

Nghiên cứu quá trình chiết và đánh giá độ ổn định của anthocyanin trong hoa Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.).

Hoàng Thị Hồng

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành
hthong@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích xây dựng qui trình chiết xuất và đánh giá độ bền của anthocyanin từ hoa Đậu biếc *Clitoria ternatea* L. Để tối đa hóa năng suất khai thác, điều kiện chiết thích hợp như sau: Dung môi, EtOH 50 %; vật liệu/dung môi tỉ lệ, 1: 9; nhiệt độ chiết 50 °C; Thời gian chiết, 30 phút; số lượng các bước chiết xuất 2 bước; Thời gian thu hoa Đậu biếc là 7 giờ sáng. Trong những điều kiện này, lượng anthocyanin là 76,41 mg/L tương ứng với 2,189 mg anthocyanin/g vật liệu khô. Độ bền anthocyanin của dịch chiết và dư lượng được đánh giá trong 2 điều kiện: nhiệt độ phòng và 45 °C. Nhiệt độ có một ảnh hưởng đáng kể đến anthocyanin và anthocyanin cao phân tử, mẫu với acid citric (1 – 3) g/L ổn định hơn so với những loại không có acid citric. Trong thử nghiệm DPPH, IC₅₀ của hoa Đậu biếc là 400 µg/mL (với $y = 0,1565x - 12,965$, $R^2 = 0,9939$) so với IC₅₀ của acid ascorbic (7 µg/mL) và thấp hơn IC₅₀ của vitamin C khoảng 57 lần. Những kết quả này cho thấy hoa Đậu biếc có tiềm năng chống oxy hóa tạo cơ sở cho việc sử dụng và khai thác tiềm năng về hoa Đậu biếc.

Nhận 17.11.2020
Được duyệt 29.11.2020
Công bố 30.12.2020

Từ khóa
anthocyanin,
hoa Đậu biếc, DPPH,
IC₅₀

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Anthocyanin là một nhóm các chất phổ biến và đặc trưng trong tự nhiên. Anthocyanin có màu sắc từ tím đến xanh, có đặc tính chống oxy hóa cao [1]. Anthocyanin được tìm thấy trong dịch bào của tế bào biểu bì, mô mạch dẫn. Chúng xuất hiện trong rễ, trụ dưới lá mầm, bao lá mầm, thân, củ, lá và tạo màu cho cả bề mặt, viền sọc, hay các vết đốm. Anthocyanin là những glucosid, thuộc họ flavonoid, do gốc đường glucose, galactose... kết hợp với gốc aglucon có màu (anthocyanin). Anthocyanin là chất màu thiên nhiên được sử dụng an toàn trong thực phẩm và dược phẩm với giá thành cao (khoảng 1000 USD/100 mg) [2]. Anthocyanin có nhiều trong rau, quả, hoa, hạt có màu từ đỏ đến tím như: quả nho, quả dâu, lá tía tô, gạo, hạt ngô đen... vai trò của anthocyanin được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu [3]. Các chức năng của anthocyanin bao gồm: bảo vệ lục lạp khỏi tác động bất lợi của ánh sáng, hạn chế bức xạ của tia UV-B, hoạt tính chống oxy hóa và chống viêm [4]. Ngoài ra, chúng còn tạo điều kiện cho sự thụ phấn, phát tán hạt nhờ màu sắc sặc sỡ trên cánh hoa và quả. Sinh tổng hợp anthocyanin ở lá được tăng cường để đáp ứng với stress môi trường: Ánh sáng mạnh, UV-B, nhiệt độ cao, thiếu nitơ và phospho, nhiễm nấm và vi khuẩn, tổn

thương, côn trùng, ô nhiễm; Khả năng chống oxy hóa cao, hạn chế sự suy giảm sức đề kháng [5].

Hoa Đậu biếc *Clitoria ternatea* L., một loại hoa đặc biệt có chứa lượng anthocyanin cao. Ở Việt Nam, cây Đậu biếc được trồng và thu hoạch chủ yếu ở Bến Tre. Tuy nhiên, giá trị của loài hoa này chưa được chính thức công nhận [6].

Nghiên cứu quá trình chiết xuất và đánh giá tính ổn định màu của anthocyanin trong hoa Đậu biếc được thực hiện với các nội dung: nghiên cứu qui trình chiết anthocyanin trong hoa Đậu biếc; khảo sát ảnh hưởng các yếu tố (dung môi, tỉ lệ dung môi, nhiệt độ chiết, thời gian chiết, số lần chiết và thời gian thu thập mẫu) đến quá trình chiết anthocyanin; đánh giá độ ổn định của dịch chiết và khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết.

2 Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu và trang thiết bị

- *Dược liệu*: Hoa Đậu biếc thu hái ở Bến Tre. Hoa tươi được sấy khô, xay và cho vào túi dây kéo ở nhiệt độ phòng.

- *Đối tượng nghiên cứu*: Anthocyanin trong hoa Đậu biếc.

- *Hóa chất, dung môi*: Ethanol tuyệt đối, Acid Chlorhydric, Kali chlorate, Natri metabisulphate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH), Methanol.



- *Trang thiết bị*: Máy đo pH: Ohaus Starter 5000, Máy đo độ ẩm: Sartorius - MA35, Đầu đọc Elisa: Elmasonic S 100 H, Máy quang phổ UV-Vis: Thermo Genesys 10S UV-Vis, Máy siêu âm: Elma S 100 H

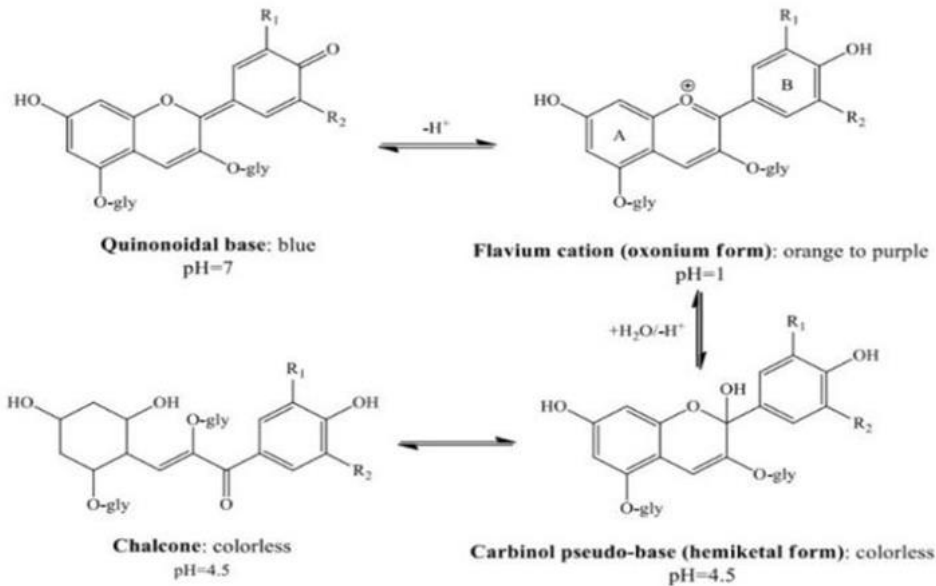
2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Xác định độ ẩm

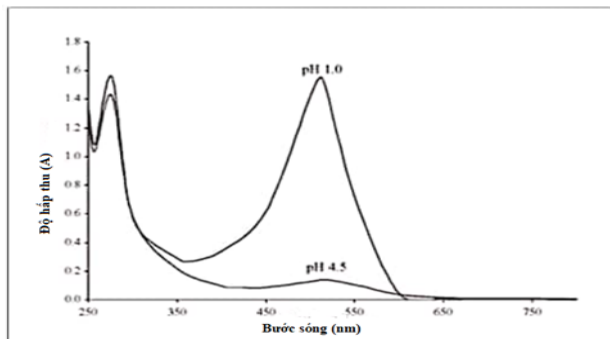
Độ ẩm được xác định bởi máy Sartorius - MA35. Mẫu được gia nhiệt để bay hơi cho đến khi khối lượng không đổi. Sự khác biệt về trọng lượng trước và sau được sử dụng để tính phần trăm độ ẩm của mẫu. Những bông hoa được đo 3 lần để lấy mức trung bình [7]:

$$m_{tb} = \frac{\sum_{i=1}^n m_i}{n}$$

Trong đó: - m_{tb} : Độ ẩm trung bình (%).
 - m_i : Độ ẩm của thí nghiệm (%).



Hình 1 Sự biến đổi cấu trúc và màu sắc của anthocyanin ở các môi trường pH khác nhau [8]



Hình 2 UV - Quang phổ nhìn thấy của anthocyanin ở đệm pH = 1 và pH = 4,5

2.2.2.2 Phương pháp thực hiện

- Dung dịch đệm pH = 1

- n: số thí nghiệm, n = 3

Lượng chất khô (d_m) được xác định bởi:

$$d_m = 100 - m_{tb} (\%)$$

2.2.2 Đo tổng anthocyanin bằng phương pháp chênh lệch pH

2.2.2.1 Nguyên tắc

Theo Lee, Durst & Wrolstad, 2005, hàm lượng anthocyanin trong mỗi chiết xuất sẽ được xác định bằng phương pháp pH vi sai [7]. Lượng anthocyanin được xác định bởi độ hấp thụ A ở bước sóng cực đại $\lambda_{vis-max}$. Trong phương pháp này, hàm lượng anthocyanin được tính bằng cách sử dụng trọng lượng phân tử MW và hệ số mol của cyanidin-3-glucoside, là sắc tố anthocyanin phổ biến nhất tìm thấy trong tự nhiên [8]. Nguyên lí của phương pháp dựa trên sự thay đổi cấu trúc của anthocyanin monomer trong các môi trường pH khác nhau, dạng oxonium màu tồn tại ở pH = 1 và dạng hemiketal không màu chiếm ưu thế ở pH = 4,5 (Hình 1)

KCl (1,86 g) được hòa tan hoàn toàn vào nước cất (980 mL) trong cốc thủy tinh. pH của dung dịch được đo bằng máy đo pH và được điều chỉnh về pH= 1 bằng dung dịch HCl 20 %. Dung dịch được bảo quản ở 10 °C để sử dụng trong vòng một tuần. Trước khi sử dụng, dung dịch đệm cần được kiểm tra và điều chỉnh đến pH = 1.

- Dung dịch đệm pH = 4,5

CH₃CO₂Na.3H₂O (54,43 g) được hòa tan hoàn toàn vào nước cất (960 mL) trong cốc thủy tinh. pH của dung dịch được đo bằng máy đo pH và được điều chỉnh về pH = 4,5 với dung dịch HCl 20 %. Dung dịch được bảo quản ở 10 °C để sử dụng trong vòng một tuần. Trước khi sử dụng, dung dịch đệm phải được kiểm tra và điều chỉnh đến pH = 4,5.

2.2.3. Xác định hàm lượng anthocyanin:

- Xác định bước sóng cực đại

Đường cơ sở của nước cất nằm giữa bước sóng 400 nm và 700 nm.

Dịch chiết hoa được pha loãng với nước cất và dung dịch được quét bằng máy quang phổ ở bước sóng từ 400 nm đến 700 nm. Kết quả là sự hấp thụ phổ của anthocyanin thu được (500 – 550) nm. Hấp thụ tối đa bước sóng là bước sóng có độ hấp thụ cao nhất A (Xem Hình 2).

- Xác định hệ số pha loãng (RF)

Hệ số pha loãng thích hợp được xác định bằng cách pha loãng phân mẫu thử với đệm pH = 1 cho đến khi độ hấp thụ cực đại $\lambda_{vis-max}$ nằm trong phạm vi tuyến tính của máy quang phổ. Đối với hầu hết các máy đo quang phổ, độ hấp thụ phải nằm trong khoảng 0,2 đến 1,2 (tối ưu là giữa 0,7 và 0,8). Sử dụng hệ số pha loãng này, hai mẫu thử pha loãng được chuẩn bị, một với đệm pH = 1 và một với đệm pH = 4,5.

$$DF = \frac{V_f}{V_i} \quad (2)$$

Trong đó:

DF: Hệ số pha loãng được tính theo công thức (2)

V_f : Thể tích cuối cùng, $V_f = V_i + V_{pha\ loãng\ dung\ môi}$

V_i : Thể tích ban đầu

Độ hấp thụ của mẫu thử được pha loãng với dung dịch đệm pH = 1 và dung dịch đệm pH = 4,5 là xác định ở cả 2 bước sóng $\lambda_{vis-max}$ và 700 nm (độ đục của mẫu). Thử nghiệm pha loãng các phần được đọc so với một ô trống chứa đầy nước cất.

Hàm lượng anthocyanin được tính theo công thức:

$$a_{dd}(mg/l) = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times L}$$

Trong đó:

$$A = (A_{\lambda_{vis\ max}} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{\lambda_{vis\ max}} - A_{700nm})_{pH4.5}$$

MW = 449.2 g/mol đối với cyanidin-3-glucose

DF: Hệ số pha loãng

L: độ dày cuvet (cm)

$\epsilon = 26900$, hệ số mol của cyanidin-3-glucoside ($l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

10^3 : hệ số chuyển đổi từ g sang mg.

Các chiết xuất của mỗi thử nghiệm được điều chỉnh thành V_1 (L) và độ hấp thụ a_1 (mg/L) của anthocyanin được đo bằng phương pháp chênh lệch pH.

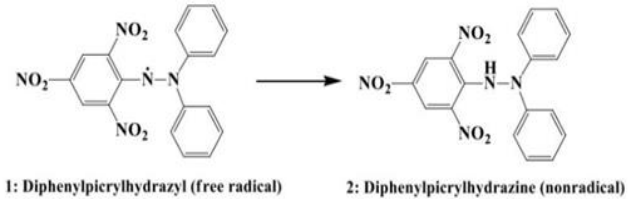
Hàm lượng anthocyanin được chuẩn hóa thành miligam anthocyanin trên mỗi gam vật liệu:

$$a(mg/g) = \frac{a_1 \cdot V_1}{m_0(1-x)}$$

2.2.4 Xác định hoạt tính chống oxi hóa

2.2.4.1 Nguyên tắc

Các phép đo DPPH được sử dụng dựa trên phương pháp của Brand-Williams và cộng sự (1995) [9]. Hoạt tính chống oxi hóa tiềm năng của chiết xuất và các phân đoạn thực vật là được xác định trên cơ sở hoạt động của 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ổn định gốc tự do. Các chất có hoạt tính chống oxi hóa sẽ chuyển DPPH từ màu tím sang màu vàng nhạt (Hình 3)



Hình 3 Chuyển đổi DPPH bằng cách loại bỏ gốc tự do

Việc quét gốc tự do được xác định bằng cách đo độ hấp thụ của mẫu tại bước sóng 517 nm [9]. Acid ascorbic được sử dụng như một chất kiểm soát tích cực. Tỷ lệ phần trăm của việc loại bỏ gốc DPPH được tính theo công thức sau:

$$DPPH (\%) = \frac{A_b - (A_s - A_c)}{A_b}$$

Trong đó:

- A_b : Mật độ quang của mẫu trắng
- A_s : Mật độ quang của mẫu
- A_c : Mật độ quang của sắc tố
- IC_{50} giá trị được tính bằng biểu đồ % ức chế.

2.2.4.2 Quá trình thực hiện

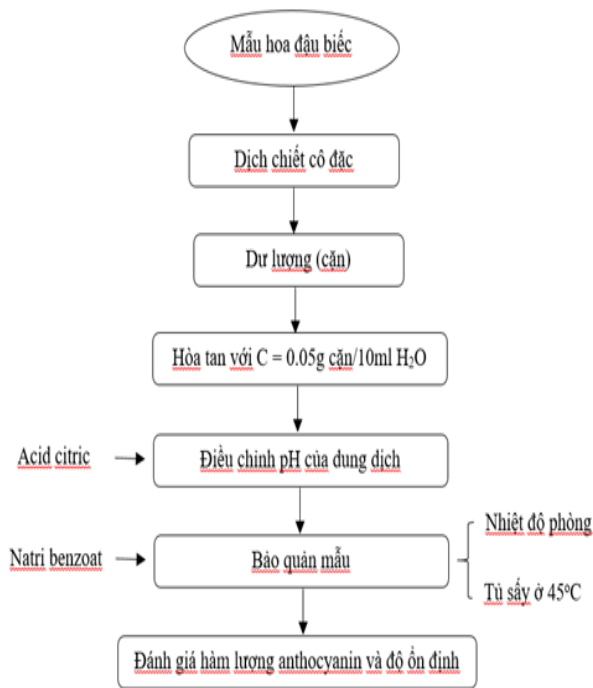
Chuẩn bị:

- DPPH được pha với nồng độ 40 $\mu\text{g/mL}$ trong metanol 80 % (với $OD_{517nm} = 0.8 \pm 0.02$).
- Vitamin C thể hiện sự kiểm soát tích cực với nồng độ (0 – 100) $\mu\text{g/mL}$ trong metanol 80 %.
- Mẫu được hòa tan trong methanol 80 %.

Quá trình thực hiện:

- Dung dịch mẫu: Dung dịch DPPH (180 μL) được thêm vào dung dịch mẫu (120 μL). Dung dịch được lắc và bảo quản trong bóng tối ở 30 $^{\circ}\text{C}$ trong 30 phút, sau đó đo độ hấp thụ ở bước sóng ở 517 nm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để tính trung bình.
- Dung dịch màu: Dung dịch MeOH 80 % (180 μL) được thêm vào dung dịch mẫu (120 μL), độ hấp thụ được đo ở bước sóng 517 nm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để tính trung bình.
- Dung dịch trắng: Dung dịch DPPH (180 μL) được thêm vào dung dịch MeOH 80 % (120 μL).

2.2.5 Đánh giá độ ổn định màu của dịch chiết



Hình 4 Quá trình đánh giá độ ổn định của dịch chiết



Hình 5 A - màu ở pH = 1; B - màu ở pH = 4,5

Kết quả phổ hấp thụ ở hình 6 cho thấy bước sóng hấp thụ cực đại từ (500 – 550) nm, tương ứng với chất tạo màu anthocyanin trong hoa Đậu biếc [25]. Độ hấp thụ tối đa được xác định ở bước sóng $\lambda_{vis-max} = 546$ nm. Do đó, tất cả các thí nghiệm và tính toán sẽ được thực hiện ở bước sóng này.

3.2.2 Hệ số pha loãng

Hệ số pha loãng được xác định bởi các dung môi khác nhau. Sau khi hòa tan dịch chiết và đệm pH = 1, các dung dịch có DF = 25 cho thấy độ hấp thụ trong vùng đáng tin cậy từ 0,2 đến 1,2 (Hình 6) dựa trên phạm vi tuyến tính của Beer-Lambert (tối ưu hóa từ 0,7 đến 0,8).

3.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết anthocyanin

3.3.1. Dung môi

Điều kiện thực hiện:

Dịch chiết được cô đặc bằng thiết bị cô quay và phần cặn được hòa tan trong nước với nồng độ 0,05 g cặn/10 mL H₂O. Sau đó, pH của dung dịch được điều chỉnh bằng acid citric (0 – 5) g/L để đánh giá hàm lượng anthocyanin và độ ổn định của màu sau thời gian bảo quản. Việc khảo sát sự ổn định được thực hiện trên cả hai chiết xuất, có và không có acid citric.

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Độ ẩm của nguyên liệu

Độ ẩm trung bình được tính qua 5 lần đo.

Bảng 1 Độ ẩm của hoa Đậu biếc

Mẫu	1	2	3	4	5
m (g)	10	10	10	10	10
Độ ẩm (%)	12,32	12,35	13,33	12,43	13,25

Theo số liệu ở Bảng 1 ta có:

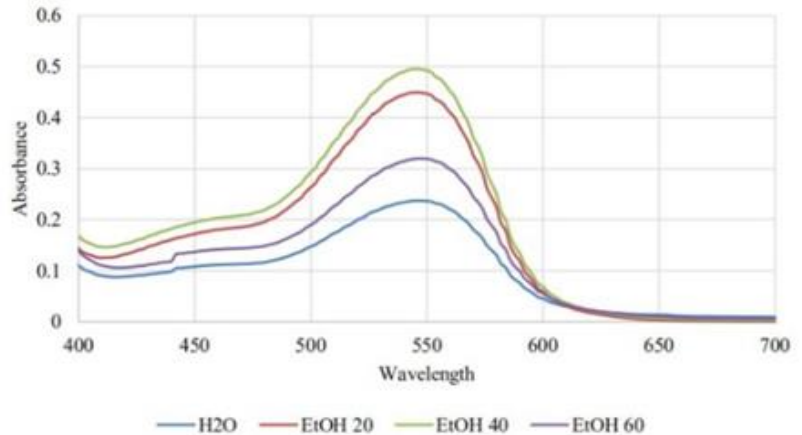
Độ ẩm trung bình của các mẫu: 12,735 %

Độ khô của mẫu: 87,3 %

3.2. Xác định độ hấp thụ cực đại và hệ số pha loãng

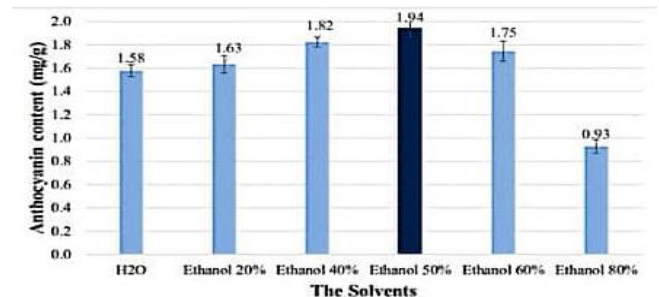
3.2.1. Độ hấp thụ cực đại

Các phép đo độ hấp thụ được thực hiện ở bước sóng độ hấp thụ cực đại của dung dịch pH = 1.



Hình 6 Phổ hấp thụ của dung môi ở pH = 1

- Vật liệu: m = 10 g, độ ẩm 12,735 %.
- Tỷ lệ dung môi : rắn : 1 : 12
- Nhiệt độ chiết: 50 °C
- Thời gian chiết: 30 phút
- Số lần chiết: 2 lần



Hình 7 Ảnh hưởng của nồng độ cồn

Ethanol được biết đến như một dung môi linh hoạt có độ phân cực cao, có thể chiết xuất anthocyanin ra khỏi các vật liệu dễ dàng. Do đó, EtOH-H₂O là dung môi được sử dụng trong quá trình chiết xuất được thực hiện ở các nồng độ khác nhau (0, 20, 40, 60 và 80) %.

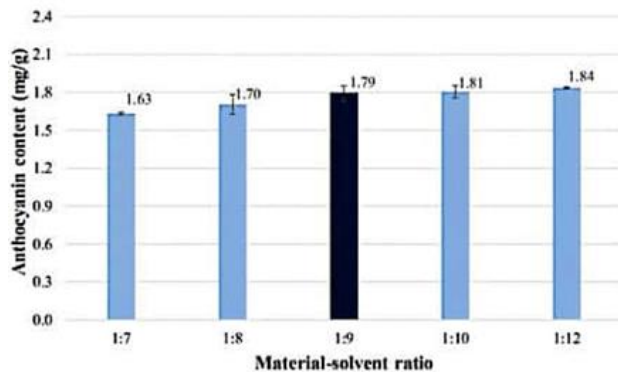
Khi nồng độ EtOH tăng từ 0 % đến 40 %, hàm lượng anthocyanin tăng dần ở mức (1,58 - 1,82) mg/g, và nó đạt mức cao nhất là 1,94 mg/g trong EtOH 50 %. Tuy nhiên, con số giảm đáng kể xuống đáy, ở mức 0,93 mg/g khi nồng độ tăng lên tới 80 % (Hình 7).

Anthocyanin có độ hòa tan vừa phải trong EtOH 50 % và hàm lượng đạt mức cao nhất 1,94 mg/g tại EtOH 50 %. Do đó, EtOH 50 % được chọn là dung môi chính.

3.3.2. Tỷ lệ dung môi rắn

Các điều kiện chiết:

- Nguyên liệu: m = 10 g, độ ẩm 12,735 %
- Dung môi: 50 % EtOH
- Nhiệt độ chiết: 50 °C
- Thời gian chiết: 30 phút
- Số lần chiết: 2 lần



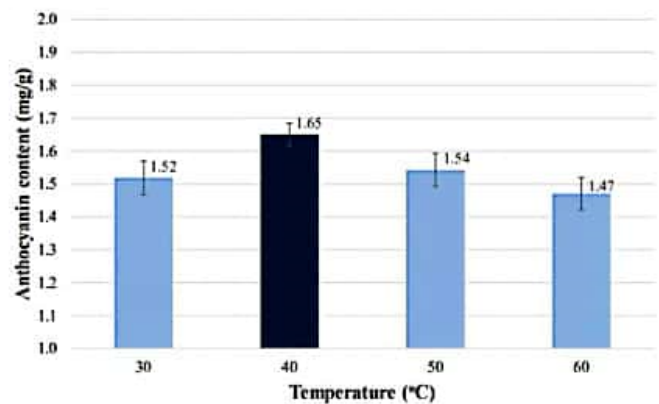
Hình 8 Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi : rắn

Dữ liệu Hình 8 cho thấy, khi lượng dung môi quá thấp, anthocyanin ít được chiết xuất. Ở tỷ lệ 1 : 7 và 1 : 8, lượng anthocyanin tăng chậm và đạt cực đại 1,84 mg/g ở tỷ lệ 1 : 12. Nguyên liệu thô và dung môi tỷ lệ 1 : 9 và 1 : 12 cho kết quả tốt nhất. Do khi lượng dung môi tăng lên, sự khác biệt về nồng độ cao hơn và sự khuếch tán sẽ tiếp tục cho đến khi đạt đến trạng thái cân bằng mới giá trị cao hơn. Ở trạng thái cân bằng, lượng anthocyanin tiêu thụ trong nguyên liệu sẽ hết, ngay cả khi khối lượng EtOH tăng thì cũng không tăng thêm nữa. Do đó, tỷ lệ nguyên liệu : dung môi 1 : 9 tiết kiệm nhiều hơn về mặt kinh tế.

3.3.3. Nhiệt độ chiết

Các điều kiện chiết:

- Nguyên liệu: m = 10 g, độ ẩm 12,735 %
- Dung môi chiết: 50 % EtOH
- Tỷ lệ dung môi : rắn: 1 : 9
- Thời gian chiết: 30 phút
- Số lần chiết: 2 lần



Hình 9 Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

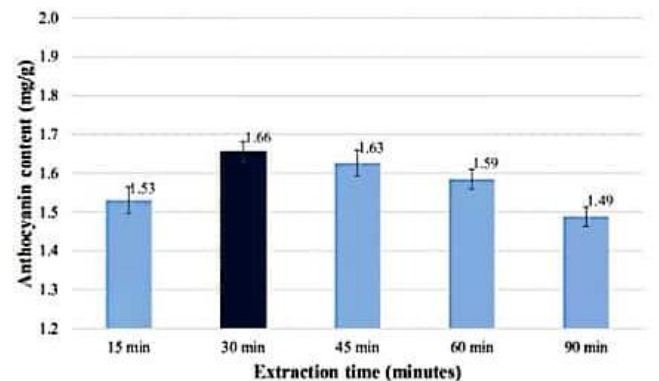
Nhiệt độ được khảo sát từ 30 °C đến 60 °C (Hình 9).

Hàm lượng anthocyanin tăng nhẹ, khoảng 0,13 mg/g và đạt 1,65 mg/g khi nhiệt độ chiết tăng từ 30 °C đến 40 °C. Nhiệt độ tăng sẽ tăng tốc độ chiết xuất anthocyanin, như tăng khả năng hòa tan và khuếch tán, làm giảm độ nhớt của dung dịch, đẩy nhanh quá trình chuyển khối, và cải thiện sự thâm nhập của dung môi vào các tế bào. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng lên 50 °C và 60 °C, hàm lượng anthocyanin giảm dần xuống 1,54 mg/g và 1,47 mg/g tương ứng, do anthocyanin bị phân hủy khi nhiệt độ tăng (Hình 9). Do đó, nhiệt độ tối ưu là 40 °C.

3.3.4. Thời gian chiết

Các điều kiện chiết:

- Nguyên liệu: m = 10 g, độ ẩm 12,735 %
- Dung môi chiết: 50 % EtOH
- Tỷ lệ dung môi : rắn: 1 : 9
- Nhiệt độ chiết: 40 °C
- Số lần chiết xuất: 2 lần



Hình 10 Ảnh hưởng của thời gian chiết

Khảo sát thời gian chiết xuất là từ 15 phút đến 90 phút, có sự biến động nhẹ của hàm lượng anthocyanin trong thời gian khảo sát.

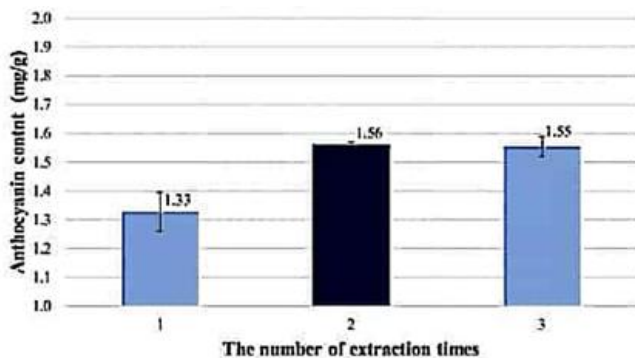
Biểu đồ cho thấy lượng anthocyanin tăng chậm từ 1,59 mg/g đến 1,63 mg/g trong khoảng thời gian 15 phút và 45 phút, và đạt cực đại 1,66 mg/g trong 30 phút. Tuy nhiên, khi thời gian chiết tăng lên, hàm lượng anthocyanin giảm liên tục và đạt mức thấp nhất 1,49 mg/g trong 90 phút

(Hình 10). Nguyên nhân là do anthocyanin sẽ bị phân hủy theo thời gian do các yếu tố của ánh sáng, nhiệt độ... Do đó, chọn thời gian chiết tối ưu là 30 phút.

3.3.5 Số lần chiết xuất

Các điều kiện chiết:

- Nguyên liệu: m = 10 g, độ ẩm 12,735 %
- Dung môi chiết: 50 % EtOH
- Tỷ lệ dung môi/rắn: 1/9
- Nhiệt độ chiết: 40 °C
- Thời gian chiết: 30 phút



Hình 11 Ảnh hưởng của số lần chiết

Số lượng các lần chiết được khảo sát từ 1 đến 3 lần.

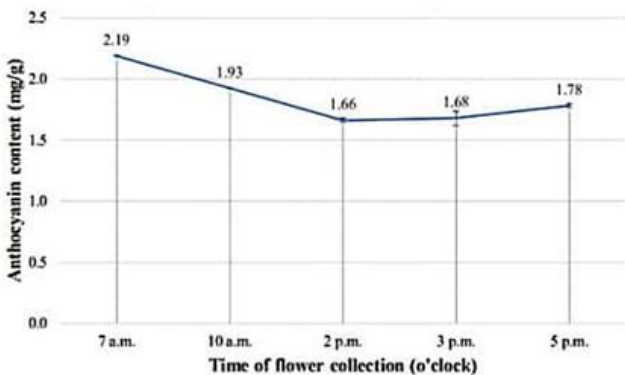
Hàm lượng anthocyanin tăng mạnh trong các thời điểm khác nhau. Vào lần đầu tiên, lượng anthocyanin không được chiết xuất hoàn toàn, chỉ ở mức 1,33 mg/g. Sau đó, tăng lên 1,56 mg/g ở lần thứ hai và không thay đổi ở lần thứ ba vì anthocyanin hòa tan trong nước dẫn đến việc chiết nhanh hơn (Hình 11).

Phần lớn anthocyanin được chiết xuất lần thứ hai. Do đó, chọn hai lần chiết để khảo sát các thí nghiệm khác.

3.3.6. Thời gian thu hoa

Các điều kiện chiết:

- Nguyên liệu: m = 10 g, độ ẩm 12,735 %
- Dung môi chiết: 50 % EtOH
- Tỷ lệ dung môi/rắn: 1/9
- Nhiệt độ chiết: 40 °C
- Thời gian chiết: 30 phút
- Số lần chiết: 2 lần



Hình 12 Ảnh hưởng của thời gian thu hoa

Thời gian thu thập hoa được khảo sát từ 7 giờ sáng đến 17 giờ chiều. Hàm lượng anthocyanin vào buổi sáng nhiều hơn buổi chiều.

Hàm lượng anthocyanin cao nhất vào lúc 7 giờ sáng, khoảng 2,2 mg/g. Sau đó, giảm nhẹ xuống 1,93 mg/g lúc 10 giờ sáng và chạm đáy ở mức 1,66 mg/g vào lúc 2 giờ chiều. Tuy nhiên, vào lúc 3 giờ chiều và 5 giờ chiều, hàm lượng anthocyanin tăng trở lại mức 1,68 mg/g và 1,78 mg/g (Hình 12).

Do đó, những bông hoa được thu thập lúc 7 giờ sáng đã được chọn để chiết xuất tối ưu.

3.4. Đánh giá độ ổn định của dịch chiết và cặn

3.4.1 Đánh giá độ ổn định của dịch chiết

3.4.1.1 Chuẩn bị mẫu

Từ các điều kiện chiết thích hợp, hàm lượng anthocyanin là 76,41 mg/L tương ứng với 2,19 mg anthocyanin/g vật liệu khô. Bắt đầu quá trình bay hơi cho phần chiết. Sau đó, cặn được trộn với nồng độ 0,05 g cặn/10 mL H₂O, ổn định pH bằng acid citric để có kết quả theo Bảng 2:

Bảng 2 pH của mẫu sau khi ổn định bằng acid citric

Tên	Mẫu 0	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
m _{acid citric} (g/L)	0	1	2	3
pH	4,88	2,86	2,58	2,33

pH được điều chỉnh bằng acid citric với nồng độ từ (0 – 3) g/L làm giảm pH của dịch chiết từ 4,48 xuống 2,33 (Bảng 2). Tuy nhiên, do tính acid yếu của acid citric, pH không thể giảm hơn nữa.

Các mẫu được bảo quản ở hai điều kiện khác nhau: nhiệt độ phòng (30 ± 2) °C và tủ ẩm (45 ± 1) °C. Các mẫu được bọc bằng giấy và được bảo quản ở nơi không có ánh sáng.

3.4.2. Đánh giá độ ổn định của dư lượng (cặn)

3.4.2.1. Chuẩn bị mẫu

Các mẫu được ổn định pH bằng acid citric (Xem Bảng 3), dịch chiết được làm bay hơi để khảo sát ở hai nhiệt độ khác nhau: nhiệt độ phòng (30 ± 2) °C và tủ sấy nhiệt độ (45 ± 1) °C.

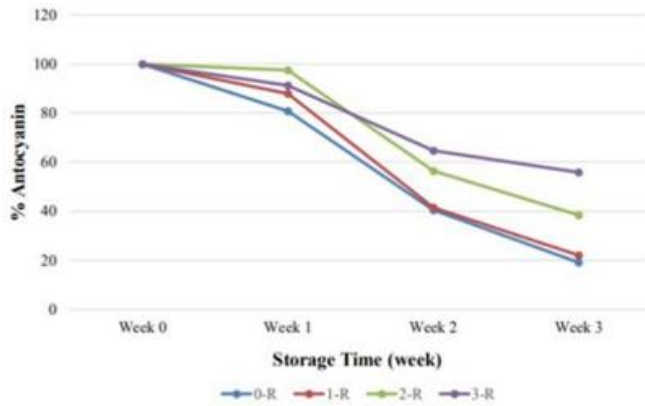
Bảng 3 Năng suất bay hơi của mẫu

	Năng suất bay hơi			
	Mẫu 0	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
Acid citric (mg/L)	0	1	2	3
pH	6,34	4,27	3,81	3,48
Cặn (g)	2,87	3,15	2,66	3,51
Thô/cặn (mg/g)	0,3	0,26	0,28	0,24

Dịch chiết hoa Đậu biếc có lượng đường cao nên sự bay hơi rất khó khăn để lấy cặn khô. Khi đó, khối lượng của cặn giữa các mẫu không tương đồng. Do đó, giá trị của anthocyanin trong tuần đầu tiên sẽ là chuyển đổi thành 100 % để so sánh với các tuần khác.

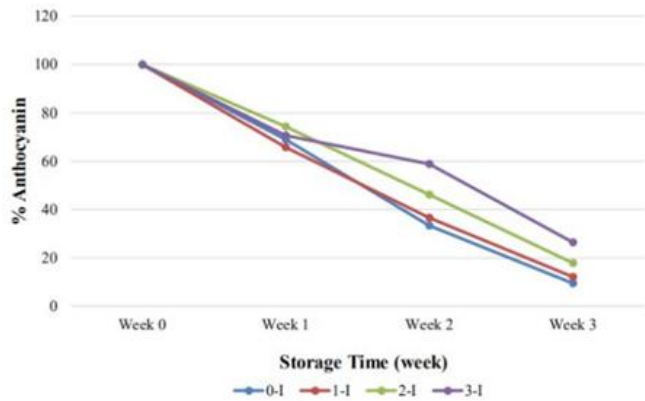
3.4.2.2 Hàm lượng anthocyanin theo thời gian

a. Ở nhiệt độ phòng



Hình 13 Hàm lượng anthocyanin theo thời gian ở nhiệt độ phòng. Sau 3 tuần, hàm lượng anthocyanin ở nhiệt độ phòng giảm đáng kể, mẫu không có acid citric giảm mạnh nhất đến 19%. Khi nồng độ acid citric tăng, hàm lượng anthocyanin ổn định hơn, lượng anthocyanin của mẫu 2 và mẫu 3 chỉ giảm xuống 38% và 55% (Hình 13).

b. Trong tủ ẩm



Hình 14 Hàm lượng anthocyanin theo thời gian ở nhiệt độ 45 °C

Trong thử nghiệm DPPH, kết quả cho thấy chiết xuất từ hoa Đậu biếc có mối quan hệ đáp ứng nồng độ trong hoạt động thử nghiệm DPPH, sử dụng ascorbic acid (vitamin C) như là một biện pháp kiểm soát tích cực. IC_{50} của hoa Đậu biếc là 400 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 16) thấp hơn IC_{50} của Vitamin C khoảng 57 lần. Những kết quả đã chứng minh rằng hoa Đậu biếc được sử dụng trong nghiên cứu này có khả năng chống oxi hóa.

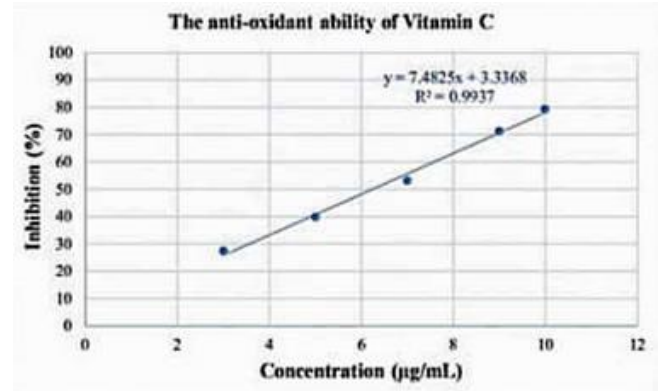
Hoạt tính chống oxi hóa phụ thuộc nhiều vào hàm lượng anthocyanin của hoa, quá trình chín của hoa, thời gian thu hoạch, khí hậu và điều kiện đất đai là những yếu tố quan trọng quyết định các hoạt tính của hoa.

Dữ liệu ở Hình 14 cho thấy acid citric không ảnh hưởng đến độ bền của anthocyanin, hàm lượng anthocyanin của các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ phòng và 45 °C giảm dần. Tỷ lệ này ở 45 °C giảm đáng kể xuống 26% cho mẫu 3 và 20% cho những mẫu khác trong tuần thứ ba (Hình 14). Nhìn chung, sự phân hủy anthocyanin trong tủ ẩm cao hơn

2 lần tại nhiệt độ phòng. Các mẫu 2 và 3 trong cả hai điều kiện ở 30 °C và 45 °C anthocyanin ổn định tốt hơn.

3.5. Đánh giá khả năng chống oxi hóa của dư lượng anthocyanin

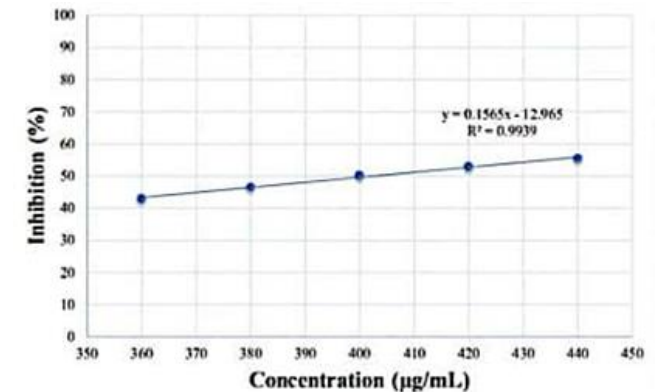
3.5.1. Khả năng chống oxi hóa của vitamin C



Hình 15 Khả năng chống oxi hóa của Vitamin C

Hình 15 cho thấy IC_{50} của vitamin C là khoảng 7 $\mu\text{g/mL}$.

3.5.2. Khả năng chống oxi hóa của anthocyanin



Hình 16 Khả năng chống oxi hóa của anthocyanin

4 Kết luận

Trong thời gian thực hiện, nghiên cứu đã thu được các kết quả:

- Chuẩn bị nguyên liệu và đánh giá các tính chất cơ bản.
- Nghiên cứu các điều kiện chiết tối ưu của sắc tố anthocyanin từ hoa Đậu biếc:
 - Thời gian thu hoa: 7 giờ sáng
 - Dung môi: 50% EtOH
 - Tỷ lệ nguyên liệu : dung môi: 1:9
 - Nhiệt độ chiết: 50 °C
 - Thời gian chiết: 30 phút
 - Số lần chiết: 2 lần.

Lượng anthocyanin đạt được 76,41 mg/L tương ứng với 2,189 mg anthocyanin/g nguyên liệu khô.

3. Đánh giá độ bền của dịch chiết và cặn ở nhiệt độ phòng và 45 °C.

- Nhiệt độ có ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng anthocyanin.

- Phần cặn và dịch chiết có cùng tốc độ thoái hóa anthocyanin và tỉ lệ trùng hợp.
 - Nồng độ acid citric (1 – 3) g/L không ảnh hưởng đến sự phân hóa anthocyanin, ở nhiệt độ phòng ổn định hơn ở 45 °C.
 - 4. Đánh giá hoạt tính chống oxi hóa của cặn hoa Đậu biếc: IC₅₀ của dư lượng là 400 µg/mL và thấp hơn IC₅₀ của vitamin C khoảng 57 lần.
- Từ kết quả nghiên cứu này, chúng tôi đề xuất tiếp tục các khảo sát sau:
- Khảo sát ảnh hưởng của pH đến việc chiết xuất.

- Thực hiện khảo sát trên mô hình thí điểm để xây dựng tính toán mở rộng chính xác mô hình áp dụng vào thực tế sản xuất.
- Nghiên cứu, phát triển và sản xuất một số sản phẩm sử dụng anthocyanin từ hoa Đậu biếc.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2020.01.066/HĐ-NCKH.

Tài liệu tham khảo

1. A. Castaneda-Ovando, M. de Lourdes Pacheco-Hernández, M. E. PáezHernández, J. A. Rodríguez, and C. A. Galán-Vidal, "Chemical studies of anthocyanins: A review", Food chemistry, vol. 113, no. 4, pp. 859-871, 2009.
2. B. Burton-Freeman, A. Sandhu, and I. Edirisinghe, "Anthocyanins", in *Nutraceuticals*: Elsevier, 2016, pp. 489-500.
3. J. Oliveira, N. F. Brás, M. A. da Silva, N. Mateus, A. J. Parola, and V. de Freitas, "Grape anthocyanin oligomerization: A putative mechanism for red color stabilization?", *Phytochemistry*, vol. 105, pp. 178-185, 2014.
4. J. He and M. M. Giusti, "Anthocyanins: natural colorants with health promoting properties", Annual Review of Food Science and Technology, vol. 1, pp. 163-187, 2010.
5. I. Konczak and W. Zhang, "Anthocyanins—more than nature's colours", BioMed Research International, vol. 2004, no. 5, pp. 239-240, 2004.
6. S. M. Gomez and A. Kalamani, "Butterfly pea (*Clitoria ternatea*): A nutritive multipurpose forage legume for the tropics-an overview", Pakistan Journal of Nutrition, vol. 2, no. 6, pp. 374-379, 2003.
7. J. Lee, R. W. Durst, and R. E. Wrolstad, "Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study", Journal of AOAC International, vol. 88, no. 5, pp. 1269-1278, 2005.
8. F. J. Francis and P. C. Markakis, "Food colorants: anthocyanins", Critical Reviews in Food Science & Nutrition, vol. 28, no. 4, pp. 273-314, 1989.
9. W. Brand-Williams, M.-E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", LWT-Food Science and Technology, vol. 28, no. 1, pp. 25-30, 1995.

Extraction and stability of anthocyanin in butterfly pea flower (*Clitoria Ternatea* L.).

Hoang Thi Hong

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

hthong@ntt.edu.vn

Abstract This study was aimed to investigate the extraction and evaluate the durability of anthocyanin from *Clitoria ternatea* L. flower. To maximize the extraction yield, the appropriate extraction conditions were as follows: solvent: EtOH 50 %; material/solvent ratio: 1/9; extraction temperature: 50 °C; extraction time: 30 minutes; number of extraction steps: 2 and CT flower collection time at 7 a.m. Under these conditions, the amount of anthocyanin was 76.41 mg/L corresponding with 2.19 mg anthocyanin/g dried material. The anthocyanin durability of extract and residue was evaluated in two conditions: at room temperature and at 45 °C. It turns out that the temperature had a significant effect on anthocyanins and polymeric anthocyanin, samples with citric acid (1 – 3) g/L were more stable than those without citric acid. In DPPH scavenging assay, the IC₅₀ of *C.ternatea* flower residue was 400 µg/mL (with $y = 0.1565x - 12.965$, $R^2 = 0.9939$) compared to the IC₅₀ of ascorbic acid (7 µg/mL), and that figure of CT flowers was lower than the IC₅₀ of vitamin C by approximately 57 times. These results showed that CT flower has antioxidant potential which provide a basis for the use of the plant and can be harnessed as drug formulation.

Keywords Anthocyanin, *Clitoria ternatea* L. flower, DPPH, IC₅₀

