bày ở hình 2.12.



**H ình 2.12. Bô tr íth íng nghiệm xác định nồng độ chất mang**

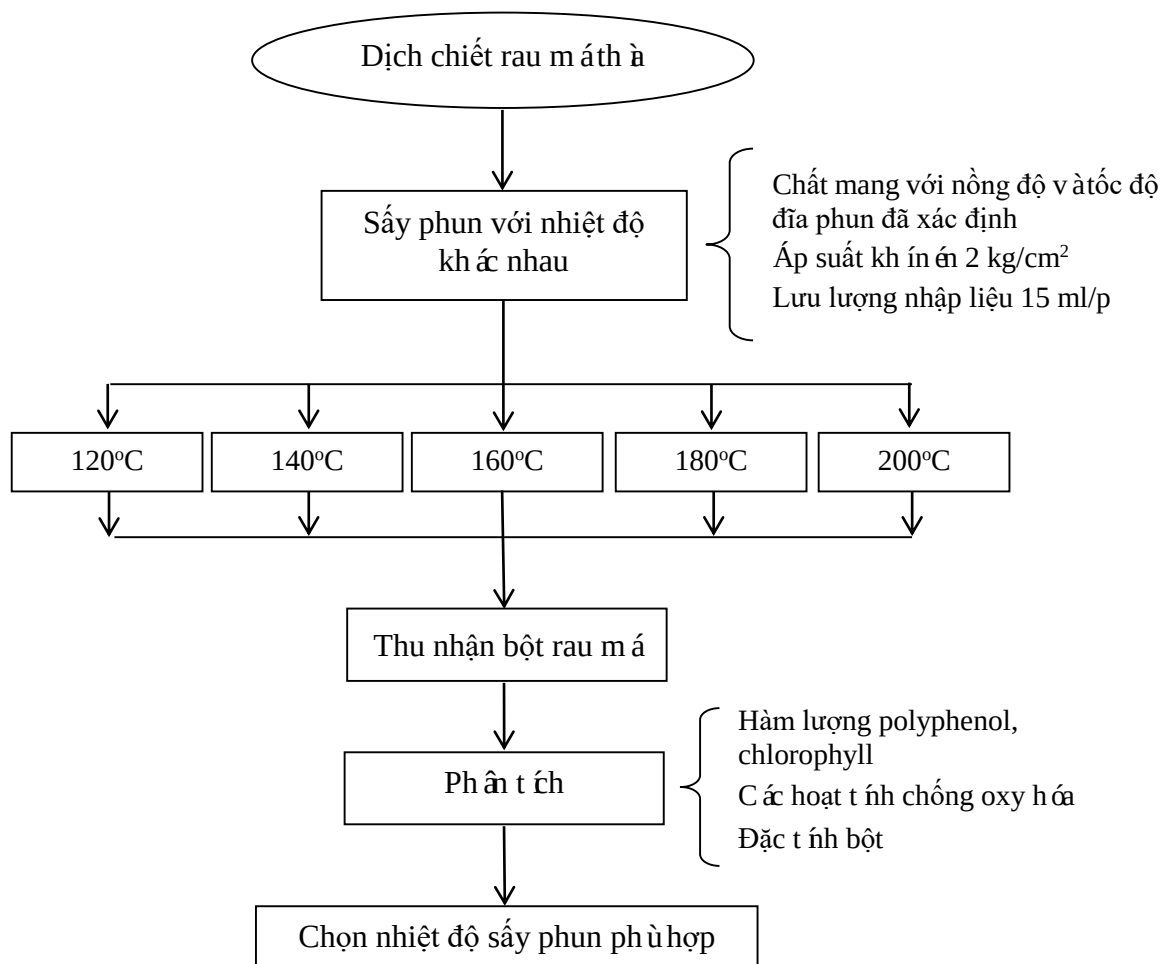
Theo sơ đồ bố tr íth íng nghiệm ở h ình 2.12, tiến hành sấy phun thu bột rau má thái theo các thông số đã chọn trong các thí nghiệm trước nhưng nồng độ chất mang bổ sung cho dịch chiết khác nhau: 50, 75, 100, 125, 150 và 175 (g/l) với áp suất kh ín ến 2 kg/cm<sup>2</sup> trong nhiệt độ sấy 140°C và lưu lượng nhập liệu 15 ml/p. Mẫu bột rau má thái thu nhận được sau quá trình sấy phun có hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa cao và đặc tính bột tốt là cơ sở để chọn nồng độ chất mang phù hợp cho quá trình sấy phun.

#### **+ Xác định nhiệt độ sấy phun**

Tiến hành bố tr íth íng nghiệm xác định nhiệt độ sấy phun cho quá trình sấy phun theo sơ đồ trình bày ở h ình 2.13.

Theo sơ đồ bố tr íth íng nghiệm trên, tiến hành sấy phun thu bột rau má thái theo các thông số đã chọn trong các thí nghiệm trước nhưng nhiệt độ sấy phun khác nhau: 120,

140, 160, 180 và 200 (°C) với áp suất kh ín ến 2 kg/cm<sup>2</sup>, lưu lượng nhập liệu 15 ml/p. Mẫu bột rau má th à thu nhận được sau qu á tr ình sấy phun c ó hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt t ình chống oxy hóa cao và đặc t ình bột tốt là cơ sở để chọn nhiệt độ sấy ph ù hợp cho qu á tr ình sấy phun.

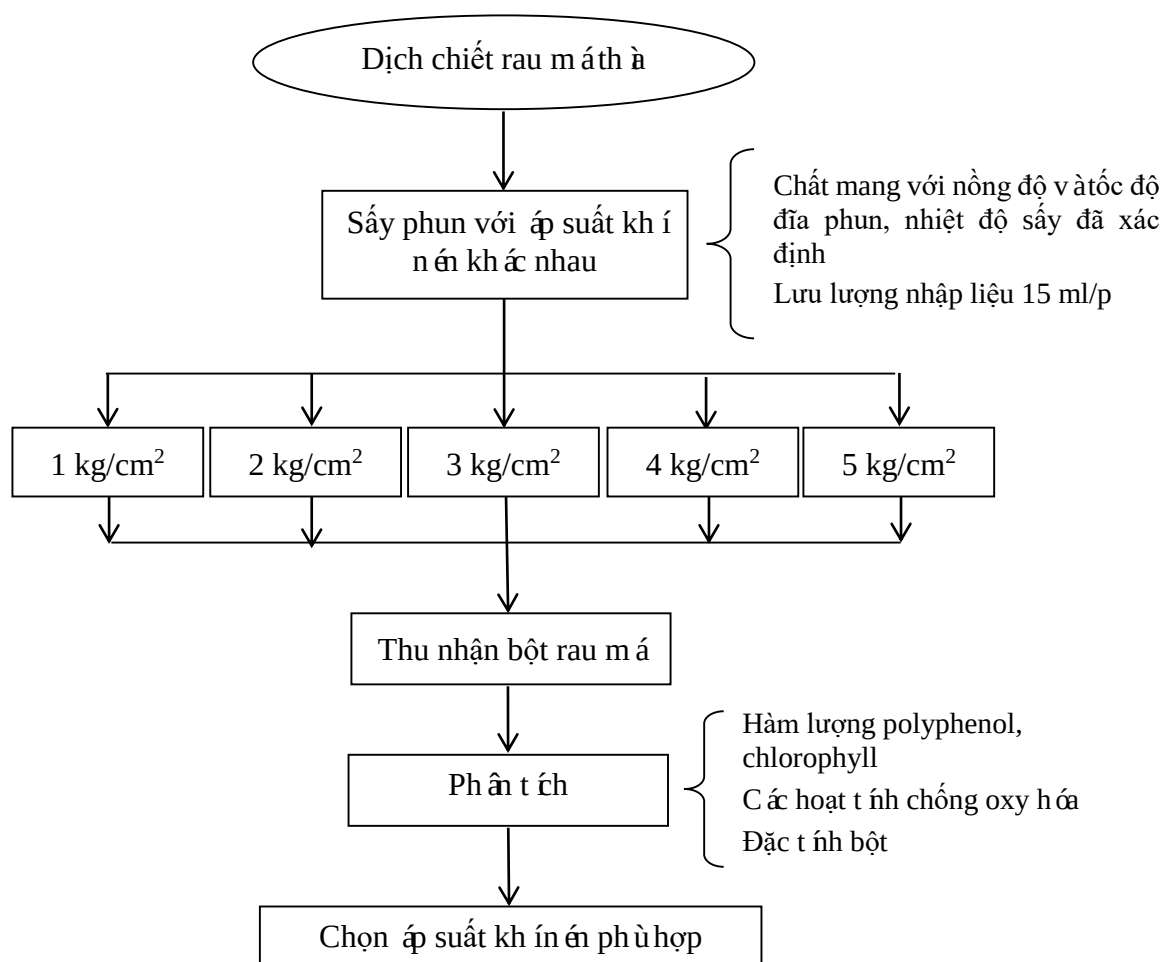


**H ình 2.13. Bô tr íth íng nghiệm xác định nhiệt độ sấy phun**

#### **+ Xác định áp suất kh ín ến**

Tiến hành bô tr íth íng nghiệm xác định áp suất kh ín ến cho qu á tr ình sấy phun theo sơ đồ tr ình bày ở h ình 2.14.

Theo sơ đồ bô tr íth íng nghiệm tr ên, tiến hành sấy phun thu bột rau má th à theo c ác thông số đã chọn trong c ác th íng nghiệm trước nhưng lưu lượng nhập liệu 15 ml/p v à áp suất kh ín ến cấp vào đĩa phun kh ác nhau: 1, 2, 3, 4 v à 5 (kg/cm<sup>2</sup>). Mẫu bột rau má th à thu nhận được sau qu á tr ình sấy phun c ó hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt t ình chống oxy hóa cao và đặc t ình bột tốt là cơ sở để chọn áp suất kh ín ến ph ù hợp cho qu á tr ình sấy phun.



**H ình 2.14. B ố tr íth ính nghiệm xác định áp suất kh í n ến**

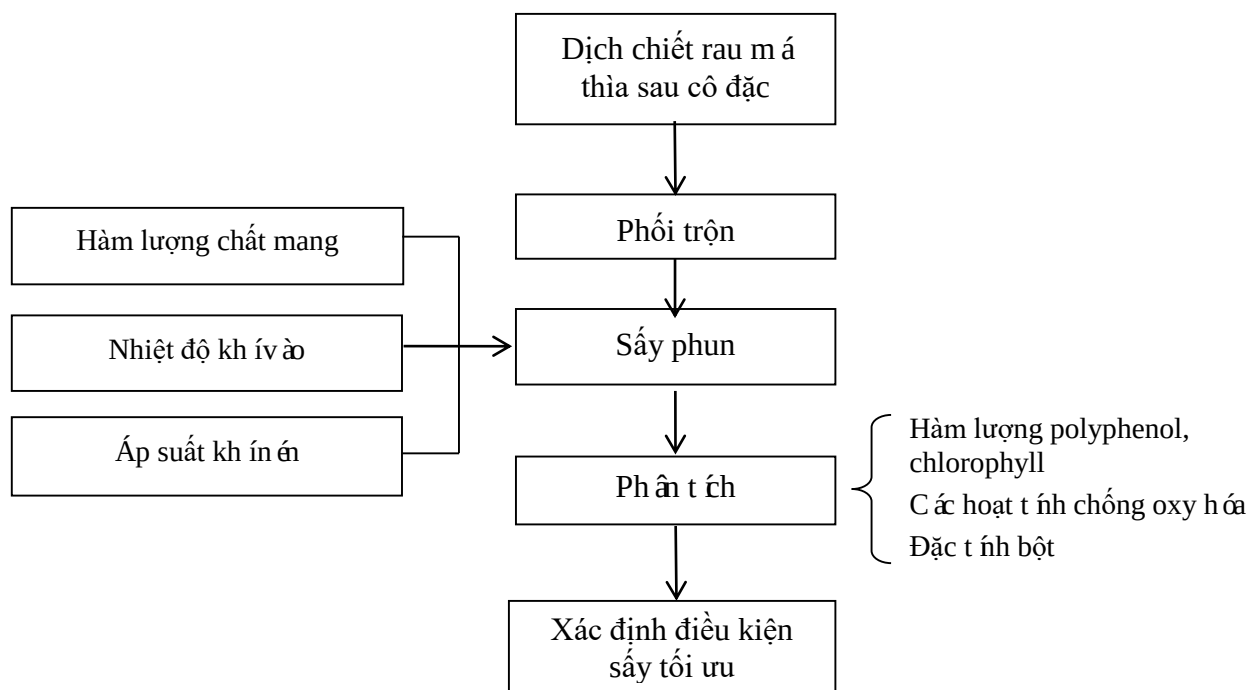
**\* Nghiên cứu tối ưu công đoạn sấy phun tạo bột rau má th à**

Thiết kế tối ưu quá trình sấy phun thu nhận bột rau má th à chứa polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa với mô hình Box-Behnken. Chọn các yếu tố tác động cho qu átr ình tối ưu gồm: nồng độ chất mang [ $X_1$ , (g/l)], nhiệt độ sấy [ $X_2$ , ( $^{\circ}\text{C}$ )] v à áp suất kh í n ến [ $X_3$ , ( $\text{kg}/\text{cm}^2$ )].

**Bảng 2.3. Các mức điều kiện th ính nghiệm tối ưu công đoạn sấy phun**

| C ác mức  | C ác yếu tố ảnh hưởng |                             |                                  |
|-----------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------------|
|           | $X_1$ (g/l)           | $[X_2, (^{\circ}\text{C})]$ | $[X_3, (\text{kg}/\text{cm}^2)]$ |
| Mức tr ên | 1                     | 1                           | 1                                |
| Mức cơ sở | 0                     | 0                           | 0                                |
| Mức dưới  | -1                    | -1                          | -1                               |

Sơ đồ bố tr íth ính nghiệm tối ưu sấy phun tạo bột rau má th à chứa polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa như hình 2.15.



**H ình 2.15. Bô tr í th í nghiệm tối ưu sấy phun**

C ác h àm mục ti êu trong qu á tr ình tối ưu là hàm lượng polyphenol [ $Y_1$ , (mg acid galic/g)], chlorophyll [ $Y_2$ , (mg/g)] và hoạt t ính chống oxy hóa tổng [ $Y_3$ , (mg acid ascorbic/g)].

**Bảng 2.4. Ma trận quy hoạch thực nghiệm tối ưu công đoạn sấy phun**

| STT | $X_1$ (g/l) | $X_2$ (°C) | $X_3$ (kg/cm <sup>2</sup> ) | $Y_1$ (mg acid galic/g) | $Y_2$ (mg/g) | $Y_3$ (mg acid ascorbic/g) |
|-----|-------------|------------|-----------------------------|-------------------------|--------------|----------------------------|
| 1.  | -1          | -1         | 0                           | -                       | -            | -                          |
| 2.  | 1           | -1         | 0                           | -                       | -            | -                          |
| 3.  | -1          | 1          | 0                           | -                       | -            | -                          |
| 4.  | 1           | 1          | 0                           | -                       | -            | -                          |
| 5.  | -1          | 0          | -1                          | -                       | -            | -                          |
| 6.  | 1           | 0          | -1                          | -                       | -            | -                          |
| 7.  | -1          | 0          | 1                           | -                       | -            | -                          |
| 8.  | 1           | 0          | 1                           | -                       | -            | -                          |
| 9.  | 0           | -1         | -1                          | -                       | -            | -                          |
| 10. | 0           | 1          | -1                          | -                       | -            | -                          |



|     |   |    |   |   |   |   |
|-----|---|----|---|---|---|---|
| 11. | 0 | -1 | 1 | - | - | - |
| 12. | 0 | 1  | 1 | - | - | - |
| 13. | 0 | 0  | 0 | - | - | - |
| 14. | 0 | 0  | 0 | - | - | - |
| 15. | 0 | 0  | 0 | - | - | - |
| 16. | 0 | 0  | 0 | - | - | - |
| 17. | 0 | 0  | 0 | - | - | - |

Sử dụng phần mềm DesignExpert 12.0 để hỗ trợ xử lý tối ưu, kiểm định t và đưa ra các phương trình hồi quy, mô hình toán học và các biểu đồ, đồ thị thể hiện sự ảnh hưởng và mối tương quan giữa các yếu tố gồm: Nồng độ chất mang ( $X_1$ ), nhiệt độ sấy phun ( $X_2$ ) và áp suất kh ín ín ( $X_3$ ) đến hàm lượng polyphenol ( $Y_1$ ), chlorophyll ( $Y_2$ ) và hoạt t ính chống oxy hóa tổng ( $Y_3$ ).

Sau khi có kết quả thực nghiệm, phân t ích ảnh hưởng c ủa biến độc lập đến hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt t ính chống oxy hóa tổng bằng việc thiết lập phương hồi quy bậc 2 về mối tương quan giữa biến phụ thuộc và biến độc lập.

Phương trình hồi quy có dạng:  $Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$

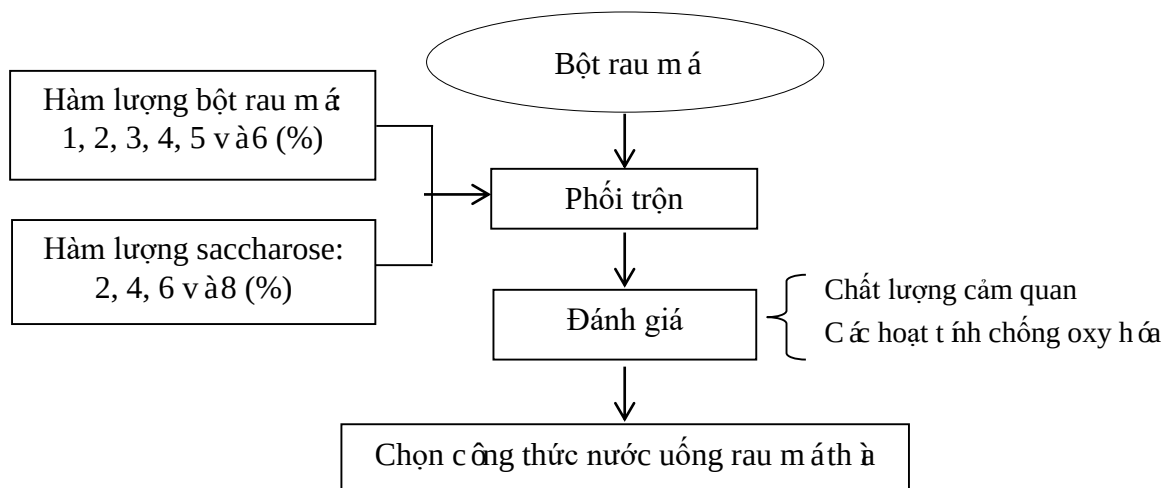
Sử dụng phần mềm DesignExpert 12.0 để t ỉn đoán và gợi ý điều kiện tối ưu nhằm thu được bột rau má chứa hàm lượng polyphenol ( $Y_1$ ), chlorophyll ( $Y_2$ ) và hoạt t ính chống oxy hóa tổng ( $Y_3$ ) cao nhất ( $Y_i = [\max]$ ). Tiến hành thí nghiệm để thẩm định kết quả tối ưu từ giá trị dự đoán để tìm điều kiện tối ưu cho quá trình sấy phun thu nhận bột rau má chứa polyphenol, chlorophyll có hoạt t ính chống oxy hóa.

#### 2.2.2.4. Xác định công thức đồ uống nước rau má th à

Tiến hành bố trí thí nghiệm xác định công thức đồ uống rau má th à theo sơ đồ trình bày ở hình 2.16.

Thực hiện quá trình phối trộn bột rau má th à để có đồ uống nước rau má chứa polyphenol, chlorophyll có hoạt t ính chống oxy hóa. Bột rau má dùng cho nghiên cứu

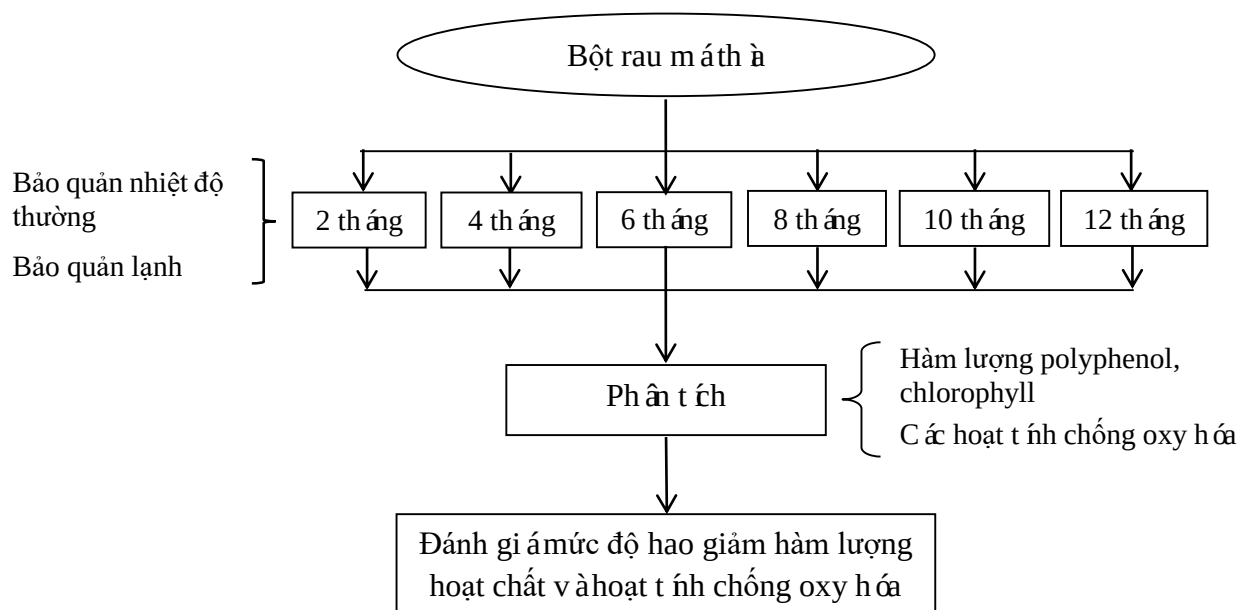
này thu nhận từ quá trình sấy phun ở điều kiện tối ưu. Mỗi đơn vị thể tích nước tinh khiết được cho vào các nồng độ bột rau má là khác nhau là 1, 2, 3, 4, 5 và 6 (%) và đường saccharose là 2, 4, 6 và 8 (%) để tạo vị ngọt. Các mẫu đồ uống nước rau má sau phối trộn được đánh giá cảm quan.



**Hình 2.16. Bố trí thí nghiệm xác định công thức đồ uống nước rau má**

#### 2.2.2.5. Đánh giá biến động hàm lượng polyphenol, chlorophyll và các hoạt tính của bột rau má thìa trong quá trình bảo quản

Tiến hành bố trí thí nghiệm đánh giá biến động hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa của bột rau má thìa trong quá trình bảo quản theo sơ đồ trình bày ở hình 2.17.



**Hình 2.17. Bố trí thí nghiệm đánh giá biến động hàm lượng polyphenol và chlorophyll của bột rau má trong bảo quản**

Theo sơ đồ bố trí thí nghiệm ở hình 2.17, bột rau má thu nhận từ quá trình sấy phun được tiến hành thí nghiệm đánh giá sự hao giảm hàm lượng polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa trong quá trình bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng và bảo quản lạnh. Thời gian thực hiện từ 0÷12 (tháng) với bước nhảy là 2. Trong đó, bảo quản bột rau má ở nhiệt độ phòng được lưu trữ trong tủ vi khí hậu với nhiệt độ  $30\pm1^{\circ}\text{C}$ , độ ẩm 70%, ánh sáng trắng cường độ 50 Lux và bảo quản lạnh trong tủ vi khí hậu ở  $5\pm1^{\circ}\text{C}$ , độ ẩm 50%, ánh sáng trắng cường độ 50 Lux.

## 2.3. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

### 2.3.1. Phương pháp sinh học phân tử

Mẫu rau má thìa (*Centella asiatica* (L.) Urb) trồng ở Nha Trang - Khánh Hòa được thu nhận và tiến hành thí nghiệm định danh loài. Các bước tiến hành định danh loài bằng kỹ thuật phân tích gen DNA như sau:

- Tách chiết DNA: Mẫu rau má được thực hiện tách chiết DNA theo quy trình CTAB I có cải biến trong việc bổ sung SDS vào thành phần đệm phân lập. DNA tổng số của mẫu lá được tách chiết dựa trên quy trình CTAB cơ bản của Kurt Weising có cải tiến [81]. Nghiền 100 mg mẫu lá trong 500  $\mu\text{l}$  CTAB 2% và PVP 2% ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp mẫu/CTAB được ủ ở  $65^{\circ}\text{C}$  trong 60 phút, ly tâm hỗn hợp mẫu/CTAB ở 14.000 rpm trong 10 phút. Chuyển dịch nổi sang ống mới, bổ sung 4  $\mu\text{l}$  RNAase, ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 5 phút, bổ sung 500  $\mu\text{l}$  hỗn hợp chloroform: isoamyl alcohol (24:1), lắc đều, ly tâm ở tốc độ 14.000 rpm trong 10 phút. Thu dịch nổi chứa DNA sang ống mới (khoảng 450-500  $\mu\text{l}$ ), bổ sung ethanol tuyệt đối với tỷ lệ 1:1 so với thể tích thu được và  $\frac{1}{2}$  thể tích NaCl 5M so với thể tích thu được. Hỗn hợp được ủ trên đá trong 1 giờ, ly tâm 13.000 rpm trong 10 phút. Hỗn hợp sau ly tâm được loại bỏ dịch nổi và thu tủa, bổ sung 500  $\mu\text{l}$  ethanol 70% lạnh và đảo ống, ly tâm 13.000 rpm trong 5 phút lặp lại 2 lần, loại bỏ dịch nổi, thu tủa. Để khô kết tủa ở nhiệt độ phòng và hòa DNA trong 200  $\mu\text{l}$  nước khử trùng hai lần.

- Nhân bản 02 gene matK và ITS1–5.8S–ITS2 bằng phản ứng PCR với các mẫu đặc hiệu:

Các phản ứng PCR được thực hiện nhằm khuếch đại vùng *matK*, ITS với các cặp primer tương ứng.

+ Vùng matK: matK 2011F: 5'-CGA TCT ATT CAT TCA ATA TTT C-3' và matK 2011R: 5'-GTT CTA GCA CAA GAA AGT CG-3'

+ Vùng ITS: 18d: 5'-CAC ACC GCC CGT CGC TCC TAC CGA-3' và 28cc: 5'-ACT CGC CGT TAC TAG GGG AA-3'

Thành phần cơ bản cho 1 phản ứng PCR 20 µl: 0,2 mM dNTP mix, enzyme DreamTaq polymerase 1U, dream taq buffer 10X, 0,4 µM primer xuôi, 0,4 µM primer ngược, nước cất 2 lần khử trùng, 1 µl mẫu với nồng độ DNA từ 100 – 500 ng/µl. Chu kỳ PCR tiến hành như sau: 95°C trong 1 phút; 30 chu kỳ (biến tính ở 95°C trong 30 giây; bắt cặp ( $T_a$ : matK (49 °C), ITS (54 °C)) trong 30 giây; 72°C trong 40 giây); chu kỳ kết thúc 72°C trong 10 phút. Kết quả PCR được phân tích đánh giá trên gel agarose 1,2%, hiệu điện thế 100V, thời gian 30-45 phút, nhuộm với ethidium bromide và chụp hình trên máy chụp gel (GelDoc-It®2315 imager UVP-Mỹ).

- Giải trình tự gen và đánh giá mức độ tương đồng của DNA phân tích với các trình tự của vùng matK và vùng ITS của loài *Centella asiatica* có sẵn trên NCBI. Kết quả giải trình tự gen được hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit version 7.2.6.1 và đánh giá mức độ tương đồng của DNA phân tích với các trình tự của vùng matK và vùng ITS của loài *Centella asiatica* có sẵn trên NCBI.

### **2.3.2. Phương pháp sinh hóa**

#### **2.3.2.1. Xác định hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Hoạt tính chống oxy hóa tổng (TAA) được xác định theo phương pháp của Prieto (1999) [130]. Lấy 100µl mẫu bổ sung 900µl nước cất và thêm 3 ml dung dịch A ( $H_2SO_4$  0,6 M, sodium phosphate 28 mM và ammonium molybdate 4 mM, mỗi loại 1 ml). Hỗn hợp được giữ 90 phút ở 95°C, sau đó đo ở bước sóng 695nm với chất chuẩn là acid ascorbic.

#### **2.3.2.2. Xác định hoạt tính khử sắt**

Hoạt tính khử sắt (RP) của dịch chiết được xác định theo phương pháp của Zhu và cộng sự (2002) [134]. Lấy 500µl dịch mẫu bổ sung 0,5ml đệm phosphate pH = 7,2 và 0,2ml  $K_3[Fe(CN)_6]$  1%. Giữ hỗn hợp 20 phút ở 50°C, sau đó thêm vào 500µl  $CCl_3COOH$  10% và bổ sung 300µl nước cất, 80µl  $FeCl_3$  0,1%. Tiếp theo đo ở bước sóng 655nm với chất chuẩn là  $FeSO_4$ .

### 2.3.2.3. Xác định hoạt tính bắt gốc tự do DPPH

Hoạt tính bắt gốc tự do (DPPH) được xác định theo Blois M. S. (1958) [31]. Lấy lần lượt 200  $\mu$ l, 400  $\mu$ l, 600  $\mu$ l, 800  $\mu$ l và 1000  $\mu$ l dịch chiết vào 5 ống nghiệm, rồi bổ sung 3ml DPPH 25mg/l vào từng ống nghiệm làm dung dịch mẫu. Ở dung dịch trắng (mẫu trắng) làm tương tự nhưng thay DPPH bằng 3ml cồn tuyệt đối vào từng ống. Mẫu kiểm soát chuẩn bị bằng cách làm giống như mẫu trắng nhưng thay dịch chiết bằng DPPH. Giữ các hỗn hợp trong tối ở nhiệt độ phòng, sau 30 phút tiến hành đo ở bước sóng 550nm. Phần trăm bắt gốc tự do được tính theo công thức như sau:

$$AA\% = 100 - \left[ \frac{(A_{\text{mẫu}} - A_{\text{mẫu trắng}})}{A_{\text{kiểm soát}}} \times 100 \right]$$

Trong đó:

AA%: hoạt tính bắt gốc tự do của mẫu thí nghiệm, (%);

$A_{\text{mẫu}}$ ,  $A_{\text{mẫu trắng}}$  và  $A_{\text{kiểm soát}}$ : giá trị đo độ hấp thụ ở bước sóng 550nm của các mẫu thí nghiệm, mẫu trắng và mẫu kiểm soát.

### 2.3.2.4. Xác định hàm lượng polyphenol

Xác định hàm lượng polyphenol tổng được thực hiện theo kỹ thuật của Folin - Ciocalteu [22]. Lấy 0,3ml dịch mẫu, bổ sung 1ml thuốc thử Folin - Ciocalteu 10%, giữ 5 phút và sau đó thêm vào 2ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%.

Hỗn hợp được lắc đều, giữ 90 phút ở nhiệt độ phòng, trong tối và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 750nm. Chất chuẩn sử dụng trong kỹ thuật xác định hàm lượng polyphenol là acid galic.

### 2.3.2.5. Xác định hàm lượng chlorophyll

Dịch chiết chlorophyll trong ethanol 95% sau khi được lọc và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 664 nm và 648 nm trên máy quang phổ UV-VIS, mẫu trắng là dung môi ethanol 95%. Hàm lượng chlorophyll được tính theo phương pháp của Lichtenthaler H. K. (1987) như sau [85]:

$$\text{Chlorophyll A: } C_{(\text{ChLa})} = 13,36A_{664} - 5,19A_{648}, (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{Chlorophyll B: } C_{(\text{ChLb})} = 27,43A_{648} - 8,12A_{664}, (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{Chlorophyll tổng: } C_{(\text{ChLa}+\text{ChLb})} = C_{(\text{ChLa})} + C_{(\text{ChLa}+\text{ChLb})}, (\mu\text{g/ml})$$

Trong đó,  $A_{664}$  và  $A_{648}$  lần lượt là độ hấp thụ quang của dịch chiết tại các bước sóng 664 nm và 648 nm.

#### **2.3.2.6. Xác định hàm lượng triterpenoid**

Hàm lượng triterpenoid được xác định theo Nagmoti và cộng sự (2013) [48]. Lấy 250  $\mu$ l dịch chiết trộn với vanillin-acetic acid (5% w/v, 0.25 ml) và 0,5 ml perchloric acid. Hỗn hợp được ủ nhiệt ở 60°C trong 10 phút, sau đó hỗn hợp được làm lạnh trong bể đá 15 phút, thêm 2,5 ml acid acetic và trộn đều trong 6 phút. Hỗn hợp được đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 538nm. Chất chuẩn sử dụng trong kỹ thuật xác định hàm lượng triterpenoid là acid oleanolic.

#### **2.3.2.7. Xác định hàm lượng asiaticoside, quercetin và acid rosmarinic**

Đối với mẫu dịch chiết rau má được lắc đều và lấy chính xác 1,0 ml dung dịch mẫu cho vào bình cầu. Cô quay đến cạn, rồi hòa tan lại với 1,0 ml methanol. Pha loãng mẫu 10 lần với methanol, lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m lấy dung dịch tiêm sắc ký.

Đối với mẫu bột rau má thì tiến hành cân chính xác 500 mg, thêm chính xác 5ml methanol, siêu âm 15 phút ở 40°C, ly tâm ở tốc độ 3.500 vòng/phút trong 5 phút, gạn dịch nổi phía trên vào bình định mức 25ml. Chiết lặp lại lần lượt 4 lần với 5ml dung môi. Gộp chung dịch chiết, để nguội, định mức đến 25ml, lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m lấy dung dịch tiêm sắc ký.

Quá trình phân tích mẫu được thực hiện trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HP Hewlett Packard Series 1050, detector DAD, sử dụng cột Phenomenex Luna C18(2) 100A, 250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, cột Phenomenex Ultracarb ODS(30) 150x4.6mm, 5  $\mu$ m và cột Phenomenex Ultracarb ODS(30) 150x4.6mm, 5  $\mu$ m cho việc phân tích asiaticoside, acid rosmarinic và quercetin.

#### **2.3.3. Phương pháp hóa lý**

##### **2.3.3.1. Xác định hiệu suất thu hồi bột trong sấy phun**

Hiệu suất thu hồi bột rau má ( $H_i$ ) trong quá trình sấy phun là tỉ lệ phần trăm giữa khối lượng bột thu hồi được sau sấy phun (M) với tổng khối lượng chất khô trong dịch sấy trước khi bổ sung chất mang ( $m_1$ ) và khối lượng chất mang bổ sung vào dịch sấy ( $m_2$ ), xác định theo công thức:

$$H_t = \frac{M}{(m_1 + m_2)} \times 100\%$$

Trong đó:

M: Khối lượng bột thu hồi được sau sấy, (gam)

m<sub>1</sub>: Khối lượng chất khô trong dịch sấy trước khi bổ sung chất mang, (gam)

m<sub>2</sub>: Khối lượng chất mang bổ sung vào dịch sấy, (gam).

### 2.3.3.2. Xác định độ tan của bột rau má

Độ tan của bột rau má sấy phun được xác định theo dược điển Việt Nam [1]. Cụ thể, cho thể tích nước (ml) nhất định vào cốc chứa 1 gam bột rau má và duy trì ở 25 ± 2(°C) trong 30 phút, cứ cách 5 phút thả nhẹ đều 30 giây.

**Bảng 2.5. Tiêu chuẩn xác định độ tan của bột**

| STT | Độ tan      | Thể tích nước (ml) dùng hòa tan 1 gam bột |
|-----|-------------|-------------------------------------------|
| 1   | Rất tan     | Dưới 1                                    |
| 2   | Dễ tan      | Từ 1 đến 10                               |
| 3   | Tan         | Trên 10 đến 30                            |
| 4   | Hơi tan     | Trên 30 đến 100                           |
| 5   | Khó tan     | Trên 100 đến 1.000                        |
| 6   | Rất khó tan | Trên 1.000 đến 10.000                     |
| 7   | Không tan   | Trên 10.000                               |

### 2.3.3.3. Xác định kích thước hạt trung bình và chỉ số đa phân tán

Sự phân bố kích thước hạt (PSD: Particle size distributions) của bột rau má được đo bằng kỹ thuật tán xạ ánh sáng động (DLS: Dynamic Light Scattering) trên thiết bị Zetasizer Nano ZS, Malvern, Vương Quốc Anh. Mẫu được chứa trong cuvette và được đặt vào buồng đo của thiết bị. Chọn góc đo phù hợp và tiến hành đo 3 lần, lấy giá trị trung bình.

Đường kính hạt trung bình (Z) và chỉ số đa phân tán (Pdi: polydispersity index) được tính bằng kết quả đo phân bố kích thước hạt.

#### **2.3.3.4. Xác định đặc tính nhiệt vi sai**

Đặc tính nhiệt vi sai (DSC: Differential scanning calorimetry) là kỹ thuật phân tích tính chất nhiệt phổ biến trong phân tích vật lý chất rắn. Sử dụng kỹ thuật này để xác định dòng nhiệt tỏa ra hoặc thu vào từ mẫu đốt nóng bằng dòng nhiệt có nhiệt độ quét với tốc độ khác nhau, từ đó xác định được các tính chất chuyển pha nhiệt của mẫu. Quá trình phân tích nhiệt vi sai trong nghiên cứu được tiến hành trên thiết bị phân tích nhiệt quét vi sai bù năng lượng DSC-60, Shimadzu (Nhật).

Tiến hành cân 4 mg mẫu bột rau má vào ni-ê-m mẫu vào đĩa nhôm chuyên dụng của thiết bị đo. Mẫu so sánh sử dụng bột nhôm oxít ( $Al_2O_3$ ) cũng được cân với khối lượng và ni-ê-m mẫu vào đĩa nhôm tương tự. Đặt mẫu cần đo và mẫu so sánh vào buồng nhiệt tương ứng của thiết bị phân tích nhiệt. Quá trình phân tích nhiệt có sử dụng khí nitơ để làm nguội các mẫu với lưu lượng 50 ml/phút, bước nhảy tăng nhiệt độ trong cung cấp nhiệt là  $20^{\circ}C/phút$  và khoảng nhiệt độ phân tích từ  $0-600^{\circ}C$ . Kết quả phân tích nhiệt được xử lý bằng phần mềm TA 60 với phiên bản 3.9A chuyên dụng theo hệ thống.

#### **2.3.3.5. Xác định hàm lượng ẩm**

Xác định hàm lượng ẩm của rau má thìa theo Dược điển Việt Nam V, tập 2 (phụ lục 9.6; PL203).

#### **2.3.3.6. Xác định hàm lượng tro toàn phần**

Xác định hàm lượng tro toàn phần của rau má thìa theo Dược điển Việt Nam V, tập 2 (phụ lục 9.8; PL204).

#### **2.3.4. Phương pháp hóa học**

- Xác định thủy ngân (Hg) theo QCVN 8-2: 2011/BYT
- Xác định Cadmi (Cd) theo QCVN 8-2: 2011/BYT
- Xác định chì (Pb) theo QCVN 8-2: 2011/BYT
- Xác định Arsen (As) theo QCVN 8-2: 2011/BYT

#### **2.3.5. Phương pháp vi sinh vật**

- Xác định *Salmonella* theo QCVN 8-3: 2012/BYT
- Xác định *Escherichia coli* theo QCVN 8-3: 2012/BYT



### 2.3.6. Phương pháp cảm quan

Nước rau má được đánh giá cảm quan theo phương pháp cho điểm mô phỏng theo TCVN 3215:1979 [18]. Theo đó, hội đồng đánh giá cảm quan phải có ít nhất từ 5 đến 12 người được đào tạo chuyên nghiệp để thực hiện việc cảm quan và cho điểm sản phẩm. Tuy nhiên, người phụ trách đánh giá cảm quan cũng có thể được lựa chọn nội bộ và số lượng tùy thuộc mức độ kinh nghiệm của người được chọn đánh giá [8].

Trên cơ sở tiêu chuẩn đánh giá cảm quan đã xây dựng sẽ thiết kế hội đồng đánh giá cảm quan 30 người gồm các cán bộ và chuyên gia đã qua đào tạo về phân tích cảm quan và cho điểm sản phẩm nước rau má để tiến hành đánh giá chất lượng cảm quan sản phẩm. Các chỉ tiêu cảm quan được trình bày ở bảng 2.6, sử dụng hệ số quan trọng cho các chỉ tiêu như sau: hệ số quan trọng của chỉ tiêu màu là 1,2, các hệ số quan trọng cho chỉ tiêu mùi và vị đều là 1,0 và hệ số quan trọng cho chỉ tiêu trạng thái là 0,8.

**Bảng 2.6. Chỉ tiêu cảm quan của nước rau má**

| <b>Điểm chưa có trọng lượng</b> | <b>Cơ sở đánh giá</b>                                                                                                                                                                                                                                                |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5                               | Bột rau má hòa tan tốt trong nước cho dịch rau má trong và không bị lắng cặn<br>Dịch rau má có màu xanh lục đậm; có mùi thơm rau má đặc trưng, có mùi thơm nhẹ của gum arabic và có vị hơi đắng nhằn đặc trưng rau má với vị ngọt thanh hài hòa của đường saccharose |
| 4                               | Bột rau má hòa tan tốt trong nước cho dịch rau má trong và không bị lắng cặn<br>Dịch rau má có màu xanh lục nhạt; mùi thơm rau má đặc trưng, có mùi thơm nhẹ của gum arabic và có vị hơi đắng nhằn đặc trưng rau má với vị ngọt thanh hài hòa của đường saccharose   |
| 3                               | Bột rau má hòa tan trong nước, dịch rau má hơi đục hoặc có lắng cặn ít<br>Dịch rau má có màu xanh oliu; mùi thơm rau má đặc trưng, có mùi thơm nhẹ của gum arabic và có thể hiện vị hơi đắng nhằn đặc trưng rau má, hơi ít ngọt hoặc hơi quá ngọt đường saccharose   |

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 | Bột rau má khó hòa tan trong nước, dịch rau má đục và có lắng cặn rắn<br><br>Dịch rau má có màu vàng xanh; có thể hiện mùi thơm rau má, có mùi thơm nhẹ của gum arabic và có thể hiện vị hơi đắng nhằn đặc trưng rau má, hơi ít ngọt hoặc hơi quánh ngọt đường saccharose |
| 1 | Bột rau má ít hòa tan trong nước, dịch rau má đục và có lắng cặn rắn<br><br>Dịch rau má có màu vàng, ít thể hiện mùi và vị đặc trưng của rau má                                                                                                                           |
| 0 | Bột rau má rất khó hòa tan trong nước và có lắng nhiều cặn rắn<br><br>Dịch rau má có màu nâu hoặc nâu nhạt, không có mùi rau má đặc trưng, có mùi khét và vị đắng chấy của bột                                                                                            |

## 2.4. THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT NGHIÊN CỨU

### 2.4.1. Máy và thiết bị nghiên cứu

Để phục vụ công tác nghiên cứu, trong quá trình thực hiện có sử dụng các máy và thiết bị thí nghiệm trình bày theo bảng 2.8.

**Bảng 2.7. Danh mục máy và thiết bị nghiên cứu**

| STT | Tên máy và thiết bị                      | Đặc điểm kỹ thuật                                                                  |
|-----|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | Máy quang phổ tử ngoại – khả kiến UV-VIS | UVD-3200, LABOMED, Mỹ, UV-VIS hai chùm tia, 8 cuvet (2 hàng)                       |
| 2   | Tủ ẩm                                    | BD 53, Binder, Đức, đối lưu không khí tự nhiên và sai số $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ |
| 3   | Tủ sấy                                   | FD 56, Binder, Đức, đối lưu không khí cưỡng bức, sai số $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  |
| 4   | Bể điều nhiệt                            | WNB7, Memmert, Đức, sai số $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$                               |
| 5   | Bể siêu âm                               | P300H, Elma, Đức, tần số siêu âm 37kHz và 80kHz                                    |
| 6   | Cân kỹ thuật                             | TXB 6201L, Shimadzu, Nhật Bản, trọng lượng cân 6200g, sai số $\pm 0,1\text{g}$     |

|    |                                                |                                                                                                                   |
|----|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7  | Cân phân tích                                  | ATX-224, Shimadzu, Nhật Bản, trọng lượng cân 210g, sai số $\pm 0,1\text{mg}$                                      |
| 8  | Máy cất nước hai lần                           | WSC/4D, Hamilton, Anh, công suất 4l/h, độ dẫn điện nước cất $< 1,5 \text{ mS/cm}$                                 |
| 9  | Máy xay mẫu                                    | A11, IKA, Đức                                                                                                     |
| 10 | Máy cô quay chân không                         | RV 10 digital V, IKA, Đức, cụm cooler của Ấn Độ có thể làm lạnh từ $-10^{\circ}\text{C}$ đến $25^{\circ}\text{C}$ |
| 11 | Bộ lọc chân không                              | IKA, Đức                                                                                                          |
| 12 | Cân phân tích ẩm                               | MB27, OHAUS, Mỹ, sai số $\pm 1\text{mg}/0,01\%$                                                                   |
| 13 | Khuấy từ gia nhiệt                             | RH basic 2, IK, Đức, tốc độ khuấy $100 \div 2.000$ (vòng/phút)                                                    |
| 14 | Thiết bị sấy phun                              | KBC2L, Kybaco, Việt Nam, công suất 2 lít/giờ, sấy phun dạng đĩa                                                   |
| 15 | Tủ mát phòng thí nghiệm                        | SERIES Bio Compact II, Gram, Đan Mạch                                                                             |
| 16 | Tủ bảo quản hóa chất                           | MPR-S163, Panasonic, Nhật Bản, Khoảng nhiệt độ điều chỉnh $2 \div 14^{\circ}\text{C}$                             |
| 17 | Bộ micropipet                                  | Isolab, Đức và Eppendorf, Đức; từ $1 \mu\text{l} \div 5000 \mu\text{l}$                                           |
| 18 | Máy xác định tính chất nhiệt                   | DSC-60, Shimadzu, Nhật                                                                                            |
| 19 | Máy xác định đường kính hạt và chỉ số phân tán | Zetasizer Nano ZS, Malvern, Vương Quốc Anh                                                                        |

#### 2.4.2. Hóa chất nghiên cứu

- Hóa chất định lượng polyphenol, chlorophyll: Acid Galic (Merck - Đức), Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Merck - Đức),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Sigma, Mỹ).

- Hóa chất xác định các hoạt tính chống oxy hóa:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Sigma, Mỹ), sodium phosphate (Sigma, Mỹ), ammonium molybdate (Sigma, Mỹ), acid ascorbic (Merck, Đức),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma, Mỹ),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma, Mỹ),  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (Sigma, Mỹ),

$\text{CCl}_3\text{COOH}$  (Sigma, Mỹ),  $\text{FeCl}_3$  (Sigma, Mỹ),  $\text{FeSO}_4$  (Merck - Đức), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (Merck - Đức), methanol (Merck - Đức), Acetone (Merck - Đức), ethanol (Merck - Đức), ethyl acetate (Merck - Đức), chloroform (Merck - Đức), diethyl ether (Merck - Đức) và n-hexane (Merck - Đức).

- Các phụ liệu khác: Giấy lọc không tro (Whatman, Anh), maltodextrin (Roquette, Pháp), dextrin (Roquette, Pháp) và gum arabic (Pháp).

## **2.5. XỬ LÝ SỐ LIỆU**

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, loại bỏ giá trị bất thường bằng phương pháp Duncan. Phân tích thống kê ANOVA và hồi quy bằng phần mềm MiniTab 18, tối ưu hóa bằng phần mềm DesignExpert 12.0.

## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. ĐỊNH DANH VÀ PHÂN TÍCH MỘT SỐ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CHỦ YẾU CỦA RAU MÁ THÌA

#### 3.1.1. Định danh rau má thìa

Mẫu nghiên cứu sau thu nhận được thực hiện tách chiết DNA theo quy trình CTAB I, quy trình có cải biến trong việc bổ sung SDS vào thành phần đệm phân lập [81]. Tiến hành tách và nhúng bản 02 gene matK và ITS1–5.8S–ITS2.

- Gene matK sẽ được nhúng bản bằng phản ứng PCR với hai mồi đặc hiệu: matK 2011F: 5'-CGA TCT ATT CAT TCA ATA TTT C-3' và matK 2011R: 5'-GTT CTA GCA CAA GAA AGT CG-3'.

- Gen ITS1–5.8S–ITS2 sẽ được nhúng bản bằng phản ứng PCR với hai mồi đặc hiệu: 18d: 5'-CAC ACC GCC CGT CGC TCC TAC CGA-3' và 28cc: 5'-ACT CGC CGT TAC TAG GGG AA-3'.

Tất cả các sản phẩm của quá trình nhúng bản bằng phản ứng PCR với mồi đặc hiệu có được từ các DNA tách chiết từ mẫu được giải trình tự và cho kết quả như sau:

Kết quả đọc trình tự gene của đoạn matK: TCGATCTATTTCMWTTCAATATT  
TCCTTTTTTAGAGGACAAAATTTACATTTAATTTATGTGTTAGAGATACTAA  
TACCTTACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATTCTTCGCTACTGGTTA  
AAAGATGCTTCTTCTTTGCATTTATTACGACTCCTTCTCTACGAGTATCGTAA  
TTGGAATACTTCAAATAAARCCAGTTCTTCTTTTTCAAAAAGATCTCMAAGA  
TTCTTCTTCTTCCTATATAATTCTTATCTATGTGAATMCGAATCCATCTTCGTC  
TTTTTCCGCAACCAATCTTCTCATTTACGCTCAACATCTTCTAGAACCCTTCT  
TGAACGAGTATATTTCTATGGAAAAATAGAACATCWTGGAGAAGTCTTTGM  
TAAGGCTTTTCAAGTCAATMTATGGTTATTGAAGGATCCTTTTCATGCATTACG  
TTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTCACATCAAAAGGGACGCCTCTTTYGAT  
GAAAAAATGGGTATATTACTTTGTTAATYTATGGCAATGTCATTTTTACCTGT  
GGTCTCAACCGAGAAGGATCTGTATAAACCAATTATCTAATTATTCGCTCGRC  
TTTCTGGGCTATCTATCAAGTGCACGGCTAAACCCTTCAATGGTACGCGGTC  
AAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATTGATAATACTATTAATAAGTTCGATACTC

TTATTCCAATTATTCCTCTGATTGCATCATTGGCTAAAGCGAAATTTTGTAAC  
 ATGTTGGGGCATCCTATTAGTAAGGTGGTTYGGGCCGATTTATCAGATTCTG  
 ATATTATYGACCGATTTGGGCGTATATGCAGAAATCTTTCTCATTATCATAGTG  
 GATCCTCACAAAAAAGAGTTKTATCGAAWA

Kết quả đọc trình tự gene của đoạn 5.8S rDNA: CCCCCCCCCACCCGTCGA  
 CCTCGAAAGGGGTCGGGGCGGAGGGGCGGAGAATGGCCTCCCGTGCCTCG  
 GGGCGCGGTTGGCCCAAACGTCAGCCCGCGGCGACGGACGTCACGACAAG  
 TGGTGGTTTGACAAAGGCCCTCGCATGTTGTCGTGCGGTGATCCGTCGTCG  
 GCGTGAGCTCGTGCGACCCTGTTGCCACGCCGTGCTCGGCGCGCGCTCCGA  
 CCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATA  
 AGCGGAGGAAAAGAACTTACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAAC  
 CGGGAACAGCCCAGCTGAAATCGGCNNTCGGT.

Các trình tự sau khi hiệu chỉnh được BLAST trên NCBI [159] cho kết quả tương đồng các vùng matK và ITS giữa mẫu nghiên cứu với các trình tự có sẵn trên NCBI và được thể hiện ở các bảng 3.1 và bảng 3.2 như sau:

**Bảng 3.1. Kết quả tương đồng vùng matK mẫu nghiên cứu với trình tự có sẵn trên NCBI**

| Mô tả trình tự tương đồng                                                               | Mức tương đồng  |       | Mã số trình tự tương đồng trên NCBI |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------|-------------------------------------|
|                                                                                         | (Số nucleotide) | (%)   |                                     |
| Centella asiatica voucher PS1212MT04 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast   | 1406            | 98,60 | GQ434230.1                          |
| Centella asiatica voucher Trotta950361 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast | 1404            | 98,47 | MH621592.1                          |
| Centella asiatica voucher PS1212MT05 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast   | 1397            | 98,59 | GQ434231.1                          |

|                                                                                         |      |       |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------|-------|------------|
| Centella asiatica voucher PS1212MT01 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast   | 1373 | 98,56 | GQ434229.1 |
| Centella virgata maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast                       | 1310 | 98,24 | KP110015.1 |
| Centella lanata maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast                        | 1299 | 97,96 | KP110012.1 |
| Centella asiatica chloroplast gene for maturase K, partial cds, isolate: CHULA-012      | 1267 | 98,45 | LC461754.1 |
| Centella asiatica isolate shawpc0933K maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast  | 1266 | 98,44 | JN407217.2 |
| Centella restioides maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast                    | 1262 | 97,78 | KP110013.1 |
| Centella asiatica isolate OSBAR 000593 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast | 1260 | 98,30 | MH552079.1 |
| Centella asiatica isolate shawpc1021K maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast  | 1260 | 98,44 | JN407219.2 |
| Centella asiatica isolate shawpc0944K maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast  | 1254 | 98,43 | JN407218.1 |
| Centella asiatica voucher TuTY1530 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast     | 1253 | 98,43 | MH768044.1 |
| Centella asiatica voucher US:Suissa158 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast | 1245 | 98,42 | MH748933.1 |

**Bảng 3.2. Sự tương đồng vùng ITS giữa mẫu nghiên cứu và các trình tự cơ sở dữ liệu NCBI**

| <b>Mô tả trình tự tương đồng</b>                                                                                                                                                                                                        | <b>Mức tương đồng</b>  |            | <b>Mã số trình tự tương đồng trình tự NCBI</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------|------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                         | <b>(Số nucleotide)</b> | <b>(%)</b> |                                                |
| Centella asiatica bio-material Chromadex_Lot_00041348-460 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence                           | 628                    | 99,42      | MK087886.1                                     |
| Centella asiatica isolate gotu_kola 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence                                                           | 595                    | 98,21      | KU724202.1                                     |
| Centella asiatica isolate UAS-SEC146 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence                        | 507                    | 99,64      | KR215628.1                                     |
| Centella asiatica voucher TuTY1530 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence | 503                    | 100        | MH768338.1                                     |
| Centella asiatica gene for 5.8S rRNA, ITS 2 and 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate: CHULA-012                                                                                                                             | 503                    | 100        | LC461753.1                                     |



|                                                                                                                                                                                                                                                             |     |       |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------|------------|
| Centella asiatica voucher CMPR8787 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence | 473 | 99,61 | MN883870.1 |
| Centella asiatica isolate SBB-1370 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence                                              | 470 | 99,23 | KM887373.1 |
| Centella asiatica voucher US:Suissa158 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence                                                                                                                                          | 446 | 100   | MH766949.1 |
| Centella asiatica voucher HXX18428 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence                                              | 416 | 99,56 | MH768337.1 |
| Centella asiatica voucher PS1212MT04 internal transcribed spacer 2, partial sequence                                                                                                                                                                        | 407 | 99,55 | GQ434698.1 |
| Centella asiatica voucher PS1212MT01 internal transcribed spacer 2, partial sequence                                                                                                                                                                        | 405 | 99,55 | GQ434697.1 |
| Centella asiatica internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence                                                                                                                              | 405 | 98,69 | AF272352.1 |
| Centella asiatica isolate SBB-1533 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence                                                                         | 390 | 99,53 | KX277730.1 |

Từ kết quả phân tích trình tự DNA của mẫu nghiên cứu đã thu nhận cho thấy mức độ tương đồng cao (98,44% - 98,76%) của DNA phân tích với các trình tự của vùng *matK* và mức độ tương đồng cao (98,21-100%) của DNA phân tích với các trình tự của vùng *ITS* của loài *Centella asiatica* có sẵn trên NCBI. Như vậy, mẫu rau má thà thu nhận tại Nha Trang, Khánh Hòa dùng cho quá trình nghiên cứu thuộc loài rau má thà (*Centella asiatica* (L.) Urban).

### 3.1.2. Phân tích một số thành phần hóa học chủ yếu của rau má thà

Tiến hành lấy mẫu rau má thà tại Nha Trang, Khánh Hòa để phân tích một số hợp chất có hoạt tính sinh học (polyphenol, chlorophyll, triterpenoid) và một số thành phần sinh hóa cơ bản của rau má. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 3.3 và 3.4.

**Bảng 3.3. Hàm lượng một số hợp chất có hoạt tính sinh học của rau má thu mẫu tại Nha Trang - Khánh Hòa**

| Thành phần   | Đơn vị tính                  | Hàm lượng    |
|--------------|------------------------------|--------------|
| Polyphenol   | mg acid galic/g chất khô     | 13,56 ± 0,20 |
| Chlorophyll  | mg/g chất khô                | 4,73 ± 0,03  |
| Triterpenoid | mg acid oleanolic/g chất khô | 5,90 ± 0,02  |

**Bảng 3.4. Thành phần sinh hóa cơ bản của rau má thu mẫu tại Nha Trang - Khánh Hòa**

| Thành phần   | Hàm lượng (g/100g chất khô) |
|--------------|-----------------------------|
| Protein      | 11,32 ± 0,12                |
| Chất béo     | 3,15 ± 0,01                 |
| Carbohydrate | 28,42 ± 0,02                |
| Chất xơ      | 42,80 ± 0,12                |
| Khoáng       | 3,62 ± 0,09                 |

Từ các kết quả phân tích trình bày ở các bảng 3.3 và 3.4 cho thấy:

#### \* Về thành phần một số hợp chất có hoạt tính sinh học

Kết quả phân tích một số hợp chất có hoạt tính sinh học của rau má thà thu mẫu tại Nha Trang, Khánh Hòa (bảng 3.3) cho thấy rau má thà có hàm lượng polyphenol là 13,56 ± 0,20 (mg acid galic/g chất khô), cao hơn so với rau má thà thu mẫu ở Sri Lanka

(4,71 mg acid galic/g chất khô) [57], thấp hơn so với rau má ở thu mẫu ở Malaysia (17,41 mg acid galic/g chất khô) [124]. Nguyên nhân của sự khác biệt về hàm lượng polyphenol có thể là do điều kiện địa lý, khí hậu, thổ nhưỡng của các vùng trồng rau má khác nhau. Kết quả phân tích cũng cho thấy hàm lượng polyphenol của rau má ở thu mẫu ở Nha Trang - Khánh Hòa cũng cao hơn hàm lượng polyphenol của một số loài rau má khác thu mẫu tại Khánh Hòa. Cụ thể, hàm lượng polyphenol của rau má thìa cao hơn 146,61% so hàm lượng polyphenol của loài *Hydrocotyle verticillata* Thunb. (9,25 mg acid galic/g chất khô) và cao hơn 222,50% so với hàm lượng polyphenol của loài *Hydrocotyle javanica* Thunb. (6,09 mg acid galic/g chất khô).

Kết quả phân tích về hàm lượng chlorophyll của rau má ở thu mẫu ở Nha Trang là  $4,73 \pm 0,03$  (mg/g chất khô), cao hơn so với rau má ở thu mẫu ở Ấn Độ (2,5 mg/g chất khô) [143]. Nếu so sánh với một số loài rau má khác thu mẫu tại Khánh Hòa thì rau má thìa có hàm lượng chlorophyll cao hơn 115,17% so với hàm lượng chlorophyll của loài *Hydrocotyle verticillata* Thunb. (4,11 mg/g chất khô) và cao hơn 138,01% so với hàm lượng chlorophyll của loài *Hydrocotyle javanica* Thunb. (3,43 mg/g chất khô).

Về hàm lượng triterpenoid, Theo Đỗ Tất Lợi, triterpenoid là hợp chất quang hóa quan trọng quyết định đến chất lượng của cây rau má sử dụng làm thuốc giải nhiệt trong dân gian. Do vậy, tiếp tục quá trình phân tích hàm lượng triterpenoid của rau má ở thu mẫu ở Nha Trang - Khánh Hòa là  $5,9 \pm 0,02$  (mg acid oleanolic/g chất khô), cao hơn hàm lượng triterpenoid có trong lá rau má ở thu mẫu ở Ấn Độ [72]. Kết quả phân tích cũng cho thấy hàm lượng triterpenoid của rau má ở thu mẫu ở Nha Trang cao hơn hàm lượng triterpenoid của một số loài rau má khác thu mẫu tại Khánh Hòa. Chẳng hạn, hàm lượng triterpenoid của rau má thìa cao hơn 131,9% hàm lượng triterpenoid của loài *Hydrocotyle verticillata* Thunb. (4,47 mg acid oleanolic /g chất khô) và cao hơn 201,57% hàm lượng triterpenoid của loài *Hydrocotyle javanica* Thunb. (2,93 mg acid oleanolic/g chất khô).

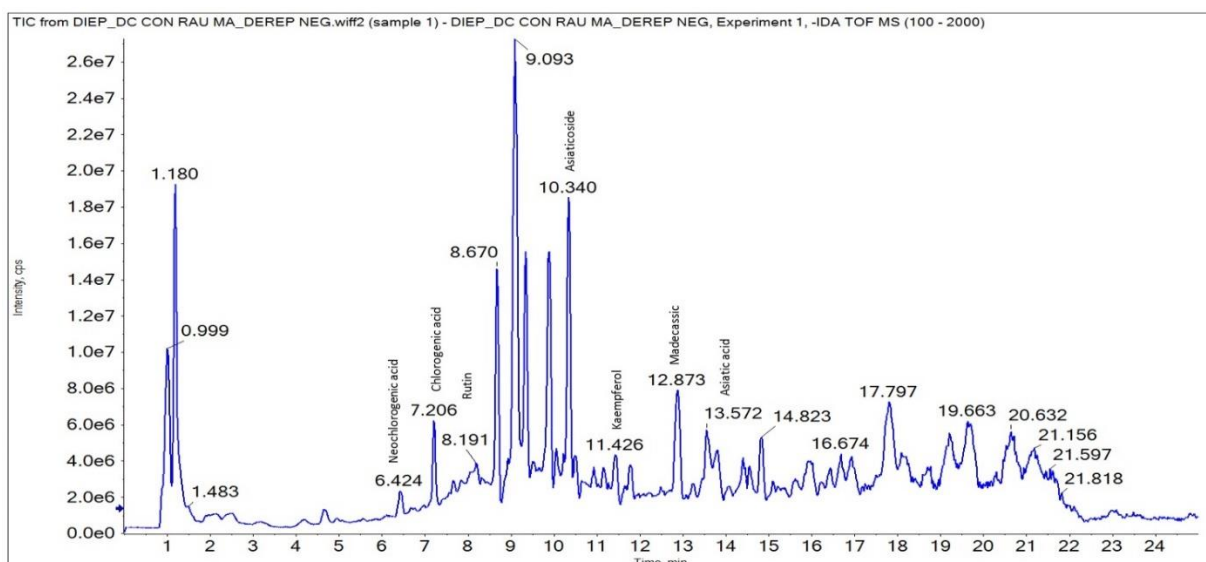
Từ các phân tích ở trên cho thấy rau má ở thu mẫu tại Nha Trang có hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học (polyphenol, chlorophyll, triterpenoid) cao hơn hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học của các loài rau má khác thu mẫu tại Khánh

Hòa và cao hơn hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học của các loài rau má cùng loài thu mẫu tại một số nước châu Á như Malaysia, Sri Lanka và Ấn Độ.

### \* Về một số thành phần sinh hóa cơ bản

Kết quả phân tích một số thành phần sinh hóa cơ bản của rau má thu mẫu tại Nha Trang cho thấy có sự khác biệt về một số thành phần sinh hóa cơ bản của rau má thu mẫu tại Nha Trang so với thành phần sinh hóa của rau má thu mẫu do Viện dinh dưỡng (Bộ Y tế, 2007) công bố [19]. Chẳng hạn, trong rau má thu mẫu tại Nha Trang có hàm lượng protein là  $11,32 \pm 0,12$  g/100g chất khô, hàm lượng chất béo là  $3,15 \pm 0,01$  g/100g chất khô, hàm lượng carbohydrate là  $28,42 \pm 0,02$  g/100g chất khô, hàm lượng chất xơ là  $42,80 \pm 0,12$  g/100g chất khô và hàm lượng khoáng tổng là  $3,62 \pm 0,09$  g/100g chất khô. Hàm lượng các thành phần phân tích được ở trên cho rau má thu mẫu là cao hơn so với cùng loài của Viện dinh dưỡng đã công bố. Hơn nữa, số liệu phân tích về rau má thu mẫu ở Nha Trang cũng cho thấy hàm lượng protein thấp hơn và hàm lượng chất béo thì cao hơn so với rau má cùng loài mọc ở Malaysia [147]. Sự khác biệt này được giải thích là do sự khác biệt về điều kiện địa lý, khí hậu và thổ nhưỡng của vùng đất rau má mọc.

Ngoài ra, cũng tiến hành phân tích một số thành phần sinh hóa khác trong rau má thu mẫu bằng kỹ thuật LC-HRMS trình bày ở hình 3.1.



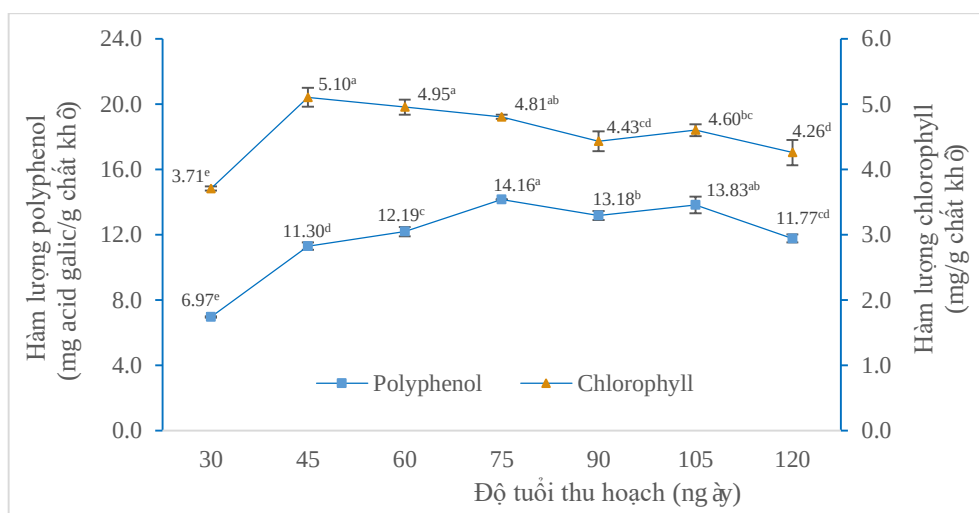
**Hình 3.1. Phổ LC-HRMS phân tích dịch chiết rau má**

Kết quả phân tích khối phổ phân giải cao LC-HRMS cho thấy dịch chiết rau má thu mẫu tại Nha Trang cũng tồn tại nhiều thành phần quang hóa quan trọng khác như: acid neochlorogenic, acid chlorogenic, asiaticoside, kaempferol, acid madecassic,

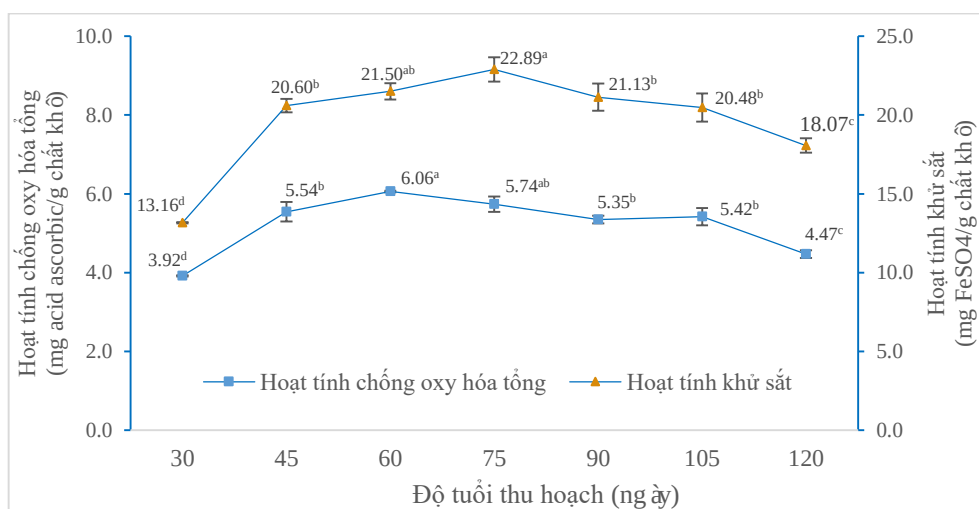
acid asiatic, ... Tuy vậy, do thời gian và kinh phí có hạn nên quá trình nghiên cứu chưa thể phân tích kỹ về các thành phần này mà sẽ tiến hành thí nghiệm về các hợp chất này khi có điều kiện.

### 3.1.3. Xác định thời gian thu hoạch rau má thà

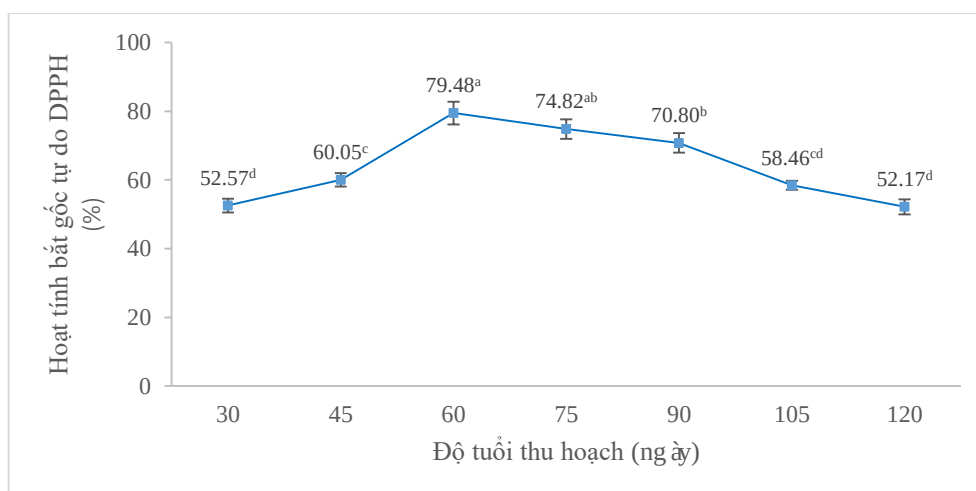
Tiến hành chiết polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thà ở các thời gian thu hoạch khác nhau từ 30 ÷ 120 (ngày) bằng phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm với dung môi ethanol 95%, tỷ lệ DM/NL 40/1, thời gian chiết 60 phút và nhiệt độ chiết 50°C. Sau khi chiết, lọc chân không thu dịch chiết và đánh giá hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng, hoạt tính khử sắt và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH. Kết quả được trình bày ở các hình 3.2; 3.3 và 3.4.



**Hình 3.2. Ảnh hưởng thời gian thu hoạch đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong dịch chiết rau má**



**Hình 3.3. Ảnh hưởng thời gian thu hoạch đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má**



**Hình 3.4. Ảnh hưởng thời gian thu hoạch đến hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết rau má**

Từ các kết quả phân tích trình bày ở các hình 3.2; 3.3 và 3.4 cho thấy:

#### **\* Về hàm lượng polyphenol**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.2 cho thấy độ tuổi thu hoạch có ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol thu nhận từ rau má thìa và độ tuổi thu hoạch khác nhau thì hàm lượng polyphenol thu nhận từ rau má thìa cũng khác nhau. Hàm lượng polyphenol thu nhận từ rau má thìa ở các độ tuổi 30, 45, 60 và 75 ngày tuổi tương ứng là  $6,97 \pm 0,04$ ,  $11,30 \pm 0,23$ ,  $12,19 \pm 0,29$  và  $14,16 \pm 0,03$  (mg acid galic/g chất khô). Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng polyphenol thu nhận từ rau má thìa ở các độ tuổi 30, 45 và 60 ngày tuổi chỉ bằng tương ứng 49,22%, 79,80% và 86,09% so với hàm lượng polyphenol cao nhất, thu nhận từ rau má thìa ở độ tuổi 75 ngày tuổi. Như vậy, khi tăng độ tuổi thu hoạch từ 30 ngày lên tới 75 ngày thì hàm lượng polyphenol thu nhận từ rau má tăng lên và đạt cao nhất khi độ tuổi thu hoạch là 75 ngày tuổi, tương ứng với hàm lượng polyphenol là  $14,16 \pm 0,03$  mg acid galic/g chất khô. Sau đó, tiếp tục tăng độ tuổi thu hoạch lên trên 75 ngày thì hàm lượng polyphenol thu nhận từ rau má lại giảm và độ tuổi thu hoạch càng lớn hơn 75 ngày thì hàm lượng polyphenol thu nhận từ rau má càng giảm. Cụ thể, hàm lượng polyphenol thu nhận từ rau má thìa ở các độ tuổi 90, 105 và 120 ngày tuổi tương ứng là  $13,18 \pm 0,28$ ,  $13,83 \pm 0,51$  và  $11,77 \pm 0,25$  (mg acid galic/g chất khô). Như vậy, hàm lượng polyphenol thu nhận từ rau má thìa ở các độ tuổi 90, 105 và 120 ngày tuổi chỉ bằng tương ứng 93,08%, 94,73% và 83,12% so với hàm lượng polyphenol cao nhất, thu nhận từ rau má thìa ở độ tuổi 75 ngày tuổi.

Kết quả phân tích phương sai ANOVA cũng cho thấy sự sai khác về hàm lượng

polyphenol thu nhận từ mẫu rau má thà ở các độ tuổi thu hoạch trong giai đoạn từ 30 ÷ 120 ngày tuổi là sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

*Từ những phân tích ở trên cho thấy ở độ tuổi thu hoạch 75 ngày tuổi thì hàm lượng polyphenol thu nhận từ rau má thà đạt mức cao nhất. Do vậy, nếu xét theo hàm lượng polyphenol thì độ tuổi rau má thà nên được thu hoạch là 75 ngày tuổi.*

#### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Kết quả phân tích hàm lượng chlorophyll thu nhận từ rau má trèn bầy ở hình 3.2 cũng cho thấy tuổi thu hoạch có ảnh hưởng lớn đến hàm lượng chlorophyll thu nhận từ rau má thà và độ tuổi thu hoạch khác nhau thì hàm lượng chlorophyll thu nhận từ rau má thà cũng khác nhau. Trong giai đoạn 30 ÷ 45 ngày tuổi, khi tăng độ tuổi thu hoạch thì hàm lượng chlorophyll thu nhận từ rau má thà cũng tăng theo độ tuổi. Cụ thể, ở độ tuổi thu hoạch là 30 ngày tuổi, hàm lượng chlorophyll chiết từ rau má thà là  $3,71 \pm 0,03$  mg/g chất khô. Khi tăng độ tuổi thu hoạch lên 45 ngày tuổi, hàm lượng chlorophyll chiết từ rau má thà tăng lên và đạt mức cao nhất là  $5,10 \pm 0,14$  mg/g chất khô tăng 137,7 % so với hàm lượng chlorophyll chiết từ rau má thà ở giai đoạn 30 ngày tuổi. Sau đó tiếp tục tăng độ tuổi thu hoạch rau má thà lên > 45 ngày tuổi thì hàm lượng chlorophyll chiết từ rau má thà lại giảm. Cụ thể, hàm lượng chlorophyll thu nhận từ rau má thà ở các độ tuổi 60, 75, 90, 105 và 120 ngày tuổi tương ứng là  $4,95 \pm 0,11$ ,  $4,81 \pm 0,03$ ,  $4,43 \pm 0,15$ ,  $4,60 \pm 0,09$  và  $4,26 \pm 0,19$  (mg/g chất khô), chỉ bằng tương ứng 97,06%, 94,31%, 86,86%, 90,20%, 83,53% so với hàm lượng chlorophyll cao nhất thu nhận từ rau má thà ở độ tuổi 45 ngày tuổi.

Kết quả phân tích phương sai ANOVA cũng cho thấy sự sai khác về hàm lượng chlorophyll thu nhận từ rau má thà ở các độ tuổi thu hoạch khác nhau trong giai đoạn từ 30 ÷ 120 ngày tuổi là sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

*Từ các phân tích ở trên cho thấy hàm lượng chlorophyll của dịch chiết rau má thà đạt mức cao nhất ở giai đoạn rau má thà đạt 45 ngày tuổi.*

#### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Kết quả phân tích hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết thu nhận từ rau má trèn bầy ở hình 3.3 cũng cho thấy tuổi thu hoạch có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết thu nhận từ rau má thà và độ tuổi thu hoạch khác nhau thì hoạt tính chống oxy hóa tổng thu nhận từ rau má thà cũng khác nhau. Trong giai đoạn

30 ÷ 60 ngày tuổi, khi tăng độ tuổi thu hoạch thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết thu nhận từ rau má thìa cũng tăng theo độ tuổi. Cụ thể, hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết thu nhận từ rau má thìa ở các độ tuổi 30, 45 và 60 ngày tuổi tương ứng là  $3,92 \pm 0,12$ ,  $5,54 \pm 0,25$  và  $6,06 \pm 0,22$  (mg acid ascorbic/g chất khô). Như vậy, khi tăng độ tuổi thu hoạch rau má thìa trong khoảng 30 ÷ 60 ngày tuổi thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết từ rau má sẽ tăng và đạt cực đại  $6,06 \pm 0,22$  mg acid ascorbic/g chất khô khi rau má đạt 60 ngày tuổi. Sau đó, khi độ tuổi thu hoạch > 60 ngày tuổi thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết từ rau má sẽ giảm. Chẳng hạn, hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết thu nhận từ rau má thìa ở các độ tuổi 75, 90, 105 và 120 ngày tuổi tương ứng là  $5,74 \pm 0,19$ ,  $5,35 \pm 0,10$ ,  $5,42 \pm 0,22$  và  $4,47 \pm 0,10$  (mg acid ascorbic/g chất khô). Như vậy, hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết thu nhận từ rau má thìa ở các độ tuổi 75, 90, 105 và 120 ngày tuổi chỉ bằng tương ứng 86,97%, 88,28%, 89,44% và 73,76% so với hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết thu nhận từ rau má thìa ở độ tuổi 60 ngày tuổi.

Mặt khác, kết quả phân tích phương sai ANOVA cũng cho thấy sự sai khác về hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết thu nhận từ rau má thìa ở các độ tuổi thu hoạch khác nhau trong giai đoạn từ 30 ÷ 120 ngày tuổi là sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

*Từ những phân tích ở trên cho thấy ở độ tuổi thu hoạch 60 ngày tuổi thì dịch chiết thu nhận từ rau má thìa có hoạt tính chống oxy hóa tổng đạt mức cao nhất.*

#### **\* Về hoạt tính khử sắt**

Kết quả phân tích hoạt tính khử sắt của dịch chiết thu nhận từ rau má trình bày ở hình 3.3 cũng cho thấy tuổi thu hoạch có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính khử sắt của dịch chiết thu nhận từ rau má thìa và độ tuổi thu hoạch khác nhau thì hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thìa cũng khác nhau. Trong giai đoạn 30 ÷ 75 ngày tuổi, khi tăng độ tuổi thu hoạch thì hoạt tính khử sắt của dịch chiết thu nhận từ rau má thìa cũng tăng theo độ tuổi. Cụ thể, hoạt tính khử sắt của dịch chiết từ rau má thìa ở các độ tuổi 30, 45, 60 và 75 ngày tuổi tương ứng là  $13,16 \pm 0,04$ ,  $20,60 \pm 0,43$ ,  $21,50 \pm 0,52$  và  $22,89 \pm 0,77$  (mg  $\text{FeSO}_4$ /g chất khô). Như vậy, khi tăng độ tuổi thu hoạch rau má thìa trong khoảng 30 ÷ 75 ngày tuổi thì hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má sẽ tăng và đạt cực đại  $22,89 \pm 0,77$  mg  $\text{FeSO}_4$ /g chất khô khi rau má đạt 75 ngày tuổi và hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má ở các độ tuổi 30, 45, 60 ngày tuổi bằng tương ứng 57,49%, 90,00%, 93,93% của hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má ở độ tuổi 75 ngày tuổi. Sau đó, khi độ tuổi thu



hoạch >75 ngày tuổi thì hoạt tính khử sắt của dịch chiết từ rau má sẽ giảm. Chẳng hạn, hoạt tính khử sắt của dịch chiết thu nhận từ rau má là ở các độ tuổi 90, 105 và 120 ngày tuổi tương ứng là  $21,13 \pm 0,86$ ,  $20,48 \pm 0,89$  và  $18,07 \pm 0,45$  (mg FeSO<sub>4</sub>/g chất khô). Như vậy, hoạt tính khử sắt của dịch chiết thu nhận từ rau má là ở các độ tuổi 90, 105 và 120 ngày tuổi chỉ bằng tương ứng 92,31%, 89,47% và 78,94% so với hoạt tính khử sắt của dịch chiết thu nhận từ rau má là ở độ tuổi 75 ngày tuổi.

Mặt khác, kết quả phân tích phương sai ANOVA cũng cho thấy sự sai khác về hoạt tính khử sắt của dịch chiết thu nhận từ rau má là ở các độ tuổi thu hoạch khác nhau trong giai đoạn từ 30 ÷ 120 ngày tuổi là sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

*Từ những phân tích ở trên cho thấy ở độ tuổi thu hoạch 75 ngày tuổi thì dịch chiết thu nhận từ rau má là có hoạt tính khử sắt đạt mức cao nhất.*

#### **\* Về hoạt tính bắt gốc tự do DPPH**

Kết quả phân tích hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết thu nhận từ rau má trình bày ở hình 3.4 cũng cho thấy tuổi thu hoạch cũng ảnh hưởng lớn đến hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết thu nhận từ rau má và độ tuổi thu hoạch khác nhau thì hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết rau má cũng khác nhau. Trong giai đoạn 30 ÷ 60 ngày tuổi, khi tăng độ tuổi thu hoạch thì hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết thu nhận từ rau má cũng tăng theo độ tuổi. Cụ thể, hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết từ rau má là ở các độ tuổi 30, 45 và 60 ngày tuổi tương ứng là  $52,57 \pm 2,01$ ,  $60,05 \pm 1,93$  và  $79,48 \pm 3,29$  (%). Như vậy, hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết từ rau má là ở độ tuổi 60 ngày tuổi là cao nhất, hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết từ rau má là ở độ tuổi 30 và 45 ngày tuổi chỉ bằng tương ứng 66,14% và 75,55% so với hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết từ rau má là ở độ tuổi 60 ngày tuổi. Rau má là ở độ tuổi trên 60 ngày tuổi thì hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết rau má lại giảm. Chẳng hạn, hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết rau má là ở các độ tuổi 75, 90, 105 và 120 ngày tuổi tương ứng là  $74,82 \pm 2,82$ ,  $70,80 \pm 2,85$ ,  $58,46 \pm 1,27$  và  $52,17 \pm 2,23$  (%). Như vậy, hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết rau má là ở các độ tuổi 75, 90, 105 và 120 ngày tuổi chỉ bằng tương ứng 94,14%, 89,08%, 73,55% và 65,64% so với hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết rau má là ở độ tuổi 60 ngày tuổi.

*Từ những phân tích ở trên cho thấy ở độ tuổi thu hoạch 60 ngày tuổi thì dịch chiết rau má là có hoạt tính bắt gốc tự do DPPH cao nhất.*

Từ tất cả các kết quả phân tích ở trên cho thấy độ tuổi thu hoạch rau má thì có ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll và hoạt tính sinh học của dịch chiết thu nhận từ rau má thì. Hơn nữa, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy có sự tương quan mạnh giữa hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll với hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thì theo các độ tuổi nghiên cứu. Cụ thể, hệ số tương quan giữa hàm lượng polyphenol với hoạt tính chống oxy hóa tổng, giữa hàm lượng polyphenol với hoạt tính khử sắt, giữa hàm lượng chlorophyll với hoạt tính chống oxy hóa tổng và giữa hàm lượng chlorophyll với hoạt tính khử sắt tương ứng là 0,757; 0,915; 0,912 và 0,863. Điều này có thể khẳng định thành phần polyphenol, chlorophyll trong dịch chiết rau má có tác động chủ yếu đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thì.

Hơn nữa, kết quả phân tích cũng cho thấy rau má thì ở độ tuổi 45 ngày tuổi có hàm lượng chlorophyll cao nhất nhưng hàm lượng polyphenol thì chỉ bằng 79,80% hàm lượng polyphenol của rau má thì ở độ tuổi 75 ngày tuổi. Kết quả phân tích cũng cho thấy dịch chiết rau má thì ở độ tuổi 75 ngày tuổi có hàm lượng polyphenol cao nhất và dịch chiết rau má thì ở độ tuổi 60 ngày tuổi có hàm lượng polyphenol bằng 86,09% hàm lượng polyphenol của dịch chiết rau má thì ở độ tuổi 75 ngày tuổi. Tuy vậy, ở giai đoạn 75 ngày tuổi, rau má thì vẫn có hàm lượng chlorophyll đạt trên 94% hàm lượng chlorophyll của rau má thì ở độ tuổi 45 ngày tuổi. Trong đồ uống từ rau má, chlorophyll là thành phần chủ yếu tạo màu xanh cho đồ uống và polyphenol là hợp chất có hoạt tính sinh học như tiêu viêm, tăng thải độc,... Từ các phân tích ở trên cho thấy để rau má thì vừa có hàm lượng polyphenol và chlorophyll cao thì nên thu hoạch rau má thì ở độ tuổi 60 ÷ 75 ngày tuổi và giai đoạn 75 ngày tuổi thì rau má thì có hàm lượng polyphenol có hoạt tính sinh học cao nhất. Do vậy, thời gian thu hoạch thích hợp cho rau má thì dùng làm nguyên liệu thu nhận polyphenol, chlorophyll có hoạt tính sinh học là 75 ngày.

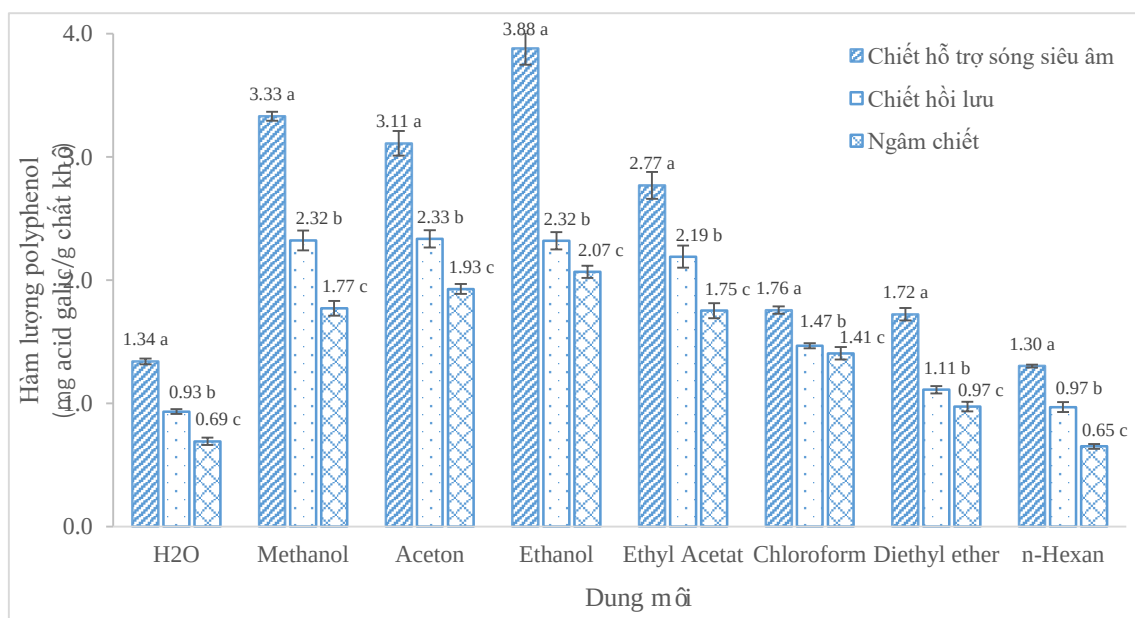
## **3.2. NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH POLYPHENOL VÀ CHLOROPHYLL TỪ RAU MÁ THÌ**

### **3.2.1. Xác định thông số chiết tách polyphenol và chlorophyll từ rau má thì**

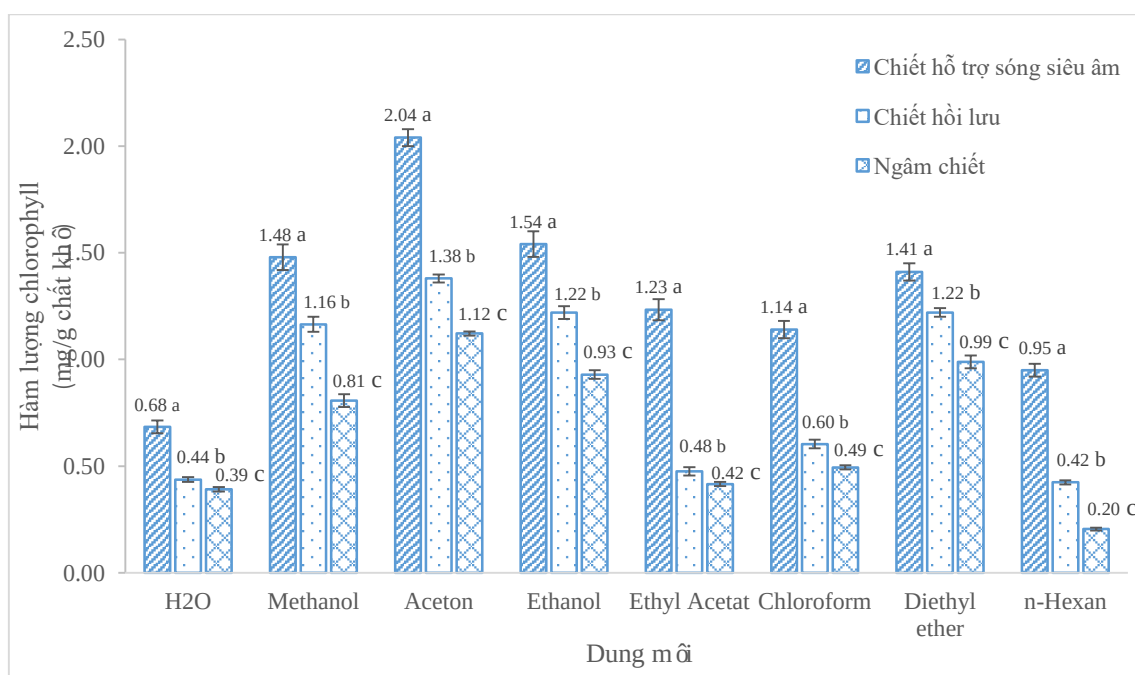
#### **3.2.1.1. Xác định dung môi và phương thức chiết**

Tiến hành chiết polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thì bằng các dung môi chiết khác nhau: Nước cất, methanol, acetone, ethanol, ethyl

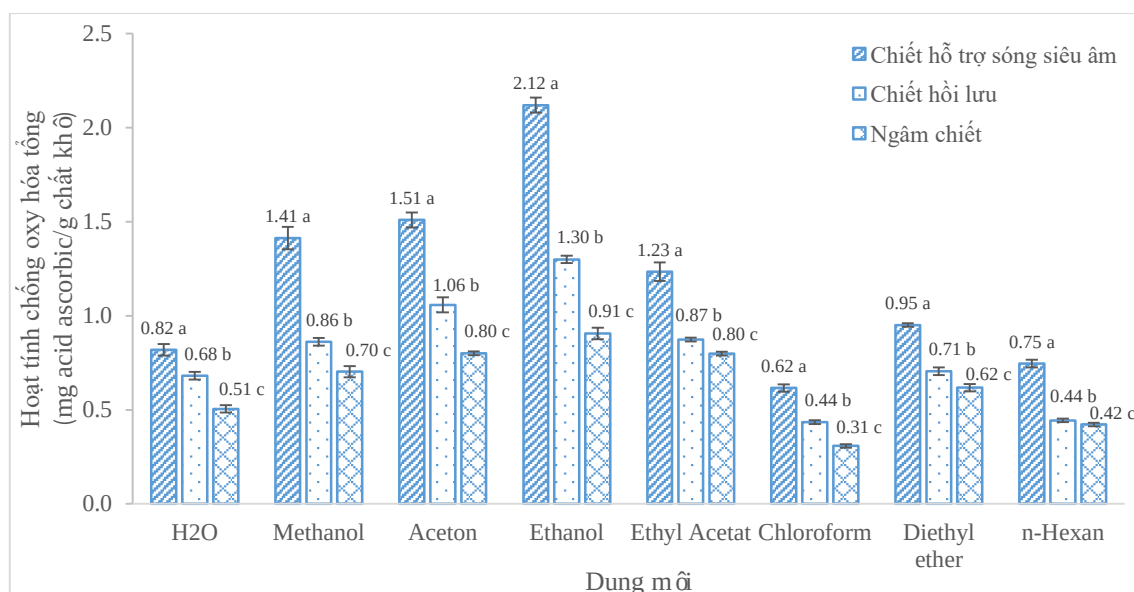
acetat, chloroform, diethyl ether và n-hexan theo 3 phương pháp chiết khác nhau: ngâm chiết, chiết hồi lưu và chiết hỗ trợ sóng siêu âm (ở tần số siêu âm 37kHz và công suất siêu âm 80W), tỷ lệ DM/NL 30/1, thời gian chiết 30 phút và nhiệt độ chiết 30°C. Kết thúc quá trình chiết mẫu được đánh giá hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt. Kết quả được trình bày ở các hình 3.5 ÷ 3.8.



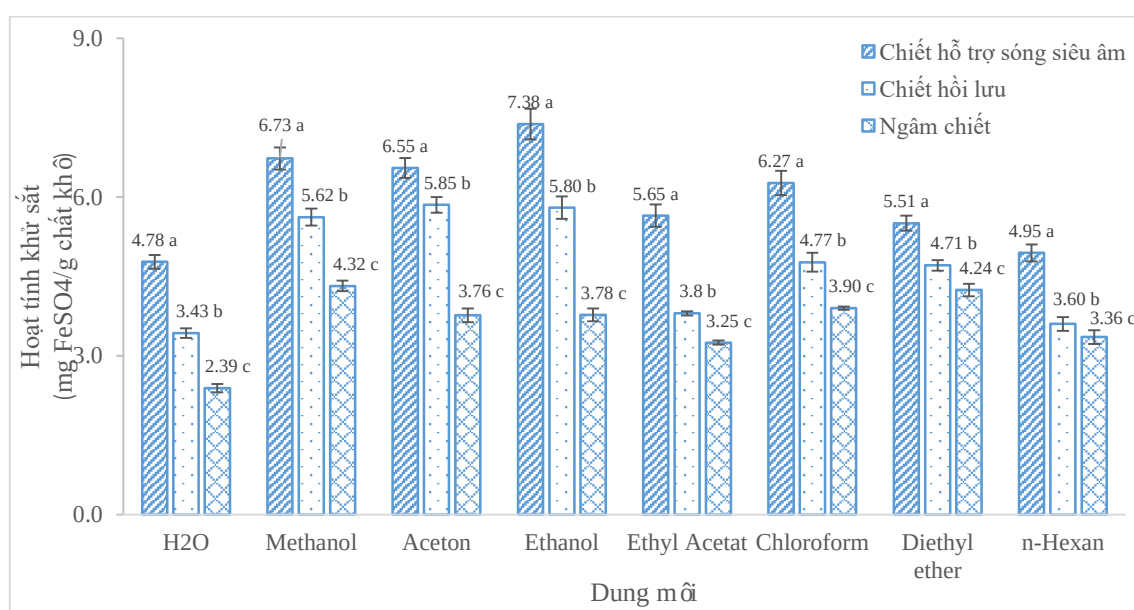
**Hình 3.5. Ảnh hưởng của dung môi và phương thức chiết đến hàm lượng polyphenol trong dịch chiết rau má**



**Hình 3.6. Ảnh hưởng của dung môi và phương thức chiết đến hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết rau má**



**Hình 3.7. Ảnh hưởng của dung môi và phương thức chiết đến hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết rau má**



**Hình 3.8. Ảnh hưởng của dung môi và phương thức chiết đến hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má**

Từ các kết quả trình bày ở các hình 3.5 ÷ 3.8 cho thấy:

#### **\* Về hàm lượng polyphenol**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.5 cho thấy dung môi chiết và phương pháp chiết có ảnh hưởng lớn đến hàm lượng polyphenol của dịch chiết rau má. Trong các phương pháp chiết mà quá trình nghiên cứu đã sử dụng thì phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm cho hàm lượng polyphenol cao hơn các phương pháp chiết khác. Cụ thể,

khi chiết polyphenol từ rau má thà bằng dung môi ethanol với phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm thì dịch chiết thu được có hàm lượng polyphenol là  $3,88 \pm 0,13$  (mg acid galic/g chất khô), cao gấp tương ứng 1,67 lần và 1,87 lần so với hàm lượng polyphenol của dịch chiết trong ethanol bằng phương pháp chiết hồi lưu và phương pháp ngâm chiết. Như vậy, phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm luôn cho dịch chiết có chứa hàm lượng polyphenol cao hơn các phương pháp chiết khác và phương pháp ngâm chiết cho dịch chiết trong ethanol có hàm lượng polyphenol thấp nhất.

Kết quả phân tích còn cho thấy trong cùng điều kiện chiết thì dịch chiết trong ethanol luôn có hàm lượng polyphenol cao hơn các dung môi chiết khác. Cụ thể, dịch chiết ethanol bằng phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm có hàm lượng polyphenol cao gấp tương ứng 1,17, 1,25, 1,40, 2,21, 2,26, 2,90 và 2,98 (lần) so với hàm lượng polyphenol của dịch chiết trong methanol, aceton, ethyl acetat, chloroform, diethyl ether, nước cất và n-hexan.

*Từ kết quả phân tích ở trên cho thấy dịch chiết rau má thà bằng ethanol theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm có hàm lượng polyphenol cao hơn so với dịch chiết trong các dung môi khác và theo các kỹ thuật chiết khác đã sử dụng trong luận án. Do vậy, nếu xét theo khía cạnh hàm lượng polyphenol cao thì dung môi ethanol và phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm nên được lựa chọn cho quá trình chiết polyphenol từ rau má thà.*

#### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.6 cho thấy hàm lượng chlorophyll của dịch chiết rau má thà cũng bị ảnh hưởng mạnh bởi dung môi chiết và phương pháp chiết. Trong phạm vi các phương pháp chiết đã nghiên cứu thì phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm cho hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết rau má thà cao hơn các phương pháp chiết còn lại. Chẳng hạn, khi chiết chlorophyll từ rau má thà bằng phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm với dung môi aceton thì dịch chiết thu được có hàm lượng chlorophyll là  $2,04 \pm 0,04$  (mg/g chất khô), cao gấp tương ứng 1,48 lần và 1,82 lần so với hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết aceton bằng phương pháp chiết hồi lưu và phương pháp ngâm chiết. Như vậy, phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm cho dịch chiết trong aceton có chứa hàm lượng chlorophyll cao hơn các phương pháp chiết khác và phương pháp ngâm chiết cho dịch chiết trong aceton có hàm lượng chlorophyll thấp nhất.

Kết quả phân tích cũng cho thấy trong cùng điều kiện chiết thì dịch chiết trong acetone luôn có hàm lượng chlorophyll cao hơn các dung môi chiết khác. Cụ thể, dịch chiết acetone với phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm có hàm lượng chlorophyll cao gấp tương ứng 1,33, 1,37, 1,45, 1,66, 1,79, 2,15 và 3,00 (lần) so với hàm lượng chlorophyll của dịch chiết trong ethanol, methanol, diethyl ether, ethyl acetat, chloroform, n-hexan và nước cất. Mặt khác, khi sử dụng dung môi ethanol với phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm thì dịch chiết rau má thu được có hàm lượng chlorophyll cao hơn khá nhiều khi chiết bằng các dung môi khác (methanol, diethyl ether, ethyl acetat, chloroform, n-hexan và nước cất) nhưng thấp hơn so với hàm lượng chlorophyll của dịch chiết rau má trong acetone. Kết quả này cũng phù hợp với đặc tính sinh lý của chlorophyll là tan trong acetone tốt hơn tan trong ethanol và cũng phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới khi sử dụng dung môi acetone trong chiết tách chlorophyll [73, 152]. Nhiều kết quả nghiên cứu khác cũng chứng minh cho thấy ngò ai dung môi acetone thì ethanol cũng rất hiệu quả để chiết các chlorophyll [12, 171] đối với nguyên liệu là thực vật và rong tảo biển.

*Từ kết quả phân tích ở trên cho thấy khi chiết các chất từ rau má thì theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm sử dụng dung môi acetone sẽ cho dịch chiết có hàm lượng chlorophyll cao hơn so với hàm lượng chlorophyll của dịch chiết rau má bằng các dung môi khác và theo các kỹ thuật chiết khác đã sử dụng trong luận án này. Tuy vậy, đối với thực phẩm thì chlorophyll chủ yếu góp phần tạo cho dịch thực phẩm có màu xanh, còn hoạt tính sinh học của dịch chiết chủ yếu là do polyphenol. Như vậy, khi xét theo hàm lượng chlorophyll cao thì sử dụng dung môi acetone để chiết các chất từ rau má thì theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm sẽ cho dịch chiết có hàm lượng chlorophyll cao nhất. Tuy vậy, khi chiết các chất từ rau má bằng ethanol thì dịch chiết thu lại có hàm lượng polyphenol với hoạt sinh học cao nhất nhưng hàm lượng chlorophyll của dịch chiết cũng khá cao và bằng 75,49% hàm lượng chlorophyll của dịch chiết rau má bằng acetone. Hơn nữa, dung môi acetone là dung môi độc và giá thành cao hơn ethanol nên người ta ít khi sử dụng acetone trong lĩnh vực chiết các chất dùng trong lĩnh vực thực phẩm.*

#### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.7 cho thấy dung môi chiết và phương pháp chiết cũng ảnh hưởng lớn đến hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết rau má.

Chiết có hỗ trợ sóng siêu âm cho dịch chiết từ rau má thì có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao hơn các phương pháp chiết khác. Cụ thể, dịch chiết rau má thì trong dung môi ethanol sử dụng phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm thu nhận được có hoạt tính chống oxy hóa tổng là  $2,12 \pm 0,04$  (mg acid ascorbic/g chất khô), cao gấp tương ứng 1,63 lần và 2,33 lần so với hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết trong ethanol bằng phương pháp chiết hồi lưu và phương pháp ngâm chiết. Như vậy, phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm luôn cho dịch chiết trong ethanol có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao hơn các phương pháp chiết khác.

Hơn nữa, trong cùng điều kiện chiết có hỗ trợ sóng siêu âm thì dịch chiết trong ethanol luôn có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao hơn so với dịch chiết trong các dung môi khác. Cụ thể, dịch chiết ethanol bằng phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao gấp tương ứng 1,40, 1,50, 1,72, 1,23, 2,59, 2,83 và 3,42 (lần) so với hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết trong aceton, methanol, ethyl acetat, diethyl ether, nước cất, n-hexan và chloroform.

*Từ kết quả phân tích ở trên cho thấy dịch chiết rau má thì bằng ethanol theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao hơn so với dịch chiết trong các dung môi khác (aceton, methanol, ethyl acetat, diethyl ether, nước cất, n-hexan và chloroform) và theo các kỹ thuật chiết khác (kỹ thuật ngâm chiết và kỹ thuật chiết hồi lưu). Do vậy, khi xét theo khía cạnh để dịch chiết có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao thì dung môi ethanol và phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm nên được lựa chọn là dung môi và phương pháp chiết các chất có hoạt tính sinh học từ rau má thì.*

#### **\* Về hoạt tính khử sắt**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.8 cho thấy hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thì cũng bị ảnh hưởng bởi dung môi chiết và phương pháp chiết. Phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm cho hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thì cao hơn các phương pháp chiết khác. Cụ thể, dịch chiết rau má thì bằng phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm với dung môi ethanol sẽ cho dịch chiết có hoạt tính khử sắt là  $7,38 \pm 0,29$  (mg FeSO<sub>4</sub>/g chất khô), cao gấp tương ứng 1,27 lần và 1,95 lần so với hoạt tính khử sắt của dịch chiết trong ethanol bằng phương pháp chiết hồi lưu và phương pháp ngâm chiết. Bên cạnh đó cũng cho thấy trong cùng điều kiện chiết thì dịch chiết trong ethanol luôn

có hoạt tính khử sắt cao hơn dịch chiết trong các dung môi chiết khác. Cụ thể, dịch chiết ethanol theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm luôn cho dịch chiết có hoạt tính khử sắt cao gấp tương ứng 1,10, 1,13, 1,18, 1,31, 1,34, 1,49 và 1,54 (lần) so với hoạt tính khử sắt của dịch chiết trong methanol, acetone, chloroform, ethyl acetate, diethyl ether, n-hexane và nước cất.

*Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy dịch chiết rau má thừ bằng ethanol theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm luôn cho dịch chiết có hoạt tính khử sắt cao hơn so với dịch chiết trong các dung môi khác và theo các kỹ thuật chiết khác đã sử dụng trong luận án. Do vậy, nếu xét theo hoạt tính khử sắt của dịch chiết cao thì dùng môi ethanol và phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm nên được lựa chọn làm dung môi chiết và phương pháp chiết để chiết các hợp chất từ rau má thừ với hoạt tính khử sắt cao.*

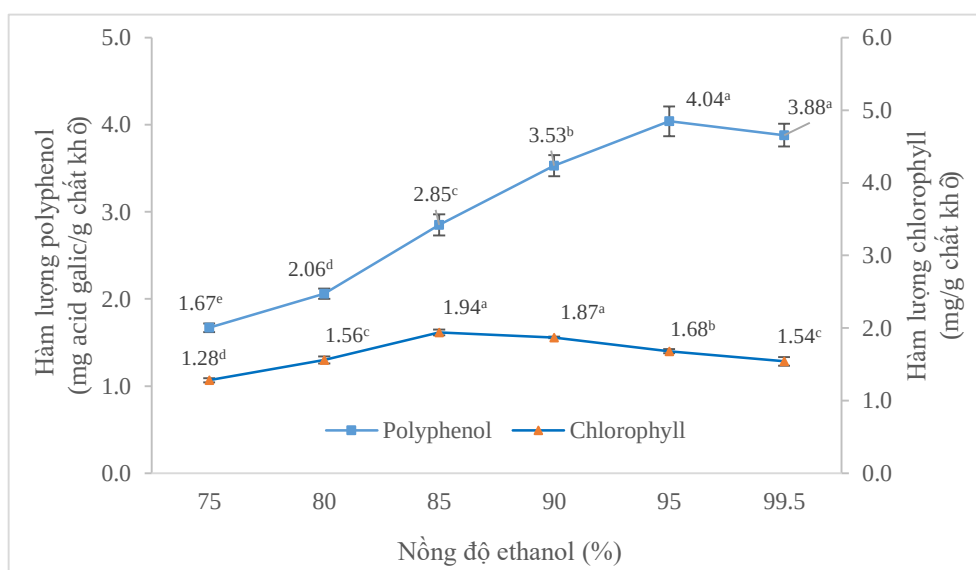
Kết quả phân tích ANOVA cũng cho thấy sự khác biệt giữa các kết quả phân tích về hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của các dịch chiết là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa  $p < 0,05$ . Phân tích này một lần nữa khẳng định, sự khác biệt về hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết trong ethanol theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm so với các dung môi chiết và phương pháp chiết khác là sự khác biệt có ý nghĩa.

*Từ tất cả các phân tích ở trên cho thấy để dịch chiết từ rau má thừ vừa có hàm lượng polyphenol và chlorophyll cao cũng như hoạt tính sinh học của dịch chiết cao thì ethanol nên được lựa chọn làm dung môi chiết và chiết có hỗ trợ sóng siêu âm nên được lựa chọn làm phương pháp chiết. Các kết quả nghiên cứu này của luận án có tính tương đồng về dung môi chiết cũng như phương pháp chiết polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa của một số tác giả ở Việt Nam và trên thế giới. Cụ thể, ethanol là dung môi có độ phân cực cao, được chứng minh phù hợp để chiết các polyphenol có hoạt tính chống oxy từ thực vật [9, 14, 118] và phù hợp để chiết các chlorophyll từ các thực vật trên cạn [12, 151] cũng như các loài thực vật biển [10, 156]. Hơn nữa, nhiều nghiên cứu cũng cho thấy phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm là hiệu quả trong việc tách chiết các polyphenol [42, 176], chlorophyll [67] có hoạt tính chống oxy hóa từ các loài thực vật. Do vậy, luận án quyết định lựa chọn ethanol làm dung môi chiết và phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm làm phương pháp chiết polyphenol, chlorophyll có hoạt tính sinh học từ rau má thừ trồng tại Nha Trang - Khánh Hòa.*

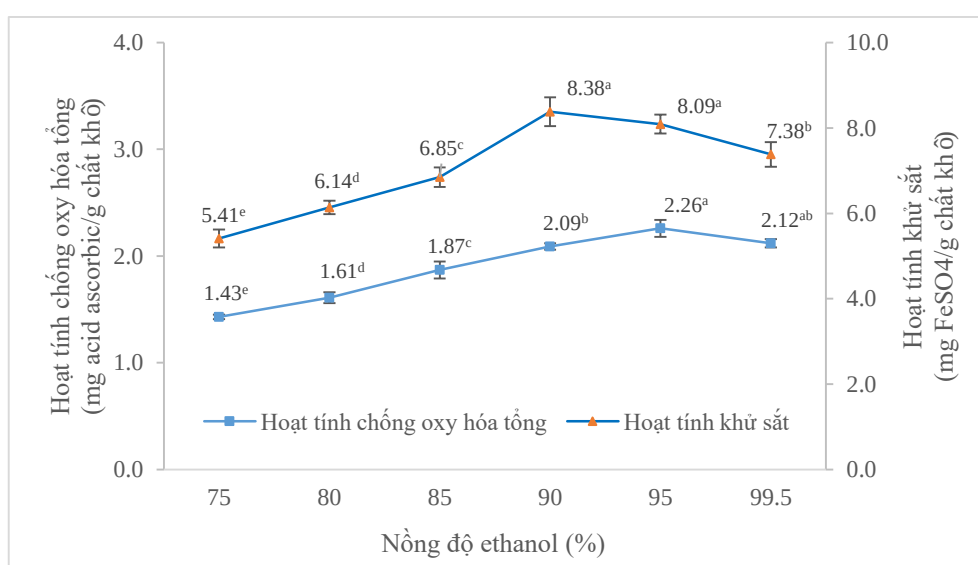


### 3.2.1.2. Xác định nồng độ dung môi

Tiến hành thí nghiệm chiết polyphenol và chlorophyll từ rau m áth à theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm sử dụng dung môi chiết là ethanol ở các nồng độ khảo sát khác nhau từ 75 ÷ 99,5 (%) với bước nhảy nồng độ ethanol là 5% trong dung môi có tỷ lệ DM/NL 30/1 với thời gian chiết 30 phút và nhiệt độ chiết 30°C. Sau khi chiết, lọc hút chân không thu dịch chiết và lấy mẫu phân tích hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt. Kết quả được trình bày ở các hình 3.9 và 3.10.



**Hình 3.9. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong dịch chiết rau m á**



**Hình 3.10. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau m á**

Từ các kết quả được trình bày ở các hình 3.9 và 3.10 cho thấy:

#### **\* Về hàm lượng polyphenol**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.9 cho thấy nồng độ ethanol sử dụng trong nghiên cứu có ảnh hưởng mạnh đến hàm lượng polyphenol có trong dịch chiết rau má thảo. Cụ thể, khi tăng nồng độ ethanol trong khoảng 75 ÷ 95 (%) thì hàm lượng polyphenol có trong dịch chiết thu được sẽ tăng theo nồng độ ethanol sử dụng và hàm lượng polyphenol của dịch chiết đạt cực đại là  $4,04 \pm 0,17$  mg acid galic/g chất khô khi nồng độ ethanol sử dụng 95%. Nếu tiếp tục tăng nồng độ ethanol cho quá trình chiết > 95% thì hàm lượng polyphenol trong dịch chiết giảm nhẹ với khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), khi nồng độ ethanol 99,5% thì dịch chiết rau má thảo thu được có hàm lượng polyphenol là  $3,88 \pm 0,13$  mg acid galic/g chất khô. Kết quả nghiên cứu của luận án cũng có nét tương đồng với một số nghiên cứu chiết polyphenol từ thực vật ở Việt Nam và trên thế giới.

Chẳng hạn nghiên cứu của Vũ Ngọc Bội và cộng sự (2015) trong chiết rút polyphenol, chlorophyll với hoạt tính chống oxy hóa từ cây măng tây [20] và nghiên cứu của Đặng Xuân Cường và cộng sự (2012) khi chiết rút phlorotannin từ rong mơ [4] đều cho rằng nồng độ ethanol có ảnh hưởng mạnh đến hàm lượng polyphenol có trong dịch chiết thu nhận được và nồng độ ethanol > 70% là phù hợp cho quá trình chiết để thu nhận hàm lượng polyphenol trong dịch chiết cao nhất [34, 58, 119].

*Từ các phân tích ở trên cho thấy ethanol ở nồng độ 95% dùng chiết polyphenol từ rau má thảo theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm sẽ cho dịch chiết có hàm lượng polyphenol cao nhất. Do vậy, khi xét theo hàm lượng polyphenol có trong dịch chiết cao thì ethanol 95% nên được lựa chọn để chiết dịch chiết từ rau má thảo.*

#### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Phân tích trình bày ở hình 3.9 cho thấy khi tăng nồng độ ethanol trong khoảng từ 75% đến 85% thì hàm lượng chlorophyll có trong dịch chiết thu được cũng tăng theo và đạt mức cao nhất là  $1,94 \pm 0,04$  (mg/g chất khô) khi nồng độ ethanol là 85%. Nếu tiếp tục tăng nồng độ ethanol lên 90%, 95% và 99,5% thì hàm lượng chlorophyll có trong dịch chiết thu được là  $1,87 \pm 0,01$  mg/g chất khô,  $1,68 \pm 0,03$  mg/g chất khô và  $1,54 \pm 0,06$  mg/g chất khô, tương ứng bằng 96,39%, 86,60% và 79,38% so với hàm lượng chlorophyll có trong dịch chiết rau má khi chiết bằng ethanol 85%. Kết quả nghiên cứu

của luận án cũng có nét tương đồng với một số nghiên cứu sử dụng ethanol với nồng độ khác nhau để chiết chlorophyll từ thực vật hay từ rong. Chẳng hạn, Lê Thị Hồng Ánh và cộng sự (2016) khi nghiên cứu chiết tách chlorophyll từ rong nước lợ *Cheatomorpha* sp. thu mẫu ở đồng bằng sông Cửu Long cho rằng sử dụng ethanol 80% để chiết tách chlorophyll từ rong nước lợ *Cheatomorpha* sp. sẽ cho hiệu quả chiết cao [10]. Nguyễn Thị Vân Anh và cộng sự (2014) cũng cho rằng dùng ethanol 92% để chiết chlorophyll từ lá rau ngót sẽ thu được hàm lượng chlorophyll cao [12]. Các kết quả nghiên cứu trên cũng cho thấy hàm lượng chlorophyll có trong dịch chiết rau má thìa cũng bị ảnh hưởng mạnh bởi nồng độ ethanol và ethanol với nồng độ cao là phù hợp để chiết các chlorophyll từ thực vật.

*Từ các phân tích trên cho thấy ethanol ở nồng độ 85% thích hợp cho việc chiết chlorophyll từ rau má thìa theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm. Tuy vậy, khi sử dụng ethanol ở nồng độ 95% để chiết các chất từ rau má thìa thì dịch chiết thu được sẽ có hàm lượng polyphenol đạt cao nhất và hàm lượng chlorophyll thu được vẫn đạt mức cao, tới 86,60% so với hàm lượng chlorophyll cực đại khi chiết bằng ethanol 95%.*

#### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.10 cũng cho thấy nồng độ ethanol sử dụng trong quá trình chiết có ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết rau má thìa. Khi tăng nồng độ ethanol trong khoảng từ 75% đến 95% thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết rau má thu được cũng tăng và đạt cao nhất  $2,26 \pm 0,08$  mg acid ascorbic/g chất khô tại nồng độ ethanol 95%. Hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết trong ethanol ở nồng độ 95% cao gấp tương ứng 1,58, 1,40, 1,21 và 1,08 (lần) so với hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết ethanol ở các nồng độ 75%, 80%, 85% và 90%. Khi tiếp tục tăng nồng độ ethanol sử dụng > 95% thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết lại có xu hướng giảm xuống. Hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết trong ethanol ở nồng độ 95% cao gấp 1,07 lần so với hoạt tính chống oxy hóa tổng có trong dịch chiết ethanol ở nồng độ 99,5%.

*Từ các phân tích trên cho thấy dịch chiết rau má thìa theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm sử dụng ethanol ở nồng độ 95% có hoạt tính chống oxy hóa tổng*

cao nhất. Do vậy, nếu xét theo hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết cao thì ethanol ở nồng độ 95% được lựa chọn để chiết các hợp chất từ rau má thà.

#### **\* Về hoạt tính khử sắt**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.10 cho thấy khi tăng nồng độ ethanol khảo sát từ 75% đến 90% thì hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thà thu được cũng tăng theo và đạt lớn nhất là  $8,38 \pm 0,34$  mg FeSO<sub>4</sub>/g chất khô khi nồng độ ethanol sử dụng là 90%. Khi tiếp tục tăng nồng độ ethanol chiết > 90% thì hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thà thu được sẽ giảm xuống. Hoạt tính khử sắt của dịch chiết ethanol ở nồng độ 90% cao gấp tương ứng 1,04 lần và 1,14 lần so với hoạt tính khử sắt của dịch chiết ethanol ở các nồng độ 95% và 99,5%. Như vậy, có thể khẳng định nồng độ ethanol sử dụng trong quá trình chiết có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thà thu được.

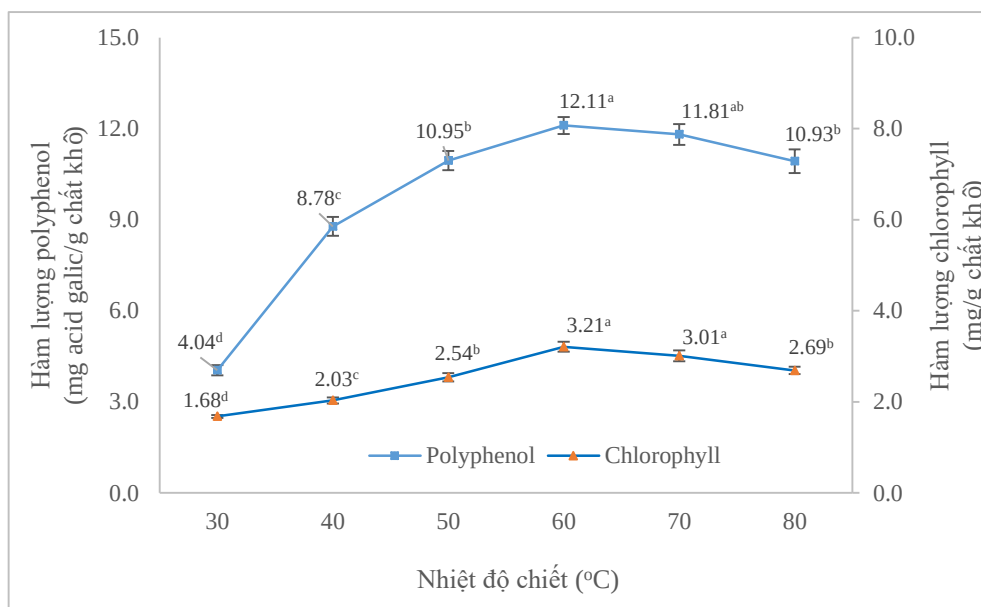
*Từ các phân tích trên cho thấy dịch chiết rau má thà trong ethanol 90% theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm luôn có hoạt tính khử sắt cao hơn tất cả các dịch chiết bằng ethanol ở các nồng độ khác 90%.*

Kết quả phân tích ANOVA cũng cho thấy sự khác biệt về kết quả phân tích hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của các dịch chiết bằng ethanol trong nồng độ khảo sát từ 75% đến 99,5% là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Phân tích này một lần nữa khẳng định, nồng độ ethanol sử dụng trong quá trình chiết trong khoảng đã khảo sát có ảnh hưởng lớn đến hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thà.

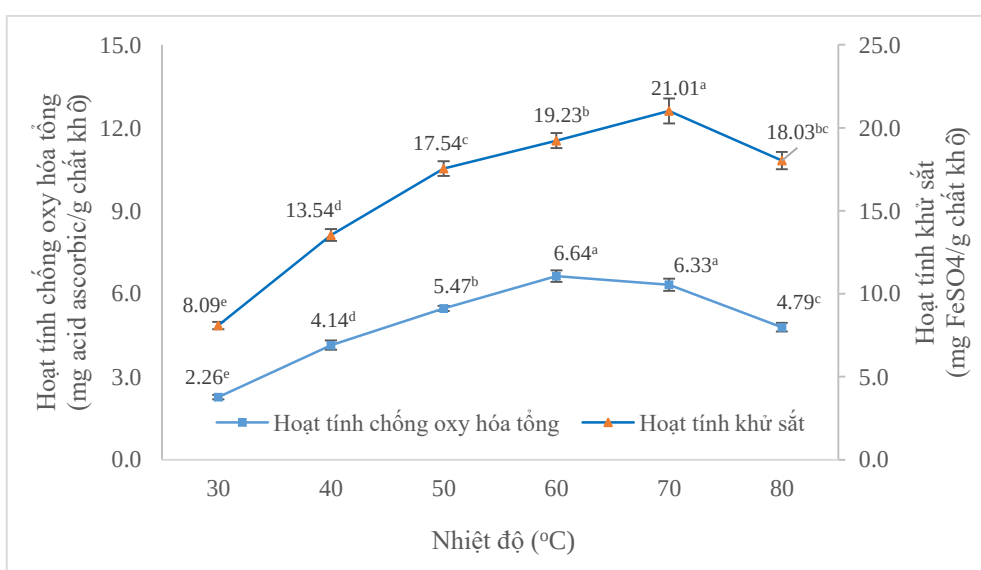
*Từ tất cả các phân tích ở trên cho thấy hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết từ rau má thà cao là do hàm lượng polyphenol trong dịch chiết cao và khi sử dụng ethanol ở nồng độ 95% để chiết các chất từ rau má thà thì dịch chiết thu được có hàm lượng polyphenol với hoạt tính chống oxy hóa tổng, hoạt tính khử sắt đạt mức cao nhất trong khi hàm lượng chlorophyll cũng ở mức cao trên 86,60% so với hàm lượng chlorophyll cực đại khi chiết bằng ethanol 85%. Do vậy, dung môi ethanol ở nồng độ 95% được lựa chọn để chiết polyphenol và chlorophyll có hoạt tính sinh học từ rau má thà.*

### 3.2.1.3. Xác định nhiệt độ chiết

Tiến hành thí nghiệm chiết polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thà với phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm trong dung môi ethanol 95%, thời gian chiết 30 phút, tỷ lệ DM/NL 30/1 và nhiệt độ chiết thay đổi từ 30 ÷ 80 (°C) với bước nhảy nhiệt độ là 10. Kết thúc quá trình chiết mẫu được phân tích hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt. Kết quả được trình bày ở các hình 3.11 và 3.12.



**Hình 3.11. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong dịch chiết rau má**



**Hình 3.12. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má**

Từ các kết quả được trình bày ở các hình 3.11 và 3.12 cho thấy:

#### **\* Về hàm lượng polyphenol**

Kết quả phân tích ở hình 3.11 cho thấy nhiệt độ chiết có ảnh hưởng mạnh đến hàm lượng polyphenol có trong dịch chiết. Cụ thể, khi tăng nhiệt độ chiết trong khoảng  $30^{\circ}\text{C} \div 60^{\circ}\text{C}$  thì hàm lượng polyphenol của dịch chiết rau má thà cũng tăng theo chiều tăng nhiệt độ chiết và đạt cực đại là  $12,11 \pm 0,28$  mg acid galic/g chất khô khi nhiệt độ chiết là  $60^{\circ}\text{C}$ , cao gấp 3,00 lần so với hàm lượng polyphenol có trong dịch chiết rau má thà chiết ở  $30^{\circ}\text{C}$ . Khi tăng nhiệt độ chiết cao hơn  $60^{\circ}\text{C}$  thì hàm lượng polyphenol của dịch chiết rau má thà có xu hướng không tăng trong khoảng nhiệt độ chiết  $60^{\circ}\text{C} \div 70^{\circ}\text{C}$  và khi nhiệt độ chiết cao hơn  $70^{\circ}\text{C}$  thì hàm lượng polyphenol của dịch chiết rau má thà có xu thế giảm nhẹ. Cụ thể, ở nhiệt độ chiết  $70^{\circ}\text{C}$  và  $80^{\circ}\text{C}$  thì hàm lượng polyphenol trong dịch chiết tương ứng là  $11,81 \pm 0,34$  mg acid galic/g chất khô và  $10,93 \pm 0,12$  mg acid galic/g chất khô, bằng tương ứng 97,52% và 90,26% so với hàm lượng polyphenol của dịch chiết rau má thà ở nhiệt độ  $60^{\circ}\text{C}$ . Như vậy, khi chiết các chất từ rau má thà theo phương thức chiết có hỗ trợ sóng siêu âm sử dụng dung môi ethanol 95% thì dịch chiết sẽ có hàm lượng polyphenol cao nhất khi chiết ở  $60^{\circ}\text{C}$ . Chew và cộng sự (2011) khi nghiên cứu chiết tách polyphenol từ cỏ râu mèo (*Orthosiphon stamineus*) bằng dung môi ethanol 40% cũng cho thấy hàm lượng polyphenol tổng số thu nhận từ cỏ râu mèo (*O. stamineus*) đạt giá trị cao nhất 20,03 mg acid galic/g chất khô ở nhiệt độ chiết  $65^{\circ}\text{C}$  - nhiệt độ chiết này cũng gần tương đương với nhiệt độ chiết các chất từ rau má thà mà luận án thực hiện [37]. Frempong và cộng sự (2021) cũng nghiên cứu chiết tách polyphenol từ loài *Funtumia elastica* bằng dung môi ethanol 76% nhận thấy nhiệt độ chiết  $63,7^{\circ}\text{C}$  là phù hợp và ở nhiệt độ chiết  $63,7^{\circ}\text{C}$  dịch chiết polyphenol từ loài *F. elastica* đạt hàm lượng cao nhất là 82,83 mg acid galic/g chất khô.

Từ các phân tích trên cho thấy khi tiến hành chiết ở nhiệt độ  $60^{\circ}\text{C}$  thì dịch chiết từ rau má thà thu được có hàm lượng polyphenol cao nhất. Do vậy, nhiệt độ chiết  $60^{\circ}\text{C}$  nên được lựa chọn để chiết rút polyphenol từ rau má thà. Mặt khác, kết quả nghiên cứu của luận án còn cho thấy khoảng nhiệt độ thích hợp cho quá trình chiết polyphenol từ rau má thà là  $40^{\circ}\text{C} \div 80^{\circ}\text{C}$ . Do vậy, khoảng nhiệt độ chiết  $40^{\circ}\text{C} \div 80^{\circ}\text{C}$  nên được lựa chọn làm thông số biên cho quá trình quy hoạch thực nghiệm chiết rút polyphenol từ rau má thà.

### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Kết quả phân tích ở hình 3.11 cho thấy hàm lượng chlorophyll chiết rút từ rau má cũng thay đổi theo nhiệt độ chiết. Khi tăng nhiệt độ chiết trong khoảng  $30^{\circ}\text{C} \div 60^{\circ}\text{C}$  thì hàm lượng chlorophyll của dịch chiết rau má cũng tăng theo chiều tăng của nhiệt độ chiết và khi nhiệt độ chiết là  $60^{\circ}\text{C}$  thì hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết đạt mức lớn nhất là  $3,21 \pm 0,11$  mg/g chất khô, bằng 1,91 lần so với hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết tại nhiệt độ chiết  $30^{\circ}\text{C}$ . Khi tiếp tục tăng nhiệt độ chiết  $> 70^{\circ}\text{C}$  thì hàm lượng chlorophyll có trong dịch chiết có xu hướng giảm ngược chiều với chiều tăng nhiệt độ chiết. Cụ thể, khi tiếp tục tăng nhiệt độ chiết trong khoảng  $60^{\circ}\text{C} \div 70^{\circ}\text{C}$  thì hàm lượng chlorophyll của dịch chiết thu được không tăng và sự khác biệt về hàm lượng chlorophyll của dịch chiết không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), chứng tỏ hàm lượng chlorophyll của dịch chiết rau má thu được hầu như không thay đổi khi tăng nhiệt độ trong khoảng  $60^{\circ}\text{C} \div 70^{\circ}$ . Sau đó nếu tiếp tục tăng nhiệt độ chiết lớn hơn  $70^{\circ}\text{C}$  thì hàm lượng chlorophyll của dịch chiết rau má có xu thế giảm nhanh hơn và hàm lượng chlorophyll của dịch chiết rau má thu được khi chiết ở  $80^{\circ}\text{C}$  giảm chỉ còn 83,80% hàm lượng chlorophyll cực đại khi chiết ở  $60^{\circ}\text{C}$ . Kết quả nghiên cứu của luận án có tính tương đồng với nghiên cứu của Weibao Kong và cộng sự (2012) khi nghiên cứu chiết tách chlorophyll từ vi tảo xanh (*Chlorella vulgaris*) bằng phương pháp ngâm chiết có hỗ trợ sóng siêu âm với dung môi chiết ethanol 80%. Kết quả nghiên cứu của Weibao Kong và cộng sự cho thấy khoảng nhiệt độ thích hợp cho quá trình chiết chlorophyll từ vi tảo xanh là  $50 \div 70^{\circ}\text{C}$  và  $61^{\circ}\text{C}$  là nhiệt độ thích hợp nhất cho quá trình chiết chlorophyll từ vi tảo xanh [178].

*Từ các phân tích trên cũng cho thấy  $60^{\circ}\text{C}$  là nhiệt độ thích hợp và  $40^{\circ}\text{C} \div 80^{\circ}\text{C}$  là khoảng nhiệt độ phù hợp cho quá trình chiết để đảm bảo thu được chlorophyll với hàm lượng cao từ rau má thà.*

### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.12 cho thấy cũng tương tự như ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol trong dịch chiết, nhiệt độ chiết cũng có ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết rau má thà. Khi tăng nhiệt độ chiết trong khoảng  $30^{\circ}\text{C} \div 60^{\circ}\text{C}$  thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết thu được cũng tăng và hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết đạt mức cao nhất  $6,64 \pm 0,21$

mg acid ascorbic/g chất khô khi nhiệt độ chiết là 60°C. Nếu tiếp tục tăng nhiệt độ chiết > 70°C thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết giảm xuống và tại 80°C thì dịch chiết có hoạt tính chống oxy hóa tổng là  $4,79 \pm 0,16$  mg acid ascorbic/g chất khô, bằng 72,14% hoạt tính oxy hóa tổng cao nhất khi chiết ở 60°C.

*Từ các phân tích trên cho thấy khi chiết các hợp chất từ rau má thì ở nhiệt độ 60°C thì dịch chiết thu được có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao nhất và khoảng nhiệt độ phù hợp cho quá trình chiết các chất từ rau má thì để dịch chiết có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao là 40 ÷ 80°C.*

#### **\* Về hoạt tính khử sắt**

Kết quả phân tích ở hình 3.12 cho thấy hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thì cũng chịu tác động mạnh bởi nhiệt độ chiết. Hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thì thu được tăng khi tăng nhiệt độ chiết trong khoảng 30 ÷ 70°C và tại nhiệt độ chiết 70°C thì hoạt tính khử sắt của dịch chiết đạt cao nhất là  $21,01 \pm 0,75$  mg FeSO<sub>4</sub>/g chất khô và cao tương ứng gấp 2,60, 1,55, 1,20, 1,09 (lần) so với hoạt tính khử sắt của dịch chiết thu nhận được khi chiết tại các nhiệt độ 30°C, 40°C, 50°C và 60°C. Khi tăng nhiệt độ chiết lên 80°C thì hoạt tính khử sắt của dịch chiết có xu thế giảm nhẹ và ở nhiệt độ chiết 80°C thì dịch chiết rau má thì có hoạt tính khử sắt là  $18,03 \pm 0,52$  mg FeSO<sub>4</sub>/g chất khô, bằng 85,82% so với hoạt tính khử sắt của dịch chiết cao nhất khi chiết tại 70°C.

*Từ các phân tích trên cho thấy 70°C là nhiệt độ thích hợp và 40 ÷ 80°C khoảng nhiệt độ phù hợp cho quá trình chiết để thu dịch chiết rau má thì có hoạt tính khử sắt cao nhất.*

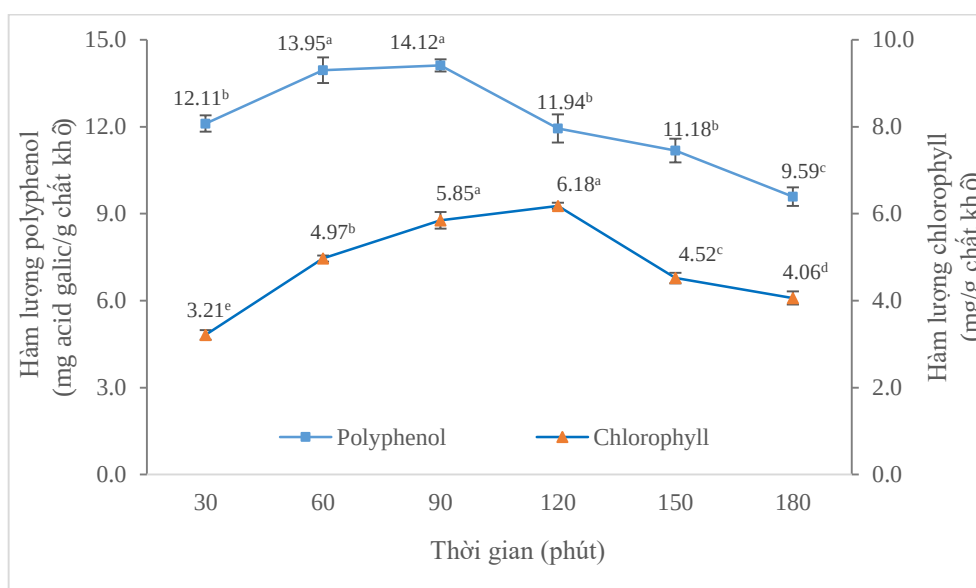
Kết quả phân tích phương sai ANOVA cho thấy có sự khác biệt với mức ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) đối với các giá trị về hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng, hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thì thu nhận ở các nhiệt độ khác nhau trong quá trình nghiên cứu của luận án. Kết quả này một lần nữa khẳng định nhiệt độ chiết có ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll và hoạt tính sinh học của dịch chiết rau má thì.

*Từ tất cả các phân tích ở trên cho thấy 60°C là nhiệt độ thích hợp cho quá trình chiết polyphenol, chlorophyll với hoạt tính sinh học từ rau má thì và 40 ÷ 80°C là khoảng nhiệt độ phù hợp cho quá trình chiết polyphenol và chlorophyll có các hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thì.*

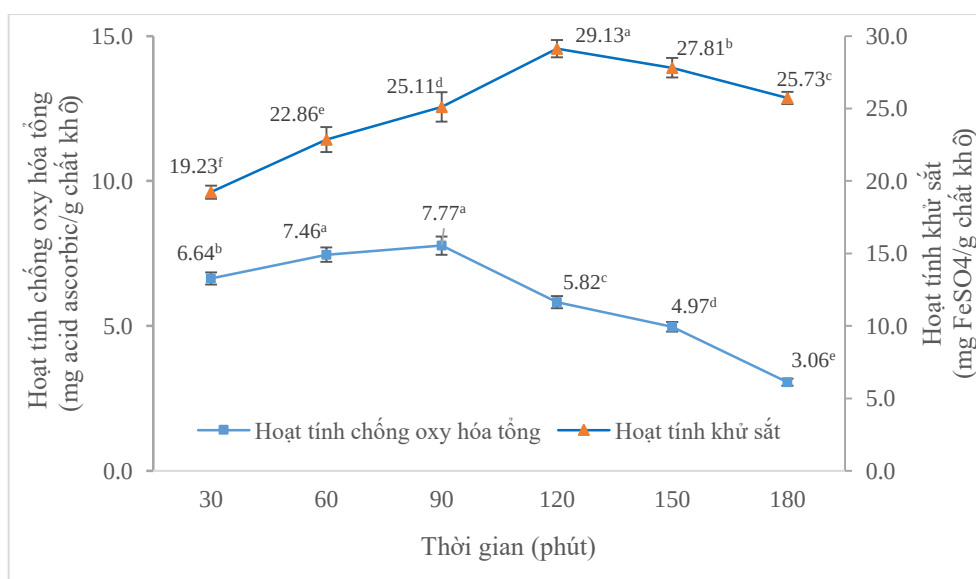


### 3.2.1.4. Xác định thời gian chiết

Tiến hành thí nghiệm chiết polyphenol, chlorophyll từ rau má theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm bằng dung môi ethanol 95% tại nhiệt độ chiết là 60°C, tỷ lệ DM/NL 30/1 và thời gian chiết thay đổi từ 30 ÷ 180 (phút) với bước nhảy thời gian là 30. Sau khi chiết, lọc hút chân không thu dịch chiết và lấy mẫu phân tích hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở các hình 3.13 và 3.14.



**Hình 3.13. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong dịch chiết rau má**



**Hình 3.14. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má**

Từ các kết quả thí nghiệm được trình bày ở hình 3.13 và 3.14 thấy rằng:

#### **\* Về hàm lượng polyphenol**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.13 cho thấy khi chiết các polyphenol từ rau má thì ảnh hưởng mạnh đến hàm lượng polyphenol có trong dịch chiết. Cụ thể, hàm lượng polyphenol trong dịch chiết rau má tăng khi tăng thời gian chiết trong khoảng từ 30 ÷ 90 (phút) và đạt giá trị cao nhất là  $14,12 \pm 0,21$  mg acid galic/g chất khô khi thời gian chiết là 90 phút. Khi tăng thời gian chiết > 90 phút thì hàm lượng polyphenol của dịch chiết giảm mạnh. Sự suy giảm hàm lượng polyphenol của dịch chiết khi thời gian chiết dài hơn 90 phút có thể lý giải là do polyphenol là hợp chất dễ bị biến đổi khi thời gian chiết kéo dài có thể làm chuyển hóa, phân hủy polyphenol. Hàm lượng polyphenol của các dịch chiết thu được tương ứng với thời gian chiết 30 phút, 60 phút, 120 phút, 150 phút và 180 phút bằng 85,77%, 98,79%, 84,56%, 79,18% và 67,92% hàm lượng polyphenol của dịch chiết rau má thu được khi chiết trong 90 phút. Như vậy, thời gian thích hợp cho quá trình chiết polyphenol từ rau má là mà luận án thực hiện ngắn hơn thời gian chiết mà Frempong và cộng sự (2021) đã thực hiện khi chiết rút polyphenol từ loài *Funtumia elastica*. Cụ thể, theo Frempong và cộng sự (2021), thời gian chiết thích hợp cho quá trình chiết rút polyphenol từ loài *Funtumia elastica* bằng ethanol 60% ở nhiệt độ chiết 35 °C là 240 phút – tương ứng với thông số chiết này, hàm lượng polyphenol thu nhận từ loài *Funtumia elastica* đạt mức cao nhất là 67,22 mg acid galic/g chất khô. Sở dĩ thời gian chiết polyphenol thu nhận từ loài *Funtumia elastica* do Frempong và cộng sự nghiên cứu khác nhiều so với nghiên cứu của luận án là vì các tác giả đã sử dụng phương pháp ngâm chiết và quá trình thực hiện nghiên cứu trên loài thực vật khác. Các loài thực vật khác nhau sẽ khác về cấu trúc mô dẫn tới thời gian chiết các chất ra khỏi mô cũng khác nhau.

*Từ các phân tích trên cho thấy dịch chiết rau má thì có hàm lượng polyphenol cao nhất khi chiết trong thời gian 90 phút. Do vậy, thời gian chiết 90 phút nên được chọn để chiết polyphenol từ rau má.*

#### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.13 cho thấy hàm lượng chlorophyll có trong dịch chiết từ rau má cũng chịu tác động mạnh bởi thời gian chiết. Cụ thể, trong khoảng thời gian chiết từ 30 ÷ 120 (phút), khi tăng thời gian chiết thì hàm lượng chlorophyll của dịch chiết rau má cũng tăng và đạt cực đại là  $6,18 \pm 0,07$  mg/g chất khô khi thời gian

chiết là 120 phút. Khi tăng thời gian chiết trên 120 phút thì hàm lượng chlorophyll của dịch chiết rau má sẽ lại giảm nhanh. Cụ thể, hàm lượng chlorophyll của dịch chiết rau má sẽ khi chiết trong thời gian 30 phút, 60 phút, 90 phút và 150 phút chỉ bằng tương ứng 51,94%, 80,42%, 94,66% và 73,14% so với hàm lượng chlorophyll của dịch chiết thu được khi chiết trong 120 phút. Kết quả nghiên cứu về thời gian chiết chlorophyll trong rau má sẽ của luận án cao hơn so với nghiên cứu chiết chlorophyll từ vi tảo xanh (*Chlorella vulgaris*) bằng phương pháp ngâm chiết có hỗ trợ sóng siêu âm sử dụng ethanol 80% và chiết ở 61°C của Weibao Kong và cộng sự. Kết quả nghiên cứu của Weibao Kong và cộng sự cho thấy thời gian chiết 79 phút là thích hợp cho quá trình chiết chlorophyll từ vi tảo xanh [178]. Sự khác biệt giữa thời gian chiết chlorophyll từ vi tảo xanh và thời gian chiết chlorophyll từ rau má sẽ có thể lý giải là do sự khác nhau về cấu trúc mô của thực vật và vi tảo. Trong thực vật cấu trúc mô chứa nhiều sợi cellulose nên trạng thái mô bền chặt hơn do vậy các chất trong mô khó khuếch tán ra dung môi chiết nên quá trình chiết rút các chất ra khỏi mô thực vật khó khăn hơn nên thời gian chiết cần dài hơn.

*Từ các phân tích trên cho thấy khi thời gian chiết là 120 phút thì dịch chiết thu được có hàm lượng chlorophyll cao nhất. Do vậy, khi chiết chlorophyll từ rau má sẽ thì thời gian chiết 120 phút là phù hợp.*

#### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.14 cho thấy tương tự như sự ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll có trong dịch chiết thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết rau má sẽ cũng chịu tác động bởi yếu tố thời gian chiết. Cụ thể, khi tăng thời gian chiết từ 30 phút đến 90 phút thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết tăng và đạt cao nhất là  $7,77 \pm 0,31$  mg acid ascorbic/g chất khô khi thời gian chiết là 90 phút. Nếu tiếp tục tăng thời gian chiết cao hơn 90 phút thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết có xu thế giảm mạnh. Kết quả này có thể lý giải là do các chất có hoạt tính chống oxy hóa tổng mạnh như các polyphenol thường ít bền với nhiệt trong một thời gian dài. Do vậy, thời gian chiết kéo dài ở nhiệt độ 60°C có thể làm mất hoạt tính của polyphenol dẫn tới hoạt tính chống oxy hóa tổng giảm mạnh khi tăng thời gian chiết trên 90 phút. Hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết khi chiết trong các thời gian chiết 30 phút, 60 phút, 120 phút, 150 phút và 180 phút chỉ bằng 85,46%, 96,01%, 74,90%, 63,96% và 39,38% hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết khi chiết với thời gian 90 phút.

*Từ các phân tích trên cho thấy dịch chiết rau má thu được với thời gian chiết là 90 phút thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết cao nhất nên thời gian chiết 90 phút là phù hợp cho quá trình chiết để thu dịch chiết có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao nhất.*

#### **\* Về hoạt tính khử sắt**

Kết quả phân tích ở hình 3.14 cho thấy hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thu được cũng chịu tác động mạnh bởi yếu tố thời gian chiết. Cụ thể, khi tăng thời gian chiết trong khoảng từ 30 phút đến 120 phút thì hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thu được tăng và đạt cao nhất là  $29,13 \pm 0,59$  mg FeSO<sub>4</sub>/g chất khô khi thời gian chiết là 120 phút. Nếu tiếp tục tăng thời gian chiết đến 150 phút và 180 phút thì hoạt tính khử sắt của dịch chiết có xu hướng giảm. Hoạt tính khử sắt của dịch chiết thu nhận được khi chiết trong thời gian 30, 60, 90, 150 và 180 (phút) bằng tương ứng 66,01%, 78,48%, 86,20%, 95,47% và 88,33% so với hoạt tính khử sắt cao nhất của dịch chiết khi chiết trong 120 phút.

*Từ các phân tích trên cho thấy thời gian chiết 120 phút thì dịch chiết rau má thu được có hoạt tính khử sắt cao nhất và đây là thời gian chiết phù hợp cho quá trình chiết thu dịch chiết có hoạt tính khử sắt cao.*

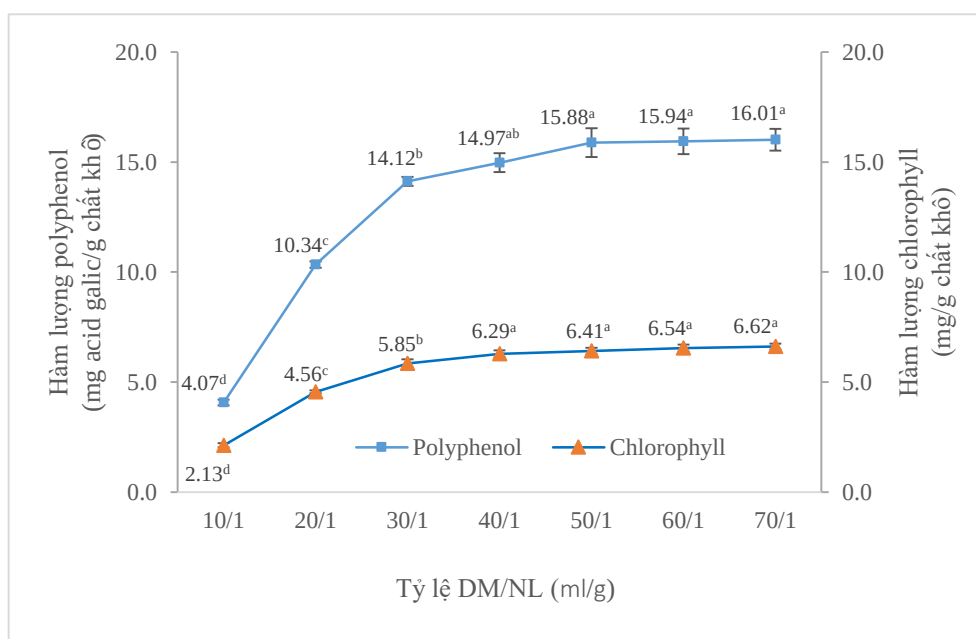
Phân tích phương sai ANOVA thấy rằng có sự khác biệt về hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thu được ở các thời gian chiết khác nhau là sự khác biệt ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Kết quả này một lần nữa khẳng định thời gian chiết có tác động mạnh đến hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thu được.

*Từ tất cả các phân tích ở trên cho thấy dịch chiết rau má thu được trong thời gian chiết 90 phút thì dịch chiết thu được ngoài việc có hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa tổng cao nhất còn thu được hàm lượng chlorophyll cao bằng 94,66% và hoạt tính khử sắt cao bằng 86,20% so với giá trị cực đại khi chiết trong 120 phút. Tr� lại, khi chiết các hợp chất từ rau má thu được trong thời gian 120 phút, dịch chiết thu được chỉ có hàm lượng chlorophyll và hoạt tính khử sắt cao trong khi hàm lượng polyphenol*

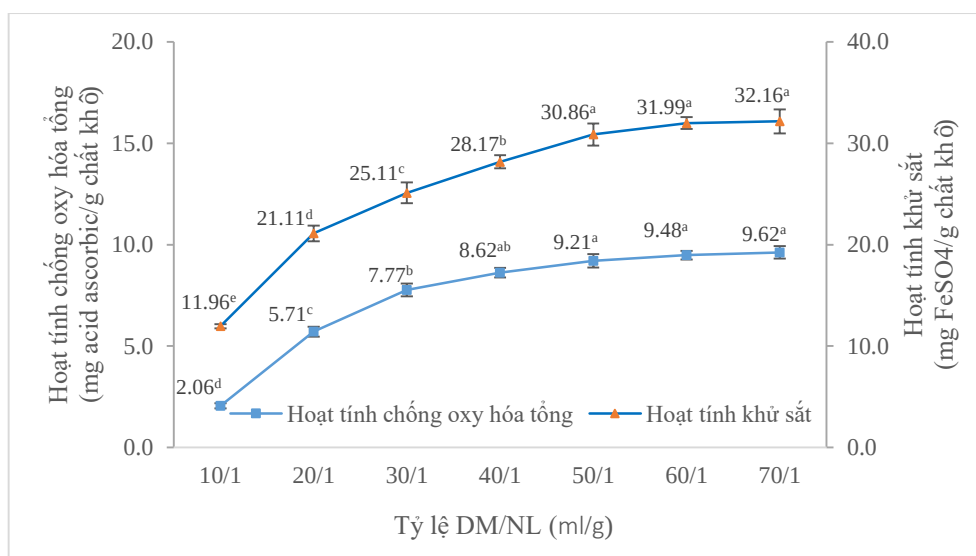
chỉ bằng 84,56% và hoạt tính chống oxy hóa tổng bằng 74,90% so với giá trị cực đại khi chiết trong 90 phút. Trong khi đó, polyphenol là hợp chất có hoạt tính sinh học có lợi cho sức khỏe con người còn chlorophyll vai trò chính là chất tạo màu xanh cho đồ uống từ rau má. Do vậy, luận án quyết định chọn thời gian chiết là 90 phút để vừa đảm bảo cho dịch chiết có hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa tổng cao nhất lại vừa đảm bảo cho dịch chiết có hàm lượng chlorophyll và hoạt tính khử sắt ở mức cao. Mặt khác, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khoảng thời gian chiết 30÷150 phút là phù hợp để chiết các hợp chất polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thà.

### 3.2.1.5. Xác định tỷ lệ DM/NL

Tiến hành thí nghiệm chiết polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thà bằng phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm với dung môi ethanol 95% trong thời gian chiết là 90 phút, nhiệt độ chiết 60°C và tỷ lệ DM/NL thay đổi từ 10/1 ÷ 70/1 (ml/g) với bước nhảy của tỷ lệ DM/NL là 10. Sau khi chiết, lọc hút chân không thu dịch chiết và mẫu được phân tích hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt. Kết quả được trình bày ở các hình 3.15 và 3.16.



**Hình 3.15. Ảnh hưởng của tỷ lệ DM/NL đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong dịch chiết rau má**



**Hình 3.16. Ảnh hưởng của tỷ lệ DM/NL đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má**

Từ các kết quả được trình bày ở các hình 3.15 và 3.16 cho thấy:

#### **\* Về hàm lượng polyphenol**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.15 cho thấy tỷ lệ DM/NL của quá trình chiết có ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol trong dịch chiết và khi tăng tỷ lệ DM/NL từ 10/1 ÷ 70/1 (ml/g) thì hàm lượng polyphenol của dịch chiết tăng dần và khi tăng tỷ lệ DM/NL từ mức 50/1 (ml/g) thì hàm lượng polyphenol của dịch chiết tăng chậm dần. Khi tỷ lệ chiết là 50/1 (ml/g) thì hàm lượng polyphenol có trong dịch chiết đạt mức cao nhất là  $15,88 \pm 0,65$  mg acid galic/g chất khô. Kết quả phân tích về thống kê cho thấy sự sai khác về hàm lượng polyphenol khi chiết theo các tỷ lệ DM/NL từ 50/1 ÷ 70/1 (ml/g) là sự sai khác không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Kết quả này có nghĩa là khi tăng tỷ lệ DM/NL trên 50/1 (ml/g) thì không làm tăng tổng hàm lượng polyphenol của dịch chiết từ rau má thà. Kết quả này có thể lý giải, quá trình chiết là quá trình khuếch tán của chất tan từ nguyên liệu ra dung môi là do sự chênh lệch về gradient nồng độ giữa nguyên liệu và dung môi. Khi hàm lượng chất tan trong dung môi và nguyên liệu tương đương nhau thì sự chênh lệch về gradient nồng độ giữa nguyên liệu và dung môi không còn nên quá trình khuếch tán dừng. Do vậy, khi tỷ lệ DM/NL là 50/1 (ml/g) thì nồng độ chất tan giữa nguyên liệu và dung môi đạt tới sự cân bằng nên khi tăng tỷ lệ DM/NL trên 50/1 (ml/g) sẽ không làm tăng khả năng khuếch tán và hòa tan của polyphenol từ rau má thà nên hàm lượng polyphenol của dịch chiết không tăng.

*Từ các phân tích trên cho thấy tỷ lệ DM/NL là 50/1 (ml/g) thì dịch chiết rau má thu được có hàm lượng polyphenol cao nên tỷ lệ DM/NL 50/1 (ml/g) là phù hợp để chiết các polyphenol từ rau má thà.*

#### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Kết quả phân tích trên bày ở hình 3.15 cho thấy hàm lượng chlorophyll có trong dịch chiết cũng chịu tác động mạnh bởi tỷ lệ DM/NL. Khi tăng tỷ lệ DM/NL trong khoảng từ 10/1 ÷ 70/1 (ml/g) thì hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết cũng tăng theo và khi tăng tỷ lệ DM/NL lên mức trên 50/1 (ml/g) thì hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết bắt đầu tăng chậm dần. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy khi tăng tỷ lệ DM/NL lên mức trên 50/1 thì sự sai khác về hàm lượng chlorophyll của các mẫu chiết không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Kết quả này có nghĩa là khi tăng tỷ lệ DM/NL lên mức trên 50/1 không làm gia tăng tổng hàm lượng chlorophyll thu nhận từ rau má thà.

*Từ các phân tích trên cho thấy đối với quá trình chiết chlorophyll từ rau má thà tỷ lệ DM/NL là 50/1 (ml/g) cũng là phù hợp.*

#### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Kết quả phân tích ở hình 3.16 cũng cho thấy tỷ lệ DM/NL của quá trình chiết có ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết rau má thà và khi tăng tỷ lệ DM/NL trong khoảng từ 10/1 ÷ 70/1 (ml/g) thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết tăng. Khi tăng tỷ lệ DM/NL trên mức 50/1 (ml/g) thì càng tăng tỷ lệ DM/NL thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết càng tăng chậm. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy khi tăng tỷ lệ DM/NL lên mức trên 50/1 (ml/g) thì sự sai khác về hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Kết quả này có nghĩa là khi tăng tỷ lệ DM/NL lên mức trên 50/1 (ml/g) không làm gia tăng hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết.

*Từ các phân tích trên cho thấy đối với quá trình chiết các hợp chất từ rau má thà để dịch chiết có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao thì tỷ lệ DM/NL là 50/1 (ml/g) cũng là phù hợp.*

#### **\* Về hoạt tính khử sắt**

Kết quả phân tích ở hình 3.16 cũng cho thấy tỷ lệ DM/NL của quá trình chiết có ảnh hưởng đến hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thà và khi tăng tỷ lệ DM/NL

trong khoảng từ 10/1 ÷ 70/1 (ml/g) thì hoạt tính khử sắt của dịch chiết tăng. Kết quả phân tích cũng cho thấy khi tăng tỷ lệ DM/NL lên mức trên 50/1 (ml/g) thì càng tăng tỷ lệ DM/NL thì hoạt tính khử sắt của dịch chiết càng tăng chậm. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy khi tăng tỷ lệ DM/NL lên mức trên 50/1 (ml/g) thì sự sai khác về hoạt tính khử sắt của dịch chiết không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Kết quả này có nghĩa là khi tăng tỷ lệ DM/NL lên trên mức 50/1 (ml/g) không quyết định đến sự gia tăng hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thà.

*Từ các phân tích trên cho thấy đối với quá trình chiết các hợp chất từ rau má thà để dịch chiết có hoạt tính khử sắt cao thì tỷ lệ DM/NL là 50/1 (ml/g) cũng là phù hợp.*

Phân tích phương sai ANOVA cũng khẳng định tỷ lệ DM/NL có tác động mạnh đến hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thà thu được và sự khác biệt giữa các mẫu chiết là sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

*Từ tất cả các phân tích ở trên cho thấy khi chiết các hợp chất từ rau má thà bằng ethanol 95% theo phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm với tỷ lệ DM/NL 50/1 (ml/g) thì dịch chiết thu được có hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll và hoạt tính sinh học cao nhất. Mặt khác, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khi tăng tỷ lệ DM/NL trên 50/1 (ml/g) thì dịch chiết thu được có hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll và hoạt tính sinh học tăng không đáng kể nhưng dẫn tới làm tăng thể tích dung dịch chiết, làm cho quá trình cô đặc dịch chiết khó khăn và làm tăng chi phí cô đặc. Ngoài ra, kết quả phân tích cũng cho thấy khoảng tỷ lệ DM/NL là 30/1 ÷ 70/1 (ml/g) phù hợp cho quá trình tối ưu thực nghiệm chiết các chất từ rau má thà trồng tại Nha Trang - Khánh Hòa.*

### **3.2.2. Tối ưu hóa công đoạn chiết tách polyphenol và chlorophyll từ rau má thà**

Từ kết quả xác định điều kiện chiết, luận án tiến hành tối ưu hóa công đoạn chiết polyphenol và chlorophyll từ rau má thà với mục tiêu thu được dịch chiết rau má thà chứa polyphenol và chlorophyll với hàm lượng và hoạt tính chống oxy hóa cao để dùng cho quá trình sấy phun tạo bột polyphenol và chlorophyll định hướng dùng trong đồ uống.



Miền nghiên cứu của các yếu tố tác động xác định trong quá trình chiết xoay quanh các thông số: Nhiệt độ ( $X_1$ :  $40 \div 80^\circ\text{C}$ ,  $\delta_1=20$ ), thời gian ( $X_2$ :  $30 \div 150$  phút,  $\delta_2=60$ ) và tỷ lệ DM/NL ( $X_3$ :  $30/1 \div 70/1$ ,  $\delta_3=20$ ). Tối ưu hóa được bố trí theo mô hình bề mặt đáp ứng Box-Behnken với các hàm mục tiêu: Hàm lượng polyphenol  $Y_1$  (mg acid galic/g chất khô), hàm lượng chlorophyll  $Y_2$  (mg/g chất khô) và hoạt tính chống oxy hóa tổng  $Y_3$  (mg acid ascorbic/g chất khô).

Kết quả thí nghiệm tối ưu công đoạn chiết polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa cao được trình bày ở bảng 3.5.

**Bảng 3.5. Kết quả tối ưu hóa công đoạn chiết polyphenol và chlorophyll từ rau má thảo**

| $X_1$<br>( $^\circ\text{C}$ ) | $X_2$<br>(phút) | $X_3$<br>(ml/g) | $Y_1$<br>(mg acid galic/g chất khô) |          | $Y_2$<br>(mg/g chất khô) |          | $Y_3$<br>(mg acid ascorbic/g chất khô) |          |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------------------|----------|--------------------------|----------|----------------------------------------|----------|
|                               |                 |                 | Thực nghiệm                         | Ước đoán | Thực nghiệm              | Ước đoán | Thực nghiệm                            | Ước đoán |
| 1                             | 0               | -1              | 5,52                                | 7,71     | 3,16                     | 3,13     | 2,75                                   | 2,90     |
| 0                             | 1               | -1              | 8,10                                | 7,82     | 2,75                     | 2,82     | 5,01                                   | 4,92     |
| 0                             | 0               | 0               | 19,93                               | 19,74    | 7,78                     | 7,66     | 14,37                                  | 14,45    |
| -1                            | 1               | 0               | 5,21                                | 5,72     | 2,65                     | 2,63     | 5,10                                   | 5,17     |
| 0                             | 0               | 0               | 19,90                               | 19,74    | 7,65                     | 7,66     | 14,40                                  | 14,45    |
| 0                             | 0               | 0               | 20,02                               | 19,74    | 7,58                     | 7,66     | 14,34                                  | 14,45    |
| 0                             | -1              | -1              | 3,38                                | 3,40     | 1,73                     | 1,73     | 2,33                                   | 2,25     |
| 1                             | -1              | 0               | 6,32                                | 5,81     | 3,63                     | 3,65     | 4,24                                   | 4,17     |
| -1                            | 0               | 1               | 5,14                                | 4,95     | 2,43                     | 2,46     | 3,67                                   | 3,52     |
| 0                             | 0               | 0               | 18,94                               | 19,74    | 7,68                     | 7,66     | 14,43                                  | 14,45    |
| 1                             | 1               | 0               | 10,14                               | 10,23    | 5,31                     | 5,27     | 7,61                                   | 7,55     |
| -1                            | -1              | 0               | 4,13                                | 4,04     | 2,48                     | 2,52     | 4,95                                   | 5,01     |
| 0                             | 0               | 0               | 19,93                               | 19,74    | 7,59                     | 7,66     | 14,69                                  | 14,45    |
| -1                            | 0               | -1              | 5,01                                | 4,78     | 1,56                     | 1,52     | 5,05                                   | 5,08     |
| 1                             | 0               | 1               | 10,06                               | 10,29    | 4,57                     | 4,62     | 7,27                                   | 7,24     |
| 0                             | 1               | 1               | 9,16                                | 8,84     | 3,81                     | 3,81     | 5,32                                   | 5,41     |
| 0                             | -1              | 1               | 6,88                                | 7,16     | 3,24                     | 3,17     | 4,45                                   | 4,54     |

Từ kết nghiệm tối ưu hóa trình bày ở bảng 3.5 cho thấy:

#### **\* Về hàm lượng polyphenol**

Kết quả thực nghiệm tối ưu hóa cho thấy hàm mục tiêu hàm lượng polyphenol ( $Y_1$ ) có trong dịch chiết thu nhận từ rau má thìa dao động trong khoảng  $3,38 \div 20,02$  (mg acid galic/g chất khô) và giá trị trung bình là  $10,44$  mg acid galic/g chất khô. Phương trình hồi quy hàm lượng polyphenol  $Y_1$  có độ lệch chuẩn (SD) là  $0,52$ , hệ số hồi qui ( $R^2$ ) là  $0,997$ , hệ số hồi qui điều chỉnh ( $Adj-R^2$ ) là  $0,993$ , điều đó cho thấy mô hình này có ý nghĩa ( $p < 0,01$ ). Dữ liệu phân tích cũng chỉ ra hàm lượng polyphenol trong dịch chiết rau má thìa tuân theo mô hình bậc 2, phụ thuộc mạnh vào các yếu tố tác động đến quá trình chiết với xác suất  $p < 0,01$  và sự tương quan giữa các biến trong hàm mục tiêu có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Kết quả phân tích cho thấy phương trình hồi quy của hàm lượng polyphenol thu nhận từ rau má thìa như sau:

$$Y_1 = 19,74 + 1,57X_1 + 1,53X_2 + 1,19X_3 + 0,69X_1X_2 + 1,1X_1X_3 - 0,69X_2X_3 - 6,83X_1^2 - 6,46X_2^2 - 6,48X_3^2$$

#### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Kết quả thực nghiệm tối ưu hóa cũng cho thấy hàm mục tiêu hàm lượng chlorophyll ( $Y_2$ ) của dịch chiết thu nhận từ rau má thìa dao động trong khoảng  $1,56 \div 7,78$  (mg/g chất khô) và giá trị trung bình là  $4,45$  mg/g chất khô. Phương trình hồi quy hàm lượng chlorophyll  $Y_2$  có độ lệch chuẩn (SD) là  $0,08$ , hệ số hồi qui ( $R^2$ ) là  $0,998$ , hệ số hồi qui điều chỉnh ( $Adj-R^2$ ) là  $0,997$ , điều này xác nhận rằng mô hình này có ý nghĩa ( $p < 0,01$ ). Dữ liệu phân tích cũng chỉ ra hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết rau má thìa tuân theo mô hình bậc 2, phụ thuộc vào các yếu tố tác động đến quá trình chiết với xác suất  $p < 0,01$  và sự tương quan giữa các biến trong hàm mục tiêu có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Kết quả phân tích cho thấy phương trình hồi quy về hàm lượng chlorophyll thu nhận từ rau má thìa như sau:

$$Y_2 = 7,66 + 0,94X_1 + 0,43X_2 + 0,61X_3 + 0,38X_1X_2 + 0,14X_1X_3 - 0,11X_2X_3 - 2,05X_1^2 - 2,09X_2^2 - 2,68X_3^2$$

#### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Kết quả thực nghiệm tối ưu hóa cũng cho thấy hàm mục tiêu hoạt tính chống oxy hóa tổng ( $Y_3$ ) của dịch chiết thu nhận từ rau má thìa dao động trong khoảng  $2,33 \div 14,69$

(mg acid ascorbic/g chất khô) và giá trị trung bình là 7,65 mg acid ascorbic/g chất khô. Phương trình hồi quy hoạt tính chống oxy hóa tổng  $Y_3$  có độ lệch chuẩn (SD) là 0,16, hệ số hồi qui ( $R^2$ ) là 0,998, hệ số hồi qui điều chỉnh ( $Adj-R^2$ ) là 0,997, điều này cho thấy rằng mô hình này có ý nghĩa ( $p < 0,01$ ). Dữ liệu phân tích cũng chỉ ra hoạt tính chống oxy hóa tổng trong dịch chiết rau má thay đổi theo mô hình bậc 2, phụ thuộc vào các yếu tố tác động đến quá trình chiết với xác suất  $p < 0,01$  và sự tương quan giữa các biến trong hàm mục tiêu có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Kết quả tối ưu hóa cũng cho thấy có phương trình hồi quy về hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết thu nhận từ rau má là như sau:

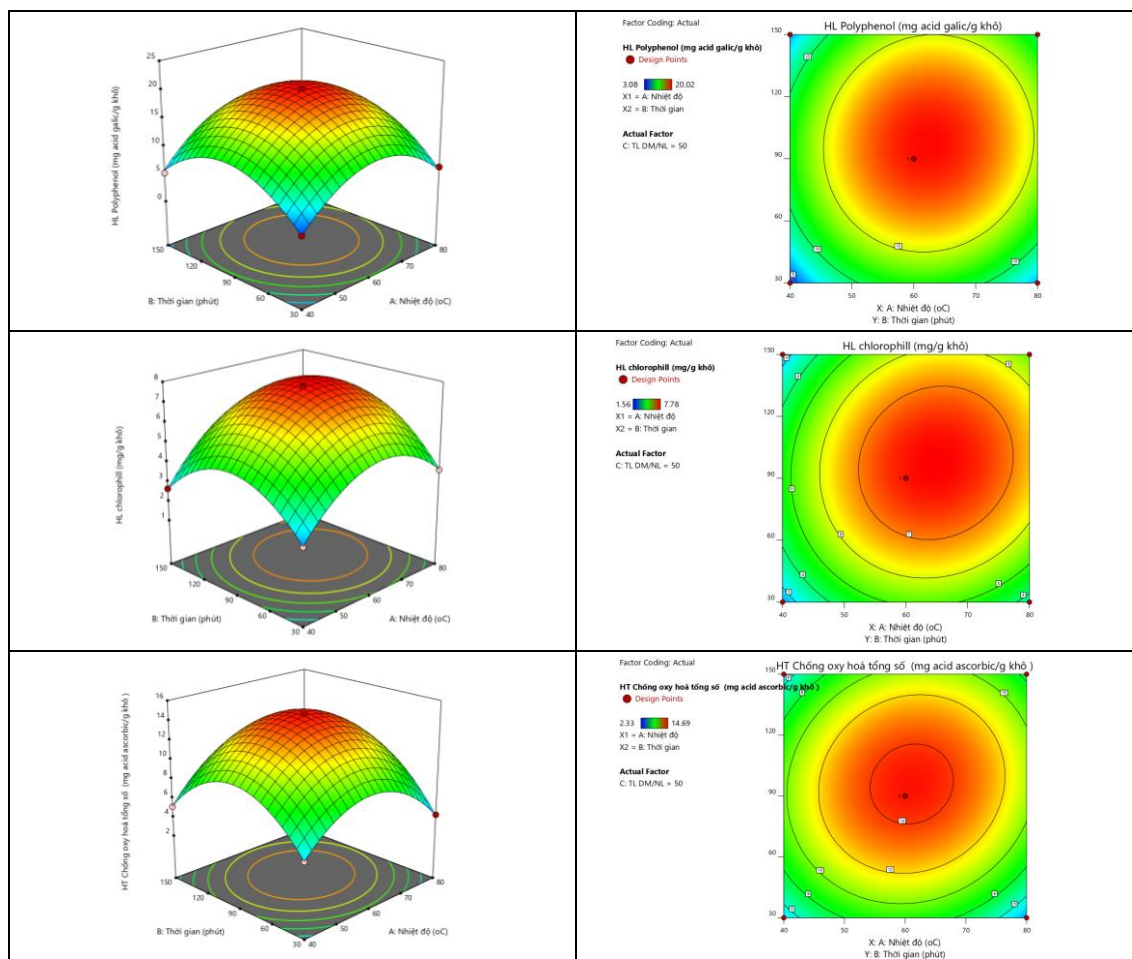
$$Y_3 = 14,45 + 0,39X_1 + 0,88X_2 + 0,70X_3 + 0,81X_1X_2 + 1,48X_1X_3 - 0,45X_2X_3 - 4,28X_1^2 - 4,69X_2^2 - 5,48X_3^2$$

Phân tích giá trị thống kê cho thấy mô hình bậc 2 là phù hợp và có tác động mạnh lên xu thế biến đổi của các hàm mục tiêu dưới tác động của các yếu tố ảnh hưởng. Hệ số ý nghĩa của các mô hình mục tiêu đều có giá trị thống kê ( $p < 0,05$ ) và độ không tương thích của mô hình là không có ý nghĩa (bảng 3.6). Các mô hình mục tiêu  $Y_1$ ,  $Y_2$  và  $Y_3$  có giá trị F biến đổi từ 275,37 đến 1.588,59, tương ứng với các giá trị p đều nhỏ hơn 0,0001, điều này cho thấy các mặt đáp ứng theo mô hình Box-Behnken là phù hợp.

**Bảng 3.6. Hệ số ý nghĩa của mô hình mục tiêu**

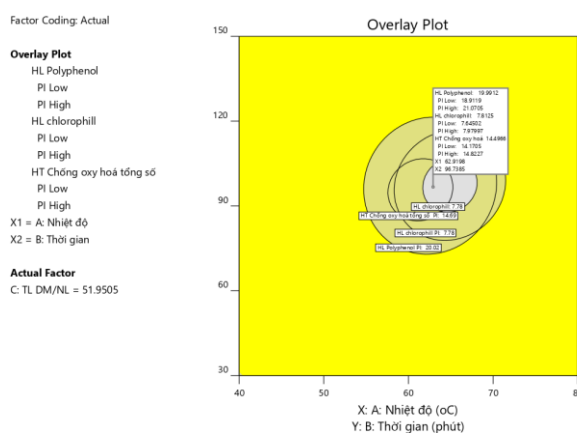
| Mô hình                                     | Hàm mục tiêu | Tổng bình phương | Trung bình bình phương | F        | p       |
|---------------------------------------------|--------------|------------------|------------------------|----------|---------|
| Bề mặt đáp ứng bậc 2                        | $Y_1$        | 671,86           | 74,65                  | 275,37   | <0,0001 |
|                                             | $Y_2$        | 86,18            | 9,58                   | 1.466,85 | <0,0001 |
|                                             | $Y_3$        | 353,95           | 39,33                  | 1.588,59 | <0,0001 |
| Độ không phù hợp của mô hình (Lack off fit) | $Y_1$        | 1,08             | 0,36                   | 1,77     | 0,2922  |
|                                             | $Y_2$        | 0,02             | 0,0065                 | 0,999    | 0,4792  |
|                                             | $Y_3$        | 0,09             | 0,0315                 | 1,59     | 0,3236  |

Phân tích độ không phù hợp của mô hình cũng thấy rằng, tất cả độ không phù hợp của mô hình đều không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ), điều này đã thỏa mãn tính phù hợp của mô hình. Sự tác động của các nhân tố đầu vào  $X_1$ ,  $X_2$  và  $X_3$  đến các hàm mục tiêu  $Y_1$ ,  $Y_2$  và  $Y_3$  là tương đồng, thể hiện qua giá trị p nhỏ ( $p < 0,05$ ).



**H ình 3.17. C ác mặt đáp ứng tối ưu thực nghiệm**

Giải các phương trình hồi quy xác định được giá trị tối ưu của các biến ( $X_1$ ,  $X_2$  và  $X_3$ ). Dữ liệu được tính toán trên phần mềm Design Expert 12 và tính toán trùng lặp các mặt đáp ứng (h ình 3.17) để tìm điểm tối ưu tiên đoán (h ình 3.18) với nhiệt độ  $X_1$  (62,92°C), thời gian  $X_2$  (96,74 phút), tỷ lệ DM/NL  $X_3$  (51,95/1 ml/g) và các hàm mục tiêu tiên đoán (h ình 3.18) với hàm lượng polyphenol  $Y_1$  (19,99 mg acid galic/g chất khô), hàm lượng chlorophyll  $Y_2$  (7,81 mg/g chất khô), hoạt tính chống oxy hóa tổng  $Y_3$  (14,50 mg acid ascorbic/g chất khô).



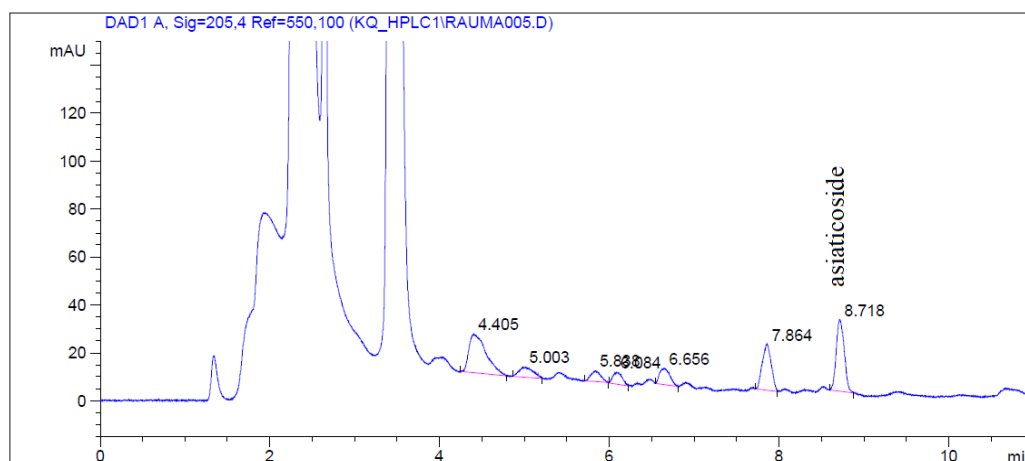
**H ình 3.18. Bề mặt tối ưu trùng lặp các mặt đáp ứng**

Tiến hành thực nghiệm lặp lại 3 lần ở điều kiện nhiệt độ  $X_1$  ( $63^\circ\text{C}$ ), thời gian  $X_2$  (97 phút) và tỷ lệ DM/NL  $X_3$  (52/1 ml/g) và giá trị các hàm mục tiêu thực nghiệm với hàm lượng polyphenol  $Y_1$  ( $19,18 \pm 0,72$  mg acid galic/g chất khô), hàm lượng chlorophyll  $Y_2$  ( $7,45 \pm 0,16$  mg/g chất khô) và hoạt tính chống oxy hóa tổng  $Y_3$  ( $13,81 \pm 0,31$  mg acid ascorbic/g chất khô).

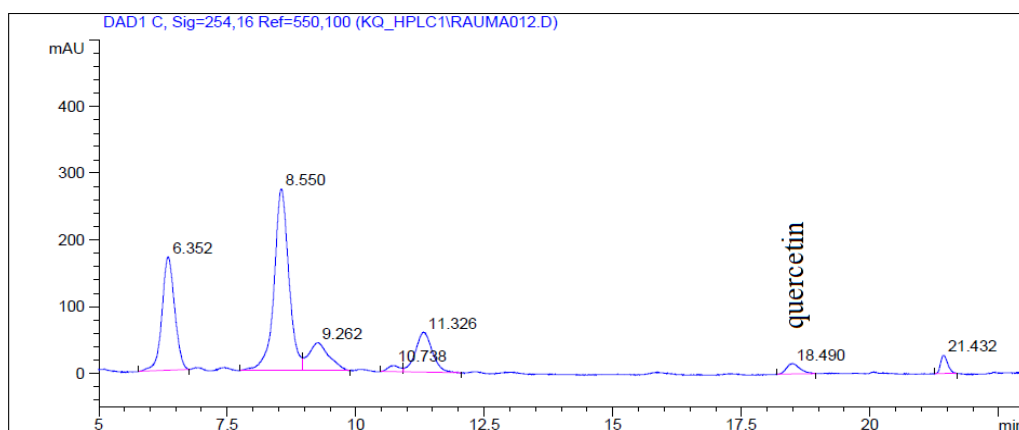
Từ kết quả tối ưu hóa thực nghiệm chiết rút các chất từ rau má thà cho phép chọn điều kiện chiết tối ưu cho công đoạn chiết rút polyphenol, chlorophyll với hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thà bằng phương pháp chiết hỗ trợ sóng siêu âm: sử dụng ethanol 95%, nhiệt độ chiết  $63^\circ\text{C}$ , thời gian chiết 97 phút và tỷ lệ DM/NL 52/1 ml/g. Dịch chiết ở điều kiện tối ưu có hoạt tính khử sắt và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH lần lượt đạt mức tương ứng là  $37,31 \pm 1,32$  mg  $\text{FeSO}_4$ /g chất khô và  $81,66 \pm 3,4\%$ .

*Từ kết quả tối ưu hóa và thực nghiệm kiểm chứng ở trên cho thấy điều kiện tối ưu để thu được dịch chiết có hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất cùng hàm lượng chlorophyll ở mức cao từ rau má thà thu mẫu tại Nha Trang – Khánh Hòa: nhiệt độ chiết tối ưu  $63^\circ\text{C}$ , thời gian chiết tối ưu 97 phút và tỷ lệ DM/NL tối ưu 52/1 ml/g. Khi chiết rút các hợp chất từ rau má thà ở điều tối ưu trên, dịch chiết thu nhận từ rau má thà có hàm lượng polyphenol là  $19,18 \pm 0,72$  mg acid galic/g chất khô, hàm lượng chlorophyll là  $7,45 \pm 0,16$  mg/g chất khô, hoạt tính chống oxy hóa tổng  $13,81 \pm 0,31$  mg acid ascorbic/g chất khô, hoạt tính khử sắt  $37,31 \pm 1,32$  mg  $\text{FeSO}_4$ /g chất khô và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH  $81,66 \pm 3,4\%$ .*

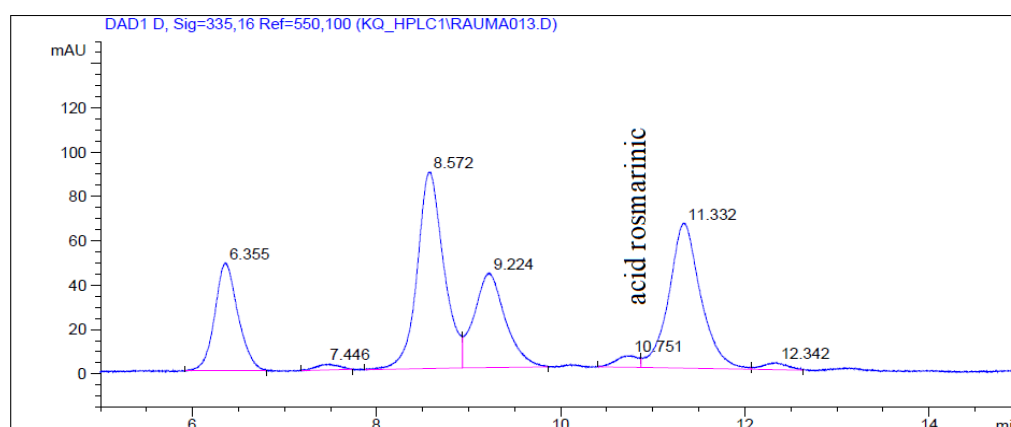
Ngoài ra, luận án cũng phân tích một số hợp chất có hoạt tính sinh học khác có trong dịch chiết rau má thà ở điều kiện tối ưu bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, kết quả phân tích được trình bày ở hình 3.19, 3.20 và 3.21.



**Hình 3.19. Sắc ký đồ HPLC phân tích asiaticoside trong dịch chiết rau má**



**H ình 3.20. Sắc ký đồ HPLC phân tích quercetin trong dịch chiết rau má**

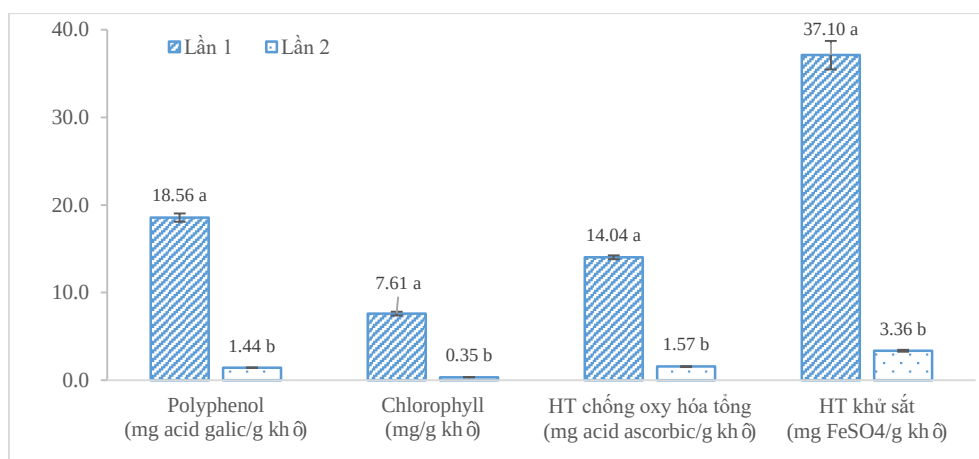


**H ình 3.21. Sắc ký đồ HPLC phân tích acid rosmarinic trong dịch chiết rau má**

Kết quả phân tích HPLC cho thấy dịch chiết rau má thu mẫu tại Nha Trang - Khánh Hòa bằng phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm sử dụng dung môi ethanol 95% ở điều kiện tối ưu đã thu nhận được ngò ã polyphenol, chlorophyll còn chứa một số hợp chất sinh học khác như là asiaticoside với hàm lượng 1,76 mg/g chất khô quercetin với hàm lượng 0,14 mg/g chất khô và acid rosmarinic với hàm lượng 0,10 mg/g chất khô. Do mục tiêu của luận án chỉ tập trung vào nghiên cứu chiết rút và thu nhận dịch chiết chứa polyphenol và chlorophyll với hàm lượng và hoạt tính cao và do thời gian, kinh phí có hạn nên luận án không thể đi sâu phân tích về các chất trên. Khi có điều kiện, nghiên cứu sinh sẽ tiếp tục nghiên cứu về các hợp chất đã phát hiện ở trên.

#### **\* Xác định số lần chiết**

Tiến hành thí nghiệm chiết polyphenol, chlorophyll với hoạt tính chống oxy hóa ở điều kiện chiết tối ưu. Xác định hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết thu được qua 2 lần chiết liên tục nhằm thu kiệt các chất polyphenol, chlorophyll khỏi rau má thu mẫu. Kết quả được trình bày ở hình 3.22.



**Hình 3.22. Ảnh hưởng số lần chiết đến hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết rau má**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.22 cho thấy ở điều kiện chiết tối ưu thì hàm lượng polyphenol trong dịch chiết rau má lần 1 là  $18,56 \pm 0,48$  mg acid galic/g chất khô và lần 2 là  $1,44 \pm 0,03$  mg acid galic/g chất khô. Dịch chiết rau má lần 1 có hàm lượng polyphenol chiếm 76,77% và dịch chiết rau má lần 2 chỉ chiếm 5,96% so với tổng hàm lượng polyphenol có trong rau má là (24,18 mg acid galic/g chất khô). Tương tự, theo kết quả phân tích ở hình 3.22 cũng cho thấy, hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết rau má lần 1 là  $7,61 \pm 0,23$  mg/g chất khô và lần 2 là  $0,35 \pm 0,02$  mg/g chất khô, tương ứng chiếm 81,30% và 3,74% so với tổng hàm lượng chlorophyll có trong rau má là (9,36 mg/g chất khô).

Luận án cũng xác định các hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết rau má ở 2 lần chiết, kết quả được thể hiện trên hình 3.22. Cụ thể, hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết rau má lần 1 là  $14,04 \pm 0,21$  mg acid ascorbic/g chất khô và lần 2 là  $1,57 \pm 0,05$  mg acid ascorbic/g chất khô, hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết rau má lần 2 bằng 11,18% so với hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết lần 1. Hơn nữa, hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má lần 1 là  $37,10 \pm 1,62$  mg FeSO<sub>4</sub>/g chất khô và lần 2 là  $3,36 \pm 0,11$  mg FeSO<sub>4</sub>/g chất khô, hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thu nhận được ở lần chiết 2 bằng 9,06% so với hoạt tính khử sắt của dịch chiết rau má thu nhận được ở lần chiết 1.

*Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy, ở điều kiện chiết tối ưu thì hàm lượng polyphenol và hàm lượng chlorophyll có trong dịch chiết rau má lần 2 không đáng kể (polyphenol là 5,96% và chlorophyll là 3,74%) so với tổng hàm lượng các hợp chất tương ứng có trong rau má thìa. Hơn nữa, các hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết*

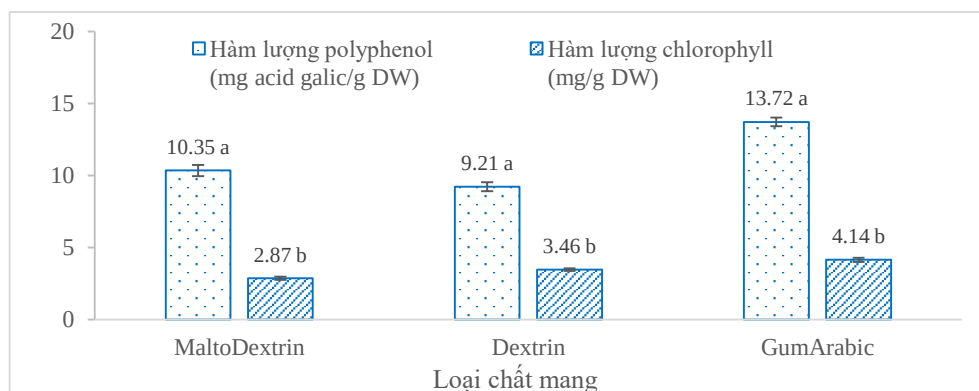
rau má lần 2 cũng có tỷ lệ thấp (hoạt tính chống oxy hóa tổng là 11,18% và hoạt tính khử sắt là 9,06%) so với các hoạt tính tương ứng của dịch chiết rau má lần 1. Trong quá trình chiết, nếu thực hiện chiết 2 lần để thu nhận các hợp chất sinh học có hoạt tính chống oxy hóa thì sẽ tốn chi phí nhiều hơn về nhân công, dung môi ethanol và nhiều chi phí khác trong khi hàm lượng các hợp chất thu nhận được và các hoạt tính chống oxy hóa trong lần chiết 2 thì không đáng kể. Do vậy, để đảm bảo tính kinh tế, luận án quyết định chỉ chiết các hợp chất polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thu nhận tại Nha Trang – Khánh Hòa trong 1 lần chiết. Hiệu suất chiết polyphenol và chlorophyll từ rau má thu tương ứng với 1 lần chiết lần lượt là 76,77% và 81,30%.

### 3.3. NGHIÊN CỨU SẤY PHUN TẠO BỘT RAU MÁ THÀ CHỨA POLYPHENOL VÀ CHLOROPHYLL

#### 3.3.1. Xác định thông số sấy phun tạo bột rau má thà

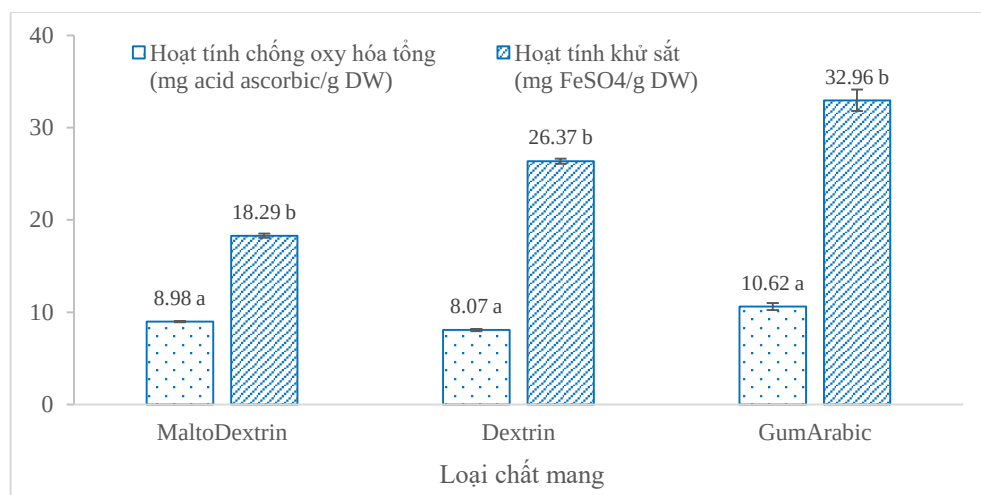
##### 3.3.1.1. Xác định chất mang

Tiến hành thí nghiệm sấy phun thu bột rau má thà chứa polyphenol và chlorophyll với hoạt tính chống oxy hóa sử dụng 3 loại chất mang khác nhau gồm: maltodextrin, dextrin và gum arabic có nồng độ là 100 g/l với áp suất kh ín ín 2 kg/cm<sup>2</sup> ở nhiệt độ sấy 140°C với tốc độ đĩa phun 20.000 v/p và lưu lượng nhập liệu 15 ml/p. Quá trình sấy phun sử dụng dịch chiết rau má thu nhận theo các thông số tối ưu đã nghiên cứu và được cô đặc ở điều kiện chân không ở nhiệt độ 60°C với áp suất chân không 75mBar và nhiệt ngưng tụ 5°C đến khi dịch chiết đạt được nồng độ chất khô 18°Bx. Sau khi sấy phun thu bột rau má thà, lấy mẫu xác định hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, các hoạt tính chống oxy hóa và kích thước hạt, đặc tính nhiệt vi sai. Kết quả được trình bày ở các hình 3.23 ÷ 3.34 và các bảng 3.7 ÷ 3.9.



**Hình 3.23. Ảnh hưởng của chất mang đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong bột rau má**

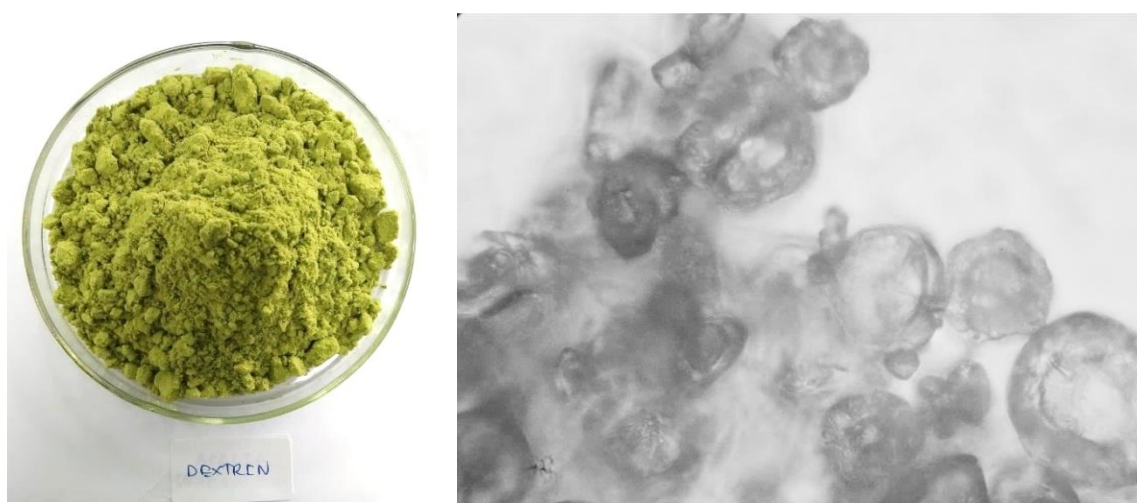




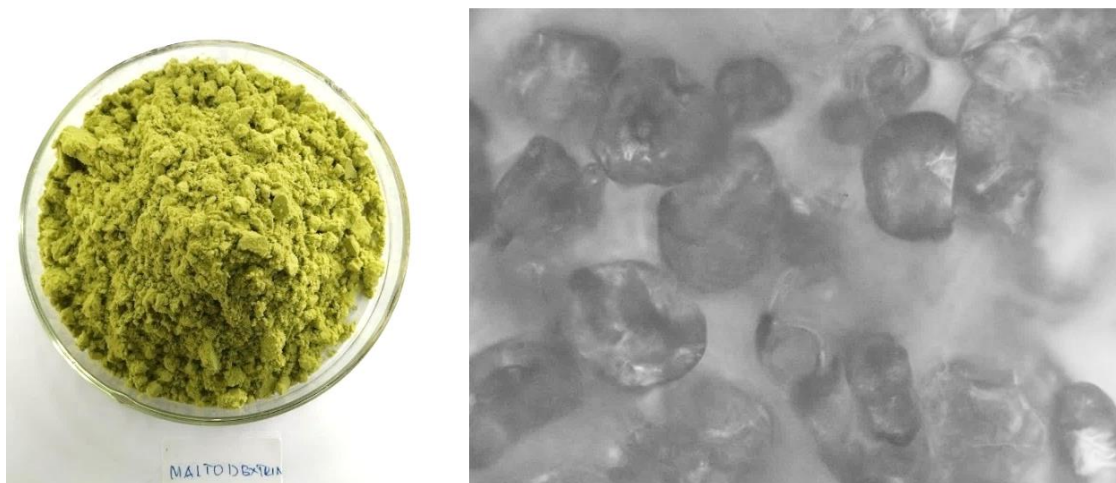
**Hình 3.24. Ảnh hưởng của chất mang đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của bột rau má**



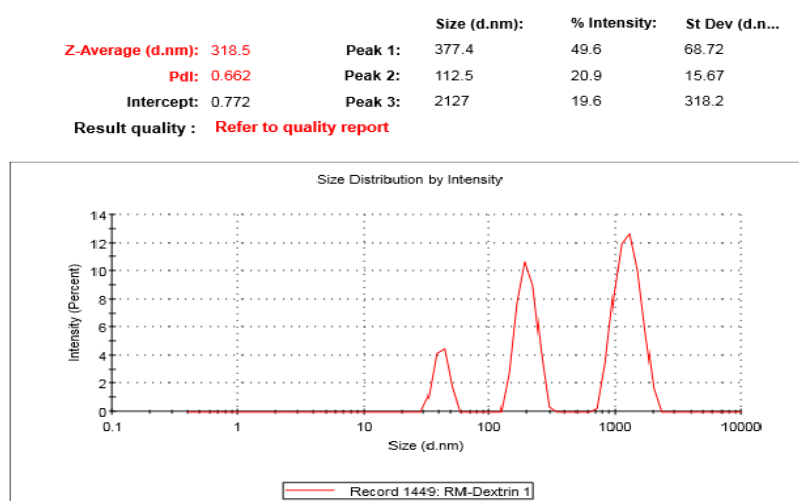
**Hình 3.25. Hình ảnh bột rau má với chất mang gum arabic dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1.000x**



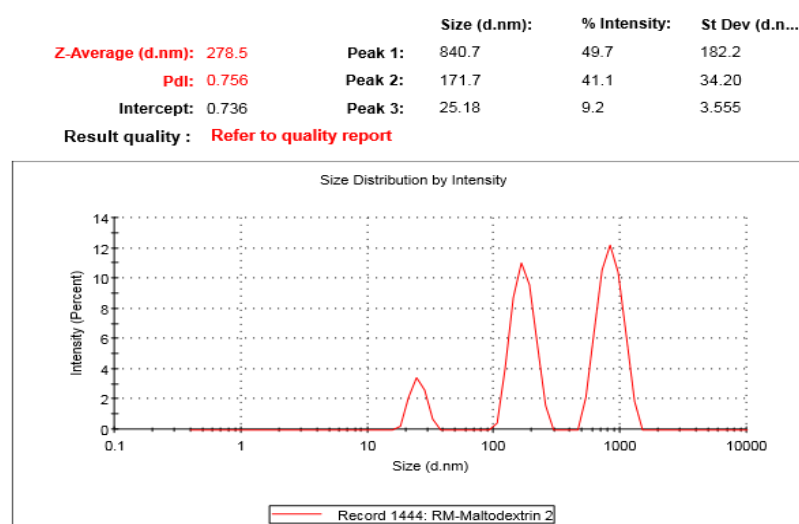
**Hình 3.26. Hình ảnh bột rau má với chất mang dextrin dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1.000x**



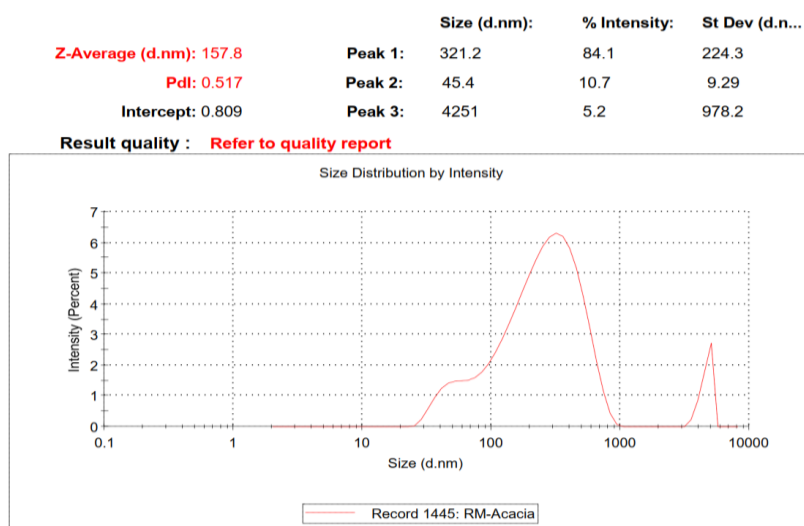
Hình 3.27. Hình ảnh bột rau má với chất mang maltodextrin dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1.000x



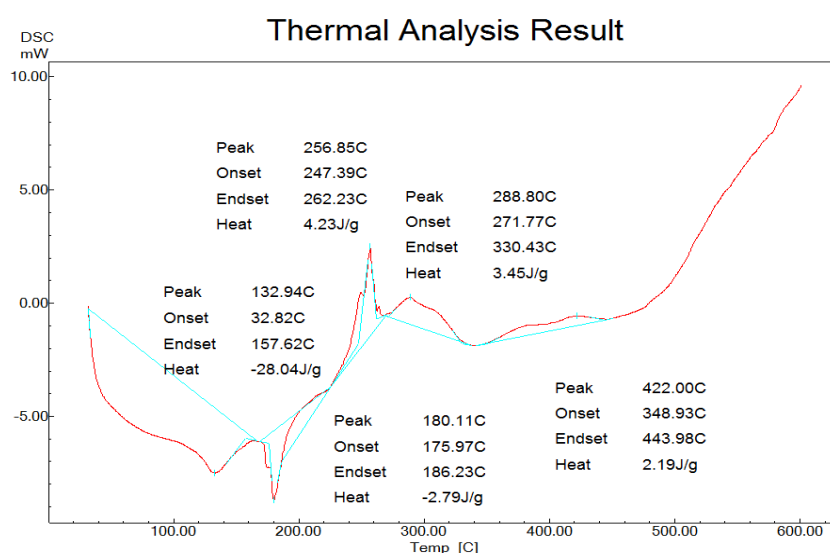
Hình 3.28. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má với chất mang dextrin



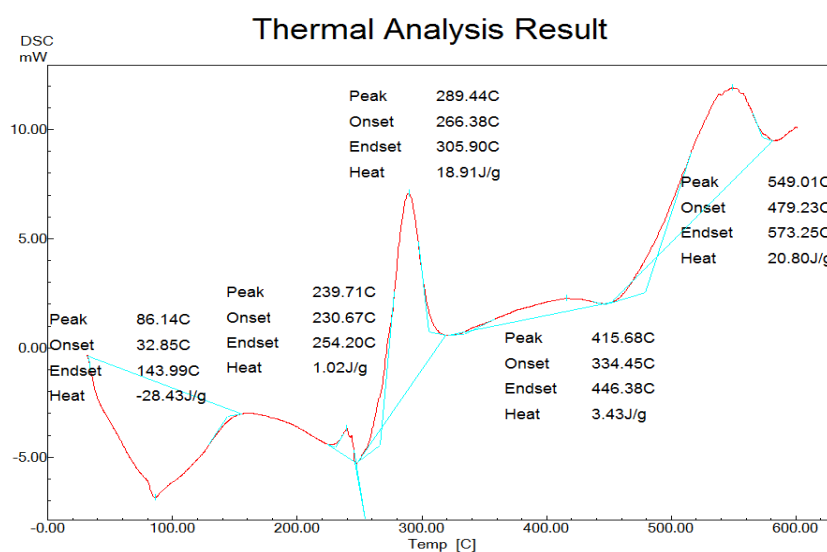
Hình 3.29. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má với chất mang maltodextrin



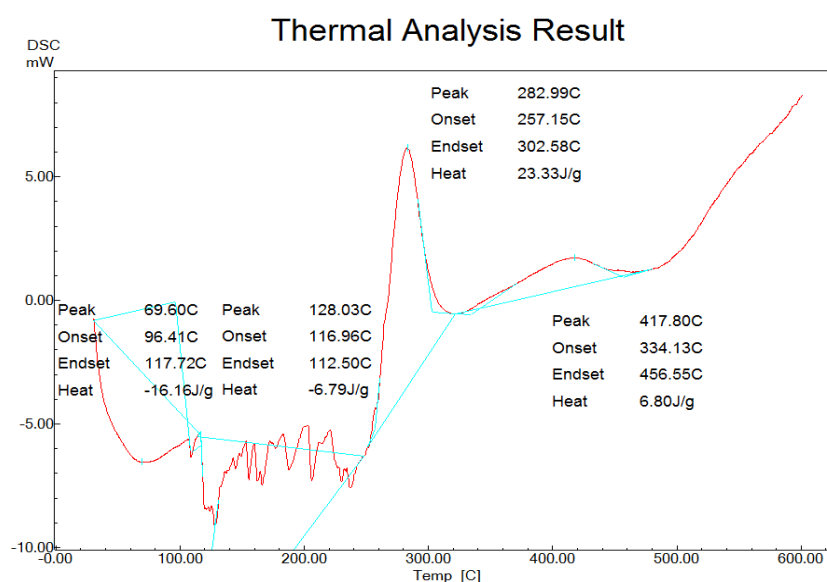
**H ình 3.30. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má với chất mang gum arabic**



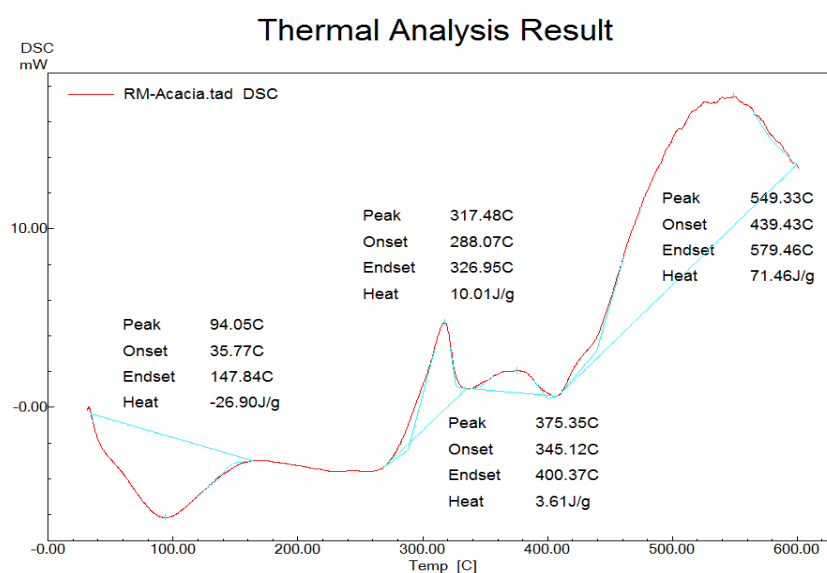
**H ình 3.31. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má không có chất mang**



**H ình 3.32. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má với chất mang dextrin**



**H ình 3.33. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má với chất mang maltodextrin**



**H ình 3.34. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má với chất mang gum arabic**

**Bảng 3.7. Độ tan và đặc t ình của bột rau má với các loại chất mang**

| STT | Loại bột                              | Độ tan | Màu sắc, trạng thái                  | Kiểu bao phủ của chất mang          |
|-----|---------------------------------------|--------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 1   | Bột rau má với chất mang gum arabic   | Dễ tan | Màu xanh tươi sáng, bột mịn, tơi xốp | Hoạt chất được bao phủ vào giữa hạt |
| 2   | Bột rau má với chất mang dextrin      | Dễ tan | Màu xanh hơi đậm, bột thô, tơi xốp   | Hoạt chất liên kết trong thành hạt  |
| 3   | Bột rau má với chất mang maltodextrin | Dễ tan | Màu xanh sẫm, bột thô, vón nhẹ       | Hoạt chất liên kết bề mặt thành hạt |

**Bảng 3.8. Kích thước và độ đa phân tán của bột rau má với các loại chất mang**

| STT | Loại bột                              | Kích thước hạt trung bình (nm) | Chỉ số đa phân tán (Pdi) |
|-----|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 1   | Bột rau má với chất mang gum arabic   | 157,8                          | 0,517                    |
| 2   | Bột rau má với chất mang dextrin      | 318,5                          | 0,662                    |
| 3   | Bột rau má với chất mang maltodextrin | 278,5                          | 0,756                    |

**Bảng 3.9. Kết quả phân tích nhiệt vi sai của bột rau má với các loại chất mang**

| STT | Loại bột                              | Nhiệt độ (°C)              |                                    |                                      |                                    |
|-----|---------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
|     |                                       | Mất nước (T <sub>m</sub> ) | Đứt gãy liên kết (T <sub>d</sub> ) | Phân hủy nhóm chức (T <sub>n</sub> ) | Phân hủy phân tử (T <sub>p</sub> ) |
| 1   | Mẫu đối chứng                         | 132,94                     | 180,11                             | 256,85 và 288,80                     | 422                                |
| 2   | Bột rau má với chất mang gum arabic   | 94,05                      | -                                  | 317,48 và 375,35                     | 549,33                             |
| 3   | Bột rau má với chất mang dextrin      | 86,14                      | -                                  | 289,44 và 415,68                     | 549,01                             |
| 4   | Bột rau má với chất mang maltodextrin | 69,60                      | 128,03                             | 282,99 và 417,08                     | -                                  |

Từ các kết quả trình bày ở hình 3.23 ÷ 3.34 và bảng 3.7 ÷ 3.9 cho thấy:

#### **\* Về hàm lượng polyphenol**

Kết quả phân tích ở hình 3.23 cho thấy loại chất mang sử dụng có ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol có trong bột rau má thành tạo thành sau sấy phun. Hàm lượng polyphenol trong bột rau má giảm dần theo loại chất mang được bổ sung trong quá trình sấy phun là gum arabic, maltodextrin và dextrin. Cụ thể, hàm lượng polyphenol trong bột rau má sử dụng chất mang gum arabic cao nhất là  $13,72 \pm 0,31$  mg acid galic/g. Bột rau má sử dụng chất mang là maltodextrin và dextrin có hàm lượng polyphenol là  $10,35 \pm 0,39$  mg acid galic/g và  $9,21 \pm 0,24$  mg acid galic/g, tương ứng bằng 75,44% và 67,13% so với hàm lượng polyphenol có trong bột sấy sử dụng chất mang gum arabic.

Kết quả này có thể lý giải là gum arabic có cấu trúc polyme, phân tử dạng phân nhánh đều trong không gian, trong phân tử có chứa nhiều nhóm hydroxyl (-OH) và cacboxyl (-COOH) nên dễ liên kết với các nhóm hoạt tính trong cấu trúc của polyphenol và có thể gắn kết với polyphenol tốt hơn maltodextrin và dextrin - đây là hai chất mang trong cấu trúc chỉ chứa nhóm hydroxyl (-OH). Do vậy, khi sử dụng gum arabic làm chất mang thì hàm lượng polyphenol có trong bột rau má thìa cao hơn khi sử dụng chất mang maltodextrin và dextrin.

*Từ các phân tích ở trên cho thấy trong 3 loại chất mang mà luận án đã khảo sát thì gum arabic giúp tạo bột rau má có hàm lượng polyphenol cao nhất. Do vậy, khi xét theo hàm lượng polyphenol cao, luận án chọn gum arabic làm chất mang cho quá trình sấy phun tạo bột rau má thìa.*

#### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Kết quả phân tích ở hình 3.23 cho thấy hàm lượng chlorophyll trong bột rau má thìa cũng chịu ảnh hưởng bởi các loại chất mang được sử dụng trong quá trình sấy phun. Cụ thể, hàm lượng chlorophyll trong bột rau má thìa giảm dần theo trình tự các chất mang được bổ sung khác nhau trong quá trình sấy phun là gum arabic, dextrin và maltodextrin. Trong đó hàm lượng chlorophyll trong bột rau má sử dụng chất mang gum arabic cao nhất là  $4,14 \pm 0,14$  mg/g. Bột rau má sử dụng chất mang là dextrin và maltodextrin có hàm lượng chlorophyll là  $3,46 \pm 0,09$  mg/g và  $2,87 \pm 0,11$  mg/g, tương ứng bằng 83,58% và 69,32% so với hàm lượng chlorophyll có trong bột rau má thìa sử dụng chất mang gum arabic.

*Từ các phân tích ở trên cho thấy trong 3 loại chất mang đã sử dụng thì gum arabic là chất mang giúp tạo bột rau má có hàm lượng chlorophyll cao nhất. Do vậy, gum arabic nên được lựa chọn làm chất mang cho quá trình sấy phun thu bột rau má chứa chlorophyll.*

#### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Kết quả phân tích ở hình 3.24 cho thấy loại chất mang có ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má thìa thu được qua quá trình sấy phun. Cụ thể, hoạt tính chống oxy hóa tổng của mẫu bột rau má sử dụng chất mang gum arabic đạt mức cao nhất là  $10,62 \pm 0,38$  mg acid ascorbic/g. Bột rau má sử dụng chất mang là maltodextrin và dextrin có hoạt tính chống oxy hóa tổng là  $8,98 \pm 0,07$  mg/g và  $8,07 \pm 0,13$

mg/g, tương ứng bằng 84,55% và 75,99% so với bột rau má sử dụng chất mang gum arabic.

*Từ các phân tích ở trên cho thấy sử dụng chất mang gum arabic sẽ giúp tạo bột rau má thích hợp sau sấy phun có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao nhất. Do vậy, gum arabic là chất mang phù hợp cho quá trình sấy phun thu bột rau má thích hợp chứa các hợp chất sinh học có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao.*

#### **\* Về hoạt tính khử sắt**

Kết quả phân tích ở hình 3.24 cho thấy hoạt tính khử sắt của bột rau má thích hợp chịu ảnh hưởng bởi các loại chất mang được sử dụng trong quá trình sấy phun. Cụ thể, hoạt tính khử sắt của mẫu rau má thích hợp sử dụng chất mang gum arabic cao nhất là  $32,96 \pm 1,16$  mg FeSO<sub>4</sub>/g. Bột rau má thích hợp sử dụng chất mang là dextrin và maltodextrin có hoạt tính khử sắt là  $26,37 \pm 0,28$  mg/g và  $18,29 \pm 0,22$  mg/g, tương ứng bằng 80,00% và 55,49% so với bột rau má sử dụng chất mang gum arabic.

*Từ các phân tích ở trên cũng cho thấy gum arabic là chất mang phù hợp cho quá trình sấy phun thu nhận bột rau má thích hợp chứa các hợp chất sinh học có hoạt tính khử sắt cao.*

#### **\* Về đặc tính bột**

Kết quả phân tích ở các hình 3.25 ÷ 3.27 và bảng 3.7 cho thấy độ tan của bột rau má thích hợp khi sử dụng các chất mang là gum arabic, maltodextrin và dextrin đều dễ tan. Bột rau má sử dụng chất mang gum arabic có màu xanh tươi sáng, bột mịn, độ tơi xốp cao và hoạt chất được bao phủ vào giữa hạt. Bột rau má với chất mang là dextrin có màu xanh hơi đậm, bột thô, tơi xốp và hoạt chất được bao phủ, liên kết trong thành hạt. Bột rau má với chất mang là maltodextrin thì có màu xanh sẫm, bột thô, vón nhẹ và hoạt chất liên kết trên bề mặt hạt. Kết quả phân tích đặc tính bột rau má sấy phun cho thấy chất mang gum arabic có khả năng bao bọc và bảo vệ các hợp chất sinh học (polyphenol, chlorophyll) có trong dịch rau má tốt hơn các loại chất mang khác đã khảo sát.

Kết quả phân tích ở các hình 3.28 ÷ 3.30 và bảng 3.8 cũng cho thấy bột rau má thích hợp sử dụng chất mang gum arabic có kích thước hạt trung bình nhỏ nhất là 157,8 nm. Trong khi đó bột rau má thích hợp sử dụng chất mang dextrin thì kích thước hạt trung bình lớn nhất là 381,5nm, gấp 2,42 lần so với kích thước hạt trung bình của bột rau má sử dụng chất mang gum arabic.

dùng chất mang gum arabic và bột rau má sấy phun sử dụng chất mang maltodextrin thì kích thước hạt trung bình là 278,5nm, gấp 1,77 lần so với kích thước hạt trung bình của bột rau má sử dụng gum arabic. Mặt khác, kết quả phân tích chỉ số đa phân tán cho thấy bột rau má thì sử dụng chất mang gum arabic có chỉ số đa phân tán thấp nhất là 0,517. Trong khi đó, bột rau má thì sử dụng chất mang maltodextrin có chỉ số đa phân tán cao nhất là 0,756 và bột rau má thì sử dụng chất mang dextrin có chỉ số đa phân tán là 0,662. Như vậy, sử dụng gum arabic làm chất mang tạo được bột rau má chứa chlorophyll, polyphenol có kích thước hạt trung bình nhỏ nhất nhưng hạt có mức độ đồng đều thấp hơn các loại chất mang khác đã sử dụng. Ngoài ra, kết quả phân tích còn cho thấy bột rau má thì sử dụng chất mang gum arabic dễ tan nhất so với bột rau má thì sử dụng các loại chất mang khác như dextrin hoặc maltodextrin.

Kết quả phân tích nhiệt vi sai hình 3.31 cho thấy bột rau má thì khi không dùng chất mang có peak thu nhiệt  $T_m$  ở 132,94°C thể hiện tại nhiệt độ này có sự mất nước hấp thụ trong phân tử bột rau má có peak thu nhiệt  $T_d$  ở 180,11°C - kết quả này thể hiện nhiệt độ có sự đứt gãy các liên kết có trong thành phần của bột rau má và có peak tỏa nhiệt  $T_n$  ở 256,85°C và 288,80°C thể hiện tại nhiệt độ này có sự phân hủy các nhóm chức chủ yếu có trong phân tử bột rau má. Ngoài ra còn có một peak tỏa nhiệt  $T_p$  ở 422°C là nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột rau má thì khi không sử dụng chất mang.

Bột rau má thì sử dụng chất mang dextrin (hình 3.32) có peak thu nhiệt  $T_m$  ở 86,14°C thể hiện tại nhiệt độ này có sự mất nước hấp thụ trong phân tử của bột rau má và không phát hiện thấy peak thu nhiệt  $T_d$  để làm phá hủy các liên kết có trong thành phần của bột rau má có peak tỏa nhiệt  $T_n$  ở 289,44°C và 415,68°C thể hiện tại các nhiệt độ này có sự phân hủy các nhóm chức chủ yếu có trong phân tử bột. Ngoài ra còn có một peak tỏa nhiệt  $T_p$  ở 549,01°C là nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột rau má.

Kết quả phân tích phổ nhiệt vi sai ở hình 3.33 cho thấy bột rau má thì sử dụng chất mang maltodextrin có peak thu nhiệt  $T_m$  ở 69,60 °C thể hiện tại nhiệt độ này có sự mất nước hấp thụ trong phân tử, có peak thu nhiệt  $T_d$  ở 128,03°C thể hiện tại nhiệt độ này có sự đứt gãy các liên kết có trong thành phần của bột, có peak tỏa nhiệt  $T_n$  ở 282,99°C và 417,08°C thể hiện tại các nhiệt độ này có sự phân hủy các nhóm chức chủ yếu có trong phân tử bột rau má và loại bột này không có peak tỏa nhiệt  $T_p$  - kết quả này



thể hiện không đo được nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột rau má. Kết quả này chứng tỏ khi sấy phun sử dụng chất mang maltodextrin thì độ bền nhiệt phân hủy bột tăng lên và có thể dự đoán rằng nhiệt độ để phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột rau má với chất mang là maltodextrin là trên 600°C.

Bột rau má thường sử dụng chất mang là gum arabic (hình 3.34) có peak thu nhiệt  $T_m$  ở 94,05°C thể hiện tại nhiệt độ này có sự mất nước hấp thụ trong phân tử bột rau má. Đối với loại bột này, không tìm thấy peak thu nhiệt  $T_d$  để làm phá hủy các liên kết có trong thành phần của bột, chứng tỏ không đo được nhiệt độ phân hủy bột rau má. Kết quả đo cũng cho thấy có peak tỏa nhiệt  $T_n$  ở 317,48°C và 375,35°C thể hiện tại các nhiệt độ này có sự phân hủy các nhóm chức chủ yếu có trong phân tử bột rau má. Ngoài ra còn có một peak tỏa nhiệt  $T_p$  ở 549,33°C là nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột rau má.

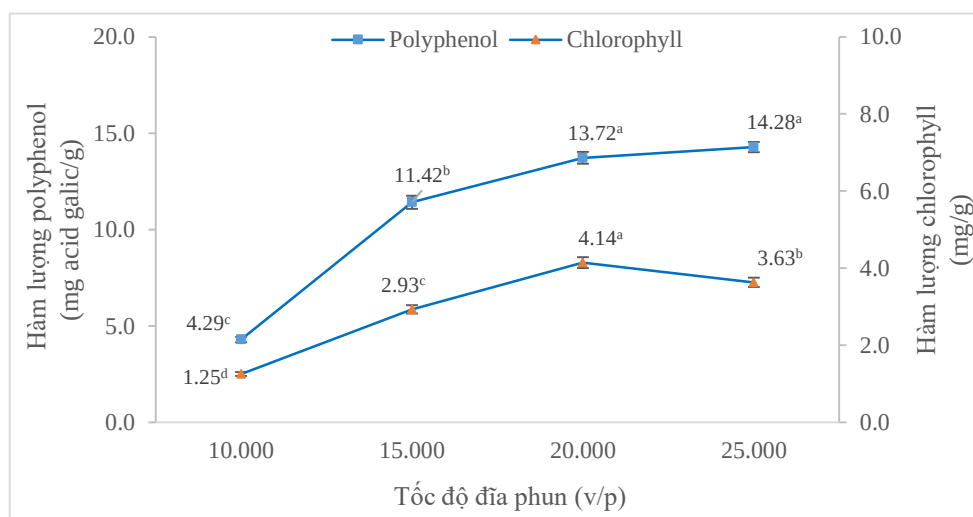
Từ kết quả phân tích nhiệt vi sai các mẫu bột rau má sử dụng các chất mang khác nhau cho thấy các loại bột rau má sử dụng chất mang khác nhau đều có nhiệt độ mất nước hấp thụ trong phân tử của bột thấp hơn so với nhiệt độ mất nước hấp thụ của bột rau má khi không sử dụng chất mang, chứng tỏ khi sử dụng chất mang thì bột rau má thu nhận được dễ khô, dễ tạo bột hơn. Mặt khác, kết quả phân tích cũng cho thấy các bột rau má sấy phun có chất mang có nhiệt độ gây đứt gãy các liên kết, nhiệt độ gây phân hủy các nhóm chức có trong thành phần của bột cao hơn mẫu bột rau má không sử dụng chất mang, chứng tỏ chất mang giúp cho các hợp chất sinh học được bảo vệ tốt hơn nên chúng có nhiệt độ gây đứt gãy các liên kết cao hơn và chất mang giúp bảo vệ các chất sinh học càng tốt thì nhiệt độ gây đứt gãy các liên kết càng cao cũng như hàm lượng các chất như polyphenol và chlorophyll có trong bột càng lớn. Ngoài ra, kết quả phân tích còn cho thấy các chất mang bảo vệ các chất sấy phun càng tốt thì bột sấy phun có nhiệt độ phân hủy càng cao nên không phát hiện thấy có peak tỏa nhiệt  $T_p$  – chứng tỏ không đo được nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột tức là nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột cao quá khả năng có thể đo được của máy.

Từ các phân tích ở trên cũng cho thấy gum arabic là chất mang có đặc tính tạo bột rau má từ sấy phun có hàm lượng các chất (polyphenol, chlorophyll) trong bột cao hơn và nhiệt độ gây đứt gãy các liên kết, đặc biệt là nhiệt độ phá hủy các nhóm chức có trong thành phần của bột cao hơn cũng như nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột cao hơn bột rau má từ sử dụng các chất mang maltodextrin hoặc dextrin.

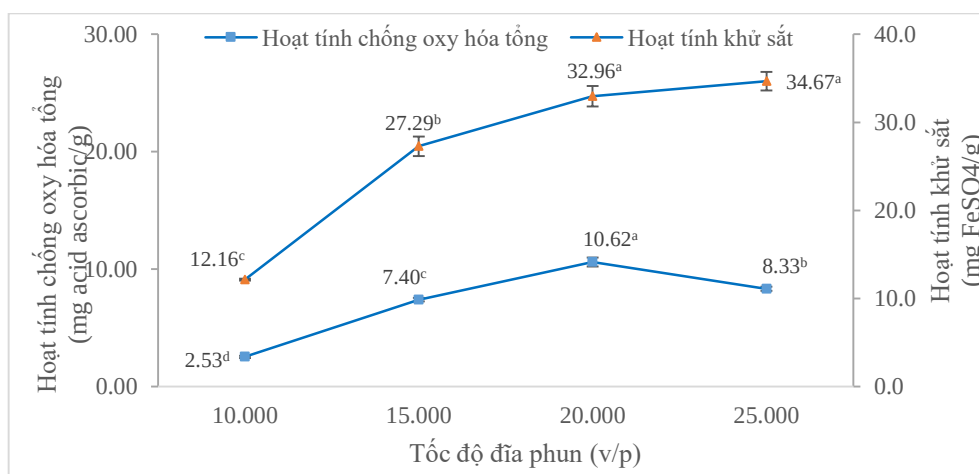
Ngoài ra, gum arabic còn giúp tạo bột rau má thành có độ tan tốt, kích thước trung bình hạt nhỏ, bột có màu xanh tươi sáng, bột có độ mịn và độ tươi xốp cao hơn so với bột rau má sử dụng chất mang là maltodextrin hoặc dextrin. Do vậy, chất mang gum arabic được lựa chọn sử dụng cho quá trình sấy phun tạo bột rau má thành.

### 3.3.1.2. Xác định tốc độ đĩa phun

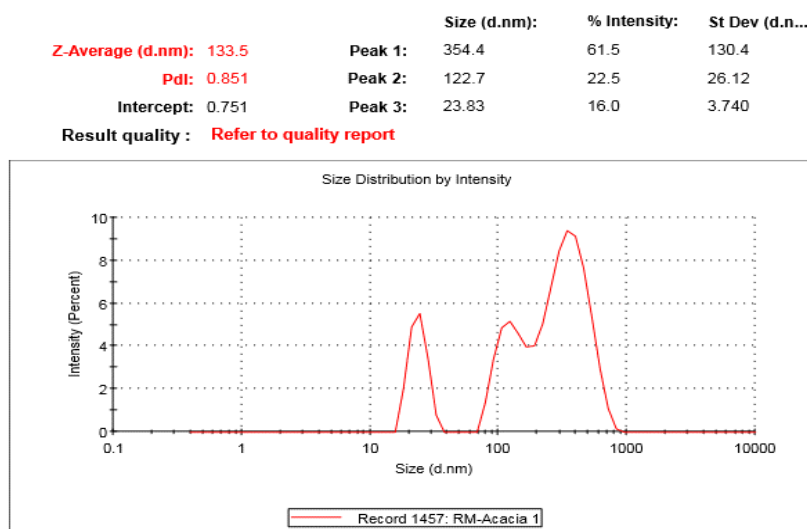
Tiến hành thí nghiệm sấy phun thu bột rau má thành sử dụng chất mang gum arabic hàm lượng 100 g/l với áp suất khít đến 2 kg/cm<sup>2</sup> ở nhiệt độ sấy 140°C với lưu lượng nhập liệu 15 ml/p và tốc độ đĩa phun khác nhau: 10.000 v/p, 15.000 v/p, 20.000 v/p và 25.000v/p. Sau khi sấy phun thu nhận bột rau má thành và lấy mẫu xác định hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, các hoạt tính chống oxy hóa và kích thước hạt, đặc tính nhiệt vi sai. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở các hình 3.35 ÷ 3.38.



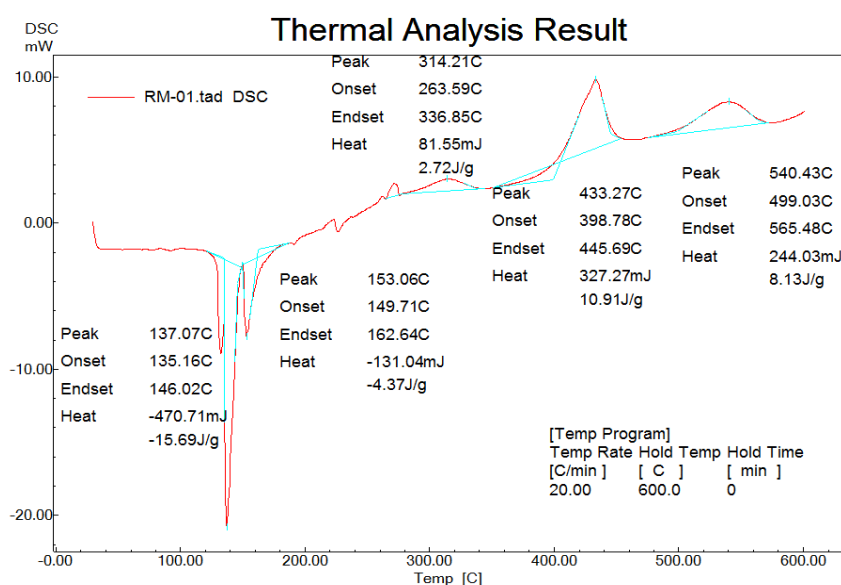
**Hình 3.35. Ảnh hưởng của tốc độ đĩa phun đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong bột rau má**



**Hình 3.36. Ảnh hưởng của tốc độ đĩa phun đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của bột rau má**



**H ình 3.37. Phổ ph ãn bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má khi tốc độ đĩa phun 15.000 v/p**



**H ình 3.38. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má khi tốc độ đĩa phun 15.000 v/p**

Từ các kết quả trình bày ở các hình 3.35 ÷ 3.38 cho thấy:

### \* Về hàm lượng polyphenol

Kết quả phân tích ở hình 3.35 cho thấy tốc độ đĩa phun của quá trình sấy phun có ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol trong bột rau má. Cụ thể, khi tăng tốc độ đĩa phun từ 10.000 ÷ 20.000 (v/p) thì hàm lượng polyphenol trong bột rau má tăng theo chiều tăng tốc độ đĩa phun và đạt giá trị lớn nhất là  $13,72 \pm 0,31$  mg acid galic/g khi tốc độ đĩa phun 20.000 v/p và cao gấp tương ứng 3,20 và 1,20 (lần) so với hàm lượng polyphenol của bột rau má thu được khi sấy phun tại tốc độ đĩa phun 10.000 và 15.000 (v/p). Khi tiếp tục tăng tốc độ đĩa phun từ 20.000 v/p đến 25.000 v/p thì hàm lượng polyphenol

của bột rau má thu được ở hai điều kiện này có khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), điều đó có nghĩa là hàm lượng polyphenol của bột rau má ít chịu tác động khi thay đổi tốc độ đĩa phun trong khoảng 20.000 đến 25.000 (v/p).

*Từ kết quả các phân tích ở trên cho thấy khi tốc độ đĩa phun 20.000 v/p thì bột rau má thu nhận được có hàm lượng polyphenol cao nhất nên tốc độ đĩa phun 20.000 v/p là phù hợp để sấy phun thu nhận bột rau má có hàm lượng polyphenol cao.*

#### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Kết quả phân tích ở hình 3.35 cho thấy trong quá trình sấy phun, hàm lượng chlorophyll trong bột rau má sẽ chịu ảnh hưởng bởi tốc độ đĩa phun. Điều này có nghĩa là khi thay đổi tốc độ đĩa phun của quá trình sấy phun sẽ ảnh hưởng đến hàm lượng chlorophyll có trong bột rau má. Cụ thể, khi tăng tốc độ đĩa phun từ 10.000 ÷ 20.000 (v/p) thì hàm lượng chlorophyll trong bột rau má tăng theo chiều tăng tốc độ đĩa phun và đạt giá trị cực đại là  $4,14 \pm 0,14$  (mg/g) tại tốc độ đĩa phun 20.000 v/p và cao gấp tương ứng 3,31 và 1,41 (lần) so với hàm lượng chlorophyll của bột rau má thu được khi sấy phun tại tốc độ đĩa phun 10.000 và 15.000 (v/p). Nếu tiếp tục tăng tốc độ đĩa phun từ 20.000 đến 25.000 (v/p) thì hàm lượng chlorophyll của bột rau má có xu hướng giảm xuống và bằng 87,68% so với hàm lượng chlorophyll của bột rau má thu nhận được khi sấy phun với tốc độ đĩa phun 25.000 v/p.

*Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy khi tốc độ đĩa phun 20.000 v/p thì bột rau má có hàm lượng chlorophyll cao nhất. Do vậy, xét theo hàm lượng chlorophyll trong bột rau má cao thì tốc độ đĩa phun 20.000 v/p là phù hợp.*

#### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Kết quả phân tích ở hình 3.36 cho thấy tốc độ đĩa phun của quá trình sấy phun có ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má. Cụ thể, khi tăng tốc độ đĩa phun từ 10.000 ÷ 20.000 (v/p) thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má tăng theo chiều tăng tốc độ đĩa phun và đạt giá trị lớn nhất là  $10,62 \pm 0,38$  mg acid ascorbic/g tại tốc độ đĩa phun 20.000 (v/p). Nếu tiếp tục tăng tốc độ đĩa phun đến 25.000 v/p thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má có xu hướng giảm xuống. Hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má khi tốc độ đĩa phun 20.000 v/p cao gấp tương ứng 4,20, 1,44, 1,28 (lần) so với hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má thu được khi sấy phun với tốc độ đĩa phun 10.000, 15.000, 25.000 (v/p).

*Từ các kết quả phân tích trên cho thấy quá trình sấy phun với tốc độ đĩa phun 20.000 v/p thì bột rau má thích hợp nhất cho hoạt tính chống oxy hóa tổng cao nhất. Do vậy, tốc độ đĩa phun 20.000 v/p là phù hợp để sấy phun thu nhận bột rau má thích hợp chứa các hợp chất sinh học có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao.*

#### **\* Về hoạt tính khử sắt**

Kết quả phân tích ở hình 3.36 cho thấy hoạt tính khử sắt của bột rau má thích hợp chịu ảnh hưởng bởi tốc độ đĩa phun trong quá trình sấy phun. Khi tăng tốc độ đĩa phun từ 10.000 ÷ 20.000 (v/p) thì hoạt tính khử sắt của bột rau má tăng theo chiều tăng tốc độ đĩa phun và đạt giá trị lớn nhất là  $32,96 \pm 1,16$  mg FeSO<sub>4</sub>/g tại tốc độ đĩa phun 20.000 (v/p). Hoạt tính khử sắt của bột rau má với tốc độ đĩa phun 20.000 v/p cao gấp tương ứng 2,71 và 1,21 (lần) so với hoạt tính khử sắt của bột rau má thu được khi sấy phun với tốc độ đĩa phun 10.000 và 15.000 (v/p). Mặt khác, tốc độ đĩa phun trong khoảng 20.000 đến 25.000 (v/p) không ảnh hưởng nhiều đến hoạt tính khử sắt của bột rau má thu được trong quá trình sấy phun, điều này được thể hiện qua giá trị hoạt tính khử sắt của bột rau má tại tốc độ đĩa phun 20.000 v/p và 25.000 v/p khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

*Từ các kết quả phân tích trên cho thấy khi tốc độ đĩa phun 20.000 v/p thì bột rau má thích hợp nhất cho hoạt tính khử sắt cao nhất. Do vậy, khi sấy phun thu nhận bột rau má thích hợp chứa các hợp chất sinh học có hoạt tính khử sắt cao thì tốc độ đĩa phun 20.000 v/p là phù hợp.*

#### **\* Về đặc tính bột**

Từ các kết quả phân tích cho thấy khi vận tốc đĩa phun là 10.000 v/p sẽ thu nhận được bột rau má có đặc tính keo dính, khó tan. Bột rau má thu nhận khi sấy phun tại các vận tốc đĩa phun khác > 15.000 v/p đều có đặc điểm tơi xốp, dễ tan. Ở tốc độ đĩa phun 15.000 v/p cho thấy bột rau má thích hợp có kích thước hạt trung bình (Z) là 133,5 nm và chỉ số đa phân tán của bột (Pdi) là 0,851 (hình 3.37). So sánh phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má ở vận tốc đĩa phun 15.000 v/p (hình 3.37) và 20.000 v/p (hình 3.30) khi các điều kiện sấy phun khác là giống nhau cho thấy khi tăng tốc độ đĩa phun từ 15.000 v/p đến 20.000 v/p thì kích thước hạt trung bình của bột rau má tăng từ 133,5 nm đến 157,8 nm và chỉ số đa phân tán giảm từ 0,851 xuống 0,517. Kết quả này cho thấy khi tăng tốc độ đĩa phun từ 15.000 v/p đến 20.000 v/p vừa làm tăng kích thước hạt trung bình và cũng vừa làm giảm chỉ số đa phân tán của bột rau má thích hợp.

Hơn nữa, đường đặc tính nhiệt vi sai của bột rau má thu nhận được khi sấy phun với tốc độ đĩa phun là 15.000 v/p (hình 3.38) có peak thu nhiệt  $T_m$  ở  $137,07^\circ\text{C}$  – kết quả trên thể hiện tại nhiệt độ này có sự mất nước hấp thụ trong phân tử bột rau má có peak thu nhiệt  $T_d$  ở  $153,06^\circ\text{C}$  thể hiện tại nhiệt độ này có sự đứt gãy các liên kết có trong thành phần của bột và có peak tỏa nhiệt  $T_n$  ở  $314,21^\circ\text{C}$  và  $433,27^\circ\text{C}$  thể hiện tại các nhiệt độ này có sự phân hủy các nhóm chức đặc trưng trong phân tử bột rau má. Ngoài ra còn có một peak tỏa nhiệt  $T_p$  ở  $540,43^\circ\text{C}$  – kết quả này thể hiện nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột rau má.

So sánh phổ nhiệt vi sai của bột rau má ở vận tốc đĩa phun 15.000 v/p (hình 3.38) và 20.000 v/p (hình 3.34) cho thấy khi tăng tốc độ đĩa phun từ 15.000 v/p lên 20.000 v/p thì đặc tính nhiệt vi sai của bột sấy có nhiều thay đổi, trong đó nhiệt mất nước hấp thụ trong phân tử bột rau má giảm từ  $137,07^\circ\text{C}$  xuống  $94,05^\circ\text{C}$ , điều này chứng tỏ khi sấy phun ở vận tốc đĩa phun 20.000 v/p thì bột rau má sẽ dễ tạo thành trong quá trình sấy phun, nhờ nhiệt mất nước hấp thụ trong phân tử thấp nên bột dễ khô, dễ tạo bột hơn so với khi sấy phun ở vận tốc đĩa phun 15.000 v/p. Tại tốc độ đĩa phun 15.000 v/p có xảy ra sự đứt gãy các liên kết có trong thành phần của bột rau má tại  $153,06^\circ\text{C}$  và tại tốc độ đĩa phun 20.000 v/p thì không xuất hiện nhiệt độ này, kết quả này chứng tỏ khi sấy phun với tốc độ đĩa phun 20.000 v/p thì bột rau má được bảo vệ các hợp chất sinh học và hoạt tính tốt hơn so với bột rau má thu nhận khi sấy phun với tốc độ đĩa phun 15.000 v/p. Do đó, tốc độ đĩa phun 15.000 v/p không nên chọn làm điều kiện sấy phun vì tại điều kiện này quá trình tạo bột khó khăn hơn do khó tách nước từ các phần tử bột, bột rau má thu nhận được kém bền, dễ bị tác động nhiệt gây đứt gãy các liên kết có trong thành phần của bột khi nhiệt độ quá trình sấy  $> 153,06^\circ\text{C}$ . Về nhiệt độ phân hủy nhóm chức  $T_n$  và nhiệt độ phân hủy hoàn toàn  $T_p$  các phân tử trong bột ở hai điều kiện vận tốc đĩa phun trên không có sự khác biệt nhiều.

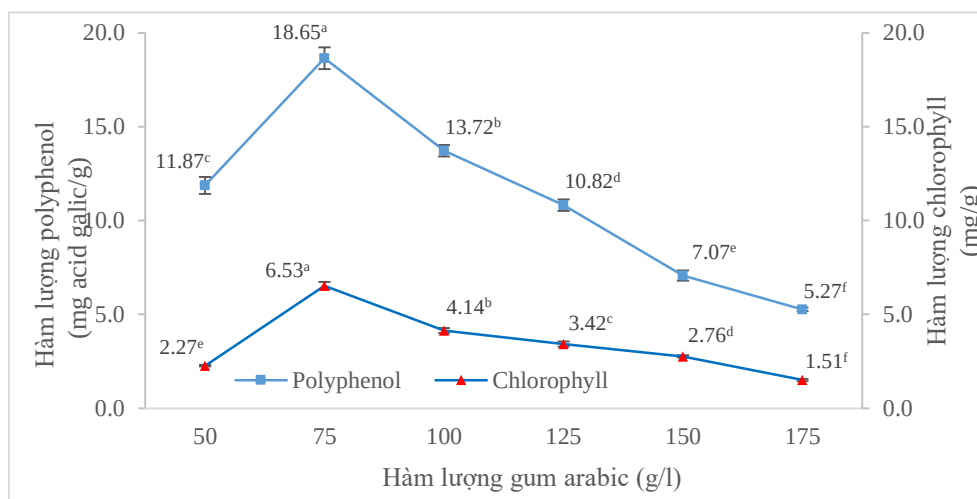
Kết quả nghiên cứu của luận án thấy rằng khi thay đổi vận tốc đĩa phun theo hướng tăng từ 15.000 v/p đến 20.000 v/p trong quá trình sấy phun sẽ làm tăng kích thước hạt, giảm chỉ số đa phân tán của bột và bột rau má có đặc tính nhiệt vi sai cũng thay đổi theo hướng tốt hơn. Những thay đổi này có được khi thay đổi tốc độ đĩa phun trong quá trình sấy phun đã góp phần tác động đến hàm lượng các hợp chất sinh học và các hoạt tính chống oxy hóa trong quá trình nghiên cứu.

*Từ tất cả các kết quả phân tích ở trên cho thấy, khi vận tốc đĩa phun 20.000 v/p sẽ thu nhận được bột rau má thì có hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll và các hoạt tính chống oxy hóa cao. Hơn nữa, bột rau má cũng có độ tan tốt, có kích thước*

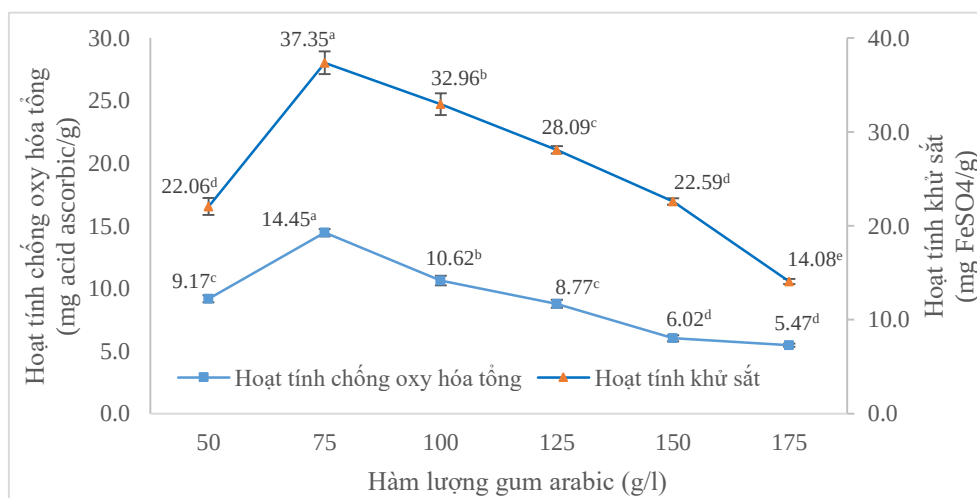
hạt trung bình nhỏ và có nhiệt mất nước hấp thụ trong phân tử bột rau má thấp, có nhiệt độ gây đứt gãy các liên kết có trong thành phần của bột rau má cao, nhiệt độ gây phá hủy hoàn toàn bột rau má cao. Vậy nên vận tốc đĩa phun 20.000 v/p được lựa chọn để sấy phun thu nhận bột rau má thì chứa các hợp chất sinh học có các hoạt tính chống oxy hóa.

### 3.3.1.3. Xác định nồng độ chất mang

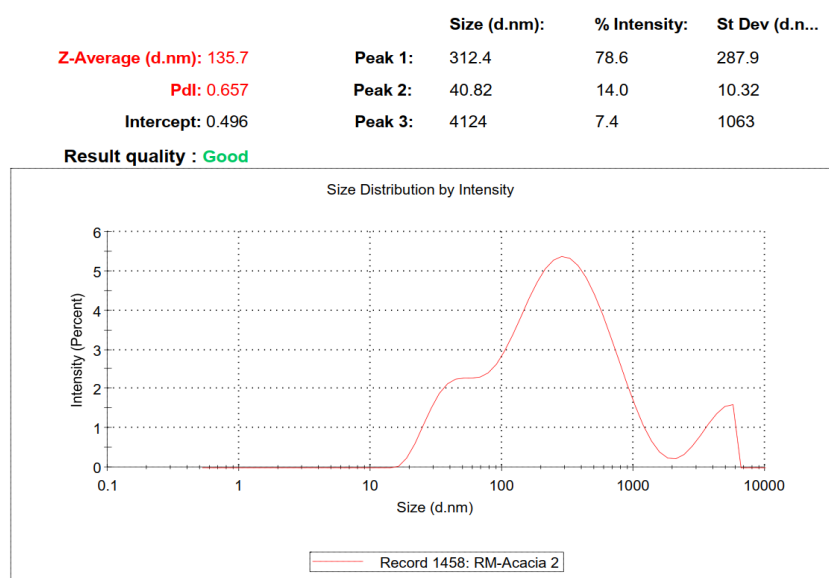
Tiến hành thí nghiệm sấy phun thu bột rau má thì tại áp suất khít đến 2 kg/cm<sup>2</sup> ở nhiệt độ sấy 140°C với tốc độ đĩa phun là 20.000 (v/p), lưu lượng nhập liệu 15 ml/p và chất mang gum arabic với các hàm lượng gum arabic là 50, 75, 100, 125, 150 và 175 (g/L). Sau khi sấy phun thu bột rau má thì và lấy mẫu xác định hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, các hoạt tính chống oxy hóa và kích thước hạt, đặc tính nhiệt vi sai. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở các hình 3.39 ÷ 3.42.



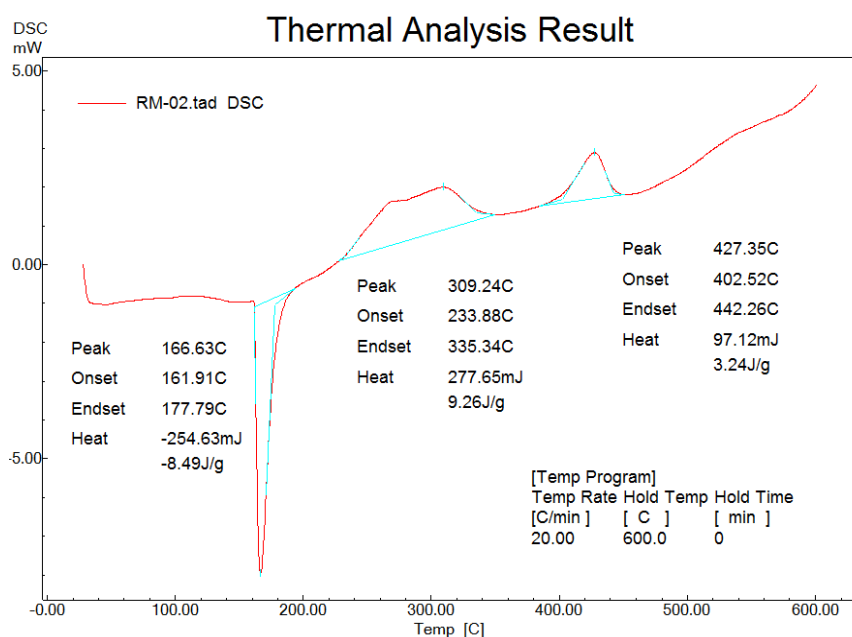
**Hình 3.39. Ảnh hưởng của nồng độ gum arabic đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong bột rau má**



**Hình 3.40. Ảnh hưởng của nồng độ gum arabic đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của bột rau má**



**Hình 3.41. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má khi nồng độ gum arabic 75 g/l**



**Hình 3.42. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má khi nồng độ gum arabic 75 g/l**

Từ các kết quả phân tích được trình bày ở các hình 3.39 ÷ 3.42 cho thấy:

#### **\* Về hàm lượng polyphenol**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.39 cho thấy hàm lượng polyphenol trong bột rau má chịu ảnh hưởng mạnh bởi nồng độ gum arabic bổ sung vào dịch chiết trong quá trình sấy phun. Cụ thể, khi tăng nồng độ gum arabic từ 50 ÷ 75 (g/l) thì hàm lượng polyphenol trong bột rau má tăng mạnh theo chiều tăng nồng độ gum arabic và đạt giá trị lớn nhất là  $18,65 \pm 0,58$  mg acid galic/g tại nồng độ gum arabic là 75 g/l. Nếu tiếp tục tăng nồng



độ gum arabic cho dịch chiết từ 100 đến 175 (g/l) thì hàm lượng polyphenol trong bột rau má liên tục giảm xuống theo chiều tăng của nồng độ gum arabic và khi dịch chiết được bổ sung gum arabic với 175 g/l thì hàm lượng polyphenol trong bột rau má thu được là  $5,27 \pm 0,09$  mg acid galic/g, chỉ bằng 28,26% so với hàm lượng polyphenol trong bột rau má khi sấy phun với nồng độ gum arabic được bổ sung là 75 g/l.

*Từ các phân tích trên cho thấy khi sấy phun sử dụng chất mang gum arabic bổ sung cho dịch chiết với nồng độ là 75 g/l thì bột rau má thu nhận được có hàm lượng polyphenol là cao nhất. Do vậy, nồng độ gum arabic 75 g/l và khoảng nồng độ gum arabic tương ứng 50 ÷ 100 g/l là phù hợp để sấy phun tạo bột rau má thì chứa các hợp chất polyphenol.*

#### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.39 cho thấy nồng độ gum arabic bổ sung vào dịch rau má trong quá trình sấy phun có ảnh hưởng lớn đến hàm lượng chlorophyll trong bột rau má. Cụ thể, trong quá trình sấy phun khi tăng nồng độ gum arabic trong dịch chiết từ 50 ÷ 75 (g/l) thì hàm lượng chlorophyll trong bột rau má tăng và đạt giá trị cực đại là  $6,53 \pm 0,20$  mg/g tại nồng độ gum arabic là 75 g/l. Nếu tiếp tục tăng nồng độ gum arabic trong dịch chiết đến 175 g/l thì hàm lượng chlorophyll trong bột rau má có xu hướng giảm xuống và khi dịch chiết được bổ sung gum arabic với nồng độ 175 g/l thì hàm lượng chlorophyll trong bột rau má thu nhận được là  $1,51 \pm 0,06$  mg/g, chỉ bằng 23,12% so với hàm lượng chlorophyll trong bột rau má khi sấy phun với nồng độ gum arabic là 75 g/l.

*Từ các phân tích trên cho thấy nồng độ gum arabic bổ sung vào dịch chiết rau má trong sấy phun với nồng độ 75 g/l thì bột rau má có hàm lượng chlorophyll cao nhất. Vậy nên nồng độ gum arabic 75 g/l và khoảng nồng độ gum arabic tương ứng 50 ÷ 100 (g/l) là phù hợp để sấy phun thu nhận bột rau má thì.*

#### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Kết quả phân tích ở hình 3.40 cho thấy nồng độ gum arabic bổ sung vào dịch chiết trong quá trình sấy phun có ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má thì. Cụ thể, khi tăng nồng độ gum arabic từ 50 đến 75 (g/l) thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má tăng và đạt giá trị lớn nhất là  $14,45 \pm 0,29$  mg acid ascorbic/g tại nồng độ gum arabic là 75 g/l. Nếu tiếp tục tăng nồng độ gum arabic đến 175 g/l thì

hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má là giảm xuống. Hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má khi nồng độ gum arabic là 75 g/l được bổ sung vào dịch chiết cao gấp tương ứng 1,58, 1,36, 1,65, 2,40 và 2,64 (lần) so với hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má thu được khi sấy phun với nồng độ gum arabic là 50, 100, 125, 150 và 175 (g/L).

*Từ các phân tích trên cho thấy khi nồng độ gum arabic phối trộn vào dịch chiết là 75 g/l thì bột rau má là có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao nhất. Do vậy, nồng độ và khoảng nồng độ gum arabic thích hợp để bổ sung vào dịch chiết trong quá trình sấy phun là 75 g/l và 50 ÷ 100 (g/l) nhằm thu nhận bột rau má là chứa các hợp chất sinh học có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao.*

#### **\* Về hoạt tính khử sắt**

Kết quả phân tích ở hình 3.40 cho thấy hoạt tính khử sắt của bột rau má là cũng chịu tác động mạnh bởi nồng độ gum arabic bổ sung vào dịch chiết rau má trong quá trình sấy phun. Cụ thể, khi tăng nồng độ gum arabic từ 50 đến 75 (g/l) thì hoạt tính khử sắt của bột rau má thu nhận được tăng theo chiều tăng nồng độ gum arabic và đạt giá trị lớn nhất là  $37,35 \pm 1,21$  mg FeSO<sub>4</sub>/g tại nồng độ gum arabic là 75 g/l. Khi tiếp tục tăng nồng độ gum arabic bổ sung từ 100 g/l đến 175 g/l thì hoạt tính khử sắt của bột rau má là liên tục giảm xuống. Hoạt tính khử sắt của bột rau má khi dịch chiết được bổ sung nồng độ gum arabic là 100 g/l và 175 g/l là  $32,96 \pm 1,16$  và  $14,08 \pm 0,27$  mg FeSO<sub>4</sub>/g, tương ứng bằng 88,25% và 37,70% so với hoạt tính khử sắt của bột rau má thu được khi sấy phun với nồng độ gum arabic là 75 g/l.

*Từ các phân tích trên cho thấy khi nồng độ gum arabic phối trộn vào dịch chiết 75 g/l thì bột rau má là có hoạt tính khử sắt cao nhất. Do vậy, chọn nồng độ và khoảng nồng độ gum arabic tương ứng để bổ sung vào dịch sấy là 75 g/l và 50 ÷ 100 (g/l) nhằm thu nhận bột rau má là có hoạt tính khử sắt cao.*

#### **\* Về đặc tính bột**

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khi bổ sung chất mang gum arabic vào dịch chiết với nồng độ 50 g/l thì bột rau má thu nhận được sau sấy phun có đặc tính keo vón, khó tan. Tại các nồng độ gum arabic khác trong khoảng khảo sát từ 75 ÷ 175 (g/l) thì bột rau má thu nhận được đều dễ tan. Bột rau má thu nhận được với nồng độ chất mang là

75 g/l được bổ sung trong quá trình sấy phun (hình 3.41) có kích thước hạt trung bình (Z) là 135,7 nm, độ đa phân tán của bột (Pdi) là 0,657. So sánh phổ phân bố kích thước hạt và độ đa phân tán của bột rau má ở nồng độ chất mang 75 g/l (hình 3.43) và 100 g/l (hình 3.32) cho thấy kích thước hạt trung bình tăng từ 135,7 nm đến 157,8 nm và chỉ số đa phân tán (Pdi) giảm từ 0,657 đến 0,517 khi tăng nồng độ gum arabic từ 75 g/l đến 100 g/l.

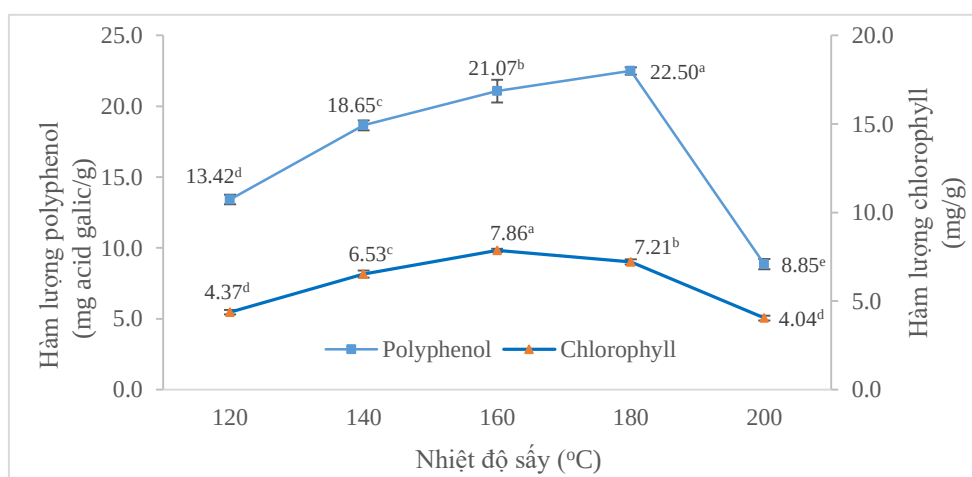
Hơn nữa, đường đặc tính nhiệt vi sai của bột rau má (hình 3.42) cho thấy có peak thu nhiệt  $T_m$  ở 166,63°C thể hiện tại nhiệt độ này có sự mất nước hấp thụ trong phân tử bột rau má. Không có peak thu nhiệt  $T_d$  – kết quả này thể hiện không phát hiện sự đứt gãy các liên kết có trong thành phần của bột rau má. Có peak tỏa nhiệt  $T_n$  ở 309,24°C thể hiện tại nhiệt độ này có sự phân hủy các nhóm chức đặc trưng có trong phân tử bột rau má. Ngoài ra còn có một peak tỏa nhiệt  $T_p$  ở 427,35°C là nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử của bột rau má. So sánh phổ nhiệt vi sai của bột rau má ở nồng độ gum arabic 75 g/l (hình 3.42) và 100 g/l (hình 3.34) cho thấy khi tăng nồng độ gum arabic từ 75 g/l đến 100 g/l thì nhiệt mất nước hấp thụ trong phân tử  $T_m$  giảm từ 166,63°C xuống 94,05 (°C), kết quả này chứng tỏ khi tăng nồng độ gum arabic cho dịch sấy thì bột rau má sẽ dễ khô, dễ tạo bột trong quá trình sấy phun do có nhiệt mất nước hấp thụ trong phân tử thấp. Bột rau má ở hai giá trị nồng độ gum arabic nêu trên có đường đặc tính nhiệt không có peak thu nhiệt  $T_d$  gây phá hủy các liên kết có trong thành phần của bột, kết quả này chứng tỏ khi sấy phun với nồng độ gum arabic 75 g/l và 100 g/l thì bột rau má đều được bảo vệ các hợp chất sinh học nên cũng cho hoạt tính tốt. Nhiệt phân hủy nhóm chức  $T_n$  trong phân tử ít có sự khác biệt ở 2 nồng độ gum arabic và nhiệt độ gây phân hủy hoàn toàn  $T_p$  các phân tử trong bột tăng từ đến 427,35°C lên 549,33 – kết quả này thể hiện khi tăng nồng độ chất mang gum arabic trong dịch sấy thì bột rau má thu nhận được sẽ khó bị phá hủy nhiệt hơn.

*Từ tất cả các kết quả phân tích ở trên cho thấy, khi nồng độ gum arabic phối trộn vào dịch chiết là 75 g/l thì bột rau má thu được có hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt là cao nhất. Hơn nữa, bột rau má thu nhận được cũng có độ tan tốt, có kích thước hạt trung bình nhỏ, có nhiệt độ làm phá hủy các liên kết có trong thành phần của bột và nhiệt độ phá hủy hoàn toàn*

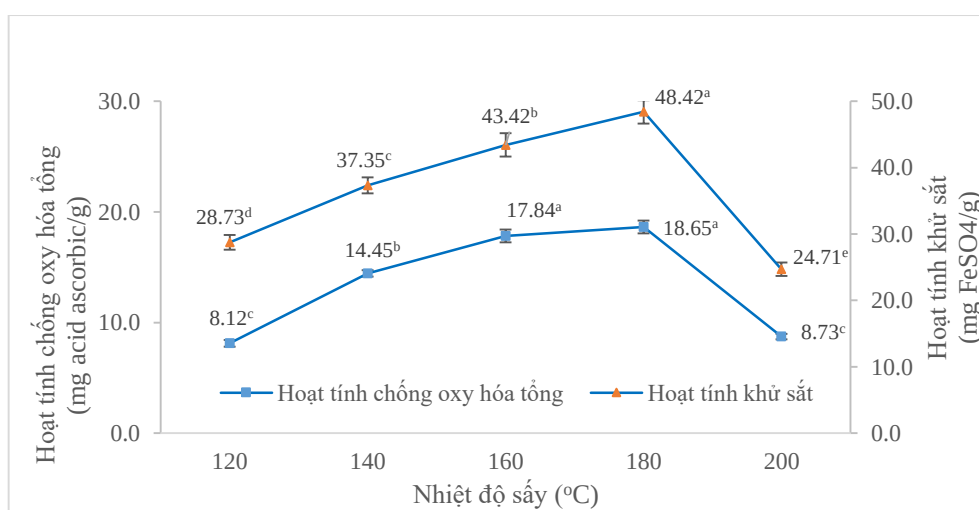
bột cao. Vậy nên nồng độ và khoảng nồng độ gum arabic tương ứng 75 g/l và 50 ÷ 100 (g/l) là phù hợp để sấy phun thu nhận bột rau má chứa polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa cao.

### 3.3.1.4. Xác định nhiệt độ sấy phun

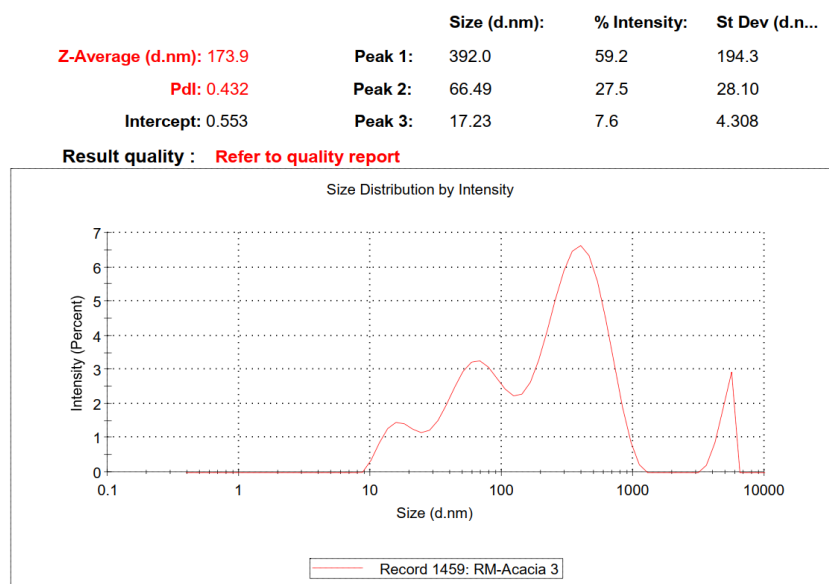
Tiến hành thí nghiệm sấy phun thu bột rau má bằng sử dụng chất mang gum arabic nồng độ là 75 g/l tại áp suất kh ín ín là 2 kg/cm<sup>2</sup> với tốc độ đĩa phun là 20.000 (v/p), lưu lượng nhập liệu 15 ml/p và nhiệt độ sấy phun biến động từ 120 ÷ 200 (°C) với bước nhảy nhiệt độ là 20. Sau khi sấy phun thu bột rau má và lấy mẫu xác định hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, các hoạt tính chống oxy hóa và kích thước hạt, đặc tính nhiệt vi sai. Kết quả được trình bày ở các hình 3.43 ÷ 3.46.



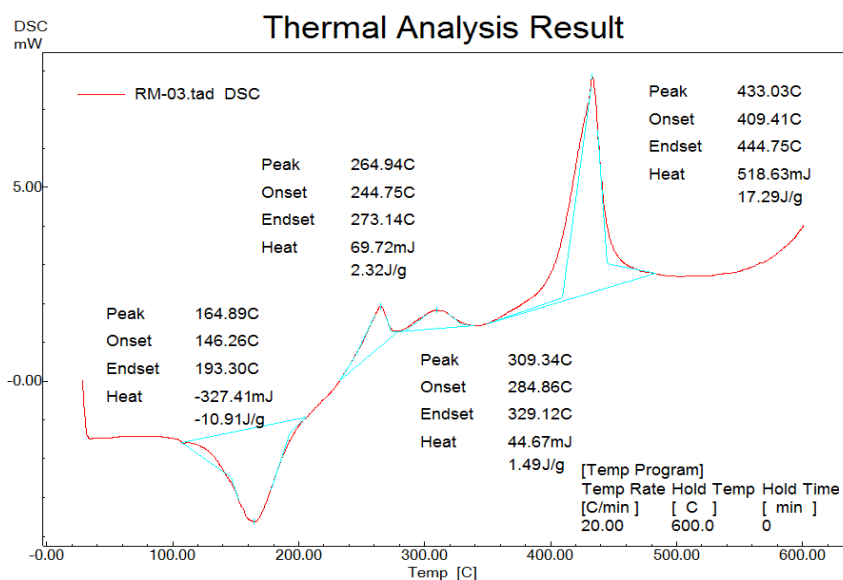
Hình 3.43. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong bột rau má



Hình 3.44. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của bột rau má



**Hình 3.45. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má khi nhiệt độ sấy phun 180°C**



**Hình 3.46. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má khi nhiệt độ sấy phun 180°C**

Từ các kết quả được trình bày ở các hình 3.43 ÷ 3.46 cho thấy:

#### **\* Về hàm lượng polyphenol**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.43 cho thấy hàm lượng polyphenol trong bột rau má chịu tác động mạnh bởi nhiệt độ sấy phun. Cụ thể, khi tăng nhiệt độ sấy phun từ 120 ÷ 180 (°C) thì hàm lượng polyphenol trong bột rau má tăng và đạt giá trị lớn nhất là 22,50 ± 0,26 mg acid galic/g khi nhiệt độ sấy là 180°C. Nếu tiếp tục tăng nhiệt độ sấy phun đến 200°C thì hàm lượng polyphenol trong bột rau má giảm xuống mạnh. Cụ thể, khi sấy phun ở nhiệt độ 200°C thì hàm lượng polyphenol trong bột rau má thu được

giảm còn  $8,85 \pm 0,36$  mg acid galic/g, bằng 39,33% so với hàm lượng polyphenol có trong bột rau má khi sấy phun ở nhiệt độ  $180^{\circ}\text{C}$ . Điều này chứng tỏ khi nhiệt độ sấy phun tăng đến  $200^{\circ}\text{C}$  sẽ tác động làm giảm mạnh hàm lượng các polyphenol có trong bột rau má thu được sau sấy phun.

*Từ kết quả các phân tích trên cho thấy khi sấy phun ở nhiệt độ  $180^{\circ}\text{C}$  thì bột rau má thu nhận được có hàm lượng polyphenol cao nhất. Vậy nên, nếu xét theo hàm lượng polyphenol trong bột rau má cao thì nhiệt độ  $180^{\circ}\text{C}$  là phù hợp để sấy phun tạo bột rau má chứa polyphenol và khoảng nhiệt độ  $160 \div 200 (^{\circ}\text{C})$  được chọn làm thông số biên để tối ưu hóa sấy phun thu bột rau má thu.*

#### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.43 cho thấy nhiệt độ của quá trình sấy phun cũng có tác động lớn đến hàm lượng chlorophyll có trong bột rau má thu. Khi tiến hành tăng nhiệt độ sấy phun trong khoảng từ  $120 \div 160 (^{\circ}\text{C})$  thì hàm lượng chlorophyll trong bột rau má thu nhận được tăng và đạt giá trị lớn nhất là  $7,86 \pm 0,09$  mg/g khi nhiệt độ sấy phun là  $160^{\circ}\text{C}$ , cao gấp 1,80 lần so với hàm lượng chlorophyll trong bột rau má khi sấy phun ở nhiệt độ  $120^{\circ}\text{C}$ . Nếu tiếp tục tăng nhiệt độ sấy đến  $180^{\circ}\text{C}$  và  $200^{\circ}\text{C}$  trong quá trình sấy phun thì bột rau má thu nhận được có hàm lượng chlorophyll giảm xuống và có giá trị tương ứng  $7,21 \pm 0,14$  mg/g và  $4,04 \pm 0,13$  mg/g, tương ứng bằng 91,73% và 51,40% so với hàm lượng chlorophyll trong bột rau má thu được khi sấy phun tại nhiệt độ  $160^{\circ}\text{C}$ .

*Từ các kết quả phân tích trên cho thấy bột rau má có hàm lượng chlorophyll cao nhất khi sấy phun ở nhiệt độ  $160^{\circ}\text{C}$ . Do vậy nhiệt độ  $160^{\circ}\text{C}$  là phù hợp để sấy phun thu hồi bột rau má chứa chlorophyll cao.*

#### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Kết quả phân tích ở hình 3.44 cho thấy nhiệt độ của quá trình sấy phun có ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má thu. Trong quá trình sấy phun, khi tăng nhiệt độ sấy từ  $120 \div 180 (^{\circ}\text{C})$  thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má thu nhận được tăng và tại nhiệt độ sấy là  $180^{\circ}\text{C}$  sẽ đạt giá trị cực đại là  $18,65 \pm 0,58$  mg acid ascorbic/g. Nếu tiếp tục tăng nhiệt độ sấy của quá trình sấy phun đến  $200^{\circ}\text{C}$  thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má thu nhận được giảm mạnh và tại đây có giá trị là  $8,73 \pm 0,24$  mg acid ascorbic/g, bằng 46,81% so với hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má thu nhận được khi sấy phun tại nhiệt độ  $180^{\circ}\text{C}$ .

*Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy khi sấy phun với nhiệt độ 180°C sẽ thu nhận được bột rau má có hoạt tính chống oxy hóa tổng cao nhất. Vậy nên nếu xét theo hoạt tính chống oxy hóa tổng trong bột rau má cao thì nhiệt độ sấy 180°C là phù hợp cho quá trình sấy phun và khoảng nhiệt độ sấy 160 ÷ 200 (°C) được chọn làm thông số biên quá trình tối ưu công đoạn sấy phun thu nhận bột rau má thì chứa các hợp chất sinh học nghiên cứu.*

#### **\* Về hoạt tính khử sắt**

Kết quả phân tích ở hình 3.44 cho thấy hoạt tính khử sắt của bột rau má thì thu nhận được chịu tác động mạnh bởi nhiệt độ sấy trong quá trình sấy phun. Cụ thể, khi tăng nhiệt độ sấy từ 120 ÷ 180 (°C) thì hoạt tính khử sắt của bột rau má thì tăng theo chiều tăng nhiệt độ và có giá trị lớn nhất là  $48,42 \pm 1,76$  mg FeSO<sub>4</sub>/g tại 180°C, cao gấp 1,69 lần so với hoạt tính khử sắt của bột rau má thì khi sấy phun ở 120°C. Nếu tiếp tục tăng nhiệt độ sấy đến 200°C thì hoạt tính khử sắt của bột rau má thì giảm xuống còn  $24,71 \pm 1,01$  mg FeSO<sub>4</sub>/g, bằng 51,03% so với hoạt tính khử sắt của bột rau má thì khi sấy phun ở 180°C.

*Từ các kết quả phân tích trên cho thấy quá trình sấy phun với nhiệt độ sấy 180°C thì bột rau má thì thu nhận được có hoạt tính khử sắt cao nhất. Vậy nên, chọn nhiệt độ sấy và khoảng nhiệt độ sấy phù hợp tương ứng 180°C và 160 ÷ 200 (°C) cho quá trình sấy phun để thu nhận bột rau má thì có chứa các hợp chất sinh học nghiên cứu có hoạt tính khử sắt cao.*

#### **\* Về đặc tính bột**

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy khi sấy phun tại nhiệt độ 120°C thì bột rau má thì thu nhận được có độ keo dẻo nhất định và hơi khó tan, còn khi sấy phun tại nhiệt độ 200°C thì bột rau má thì có đặc tính khô cứng, bị thủy tinh hóa, khó tan và tại các nhiệt độ sấy khác trong nghiên cứu thì bột rau má thì thu nhận được có độ tơi xốp, dễ tan. Biến đổi đặc tính bột ở trên là nguyên nhân làm bột rau má với hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll và các hoạt tính chống oxy hóa bị giảm rất mạnh khi sấy phun ở nhiệt độ 200°C. Qua thực nghiệm thấy rằng mẫu bột rau má thu nhận được khi sấy phun ở nhiệt độ 200°C bị thủy tinh hóa rất mạnh, đây cũng chính là nhược điểm của chất mang gum arabic khi tiếp xúc với nhiệt độ cao. Bột rau má bị thủy tinh hóa đồng nghĩa với việc chúng bị biến tính, các hợp chất sinh học có trong bột bị chuyển hóa gây giảm hàm lượng và giảm cả hoạt tính sinh học khi sấy phun ở nhiệt độ 200°C.

Bột rau má thu nhận được với nhiệt độ sấy phun là 180°C (hình 3.45) cho thấy có kích thước hạt trung bình (Z) là 173,9 nm, độ đa phân tán của bột (Pdi) là 0,432. Ở cùng các điều kiện sấy khác, so sánh phổ phân bố kích thước hạt và độ đa phân tán của bột rau má ở 140°C (hình 3.41) và 180 °C (hình 3.45) cho thấy khi tăng nhiệt độ sấy phun từ 140°C lên 180°C thì kích thước hạt trung bình của bột tăng từ 135,7 nm đến 173,9 nm và độ đa phân tán (Pdi) của bột giảm từ 0,657 xuống 0,432.

Về đặc tính nhiệt vi sai của bột rau má thì tại nhiệt độ sấy là 180°C (hình 3.46) cho thấy có peak thu nhiệt  $T_m$  ở 164,89°C, tại nhiệt độ này sẽ diễn ra sự mất nước hấp thụ trong phân tử. Không có peak thu nhiệt  $T_d$  – kết quả thể hiện không xảy ra sự đứt gãy các liên kết có trong thành phần của bột rau má. Có 02 peak tỏa nhiệt  $T_n$  ở 264,94° và 309,34°C thể hiện tại các nhiệt độ này có sự phân hủy các nhóm chức đặc trưng trong phân tử bột rau má. Ngoài ra còn có một peak tỏa nhiệt  $T_p$  ở 433,03°C – kết quả cho thấy tại nhiệt độ này sẽ xảy ra sự phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột rau má. So sánh phổ nhiệt vi sai của bột rau má ở 140°C (hình 3.42) và 180°C (hình 3.46) cho thấy khi tăng nhiệt độ sấy phun từ 140°C lên 180°C thì đặc tính nhiệt vi sai của bột rau má đã thay đổi, cụ thể là nhiệt mất nước hấp thụ  $T_m$  trong phân tử, nhiệt phân hủy các nhóm chức  $T_n$  và nhiệt độ phân hủy hoàn toàn  $T_p$  của phân tử có trong bột rau má không có sự khác biệt nhiều khi thay đổi nhiệt độ sấy phun như trên.

Từ các kết quả nghiên cứu ở trên cho thấy khi thay đổi nhiệt độ sấy trong quá trình sấy phun sẽ tác động nhiều đến đặc tính của bột, kích thước hạt, mức độ đồng đều của hạt và hoạt tính sinh học của bột rau má. Cụ thể, khi sấy phun ở nhiệt độ quá cao có thể làm biến tính bột do bột bị thủy tinh hóa, chuyển hóa gây giảm hàm lượng các hợp chất và giảm hoạt tính sinh học của bột rau má. Vì vậy nhiệt độ sấy phun sẽ ảnh hưởng lớn đến hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của bột rau má thì thu nhận được sau quá trình sấy phun.

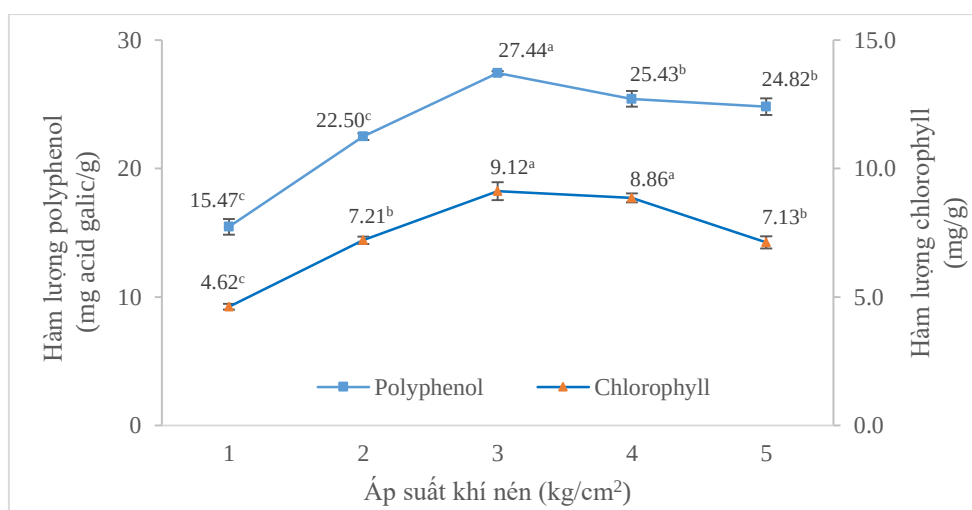
*Từ tất cả các kết quả phân tích ở trên cho thấy, khi nhiệt độ sấy phun 180°C thì bột rau má thì có hàm lượng polyphenol, hoạt tính chống oxy hóa tổng, hoạt tính khử sắt là cao nhất và hàm lượng chlorophyll thì cũng rất cao, cao hơn 91% so với hàm lượng chlorophyll cao nhất có trong bột rau má thu nhận được khi sấy phun tại 160°C. Hơn nữa, với nhiệt độ sấy phun 180°C, bột rau má thì cũng có độ tan tốt, có kích thước hạt nhỏ; có nhiệt độ phá hủy các liên kết, nhiệt độ phân hủy các nhóm chức trong phân*



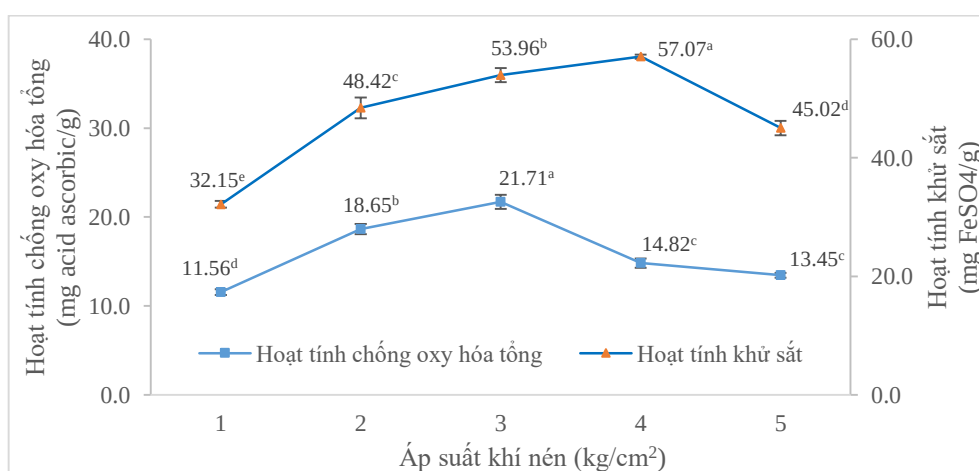
tử và nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột rau má cao. Do vậy, nhiệt độ 180°C là phù hợp để sấy phun và khoảng nhiệt độ 160÷200 (°C) được chọn làm thông số biên quá trình tối ưu sấy phun thu nhận bột rau má chứa polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa.

### 3.3.1.5. Xác định áp suất khí nén

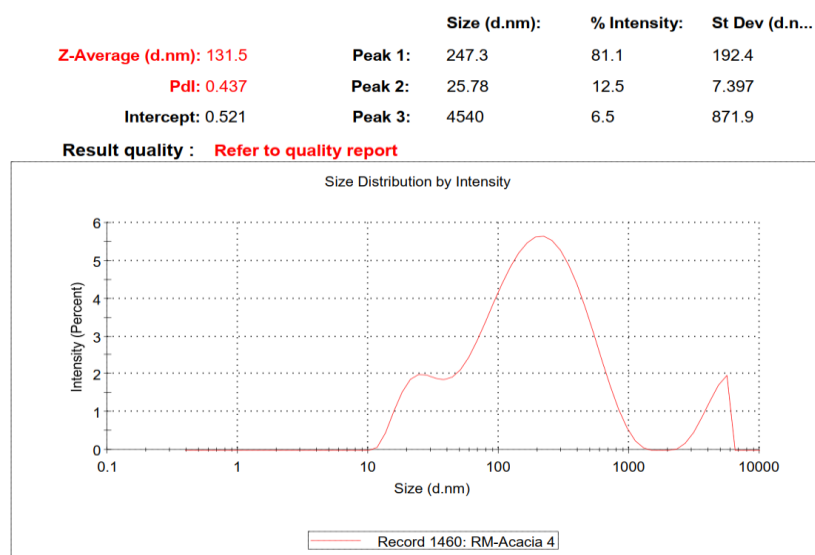
Tiến hành thí nghiệm sấy phun thu bột rau má bằng sử dụng chất mang gum arabic nồng độ 75 g/l ở nhiệt độ sấy 180°C với tốc độ đĩa phun 20.000 v/p, lưu lượng nhập liệu 15 ml/p và áp suất kh ín ín biến động từ 1 ÷5 kg/cm<sup>2</sup> với bước nhảy áp suất kh ín ín l à1. Sau khi sấy phun thu bột rau má bằng và lấy mẫu xác định hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, các hoạt tính chống oxy hóa và kích thước hạt, đặc tính nhiệt vi sai. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở các hình 3.47 ÷3.50.



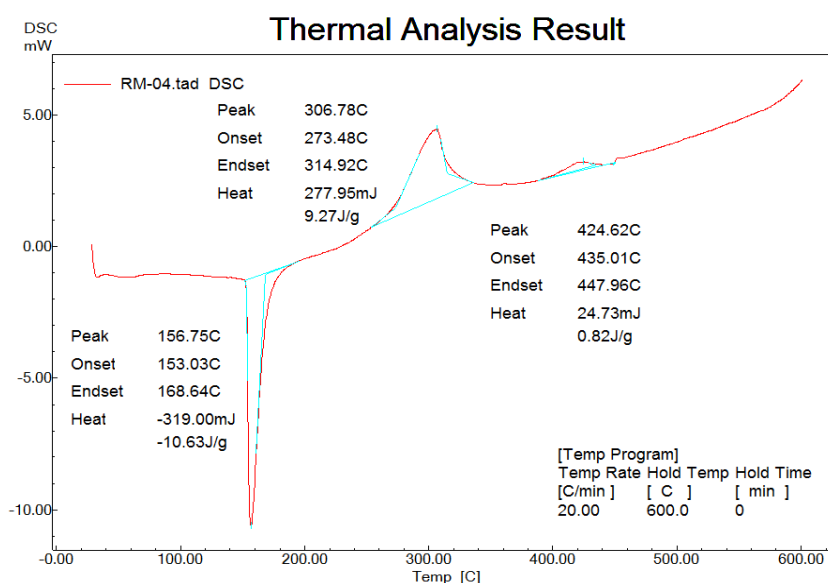
**Hình 3.47. Ảnh hưởng của áp suất khí nén đến hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong bột rau má**



**Hình 3.48. Ảnh hưởng của áp suất khí nén đến hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của bột rau má**



**Hình 3.49. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má khi áp suất kh ín ín 3 kg/cm<sup>2</sup>**



**Hình 3.50. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má khi áp suất kh ín ín 3 kg/cm<sup>2</sup>**

Từ các kết quả được trình bày ở các hình 3.47 ÷ 3.50 cho thấy:

#### **\* Về hàm lượng polyphenol**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.47 cho thấy hàm lượng polyphenol có trong bột rau má sẽ chịu ảnh hưởng bởi áp suất kh ín ín của quá trình sấy phun. Cụ thể, khi tăng áp suất kh ín ín từ 1 ÷ 3 (kg/cm<sup>2</sup>) thì hàm lượng polyphenol trong bột rau má tăng và có giá trị cực đại là  $27,44 \pm 0,15$  mg acid galic/g khi áp suất kh ín ín là 3 kg/cm<sup>2</sup>, bằng 1,77 lần so với hàm lượng polyphenol trong bột rau má khi sấy với áp suất kh ín ín là 1 kg/cm<sup>2</sup>. Nếu tiếp tục tăng áp suất kh ín ín trong quá trình sấy phun đến 4 kg/cm<sup>2</sup> và 5 kg/cm<sup>2</sup> thì hàm lượng polyphenol trong bột rau má giảm xuống và có giá trị tương ứng là

25,43 $\pm$ 0,62 mg acid galic/g và 24,82 $\pm$ 0,65 mg acid galic/g. Tuy nhiên các giá trị hàm lượng polyphenol có trong bột rau má thu nhận được khi sấy phun tại 4 kg/cm<sup>2</sup> và 5 kg/cm<sup>2</sup> có khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), do đó khi áp suất kh ín ín từ 4 ÷ 5 (kg/cm<sup>2</sup>) sẽ ít ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol của bột rau má trong quá trình sấy phun.

*Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy khi tiến hành sấy phun với suất kh ín ín là 3 kg/cm<sup>2</sup> thì bột rau má có hàm lượng polyphenol cao nhất. Vậy nên chọn áp suất kh ín ín 3 kg/cm<sup>2</sup> và khoảng áp suất kh ín ín 2 ÷ 4 (kg/cm<sup>2</sup>) trong quá trình sấy phun là phù hợp để thu nhận bột rau má chứa hàm lượng polyphenol cao.*

#### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.47 cho thấy áp suất kh ín ín của quá trình sấy phun có ảnh hưởng đến hàm lượng chlorophyll trong bột rau má thu nhận được. Điều này được khẳng định khi tăng áp suất kh ín ín từ 1 ÷ 3 (kg/cm<sup>2</sup>) thì hàm lượng chlorophyll trong bột rau má tăng và đạt giá trị cao nhất là 9,12 $\pm$ 0,35 mg/g khi áp suất kh ín ín là 3 kg/cm<sup>2</sup>. Khi tiến hành sấy phun ở áp suất kh ín ín 4 kg/cm<sup>2</sup> và 5 kg/cm<sup>2</sup> thì hàm lượng chlorophyll trong bột rau má thu được là 8,86 $\pm$ 0,17 mg/g và 7,13 $\pm$ 0,24 mg/g, tương ứng bằng 97,15% và 78,18% so với hàm lượng chlorophyll trong bột rau má khi sấy phun ở áp suất kh ín ín là 3 kg/cm<sup>2</sup>. Điều này cho thấy, nếu tăng áp suất kh ín ín từ 3 ÷ 4 (kg/cm<sup>2</sup>) thì ít ảnh hưởng đến hàm lượng chlorophyll trong bột rau má do các giá trị về hàm lượng chlorophyll tại các áp suất này khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) và nếu tục tăng áp suất kh ín ín từ 4 ÷ 5 (kg/cm<sup>2</sup>) thì hàm lượng chlorophyll trong bột rau má sẽ giảm xuống.

*Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy khi sấy phun với áp suất kh ín ín là 3 kg/cm<sup>2</sup> thì bột rau má có hàm lượng chlorophyll cao nhất. Do vậy, xét theo hàm lượng chlorophyll trong bột rau má cao thì áp suất kh ín ín 3 kg/cm<sup>2</sup> và khoảng áp suất kh ín ín tương ứng 2 ÷ 4 (kg/cm<sup>2</sup>) là phù hợp để sấy phun thu nhận bột rau má là.*

#### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Kết quả phân tích ở hình 3.48 cho thấy áp suất kh ín ín của quá trình sấy phun cũng ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má là. Cụ thể, khi tăng áp suất kh ín ín từ 1 ÷ 3 (kg/cm<sup>2</sup>) thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má tăng và khi áp suất kh ín ín là 3 kg/cm<sup>2</sup> thì hoạt tính chống oxy hóa tổng có giá trị lớn nhất là

21,71 ± 0,78 mg acid ascorbic/g. Tại áp suất kh ín ín l à 4 kg/cm<sup>2</sup> và 5 kg/cm<sup>2</sup> thì hoạt t ính chống oxy h óa tổng của bột rau m á l à 14,82 ± 0,53 mg acid ascorbic/g và 13,45 ± 0,28 mg acid ascorbic/g, c á c g í á tr ì n à y c ó k h á c b iệ t k h ò n g c ó ý n g h ì a t h ò n g k ê (p < 0,05), ã i ều n à y c h o t h à y k h i á p s u á t k h í n í n t ù 4 ÷ 5 (kg/cm<sup>2</sup>) í t á c ã n g ã n h o à t t ính chống oxy h óa tổng của bột rau m á t h à. Hoạt t ính chống oxy h óa tổng của bột rau m á t h à t h u n h à n được khi sấy phun với á p s u á t k h í n í n 3 kg/cm<sup>2</sup> c a o g á p t u ơ n g 1,88, 1,16, 1,47 v à 1,61 (lần) s o v ớ i h o à t t ính chống oxy h óa tổng của bột rau m á t h u được khi sấy phun với á p s u á t k h í n í n l à 1, 2, 4 v à 5 (kg/cm<sup>2</sup>).

*Từ c á c k ết q u ả p h â n t í c h ở t r ê n c h o t h à y q u á t r ì n h s á y p h u n v ớ i á p s u á t k h í n í n l à 3 kg/cm<sup>2</sup> t h ì t h u n h à n đ ược bột rau m á t h à c ó h o à t t ính chống oxy h óa tổng c a o n h á t. D o v à y, n ếu x ế t h o à t t ính chống oxy h óa tổng t r o n g bột rau m á c a o t h ì s u á t k h í n í n 3 kg/cm<sup>2</sup> v à k h o ả n g á p s u á t k h í n í n t u ơ n g 2 ÷ 4 (kg/cm<sup>2</sup>) l à p h ù h ợ p ã i s á y p h u n t h u n h à n bột rau m á t h à.*

#### **\* Về hoạt t ính kh ử s ắ t**

Kết q u ả p h â n t í c h ở h ì n h 3.48 c h o t h à y h o à t t ính kh ử s ắ t của bột rau m á t h à c h i ịu t á c ã n g b ớ i á p s u á t k h í n í n t r o n g q u á t r ì n h s á y p h u n. K h i t ă n g á p s u á t k h í n í n t ù 1 ÷ 4 (kg/cm<sup>2</sup>) t h ì h o à t t ính kh ử s ắ t của bột rau m á t ă n g v à ã t g í á tr ì l ớn n h á t l à 57,07 ± 0,35 mg FeSO<sub>4</sub>/g k h i á p s u á t k h í n í n l à 4 kg/cm<sup>2</sup>. N ếu t i ếp t ụ c t ă n g á p s u á t k h í n í n của q u á t r ì n h s á y p h u n ã n 5 kg/cm<sup>2</sup> t h ì h o à t t ính kh ử s ắ t của bột rau m á t h à g i ả m x u ố n g c ó g í á tr ì 45,02 ± 1,21 mg FeSO<sub>4</sub>/g, b ằ n g 78,89% s o v ớ i h o à t t ính kh ử s ắ t của bột rau m á k h i s á y p h u n t ại á p s u á t k h í n í n 4 kg/cm<sup>2</sup>. H o à t t ính kh ử s ắ t của bột rau m á t h à t h u n h à n đ ược khi sấy phun với á p s u á t k h í n í n 4 kg/cm<sup>2</sup> c a o g á p t u ơ n g 1,78, 1,18, 1,06 v à 1,27 (lần) s o v ớ i h o à t t ính kh ử s ắ t của bột rau m á t h u được khi sấy phun với á p s u á t k h í n í n l à 1, 2, 3 v à 5 (kg/cm<sup>2</sup>).

*Từ c á c k ết q u ả p h â n t í c h t r ê n c h o t h à y q u á t r ì n h s á y p h u n v ớ i á p s u á t k h í n í n l à 4 kg/cm<sup>2</sup> t h ì bột rau m á t h à t h u n h à n đ ược c ó h o à t t ính kh ử s ắ t c a o n h á t. V à y n ê n á p s u á t k h í n í n 4 kg/cm<sup>2</sup> l à p h ù h ợ p t r o n g s á y p h u n t h u h ồi bột rau m á c h ứa c á c h ợ p c h á t s i n h h ọc c ó h o à t t ính kh ử s ắ t c a o.*

#### **\* Về ã t t ính bột**

Q u a k ết q u ả n g h i ê n c ứ u c h o t h à y bột rau m á t h à t h u n h à n đ ược khi sấy phun với á p s u á t k h í n í n 1 kg/cm<sup>2</sup> c ó ã t ã i ể m ẩ m ứ t, ã i v ớ n, k h ó t a n v à c á c bột rau m á t h u

nhận trong quá trình sấy phun tại các giá trị áp suất kh ín ến kh ác từ 2 ÷5 (kg/cm<sup>2</sup>) thì đều có đặc t ính toi xóp, dễ tan. Khi sấy phun với áp suất kh ín ến 3 kg/cm<sup>2</sup> thì bột rau má có kích thước hạt trung b ình (Z) là 131,5 nm và chỉ số đa phân tán của bột (Pdi) là 0,437 (h ình 3.49). So sánh phổ ph ân bố kích thước hạt và độ đa phân tán của bột rau má khi sấy phun với áp suất kh ín ến 2 kg/cm<sup>2</sup> (h ình 3.45) và 3 kg/cm<sup>2</sup> (h ình 3.49) cho thấy khi tăng áp suất kh ín ến từ 2 kg/cm<sup>2</sup> l ến 3 kg/cm<sup>2</sup> thì bột rau má có kích thước hạt trung b ình giảm từ 173,9 nm xuống 131,5 nm và chỉ số đa phân tán thì thay đổi không đáng kể.

Từ kết quả phân tích đặc t ính nhiệt vi sai của bột rau má tại áp suất kh ín ến 3 kg/cm<sup>2</sup> (h ình 3.50) cho thấy đường đặc t ính nhiệt có peak thu nhiệt T<sub>m</sub> ở 156,75°C thể hiện có sự mất nước hấp thụ trong ph ân tử tại nhiệt độ này. Không có peak thu nhiệt T<sub>d</sub> – kết quả cho thấy không thể hiện nhiệt độ có sự đứt gãy các liên kết có trong thành phần của bột trong dải nhiệt độ đã đo. Có peak tỏa nhiệt T<sub>n</sub> ở 306,78°C thể hiện có sự ph ân hủy nhóm chức đặc trưng trong ph ân tử tại nhiệt độ này. Ngoài ra còn có một peak tỏa nhiệt T<sub>p</sub> ở 424,62 (°C) thể hiện tại nhiệt độ này có sự ph ân hủy hoàn toàn các ph ân tử trong bột.

So sánh phổ nhiệt vi sai của bột rau má ở áp suất kh ín ến 2 kg/cm<sup>2</sup> (h ình 3.46) và 3 kg/cm<sup>2</sup> (h ình 3.50) cho thấy khi tăng áp suất kh ín ến từ 2 kg/cm<sup>2</sup> đến 3 kg/cm<sup>2</sup> thì đường đặc t ính nhiệt vi sai của bột rau má có thay đổi nhưng không kh ác biệt nhiều. Cụ thể, các đường đặc t ính nhiệt cho thấy nhiệt mất nước hấp thụ T<sub>m</sub> trong ph ân tử bột rau má giảm từ 164,89°C xuống 156,75°C, nhiệt ph ân hủy nhóm chức T<sub>n</sub> giảm từ 309,34°C xuống 306,78°C và nhiệt độ ph ân hủy hoàn toàn T<sub>p</sub> các ph ân tử bột rau má giảm từ 433,03°C đến 424,62°C khi tăng áp suất kh ín ến trong quá trình sấy phun từ 2 kg/cm<sup>2</sup> đến 3 kg/cm<sup>2</sup>.

Qua kết quả nghi ên cứu cho thấy, khi tăng áp suất kh ín ến trong quá trình sấy phun sẽ làm giảm kích thước hạt, giảm các giá trị nhiệt độ quyết định đặc t ính của bột rau má. Những thay đổi trên không những tác động đến t ính chất vật lý của bột mà còn làm biến đổi hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll và hoạt t ính chống oxy hóa của bột rau má thu được sau sấy phun.

*Từ tất cả các kết quả phân t ích ở trên cho thấy, quá trình sấy phun với áp suất kh ín ến 3 kg/cm<sup>2</sup> thì bột rau má thu được có hàm lượng polyphenol, có hàm lượng chlorophyll, hoạt t ính chống oxy hóa tổng cao nhất và hoạt t ính khử sắt thì cao hơn 90%*

so với hoạt tính khử sắt cao nhất của bột rau má thu nhận được khi sấy phun tại áp suất kh ín ến 4 kg/cm<sup>2</sup>. Hơn nữa, khi sấy phun với áp suất kh ín ến 3 kg/cm<sup>2</sup> thì bột rau má thìa cũng có độ tan tốt, có kích thước hạt trung bình thấp; có nhiệt gây mất nước hấp thụ trong phân tử bột thấp, có nhiệt độ phân hủy các nhóm chức trong phân tử bột và nhiệt độ phân hủy hoàn toàn của các phân tử trong bột cao. Điều này chứng tỏ khi sấy phun với áp suất kh ín ến 3 kg/cm<sup>2</sup> thì bột rau má dễ tách nước, dễ khô, dễ tạo bột và các hợp chất sinh học được bảo vệ tốt hơn trong quá trình sấy phun. Vậy nên giá trị áp suất kh ín ến 3 kg/cm<sup>2</sup> và khoảng áp suất kh ín ến 2 ÷ 4 (kg/cm<sup>2</sup>) là phù hợp để sấy phun thu nhận bột rau má chứa các hợp chất sinh học có hoạt tính chống oxy hóa.

### 3.3.2. Tối ưu quá trình công đoạn sấy phun tạo bột polyphenol và chlorophyll từ rau má thìa

Từ kết quả khảo sát các điều kiện sấy của công đoạn sấy phun tạo bột polyphenol, chlorophyll từ rau má luận án tiến hành nghiên cứu tối ưu hóa công đoạn sấy phun với mục tiêu thu nhận được bột polyphenol, chlorophyll từ rau má có hàm lượng polyphenol với hoạt tính chống oxy hóa cao nhất và đồng thời cũng có hàm lượng chlorophyll cao nhằm tạo màu xanh cho bột thu nhận được.

Miền nghiên cứu của các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa trong bột sấy phun: nồng độ gum arabic (X<sub>1</sub>: 50 ÷ 100 g/l, δ<sub>1</sub>=25), nhiệt độ sấy (X<sub>2</sub>: 160 ÷ 200 oC, δ<sub>2</sub>=20) và áp suất kh ín ến (X<sub>3</sub>: 2 ÷ 4 kg/cm<sup>2</sup>, δ<sub>3</sub>=1,0). Tối ưu hóa được bố trí theo mô hình mặt đáp ứng Box-Behnken với các hàm mục tiêu: Hàm lượng polyphenol Y<sub>1</sub> (mg acid galic/g), hàm lượng chlorophyll Y<sub>2</sub> (mg/g) và hoạt tính chống oxy hóa tổng Y<sub>3</sub> (mg acid ascorbic/g).

Kết quả thí nghiệm tối ưu hóa công đoạn sấy phun tạo bột chứa polyphenol và chlorophyll với hàm lượng và hoạt tính chống oxy hóa cao được trình bày ở bảng 3.10.

**Bảng 3.10. Kết quả tối ưu hóa công đoạn sấy phun tạo bột polyphenol, chlorophyll từ rau má**

| X <sub>1</sub><br>(g/l) | X <sub>2</sub><br>(°C) | X <sub>3</sub><br>(kg/cm <sup>2</sup> ) | Y <sub>1</sub> (mg acid galic/g) |          | Y <sub>2</sub> (mg/g) |          | Y <sub>3</sub> (mg acid ascorbic/g) |          |
|-------------------------|------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|----------|-----------------------|----------|-------------------------------------|----------|
|                         |                        |                                         | Thực nghiệm                      | Ước đoán | Thực nghiệm           | Ước đoán | Thực nghiệm                         | Ước đoán |
| 1                       | 0                      | -1                                      | 14,52                            | 14,68    | 6,81                  | 6,81     | 7,77                                | 7,79     |
| 0                       | 0                      | 0                                       | 28,24                            | 28,49    | 10,62                 | 10,61    | 18,13                               | 19,42    |

|    |    |    |       |       |       |       |       |       |
|----|----|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1  | 0  | 1  | 15,91 | 15,28 | 5,91  | 5,84  | 11,30 | 11,50 |
| 1  | -1 | 0  | 15,82 | 16,03 | 5,61  | 5,65  | 7,81  | 8,19  |
| 1  | 1  | 0  | 9,03  | 9,29  | 4,23  | 4,26  | 9,10  | 8,50  |
| -1 | 0  | 1  | 18,62 | 18,46 | 5,03  | 5,03  | 13,94 | 13,91 |
| 0  | 1  | -1 | 15,37 | 14,95 | 5,43  | 5,40  | 12,61 | 13,18 |
| -1 | 0  | -1 | 14,19 | 14,82 | 5,28  | 5,35  | 15,10 | 14,90 |
| 0  | 0  | 0  | 28,10 | 28,49 | 10,56 | 10,61 | 19,91 | 19,42 |
| -1 | 1  | 0  | 14,53 | 14,32 | 3,06  | 3,02  | 11,33 | 10,95 |
| 0  | 0  | 0  | 28,15 | 28,49 | 10,59 | 10,61 | 20,04 | 19,42 |
| 0  | -1 | -1 | 14,31 | 13,95 | 7,18  | 7,14  | 14,26 | 13,85 |
| 0  | -1 | 1  | 20,02 | 20,44 | 6,21  | 6,24  | 17,12 | 16,55 |
| 0  | 0  | 0  | 28,88 | 28,49 | 10,68 | 10,61 | 19,19 | 19,42 |
| -1 | -1 | 0  | 14,59 | 14,32 | 4,63  | 4,60  | 14,67 | 15,27 |
| 0  | 0  | 0  | 29,09 | 28,49 | 10,58 | 10,61 | 19,84 | 19,42 |
| 0  | 1  | 1  | 12,34 | 12,70 | 4,97  | 5,01  | 12,80 | 13,20 |

Kết quả tối ưu hóa công đoạn sấy phun tạo bột chứa polyphenol và chlorophyll trong bột ở bảng 3.10 cho thấy:

#### \* Về hàm lượng polyphenol

Kết quả thực nghiệm tối ưu hóa cho thấy hàm mục tiêu hàm lượng polyphenol ( $Y_1$ ) có trong bột rau má thay dao động trong khoảng 9,03 ÷ 29,09 (mg acid galic/g) và giá trị trung bình là 18,92 mg acid galic/g. Phương trình hồi quy hàm lượng polyphenol  $Y_1$  có độ lệch chuẩn (SD) là 0,60, hệ số hồi qui ( $R^2$ ) là 0,996, hệ số hồi qui điều chỉnh ( $Adj-R^2$ ) là 0,992, điều này xác nhận rằng mô hình này có ý nghĩa ( $p < 0,01$ ). Dữ liệu phân tích cũng chỉ ra hàm lượng polyphenol trong bột rau má thay đổi theo mô hình bậc 2, phụ thuộc mạnh vào các yếu tố tác động đến quá trình sấy với xác suất  $p < 0,01$  và sự tương quan giữa các biến trong hàm mục tiêu có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Kết quả tối ưu hóa cũng cho thấy phương trình hồi quy của hàm lượng polyphenol như sau:

$$Y_1 = 28,49 - 0,83X_1 - 1,68X_2 + 1,06X_3 - 1,68X_1X_2 - 0,76X_1X_3 - 2,18X_2X_3 - 7,35X_1^2 - 7,65X_2^2 - 5,33X_3^2$$

### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Hàm mục tiêu hàm lượng chlorophyll ( $Y_2$ ) có trong bột rau má thìa dao động trong khoảng  $3,06 \div 10,68$  (mg/g) và giá trị trung bình là 6,90 mg/g. Phương trình hồi quy hàm lượng chlorophyll  $Y_2$  có độ lệch chuẩn (SD) là 0,06, hệ số hồi qui ( $R^2$ ) là 0,998, hệ số hồi qui điều chỉnh ( $Adj-R^2$ ) là 0,997, điều này cho thấy rằng mô hình này có ý nghĩa ( $p < 0,01$ ). Dữ liệu phân tích cũng chỉ ra hàm lượng chlorophyll trong bột rau má thìa tuân theo mô hình bậc 2, phụ thuộc vào các yếu tố tác động đến quá trình sấy với xác suất  $p < 0,01$  và sự tương quan giữa các biến trong hàm mục tiêu có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Kết quả tối ưu hóa cũng cho thấy phương trình hồi quy của hàm lượng chlorophyll như sau:

$$Y_2 = 10,61 + 0,57X_1 - 0,74X_2 - 0,32X_3 + 0,05X_1X_2 - 0,16X_1X_3 + 0,13X_2X_3 - 3,21X_1^2 - 3,02X_2^2 - 1,64X_3^2$$

### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Kết quả thực nghiệm tối ưu hóa cũng cho thấy hàm mục tiêu hoạt tính chống oxy hóa tổng ( $Y_3$ ) của bột rau má thìa dao động trong khoảng  $7,77 \div 20,04$  (mg acid ascorbic/g) và giá trị trung bình là 14,41 mg acid ascorbic/g. Phương trình hồi quy hoạt tính chống oxy hóa tổng  $Y_3$  có độ lệch chuẩn (SD) là 0,81, hệ số hồi qui ( $R^2$ ) là 0,983, hệ số hồi qui điều chỉnh ( $Adj-R^2$ ) là 0,962, điều này xác nhận rằng mô hình này có ý nghĩa ( $p < 0,01$ ). Dữ liệu phân tích cũng chỉ ra hoạt tính chống oxy hóa tổng trong bột rau má thìa tuân theo mô hình bậc 2, phụ thuộc vào các yếu tố tác động đến quá trình sấy với xác suất  $p < 0,01$  và sự tương quan giữa các biến trong hàm mục tiêu có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Kết quả tối ưu hóa cũng cho thấy phương trình hồi quy hoạt tính chống oxy hóa tổng như sau:

$$Y_3 = 19,42 - 2,38X_1 - 1,00X_2 + 0,68X_3 + 1,16X_1X_2 + 1,17X_1X_3 - 0,67X_2X_3 - 5,43X_1^2 - 3,26X_2^2 - 1,96X_3^2$$

Phân tích thống kê cho thấy mô hình bậc 2 là phù hợp và có tác động mạnh lên xu thế biến đổi của các hàm mục tiêu bởi tác động của các yếu tố ảnh hưởng. Hệ số ý nghĩa của các mô hình mục tiêu đều có giá trị thống kê ( $p < 0,05$ ) và độ không tương

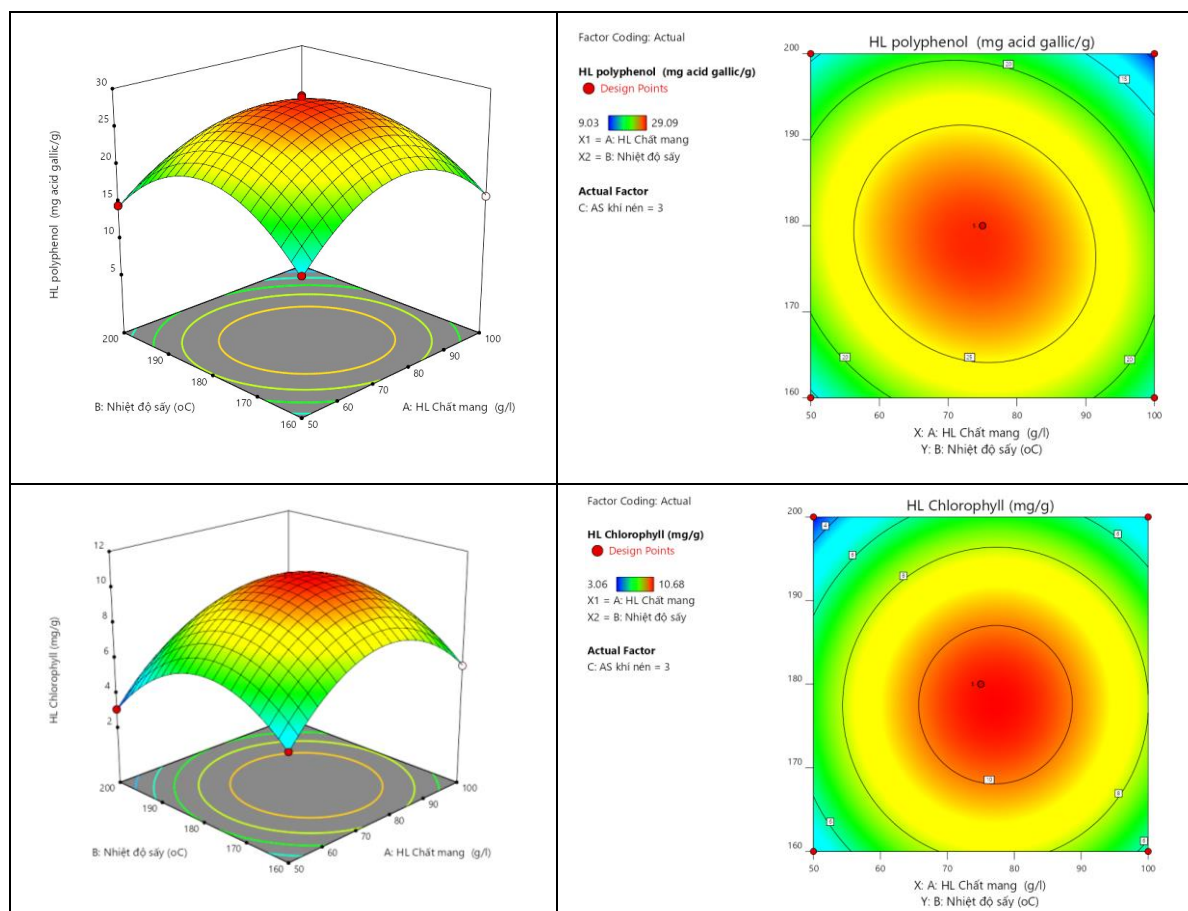


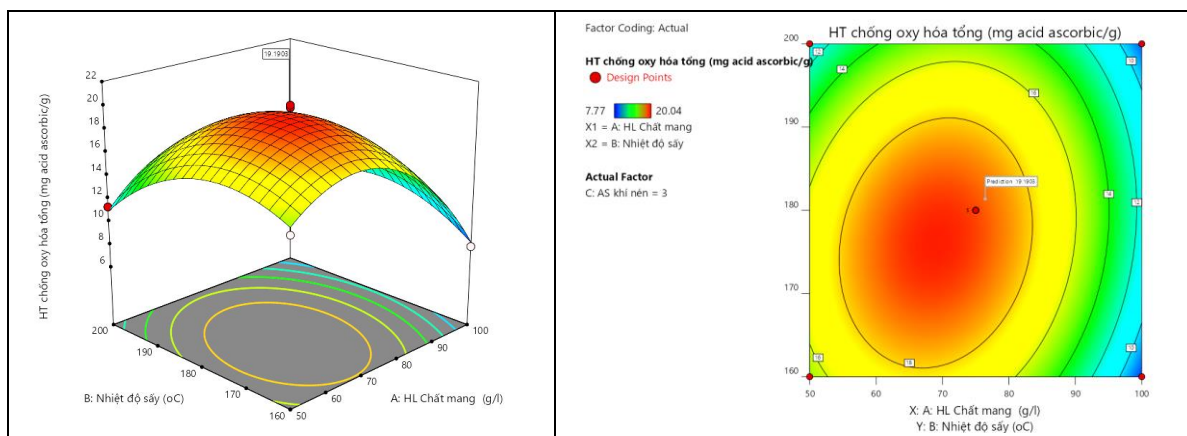
thích của mô hình là không có ý nghĩa. Các mô hình mục tiêu  $Y_1$ ,  $Y_2$  và  $Y_3$  có giá trị F biến đổi từ 46,14 đến 3.174, tương ứng với các giá trị p đều nhỏ hơn 0,0001, đồng nghĩa các bề mặt đáp ứng theo mô hình Box-Behnken là phù hợp (bảng 3.11)

**Bảng 3. 11. Hệ số ý nghĩa của mô hình mục tiêu**

| Mô hình                                     | Hàm mục tiêu | Tổng bình phương | Trung bình bình phương | F      | p       |
|---------------------------------------------|--------------|------------------|------------------------|--------|---------|
| Bề mặt đáp ứng bậc 2                        | $Y_1$        | 731,12           | 81,24                  | 224,95 | <0,0001 |
|                                             | $Y_2$        | 110,89           | 12,32                  | 3.174  | <0,0001 |
|                                             | $Y_3$        | 272,49           | 30,28                  | 46,14  | <0,0001 |
| Độ không phù hợp của mô hình (Lack off fit) | $Y_1$        | 1,690            | 0,562                  | 2,67   | 0,183   |
|                                             | $Y_2$        | 0,018            | 0,006                  | 2,82   | 0,171   |
|                                             | $Y_3$        | 2,080            | 0,692                  | 1,10   | 0,447   |

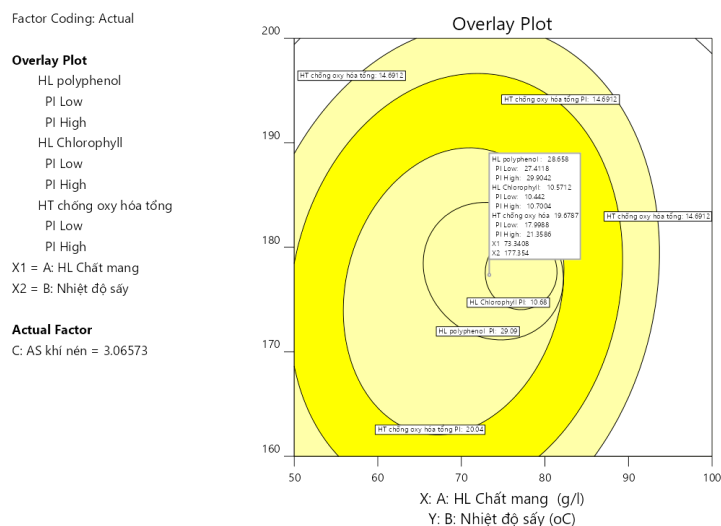
Phân tích độ không phù hợp của mô hình cũng thấy rằng, tất cả độ không phù hợp của mô hình đều không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ), điều này đã thỏa mãn tính phù hợp của mô hình. Sự tác động của các nhân tố đầu vào  $X_1$ ,  $X_2$  và  $X_3$  đến hàm mục tiêu  $Y_1$ ,  $Y_2$  và  $Y_3$  là tương đối tương đồng, thể hiện qua giá trị p nhỏ ( $p < 0,05$ ).





**H ình 3.51. C ác mặt đáp ứng tối ưu thực nghiệm**

Giải các phương trình hồi quy xác định được giá trị tối ưu của các biến ( $X_1$ ,  $X_2$  và  $X_3$ ). Dữ liệu được tính toán trên phần mềm Design Expert 12 và tính toán trùng lặp các mặt đáp ứng (h ình 3.52) để tìm điểm tối ưu tiên đoán với hàm lượng chất mang  $X_1$  (73,34 g/l), nhiệt độ sấy  $X_2$  (177,35°C), áp suất kh ín ến  $X_3$  (3,07 kg/cm<sup>2</sup>) và các hàm mục tiêu tiên đoán với hàm lượng polyphenol  $Y_1$  (28,66 mg acid galic/g), hàm lượng chlorophyll  $Y_2$  (10,57 mg/g), hoạt tính chống oxy hóa tổng  $Y_3$  (19,68 mg acid ascorbic/g).



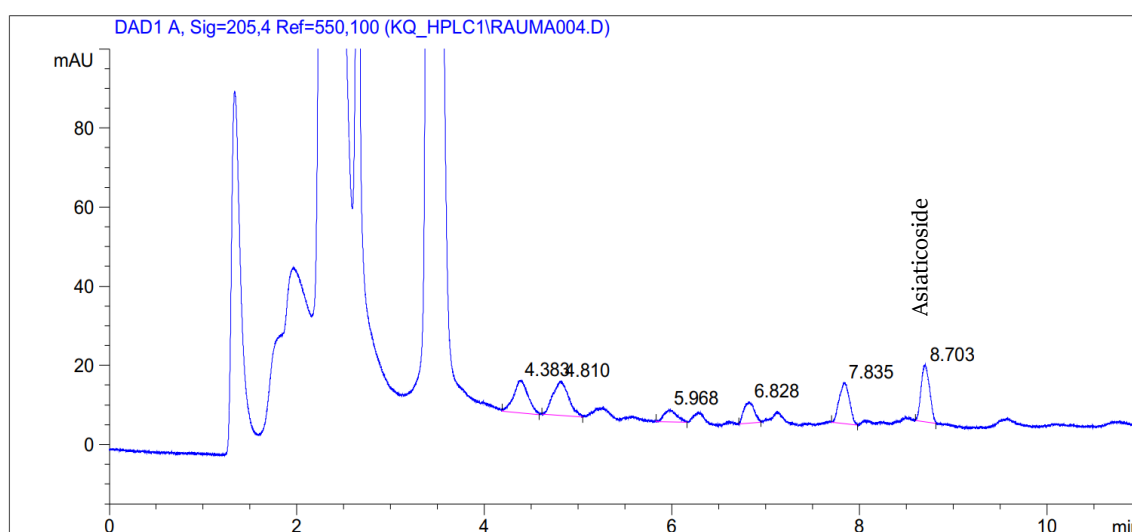
**H ình 3.52. Bề mặt tối ưu trùng lặp các mặt đáp ứng**

Tiến hành thực nghiệm lặp lại 3 lần ở điều kiện hàm lượng chất mang  $X_1$  (73,0 g/L), nhiệt độ sấy  $X_2$  (177,0°C), áp suất kh ín ến  $X_3$  (3,1 kg/cm<sup>2</sup>) và giá trị các hàm mục tiêu thực nghiệm với hàm lượng polyphenol  $Y_1$  (28,15±1,13 mg acid galic/g), hàm lượng chlorophyll  $Y_2$  (10,62±0,27 mg/g), hoạt tính chống oxy hóa tổng  $Y_3$  (19,47±0,42 mg acid ascorbic/g).

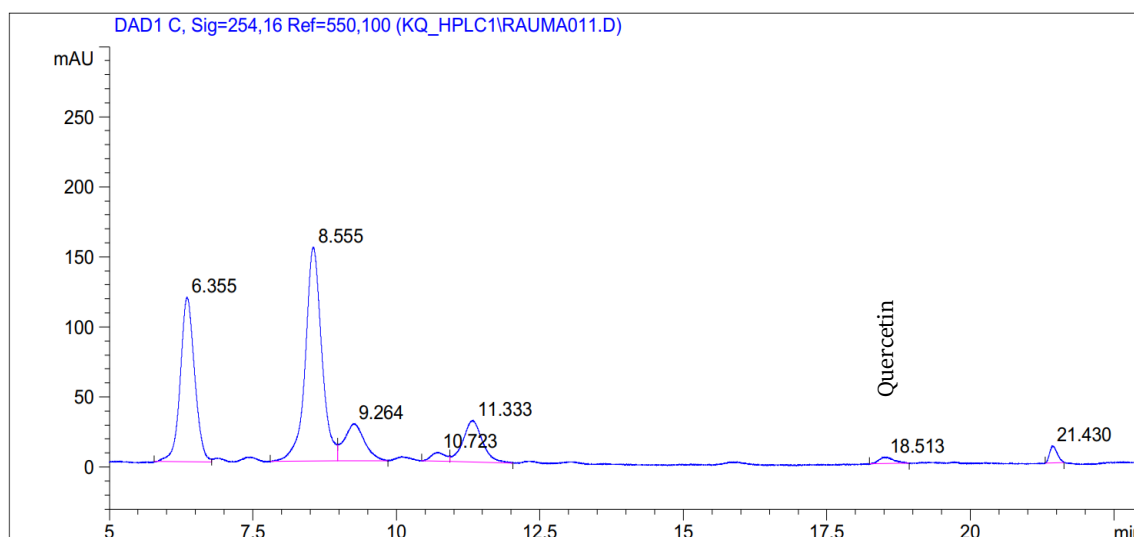
Từ kết quả tối ưu hóa thực nghiệm sấy phun thu nhận bột rau má thì đã chọn điều kiện tối ưu trong quá trình sấy phun sử dụng chất mang gum arabic với tốc độ đĩa phun 20.00 v/p, nồng độ gum arabic 73 g/l, nhiệt độ sấy phun 177°C và áp suất kh ín ến 3,1 kg/cm<sup>2</sup>. Bột rau má thì à tại điều kiện sấy phun tối ưu cũng được đánh giá hoạt t ính khử sắt và hiệu suất thu hồi với gi á trị ph ần t ích thực nghiệm lần lượt có gi á trị tương ứng là 59,50 ± 2,08 mg FeSO<sub>4</sub>/g và 82,72%.

Từ kết quả tối ưu hóa và thực nghiệm th ỉ nghiệm kiểm chứng ở tr ên cho thấy điều kiện tối ưu để sấy phun thu nhận bột rau má thì à có chứa hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt t ính chống oxy h ố hóa tổng cao nhất là: nồng độ gum arabic tối ưu 73 g/l, nhiệt độ sấy phun tối ưu 177°C và áp suất kh ín ến tối ưu 3,1 kg/cm<sup>2</sup>. Khi sấy phun ở điều kiện tối ưu thì bột rau má thì à thu nhận được có hàm lượng polyphenol là 28,15 ± 1,13 mg acid galic/g, hàm lượng chlorophyll là 10,62 ± 0,27 mg/g, hoạt t ính chống oxy h ố hóa tổng là 19,47 ± 0,42 mg acid ascorbic/g, hoạt t ính khử sắt là 59,50 ± 2,08 mg FeSO<sub>4</sub>/g. Kết quả xác định hiệu suất thu hồi bột rau má và thu hồi các chất có hoạt t ính sinh học trong bột rau má thì à ở điều kiện sấy phun tối ưu cho thấy hiệu suất thu hồi bột sấy phun dịch chiết rau má thì à là 82,72% và hiệu suất thu hồi polyphenol, chlorophyll của bột rau sấy phun tương ứng là 78,69%, 74,83% so với hàm lượng polyphenol, chlorophyll có trong dịch chiết trước khi sấy phun.

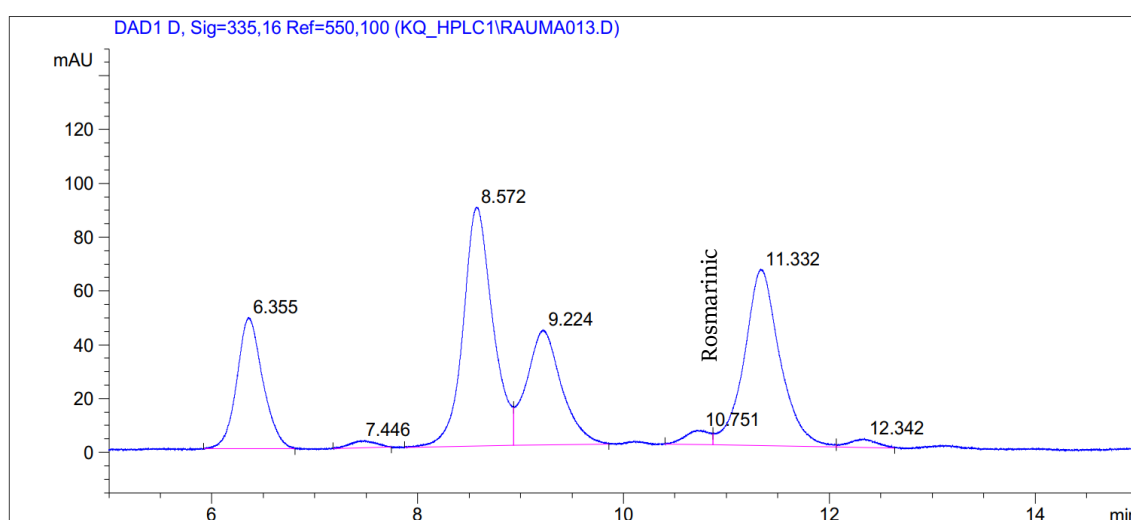
Ngo ài ra, luận án cũng phân tích một số hợp chất có hoạt t ính sinh học khác có trong bột sấy phun bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC. Kết quả ph ần t ích được tr ình bày ở h ình 3.53, 3.54 và 3.55.



**H ình 3.53. Sắc ký đồ HPLC ph ần t ích asiaticoside trong bột rau má**



**H ình 3.54. Sắc ký đồ HPLC ph ãn t ích quercetin trong bột rau má**



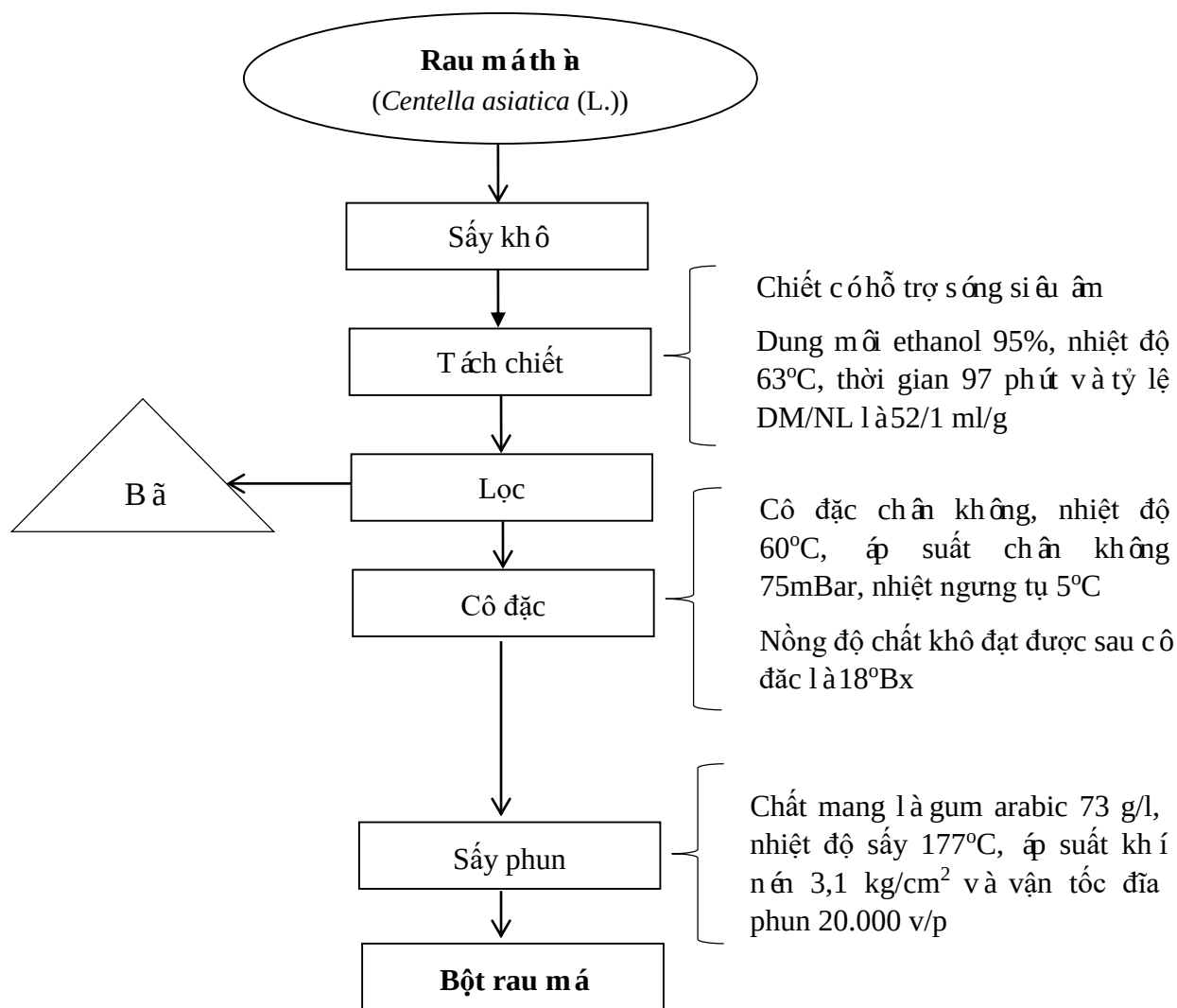
**H ình 3.55. Sắc ký đồ HPLC ph ãn t ích acid rosmarinic trong bột rau má**

Kết quả ph ãn t ích HPLC về c ác chất c ó trong bột sấy phun dịch chiết từ rau má th ã sử dụng chất mang gum arabic, tốc độ đĩa phun 20.000 v/p trong điều kiện tối ưu về nhiệt độ, nồng độ chất mang gum arabic, áp suất kh ín ín cho thấy ngo ài polyphenol, chlorophyll th ã bột sấy phun c òn chứa một số hợp chất sinh học khác như: asiaticoside (2,39 mg/g), quercetin (0,21 mg/g) và acid rosmarinic (0,22 mg/g). Hàm lượng c ác hợp chất asiaticoside, quercetin và rosmarinic c ó trong bột rau má sấy phun cao gấp tương ứng 1,36, 1,5 và 2,2 (lần) so với trong dịch chiết rau má ở điều kiện tối ưu. Kết quả này c òng khẳng định, quá trình sấy phun các hợp chất sinh học được bảo vệ bởi chất mang gum arabic. Tuy nhi ãn, do c ác chất kể tr ên kh ông thuộc phạm vi của luận án n ên luận án kh ông tiến hành th ãn c ác nghi ãn cứu về c ác hợp chất này trong qu á tr ãnh sấy phun tạo bột rau má

### 3.3.3. Quy trình sấy phun tạo bột rau má thà chứa polyphenol và chlorophyll

#### 3.3.3.1. Đề xuất quy trình sấy phun tạo bột rau má thà

Từ các kết quả nghiên cứu được ở trên, luận án đề xuất quy trình sấy phun tạo bột rau má thà chứa polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa được trình bày ở hình 3.56.



Hình 3.56. Quy trình sấy phun tạo bột rau má thà

\* **Nguyên liệu:** Rau má thà 60÷75 ngày tuổi trồng ở Nha Trang - Khánh Hòa được thu hoạch và loại bỏ tạp chất, lá vàng, lá úa. Sau đó rau má được làm sạch bằng máy rửa sục khí và làm ráo nước nhờ máy ly tâm lọc để chuẩn bị cho công đoạn sấy khô.

\* **Sấy khô:** Rau má được trải ra vỉ sấy và sấy khô bằng tủ sấy nhiệt có bức xạ hồng ngoại trong điều kiện không khí đối lưu cưỡng bức ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 8 giờ, rau má sau sấy được kiểm tra độ ẩm 8%. Sau khi sấy khô, rau má được bao gói chân không bằng túi PA có tráng nhôm và được lưu trữ trong kho mát, tránh ánh nắng.

\* **Chiết tách:** Nguyên liệu rau má sẽ được nghiền nhỏ bằng máy nghiền đến kích thước 0,5mm để sử dụng cho quá trình chiết. Tiến hành chiết các polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa bằng máy chiết siêu âm có tần số sóng siêu âm 37kHz với dung môi chiết là ethanol 95%, tỷ lệ DM/NL là 52/1 (ml/g) tại nhiệt độ 63°C trong thời gian chiết là 97 phút. Quá trình chiết được thực hiện 1 lần để thu dịch chiết rau má

\* **Lọc:** Dịch chiết rau má thu nhận sau chiết chứa các polyphenol, chlorophyll được lọc tách bã qua 2 bước, trước tiên là lọc thô bằng vải lọc để loại bã chiết thô và dịch chiết thô thu được sau lọc thô sẽ qua lọc tinh bằng máy lọc chân không với kích thước màng lọc là 0,1mm.

\* **Cô đặc:** Thực hiện bằng thiết bị cô đặc chân không với áp suất chân không 75mBar, nhiệt độ cô đặc 60°C và thời gian cô đặc là 5 phút. Tổng hàm lượng chất khô trong dịch chiết rau má thừa sau cô đặc đạt được 18°Bx.

\* **Sấy phun:** Thực hiện quá trình sấy phun dịch rau má thừa bằng máy sấy phun sương dạng đĩa phun. Trước khi sấy phun, dịch rau má sau cô đặc được bổ sung chất mang là gum arabic với hàm lượng 73 g/l. Quá trình sấy phun được thực hiện với nhiệt độ sấy 177°C, áp suất khinén 3,1 kg/cm<sup>2</sup> và vận tốc đĩa phun 20.000 v/p.

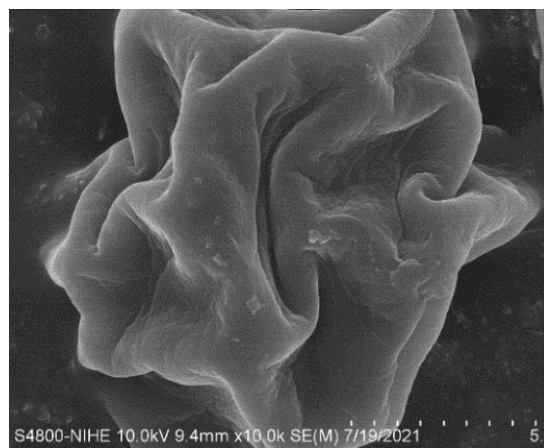
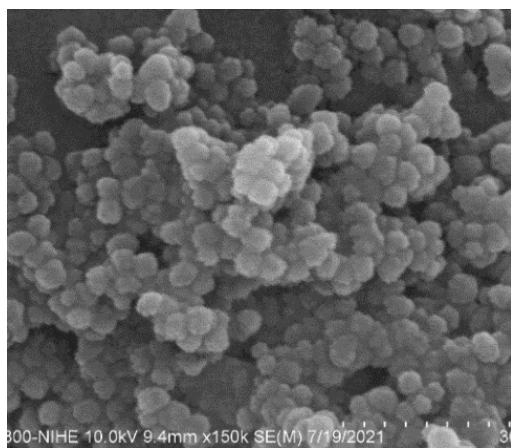
### 3.3.3.2. Đánh giá chất lượng bột rau má

Từ quy trình đề xuất ở trên, tiến hành sản xuất bột sấy phun chứa polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa, kết quả đánh giá bột sấy phun được trình bày ở các hình 3.57 ÷ 3.60 và bảng 3.12 ÷ 3.13.

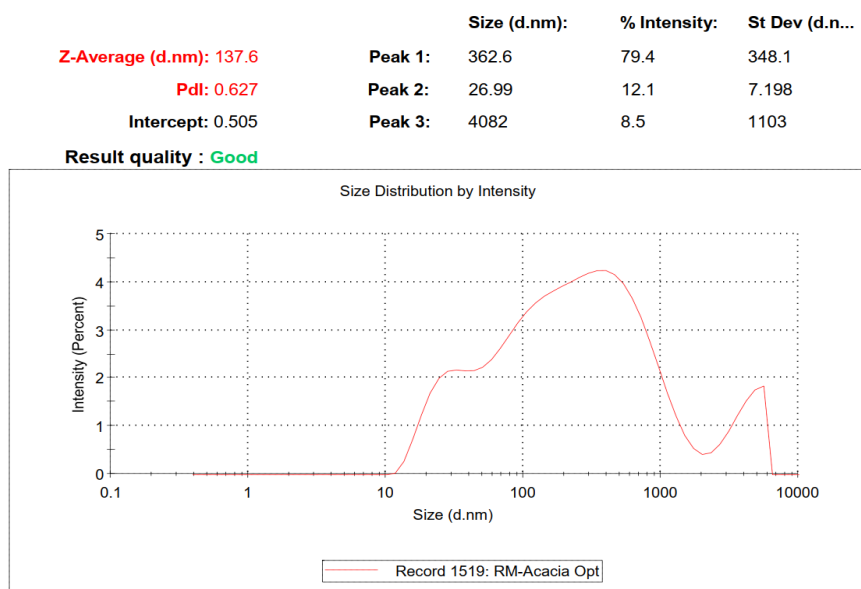


**Hình 3.57. Ảnh chụp bột sấy phun và ảnh của bột rau má dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1.000x**

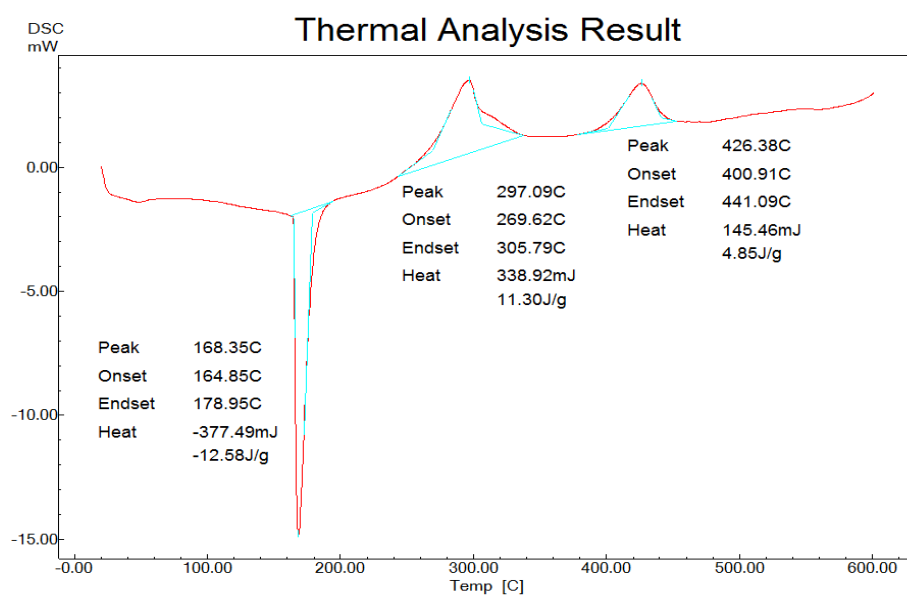




**Hình 3.58. Ảnh của bột rau má dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM)**



**Hình 3.59. Phổ phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán của bột rau má ở điều kiện sấy phun tối ưu**



**Hình 3.60. Phổ nhiệt vi sai của bột rau má ở điều kiện sấy phun tối ưu**

**Bảng 3.12. Kết quả phân tích cảm quan, độ ẩm và độ tan của bột rau má**

| STT | Chỉ tiêu | Kết quả                                             | Ghi chú |
|-----|----------|-----------------------------------------------------|---------|
| 1   | Cảm quan | Màu sắc xanh tươi sáng, có độ mịn và độ tơi xốp cao |         |
| 2   | Độ ẩm    | 5,25%                                               |         |
| 3   | Độ tan   | Dễ tan                                              |         |

**Bảng 3.13. Kết quả kiểm nghiệm kim loại nặng và vi sinh vật của bột rau má**

| STT                         | Chỉ tiêu kiểm nghiệm    | Đơn vị tính | Giới hạn cho phép | Kết quả       | Ghi chú |
|-----------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|---------------|---------|
| <i>Chỉ tiêu hóa học</i>     |                         |             |                   |               |         |
| 1                           | Asen (As)               | mg/kg       | 1,0               | 0,04          |         |
| 2                           | Cadimi (Cd)             | mg/kg       | 1,0               | KPH (MDL=0,2) |         |
| 3                           | Chì (Pb)                | mg/kg       | 2,0               | KPH (MDL=0,2) |         |
| 4                           | Thủy ngân (Hg)          | mg/kg       | 0,1               | KPH (MDL=0,2) |         |
| <i>Chỉ tiêu vi sinh vật</i> |                         |             |                   |               |         |
| 1                           | <i>Salmonella</i>       | CFU/gam     | KPH               | KPH           |         |
| 2                           | <i>Escherichia coli</i> | CFU/gam     | 10 <sup>2</sup>   | KPH           |         |

Kết quả đánh giá cảm quan (phương pháp cho điểm theo TCVN 3215:1979) cho thấy bột polyphenol và chlorophyll từ rau má có màu sắc xanh tươi sáng, có độ mịn và độ tơi xốp cao, dễ tan, có độ ẩm là 5,25% (Bảng 3.12). Tiến hành soi bột rau má dưới kính hiển vi soi nổi với độ phóng đại 1.000x cho thấy hoạt chất được bao phủ vào bên trong bởi chất mang gum arabic (hình 3.57). Bột rau má cũng được phân tích bằng kỹ thuật soi qua kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy bột rau má có hình dạng hạt theo xu hướng cấu trúc hình cầu (hình 3.58). Bột rau má cũng được đo phân bố kích thước hạt và chỉ số đa phân tán (Pdi) có kết quả kích thước hạt trung bình (Z) của bột nhỏ 137,6 nm và độ đa phân tán của bột (Pdi) là 0,627 (hình 3.59).

Kết quả phân tích từ đặc tính nhiệt vi sai của bột rau má cho thấy bột có peak thu nhiệt  $T_m$  ở 168,35°C – kết quả này cho biết có sự mất nước hấp thụ trong phân tử bột tại nhiệt độ này. Không có peak thu nhiệt  $T_d$  thể hiện không xảy ra sự đứt gãy các liên kết có trong thành phần của bột rau má. Có peak tỏa nhiệt  $T_n$  ở 297,09°C thể hiện có sự phân hủy nhóm chức đặc trưng trong phân tử bột rau má tại nhiệt độ này. Ngoài ra còn có một peak tỏa nhiệt  $T_p$  ở 426,38°C – đây là nhiệt độ xảy ra sự phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột (hình 3.60).

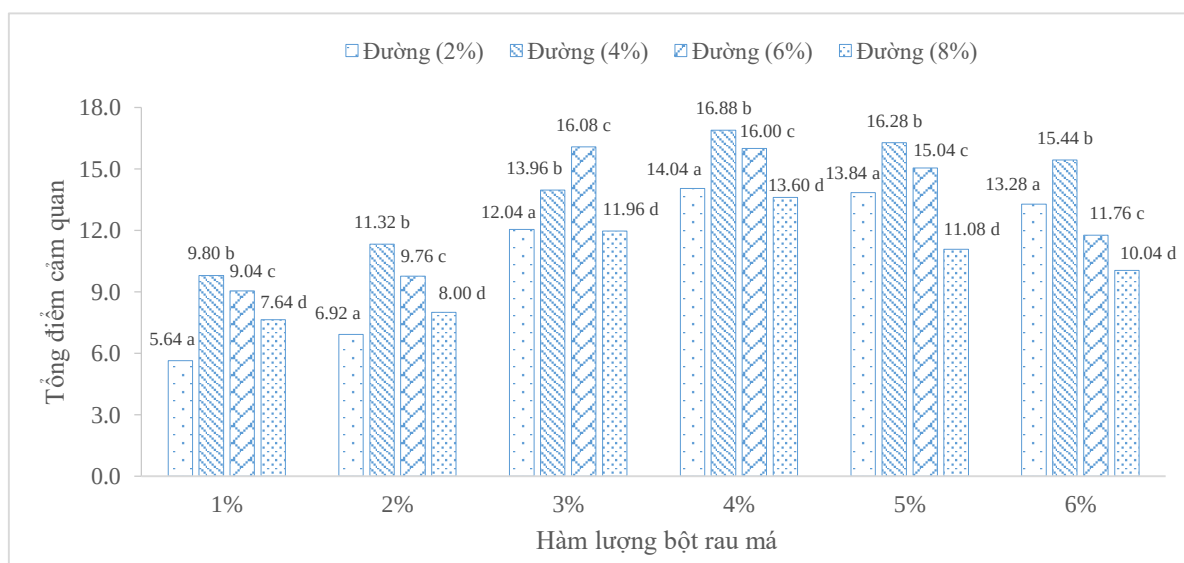


Kết quả kiểm nghiệm các chỉ tiêu hóa học (Theo quy chuẩn Việt Nam QCVN 8-2: 2011/BYT) và vi sinh vật (Theo quy chuẩn Việt Nam QCVN 8-3: 2012/BYT) cho thấy bột rau má đã sấy phun đạt yêu cầu về các chỉ tiêu kim loại nặng và vi sinh theo quy định hiện hành của Bộ Y tế về giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm (Bảng 3.13).

Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy bột rau má đã chứa polyphenol và chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa có cảm quan về màu sắc tốt (màu xanh tươi sáng), trạng thái bột tốt (có độ mịn và độ tơi xốp cao, dễ tan, có độ ẩm là 5,25%), có kích thước hạt trung bình thấp (137,6 nm) và các điểm nhiệt về đặc tính nhiệt vi sai của bột tốt. Bột rau má có chứa hàm lượng hợp chất sinh học cao (hàm lượng polyphenol là  $28,15 \pm 1,13$  mg acid galic/g, chlorophyll là  $10,62 \pm 0,27$  mg/g) và hoạt tính cao (hoạt tính chống oxy hóa tổng là  $19,47 \pm 0,42$  mg acid ascorbic/g, hoạt tính khử sắt là  $59,50 \pm 2,08$  mg  $\text{FeSO}_4$ /g). Bên cạnh đó, trong bột rau má còn có chứa các hợp chất sinh học phổ biến khác như asiaticoside (2,39 mg/g), quercetin (0,21 mg/g), rosmarinic acid (0,22 mg/g) và đạt yêu cầu về giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm.

### 3.3.3.3. Xác định công thức nước rau má thích hợp

Để xác định công thức nước rau má tiến hành với mỗi mẫu thí nghiệm là 50ml thể tích nước tinh khiết có các nồng độ khác nhau bột rau má là 1, 2, 3, 4, 5, 6 (%) và đường saccharose là 2, 4, 6, 8 (%) để tạo vị ngọt. Các mẫu nước rau má sau phối trộn được đánh giá cảm quan (TCVN 3215:1979). Kết quả được trình bày ở hình 3.61.



**Hình 3.61. Ảnh hưởng nồng độ bột rau má và đường saccharose đến điểm cảm quan**

Từ các kết quả thí nghiệm trình bày ở các hình 3.61 cho thấy hàm lượng bột rau má và hàm lượng đường saccharose có ảnh hưởng đến tổng điểm cảm quan của các mẫu nước rau má. Cụ thể, trong các hàm lượng đường đã khảo sát thì mẫu nước rau má có hàm lượng đường 4% cho tổng điểm cảm quan cao hơn so với các mẫu nước rau má có hàm lượng đường khác. Cụ thể, xét các mẫu nước rau má có hàm lượng bột rau má 4%, khi thêm đường với hàm lượng 4% sẽ cho tổng điểm cảm quan cao gấp 1,2, 1,06, 1,24 lần so với tổng điểm cảm quan của nước rau má khi thêm đường với hàm lượng tương ứng là 2, 6 và 8%. Như vậy, khi mẫu nước rau má có hàm lượng bột rau má 4%, nếu được bổ sung thêm hàm lượng đường 4% sẽ cho tổng điểm cảm quan cao hơn so với nước rau má có bổ sung thêm đường với các hàm lượng khác.

Kết quả phân tích còn cho thấy trong cùng các hàm lượng đường khảo sát thì nước rau má có hàm lượng bột rau má 4% có tổng điểm cảm quan cao hơn so với nước rau má có bột rau má với hàm lượng khác. Cụ thể, xét nước rau má với hàm lượng đường 4%, nếu thêm bột rau má với hàm lượng 4% sẽ cho tổng điểm cảm quan cao gấp 1,72, 1,49, 1,21, 1,04 và 1,09 (lần) so với tổng điểm cảm quan của nước rau má khi có bột rau má với các hàm lượng là 1, 2, 3, 5 và 6 (%).

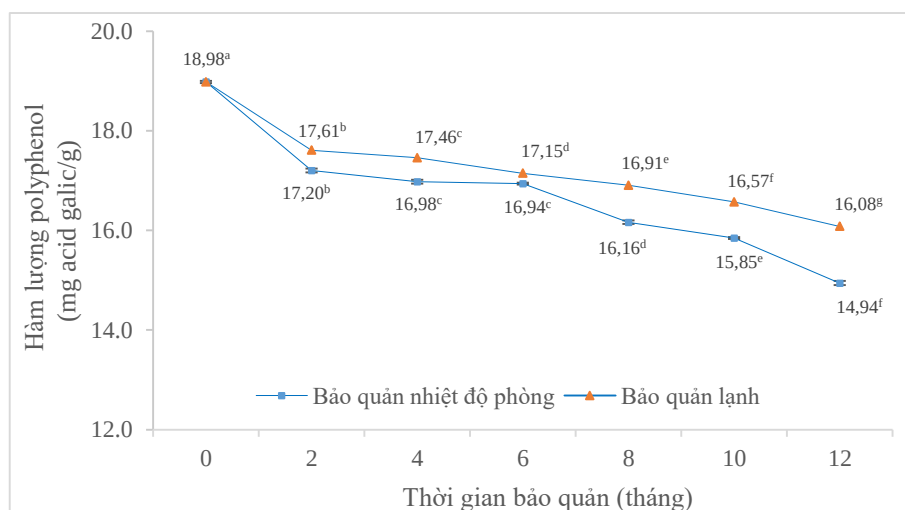
*Từ kết quả phân tích ở trên cho thấy nước rau má có hàm lượng bột rau má 4% và hàm lượng đường 4% sẽ cho tổng điểm cảm quan là 16,88 điểm và đạt loại khá, đạt điểm cao nhất so với tổng điểm cảm quan của nước rau má ở các hàm lượng bột rau má và hàm lượng đường khác đã sử dụng trong luận án. Do vậy, nếu xét theo khía cạnh tổng điểm cảm quan cao thì nước rau má có hàm lượng bột rau má 4% và hàm lượng đường 4% được chọn làm cơ sở phối trộn tạo công thức cho bột rau má thìa để làm đồ uống và khi đó nước rau má có hoạt tính chống oxy hóa tổng là  $67,23 \pm 1,44$  mg acid ascorbic/100 ml, hoạt tính khử sắt là  $195,63 \pm 2,99$  mg FeSO<sub>4</sub>/100 ml, hoạt tính bắt gốc tự do DPPH là  $64,73 \pm 1,47$  %.*

#### **3.3.4. Đánh giá biến động hàm lượng polyphenol và chlorophyll của bột rau má thìa trong bảo quản**

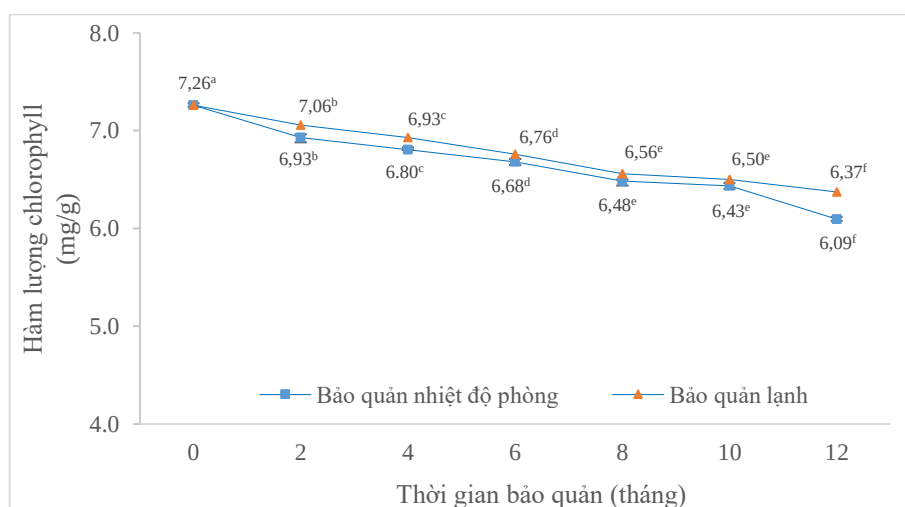
Tiến hành thí nghiệm đánh giá sự biến động hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa của bột rau má thìa trong quá trình bảo quản. Bột rau má sử

dụng cho nghiên cứu này thu nhận từ quatrình sấy phun sử dụng chất mang gum arabic với hàm lượng 100 g/l với tốc độ đĩa phun 15.000 v/p, lưu lượng nhập liệu 15 ml/p, áp suất khínén 3,0 kg/cm<sup>2</sup> và nhiệt độ sấy phun 160°C.

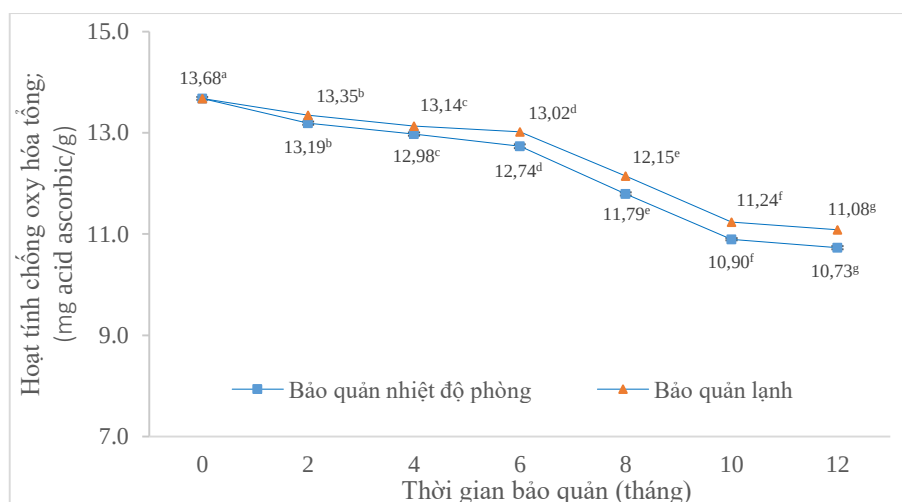
Mỗitúi mẫuchứa 20 g bột rau má được bao gói chấnkhông trong túi PA, cáctúi mẫuchứa bột rau máđược tiếnhành bảo quản ở nhiệt độ phòng và bảo quản lạnh. Bảo quản ở nhiệt độ phòng được thực hiện trong tủ vi khí hậu nóng với nhiệt độ 30±1°C, độ ẩm 70%, ánh sáng trắng có cường độ 50 Lux và bảo quản lạnh trong tủ vi khí hậu lạnh ở 5±1°C, độ ẩm 50%, ánh sáng trắng với cường độ 50 Lux. Thời gian bảo quản từ 0 ÷12 (tháng) và cứ mỗi sau 2 tháng một túi mẫu sẽ được lấy ngẫu nhiên nguyên túi đi kiểm tra hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả phân tích được trình bày ở các hình 3.62 ÷3.65.



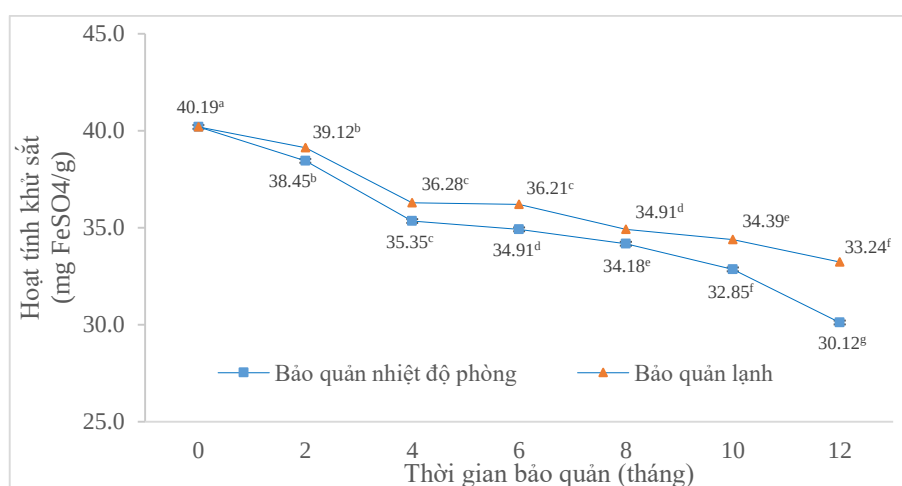
**Hình 3.62. Biến động hàm lượng polyphenol trong bột rau má khi bảo quản**



**Hình 3.63. Biến động hàm lượng chlorophyll trong bột rau má khi bảo quản**



**Hình 3.64. Biến động hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má khi bảo quản**



**Hình 3.65. Biến động hoạt tính khử sắt của bột rau má khi bảo quản**

Từ các kết quả được trình bày ở các hình 3.62 ÷ 3.65 cho thấy:

### \* Về hàm lượng polyphenol

Qua kết quả thí nghiệm ở hình 3.62 cho thấy, sau 12 tháng bảo quản thì hàm lượng polyphenol của bột rau má có xu hướng giảm theo thời gian ở cả 2 chế độ bảo quản. Cụ thể, khi bảo quản ở nhiệt độ phòng thì hàm lượng polyphenol giảm dần từ  $18,98 \pm 0,37$  xuống còn  $14,94 \pm 0,10$  (mg acid galic/g), tương ứng giảm 21,3%. Trong khi bảo quản lạnh thì hàm lượng polyphenol của bột rau má giảm từ  $18,98 \pm 0,37$  đến  $16,08 \pm 0,70$  (mg acid galic/g), tương ứng giảm 15,3%. Như vậy, hàm lượng polyphenol trong bột rau má sấy phun bảo quản ở nhiệt độ phòng có sự hao giảm nhiều hơn 6% so với bảo quản lạnh.

Hàm lượng polyphenol của bột rau má giảm nhiều nhất ở 2 tháng đầu tiên ở cả 2 điều kiện bảo quản nhiệt độ phòng và bảo quản lạnh, sự sụt giảm lần lượt tương ứng ở

hai chế độ bảo quản là 9,4% và 7,2% ( $p < 0,05$ ). Sau 4, 6, 8, 10 và 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng thì hàm lượng polyphenol của bột rau má giảm dần theo thời gian qua các tháng tương ứng với 10,5%, 10,8%, 14,8%, 16,5% và 21,3%. Tương tự, khi bảo quản lạnh thì hàm lượng polyphenol của bột rau má cũng giảm dần theo thời gian tương ứng qua các tháng như trên là 8,0%, 9,7%, 10,9%, 12,7% và 15,3%.

*Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy, hàm lượng polyphenol của bột rau má thì giảm dần theo thời gian bảo quản trong hai điều kiện thí nghiệm, trong đó bảo quản lạnh thì bột rau má có độ hao giảm polyphenol ít hơn so với bảo quản ở nhiệt độ phòng là 6%. Trong cả hai điều kiện bảo quản trên thì hàm lượng polyphenol của bột rau má giảm nhiều nhất tập trung ở hai tháng đầu tiên, cụ thể trong bảo quản lạnh giảm 7,2% và bảo quản ở nhiệt độ phòng giảm 9,4%.*

#### **\* Về hàm lượng chlorophyll**

Qua kết quả thí nghiệm ở hình 3.63 cho thấy, sau 12 tháng bảo quản thì hàm lượng chlorophyll của bột rau má có xu hướng giảm theo thời gian ở cả 2 chế độ bảo quản. Cụ thể, ở điều kiện nhiệt độ phòng thì hàm lượng chlorophyll của bột rau má thì giảm từ  $7,26 \pm 0,02$  đến  $6,09 \pm 0,23$  (mg/g), tương ứng giảm 16,1% và bảo quản lạnh thì hàm lượng chlorophyll của bột rau má thì giảm từ  $7,26 \pm 0,02$  đến  $6,37 \pm 0,18$  (mg/g), tương ứng giảm 12,2%. Như vậy, bột rau má thì bảo quản ở nhiệt độ phòng có sự hao giảm hàm lượng chlorophyll nhiều hơn 3,9% so với bảo quản lạnh.

Hàm lượng chlorophyll giảm nhiều nhất ở 2 tháng đầu tiên và tháng 10÷12 ở điều kiện bảo quản nhiệt độ phòng. Cụ thể, hàm lượng chlorophyll giảm ở 2 tháng đầu tiên từ  $7,26 \pm 0,02$  đến  $6,93 \pm 0,19$  (mg/g), tương ứng giảm 4,6% và ở tháng 10÷12 giảm từ  $6,43 \pm 0,03$  đến  $6,09 \pm 0,23$  (mg/g), tương ứng giảm 4,7% ( $p < 0,05$ ). Sau 2, 4, 6, 8, 10 và 12 tháng, khi bảo quản ở nhiệt độ phòng thì hàm lượng chlorophyll của bột rau má thì giảm tương ứng qua các tháng là 4,6%, 6,3%, 8,0%, 10,7%, 11,4% và 16,1%. Khi bảo quản lạnh thì hàm lượng chlorophyll của bột rau má thì giảm tương ứng qua các tháng như trên là 2,8%, 4,5%, 6,9%, 9,6%, 10,5% và 12,2%.

*Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy, hàm lượng chlorophyll của bột rau má thì giảm theo thời gian bảo quản trong cả hai điều kiện thí nghiệm, trong đó bảo quản lạnh có độ hao giảm chlorophyll ít hơn so với bảo quản ở nhiệt độ phòng là 3,9%. Riêng bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng thì hàm lượng chlorophyll của bột rau má giảm nhiều nhất tập trung ở hai tháng đầu tiên là 4,6% và tháng 10÷12 là 4,7%.*

### **\* Về hoạt tính chống oxy hóa tổng**

Qua kết quả thí nghiệm ở hình 3.64 cho thấy, sau 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má là giảm từ  $13,68 \pm 0,18$  đến  $10,73 \pm 0,13$  (mg acid ascorbic/g), giảm tương ứng 21,6% và ở điều kiện bảo quản lạnh thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má là giảm từ  $13,68 \pm 0,18$  đến  $11,08 \pm 0,09$  (mg acid ascorbic/g), giảm tương ứng 19,0%. Như vậy bột rau má là bảo quản nhiệt độ phòng có sự hao giảm hoạt tính chống oxy hóa tổng nhiều hơn 2,6% so với bảo quản lạnh.

Khi bảo quản bột rau má là ở nhiệt độ phòng thì hoạt tính chống oxy hóa tổng giảm nhiều nhất ở tháng thứ 6 ÷ 8 và 8 ÷ 10, giảm tương ứng 6,9% và 6,6%. Còn khi bảo quản lạnh bột rau má là thì hoạt tính chống oxy hóa tổng cũng giảm nhiều nhất cũng ở tháng thứ 6 ÷ 8 và 8 ÷ 10, giảm tương ứng 6,4% và 6,7%. Hơn nữa, sau 2, 4, 6, 8, 10 và 12 tháng trong bảo quản ở nhiệt độ phòng thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má là giảm tương ứng qua các tháng là 3,6%, 5,2%, 6,9%, 13,8%, 20,3% và 21,6%. Cũng với thời gian trên, trong điều kiện bảo quản lạnh thì hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má là giảm tương ứng qua các tháng là 2,4%, 4,0%, 4,8%, 11,2%, 17,9% và 19,0%.

*Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy hoạt tính chống oxy hóa tổng của bột rau má là giảm dần theo thời gian bảo quản trong cả hai điều kiện thí nghiệm, trong đó đều giảm nhiều nhất tập trung ở tháng thứ 6 ÷ 8 và 8 ÷ 10. Hơn nữa, khi bảo quản ở nhiệt độ phòng thì bột rau má có độ hao giảm hoạt tính chống oxy hóa tổng cao hơn so với bảo quản lạnh là 2,6%.*

### **\* Về hoạt tính khử sắt**

Qua kết quả thí nghiệm ở hình 3.65 cho thấy, sau 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng thì hoạt tính khử sắt của bột rau má giảm từ  $40,19 \pm 0,62$  đến  $30,12 \pm 0,60$  (mg FeSO<sub>4</sub>/g), tương ứng giảm 25,1% và bảo quản lạnh thì hoạt tính khử sắt của bột rau má giảm từ  $40,19 \pm 0,62$  đến  $33,24 \pm 0,64$  (mg FeSO<sub>4</sub>/g), tương ứng giảm 17,3%. Như vậy bột rau má là bảo quản ở nhiệt độ thường có sự hao giảm hoạt tính khử sắt nhiều hơn 7,8% so với bảo quản lạnh.

Ở nhiệt độ phòng thì hoạt tính khử sắt của bột rau má giảm nhiều nhất ở tháng thứ 2 ÷ 4 và 10 ÷ 12, tương ứng giảm 7,7% và 6,8%. Bảo quản ở điều kiện nhiệt độ lạnh

thì hoạt tính khử sắt giảm nhiều nhất ở tháng thứ 2 ÷ 4 với 7,1%. Hơn nữa, sau 2, 4, 6, 8, 10 và 12 tháng, trong bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng thì hoạt tính khử sắt của bột rau má thì giảm tương ứng qua các tháng là 4,3%, 12,0%, 13,1%, 15,0%, 18,3% và 25,1%. Cũng qua 12 tháng ở điều kiện bảo quản lạnh thì hoạt tính khử sắt của bột rau má thì giảm tương ứng qua các tháng là 2,7%; 9,7%; 9,9%; 13,1%; 14,4% và 17,3% ( $p < 0,05$ ).

*Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy hoạt tính khử sắt của bột rau má thì giảm theo thời gian bảo quản trong cả hai điều kiện thí nghiệm, trong đó giảm nhiều nhất ở tháng thứ 2 ÷ 4 và 10 ÷ 12 khi bảo quản ở nhiệt độ phòng, tương ứng giảm 7,7% và 6,8% và ở tháng thứ 2 ÷ 4 khi bảo quản lạnh với 7,1%. Hơn nữa, khi bảo quản ở nhiệt độ phòng sẽ có độ hao giảm hoạt tính khử sắt của bột rau má cao hơn so với bảo quản lạnh là 7,8%.*

*Từ các kết quả nghiên cứu ở trên thấy rằng các chỉ tiêu nghiên cứu của bột rau má thì đều giảm theo thời gian bảo quản ở cả 2 điều kiện khảo sát. Cụ thể, hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt của bột rau má thì sau 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng sẽ giảm tương ứng 21,3%, 16,1%, 21,6%, 25,1% và ở điều kiện bảo quản lạnh giảm tương ứng 15,3%, 12,2%, 19,0%, 17,3%. Từ đó thấy rằng, khi bảo quản ở nhiệt độ phòng thì hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt sẽ bị suy giảm nhiều hơn tương ứng 6%, 3,9%, 2,6% và 7,8% so với bảo quản lạnh.*

*Sự suy giảm các chỉ tiêu nghiên cứu của các mẫu bột rau má chủ yếu là do tác động của nhiệt độ và ánh sáng của môi trường bảo quản. Bên cạnh đó, một phần khác cũng dẫn đến sự suy giảm này là bột rau má cũng bị oxy hóa do lượng ít oxy còn lại trong túi sau khi hút chân không. Mặt khác, ở hai điều kiện bảo quản nhiệt độ phòng và bảo quản lạnh, cường độ ánh sáng được duy trì như nhau, chỉ khác nhau về nhiệt độ và độ ẩm. Tuy nhiên các mẫu bột rau má được bao gói trong túi PA nên được cách ẩm với môi trường, như vậy sự khác biệt về nhiệt độ đã tác động và dẫn đến sự khác biệt về suy giảm các chỉ tiêu nghiên cứu của các mẫu bột rau má ở hai điều kiện trong quá trình bảo quản.*

# KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

## 1. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy luận án đã hoàn thành tất cả các nội dung nghiên cứu đã đề xuất thể hiện qua các kết luận được rút ra từ quá trình nghiên cứu của luận án:

1) Luận án đã tiến hành định danh loài rau má thừ trồng tại Nha Trang bằng kỹ giải trình tự gen cho thấy DNA của rau má thừ có mức độ tương đồng 98,44% - 98,76% so với trình tự vùng *matK* và 98,21-100% so với trình tự của vùng *ITS* của loài *Centella asiatica* có sẵn trên NCBI.

2) Luận án đã đánh giá thành phần hóa học chủ yếu của rau má thừ trồng tại Nha Trang theo thời gian phát triển cho thấy thời gian thu hoạch thích hợp để rau má thừ có hàm lượng polyphenol, hàm lượng chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa tổng đạt mức cao nhất là thời điểm 75 ngày tuổi. Tại thời điểm 75 ngày tuổi, rau má thừ có hàm lượng polyphenol: 13,56 mg acid galic/g chất khô, hàm lượng chlorophyll: 4,73 mg/g chất khô, hoạt tính chống oxy hóa tổng là 6,06 mg acid ascorbic/g chất khô, hoạt tính khử sắt: 22,89 mg FeSO<sub>4</sub>/g chất khô và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH: 79,48 %. Ngoài ra trong rau má thừ có chứa một số hợp chất có hoạt tính sinh học như triterpenoid, asiaticoside, quercetin, acid rosmarinic.

3) Luận án đã nghiên cứu chiết rút polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa từ rau má thừ theo phương pháp ngâm chiết có hỗ trợ sóng siêu âm với dung môi chiết ethanol 95% và xác định được các điều kiện tối ưu cho quá trình chiết: nhiệt độ chiết là 63°C, thời gian chiết là 97 phút, tỷ lệ DM/NL là 52 ml/g. Ở điều kiện chiết tối ưu, dịch chiết rau má thừ thu được có hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng, hoạt tính khử sắt và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH tương ứng là 19,18±0,72 mg acid galic/g chất khô, 7,45±0,16 mg/g chất khô, 13,81±0,31 mg acid ascorbic/g chất khô, 37,31±1,32 mg FeSO<sub>4</sub>/g chất khô và 81,66±3,4%.

4) Luận án đã nghiên cứu sấy phun tạo bột rau má thừ chứa polyphenol, chlorophyll có hoạt tính chống oxy hóa và xác định được các điều kiện thích hợp cho quá trình sấy phun: chất mang là gum arabic, vận tốc đĩa phun: 20.000 v/p, nồng độ gum arabic: 73 g/l, nhiệt độ sấy phun: 177°C, áp suất khí nén: 3,1 kg/cm<sup>2</sup>. Bột rau má thừ sấy phun theo các thông số tối ưu có hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính



chống oxy hóa tổng và hoạt tính khử sắt tương ứng là  $28,15 \pm 1,13$  mg acid galic/g,  $10,62 \pm 0,27$  mg/g,  $19,47 \pm 0,42$  mg acid ascorbic/g và  $59,50 \pm 2,08$  mg  $\text{FeSO}_4$ /g, độ ẩm: 5,25%, kích thước hạt trung bình: 137,6 nm, nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử và hoạt tính lần lượt là  $168,35^\circ\text{C}$ ,  $297,09^\circ\text{C}$ ,  $426,38^\circ\text{C}$ .

5) Luận án đã nghiên cứu bảo quản bột rau má và nhận thấy sau 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$  và  $5^\circ\text{C}$ , bột rau má thì có mức độ suy giảm hàm lượng polyphenol, chlorophyll, hoạt tính chống oxy hóa tổng, hoạt tính khử sắt tương ứng ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$  và  $5^\circ\text{C}$  là (21,3%; 16,1%; 21,6%, 25,1%) và (15,3%; 12,2%; 19,0%; 17,3 %).

6) Luận án đã xác định công thức phối trộn tạo đồ uống rau má như: tỷ lệ bột rau má thì: 4%, đường saccharose: 4%. Đồ uống rau má phối trộn theo công thức trên có hoạt tính chống oxy hóa tổng:  $67,23 \pm 1,44$  mg acid ascorbic/100 ml, hoạt tính khử sắt:  $195,63 \pm 2,99$  mg  $\text{FeSO}_4$ /100 ml và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH:  $64,73 \pm 1,47$  %.

## 2. KIẾN NGHỊ

Từ quá trình nghiên cứu của luận án, cho phép đề xuất một số kiến nghị:

- Cần tiếp tục nghiên cứu và đánh giá về một số hoạt tính sinh học như: hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn, kháng virus; hoạt tính tăng cường miễn dịch cũng như nghiên cứu sản xuất sản phẩm ở quy mô lớn để tính toán chi phí sản xuất làm cơ sở cho việc tiến tới phát triển thương mại sản phẩm bột rau má sau này.

- Cần tiếp tục nghiên cứu và đánh giá về một số hợp chất có hoạt tính sinh học khác có trong bột rau má như: asiaticoside, quercetin, acid rosmarinic.

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA LUẬN ÁN

1. Đặng Bửu Tùng Thiện, Vũ Ngọc Bội, Ngô Đăng Nghĩa, Đặng Xuân Cường (2020), *"Polyphenol, chlorophyll: Tối ưu hóa chiết từ rau m ế"*, Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn, Số 1/2020, Trang 93-99.
2. Dang Buu Tung Thien, Ngo Dang Nghia, Vu Ngoc Boi, Dang Thi Thanh Tuyen, Dang Xuan Cuong, Pham Thanh Thuan, Vu Thi Thanh Hien, Pham The Trinh, Dinh Van Hien (2021), *"The content of polyphenol and chlorophyll, and antioxidant activity of Centella asiatica: Accumulation according to the growth times and their correlation"*, Sapporo Medical Journal, 55(6), Pp. 1-8.
3. Dang Buu Tung Thien, Vu Ngoc Boi, Ngo Dang Nghia, Dang Xuan Cuong (2021), *"Effect of various solvents and extraction methods on polyphenol, chlorophyll, and antioxidant activities of Centella asiatica grown in south-center, Vietnam"*, International Journal of Pharmaceutical Research, 29(1), Pp. 1537-1543.
4. Dang Buu Tung Thien, Vu Ngoc Boi, Ngo Dang Nghia, Dang Xuan Cuong (2020), *"Phytochemistry, nutrition component, vitamin, minerals and antioxidant activity of three species Hydrocotyle sp. growth in Vietnam"*, International Medical Journal, 25(3), Pp. 1047-1056.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. Bộ Y Tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Tập 2, Nxb. Y học, Hà Nội.
2. Đái Duy Ban (2008), *Các hợp chất thi ên nhi ên có hoạt tính sinh học phòng chống bệnh một số bệnh cho người và vật nuôi*, Nxb. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
3. Đặng Xuân Cường, Lê Tuấn Anh, Vũ Ngọc Bội, Bùi Minh Lý (2014), “Thu nhận polyphenol từ cây ngô”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Số 4/2014, Trường Đại học Nha Trang, Trang 16-21.
4. Đặng Xuân Cường, Vũ Ngọc Bội, Trần Thị Thanh Vân, (2012), "Tối ưu hóa quá trình tách chiết phlorotannin từ rong biển (*Sargassum vietnamense*) thu mẫu tại Nha Trang - Khánh Hòa", *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Số 3/2012, Trường Đại học Nha Trang, Trang 83-87.
5. Đỗ Huy Bích (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Tập 2, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
6. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, Hà Nội.
7. Dương Thị Phượng Liên, Phan Thị Bích Trâm, Hà Thanh Toàn (2014), "Ảnh hưởng quá trình trích ly đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa từ đậu nành", *Tạp chí Khoa học*, Số 1/2014 Trường Đại học Cần Thơ, Trang 8-15.
8. Hà Duyên Tư (2010), *Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
9. Hoàng Thị Yến, Trịnh Thị Thùy Linh, Mai Chí Thành, Nguyễn Thị Thu Huyền, Lại Thị Ngọc Hà, Bùi Văn Ngọc (2015), "Tối ưu hóa điều kiện tách chiết các hợp chất polyphenol có tính chống oxy hóa cao từ cây sim (*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk.) thu thập ở vùng đồi núi chítlinh, Hải Dương", *Tạp chí Sinh học*, Số 37(4), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Trang 509-519.
10. Lê Thị Hồng Ánh, Hoàng Thị Ngọc Nhơn, Nguyễn Minh Kiên, Trần Trung Kiên, (2016), "Nghiên cứu thu nhận bột màu chlorophyll từ rong nước lơ *cheatomorpha* sp. đồng bằng sông Cửu Long", *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, Số 10(11), Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp. HCM, Trang 30-38.

11. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, Nxb. Đại học Quốc gia, TP. Hồ Chí Minh.
12. Nguyễn Thị Văn Anh, Bùi Thị Liên, Vũ Thành Hưng, Trần Thanh Quỳnh Anh (2014), "Nghiên cứu ảnh hưởng của trạng thái nguy hiểm và ba thông số chiết đến hàm lượng chlorophyll thu nhận từ rau ngót (*Sauropus androgynus* (L.) Merr)", *Tạp chí Khoa học*, Số 94(6), Đại học Huế, Trang 32-38.
13. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam*, Nxb. Trẻ, TP. Hồ Chí Minh.
14. Phạm Ngọc Khôi, Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2017), "Khảo sát điều kiện tách chiết và hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn của hợp chất polyphenol từ vỏ thân cây quao nước (*Dolichandrone spathacea*)", *Tạp chí khoa học*, Số 14(12), Trường Đại học Sư phạm TP. Hồ Chí Minh, Trang 181-193.
15. Phạm Thiện Ngọc, Lê Ngọc Liên (2005), "Chiết xuất, xác định hàm lượng polyphenol và đánh giá tác dụng chống oxy hóa của các mẫu bột chiết lá dâu", *Tạp chí Nghiên cứu y học*, Số 38(5), Trường Đại học Y Hà Nội, Trang 34-38.
16. Trần Văn Lộc, Trần Văn Sung, Phạm Đức Thắng (2012), "Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây rau má (*Centella asiatica* (L.) Urb.)", *Tạp chí Hóa học*, Số 50(2), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Trang 18-22.
17. Trần Văn Lộc, Võ Thị Quỳnh Như, Lê Thị Thu Hà, Trần Văn Sung, (2014), "Nghiên cứu tổng hợp một số dẫn xuất của axit madecassic phân lập từ cây rau má (*Centella asiatica* (L.) Urban) của Việt Nam", *Tạp chí Hóa học*, Số 52(4), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Trang 508-513.
18. Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước (1979), *Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3215-79 về Sản phẩm thực phẩm - Phân tích cảm quan - Phương pháp cho điểm*, Cục kiểm tra chất lượng sản phẩm và hàng hóa.
19. Viện dinh dưỡng - Bộ Y tế (1994), *Thành phần dinh dưỡng thức ăn Việt Nam*, Nxb. Y học, Hà Nội.
20. Vũ Ngọc Bội, Đặng Xuân Cường, Nguyễn Hoàng Quốc (2015), "Tối ưu công đoạn chiết polyphenol, chlorophyll với hoạt tính chống oxy hóa từ cây măng tây", *Tạp chí khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Số 3/2015, Trường Đại học Nha Trang, Trang 3-8.

## Tiếng Anh

21. Abaychi J. K., Riley J. P. (1979), "The determination of phytoplankton pigments by high performance liquid chromatography", *Analytica Chimica Acta*, 107/1979, Pp. 1-11.
22. Aline M., Charles E. L., Marco R., Jeanne M., Odile G. N. (2005), "Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity", *Food Chemistry*, 91/2005, Pp. 571–577.
23. Ariffin F., Heong C. S., Bhupinder K., Karim A. A., Huda N. (2011), "Antioxidant capacity and phenolic composition of fermented *Centella asiatica* herbal teas", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91/2011, Pp. 2731-2739.
24. Arpita R., Laxmi K., Navneeta B. (2018), "Qualitative and Quantitative Phytochemical Analysis of *Centella asiatica*", *Natural Products Chemistry & Research*, 6(4), Pp. 1-4.
25. Azizah A. H., Suhaila M., Zamree M. S. (2002), "Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban", *Food Chemistry*, 77(4), Pp. 465-469.
26. Babu P. V. A., Liu D. (2009), *Flavonoids and Cardiovascular Health*, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, USA, Pp. 371–392.
27. Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J. D. (2007), *Herbal Medicines*, Published by the Pharmaceutical Press, London, UK, Pp. 371-373.
28. Bentham G., Hooker J. D. (1967), *Umbelliferae*, L. Reeve & Co, London, Pp. 859–947.
29. Bhandari B. R., Datta N., Howes T. (1997), "Problems associated with spray drying of sugar-rich foods", *Drying technology*, 15(2), Pp. 671-684.
30. Bhandari P., Kumar N., Gupta A. P., Singh B., Kaul V. K. (2007), "A rapid RP-HPTLC densitometry method for simultaneous determination of major flavonoids in important medicinal plants", *Journal of Separation Science*, 30(13), Pp. 2092–2096.
31. Blois M. S. (1958), "Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical", *Nature Product Radiance*, 181/1958, Pp. 1199-1200.
32. Bonte F., Dumas M., Chaudagne C., Meybeck A. (1994 ), "Influence of asiatic acid,

- madecassic acid, and asiaticoside on human collagen I synthesis", *Planta Med*, 60(2), Pp. 133-135.
33. Cai Y., Corke H. (2000), "Production and properties of spray-dried amaranthus betacyanin pigments", *Journal of Food Science*, 65(6), Pp. 1248-1252.
  34. Celia M. L., Luis M., Esperanza M. G. C., Daniel V. B. (2013), "Polyphenol extraction from grape wastes: Solvent and pH effect", *Agricultural Sciences*, 4(9), Pp. 56-62.
  35. Chegini G. R., Ghobadian B. (2007), "Spray dryer parameters for fruit juice drying", *World Journal of agricultural sciences*, 3(2), Pp. 230-236.
  36. Chemat F., Zill E. H., Khan M. K. (2011), "Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction", *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), Pp. 813-835.
  37. Chew K. K., Khoo M. Z., Thoo Y. Y., Wan A., Ho C. W, (2011), "Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts", *International Food Research Journal*, 18(4), Pp. 1427-1435.
  38. Chew S. H., Kaur B., Nurul H., Alias A. K., Ariffin F. (2011), "Effect of fermentation on the compositin of *Centella asiatica* teas", *American Journal of Food technology*, 6(7), Pp. 581-593.
  39. Cheynier V. (2005), "Polyphenols in foods are more complex than often thought", *The American journal of Clinical Nutrition*, 81(1), Pp. 223-229.
  40. Chong N. J., Aziz Z. (2011), "A systematic review on the chemical constituents of *Centella asiatica*", *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2(3), Pp. 445–459.
  41. Christophe H., Duangjai T. (2020), "Plant Polyphenols, More than Just Simple Natural Antioxidants: Oxidative Stress, Aging and Age-Related Diseases", *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 7(5), Pp. 1-10.
  42. Corrales M., Toepfl S., Butz P., Knorr D., Tauscher B. (2008), "Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(1), Pp. 85-91.

43. Cubas C., Gloria Lobo M., Gonzalez M. (2008), "Optimization of the extraction of chlorophylls in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by N,N-dimethylformamide using response surface methodology", *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(2), Pp. 125–133.
44. David V., Ana R. M., Giulia C., Maria J. O. C., Jeremy P. E. S. (2010), "Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action", *Nutrients*, 2(11), Pp. 1106-1131.
45. Delsart C., Ghidossi R., Poupot C., Cholet C., Grimi N., Vorobiev E., Milisic V., Peuchot MM. (2012), "Enhanced extraction of valuable compounds from merlot grapes by pulsed electric field", *American Journal of Enology and Viticulture*, 63/2012, Pp. 205-211.
46. Denis R., Billo D., Francisco R., Christian R., Kiban C., Anne M. C., Jacques M., Suzanne R., Mondher E. J. (2007), "Comparative analysis of active constituents in *Centella asiatica* samples from Madagascar: Application for ex situ conservation and clonal propagation", *Fitoterapia*, 78/2007, Pp. 482-489.
47. Desai K. G. H., Park H. J. (2005), "Recent developments in microencapsulation of food ingredients", *Drying Technology*, 23(7), Pp. 1361-1394.
48. Dnyaneshwar M. N., Archana R. J. (2013), "In vitro inhibitory effects of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. seeds on intestinal  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic  $\alpha$ -amylase", *J Biochem Tech*, 4(3), Pp. 616-621.
49. Đorđević V., Paraskevopoulou A., Mantzouridou F., Lalou S., Pantic M., Bugarski B. (2016), *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*, Springer International Publishing, Switzerland.
50. Erdman J. W. J., Balentine, Arab D., Beecher L., Dwyer J. T., Folts J., Harnly J., Hollman P., Keen C. L., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G., Burrowes J. (2007), "Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC", *The Journal of Nutrition*, 137(3), Pp. 718 – 737.
51. Fazaeli M., Emam D. Z., Kalbasi A. A., Omid M. (2012), "Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder", *Food and Bioprocesses*, 90(4), Pp. 667-675.

52. Ferruzzi M. G., Blakeslee J. (2007), "Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives", *Nutrition Research*, 27(1), Pp. 1-12.
53. Frederico P., Rafael C. D., Dalton D. J., Miriam T. P. L., Nádia R. B. (2009), "Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Centella asiatica* (L.) Urb.", *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), Pp. 3713–3721.
54. Galano A. (2015), "Free radicals induced oxidative stress at a molecular level: the current status, challenges and perspectives of computational chemistry based protocols", *Journal of the Mexican Chemical Society*, 59(4), Pp. 231–262.
55. Galano A., Mazzone G., Alvarez D. R., Marino T., Alvarez I. J. R., Russo N. (2016), "Food Antioxidants: Chemical Insights at the Molecular Level", *Annual Review of Food Science and Technology*, 7/2016, Pp. 335–352.
56. Gopi S., Varma K., George R., (2014), "A short review o the medicinal properties of chlorophyll juice", *Asian journal of pharmaceutical technology and innovation*, 2(9), Pp. 89-94.
57. Gunathilake K. D. P. P., Ranaweera K. K. D. S., Rupasinghe H. P. V. (2019), "Response surface optimization for recovery of polyphenols and carotenoids from leaves of *Centella asiatica* using an ethanol-based solvent system", *Food Science & Nutrition*, 7(2), Pp. 528–536.
58. Hanna L., Makai S., Michael W. (2022), "Effect of ethanol solvents on total phenolic content and antioxidant properties of seed extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) varieties and determination of phenolic composition by HPLC-ESI-MS", *Diversity*, 14(1).
59. Hashim P. (2011), "*Centella asiatica* in food and beverage applications and its potential antioxidant and neuroprotective effect", *International Food Research Journal*, 18(4), Pp. 1215-1222.
60. Hayat K., Hussain S., Abbas S., Farooq U., Ding B., Xia S., Jia C., Zhang X., Xia W. (2009), "Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro", *Separation and Purification Technology*, 70(1), Pp. 63-70.



61. Hayat K., Zhang X., Chen H., Xia S., Jia C., Zhong F. (2010), "Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity", *Separation and Purification Technology*, 73(3), Pp. 371-376.
62. Hayat K., Zhang X., Farooq U., Abbas S., Xia S., Jia C., Zhong F., Zhang J. (2010), "Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace", *Food Chemistry*, 123(2), Pp. 423-429.
63. Herrero M., Cifuentes A., Ibanez E. (2006), "Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: a review", *Food Chemistry*, 98(1), Pp. 136-148.
64. Hutzler P., Fischbach R., Heller W., Jungblut T. P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenbock G., Schnitzler J. P. (1998), "Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy", *Journal of Experimental Botany*, 49(323), Pp. 953-965.
65. Huynh T. V., Caffin N., Dykes G. A., Bhandari B. (2008), "Optimization of the microencapsulation of lemon myrtle oil using response surface methodology", *Drying Technology*, 26(3), Pp. 357-368.
66. Intipunya P., Bhandari B. R. (2010), *Chemical deterioration and physical instability of food and beverages*, Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
67. Ivailo M., Nadezhda P., Iliana M. T. (2021), "Ultrasound-Assisted Extraction of Chlorophylls and Phycocyanin from *Spirulina platensis*", *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(2), Pp. 9296 - 9304.
68. Jamil S. S., Nizami Q., Salam M. (2007), "Centella asiatica L. Urban A Review", *Nature Product Radiance*, 6(2), Pp. 158–170.
69. Jeffrey S. W., Mantoura R. F. C., Wright E. S. W. (1997), *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*, UNESCO Publishing, Farnce.
70. Joana G., Chavez G., Villa J A., Fernando A. J., Basilio H. J., Sepulveda D., Yahia E. M., Gonzalez A. G. A. (2013), "Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview", *Comprehensive Reviews in Food science and Food safety*, 12(1), Pp. 5-23.

71. Joseph A. R., Alexander M. R., Jara P. J., Vanessa N., Viktoria K., Nadia S., Augustin S. (2014), "Effects of food processing on polyphenol contents: A systematic analysis using phenol explorer data", *Molecular nutrition and Food research*, 59(1), Pp. 160-170.
72. Kamal K., Kavi B., Roshni T., Rajendra M., Vivekananda M. (2019), "Impact of microwaves on the extraction yield of phenolics, flavonoids, and triterpenoids from *Centella* leaves: an approach toward digitized robust botanical extraction", *Pharmacognosy Magazine*, 15(64), Pp. 267-273.
73. Karsten U., Schumann R., Haubner N., Klausch S. (2005), "Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades", *International biodeterioration & Biodegradation*, 55(3), Pp. 213-222.
74. Kenner G. W., Rimmer J., Smith K. M., Unsworth J. F., Jackson A. H. (1976), "Studies on the Biosynthesis of the Chlorobium Chlorophylls", *Biological Sciences*, 273(924), Pp. 255-276.
75. Kevin C., Vaughn, S., Duke O. (1984), "Function of polyphenol oxidase in higher plants", *Physiologia plantarum*, 60(1), Pp. 106-112.
76. Kha T. C., Nguyen M. H. và Roach P. D. (2010), "Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder", *Journal of Food Engineering*, 98(3), Pp. 385-392.
77. Kha T. C., Nguyen M. H., Roach P. D. (2010), "Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder", *Journal of Food Engineering*. 98, Pp. 385-392.
78. Khairi Z., Yusof S., Abd Hamid A., Muse R. (2003), "Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban", *Food Chemistry*, 81(4), Pp. 575–581.
79. Kitamura Y., Itoh H., Echizen H., Satake T. (2009), "Experimental vacuum spray drying of probiotic foods included with lactic acid bacteria", *Journal of food processing and preservation*, 33(6), Pp. 714-726.
80. Kong K. W., Ismail A. (2011), "Lycopene content and lipophilic antioxidant capacity of by-products from *Psidium guajava* fruits produced during puree production industry", *Food and Bioproducts Processing*. 89(1), Pp. 53-61.

81. Kurt W., Hilde N., Kirsten W., Gunter K. (2005), *DNA Fingerprinting in Plants*, CRC press.
82. Le F. F., Tena M. T., Ríos A., Valcarcel M. (1998), "Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves", *Talanta*, 46(5), Pp. 1123-1130.
83. Leo P. V., Gilbert R. S. (1966), *The chlorophylls*, Academic Press.
84. Lichtenthaler H. K. (1987), "Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes", *Plant Cell Membranes*, 148/1987, Pp. 350–382.
85. Lichtenthaler H. K., Hartmut K. (1987), "Chlorophylls and Carotenoid: pigments of photosynthetic biomembranes", *Academic Press*.
86. Lien A. P. H., Hua H., Chuong P. H. (2008), "Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health", *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), Pp 89-96.
87. Litwinienko G., Ingold K. U. (2007), "Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals", *Accounts of Chemical Research*, 40(3), Pp. 222-230.
88. Lopez N., Puertolas E., Condon S., Alvarez I., Raso J. (2008), "Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(4), Pp. 477-482.
89. Lopez N., Puertolas E., Hernandez O. P., Ignacio A. I., Raso J. (2009), "Effect of a pulsed electric field treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of Cabernet Sauvignon freshly fermented model wines obtained after different maceration times", *Food Science and Technology*, 42(7), Pp. 1225-1231.
90. Lugkana Mato., Jintanaporn W., Supaporn M., Terdthai T., Nawanant P., Kwanchanok Y., Panida T., Bungorn S. (2009), "*Centella asiatica* improves physical performance and health-related quality of life in healthy elderly volunteer", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(8), Pp. 1-7.
91. Luque D. C. M., Garcia Ayuso. L. (1998), "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future", *Analytica Chimica Acta*, 369(1), Pp. 1-10.

92. Maa Y. F., Costantino H., Nguyen P. A., Hsu C. (1997), "The effect of operating and formulation variables on the morphology of spray dried protein particles", *Pharmaceutical Development and Technology*, 2(3), Pp. 213-223.
93. Macias S., Mantell R., Iiguez D. O., Lubian M. (2009), "Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*", *Talanta*, 77(3), Pp. 948–952.
94. Madhu N., Vijay K. (2012), "Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts", *International Academy of Science*, 1(1), Pp. 8-26.
95. Mahanom H., Azizah A. H., Suhaila M., Nazamid S., Maznah I., Mohd H. B. (2007), "Protective effect of *Centella asiatica* extract and powder on oxidative stress in rats", *Food Chemistry*, 100(2), Pp. 535-541.
96. Maira B. A., Thalita M. C., Ana L. M. J., Maria V. R. V., Joao C. M. C., Andre R. B. (2017), "Cosmetic attributes of algae - A review", *Algal Research*. 25/2017, Pp. 483-487.
97. Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004), "Polyphenols: Food sources and bioavailability", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), Pp. 727–747.
98. Mantoura R. F. C., Llewellyn C. A. (1983), "The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase highperformance liquid chromatography", *Analytica Chimica Acta*, 151(2), Pp. 297–314.
99. Maquart F. X., Bellon G., Gillery P., Wegrowski Y., Borel J. P. (1990), "Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*", *Connect Tissue Research*, 24(2), Pp. 107-20.
100. Marimuthu S., Samuel S., Muthuswamy A. D., Chinnakkannu P. (2005), "Emerging role of *Centella asiatica* in improving age-related neurological antioxidant status", *Experimental Gerontology*, 40(8), Pp. 707–715.
101. Markovic Z. (2016), "Study of the mechanisms of antioxidative action of different antioxidants", *Journal of the Serbian Society for Computational Mechanics*, 10(1), Pp. 135-150.

102. Marques L. G., Ferreira M. C., Freire J. T. (2007), "Freeze drying of acerola (*Malpighia glabra* L.)", *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5), Pp. 451-457.
103. Mathew A. G., Parpia H. A. B. (1971), "Food browning as a polyphenol reaction", *Advances in Food research*, 19/1971, Pp. 75-145.
104. Mattila P., Hellstrom J., Torronen R. (2006), "Phenolic acids in berries, fruits, and beverages", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (19), Pp. 7193–7199.
105. Maury M., Murphy K., Kumar S., Shi L., Lee G. (2005), "Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(3), Pp. 565-573.
106. Mazzone G., Galano A., Alvarez I. J. R., Russo N. (2016), "Coumarin–chalcone hybrids as peroxy radical scavengers: kinetics and mechanisms", *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(4), Pp. 662–670.
107. Miller D. A., Gil M. (2012), *Spray drying technology*, Appspress Springer, USA.
108. Mishra P., Mishra S., Mahanta C. L. (2014), "Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Embllica officinalis*) juice powder", *Food and Bioproducts processing*, 92(3), Pp. 252-258.
109. Moed J. R., Hallegraef G. M. (1978), "Some problems in the estimation of chlorophyll a and phaeopigments from pre- and post-acidification spectrophotometric measurements", *Int. Revueges. Hydrobiol* , 63/1978, Pp. 787-800.
110. Mohammad A. M. (2011), *Selected medicinal plants of chittagong hill tracts*, IUCN Bangladesh.
111. Mohammad R. I. S., Wei C. (2017), "Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices", *Trends in Food Science & Technology*, 65/2017, Pp. 49-67.
112. Moon Y. J., Wang X., Morris M. E. (2006), "Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism", *Toxicol In Vitro*, 20(2), Pp. 187-210.
113. Murali S., Kar A., Mohapatra D., Kalia P. (2015), "Encapsulation of black carrot juice

- using spray and freeze drying", *Food Science and Technology International*, 21(8), Pp. 604-612.
114. Murray A. P., McShane P. E., Errey B., Terhell D. (1985), *Analysis of phytoplankton pigments and their degradation products by high pressure liquid chromatography*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
  115. Mustafa A., Turner C. (2011), "Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review", *Analytica Chimica Acta*, 703(1), Pp. 8-18.
  116. Naczek M., Shahidi F. (2004), "Extraction and analysis of phenolics in food", *Journal of Chromatography*, 1054(1), Pp. 95-111.
  117. Naghma K., Hasan M. (2007), "Tea polyphenols for health promotion", *Life Sciences*, 7(81), Pp. 519-533.
  118. Nerea J. M., Francesca V., Jose A. M., Irene E., Carmen A. A. (2019 ), "Impact of extraction conditions on the phenolic composition and antioxidant capacity of grape stem extracts", *Antioxidants*, 8(12), Pp. 1-17.
  119. Nguyen N. Q., Nguyen M. T., Nguyen V. T., Le V. M. (2020), "The effects of different extraction conditions on the polyphenol, flavonoids components and antioxidant activity of polyscias fruticosa roots", *Energy Security and Chemical Engineering Congress*, 736/2020, Pp. 1-9.
  120. Nicholas J. M., Catherine A. R. E. (1997), "The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink", *Food Chemistry*, 60(3), Pp. 331-337.
  121. Nijveldt R. J., Van N. E., Van H. D. E., Boelens P. G., Van N. K., Van L. P. A. (2001), "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), Pp. 418- 425
  122. Ong E. S., Cheong J. S. H., Goh D. (2006), "Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials", *Journal of Chromatography*, 1112(1), Pp. 92-102.
  123. Ong E. S., Woo S. O., Yong Y. L. (2000), "Pressurized liquid extraction of berberine and aristolochic acids in medicinal plants", *Journal of Chromatography*, 904(1), Pp. 57-64.

124. Ong H. Y., Mohamad Y. M., Wan A. W. M. (2010), "Effect of extraction on polyphenol content, antioxidant activity and pH in pegaga (*Centella asiatica*)", *Sains Malaysiana*, 39(5), Pp. 747-752.
125. Palma M., Pineiro Z., Barroso C. G. (2001), "Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents", *Journal of Chromatography*, 921(2), Pp. 169-174.
126. Paranagama P., Abeysekera K., Abeywickrama K., Nugaliyadde L. (2003), "Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf. (lemongrass) against aspergillus flavus link. isolated from stored rice", *Letters in applied microbiology*, 37(1), Pp. 86-90.
127. Sunil P., Narashans A. S., Sunil S., Vinay K., Tripti A., Gustavo A. G., Elhadi M. Y. (2017), *Chlorophylls: Chemistry and Biological Functions*, John Wiley & Sons
128. Peiris K. H. S., Kays S. J. (1996), "Asiatic Pennywort (*Centella asiatica* (L.) Urb.): A little-known vegetable crop", *American Society for Horticultural Science*, 6(1), Pp. 13-18.
129. Perrut M. (2000), "Supercritical fluid applications: Industrial developments and economic issues", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39(12), Pp. 4531-4535.
130. Pilar P., Manuel P., Miguel A. (1999), "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E", *Analytical Biochemistry*, 269(2), Pp. 337-341.
131. Pineiro Z., Palma M., Barroso C. G. (2004), "Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids", *Journal of Chromatography*, 1026(1), Pp. 19-23.
132. Puertolas E., Saldana G., Condon S., Alvarez I., Raso J. (2010), "Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle", *Food Chemistry*, 119(3), Pp. 1063-1070.
133. Puziah H., Hamidah S., Mohd H. M. H., Aidawati S., Uma D. P., Mohd I. (2011), "Triterpene Composition and Bioactivities of *Centella asiatica*", *Molecules*, 16(2), Pp. 1310-1322.

134. Qin Y. Z., Robert M. H., Jodi L. E., Roberta R. H., Carl L. K. (2002), "Antioxidative activities of Oolong tea", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), Pp. 6929-6934.
135. Qing W. Z., Li G. L., Wen C. Y. (2018), "Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review", *Chinese Medicine*, 13(1), Pp. 1-26.
136. Quek S. Y., Chok N. K., Swedlund P. (2007), "The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders", *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5), Pp. 386-392.
137. Quideau S., Ken S. F. (1996), "Ellagitannin Chemistry", *American Chemical Society*, 1(96), Pp. 475-504.
138. Ratnavathi C. V. ( 2019), *Grain Structure, Quality and Nutrition*, Woodhead Publishing, United Kingdom.
139. Ravi S., Veerakumar A., Manimaran R., Hashim K. M., Indira B. (2008), "Two new flavonoids from *Centella asiatica* (Linn.)", *Journal of Natural Medicines*, 62(3), Pp. 369–373.
140. Renoe B. W. (1994), "Microwave assisted extraction", *American Laboratory*, 26/1994, Pp. 34-40.
141. Rhena S., Norbert H., Steffi K., Ulf K. (2005), "Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55(3), Pp. 213-222.
142. Rice E. C. A., Miller N., Paganga G. (1997), "Antioxidant properties of phenolic compounds", *Trends in Plant Science*, 2(4), Pp. 152–159.
143. Ritisha N. T., Kiran S. C., Vibhuti M. J., Vrinda S. T. (2014), "Screening of proper leaf size in *Centella asiatica* for antioxidant potential and separation of phenolics using RP-HPLC ", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(2), Pp. 43-47.
144. Rizna T. D., Faiza M. (2014), "Antioxidant and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Compounds of *Centella asiatica*", *Procedia Chemistry*, 17(2015), Pp. 147 – 152
145. Robbins R. J. (2003), "Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology", *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 51(10), Pp. 2866-2887.



146. Rodriguez H. G. R., Gonz A. G., Grajales L. A., Ruiz C., Abud A. (2005), "Effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product", *Drying technology*, 23(4), Pp. 955-973.
147. Rosalizan M. S., Rohani M. Y., Khatijah I., Shukri M. A. (2008), "Physical characteristics, nutrient contents and triterpene compounds of ratoon crops of *Centella asiatica* at three different stages of maturity", *J Trop Agric Food Sci*, 36(1), Pp. 43– 51.
148. Rostagno A., Araujo J. M. A., Sandi D. (2002), "Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour", *Food Chemistry*, 78(1), Pp. 111-117.
149. Ruhiye Y., Maurice R. M. (2007), "Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review", *Food biochemistry*, 27(5), Pp. 361-422.
150. Sahin N. H., Dinçer C., Torun M., Topuz A., Ozdemir F. (2013), "In fluence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (*Salvia fruticosa* Miller) by spray drying", *Food Science and Technology*, 52(1), Pp. 31-38.
151. Sartory D. P., Grobbelaar J. U. (1984), "Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis", *Hydrobiologia*. vol. 114(3), pp. 177– 187.
152. Sasadara M. M. V., Nayaka D. M. W., Yuda E. S. K., Dewi K. A. A., Cahyaningsih E., Wirawan I. G. P., Silalahi D. (2021), *Optimization of chlorophyll extraction solvent of bulung sangu (Gracilaria sp.) seaweed*, Conference Series: Earth and Environmental Science.
153. Scotter M. J., Castle L. (2004), "Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review", *Food additives and contaminants*, 21(2), Pp. 93–124.
154. Shishir M. R. I., Taip F. S., Aziz N. A., Talib R. A., Sarker M. S. H. (2016), "Optimization of spray drying parameters for pink guava powder using RSM", *Food science and biotechnology*, 25(2), Pp. 1-8.
155. Shyam S., Alice M. (2018), "Technologies for the extraction, separation and purification of polyphenols – A Review", *Nepal journal of Biotechnology*, 6(1), Pp. 74-91.
156. Simon D., Helliwell S. (1998), "Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae", *Water Research*, 32(7), Pp. 2220–2223.

157. Singh A., Holvoet S., Mercenier A. (2011), "Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases", *Clinical and Experimental Allergy*, 41(10), Pp. 1346-59.
158. Spears K. (1988), "Developments in food colourings: the natural alternatives", *Trends in Biotechnology*, 6(11), Pp. 283-288.
159. *Standard Nucleotide BLAST*, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.
160. Sunil P., Narashans A. S., Sunil S., Vinay K., Tripti A., Gustavo A., Gonzalez A., Elhadi M. Y. (2017), *Chlorophylls: Chemistry and Biological Functions*, John Wiley & Sons Ltd.
161. Tenni R., Zanaboni G., De A. M. P., Rossi A., Bendotti C., Cetta G. (1988 ), "Effect of the triterpenoid fraction of *Centella asiatica* on macromolecules of the connective matrix in human skin fibroblast cultures", *Ital J Biochem*, 37(2), Pp. 69-77.
162. Teo C. C., Tan S. N., Yong J. W. H., Hew C. S., Ong E. S. (2010), "Pressurized hot water extraction (PHWE)", *Journal of Chromatography*, 1217(16), Pp. 2484-2494.
163. Thangavel A., Muniappan A., Yesudason J. K. P., Thangavel S. (2011), "Phytochemical screening and antibacterial activity of leaf and callus extracts of *Centella asiatica*", *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 6(1), Pp. 55-60.
164. Richard Martin Willstätter (1915), *Researches on plant pigments, especially chlorophyll*, The Nobel Prize in Chemistry.
165. Hans Fischer (1930), *Researches into the constitution of haemin and chlorophyll and especially for his synthesis of haemin*, The Nobel Prize in Chemistry.
166. Tonon R. V., Brabet C., Hubinger M. D. (2008), "Influence of process conditions on the physicochemical properties of a çai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying", *Journal of food engineering*, 88(3), Pp. 411-418.
167. Tsao R. (2010), "Chemistry and Biochemistry of dietary polyphenols", *Nutrients*, 2(12), Pp. 1231-1246.
168. Turan F. T., Cengiz A., Kahyaoglu T. (2015), "Evaluation of ultrasonic nozzle with spray drying as a novel method for the microencapsulation of blueberry's bioactive compounds", *Innovative food science & emerging technologies*, 32/2015, Pp. 136-145.

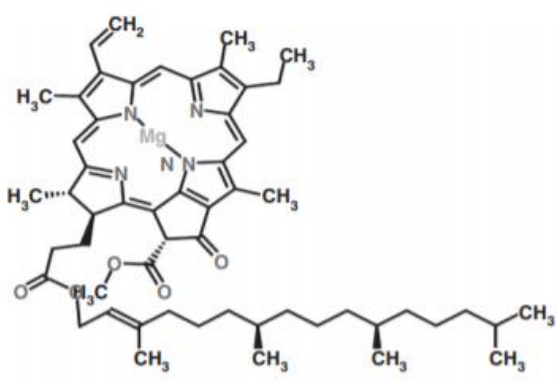
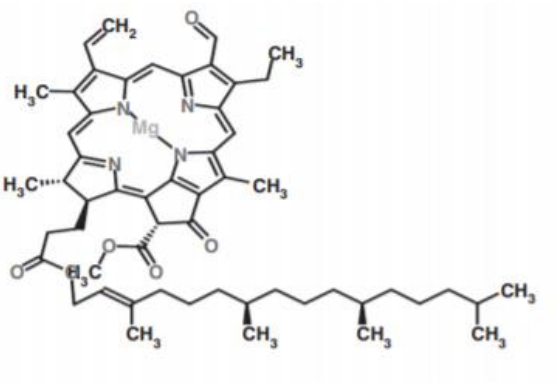
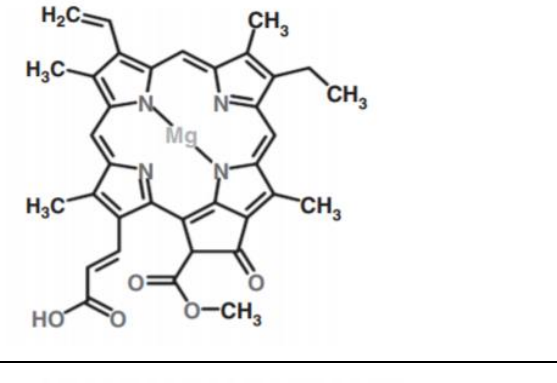
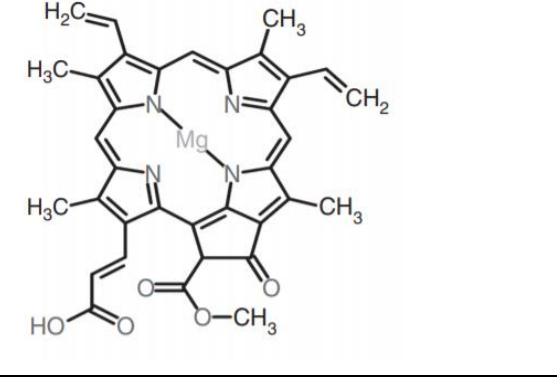
169. Turchiuli C., Gianfrancesco A., Palzer S., Dumoulin E. (2011), "Evolution of particle properties during spray drying in relation with stickiness and agglomeration control", *Powder technology*, 208(2), Pp. 433-440.
170. Tze N. L., Han C. P., Yusof Y. A., Ling C. N., Talib R. A., Taip F. S. (2012), "Physicochemical and nutritional properties of spray-dried pitaya fruit powder as natural colorant", *Food Science and Biotechnology*, 21(3), Pp. 675-682.
171. Varaprasad D., Raga S. N., Nazaneen P. S., Chandrasekhar T. (2019), "Effect of various solvents on chlorophyll and carotenoid extraction in green algae: *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*", *Annals of Plant and Soil Research*, 21(4), Pp. 341-345.
172. Vassantharuba S., Banumathi P., Premalatha M. R., Sundaram S. P., Arumugam T. (2012), "Functional properties of *Centella Asiatica* (L.): A review", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4/2012, Pp. 8-14.
173. Vernon L. P., Seely G. R. (1966), *The Chlorophylls*, Academic Press, New York.
174. Vicente A. R., Manganaris G. A., Sozzi S. O., Crisosto C. H. (2009), *Nutritional quality of fruits and vegetables*, Academic Press
175. Vilkhuk K. (2008), "Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review", *Innovative Food science and Emerging technologies*, 9(2), Pp. 161-169.
176. Vilkhuk K., Mawson R., Simons L., Bates D. (2008), "Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry", *Food Sci Emerg Technol*, 9(2), Pp. 161-169.
177. Vinatoru M. (2001), "An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs", *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), Pp. 303-313.
178. Weibao K., Na L., Ji Z., Qi Y., Shaofeng H., Hao S., Chungu X. (2012), "Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology", *J Food Sci Technol*, 51(9), Pp. 2006-2013.
179. Willows R. D. (2004), *Plant Pigments and their Manipulation*, CRC Press.

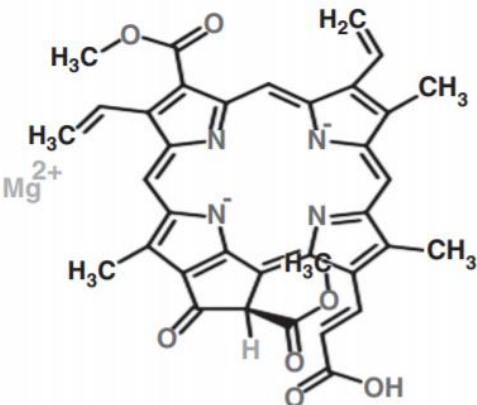
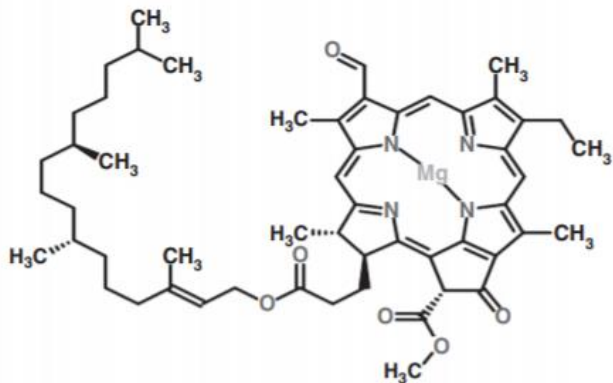
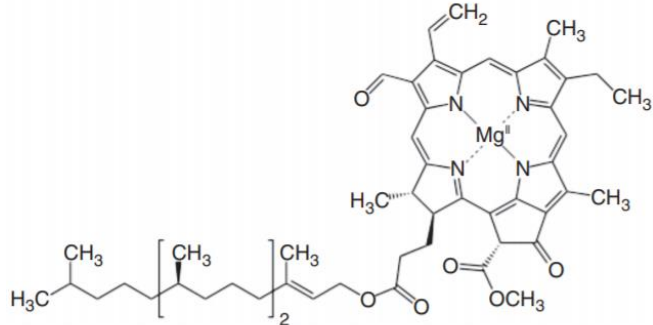
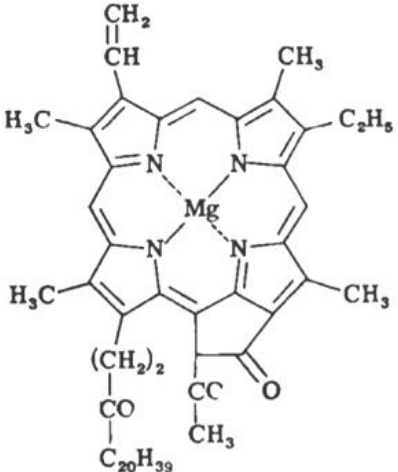
180. Wiwat W., Suthaya P. (2016 ), "Chlorophyll and total phenolic contents, antioxidant activities and consumer acceptance test of processed grass drinks", *Journal of Food Science and Technology*, 53(12), Pp. 4135–4140.
181. Woo M. W., Bhandari B. (2013), *Spray drying for food powder production*, Woodhead Publishing Limited.
182. Yasushi E., Riichiro U. I., Takashi K. (1984), "Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62/1984, Pp. 1387-1390
183. Zainol M. K. (2002), "Antioxidative activity of leaves, roots and petioles of *Centella asiatica* (L.) Urb.", *Forest Research Institute Malaysia*, 81(4), Pp. 190-195.
184. Zheng C., Qin L. (2007), "Chemical components of *Centella asiatica* and their bioactivities", *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 5(3), Pp. 348–351.

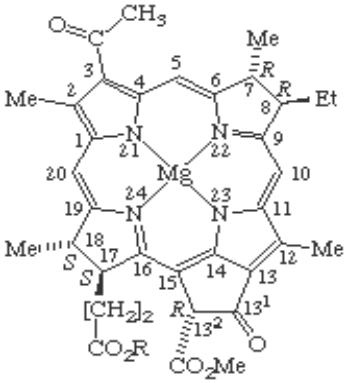
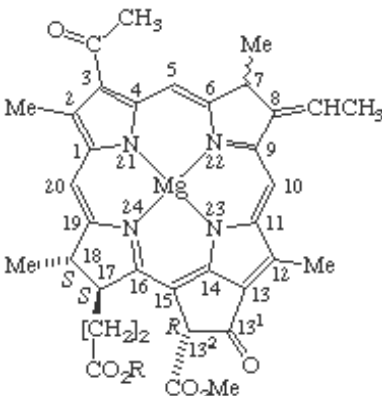
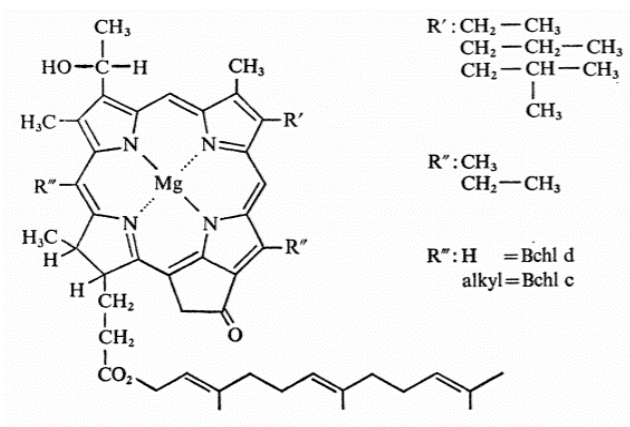
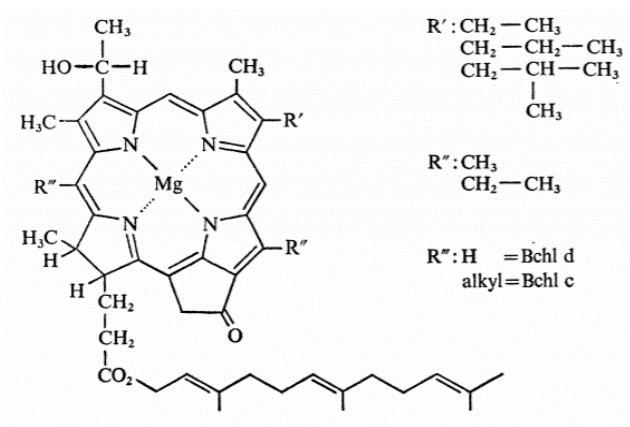
## PHỤ LỤC

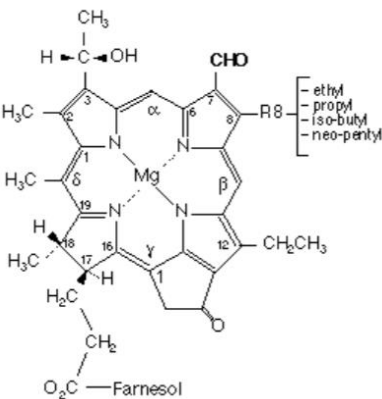
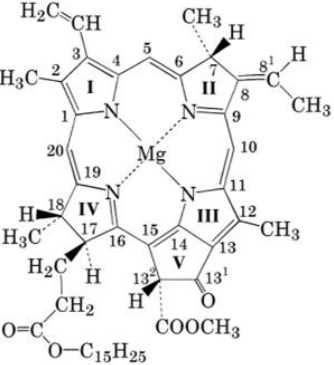
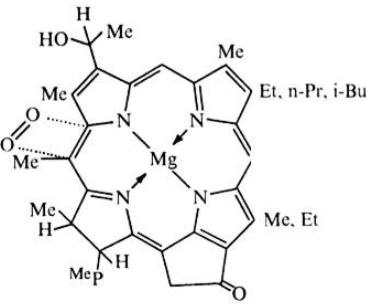
### PHỤ LỤC 1

#### BẢNG PHÂN LOẠI VÀ NGUỒN GỐC CÁC CHLOROPHYLL

| Tên gọi        | Công thức cấu tạo                                                                    | Nguồn gốc                  |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Chlorophyll-a  |    | Thực vật quang hợp         |
| Chlorophyll-b  |   | Thực vật bậc cao, rong lục |
| Chlorophyll-c1 |  | Rong nâu, tảo              |
| Chlorophyll-c2 |  | Rong nâu, tảo              |

|                  |                                                                                      |                                                                 |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Chlorophyll-c3   |    | Rong nâu, tảo                                                   |
| Chlorophyll-d    |   | Rong đỏ                                                         |
| Chlorophyll-f    |  | Khuẩn lam                                                       |
| Protochlorophyll |   | Hạt bí ngô, lá<br>vàng của cây non<br>mọc nơi thiếu ánh<br>sáng |

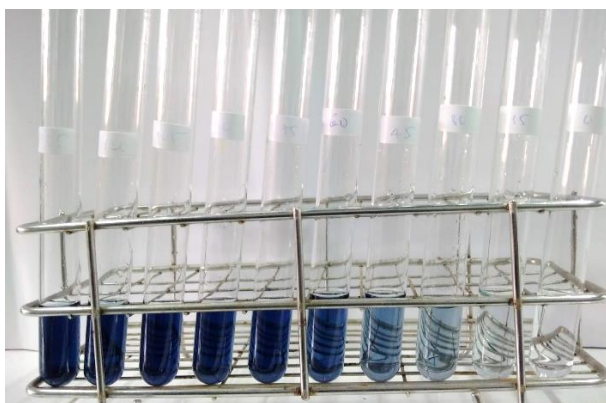
|                                        |                                                                                      |                                                                        |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <p>Bacteriochlorophyll a</p>           |     | <p>Vi khuẩn</p>                                                        |
| <p>Bacteriochlorophyll b</p>           |     | <p>Vi khuẩn<br/>(<i>Rhodopseudomonas</i>)</p>                          |
| <p>Bacteriochlorophyll c<br/>[160]</p> |  | <p>Vi khuẩn<br/>(<i>Chloroflexaceae</i>,<br/><i>Chlorobiaceae</i>)</p> |
| <p>Bacteriochlorophyll d<br/>[160]</p> |  | <p>Vi khuẩn<br/>(<i>Chloroflexaceae</i>,<br/><i>Chlorobiaceae</i>)</p> |

|                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                        |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <p>Bacteriochlorophyll e<br/>[160]</p>  |                                                                                                                                                                                                                                             | <p>Vi khuẩn<br/>(<i>Chloroflexaceae</i>,<br/><i>Chlorobiaceae</i>)</p> |
| <p>Bacteriochlorophyll g<br/>[160]</p>  |                                                                                                                                                                                                                                             | <p>Vi khuẩn<br/>(<i>Heliobacterium chlorum</i>)</p>                    |
| <p>Chlorobium chlorophyll [74, 160]</p> |  <p>Với:<br/> <math>\text{Me} = \text{CH}_3</math>; <math>\text{Et} = \text{CH}_2\text{CH}_3</math>; <math>\text{n-Pr} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3</math><br/> <math>\text{i-Bu} = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2</math></p> | <p>Vi khuẩn</p>                                                        |



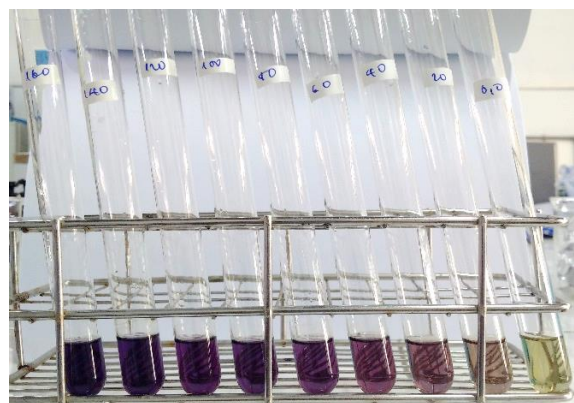
## PHỤ LỤC 2

### CÁC ĐƯỜNG CHUẨN TRONG PHÂN TÍCH



**Hình 2.1. Phản ứng màu dựng đường chuẩn acid gallic**

$$Y = 0,0146.X - 0,1294 \quad (R^2 = 0,9947)$$



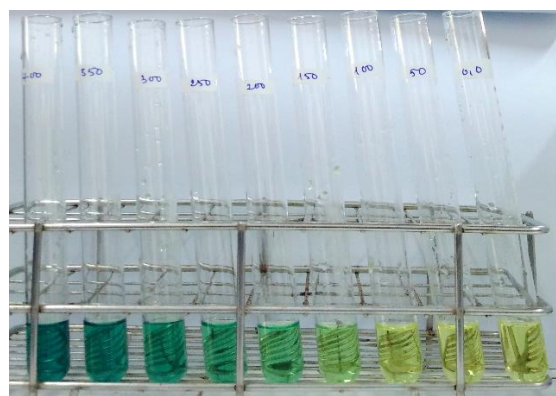
**Hình 2.2. Phản ứng màu dựng đường chuẩn acid oleanolic**

$$Y = 0,0072.X + 0,11 \quad (R^2 = 0,9957)$$



**Hình 2.3. Phản ứng màu dựng đường chuẩn acid ascorbic**

$$Y = 0,0069.X + 0,0166 \quad (R^2 = 0,9977)$$



**Hình 2.4. Phản ứng màu dựng đường chuẩn sắt sulfat**

$$Y = 0,0034.X - 0,0406 \quad (R^2 = 0,9981)$$

### **PHỤ LỤC 3**

#### **CÁC HÌNH ẢNH THỰC NGHIỆM**



**H ình 3.1. Rau má**



**H ình 3.2. Ruộng rau má**



**H ình 3.3. Tủ sấy FD 56, Binder, Đức**



**H ình 3.4. Sấy rau má**



**H ình 3.5. Rau má sấy khô**



**H ình 3.6. Bao g ữ rau má sau sấy khô**



**H ình 3.7. Chiết có hỗ trợ sóng si êu âm**

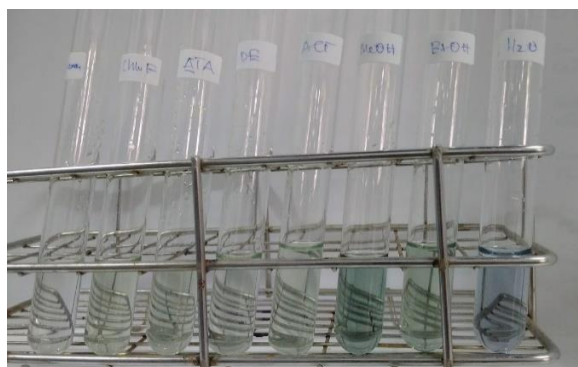


**H ình 3.8. Lọc thu dịch chiết**





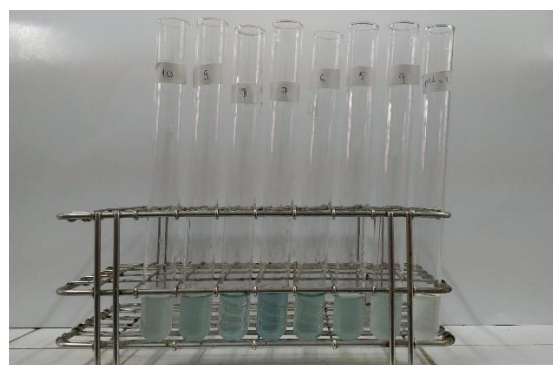
**H ình 3.9. Máy quang phổ UV-VIS 2 chùm tia, UVD-3200 Labomed, Mỹ**



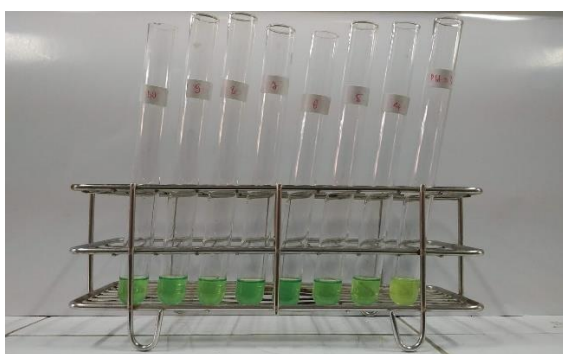
**H ình 3.10. Phản ứng màu xác định polyphenol**



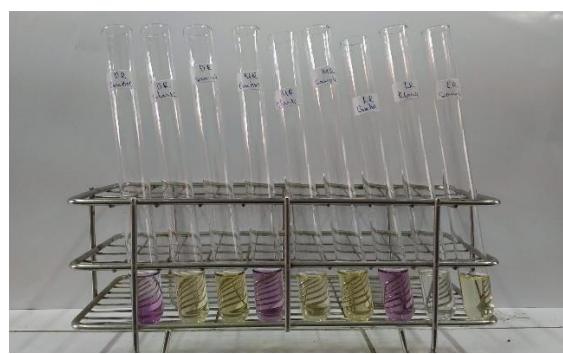
**H ình 3.11. Phản ứng màu xác định chlorophyll**



**H ình 3.12. Phản ứng màu xác định hoạt tính chống oxy hóa tổng**



**H ình 3.13. Phản ứng màu xác định hoạt tính khử sắt**



**H ình 3.14. Phản ứng màu xác định hoạt tính bắt gốc tự do DPPH**



**H ình 3.15. Cân phân tích ẩm MF-50, A&D, Nhật Bản**



**H ình 3.16. Bể điều nhiệt WNB7, Memmert, Đức**



Hình 3.17. Tủ nung Nabertherm, Đức



Hình 3.18. Xác định tổng hàm lượng khoáng chất



Hình 3.19. Cô đặc dịch chiết rau má



Hình 3.20. Sấy phun dịch chiết rau má sau cô đặc



Hình 3.21. Hệ thống máy sấy phun đĩa



Hình 3.22. Đĩa phun máy sấy phun





**H ình 3.23. Đáy phễu buồng sấy máy sấy phun**



**H ình 3.24. Bột rau má với chất mang gum arabic**



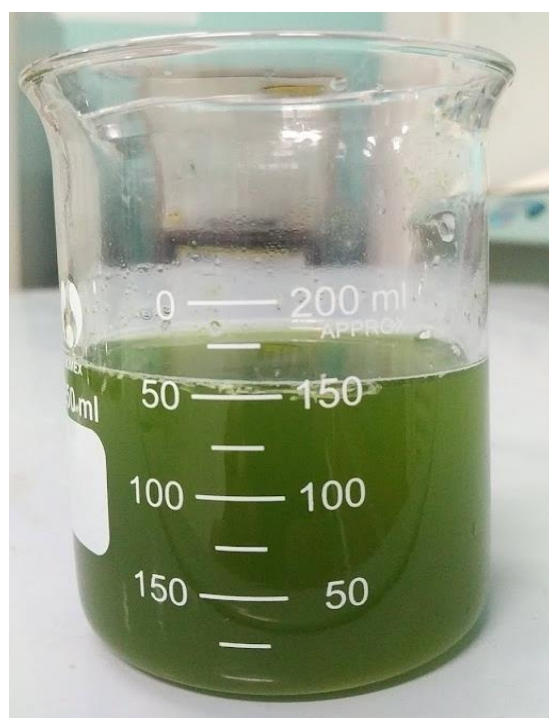
**H ình 3.25. Bột rau má với chất mang dextrin**



**H ình 3.26. Bột rau má với chất mang maltodextrin**



**H ình 3.27. Bao gói bột rau má**



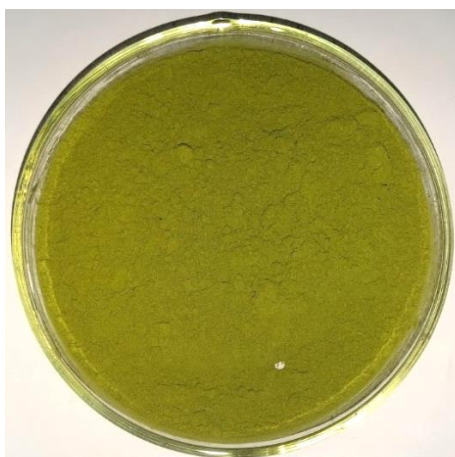
**H ình 3.28. Nước rau má**



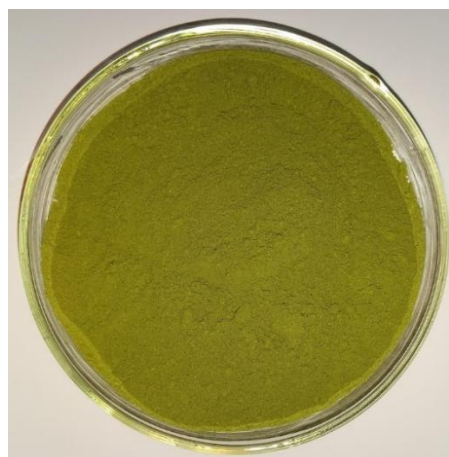
**H ình 3.29. Máy chiết siêu âm bán công nghiệp (năng suất 20 lít/mẻ)**



**H ình 3.30. Tủ vi khí hậu nóng**



**H ình 3.31. Bột rau má bảo quản ở 5°C ở thời điểm 6 tháng**



**H ình 3.32. Bột rau má bảo quản ở 5°C ở thời điểm 12 tháng**



**H ình 3.33. Bột rau má bảo quản ở 30°C ở thời điểm 6 tháng**



**H ình 3.34. Bột rau má bảo quản ở 30°C ở thời điểm 12 tháng**