

# NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT DẦU VÀ PICEATANNOL TỪ HẠT CHANH LEO

Lại Thị Ngọc Hà

*Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Tác giả liên hệ: ltnha.cntp@vnua.edu.vn*

Ngày nhận bài: 29.06.2023

Ngày chấp nhận đăng: 05.01.2024

## TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định điều kiện thích hợp cho quá trình khai thác dầu và piceatannol từ hạt chanh leo. Dầu được tách ra bằng phương pháp trích ly động. Điều kiện tối ưu cho tách piceatannol được xác định bằng phương pháp bề mặt đáp ứng và piceatannol được phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. Kết quả cho thấy điều kiện thích hợp để trích ly dầu là: dung môi ethyl acetate, nhiệt độ 30°C, thời gian 30 phút, số lần trích ly 2 với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lần lượt là 1/10 và 1/5 (w/v) cho hiệu suất trích ly dầu đạt  $78,12 \pm 0,31\%$ . Dầu thô có chỉ số axit và peroxide lần lượt là  $1,61 \pm 0,05$  mg KOH/g và  $0,62 \pm 0,03$  meq O<sub>2</sub>/kg, đạt tiêu chuẩn TCVN 7597:2018 quy định cho dầu thực vật. Hạt chanh leo sau trích ly dầu chứa 68,94% lượng piceatannol so với nguyên liệu ban đầu. Mô hình bậc hai với ba biến (nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian) đã được xây dựng để mô tả quá trình tách chiết piceatannol từ hạt chanh leo sau trích ly dầu ( $R^2 = 0,9635$ ). Điều kiện tách chiết piceatannol tối ưu như sau: 68% ethanol (v/v), 85°C, 45 phút. Nghiên cứu này là cơ sở cho việc khai thác triệt để phụ phẩm hạt chanh leo, tạo các sản phẩm ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và mỹ phẩm.

Từ khóa: Ethyl acetate, tách chiết dùng ethanol, HPLC, bề mặt đáp ứng.

## Extraction of Lipids and Piceatannol from Passion Fruit Seeds

### ABSTRACT

The objective of this study was to determine the optimal conditions for oil and piceatannol extraction from passion fruit seeds. Oil was extracted by dynamic extraction and piceatannol extraction was optimised by response surface methodology. The piceatannol content was analysed by high performance liquid chromatography. Results showed that the best oil extraction conditions were as follows: ethyl acetate used as extraction solvent, temperature of 30°C, extraction time of 30 minutes and two times of extraction (with material/solvent ratio of 1/10 and 1/5 (w/v) for the first and the second times, respectively). At these conditions, the oil extraction yield was of  $78.12 \pm 0.31\%$ . The crude oil had acid value of  $1.61 \pm 0.05$ mg KOH/g and peroxide value of  $0.62 \pm 0.03$  meq O<sub>2</sub>/kg. These values were lower than the maximal legal levels specified in TCVN 7597:2018 Vietnamese standard for vegetable oils. Piceatannol content in defatted passion seeds corresponded to 68.94% of initial piceatannol quantity of passion fruit seeds. A second-order polynomial model with three important variables (ethanol concentration, temperature and extraction time) was successfully built to describe the piceatannol extraction ( $R^2 = 0.9635$ ). The optimised conditions were the followings: 68% ethanol (v/v), at 85°C during 45 min. This research could serve as bases for full exploitation of passion fruit seeds, producing by-products utilised in cosmetic and food technologies.

Keywords: Ethyl acetate, ethanolic extraction, HPLC quantification, response surface methodology.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chanh leo (*Passiflora edulis* Sims) thuộc họ Passifloraceae, có nguồn gốc Nam Mỹ (Morton, 1987). Loại quả này có hương thơm hấp dẫn và nhiều lợi ích cho sức khỏe con người. Theo Cơ sở dữ liệu Dinh dưỡng quốc gia của Bộ Nông

nghiệp Hoa Kỳ, một khẩu phần chanh leo (236g) cung cấp 24,5g chất xơ (65-117% khuyến nghị hàng ngày cho người trưởng thành); 3,8mg sắt (21-47%); 821,3mg kali (24-36%); 70,8mg vitamin C (79-157%), 151µg vitamin A (17-25%) (USDA, 2019; NIH, 2023). Hạt chanh leo chứa lượng dầu cao (23,32%) có thể được sử dụng

trong ngành thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm (Surlehan & cs., 2019). Bên cạnh đó, chanh leo còn chứa nhiều chất hoạt chất sinh học như các anthocyanin trong vỏ (Hu & cs., 2020) và piceatannol trong hạt (Matsui & cs., 2010) được biết đến là có lợi cho sức khỏe con người. Trong số các hoạt chất này, piceatannol có nhiều tính chất sinh học quý bao gồm chống oxy hóa, chống viêm (Zomer & cs., 2022), kháng khuẩn (Güldap & cs., 2019), chống ung thư (Yamamoto & cs., 2019) và chống dị ứng (Võ Thanh Sang & cs., 2021). Hợp chất này thúc đẩy quá trình biệt hóa tế bào hình sao là tế bào thần kinh đệm phổ biến nhất trong hệ thần kinh trung ương với nhiều vai trò quan trọng khác nhau bao gồm kiểm soát lưu lượng máu, vận chuyển ion, hấp thu và giải phóng các chất dẫn truyền thần kinh và chuyển hóa năng lượng (Arai & cs., 2019). Hàm lượng piceatannol trong hạt chanh leo rất cao, đạt 2,2 mg/g (Matsui & cs., 2010) gấp 14.000 lần so với nho đỏ (0,15-0,17 mg/kg) (Guerrero & cs., 2010), một nguồn piceatannol chính trong chế độ ăn uống của con người.

Theo thống kê của Bộ NN&PTNT Việt Nam, chanh leo hiện được trồng tại 46 tỉnh trên cả nước với diện tích trên 6.000ha và sản lượng trên 110.000 tấn (Văn Phúc, 2022). Ước tính, diện tích trồng chanh leo tăng lên 15.000ha trong giai đoạn 2025-2030, chủ yếu tập trung tại các tỉnh miền núi phía Bắc và Tây Nguyên với sản lượng 300.000-400.000 tấn. Chanh leo được dùng để xuất khẩu, chế biến nước chanh leo và chanh leo cô đặc. Trong quá trình chế biến, hạt và vỏ chanh leo là phụ phẩm chiếm lần lượt 40% và 12% lượng nguyên liệu đầu vào (Matsui & cs., 2010). Như vậy, mỗi năm sẽ có hàng nghìn tấn hạt chanh leo được thải ra bởi các nhà máy thực phẩm. Phụ phẩm này có thể được sử dụng để khai thác dầu và chiết xuất hoạt chất piceatannol ứng dụng trong công nghệ thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm.

Mục tiêu của nghiên cứu này là khai thác hạt chanh leo như một nguồn dầu thực vật và các chất có hoạt tính sinh học. Để đạt được mục tiêu này, đầu tiên, điều kiện thích hợp để trích ly dầu từ hạt được xác định. Sau đó, điều kiện tách chiết piceatannol từ hạt sau tách dầu được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu và hóa chất

Chanh leo được mua tại chợ đầu mối phía Nam Hà Nội vào tháng 9/2019. Hạt được tách ra và được rửa sạch bằng nước máy để loại bỏ lớp màng bao quanh hạt, tráng bằng nước cất và phơi khô dưới ánh nắng mặt trời. Hạt khô (độ ẩm  $93,94 \pm 0,19\%$ ) được nghiền đến kích thước  $< 0,3\text{mm}$  bằng máy ZM 200 - Ultra Centrifugal Mill (Retsch, Đức), đựng trong túi PE kín và bảo quản ở  $-20^{\circ}\text{C}$  cho đến khi sử dụng. Bã hạt chanh leo sau tách dầu từ 100g hạt chanh leo nguyên liệu được sử dụng cho thí nghiệm tối ưu hóa quá trình tách chiết piceatannol.

Chất chuẩn piceatannol và ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) được mua của Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ethanol, acetonitrile và axit acetic loại HPLC được cung cấp bởi Merck (Darmstadt, Đức). Các dung môi dùng để trích ly dầu gồm *n*-hexan, ethanol, ethyl acetate, aceton, isopropanol do Công ty Xilong (Quảng Đông, Trung Quốc) sản xuất.

### 2.2. Tách chiết dầu từ hạt chanh leo

Điều kiện thích hợp cho trích ly dầu từ hạt chanh leo được xác định bằng phương pháp nghiên cứu đơn yếu tố và có tính kế thừa. Các điều kiện nghiên cứu theo thứ tự bao gồm: loại dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, nhiệt độ, thời gian và số lần trích ly.

Trong thí nghiệm ảnh hưởng của loại dung môi, bột hạt chanh leo được trộn với dung môi *n*-hexan, ethanol, ethyl acetate, aceton, isopropanol theo tỷ lệ 1/8 (w/v) trong lọ thủy tinh 100ml, đậy kín và lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở  $40^{\circ}\text{C}$  trong 3 giờ. Kết thúc quá trình trích ly, ly tâm hỗn hợp ở  $10^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút (Mikko 220) thu dịch trong. Dịch trong được cô quay dưới dung môi ở  $40^{\circ}\text{C}$ , áp suất 100mmHg trong hệ thống cô quay chân không (Rotovapor R300) đến khối lượng không đổi để thu dầu thô. Hiệu suất trích ly dầu được xác định theo công thức:  $H (\%) = \text{lượng dầu thô chiết được} / \text{lượng dầu có trong nguyên liệu} \times 100$ .

Ở các thí nghiệm ảnh hưởng của các yếu tố khác, quá trình trích ly dầu diễn ra tương tự với

điều kiện được chọn ở thí nghiệm trước sẽ được dùng trong thí nghiệm sau. Ngưỡng nghiên cứu của các yếu tố còn lại như sau: tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/4, 1/6, 1/8, 1/10, 1/12 (w/v); nhiệt độ 30, 40, 50 và 60°C; thời gian 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 giờ; và số lần trích ly là 1, 2 và 3 lần.

### 2.3. Xác định hàm lượng dầu trong hạt chanh leo nguyên liệu và một số chỉ số chất lượng của dầu hạt chanh leo

Hàm lượng dầu trong hạt chanh leo nguyên liệu được xác định bằng phương pháp Soxhlet theo TCVN 8948:2011 với dung môi sử dụng là hexan và số lần chiết là 3. Chỉ số axit và chỉ số peroxid của dầu hạt chanh leo được xác định lần lượt theo TCVN 6127:2010 và TCVN 6121:2018.

### 2.4. Tách chiết piceatannol trong hạt chanh leo nguyên liệu và hạt chanh leo sau trích ly dầu

Hàm lượng piceatannol của hạt chanh leo trước và sau trích ly dầu được xác định bằng phương pháp mô tả bởi Lai & cs. (2014). Piceatannol được tách chiết với ethanol 79%, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/20, nhiệt độ 83°C và thời gian 79 phút. Dịch chiết sau đó được đem phân tích bằng HPLC.

### 2.5. Tối ưu hóa quá trình tách chiết piceatannol từ hạt chanh leo sau trích ly dầu bằng phương pháp bề mặt đáp ứng

Mô hình trục xoay trung tâm được sử dụng để mô hình hóa quá trình tách chiết piceatannol từ hạt chanh leo sau trích ly dầu. Các yếu tố ảnh hưởng bao gồm nồng độ ethanol (%;  $X_1$ ), nhiệt độ (°C;  $X_2$ ) và thời gian chiết (phút;  $X_3$ ). Mỗi biến được mã hóa ở năm mức -1,68; -1; 0; 1 và 1,68. Yếu tố cố định là tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (1/20). Hàm mục tiêu là hàm lượng piceatannol tách được từ 1g chất khô hạt chanh leo sau trích ly dầu. Công thức chuyển đổi giữa biến thực và biến chuẩn như sau:  $x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i$  ( $i = 1, 2, 3$ ), trong đó  $x_i$  và  $X_i$  là biến chuẩn và biến thực,  $X_0$  và  $\Delta X_i$  là giá trị trung tâm và khoảng biến đổi tương ứng 1 đơn vị biến chuẩn. Ma trận thực nghiệm được giới thiệu ở bảng 1.

Mô hình mô tả quá trình tách chiết như sau, trong đó  $Y$  là hàm mục tiêu và các  $X_i$  là biến thực của các yếu tố ảnh hưởng,  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$  là các hệ số của mô hình.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i < j}}^2 \sum_{j=2}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

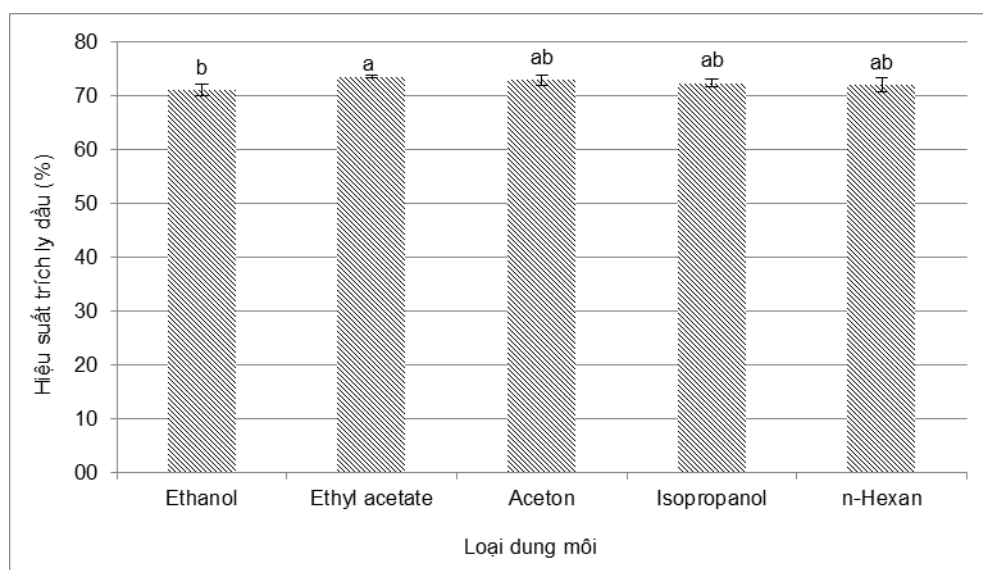
Tách chiết piceatannol được thực hiện trong các ống falcon 15ml và chiết tinh trong bể ổn nhiệt GLF 1008 (Đức). Hỗn hợp sau đó được ly tâm ở 3.642g trong 10 phút ở 4°C. Dịch chiết sau đó được phân tích bằng HPLC để xác định hàm lượng piceatannol.

### 2.6. Xác định hàm lượng piceatannol bằng HPLC

Dịch chiết piceatannol được phân tích trên hệ thống Shimadzu (Nhật Bản) trang bị bơm LC-10Ai, bộ khử khí DGU-20A3, detector UV/VIS SPD-20A và bộ điều khiển trung tâm CBM-20A. Hai mươi  $\mu$ l dịch chiết piceatannol được bơm vào cột C18 pha đảo (ODS) (100  $\times$  3mm; kích thước hạt 5 $\mu$ m) gắn với cột bảo vệ cùng loại (Agilent, CA). Các pha động là A (20  $\mu$ g/ml EDTA, 2% axit acetic, 9% acetonitrile) và B (20  $\mu$ g/ml EDTA, 2% acetic acid, 80% acetonitrile). Tốc độ pha động 1 ml/phút và nhiệt độ cột 35°C. Gradient pha động như sau: 0-4 phút, 0-0% B; 4-8 phút, 0-35% B; 8-18 phút, 35-80% B; 18-20 phút, 80-100% B; 20-25 phút, 100% B; 25-30 phút, 100-0% B; 30-32 phút, 0% B. Detector được đặt ở bước sóng 320nm để định lượng piceatannol. Piceatannol trong dịch chiết được xác định bằng so sánh thời gian lưu với chất chuẩn và được định lượng theo đường chuẩn năm điểm ( $y = 10.034x - 807,9$ ;  $R^2 = 0,999$ ).

### 2.7. Xử lý thống kê

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được biểu diễn bằng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn. Phân tích phương sai một chiều và chuẩn Tukey được sử dụng để so sánh các trung bình. Trong thí nghiệm tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng, phần mềm Expert Design 12 (Stat-Ease, Minneapolis, MN) được sử dụng.



Hình 1. Ảnh hưởng của loại dung môi đến hiệu suất trích ly dầu hạt chanh leo

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của một số yếu tố công nghệ đến hiệu suất trích ly dầu từ hạt chanh leo

##### 3.1.1. Ảnh hưởng của loại dung môi

Hàm lượng dầu trong hạt chanh leo nguyên liệu là  $27,28 \pm 0,54\%$ . Hiệu suất trích ly dầu hạt chanh leo bằng các dung môi khác nhau được biểu diễn ở hình 1. Kết quả xử lý thống kê cho thấy loại dung môi ảnh hưởng có ý nghĩa đến hiệu suất trích ly dầu ( $P = 0,0633$ ). Trong năm loại dung môi nghiên cứu, ethyl acetate cho hiệu suất trích ly dầu cao nhất, đạt  $73,67 \pm 0,33\%$ . Ethanol cho hiệu quả trích ly dầu thấp nhất với giá trị  $71,10 \pm 1,12\%$ .

Ảnh hưởng của loại dung môi đến hiệu suất trích ly dầu từ nguyên liệu thực vật đã được báo cáo với hạt bí ngô (Chatepa & Masamba, 2019) hay thịt quả trám đen (Lại Thị Ngọc Hà & cs., 2023). Sự khác biệt về hiệu suất trích ly dầu được giải thích một phần do độ phân cực của các dung môi sử dụng. Hằng số điện môi là thước đo độ phân cực của dung môi, hằng số điện môi càng lớn dung môi càng phân cực. Trong nghiên cứu này, hằng số điện môi của ethanol (25,0) cao hơn ethyl acetate (6,02), hexan (1,9) và acetone (21,0) nên hiệu suất trích ly dầu của ethanol

thấp hơn. Tuy nhiên, cũng thấy rõ rằng sự khác biệt về hiệu suất trích ly dầu giữa ethanol và các dung môi không phân cực như ethyl acetate hay *n*-hexan không quá nhiều. Điều này cho thấy thành phần lipid trong nguyên liệu hạt chanh leo đa dạng (monoacylglycerol, diacylglycerol, triacylglycerol, sáp, terpenoid, carotenoid,...) và mỗi nhóm hòa tan thích hợp trong những loại dung môi nhất định (Chatepa & Masamba, 2019; Srinorasing & cs., 2021).

Trong các loại dung môi nghiên cứu, ethyl acetate cho hiệu suất trích ly dầu cao nhất. Theo quy định của Cộng đồng chung châu Âu 2009/32/EC về dung môi được dùng trong sản xuất thực phẩm và nguyên liệu thực phẩm, ethyl acetate là một trong bảy dung môi được phép sử dụng rộng rãi. Chính vì vậy, ethyl acetate được chọn làm dung môi để tách chiết dầu từ hạt chanh leo.

##### 3.1.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi

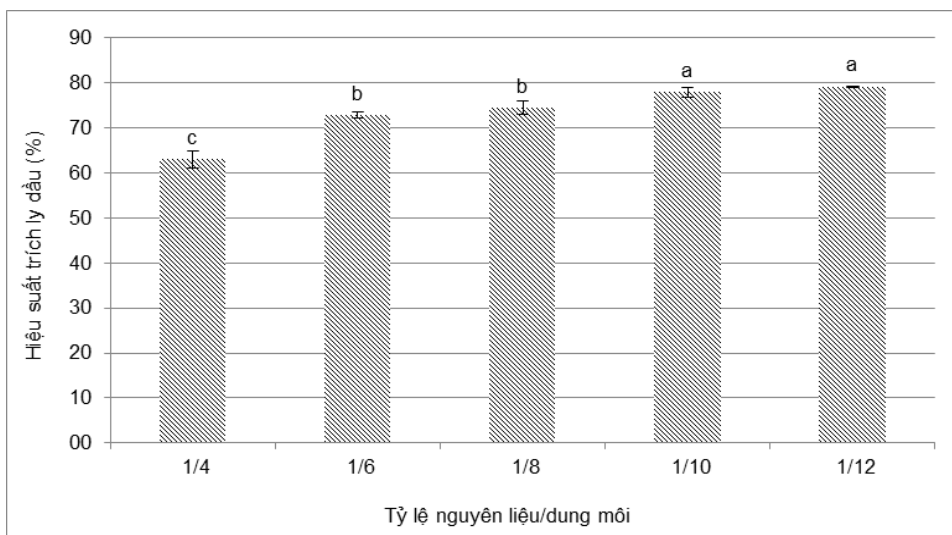
Ảnh hưởng tỷ lệ hạt chanh leo/dung môi đến hiệu suất trích ly dầu được biểu diễn ở hình 2. Kết quả xử lý thống kê cho thấy tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ảnh hưởng có ý nghĩa đến hiệu suất trích ly dầu ( $P < 0,0001$ ). Khi tỷ lệ nguyên liệu/dung môi giảm từ 1/4 đến 1/10, hiệu suất trích ly dầu tăng từ  $63,20 \pm 1,89\%$  đến

78,01 ± 1,07%. Nếu tiếp tục giảm tỷ lệ này, hiệu suất trích ly dầu không thay đổi có ý nghĩa. Sự tăng hiệu suất trích ly dầu khi giảm tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đã được quan sát khi chiết dầu từ rong nho loại (Srinorasing & cs., 2021) hay từ thịt quả trám đen (Lại Thị Ngọc Hà & cs., 2023). Điều này cho thấy đối với hạt chanh leo, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/10 đủ để đạt cân bằng nồng độ dầu trong nguyên liệu và dung môi chiết. Việc tăng lượng dung môi sử dụng sẽ không làm tăng đáng kể hiệu suất thu hồi dầu nhưng có thể thay đổi thành phần dầu thu được, giảm chất lượng sản phẩm và tăng chi phí cho quá trình sản xuất do tổn năng lượng cho quá trình cô đuổi

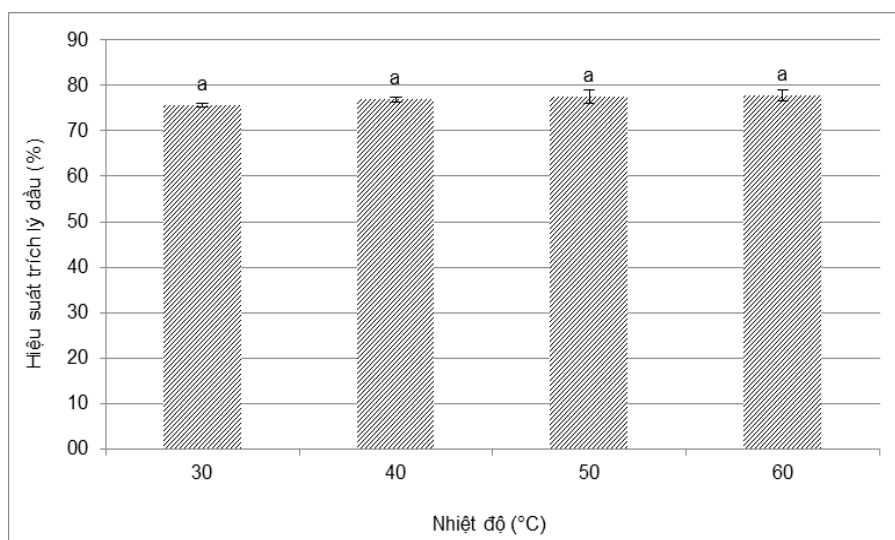
dung môi. Tỷ lệ 1/10 được chọn để dùng cho các thí nghiệm sau.

### 3.1.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ

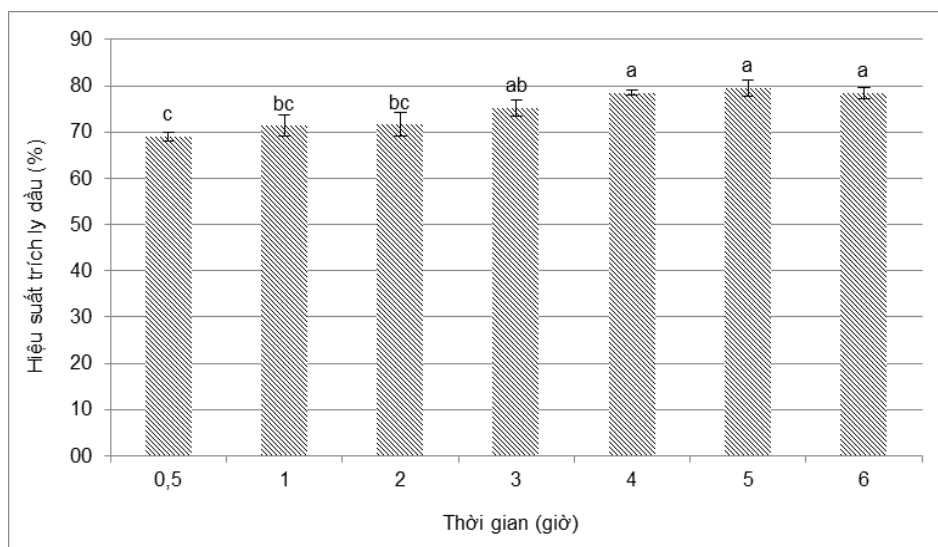
Dầu từ hạt chanh leo được trích ly ở các nhiệt độ 30, 40, 50 và 60°C. Kết quả xử lý thống kê cho thấy nhiệt độ không ảnh hưởng có ý nghĩa đến hiệu suất trích ly dầu từ hạt chanh leo (P = 0,1399) (Hình 3). Ảnh hưởng không có ý nghĩa của nhiệt độ đến hiệu suất thu hồi dầu đã được báo cáo bởi Trần Thị Hoài & cs. (2021) khi tiến hành trích ly dầu từ hạt mướp đắng. Trong nghiên cứu này, nhiệt độ 30°C được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Ảnh hưởng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến hiệu suất trích ly dầu từ hạt chanh leo



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất trích ly dầu từ hạt chanh leo



**Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất trích ly dầu từ hạt chanh leo**

### 3.1.4. Ảnh hưởng của thời gian trích ly

Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất trích ly dầu từ hạt chanh leo được trình bày ở hình 4.

Kết quả xử lý thống kê cho thấy thời gian trích ly ảnh hưởng có ý nghĩa đến hiệu suất trích ly dầu ( $P < 0,0001$ ). Hiệu suất trích ly dầu tăng từ  $69,09 \pm 0,93\%$  lên  $78,52 \pm 0,53\%$  khi thời gian chiết tăng từ 30 phút lên 4 giờ. Hiệu suất trích ly không thay đổi khi thời gian chiết tăng từ 4 đến 6 giờ. Điều này cho thấy quá trình trích ly dầu diễn ra với tốc độ lớn trong thời gian đầu của quá trình sau đó đạt cân bằng từ giờ thứ tư trở đi. Sự biến đổi này của hiệu suất trích ly dầu theo thời gian đã được báo cáo cho hạt mướp đắng (Trần Thị Hoài & cs., 2021) hay thịt quả trám đen (Lại Thị Ngọc Hà & cs., 2023). Để tránh tăng chi phí cho hoạt động của thiết bị và hạn chế biến đổi chất lượng dầu do sự trích ly các tạp chất từ nguyên liệu khi kéo dài thời gian trích ly, 30 phút được chọn để trích ly dầu từ hạt chanh leo và được sử dụng cho thí nghiệm sau.

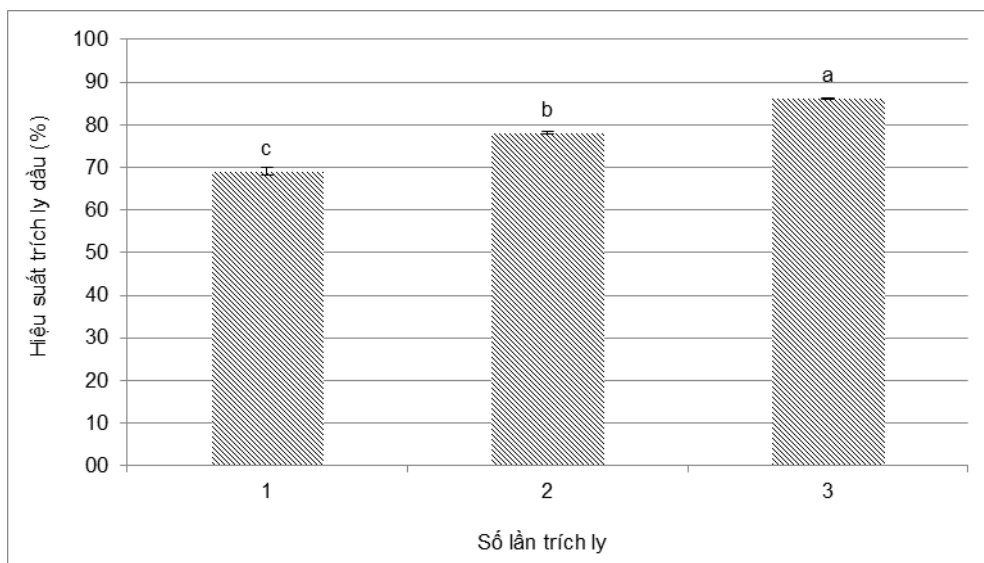
### 3.1.5. Ảnh hưởng của số lần trích ly

Số lần trích ly ảnh hưởng có ý nghĩa đến hiệu suất quá trình trích ly dầu ( $P < 0,0001$ ), được biểu diễn ở hình 5. Điều kiện trích ly là các điều kiện thích hợp đã được xác định từ các thí nghiệm trước bao gồm: dung môi ethyl acetate, nhiệt độ  $30^{\circ}\text{C}$ , thời gian 30 phút. Riêng tỷ lệ hạt

chanh leo/dung môi dùng cho các lần trích ly lần lượt là 1/10 (lần chiết 1) và 1/5 (lần chiết 2 và 3) để tiết kiệm dung môi và năng lượng cần thiết để đuổi dung môi sau này. Hiệu suất trích ly dầu thu được khi chiết 1, 2 và 3 lần lần lượt là  $69,09 \pm 0,93\%$ ;  $78,12 \pm 0,31\%$  và  $86,14 \pm 0,12\%$ . Một điều đáng lưu ý là từ lần chiết thứ ba, dầu thu được rất khó tách ra khỏi bã vì có nhiều cặn lơ lửng đồng thời dầu không trong. Chính do vậy, để đảm bảo chất lượng của dầu, nên trích ly dầu từ hạt chanh leo hai lần.

Sau quá trình trích ly, hỗn hợp được cô đuổi dung môi để thu dầu (Hình 6). Kết quả phân tích cho thấy chỉ số axit của dầu hạt chanh leo là  $1,61 \pm 0,05$  (mg KOH/g dầu) và chỉ số peroxide là  $0,62 \pm 0,03$  (meq oxy hoạt động/kg) đạt TCVN cho dầu nguyên chất và dầu ép nguội ( $\leq 4,0\text{mg KOH/g}$  dầu và  $\leq 15,0\text{meq oxy hoạt động/kg}$ ) (TCVN 7597:2018).

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các tổ công nghệ đến hiệu suất trích ly dầu cho thấy điều kiện phù hợp để trích ly dầu từ hạt chanh leo là: sử dụng dung môi ethyl acetate, nhiệt độ  $30^{\circ}\text{C}$ , thời gian trích ly 30 phút, số lần trích ly 2 với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lần lượt là 1/10 và 1/5 (w/v). Với điều kiện trích ly này, dầu hạt chanh leo thu được có chỉ số axit và peroxide đạt yêu cầu cho dầu nguyên chất và dầu ép nguội theo TCVN 7597:2018.



Hình 5. Ảnh hưởng của số lần trích ly đến hiệu suất trích ly dầu từ hạt chanh leo



Hình 6. Dầu thô từ hạt chanh leo

### 3.2. Tối ưu hóa quá trình tách chiết piceatannol từ hạt chanh leo sau trích ly dầu bằng phương pháp bề mặt đáp ứng

Piceatannol là một hợp chất thứ cấp thuộc nhóm stilbene đã được biết đến với rất nhiều hoạt tính sinh học quý. Trong số các nguồn piceatannol, hạt chanh leo rất tiềm năng. Để khai thác triệt để hạt chanh leo, hàm lượng piceatannol của hạt sau trích ly dầu được xác định. Kết quả cho thấy, hàm lượng piceatannol trong hạt chanh leo nguyên liệu và hạt chanh leo sau tách dầu hai lần lần lượt là  $7,63 \pm 0,21$  và  $7,07 \pm 0,17$  mg/g chất khô (CK). Như vậy, hạt chanh leo sau tách dầu hai lần còn chứa 68,94%

piceatannol so với nguyên liệu ban đầu. Điều này có thể do piceatannol có ái lực thấp với ethyl acetate là dung môi được sử dụng trong quá trình trích ly dầu (dos Santos & cs., 2021). Hạt chanh leo sau khi tách dầu, do đó, hoàn toàn có thể sử dụng như nguyên liệu để khai thác piceatannol. Thêm vào đó, việc tách dầu từ hạt chanh leo trước khi tách chiết piceatannol khiến dịch chiết piceatannol chứa ít nhiều tạp chất hơn và dễ làm sạch hơn. Sắc ký đồ của dịch chiết piceatannol ở hạt chanh leo ban đầu và hạt sau tách dầu hai lần được giới thiệu ở hình 7.

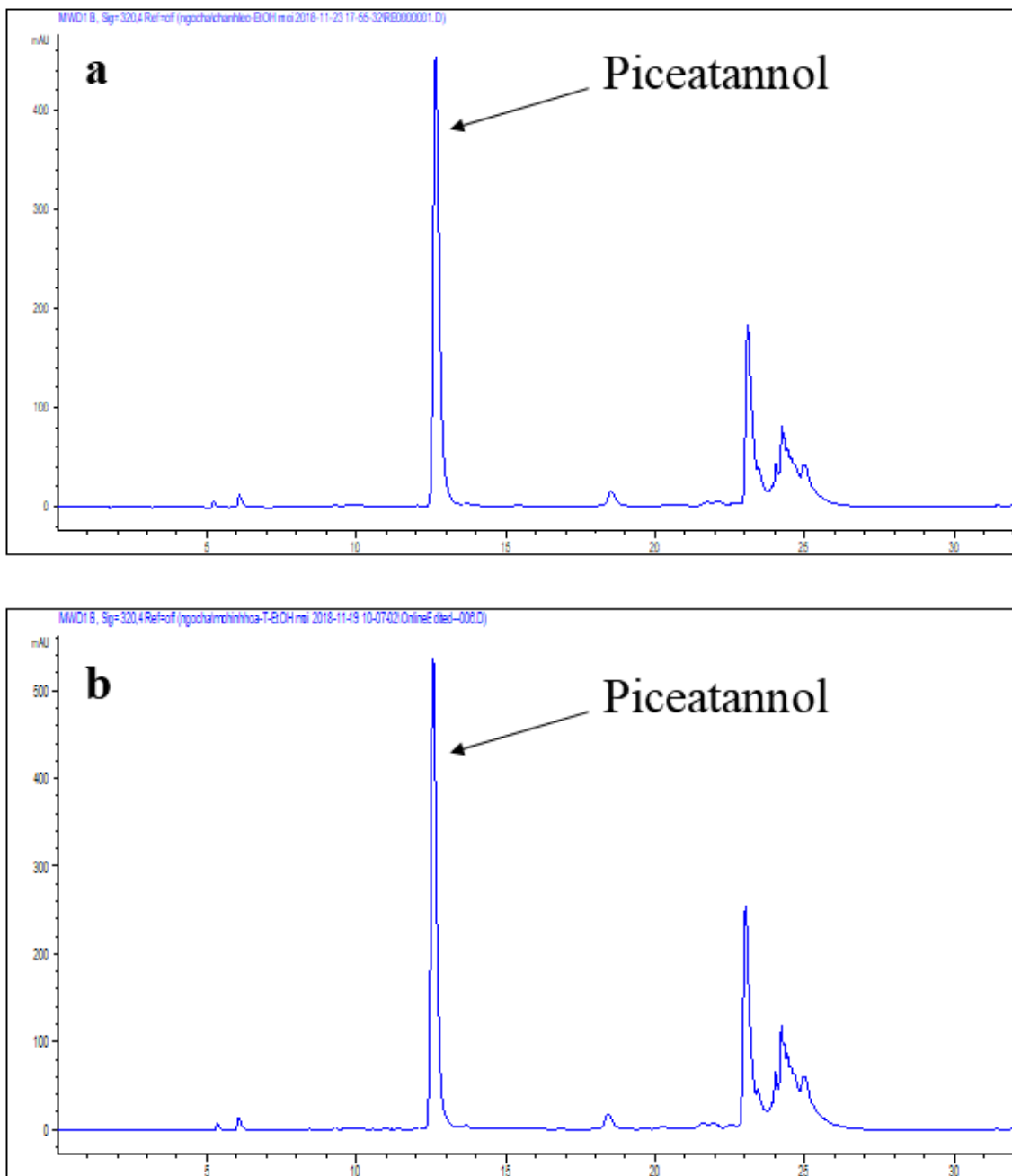
Quá trình tách chiết piceatannol từ hạt chanh leo sau trích ly dầu được tối ưu hóa thông qua phương pháp bề mặt đáp ứng. Ba yếu tố bao

gồm nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian là các biến trong mô hình trong khi tỷ lệ nguyên liệu/dung môi được cố định ở mức 1/20. Phạm vi biến đổi của các yếu tố nghiên cứu như sau: nồng độ ethanol (40-80%, v/v), nhiệt độ (45-85°C) và thời gian (15-45 phút). Ma trận thực nghiệm và kết quả được giới thiệu ở bảng 1.

Tiến hành phân tích hồi quy với phần mềm

Expert Design 12, mối quan hệ giữa các yếu tố ảnh hưởng và hàm mục tiêu được biểu diễn ở phương trình sau trong đó các biến  $X_i$  là các biến thực.

$$Y = -4,651 + 0,159 \times X_1 + 0,015 \times X_2 + 0,012 \times X_3 - 1,614 \times 10^{-3} \times X_1^2 + 0,030 \times 10^{-3} \times X_2^2 - 0,575 \times 10^{-3} \times X_3^2 + 0,609 \times 10^{-3} \times (X_1 \times X_2) + 0,188 \times 10^{-3} \times (X_1 \times X_3) + 0,837 \times 10^{-3} \times (X_2 \times X_3)$$



Hình 7. Sắc ký đồ của dịch chiết hạt chanh leo ban đầu (a) và sau 2 lần tách dầu (b) ở bước sóng 320nm



**Bảng 1. Ma trận thực nghiệm theo mô hình trục quay trung tâm với các biến chuẩn ( $x_1, x_2, x_3$ ), các biến thực ( $X_1, X_2, X_3$ ) và kết quả hàm mục tiêu**

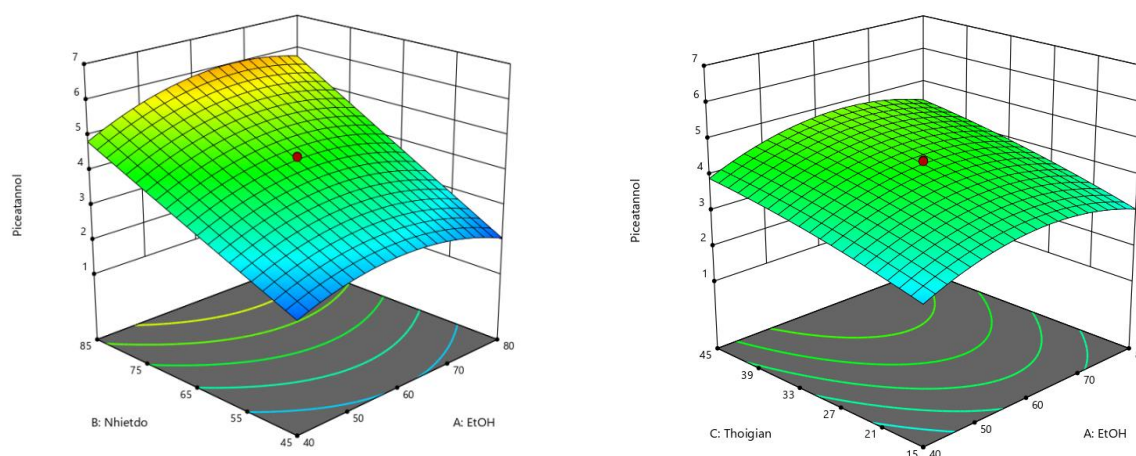
Lần chiết	Biến chuẩn			Biến thực			Lượng piceatannol thu được (mg/g CK)
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Ethanol (%)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	
1	+1	+1	+1	80	85	45	6,88
2	-1	+1	+1	40	85	45	5,45
3	+1	-1	+1	80	45	45	2,45
4	-1	+1	+1	40	45	45	2,05
5	+1	-1	-1	80	85	15	5,25
6	-1	+1	-1	40	85	15	4,10
7	+1	-1	-1	80	45	15	1,88
8	-1	-1	-1	40	45	15	1,65
9	1,68	0	0	93,6	65	30	2,20
10	-1,68	0	0	26,4	65	30	2,39
11	0	1,68	0	60	98,6	30	6,60
12	0	-1,68	0	60	31,4	30	1,71
13	0	0	1,68	60	65	55,2	5,19
14	0	0	-1,68	60	65	4,8	2,32
15A	0	0	0	60	65	30	4,43
15B	0	0	0	60	65	30	4,41
15C	0	0	0	60	65	30	4,22

**Bảng 2. Phân tích phương sai cho mô hình tách chiết piceatannol từ hạt chanh leo sau trích ly dầu**

Nguồn biến động	Bậc tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F
Mô hình	9	47,50	5,28	20,55
Sai số	7	1,80	0,2569	P = 0,0003
Tổng	16	49,30		

**Bảng 3. Phân tích phương sai cho các yếu tố trong mô hình**

Yếu tố	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	F	P
Ethanol	0,6118	1	0,6118	2,38	0,1667
Nhiệt độ	35,04	1	35,04	136,40	< 0,0001
Thời gian	5,64	1	5,64	21,96	0,0022
EthanolxNhiệt độ	0,4753	1	0,4753	1,85	0,2159
EthanolxTime	0,0253	1	0,0253	0,0985	0,7627
Nhiệt độxTime	0,5050	1	0,5050	1,97	0,2036
EthanolxEthanol	4,70	1	4,70	18,29	0,0037
Nhiệt độxNhiệt độ	0,0016	1	0,0016	0,0063	0,9390
Thời gianxThời gian	0,1889	1	0,1889	0,7354	0,4195



**Hình 8. Bề mặt đáp ứng mô tả hàm lượng piceatannol chiết tách được từ hạt chanh leo sau trích ly dầu phụ thuộc vào nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian chiết**

Ảnh hưởng tuyến tính, bậc hai của các yếu tố cũng như sự tương tác của chúng đến hàm mục tiêu được xác định thông qua phân tích phương sai (ANOVA) của mô hình (Bảng 2) và các yếu tố (Bảng 3). Kết quả phân tích phương sai cho thấy mô hình với ba yếu tố nghiên cứu (nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian) ảnh hưởng có ý nghĩa đến sự biến đổi của hàm mục tiêu ( $P < 0,0001$ ). Mức độ phù hợp của mô hình được đánh giá bằng hệ số hồi quy ( $R^2$ ). Trong nghiên cứu này, giá trị  $R^2$  cho mô hình hồi quy hàm lượng piceatannol tách chiết được từ hạt chanh leo sau trích ly dầu là 0,9635 cho thấy mô hình xây dựng được mô tả 96,35% sự biến thiên hàm mục tiêu (Andres & cs., 2020) hay nói cách khác 96,35% sự biến thiên lượng piceatannol tách chiết được từ hạt chanh leo sau trích ly dầu là do ba yếu tố nghiên cứu.

Bảng 3 cho thấy nhiệt độ, thời gian và bình phương nồng độ ethanol ảnh hưởng có ý nghĩa đến lượng piceatannol tách chiết được từ hạt chanh leo sau trích ly dầu với giá trị P lần lượt là  $< 0,0001$ ; 0,0022 và 0,0037. Trong số các yếu tố nghiên cứu, nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất đến hàm mục tiêu. Hình 8 và bảng 1 cho thấy khi nhiệt độ tăng, lượng piceatannol tách chiết được từ hạt chanh leo sau trích ly dầu tăng. Ví dụ, ở nhiệt độ 45°C, lượng piceatannol thu được là 2,45 mg/g CK (lần chiết 3) nhưng

khi tăng nhiệt độ lên 85°C, lượng piceatannol thu được là 6,88 mg/g CK (lần chiết 1) ở cùng điều kiện nồng độ ethanol và thời gian. Kết quả tương tự thu được khi so sánh lần chiết 6 và lần chiết 8.

Thời gian là yếu tố ảnh hưởng mạnh thứ hai sau nhiệt độ đến hàm mục tiêu. Ở cùng điều kiện nhiệt độ và nồng độ ethanol, khi thời gian chiết tăng từ 15 phút (lần chiết 8) đến 45 phút (lần chiết 4), hàm lượng piceatannol thu được tăng từ 1,65 mg/g CK lên 2,05 mg/g CK. Kết quả tương tự thu được khi so sánh lần chiết 5 và lần chiết 1.

Hệ số bình phương của nồng độ ethanol và thời gian âm cho thấy có giá trị nào đó của hai yếu tố này tại đó hàm lượng piceatannol thu được từ hạt chanh leo sau trích ly dầu cao nhất. Tiến hành giải hệ phương trình đạo hàm riêng phần bằng không để tìm điểm cực đại với phần mềm Expert design 12 thu được điều kiện tách chiết tối ưu piceatannol từ hạt chanh leo sau trích ly dầu là: nồng độ ethanol 68% (v/v), nhiệt độ 85°C và thời gian tách chiết 45 phút.

Để kiểm tra tính đúng đắn của mô hình, 4 lần chiết độc lập được thực hiện tại điều kiện tối ưu. Kết quả thu được lượng piceatannol tách chiết được từ 1g chất khô hạt chanh leo sau trích ly dầu là 6,42; 6,48; 6,47 và 6,70mg nằm trong khoảng 95% độ tin cậy của giá trị tiên

đoán (6,04-7,58 mg/g CK). Điều này khẳng định tính đúng đắn của phương trình mô tả quá trình tách chiết piceatannol từ hạt chanh leo sau trích ly dầu đã xây dựng.

#### 4. KẾT LUẬN

Các yếu tố loại dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, thời gian và số lần trích ly ảnh hưởng có ý nghĩa đến quá trình trích ly dầu từ hạt chanh leo. Điều kiện trích ly dầu thích hợp là: dung môi ethyl acetate, nhiệt độ 30°C, thời gian trích ly 30 phút, số lần trích ly là 2 (tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/10 và 1/5 (w/v) cho lần trích ly 1 và 2). Ở điều kiện này, hiệu suất trích ly dầu là  $78,12 \pm 0,31\%$ . Dầu thô thu được đạt TCVN 7597:2018 về tiêu chuẩn chỉ số axit và peroxide. Bã hạt chanh leo sau chiết dầu còn chứa 68,94% lượng piceatannol so với nguyên liệu ban đầu. Phương pháp bề mặt đáp ứng đã được sử dụng thành công để mô tả quá trình tách chiết piceatannol từ bã. Điều kiện tách chiết tối ưu piceatannol từ hạt chanh leo sau trích ly dầu là: nồng độ ethanol 68% (v/v), nhiệt độ 85°C và thời gian tách chiết 45 phút. Nghiên cứu này là cơ sở cho việc khai thác triệt để hạt chanh leo, một phụ phẩm của quá trình chế biến chanh leo.

#### LỜI CẢM ƠN

Tác giả trân trọng cảm ơn Công ty Cổ phần BIOTECHCARE Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện đề tài này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Andres A.I., Petron M.J., Lopez A.M. & Timon M.L. (2020). Optimization of extraction conditions to improve phenolic content and *in vitro* antioxidant Activity in craft brewers' spent grain using response surface methodology (RSM). *Foods*: 9: 1398.

Arai D., Kataoka R., Otsuka S., Kawamura M., Maruki-Uchida H., Sai M., Itoc T. & Nakao Y. (2019). Piceatannol is superior to resveratrol in promoting neural stem cell differentiation into astrocytes. *Food & Function*. 7: 4432-4441.

Bộ Khoa học và Công nghệ (2018). Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 7597:2018. Dầu thực vật.

Chatepa L. & Masamba K. (2019). The influence of solvent's polarity on physicochemical properties and oil yield extracted from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed. *Journal of agricultural biotechnology and sustainable development*. 11(3): 40-47.

Directive 2009/32/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009. Extraction solvents which may be used during the processing of raw materials, of foodstuffs, of food components or of food ingredients. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0032> on Jan 05, 2024.

dos Santos L.C., Mendiola J. A., Sánchez-Camargo A. del P., Álvarez-Rivera G., Viganó J., Cifuentes A., Ibáñez E. & Martínez J. (2021). Selective extraction of piceatannol from *Passiflora edulis* by-products: Application of HSPs strategy and inhibition of neurodegenerative enzymes. *International journal of molecular sciences*. 22: 6248.

Guerrero R.F., Puertas B., Fernández M.I. & Cantos-Villar M.E. (2010). Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innovative food science & emerging technologies*. 11: 231-238.

Güldaş N., Uysal T., Ellidokuz H. & Babýnar Y. (2019). Antimicrobial effect of piceatannol, a resveratrol metabolite, on *Staphylococcus aureus*. *Journal of basic and clinical health sciences*. 3: 184-187.

Hu M., Du J., Du L., Luo Q. & Xiong J. (2020). Anti-fatigue activity of purified anthocyanins prepared from purple passion fruit (*P. edulis* Sim) epicarp in mice. *Journal of functional foods*. 65.

Lại Thị Ngọc Hà, Đỗ Thị Hồng Hải, Nguyễn Thị Thom & Nguyễn Thị Thanh Thu (2023). Ảnh hưởng của một số yếu tố công nghệ đến quá trình trích ly dầu từ thịt quả trám đen (*Canarium tramdenum* Dai and Yakovl.) Hương Sơn (Hà Tĩnh). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 21(1): 104-113.

Lai T.N.H., André C., Chirinos R., Nguyen T.B.T., Larondelle Y. & Rogez H. (2014). Optimisation of extraction of piceatannol from *Rhodomyrtus tomentosa* seeds using response surface methodology. *Separation and purification technology*. 134: 139-146.

Matsui Y., Sugiyama K., Kamei M., Takahashi T., Suzuki T., Takagata Y. & Ito T. (2010). Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58: 11112-11118.

Morton J. (1987). Passion fruit. In: *Fruits of warm climates*. Morton J.F., Miami, FL.

- NIH (2023). Nutrient Recommendations and Databases. Retrieved from <https://ods.od.nih.gov/HealthInformation/nutrientrecommendations.aspx> on Jun 27, 2023.
- Srinorasing T., Chirasuwan N., Bunnag B. & Chaiklahan R. (2021). Lipid extracts from *Caulerpa lentillifera* waste: An alternative product in a circular economy. *Sustainability*. 13: 4491.
- Surlehan H.F., Noor Azman N.A., Zakaria R. & Mohd Amin N.A. (2019). Extraction of oil from passion fruit seeds using surfactant-assisted aqueous extraction. *Food research*. 3(4): 348-356.
- Trần Thị Hoài, Hoàng Lan Phương, Vũ Thị Huyền, Phạm Thị Minh Huệ, Ngô Thị Hạnh & Lại Thị Ngọc Hà (2019). Đặc điểm hóa lý của hạt và dầu hạt mướp đắng trích ly bằng ethyl acetate. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 19(6): 764-772.
- USDA (2019). Passion-fruit, (granadilla), purple, raw. Retrieved from <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169108/nutrients> on Aug 02, 2023.
- Văn Phúc (2022). Dự báo diện tích chanh leo Việt Nam có thể tăng lên 15.000ha. Truy cập từ <https://www.sggp.org.vn/du-bao-dien-tich-chanh-leo-viet-nam-co-the-tang-len-15000ha-post643088.html> ngày 27/6/2023.
- Võ Thanh Sang, Nguyễn Hoàng Nhật Minh, Ngô Xuân Quảng, Phạm Ngọc Hoài, Bạch Long Giang, Lê Văn Minh, Nguyễn Hữu Hùng, Nguyễn Lương Hiếu Hòa & Ngô Đại Hùng (2021). Khảo sát hoạt tính kháng dị ứng của piceatannol từ quả sim (*Rhodomyrtus tomentosa*). *Tạp chí Công nghệ sinh học*. 19(1): 119-128.
- Yamamoto T., Sato A., Takai Y., Yoshimori A., Umehara M., Ogino Y., Inada M., Shimada N., Nishida A., Ichida R., Takasawa R., Maruki-Uchida H., Mori S., Sai M., Morita M. & Tanuma S. (2019). Effect of piceatannol-rich passion fruit seed extract on human glyoxalase I-mediated cancer cell growth. *Biochemistry and biophysics reports*. 8p.
- Zomer A.P.L., Rodrigues C.A. & Maldaner L. (2022). Piceatannol: a natural stilbene with a broad spectrum of biological activities. *Research, society and development*. 11(9): e49211932221.