

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH TÍNH SẠCH POLYPHENOL TỔNG ĐƯỢC TRÍCH LY TỪ HẠT BƠ (*Persea americana* Mill) BẰNG DUNG MÔI ETHYL ACETAT

Lê Phan Thùy Hạnh^{1,*}, Trần Quyết Thắng¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu này tập trung xác định điều kiện tối ưu để tinh sạch hợp chất polyphenol tổng được trích ly từ hạt bơ *Persea americana* Mill bằng dung môi ethyl acetat. Điều kiện của quá trình tinh sạch được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (Response surface methodology) với mô hình quay bậc 2 có tâm (Central composite design - CCD) nhằm thu được sản phẩm polyphenol tổng và khả năng bắt gốc tự do DDPH của dịch chiết cao nhất. Các yếu tố khác được cố định dựa trên kết quả của các khảo sát trước đó. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat là 1/1 (ml/ml) và thời gian 60 phút là thích hợp để tinh sạch; sản phẩm polyphenol tổng thu được là 220,5 g/kg chất khô; khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm là 57,691%; sản phẩm có độ tinh khiết là 86,4264%.

Từ khóa: Polyphenol, tinh sạch polyphenol, hạt bơ *Persea americana* Mill, phương pháp bề mặt đáp ứng, dung môi ethyl acetat.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, hợp chất polyphenol là nhóm chất rất được quan tâm bởi polyphenol thể hiện những đặc tính sinh học quý đặc biệt là khả năng chống oxi hóa, chống viêm, chống dị ứng và khả năng kháng khuẩn [1].

Trong công nghiệp, thịt quả bơ được sử dụng, vỏ và hạt bị loại bỏ. Hiện nay, lượng phụ phẩm này chủ yếu được dùng để sản xuất thức ăn chăn nuôi, làm phân bón hoặc chỉ thải bỏ ra môi trường. Trong khi đó, hạt quả bơ chứa nhiều hợp chất chống oxi hóa tự nhiên [2]. Một trong những chất chống oxy hóa tự nhiên được công nhận là hợp chất polyphenols [3].

Để chiết xuất hợp chất polyphenol tổng, các phương pháp chiết xuất bằng dung môi hữu cơ, chiết xuất có hỗ trợ siêu âm, chiết xuất có hỗ trợ vi sóng và chiết xuất bằng enzym đã được áp dụng

[4]. Sau khi chiết xuất, các quá trình tách và tinh chế là cần thiết để loại bỏ các tạp chất, thành phần không mong muốn như: đường, cafein, protein, axit hữu cơ... nhằm thu được sản phẩm polyphenol tổng với độ tinh khiết cao [5].

Kỹ thuật chiết lỏng - lỏng bằng dung môi hữu cơ là một lựa chọn phù hợp để tinh chế polyphenol từ chiết xuất thực vật. Nó không chỉ đơn giản mà chi phí lại thấp [5]. Mặt khác, ethyl acetate là một dung môi rất thích hợp để chọn làm dung môi tinh sạch polyphenol do ethyl acetate dễ bay hơi nên dễ loại bỏ để thu polyphenol, bên cạnh đó ethyl acetate không độc hại cho người sử dụng [5]. Do đó, việc sử dụng dung môi ethyl acetate để tinh sạch polyphenol tổng sau khi được trích ly sẽ hữu ích cho việc thu nhận và ứng dụng nguồn sản phẩm polyphenol này trong các lĩnh vực thực phẩm và y học.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Dịch chiết polyphenol tổng được trích ly từ hạt quả bơ (*Persea americana* Mill) theo quy trình:

¹ Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh

*Email: hanhlpt@hufi.edu.vn

10 g hạt bơ khô đã nghiền được trích ly bằng dung môi ethanol (ethanol/nước: 50/50 (v/v)) ở tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v) với sự hỗ trợ của vi sóng (công suất vi sóng 120 W và thời gian 100 giây), tiến hành lọc, rồi đem cô quay ở nhiệt độ 40°C trong điều kiện chân không [7]. Dịch sau cô quay được bổ sung axit HCl 0,01M với tỷ lệ dịch lọc/dung dịch HCl là 1/10 (ml/ml) trong thời gian 24 giờ nhằm tạo môi trường axit thích hợp cho sự tồn tại của polyphenol tổng, đồng thời dùng axit để phá hủy cấu trúc liên kết của các nhóm phức như: đường, protein... với polyphenol để giải phóng polyphenol tự do [8]. Dịch sau xử lý axit được đem đi lọc, thu lấy phần dịch lọc.

2.2. Phương pháp phân tích

2.2.1. Xác định hàm lượng polyphenol tổng bằng phương pháp so màu (phương pháp Folin – Ciocalteu) [9]

Xây dựng phương trình đường chuẩn axit gallic: lấy axit gallic vào các bình định mức với lượng 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 µg. Cho tiếp 0,5 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu vào từng bình định mức. Sau 3 phút thì cho tiếp 2,5 ml Sodium cacbonat bão hòa. Thêm nước cất đến vạch định mức, để tối đa 30 phút. Đo cường độ hấp thụ ở bước sóng 760 nm.

Xác định hàm lượng polyphenol: hút 1 ml dịch chiết + 0,5 ml thuốc thử Folin - Ciocalteu để khoảng 3 phút. Sau đó thêm vào 2,5 ml dung dịch Na₂CO₃ bão hòa, lắc nhẹ cho đều, định mức bằng nước cất đến vạch, để trong bóng tối 30 phút tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 760 nm.

Từ kết quả so màu, dựa trên phương trình chuẩn của axit gallic thì xác định được hàm lượng của polyphenol.

2.2.2. Xác định độ tinh khiết của sản phẩm

Lấy hàm lượng sản phẩm được xác định ở trên hòa tan trong nước, sau đó tiến hành xác định hàm

lượng polyphenol tổng bằng phương pháp so màu theo mục 2.2.1.

$$\text{Độ tinh khiết của sản phẩm} = \frac{m_{\text{polyphenol}}}{m_{\text{sp}}} \times 100 (\%)$$

2.2.3. Xác định khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH của sản phẩm

Lấy hàm lượng sản phẩm mà tại hàm lượng đó loại bỏ 50% gốc tự do DPPH được xác định ở trên vào 2,5 ml dung dịch DPPH 0,06 mM, định mức đến vạch rồi để ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút.

Mẫu đối chứng là mẫu chứa DPPH.

Sự thay đổi độ hấp thụ tại bước sóng 517 nm được đo bằng thiết bị đo quang UV-Vis và lượng DPPH còn lại sẽ được tính toán. Hoạt lực thu dọn các gốc tự do được thể hiện trên tỷ lệ phần trăm ức chế và được tính theo công thức:

$$\frac{H_0 - H_1}{H_0} \times 100 \%$$

Trong đó: H₀ là độ hấp thụ của mẫu đối chứng; H₁ là độ hấp thụ của mẫu có dịch chiết.

Sản phẩm có khả năng ức chế hàm lượng gốc tự do DPPH càng cao thì khả năng bắt gốc tự do DPPH càng lớn.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp nghiên cứu thực nghiệm đơn yếu tố

Sử dụng phương pháp nghiên cứu thực nghiệm đơn yếu tố để nghiên cứu ảnh hưởng riêng của 2 yếu tố: tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat và thời gian tinh sạch đến hàm lượng hợp chất polyphenol tổng thu nhận và khả năng bắt gốc tự do của sản phẩm trích ly.

Khoảng nghiên cứu của các yếu tố:

Tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat: 0,5/1; 1/1; 2/1; 3/1 (ml/ml) ở nhiệt độ thường trong thời gian 60 phút.

Thời gian: 30, 45, 60, 75 phút với tỷ lệ dịch/ethyl acetat theo kết quả trên.

Sau xử lý ethyl acetat, hỗn hợp sẽ chia thành 2 pha, trong đó polyphenol tổng sẽ hòa tan vào trong lớp ethyl acetate, tách bỏ lớp nước bên trên. Tiếp theo, tiến hành cô đặc để dung môi ethyl acetate bay hơi và thu lại sản phẩm cuối cùng là cao chiết polyphenol tổng. Cao chiết polyphenol tổng được sấy ở nhiệt độ 60°C đến độ ẩm sản phẩm nhỏ hơn 10%. Cân khối lượng sản phẩm thu được sau khi sấy. Kết quả của thí nghiệm được đánh giá qua khối lượng sản phẩm thu được, độ tinh khiết của sản phẩm theo mục 2.2.2 và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm theo mục 2.2.3.

2.3.2. Phương pháp thực nghiệm đa yếu tố [10]

Kết quả khảo sát độc lập sự ảnh hưởng 2 các yếu tố tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat và thời gian là cơ sở để thực hiện thí nghiệm tối ưu hóa.

Phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology – RSM) với phương án quay bậc 2 có tâm (cánh tay đòn $\alpha = 1,414$) được áp dụng để nghiên cứu ảnh hưởng đồng thời của 2 yếu tố: tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat và thời gian đến khối lượng sản phẩm thu được, độ tinh khiết của sản phẩm và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm polyphenol tổng.

Số thí nghiệm được tính theo công thức: $N = 2k + 2k + n_0$.

Trong đó: k là số yếu tố thí nghiệm; n_0 là số thí nghiệm tại tâm.

Phương trình hồi quy sử dụng để dự đoán sự phụ thuộc của khối lượng sản phẩm thu được, độ tinh khiết của sản phẩm và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm polyphenol tổng được tính sạch vào các yếu tố thí nghiệm là một đa thức bậc hai có dạng như sau:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_{12} + b_{22}X_{22}$$

Trong đó: $b_0, b_1, b_2, b_{12}, b_{11}, b_{22}$ là các hệ số của phương trình hồi quy; b_0 là hệ số hồi quy; b_1, b_2 là hệ số tuyến tính; b_{11}, b_{22} là hệ số tương tác đôi.

Mỗi hệ số b đặc trưng cho ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình tinh sạch polyphenol.

Các hệ số của phương trình hồi quy được xác định với sự trợ giúp của phần mềm Modde 5.0. Ngoài ra, để xác định được chính xác dạng của phương trình, các hệ số hồi quy này còn được tiến hành kiểm tra mức ý nghĩa với $P = 0,05$.

2.4. Phân tích số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được trình bày ở dạng $TB \pm SD$. Phần mềm SPSS 16 được sử dụng để tìm ra sự khác biệt giữa các thí nghiệm qua xử lý ANOVA và LSD. Phần mềm JMP được ứng dụng để qui hoạch thực nghiệm và tối ưu hóa quá trình sấy. Đồ thị được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu thực nghiệm đơn yếu tố

3.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat

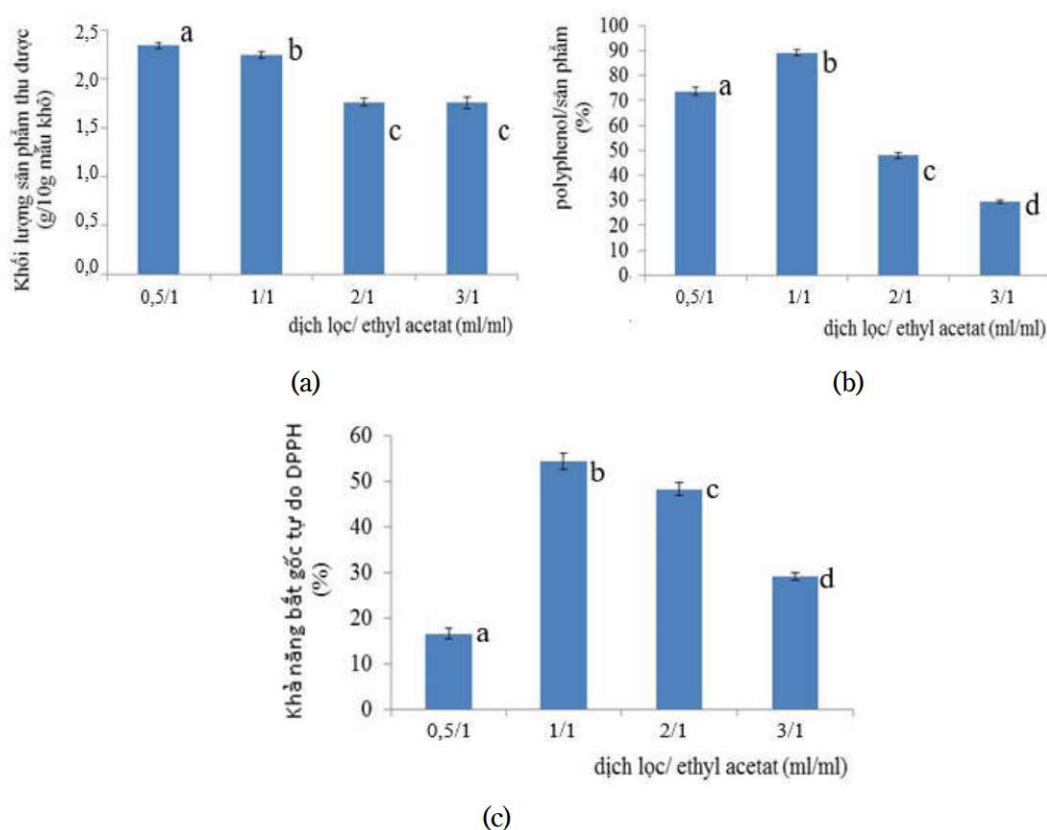
Dịch sau khi được xử lý axit HCl 0,01M với tỷ lệ dịch lọc/HCl là 1/10 trong thời gian 24 giờ, được lắng lọc. Sau đó, sử dụng dịch này để tiến hành tinh chế polyphenol.

Dung môi ethyl acetate không tan trong nước và có tỷ trọng nhẹ hơn nước nên sau khi trộn vào dung dịch lọc, khuấy đều và để yên trong một khoảng thời gian, hỗn hợp sẽ tách 2 pha rõ rệt. Tiến hành tách dung dịch ethyl acetate có chứa polyphenol ra khỏi hỗn hợp.

Trong thí nghiệm khảo sát tỷ lệ dịch lọc/dung môi là 0,5/1; 1/1; 2/1; 3/1 ở nhiệt độ thường trong thời gian 60 phút. Kết quả được thể hiện ở hình 1.

Kết quả thu được là giá trị trung bình của ba lần lặp. Số liệu được xử lý ANOVA để nhận xét sự khác biệt giữa các mẫu. Giá trị P - value đều cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu khi thay đổi tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat.

Đồng thời, khi tiến hành xử lý LSD cho thấy, tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat ảnh hưởng đáng kể đến việc thu hồi hợp chất polyphenol tổng và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm.



Hình 1. Ảnh hưởng dịch lọc/ethyl acetat đến khối lượng sản phẩm thu nhận, độ tinh khiết của polyphenol tổng trong sản phẩm và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm

Ghi chú: Các số liệu có ký tự chung thì khác biệt không có ý nghĩa. (a): Khối lượng sản phẩm thu nhận; (b): Độ tinh khiết của polyphenol trong sản phẩm; (c): Khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm.

Hình 1 cho thấy, khi lượng dung môi ethyl acetat sử dụng tăng dần và giữ nguyên lượng dịch lọc thì sản phẩm trích ly thu được tăng dần (Hình 1 (a)). Trong khi đó, độ tinh khiết tăng từ tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat từ 3/1 lên 1/1 và sau đó có xu hướng giảm ở tỷ lệ 0,5/1 (Hình 1 (b)). Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat đến khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm cũng trùng với kết quả ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol trong sản phẩm. Tức là, khi tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat tăng từ 3/1 lên 1/1 (ml/ml) thì khả năng bắt gốc tự do DPPH tăng và có xu hướng giảm ở tỷ lệ 0,5/1 (Hình 1 (c)).

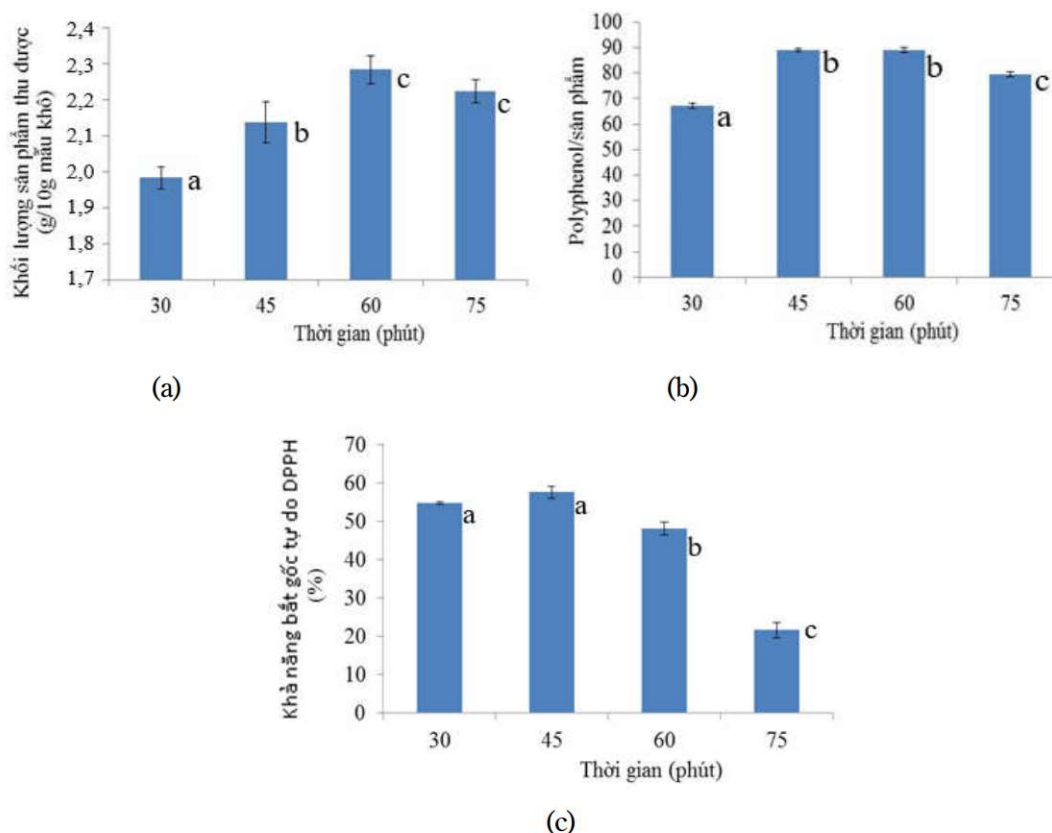
Để đảm bảo khối lượng sản phẩm thu nhận, độ tinh khiết của polyphenol tổng trong sản phẩm

và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm đạt tối ưu. Đồng thời, khi lượng dung môi ethyl acetat sử dụng lớn sẽ ảnh hưởng đến chi phí của thành phẩm sau này.

Do đó, chọn tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat 1/1 (ml/ml) là tỷ lệ thích hợp để tinh sạch hợp chất polyphenol tổng.

3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian tinh sạch

Để tinh sạch hợp chất polyphenol tổng, hợp chất này cần có đủ thời gian để hòa tan vào dung môi ethyl acetat. Do đó, thời gian cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tinh sạch hợp chất polyphenol tổng. Kết quả thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng thời gian đến khối lượng sản phẩm, độ tinh khiết của polyphenol tổng trong sản phẩm và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm

Ghi chú: Các số liệu có kí tự chung thì khác biệt không có ý nghĩa. (a): Khối lượng sản phẩm thu nhận; (b): Độ tinh khiết của polyphenol trong sản phẩm; (c): Khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm

Kết quả thu được là giá trị trung bình của ba lần lặp. Số liệu được xử lý ANOVA để nhận xét sự khác biệt giữa các mẫu. Giá trị P - value đều cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu khi thay đổi thời gian.

Đồng thời, khi tiến hành xử lý LSD cho thấy, thời gian ảnh hưởng đáng kể đến việc thu hồi hợp chất polyphenol và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm. Kết quả cho thấy, khi tăng thời gian tinh sạch thì khối lượng sản phẩm có xu hướng tăng và đạt giá trị cao nhất tại thời gian 60 phút. Ở thời gian 70 phút, khối lượng sản phẩm thu được có xu hướng ngừng tăng. Trong khi đó, độ tinh khiết của sản phẩm đạt giá trị cao nhất tại thời

gian 45 phút. Khi tăng thời gian từ 45 phút lên 60 phút, độ tinh khiết của sản phẩm có xu hướng ngừng tăng sau đó giảm khi ở thời gian 75 phút.

Mặc khác, khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm đạt cao nhất ở thời gian 30 và 45 phút. Nếu tiếp tục tăng thời gian từ 45 phút lên 75 phút, khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm có xu hướng giảm.

Để đảm bảo khối lượng sản phẩm thu nhận, độ tinh khiết của polyphenol trong sản phẩm và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm đạt tối ưu, chọn thời gian 45 phút là thời gian thích hợp để tinh sạch hợp chất polyphenol tổng.

3.2. Kết quả nghiên cứu thực nghiệm đa yếu tố

Dựa vào kết quả thu được của thí nghiệm đơn yếu tố để xác định được khoảng biến thiên của tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat và thời gian tinh sạch. Hai yếu tố tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat (X_1 , ml/ml) và thời gian tinh sạch (X_2 , phút) được khảo sát đồng thời nhằm: (1) xây dựng phương trình hồi quy thực nghiệm mô tả mối quan hệ giữa các yếu tố

ảnh hưởng đến khối lượng sản phẩm thu được, độ tinh khiết của sản phẩm và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm polyphenol tổng; (2) tìm điều kiện của quá trình tinh sạch để thu được khối lượng sản phẩm, độ tinh khiết của sản phẩm và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm polyphenol tổng tốt nhất.

Bảng 1. Các mức yếu tố trong thí nghiệm tối ưu hóa quá trình tinh sạch

Yếu tố thí nghiệm	Mức yếu tố				
	- α	- 1	0	+ 1	α
Dịch lọc/ethyl acetat (X_1 , ml/ml)	0,293	0,5/1	1/1	2/1	1,707
Thời gian (X_2 , phút)	23,79	30	45	60	66.21
Các mức của biến mã hóa: +1 (mức cao), -1 (mức thấp), 0 (mức cơ sở), $\alpha = 1,414$					

Số thí nghiệm: $N = 2k + 2k + n_0 = 22 + 2.2 + 3 = 11$

Bảng 2. Ma trận thực nghiệm trong thí nghiệm tối ưu hóa quá trình tinh sạch

Thí nghiệm thứ	Biến mã hóa		Biến thực		Sản phẩm (g/10 g mẫu)		Độ tinh khiết		Khả năng bắt gốc DPPH	
	x_1	x_2	X_1	X_2	$Y_{\text{thực}}$ thí nghiệm	$Y_{\text{dự đoán}}$	$Y_{\text{thực}}$ thí nghiệm	$Y_{\text{dự đoán}}$	$Y_{\text{thực}}$ thí nghiệm	$Y_{\text{dự đoán}}$
1	- 1	- 1	0,5	30	1,632	1,583	66,789	64,058	44,223	43,079
2	+ 1	- 1	1,5	30	1,503	1,457	61,456	60,911	40,93	38,617
3	- 1	+ 1	0,5	60	1,362	1,324	51,697	50,045	30,473	30,594
4	+ 1	+ 1	1,5	60	2,24	2,205	85,892	86,426	58,739	57,691
5	- α	0	0,293	45	1,594	1,638	62,395	65,040	44,909	45,179
6	+ α	0	1,707	45	2,132	2,172	88,984	88,537	59,259	61,182
7	0	- α	1	23,79	1,157	1,207	48,004	49,866	27,490	29,481
8	0	+ α	1	66,21	1,518	1,552	57,663	57,998	33,937	34,139
9	0	0	1	45	1,503	1,564	65,502	65,826	41,145	41,849
10	0	0	1	45	1,611	1,564	66,788	65,826	42,505	41,849
11	0	0	1	45	1,578	1,564	65,189	65,826	41,899	41,849

Để xây dựng mô tả toán học dưới dạng phương trình hồi quy, tiến hành xác định các hệ số của phương trình. Kết quả tính toán và kiểm tra ý

nghĩa các hệ số của phương trình hồi quy được như sau:

3.2.1. Tối ưu hóa thực nghiệm trong thu sản phẩm

Bảng 3. Kết quả tính toán và kiểm tra ý nghĩa các hệ số của phương trình hồi quy trong tinh sạch (hàm mục tiêu là sản phẩm)

Hệ số	Giá trị ước lượng	Giá trị P
b_0	1,564	1,4e-007
b_1	0,189	0,000
b_2	0,122	0,003
b_{11}	0,171	0,001
b_{22}	-0,092	0,019
b_{12}	0,252	0,001

^a Các hệ số không có ý nghĩa thống kê với $P > 0,05$

Kết quả xử lý số liệu cho thấy, tất cả các hệ số có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Bảng 4. Kết quả kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy trong tinh sạch (hàm mục tiêu là sản phẩm)

Nguồn	Mức độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P	
Hồi quy	5	0,947437	0,189487	46,2487	0,000	Có ý nghĩa
Giá trị còn lại	5	0,020485	0,0040971			
Sự thiếu phù hợp	3	0,014359	0,0047865	1,56271	0,413	kKhông có ý nghĩa
Lỗi thuần túy	2	0,006126	0,0030630			
Tổng số chính xác	10	0,967922	0,0967922			

3.2.2. Tối ưu hóa thực nghiệm độ tinh khiết của sản phẩm

Bảng 5. Kết quả tính toán và kiểm tra ý nghĩa các hệ số của phương trình hồi quy trong tinh sạch (hàm mục tiêu là độ tinh khiết của sản phẩm)

Hệ số	Giá trị ước lượng	Giá trị P
b_0	65,826	4,4e-008
b_1	8,309	0,000
b_2	2,876	0,013
b_{11}	5,483	0,0017
b_{22}	-5,947	0,0012
b_{12}	9,882	0,0002

^a Các hệ số không có ý nghĩa thống kê với $P > 0,05$

Phương trình hồi quy thực nghiệm có dạng như sau:

$$Y_2 = 1,564 + 0,189X_1 + 0,122X_2 + 0,252X_1X_2 + 0,171X_1^2 - 0,092X_2^2 \quad (1)$$

Kết quả kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy với thực nghiệm (Bảng 4) cho thấy, các yếu tố thí nghiệm có ảnh hưởng mạnh lên hàm lượng polyphenol thu được ($P < 0,05$). Tính tương thích của phương trình hồi quy (lack of fit) được kiểm tra với sự hỗ trợ của phần mềm Modde 5.0. Phương trình hồi quy sẽ tương thích với thực nghiệm nếu kết quả phân tích “lack of fit” là không có ý nghĩa thống kê [9]. Kết quả ở bảng 3 cho thấy, kiểm định “lack of fit” là không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Như vậy, phương trình hồi quy có sự tương thích cao với thực nghiệm.

Kết quả xử lý số liệu cho thấy, các hệ số có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Phương trình hồi quy thực nghiệm có dạng như sau:

$$Y_2 = 65,826 + 8,309X_1 + 2,876 X_2 + 9,882 X_1X_2 + 5,483X_1^2 - 5,947X_2^2 \quad (2)$$

Kết quả kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy với thực nghiệm (Bảng 6) cho thấy, các yếu tố thí nghiệm có ảnh hưởng mạnh lên độ tinh khiết của dịch chiết thu được ($P < 0,05$). Tính tương thích của phương trình hồi quy (lack of fit)

được kiểm tra với sự hỗ trợ của phần mềm Modde 5.0. Phương trình hồi quy sẽ tương thích với thực nghiệm nếu kết quả phân tích “lack of fit” là không có ý nghĩa thống kê [9]. Kết quả ở bảng 6 cho thấy

kiểm định “lack of fit” là không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Như vậy, phương trình hồi quy có sự tương thích cao với thực nghiệm.

Bảng 6. Kết quả kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy theo trong tinh sạch (hàm mục tiêu là độ tinh khiết của sản phẩm)

Nguồn	Mức độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P	
Hồi qui	5	1531,8	306,36	66,6521	0,000	Có ý nghĩa
Giá trị còn lại	5	22,982	4,5964			
Sự thiếu phù hợp	3	21,5458	7,18194	10,0014	0,092	Không có ý nghĩa
Lỗi thuần túy	2	1,43619	0,718094			
Tổng số chính xác	10	1554,78	155,478			

3.2.3. Tối ưu hóa thực nghiệm khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm

Bảng 7. Kết quả tính toán và kiểm tra ý nghĩa các hệ số của phương trình hồi qui trong tinh sạch (hàm mục tiêu là khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm)

Hệ số	Giá trị ước lượng	Giá trị P
b_0	41,849	1,8e-007
b_1	5,659	0,000
b_2	1,647	0,050
b_{11}	5,667	0,0007

b_{22}	-5,021	0,0012
b_{12}	7,890	0,0003
^a Các hệ số không có ý nghĩa thống kê với $P > 0,05$		

Kết quả xử lý số liệu cho thấy hầu hết các hệ số có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$), chỉ có một hệ số b_2 không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) nên bị loại khỏi phương trình hồi quy.

Phương trình hồi quy thực nghiệm có dạng như sau:

$$Y_3 = 41,849 + 5,659X_1 + 7,890 X_1X_2 + 5,667X_1^2 - 5,021X_2^2 \quad (3)$$

Bảng 8. Kết quả kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy trong tinh sạch (hàm mục tiêu là khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm)

Nguồn	Mức độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P	
Hồi qui	5	984,447	196,889	59,7603	0,000	Có ý nghĩa
Giá trị còn lại	5	16,4733	3,29465			
Sự thiếu phù hợp	3	15,5448	5,1816	11,1618	0,083	Không có ý nghĩa
Lỗi thuần túy	2	0,928451	0,464226			
Tổng số chính xác	10	1000,92	100,092			

Kết quả kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy với thực nghiệm (Bảng 8) cho thấy các yếu tố thí nghiệm có ảnh hưởng mạnh lên khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết thu được

($P < 0,05$). Tính tương thích của phương trình hồi quy (lack of fit) được kiểm tra với sự hỗ trợ của phần mềm Modde 5.0. Phương trình hồi quy sẽ tương thích với thực nghiệm nếu kết quả phân tích

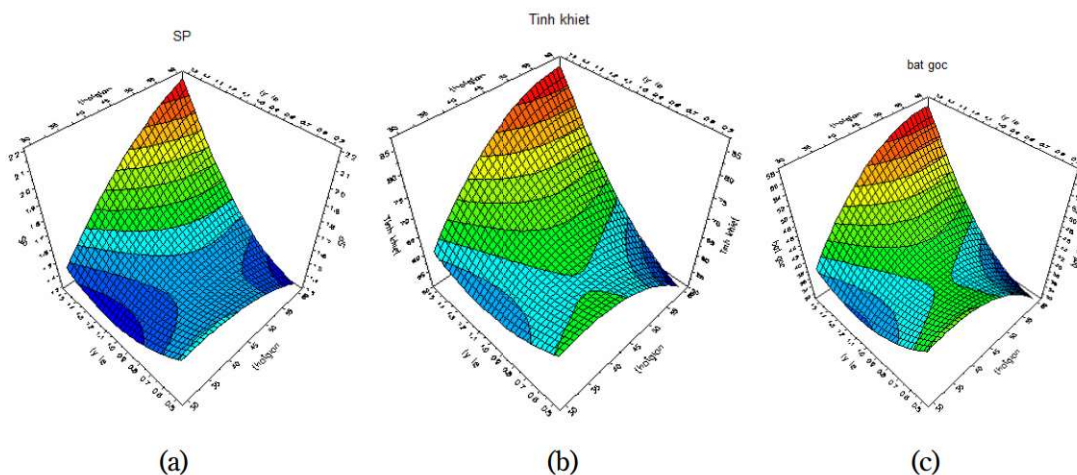
“lack of fit” là không có ý nghĩa thống kê [9]. Kết quả ở bảng 8 cho thấy kiểm định “lack of fit” là không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Như vậy, phương trình hồi quy có sự tương thích cao với thực nghiệm.

3.2.4. Tối ưu hóa hàm đa mục tiêu

Quá trình tinh sạch polyphenol có khối lượng, độ tinh khiết và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm được đặc trưng bởi 3 phương trình (1), (2) và (3). Ba phương trình này thể hiện sự tác

động của các yếu tố công nghệ đến hàm lượng polyphenol thu được, độ tinh khiết của polyphenol và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm.

Xử lý bằng mode 5.0 cho kết quả: tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat: 1/1 (ml/ml); thời gian 60 phút; sản phẩm thu được là 220,5 g/kg chất khô; khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết là 57,691%; sản phẩm có độ tinh khiết là 86,4264%



Hình 3. Bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu trong quá trình tinh sạch

Ghi chú: (a): Hàm mục tiêu là sản phẩm thu nhận; (b): Hàm mục tiêu là độ tinh khiết của sản phẩm; (c): Hàm mục tiêu là khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm

4. KẾT LUẬN

Cả hai yếu tố tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat và thời gian đều ảnh hưởng đến khối lượng sản phẩm thu được, độ tinh khiết của sản phẩm và khả năng bắt gốc tự do DPPH của sản phẩm polyphenol tổng. Kết quả, tỷ lệ dịch lọc/ethyl acetat: 1/1 (ml/ml) và thời gian 60 phút là điều kiện tối ưu để tinh sạch hợp chất polyphenol tổng được chiết xuất từ hạt bơ *Persea americana* Mill với sản phẩm thu được là 220,5 g/kg chất khô, khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết là 57,691% và sản phẩm có độ tinh khiết là 86,4264%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. A. Rostagno, M. Palma, C. G. Barroso (2004). *Pressurized liquid extraction of isoflavones*

from soybeans. *Analytica Chimica Acta*: 522,169–177.

2. Francisco Segovia Gómez, Sara Peiró Sánchez, Maria Gabriela Gallego Iradi, Nurul Aini Mohd Azman, María Pilar Almajano (2014). *Avocado seeds: extraction optimization and possible use as antioxidant in food*. *Antioxidants*: 3, 439-454.

3. King A. J., Griffin J. K., Roslan F. (2014). In vivo and in vitro addition of dried olive extract in poultry. *J. Agric. Food Chemistry*: 62 (31), 7915-7919.

4. Jang G. Y., Kim H. Y., Lee S. H., Kang Y., Hwang I. G., Woo K. S (2012). Effects of heat treatment and extraction method on antioxidant

activity of several medicinal plants. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*: 41, 914–920.

5. Marcelo Silva, Joan Cortada García, and Marcel Ottens (2018). *Polyphenol Liquid-Liquid Extraction Process Development Using NRTL-SAC*. Industrial & engineering chemistry research: 57(28), 9210–9221.

6. Queires LC, *et al.* (2006). *Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (Schinus terebinthifolius, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells*. Anticancer Res.: 26(1A), 379–387.

7. Lê Phan Thùy Hạnh, Trần Quyết Thắng (2019). Tối ưu hóa quá trình trích ly hợp chất Polyphenol tổng có hỗ trợ vi sóng từ hạt của cây bơ (*Persea americana* Mill). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 19, 72-80.

8. Pinelo, M., Laurie, V. F., Waterhouse, A. L. (2006). A simple method to separate red wine nonpolymeric and polymeric phenols by solid-phase extraction. *J. Agric. Food Chem.*: 54, 2839-2844.

9. Singleton, V. L & Rossi J A Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult*: 16, 144 – 158.

10. Kun-Nan Chen và Ming-Ju Chen (2008). *Statistical Optimization: Response Surface Methodology. Optimization in Food Engineering. Optimization in food engineering*. CRC Press, 140 – 165.

OPTIMIZATION OF PURIFICATION OF TOTAL POLYPHENOL COMPOUNDS WHICH EXTRACTED FROM AVOCADO SEEDS (*Persea americana* MILL) BY ETHYL ACETAT SOLVENT

Le Phan Thuy Hanh^{1,*}, Tran Quyet Thang¹

¹*Ho Chi Minh city University of Food Industry*

**Email: hanhlpt@hufi.edu.vn*

Summary

This study focused on optimization of purification of total polyphenol compounds which extracted from avocado seeds (*Persea americana* Mill) by ethyl acetat solvent. The conditions of purification of total polyphenol compounds were optimized by Response Surface Methodology with central composite design (CCD). Other factors were fixed based on results of earlier studies. The results showed that, the optimal conditions for purification of total polyphenol compounds: polyphenolic extracts to ethyl acetat solvent ratio of 1/1 (ml/ml) and purification time of 60 minutes; the polyphenol product is 220.5 g GAE/kg dry samples; the free radical DPPH scavenging capacity of polyphenol product is 57.691%; the product purity is 86.4264%.

Keywords: *Polyphenol, purification of total polyphenol compounds, Persea americana Mill avocado seed, response surface methodology, ethyl acetat solvent.*

Người phản biện: PGS.TS. Đỗ Văn Chương

Ngày nhận bài: 02/12/2022

Ngày thông qua phản biện: 19/12/2022

Ngày duyệt đăng: 31/01/2023