

## NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH ANTHOCYANIN TỪ ĐÀI HOA *HIBISCUS SABDARIFFA*- ỨNG DỤNG ĐỂ SẢN XUẤT GIẤY CHỈ THỊ PHÁT HIỆN NHANH HÀN THE TRONG THỰC PHẨM

Nguyễn Thị Hiền<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Thủy<sup>2\*</sup>, Nguyễn Thị Loan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Khoa Tài nguyên và Môi trường, <sup>2</sup>Khoa Công nghệ thực phẩm,

<sup>3</sup>Sinh viên lớp BQCBA53 Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Email\*: ntthuy@hua.edu.vn

Ngày gửi bài: 29.05.2012

Ngày chấp nhận: 12.08.2012

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích chiết xuất chất màu anthocyanin từ đài hoa *Hibiscus*, tách bỏ bớt các tạp chất để có thể thu được thành phẩm chứa hàm lượng anthocyanin cao nhất. Sử dụng chất màu thu được để nghiên cứu sản xuất giấy chỉ thị xác định nhanh hàn the trong thực phẩm. Bằng phương pháp so màu và phương pháp pH vi sai, đã xác định được các điều kiện tối ưu cho quá trình chiết chất màu là dung môi etanol:nước 50:50 bổ sung 1% HCl; tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 14 ml/1 gam; thời gian chiết 6 ngày. Bằng phương pháp chiết phân đoạn, đã tách được chất màu thô anthocyanin từ dịch chiết của đài hoa *Hibiscus*. Đã xác định được hàm lượng chất màu trong nguyên liệu khô là 15,2% tương ứng trong nguyên liệu tươi là 1,06%. Độ axit của nguyên liệu khô là 3,37 mldH<sup>+</sup>/1 gam nguyên liệu, độ axit của chất màu khô là 3,83 mldH<sup>+</sup>/1 gam chất màu, tương ứng 0,58 mldH<sup>+</sup>/1 gam nguyên liệu khô, tức là độ axit đã giảm 83%. Đã khảo sát một số điều kiện để sản xuất giấy chỉ thị hàn the và đã chọn được các thông số thích hợp với tỉ lệ pha loãng là 1gam màu khô/400ml nước cất; thời gian ngâm tẩm dịch màu lên giấy là 120 giây; thời gian tiếp xúc của giấy chỉ thị với thực phẩm (hoặc dịch thực phẩm) là 90 giây. Ngưỡng phát hiện tối thiểu hàn the của giấy chỉ thị là 40 mg/1 kg thực phẩm. Kết quả này có ưu điểm là phát hiện được ngưỡng tối thiểu tốt hơn so với giấy nghệ. Về độ nhạy khi thử trên một số nguyên liệu thực phẩm cũng thu được kết quả tương tự.

Từ khóa: Anthocyanin, chất màu, *Hibiscus*, hàn the, giấy chỉ thị.

### Study on Extraction and Separation of Anthocyanin from Hibiscus Sabdariffa Calyx. Application to Produce the Rapid Indicator Paper of Detecting the Borax in Food

### ABSTRACT

The extraction and purification of anthocyanin pigments from calyx of *Hibiscus sabdariffa*, and its use as potential rapid indicator paper for detecting the borax in food were investigated. By using the colour comparison and the differential pH methods, the optimal conditions for pigment extraction were identified as follows: ethanol solvent to water is 50:50 with supplement 1% HCl; the ratio of solvent per raw-material is 14 ml/1g; extracting duration is 6 days. By fractional extraction method, the crude anthocyanin pigments are isolated from extracts of Hibiscus calyx. The concentration of pigments in the dry and fresh material was 15.2% and 1.06%, respectively. The acidity of the dry ingredients is 3.37 mldH<sup>+</sup> /1g of raw material, the acidity of the dry pigment is 3.83 mldH<sup>+</sup>/1g of colour substance, respectively 0.58 mldH<sup>+</sup> /1g dry material and the acid reduced 83%. By surveying several conditions for production of the indicator paper, the appropriate parameters are selected with color dilution of 1gram of dry colour substance to 400ml distilled water ratio; duration of color impregnated on paper is 120 seconds; the duration of indicator paper exposure to food (or food fluid) is 90 seconds. A minimum level of the indicator paper for detecting the borax is identified as 40 mg/1 kg of food. This result has shown that the minimum detectable limit is equivalent to turmeric paper. As for sensitivity, when testing on a number of food materials, the similar results were also been obtained.

Keywords: Anthocyanin, pigment, Hibiscus, borax, paper indicator.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay chất màu tự nhiên đang ngày càng được quan tâm. Ngoài vai trò là chất tạo màu không độc hại, chất màu tự nhiên còn được coi là chất màu sinh học, được phẩm và được ứng dụng rộng rãi cho nhiều ngành công nghiệp. Anthocyanin là họ màu rất phổ biến tồn tại trong hầu hết các thực vật bậc cao và được tìm thấy trong một số loại rau, hoa, quả, hạt, có màu từ đỏ đến tím như: quả nho, quả dâu, bắp cải tím, lá tía tô, đài hoa *Hibiscus*, đậu đen, quả cà tím, gạo nếp than, gạo đỏ... Trong số đó *Hibiscus sabdariffa* L. (bụt giấm) là nguyên liệu có hàm lượng anthocyanin khá cao.

*Hibiscus sabdariffa* L. có nguồn gốc từ Tây Phi. Ở nước ta loại cây này phân bố khá rộng từ các tỉnh trung du miền núi phía Bắc như Hoà Bình, **Hà Tây**; Trung bộ như Thanh Hoá, Nghệ An, cao nguyên Lâm Đồng đến các tỉnh Nam bộ như Kiên Giang, Cần Thơ... Đài hoa *Hibiscus* khi thu hoạch có màu đỏ hấp dẫn, vị chua mát đặc trưng và có hàm lượng anthocyanin khá cao. Theo nhiều nghiên cứu cho thấy anthocyanin trong *Hibiscus* không những tạo màu tốt mà còn có tác dụng tốt đối với sức khoẻ con người và động vật (Chiung-Huei Peng & cs., 2011; Alarcon-Aguilar & cs., 2007; Tseng & cs., 2000). Vì thế nó được sử dụng rộng rãi để làm thuốc, màu thực phẩm, các sản phẩm sử dụng trong gia đình hay dùng làm thức ăn chăn nuôi gia súc.

Để chiết chất màu anthocyanin từ *Hibiscus*, các dung môi hữu cơ được sử dụng thường có độ phân cực cao hoặc sử dụng hệ dung môi phân cực (Ologundudu & cs., 2006a; Ologundudu & cs., 2006b). Tuy nhiên, chất màu chiết xuất được thường kèm theo rất nhiều axit vốn có trong đài hoa. Đây cũng là hạn chế của chất màu thu được vì nó rất chua. Vì vậy, sau khi chiết xuất cần tiến hành tách bỏ bớt axit để làm giàu chất màu, đồng thời để khi bổ sung vào thực phẩm không cần pha loãng do giảm được độ chua của dịch màu.

Hàn the là một trong những loại phụ gia thực phẩm rất nguy hại, ở Việt Nam, Bộ Y tế (BYT) đã có Quyết định 867/QĐ - BYT ngày 4/4/1998 không cho phép sử dụng hàn the làm chất phụ gia thực phẩm. Dựa trên nguyên tắc,

chất màu anthocyanin có đặc tính rất đặc biệt là thay đổi màu theo pH môi trường, khi trong thực phẩm có hàn the với nồng độ nhỏ cũng làm cho anthocyanin chuyển màu từ đỏ sang xám đen hoặc xám xanh. Do đó anthocyanin hoàn toàn có thể dùng làm chất chỉ thị để định tính hàn the.

Mục tiêu nghiên cứu là tìm được điều kiện chiết tách phù hợp để thu nhận được lượng lớn nhất chất màu anthocyanin từ đài hoa *Hibiscus*, đồng thời bước đầu ứng dụng chất màu này để hình thành giấy chỉ thị phát hiện nhanh hàn the trong thực phẩm.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

Đài hoa *Hibiscus* được thu mua tại Hòa Bình vào tháng 11/2011, bảo quản thoáng trong vòng 24h sau thu hoạch. Đài hoa được sấy khô, nghiền mịn và bảo quản kín.

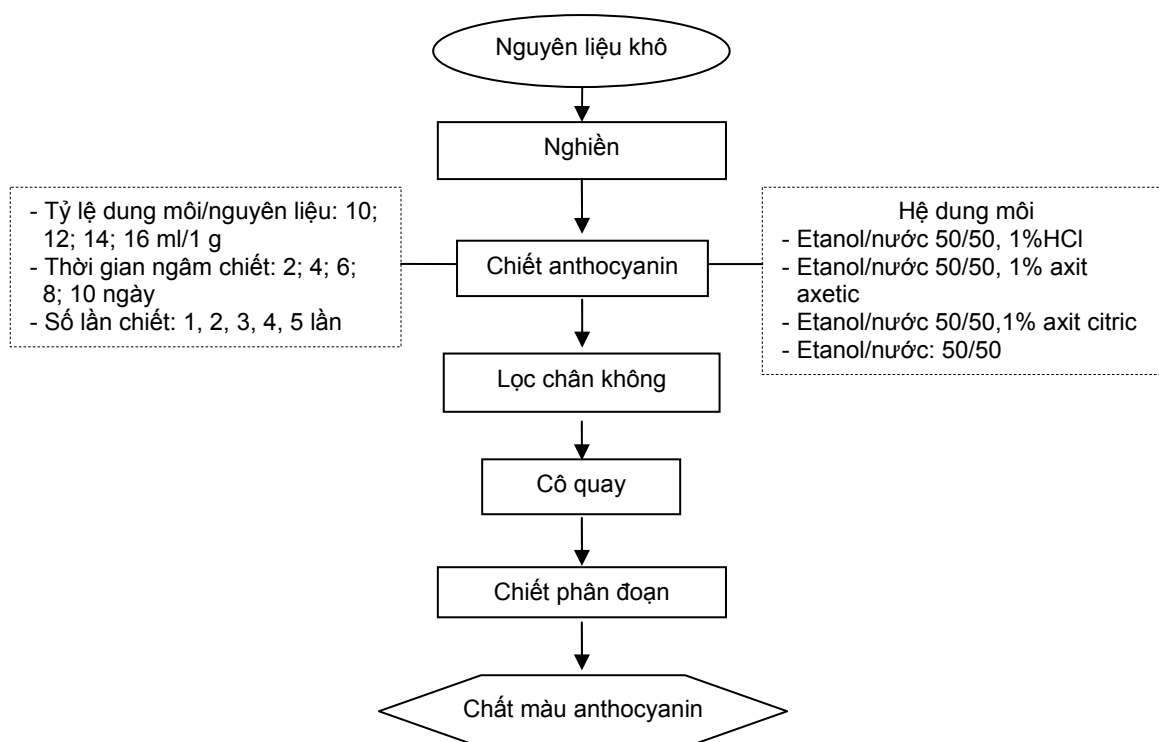
Các loại hóa chất: etanol, axit clohidric, axit citric, axit axetic, etylaxetat, natritetaborac decahidat. Giấy lọc băng xanh. Chất màu được chiết tách theo sơ đồ 1.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chất màu bằng phương pháp chiết phân đoạn, xác định hàm lượng chất màu theo phương pháp pH vi sai (Huỳnh Thị Kim Cúc và cs., 2004); Độ axit của nguyên liệu và thành phẩm được xác định bằng phương pháp chuẩn độ điện dẫn (Hồ Viết Quý, 2006); Độ ẩm được xác định bằng phương pháp sấy 105°C tới khối lượng không đổi; Hàm lượng anthocyanin được xác định bằng phương pháp chiết phân đoạn xác định; Ngưỡng tối thiểu đối với loại phụ gia cấm được xác định bằng phương pháp sàng lọc (QĐ 657/EC/2002); Sản xuất giấy chỉ thị xác định hàn the dựa trên nguyên tắc anthocyanin có màu thay đổi dựa vào pH của môi trường (Bảng 1).

Hàn the (natritetaborac) là chất kiềm, nếu giấy chỉ thị hàn the được tẩm chất màu anthocyanin bằng dịch màu ở môi trường axit, khi giấy được tiếp xúc với môi trường hoặc thực phẩm có hàn the thì giấy sẽ chuyển màu từ đỏ sang tím (xám) hoặc xanh.

Nghiên cứu chiết tách anthocyanin từ đài hoa *Hibiscus sabdariffa*  
 - Ứng dụng để sản xuất giấy chỉ thị phát hiện nhanh hàn the trong thực phẩm



Sơ đồ 1. Quy trình tách chiết chất màu

Bảng 1. Màu của anthocyanin trong các môi trường pH khác nhau

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Màu	đỏ	đỏ	đỏ	đỏ nhạt	đỏ nhạt	tím nhạt	tím	xanh	xanh

Phương pháp thử nghiệm phát hiện hàn the trong thực phẩm bằng giấy anthocyanin. Đối với thực phẩm lỏng: nhúng trực tiếp giấy chỉ thị vào trong thực phẩm; đối với thực phẩm rắn: lấy một mẫu nhỏ, cắt hoặc dằm nát ra, thêm vài giọt nước cất cho ẩm (rất ít) rồi nhúng giấy chỉ thị vào thực phẩm ẩm để kiểm tra sự thay đổi màu của chỉ thị.

Phương pháp xác định ngưỡng phát hiện tối thiểu của một test thử với loại phụ gia cấm sử dụng được thực hiện theo quy định của EU: QĐ657/EC/2002, đây là ngưỡng nồng độ thấp nhất và tại đó số mẫu âm tính phải  $\leq 5\%$ . Tiến hành thí nghiệm trên mẫu trắng với thao tác thêm chất chuẩn vào với lượng giảm dần để xác

định ngưỡng tối thiểu. Điều này phải dựa trên giá trị MRPL (giới hạn hiệu suất tối thiểu của phương pháp đối với các chất cấm hoàn toàn) và MRL (giới hạn tồn dư tối đa với các chất cho phép sử dụng nhưng có giới hạn). Vì thế, để đảm bảo một cơ sở chắc chắn cho sự xác định này, ít nhất mỗi mức nồng độ cần phải thực hiện 20 lần phân tích lặp lại. Kết quả các phân tích này mang lại độ mạnh thống kê là 0,66 để có 1 kết quả âm tính, khả năng phát hiện với khoảng tin cậy là  $\pm 10\%$  đối với sản phẩm chuẩn hóa đầu tiên, xác suất khoảng 95%. Nếu có một kết quả âm tính thì phải tiếp tục tiến hành phân tích 10 mẫu và khi tất cả 10 mẫu phân tích đó cùng cho kết quả dương tính thì có thể coi như đó là ngưỡng phát hiện tối thiểu của giấy. Trong

trường hợp mùi phân tích đó thu được một kết quả âm tính mới, phải nâng mức phát hiện của giấy lên.

### 3. KẾT QUẢ

#### 3.1 Kết quả xác định điều kiện phù hợp cho quá trình chiết tách chất màu

##### 3.1.1 Lựa chọn dung môi phù hợp

Anthocyanin vốn có các gốc hidrocarbon kỵ nước, chỉ tan tốt trong các dung môi hữu cơ, tuy nhiên nó lại có các nhóm chức polyphenol phân cực tan tốt trong dung môi phân cực. Do đó muốn chiết anthocyanin phải dùng hệ dung môi gồm: dung môi hữu cơ và một chất phân cực (thường là nước). Nước vừa có tính phân cực tốt, giá thành rẻ rất thích hợp để sử dụng. Do đó etanol/nước là hệ dung môi thông dụng dùng trong chiết xuất các hợp chất hữu cơ phân cực, tỷ lệ etanol/nước thường sử dụng là 50/50 (Nguyễn Thị Lan và Lê Thị Lạc Quyên, 2004).

Khi bổ sung axit với lượng nhỏ vào dung môi giúp tăng tính phân cực cho dung môi. Tuy nhiên, cần lựa chọn loại axit phù hợp dùng trong thực phẩm mà vẫn đảm bảo hiệu suất chiết tốt nhất và không độc hại. Axit clohydric (HCl), axit axetic và axit citric với nồng độ 1% được bổ sung riêng rẽ để chiết chất màu từ nguyên liệu khô đã được nghiền nhỏ. Các điều kiện thí nghiệm: tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1 g/12 ml; thời gian chiết là 4 ngày; tiến hành ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết được pha loãng rồi đem đo mật độ quang bằng máy hấp phụ phân tử để so sánh hàm lượng chất màu. Ảnh hưởng của hệ dung môi đến hiệu suất chiết được trình bày ở bảng 2.

Qua bảng số liệu cho thấy: khi bổ sung các loại axit, hiệu suất chiết có thay đổi so với không bổ sung. Bổ sung axit citric và axit axetic thì lượng chất màu tăng không đáng kể so với không dùng và chỉ bằng 0,7 lần so với việc dùng axit clohydric (HCl). HCl là axit mạnh do đó làm tăng tính phân cực của dung môi, thuận lợi cho việc chiết các chất phân cực, tuy nhiên dùng với lượng rất nhỏ (1%) thì hoàn toàn không gây độc cho cơ thể nếu chúng ta sử dụng chất màu làm thực phẩm. Vì vậy, hệ dung môi etanol/nước: 50/50 bổ sung 1% HCl được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

##### 3.1.2 Lựa chọn tỉ lệ dung môi và nguyên liệu

Thí nghiệm này được tiến hành để lựa chọn tỷ lệ dung môi/nguyên liệu thích hợp cho việc thu nhận hàm lượng anthocyanin cao. Lựa chọn dung môi etanol : nước là 50:50, 1% HCl; Thời gian chiết trong 4 ngày, tiến hành chiết ở nhiệt độ phòng. Các ngưỡng tỷ lệ sử dụng là: 10; 12; 14; 16 ml dung môi/1g nguyên liệu.

Khi lượng dung môi càng ít thì mật độ quang càng lớn, tuy nhiên thể tích dịch chiết càng nhiều thì lượng anthocyanin càng tăng. Lượng dung môi sử dụng càng nhiều thì lượng chất màu thu được càng lớn. Ở mức tỷ lệ 16 ml/1 g nguyên liệu thì lượng chất màu thu được cao nhất tuy nhiên không khác ý nghĩa so với tỷ lệ 14 ml/1g nguyên liệu (Bảng 3). Nguyên nhân là do lúc này lượng chất màu tan vào dung môi đã đạt tối đa và sự tăng lượng chất màu là không đáng kể khi tăng lượng dung môi chiết xuất. Vì vậy, tỷ lệ 14 ml dung môi/1g nguyên liệu sẽ được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của hệ dung môi đến hiệu suất chiết anthocyanin**

Hệ dung môi	Mật độ quang	Lượng anthocyanin (g)
<b>Etanol/nước: 50/50; 1% HCl</b>	<b>1,215<sup>a</sup></b>	<b>0,018225*X</b>
Etanol/nước: 50/50; 1% axit axetic	0,849 <sup>b</sup>	0,012735*X
Etanol/nước: 50/50; 1% axit citric	0,838 <sup>b</sup>	0,012570*X
Etanol/nước: 50/50	0,795 <sup>b</sup>	0,011925*X

Ghi chú: Các số liệu theo cột có chữ số mũ khác nhau là có giá trị khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa  $\alpha = 5\%$ ; X = M.K/ε.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đến hiệu suất chiết anthocyanin**

Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (ml/1g)	Mật độ quang	Thể tích dịch chiết (l)	Lượng anthocyanin (g)
10	1,270 <sup>a</sup>	0,010	0,012700*X
12	1,234 <sup>a</sup>	0,012	0,014808*X
<b>14</b>	<b>1,123<sup>ab</sup></b>	<b>0,014</b>	<b>0,015722*X</b>
16	0,983 <sup>b</sup>	0,016	0,015728*X

Ghi chú: Các số liệu theo cột có chữ số mũ khác nhau là có giá trị khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa  $\alpha = 5\%$ ; X = M.K/l

### 3.1.3 Lựa chọn thời gian chiết

Thời gian chiết có ảnh hưởng tới hiệu suất chiết. Điều kiện thí nghiệm được lựa chọn từ các thí nghiệm trên. Các ngưỡng thời gian được thử nghiệm lần lượt là: 2; 4; 6; 8 và 10 ngày.

Qua kết quả thí nghiệm trên cho thấy: thời gian chiết càng lâu thì hàm lượng chất màu càng nhiều (Bảng 4). Tuy nhiên đến ngày thứ 8 và 10 thì hàm lượng chất màu gần như tăng không đáng kể. Mức thời gian 6 ngày cho lượng chất màu khá cao và khác không ý nghĩa so với 8 và 10 ngày. Do đó chúng tôi lựa chọn thời gian chiết là 6 ngày và áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.2 Kết quả xác định một số chỉ tiêu lý, hóa học của nguyên liệu

Sau khi chiết, chất màu thô thu được ở dạng keo, tiến hành sấy khô ở áp suất thấp tại 40° C thu được chất màu khô, bảo quản ở nhiệt độ -5°C. Kết quả đã xác định được một số chỉ tiêu lý, hóa học của nguyên liệu tươi và khô ở bảng 5.

Tiến hành thí nghiệm tương tự để xác định độ axit của chất màu sau khi sấy khô, kết quả là độ axit của chất màu thành phẩm là 3,83 mldH<sup>+</sup>/1gam chất màu, tương ứng 0,58 mldH<sup>+</sup>/1 gam nguyên liệu khô. Như vậy, độ axit trong chất màu tách ra đã giảm đi khá nhiều so với nguyên liệu ban đầu.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hiệu suất chiết anthocyanin**

Thời gian chiết (ngày)	Mật độ quang	Lượng anthocyanin (g)
2	0,758 <sup>b</sup>	0,014212*X
4	0,779 <sup>b</sup>	0,014606*X
<b>6</b>	<b>0,958<sup>a</sup></b>	<b>0,017963*X</b>
8	0,958 <sup>a</sup>	0,017963*X
10	0,961 <sup>a</sup>	0,018018*X

Ghi chú: Các số liệu theo cột có chữ số mũ khác nhau là có giá trị khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa  $\alpha = 5\%$ ; X = M.K/l

**Bảng 5. Kết quả xác định một số chỉ tiêu kỹ, hóa học của nguyên liệu**

Thông số	Nguyên liệu khô	Nguyên liệu tươi
Độ ẩm (%)	9,53	93
Hàm lượng chất màu thô anthocyanin (%)	15,2	1,06
Độ axit (mld [H <sup>+</sup> ]/1 g nguyên liệu)	3,37	-

Ghi chú: mld - mili đương lượng

### 3.3 Xác định các thông số thích hợp để sản xuất giấy chỉ thị hàn the

#### 3.3.1 Xác định nồng độ pha loãng

Chất màu khô có hàm lượng màu rất cao, do đó cần hòa loãng bằng nước cất với tỷ lệ lớn rồi mới đem tẩm dịch vào giấy. Các dung dịch được sử dụng có nồng độ hàn the từ 0,0001 đến 0,1N (tương đương là từ 38,1mg/1kg thực phẩm đến 38,1 gam/1kg thực phẩm) đến để tiến hành thí nghiệm. Các ngưỡng nồng độ dịch tẩm thí nghiệm là: 200; 400; 600; 800 ml nước cất/1gam chất màu.

Kết quả cho thấy, khi lượng chất màu được tẩm trên giấy quá cao hoặc quá thấp thì đều không phát hiện được hàn the trong ngưỡng nồng độ trên. Ở độ pha loãng chất màu: 1g/400 ml nước cất có thể phát hiện được nồng độ hàn the ở mức rất thấp 0,0001N và sự chuyển màu là rõ nhất (Bảng 6). Do đó độ pha loãng dịch màu này được lựa chọn để tẩm giấy chỉ thị cho

các thí nghiệm tiếp theo và ứng dụng để sản xuất giấy chỉ thị hàn the.

#### 3.3.2 Xác định thời gian tẩm dịch màu lên giấy

Thời gian ngâm tẩm dịch màu lên giấy có ý nghĩa quan trọng trong việc xác định sự xuất hiện của hàn the. Các mốc thời gian ngâm giấy thí nghiệm là: 1; 30; 60; 90; 120; 150 giây. Giấy sau khi ngâm tẩm dịch màu được sấy khô ở nhiệt độ 40°C trong 1 giờ. Kết quả phát hiện hàn the của giấy được thể hiện dưới bảng 7.

Qua bảng kết quả thí nghiệm ta thấy thời gian tẩm dịch ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả phát hiện hàn the của giấy chỉ thị. Nếu thời gian ít hơn 120 giây thì khi tăng thời gian ngâm cũng tăng độ nhạy của giấy. Tuy nhiên khi tăng đến 150 giây thì sự phát hiện bắt đầu giảm. Nguyên nhân có thể do lượng anthocyanin trên giấy lớn nên không phát hiện được các ngưỡng nồng độ hàn the thấp. Do vậy, thời gian ngâm tẩm giấy được lựa chọn là 120 giây.

**Bảng 6. Ảnh hưởng của độ pha loãng chất màu đến khả năng phát hiện hàn the**

Nồng độ dịch tẩm	Hàn the 0,1N	Hàn the 0,01N	Hàn the 0,001N	Hàn the 0,0001N
1g dịch màu/200 ml nước cất	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám xanh	Giấy không đổi màu	Giấy không đổi màu
1g dịch màu/400 ml nước cất	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám hơi xanh	Giấy chuyển màu xám xanh	Giấy chuyển màu xám xanh nhạt
1g dịch màu/600 ml nước cất	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám xanh	Giấy chuyển màu xám xanh	Giấy không đổi màu
1g dịch màu/800 ml nước cất	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám	Giấy không chuyển màu	Giấy không đổi màu

**Bảng 7. Ảnh hưởng của thời gian ngâm tẩm dịch màu vào giấy đến khả năng phát hiện hàn the của giấy chỉ thị**

Thời gian ngâm tẩm dịch màu (giây)	Hàn the 0,1N	Hàn the 0,01N	Hàn the 0,001N	Hàn the 0,0001N
1	Màu xám mờ	Màu xám xanh mờ	Không đổi màu	Không đổi màu
30	Màu xám mờ	Màu xám mờ	Màu xám xanh mờ	Không đổi màu
60	Màu xám rất rõ	Màu xám rất rõ	Màu xám hơi mờ	Màu xám mờ
90	Màu xám rất rõ	Màu xám rất rõ	Màu xám xanh mờ	Màu xám xanh mờ
120	Màu xám rất rõ	Màu xám rất rõ	Màu xám xanh rõ	Màu xám xanh rất rõ
150	Màu xám rõ	Màu xám rõ	Màu xám xanh	Màu xanh mờ

### 3.3.3 Xác định thời gian nhúng giấy chỉ thị vào thực phẩm

**Bảng 8. Ảnh hưởng của thời gian nhúng giấy chỉ thị vào thực phẩm đến khả năng phát hiện hàn the**

TG (giây)	Hàn the 0,1N	Hàn the 0,01N	Hàn the 0,001N	Hàn the 0,0001N
1	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám	Giấy không đổi màu	Giấy không đổi màu
30	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy không đổi màu	Giấy không đổi màu
60	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám xanh mờ	Giấy không chuyển màu
90	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám xanh	Giấy chuyển màu xám xanh mờ
120	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám xanh	Giấy chuyển màu xám xanh
150	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám đen	Giấy chuyển màu xám xanh

Khi sử dụng giấy để phát hiện hàn the thì thời gian nhúng giấy vào thực phẩm cũng ảnh hưởng đến khả năng phát hiện hàn the của giấy, nhất là với các ngưỡng nồng độ thấp. Thử nghiệm các ngưỡng thời gian nhúng lần lượt là: 1; 30; 60; 90; 120; 150 giây. Kết quả thể hiện trong bảng 8.

Qua bảng kết quả thí nghiệm cho thấy thời gian ngâm dịch ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả

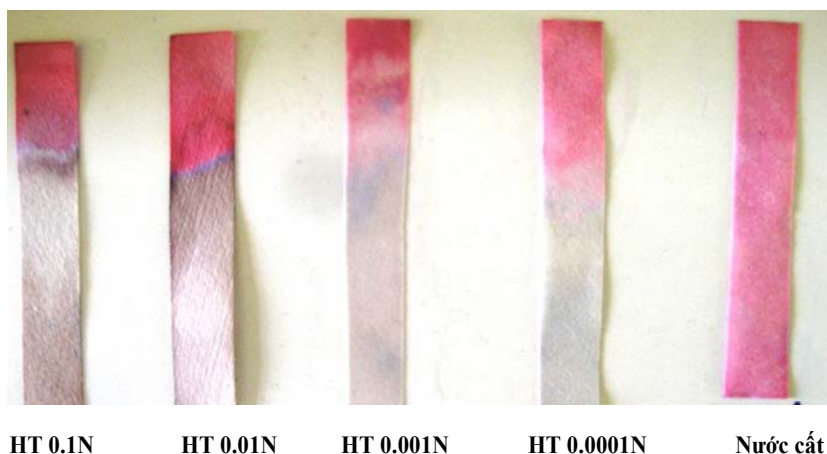
phát hiện hàn the của giấy chỉ thị. Nếu thời gian ít hơn 120 giây thì khi tăng thời gian ngâm cũng tăng độ nhạy của giấy. Tuy nhiên khi tăng đến 150 giây thì sự phát hiện bắt đầu giảm. Do vậy chúng tôi lựa chọn thời gian ngâm tẩm giấy là 120 giây.

### 3.4. Xác định ngưỡng phát hiện hàn the tối thiểu của giấy chỉ thị

**Bảng 9. Kết quả xác định ngưỡng phát hiện tối thiểu của giấy chỉ thị đối với mẫu chuẩn**

Lần lặp	Hàn the 20mg/l	Hàn the 30mg/l	Hàn the 40mg/l	Hàn the 50mg/l	Hàn the 60mg/l
1	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X
8			X	X	X
9		X	X	X	X
10		X	X	X	X
11		X	X	X	X
12		X	X	X	X
13		X	X	X	X
14		X	X	X	X
15			X	X	X
16		X	X	X	X
17		X	X	X	X
18	X	X	X	X	X
19		X	X	X	X
20	X	X	X	X	X

Ghi chú: dấu "X" tương ứng với giấy chỉ thị chuyển màu từ hồng sang xám xanh



**Hình 1. Sự đổi màu của giấy chỉ thị màu anthocyanin khi nhúng hàn the ở các nồng độ khác nhau**

Tiến hành thí nghiệm xác định ngưỡng phát hiện tối thiểu hàn the của giấy anthocyanin được tiến hành theo tài liệu QĐ 657/EC/2002, chúng tôi nghiên cứu trên các mẫu chuẩn tương ứng với hàm lượng hàn the lần lượt là: 20; 30; 40; 50; 60 mg/lít.

Có thể nhận thấy ở ngưỡng nồng độ của hàn the 30 mg/l, nước cất số mẫu âm tính là 2/20 hay bằng 10% không đáp ứng được yêu cầu. Ở ngưỡng 40mg/l nước cất số mẫu âm tính là 0/20 (Bảng 9). Vậy kết luận ngưỡng phát hiện tối thiểu của giấy chỉ thị là 40mg/l hay tương ứng với 40 mg/kg thực phẩm lỏng. Ngưỡng phát hiện tối thiểu của loại giấy nghệ trên thị trường để phát hiện hàn the là 50 mg/kg. Như vậy, nghiên cứu đã có kết quả bước đầu rất khả quan.

### 3.5 Một số kết quả thử nghiệm giấy chỉ thị hàn the trên thực phẩm

Trong các loại thực phẩm thì: Giò, chả, bánh suse, nem chua, bánh đúc, bánh cuốn, hải sản... được kết luận là có sử dụng hàn the khá nhiều. Mẫu thử được mua tại chợ sinh viên trường đại học Nông Nghiệp Hà Nội. Hiện nay Bộ Y tế cho phép sử dụng giấy nghệ để xác định nhanh hàn the với ngưỡng tối thiểu là 50mg/1kg thực phẩm. Giấy nghệ sản xuất theo quy chuẩn thường quy kỹ thuật của Bộ Y tế. Khi thử giấy nghệ chuyển từ màu vàng sang màu cam, cam đỏ thì chúng tỏ mẫu thử có hàn the. So sánh với kết quả thử nghiệm bằng giấy nghệ, giấy anthocyanin chuyển màu từ hồng sang xám, xám xanh thì mẫu có hàn the.

**Bảng 10. Kết quả thử nghiệm giấy anthocyanin để xác định hàn the trong một số mẫu thực phẩm và so sánh với kết quả với giấy nghệ**

Mẫu	Giấy anthocyanin	Giấy nghệ
Giò 1	Giấy chuyển màu xám xanh	Giấy nghệ chuyển màu cam
Giò 2	Giấy chuyển màu xám xanh nhạt	Giấy nghệ chuyển màu cam nhạt
Chả 1	Giấy chuyển màu xám xanh	Giấy nghệ chuyển màu cam
Chả 2	Giấy chuyển màu xám xanh	Giấy nghệ chuyển màu cam
Nem chua	Giấy chuyển màu xám xanh nhạt	Giấy không chuyển màu
Bún	Giấy không chuyển màu	Giấy không chuyển màu
Bánh cuốn	Giấy không chuyển màu	Giấy không chuyển màu



Kết quả thí nghiệm cho thấy sự nhận biết hàn the của hai loại giấy là tương tự nhau, với mẫu nem chua giấy nghệ không phát hiện còn giấy màu anthocyanin có phát hiện hàn the với lượng nhỏ. Vậy có thể kết luận ban đầu rằng giấy màu anthocyanin có thể dùng để phát hiện hàn the trong thực phẩm.

#### 4. KẾT LUẬN

Thông qua việc thu nhận anthocyanin từ đài hoa *Hibiscus* bằng phương pháp tách chiết phân đoạn dựa trên nguyên tắc giảm dần độ phân cực của dung môi, chúng tôi đã tách được anthocyanin có hàm lượng là 15,2% đối với nguyên liệu khô, đồng thời giảm hàm lượng axit đi 83%, việc làm giảm độ chua của dịch chiết là một tiềm năng để ứng dụng loại màu này trong thực phẩm. Nghiên cứu ứng dụng bước đầu của dịch chiết này là sản xuất được giấy chỉ thị hàn the. Kết quả cho thấy khả năng phát hiện và độ nhạy khi xác định hàn the của giấy nghệ (loại giấy được cho phép sử dụng để xác định hàn the trên thị trường) và giấy anthocyanin là tương đương. Kết quả này mở ra nhiều ứng dụng hơn cho các chất màu được tách chiết từ thực vật.

#### LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn TS. Phạm Kim Đăng - Khoa Chăn nuôi và NTTS - người đã cung cấp thông tin về ngưỡng xác định tối thiểu và độ nhạy của phép thử khi xác định giới hạn hiệu suất tối thiểu của phương pháp đối với các chất cấm hoàn toàn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Huỳnh Thị Kim Cúc, Phạm Châu Quỳnh, Nguyễn Thị Lan, Trần Khôi Nguyên (2004). Xác định hàm lượng anthocyanin trong một số nguyên liệu rau quả bằng phương pháp pH vi sai, Tạp Chí Khoa Học và Công Nghệ, Đại Học Đà Nẵng, số 3(7), 47-54.

Nguyễn Thị Lan, Lê Thị Lạc Quyên (2004). Ảnh hưởng của hệ dung môi đến khả năng chiết chất màu anthocyanin từ quả dâu. Tạp chí khoa học công nghệ, Đại học Đà Nẵng, số 2, 41-44.

Hồ Viết Quý (2006). Giáo trình phân tích lí hóa. Nhà xuất bản Giáo dục

Quyết định 867-BYT ngày 4/4/1998.

Quyết định của EU: QĐ 657/EC/2002

Alarcon-Aguilar, F.J., Zamilpa, A., Perez-Garcia, M.D., Almanza-Perez, J.C., Romero-Núñez, E., Campos-Sepulveda, E.A., Vazquez-Carrillo, L.I., Roman-Ramos, R. (2007). Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. Journal of Ethnopharmacology, 114: 66-71.

Chien-Ning Huang, Kuei-Chuan Chan, Wei-Ting Lin, Shi-Li Su, Chau-Jong Wang and Chiung-Huei Peng (2009). *Hibiscus sabdariffa* Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration Induced by High Glucose. A Mechanism Involves Connective Tissue Growth Factor Signals. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57 (8), 3073-3079.

Chiung-Huei Peng, Charng-Cherng Chyau, Kuei-Chuan Chan, Tsung-Hsien Chan, Chau-Jong Wang, and Chien-Ning Huang (2011). *Hibiscus sabdariffa* polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance. Journal of Agricultural and Food Chemistry

Morton, J.F. (1987). Roselle, *Hibiscus sabdariffa* L. In: Morton, J.F. (Ed.). Fruits of Warm Climates. Miami, FL USA, pp. 281-286.

Ologundudu, A., A.O. Lawal, O.G. Adesina, F.O. Obi, (2006a). Effect of ethanolic extract of *Hibiscus sabdariffa* L. on 2, 4- dinitrophenylhydrazine-induced changes in blood parameters in rabbits. Global J. Pure Appl. Sci. 12(3): 335-338.

Ologundudu, A., A.O. Lawal, O.G. Adesina, F.O. Obi (2006b). Effect of ethanolic extract of *Hibiscus sabdariffa* L. on 2, 4-dinitrophenylhydrazine-induced low glucose level and high malondialdehyde levels in rabbit brain and liver. Global J. Pure Appl. Sci. 12(4): 525-529.

Tseng, T.H., E.S. Kao, F.P. Chu, H.W. Lin-Wa, C.J. Wang (2000). Protective effect of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. Food and Chemical Toxicology 35(12):1159-1164.