

TỐI ƯU MỘT SỐ THÔNG SỐ QUÁ TRÌNH TÁCH CHIẾT LIMONENE TRONG VỎ CAM SÀNH TRỒNG TẠI HÀM YÊN – TUYẾN QUANG

Trần Văn Chí*, Lê Thị Nga, Nguyễn Văn Tùng, Vũ Thị Hằng,
Cao Thị Duyên, Lê Thị Phụng, Lưu Hồng Sơn, Tạ Thị Lương
Trường Đại học Nông Lâm - ĐHTN Thái Nguyên

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là khảo sát đơn yếu tố nồng độ NaCl, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu, thời gian chưng cất ảnh hưởng tới quá trình tách chiết limonene trong vỏ cam sành trồng tại Hàm Yên – Tuyên Quang. Kết quả khảo sát tương ứng: 8%; 2,5/1 (v/w); 80 phút. Trên cơ sở khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện chiết tách, chúng tôi nhận thấy nồng độ NaCl, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu, thời gian chưng cất là những yếu tố ảnh hưởng mạnh đến quá trình chiết tách. Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm Box- Behnken đã tìm được điều kiện tối ưu quá trình tách chiết limonene từ vỏ cam sành Hàm Yên ở nồng độ NaCl 7,5%, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu 2,546/1 (v/w), thời gian chưng cất 79,69 phút, hàm lượng limonene là 2,916 g (w/w). Kết quả thực nghiệm cho kết quả có độ tương thích cao với mô hình.

Từ khóa: cam sành, limonene, tách chiết, tối ưu, Box- Behnken

MỞ ĐẦU

Cam sành (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) được trồng ở nhiều tỉnh thành trên cả nước. Đặc biệt là ở Hàm Yên – Tuyên Quang.

Cam sành là một loại quả có múi được sử dụng chủ yếu để ăn tươi và sản xuất đồ uống. Ngoài sử dụng phần múi thì phần vỏ của quả cam chứa một lượng tinh dầu lớn được sử dụng trong nhiều lĩnh vực của đời sống [1]. Trong vỏ cam sành chứa 1,4% tinh dầu và tinh dầu cam sành là một chất lỏng màu vàng nhạt, có huỳnh quang xanh, mùi thơm dễ chịu. Thành phần chủ yếu trong tinh dầu cam là limonene (92,1%), một ít xitrala, các andehyt nonylic và dextylic [2].

Limonene trong vỏ cam có tác dụng trung hòa axit trong dạ dày và duy trì các hoạt động bình thường của ruột. Ngoài ra, nó cũng hỗ trợ các chức năng gan hoạt động bình thường [2], [3]. Limonene chứa trong vỏ cam có tác dụng như thuốc an thần tự nhiên giúp làm dịu các dây thần kinh và mang lại cảm giác ngủ ngon và sâu [4]. Limonene cũng là thành phần quan trọng nhất có vai trò chủ đạo trong chất lượng của tinh dầu vỏ quả và thể hiện tính oxy hóa, kháng nấm và diệt trừ các côn trùng gây bệnh, đặc biệt là muỗi [5].

Việc tách chiết limonene chịu ảnh hưởng bởi dung môi, điều kiện chiết [6]. Vì vậy mục đích của nghiên cứu là nhằm tối ưu hóa quá trình tách chiết limonene tổng số từ vỏ cam sành tại huyện Hàm Yên, tỉnh Tuyên Quang.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Cam sành (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) được thu mua vào tháng 6, 7 tại huyện Hàm Yên, tỉnh Tuyên Quang. Thu mua khi quả tươi, mới thu hoạch, vừa chín tới và có vỏ nhẵn. Sau đó vận chuyển về phòng thí nghiệm. Sau khi đó sẽ bảo quản ở nhiệt độ -20°C đến khi nghiên cứu. Khi sử dụng, dùng tay lột phần vỏ bên ngoài rồi cân chính xác 100 g/ mẫu. Nguyên liệu được tách chiết bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn theo hơi nước và được làm khan bằng Na₂SO₄.

Dung môi: Nước cất.

Bố trí thí nghiệm

Vỏ cam sành Hàm Yên được say nhỏ và ngâm trong muối NaCl 4, 6, 8, 10% trong thời gian 1h, 1,5, 2, 2,5 giờ. Tỷ lệ dung môi: nguyên liệu lần lượt là: 2:1; 2,5:1; 3:1; 3,5:1 (v/w). Thời gian chưng cất là 60, 80, 100, 120 phút. Sau khi tiến hành khảo sát các đơn nhân tố, chúng tôi lựa chọn 03 yếu tố là các yếu tố ảnh hưởng lớn nhất đến hàm lượng limonene

* Tel: 0965 051219

tổng số trong vỏ cam sành Hàm Yên, để đánh giá khả năng ảnh hưởng của chúng, chúng tôi sử dụng phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box – Behnke với ba yếu tố, ba cấp độ.

Xác định hàm lượng limonene tổng số

Quả cam sành được thu hái trên địa bàn tỉnh Tuyên Quang. Chọn những quả tươi, vừa chín tới, vỏ nhẵn, rửa để ráo, bỏ cuống, bóc ruột, gọt lấy phần vỏ xanh phía ngoài. Cân 100 g nguyên liệu sau đó xay nhuyễn trong máy xay sinh tố (kích thước khoảng 2x2 mm) rồi ngâm vào 500 ml muối NaCl 8% trong vòng 2 h. Nguyên liệu sau khi xử lý sơ bộ cho vào bộ chưng cất lôi cuốn hơi nước với tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 2,5/1. Hơi nước bay hơi sẽ lôi cuốn tinh dầu đi lên, ngưng tụ trong sinh hàn và tách lớp tại bộ phận tách tinh dầu. Lượng tinh dầu sau khi chưng cất tiến hành làm khan với Na₂SO₄ khan [7]. Sau khi thu được tinh dầu sẽ tiến hành sắc ký. Limonene được định lượng bằng cách sử dụng metanol tuyệt đối làm tiêu chuẩn bên ngoài, tách trên cột C18 (4,6 mm × 250 mm, 5 μm) bằng metanol- nước (75:25, V / V) là pha động ở tốc độ dòng chảy là 1,0 ml/ phút. Bước sóng phát hiện tia cực tím được đặt ở 200 nm và nhiệt độ cột là 25°C trong HPLC [8].

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm xử lý số liệu SPSS 18.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl

Từ kết quả bảng 1 cho thấy khi chiết ở nồng độ NaCl khác nhau thì sẽ cho hàm lượng limonene khác nhau và hàm lượng limonene bắt đầu tăng lên khi chiết ở nồng độ NaCl từ 4% đến 8%. Hàm lượng limonene đạt cao nhất tại nồng độ muối NaCl 8% tương ứng với hàm lượng limonene 1,79 g. Tiếp tục tăng nồng độ muối NaCl lên 10% thì hàm lượng limonene không tăng mà còn bị giảm. Do vậy, nồng độ muối NaCl 8% là thích hợp nhất để thực hiện quá trình tách chiết limonene từ vỏ cam sành Hàm Yên.

Bảng 1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến hàm lượng limonene của vỏ cam sành Hàm Yên

CT	Nồng độ (%)	Hàm lượng limonene (g/100 g)
CT1	4	1,34 ^c
CT2	6	1,52 ^b
CT3	8	1,79 ^a
CT4	10	0,95 ^d

Ghi chú: Trên cùng 1 cột các giá trị mang cùng chữ số mũ thì khác nhau không có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$

Ảnh hưởng của thời gian ngâm

Từ bảng 2 ta thấy thời gian ngâm muối NaCl có ảnh hưởng đến quá trình chiết tách limonene từ nguyên liệu vỏ cam sành Hàm Yên. Ta nhận thấy hàm lượng limonene tăng khi tăng thời gian chiết từ 1 h đến 2,5 h, ở thời gian ngâm 2 h và 2,5 h có sự sai khác không có ý nghĩa thống kê, vì vậy chúng tôi chọn thời gian ngâm thích hợp là 2 h.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian ngâm

CT	Thời gian ngâm (giờ)	Hàm lượng limonene (g/100 g)
CT1	1 h	1,97 ^c
CT2	1,5 h	2,16 ^b
CT3	2 h	2,32 ^a
CT4	2,5 h	2,33 ^a

Ghi chú: Trên cùng 1 cột các giá trị mang cùng chữ số mũ thì khác nhau không có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$

Ảnh hưởng thời gian chưng cất

Từ kết quả bảng 3 cho thấy thời gian chưng cất là yếu tố ảnh hưởng tới hàm lượng limonene tổng thu được sau quá trình chiết. Từ bảng 3 ta có thể thấy hàm lượng limonene tăng đều khi chúng ta tăng thời gian từ 60 phút đến 80 phút. Hàm lượng tăng cao từ 2,38 g lên 2,51 g. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng thời gian lên 100 phút thì hàm lượng limonene có xu hướng giảm. Tiếp tục tăng thời gian chưng cất lên 120 phút thì hàm lượng limonene tiếp tục giảm. Hàm lượng limonene thu được cao nhất khi chưng cất trong vòng 80 phút. Vì vậy thời gian chưng cất thích hợp là 80 phút.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian chưng cất

CT	Thời gian (phút)	Hàm lượng limonene (g/100 g)
CT1	60	2,38 ^c
CT2	80	2,51 ^a
CT3	100	2,40 ^b
CT4	120	2,37 ^c

Ghi chú: Trên cùng 1 cột các giá trị mang cùng chữ số mũ thì khác nhau không có ý nghĩa ở mức $\alpha=0,05$

Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu

Từ bảng 4 cho thấy tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu có ảnh hưởng tới hàm lượng limonene trong vỏ cam sành Hàm Yên. Hàm lượng limonene trong dịch chiết tăng lên khi tỷ lệ: Dung môi/ nguyên liệu tăng. Đạt hàm lượng limonene cao nhất 2,93 g ở tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 2,5/1 và 3/1. Tuy nhiên hàm lượng limonene ở công thức tỷ lệ 3/1 sự sai khác không có ý nghĩa thống kê. Vì vậy chúng tôi chọn tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu thích hợp là 2,5/1 để tiết kiệm dung môi.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu

CT	Tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu (ml/g)	Hàm lượng limonene (g/100g)
CT1	2/1	2,65 ^b
CT2	2,5/1	2,93 ^a
CT3	3/1	2,93 ^a
CT4	3,5/1	2,88 ^a

Tối ưu hóa quá trình tách chiết

Chúng tôi sử dụng phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box-Behnken với ba biến ba cấp độ. Các số liệu thu được từ dịch chiết vỏ cam sành Hàm Yên được xử lý trên phần mềm Design- Expert 7.0 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, USA) ANOVA

Để đánh giá mô hình chúng tôi sử dụng phân tích ANOVA. Kết quả phân tích ANOVA được thể hiện qua bảng sau:

Bảng 6. Phân tích phương sai ANOVA của mô hình chiết limonene từ vỏ cam sành Hàm yên

Nguồn	SS	DF	MS	Chuẩn F	Giá trị p
Model	3,08	9	0,43	92,76	< 0,0001
A	0,088	1	0,088	23,91	0,0018
B	0,021	1	0,021	5,70	0,0484
C	0,050	1	0,050	13,45	0,0080
AB	0,012	1	0,012	3,28	0,0130
AC	0,073	1	0,073	19,76	0,0030
BC	6,250E-004	1	6,250E-004	0,17	0,0692

được dùng để đánh giá kết quả thu được. Tiến hành giải bài toán tối ưu theo phương pháp “hàm mong đợi”. Sử dụng phần mềm Design-Expert 7.0 để tiến hành tối ưu hóa nhằm xác định được giá trị của ba yếu tố mà tại đó hàm lượng limonene là cao nhất. Áp dụng phương pháp phân tích hồi quy các số liệu thực nghiệm, thu được mô hình đa thức bậc hai thể hiện hàm lượng limonene:

$$Y = +2,93 - 0,10*A + 0,051*B - 0,079*C + 0,055*A*B - 0,14*A*C - 0,013*B*C - 0,19A^2 - 0,21*B^2 - 0,74*C^2$$

Trong đó Y là hàm lượng Limonene trong dịch chiết dự báo thu được.

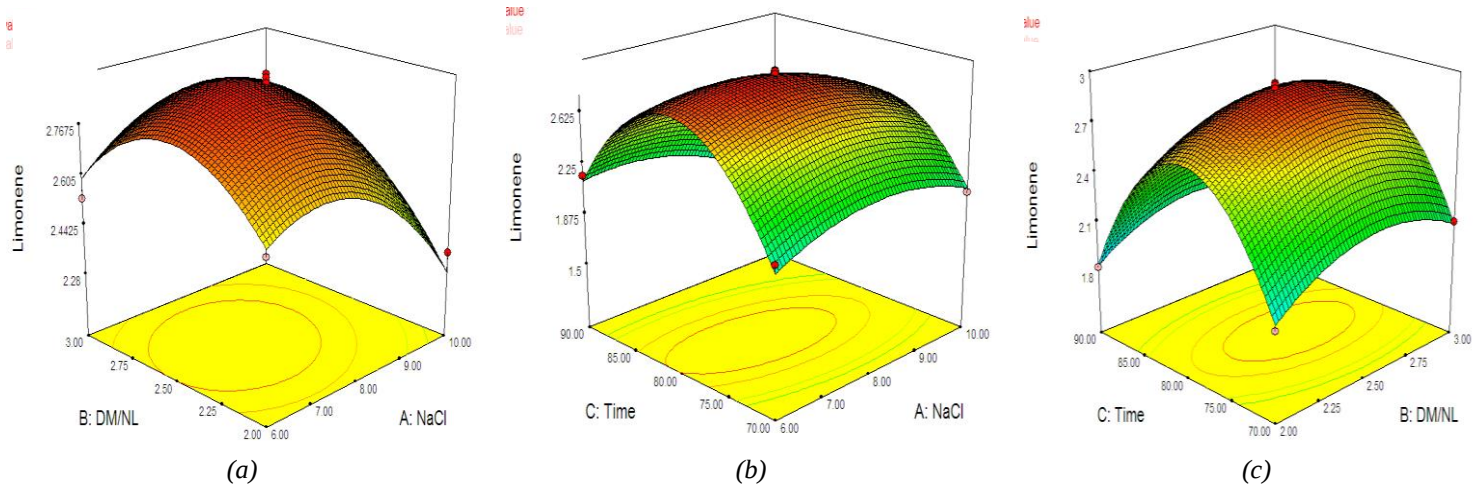
Bảng 5. Ma trận thực nghiệm Box- Behnken ba yếu tố chiết limonene từ vỏ cam sành Hàm Yên

TN	Biến thực			Hàm lượng limonene (g/100g)
	A (nồng độ muối NaCl)	B (dung môi/ nguyên liệu)	C (thời gian chưng cất)	
1	6	2/1	80	2,58
2	10	2/1	80	2,35
3	6	3/1	80	2,53
4	10	3/1	80	2,52
5	6	2,5/1	70	2,07
6	10	2,5/1	70	2,04
7	6	2,5/1	90	2,16
8	10	2,5/1	90	1,59
9	8	2/1	70	1,93
10	8	3/1	70	2,1
11	8	2/1	90	1,82
12	8	3/1	90	1,94
13	8	2,5/1	80	2,91
14	8	2,5/1	80	2,84
15	8	2,5/1	80	2,93
16	8	2,5/1	80	2,92
17	8	2,5/1	80	2,9

A^2	0,16	1	0,16	42,84	0,0003
B^2	0,19	1	0,19	50,93	0,0002
C^2	2,31	1	2,31	627,08	< 0,0001
Residual	0,026	7	3,689E-003		
Lack of Fit	0,021	3	6,942E-003	5,55	0,1002
Sai số (pure error)	5,000E-003	4	1,250E-003		
SS tổng Số	3,11	16			

SS: Tổng phương sai; DF: Bậc tự do; MS: Trung bình phương sai; chuẩn F: Chuẩn Fisher; Residual: Phần dư; "Lack of Fit": Chuẩn đánh giá độ không tương thích của mô hình với thực nghiệm.

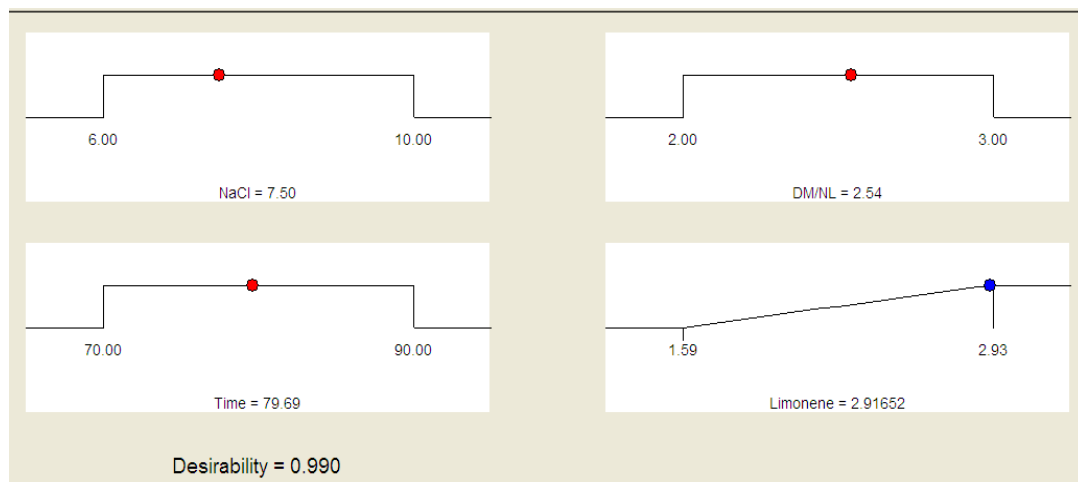
Từ kết quả phân tích ANOVA ta thấy giá trị xác suất của mô hình P-value = 0,0001 < 0,05 do đó mô hình được lựa chọn để giải thích cho kết quả của thí nghiệm, Lack of fit test = 0,1002 (not significant) có ý nghĩa đối với mô hình.



Hình 1. Bề mặt đáp ứng hàm lượng limonene

- a. Mô hình tương tác giữa tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu và nồng độ NaCl;
- b. Mô hình tương tác giữa thời gian chưng cất và nồng độ NaCl;
- c. Mô hình tương tác giữa thời gian chưng cất và tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu

Phương án tốt nhất được dự đoán nồng độ muối NaCl 7,5%, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 2,54/1 (v/w), thời gian chưng cất 79,69 phút khi đó hàm lượng limonene đạt 2,916 g. Kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm cho kết quả tương ứng.



Hình 2. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu ở hàm lượng limonene

KẾT LUẬN

Chúng tôi sử dụng phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box-Behnken với ba biến ba cấp độ cho phương án tốt nhất được dự đoán nồng độ muối NaCl 7,5%, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu 2,54/1 (v/w), thời gian chưng cất 79,69 phút khi đó hàm lượng limonene đạt 2,196 g/100 g. Kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm có độ tương thích cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Lợi (2014), “Nghiên cứu thành phần và hoạt tính sinh học của tinh dầu lá bưởi, cam và chanh”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - ĐH Bách khoa Hà Nội*, 52 (A5), tr. 1-6.
2. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Y học.
3. Đỗ Huy Bích, (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nxb Khoa học kỹ thuật Hà Nội.
4. Phạm Như Quỳnh (2014), “Tinh dầu citrus và tiềm năng khai thác ở Nghệ An”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - ĐH Vinh*, 12, tr. 28- 30.
5. Nguyễn Ngọc Thanh (2010), *Nghiên cứu tách chiết limonene và một số chất dẫn xuất từ thực vật Việt Nam sử dụng trong lĩnh vực sát trùng gia dụng (phòng trừ côn trùng y tế)*, Đề tài cấp bộ, Viện hóa học Công nghiệp Việt Nam.
6. Nguyễn Năng Vinh (1978), *Kỹ thuật khai thác và sơ chế tinh dầu*, Nxb Nông nghiệp.
7. Lê Thị Thanh Xuân, Nguyễn Minh Thảo (2015), “Xác định thành phần hóa học tinh dầu vỏ quả chanh ở Đồng Tháp”, *Tạp chí Khoa học – Trường ĐH An Giang*, 3, tr. 18- 22.
8. ZHANG Rui-lun, et al. (2012), “Determination of limonene content in the oil by HPLC method”, *Anhui Agricultural Science Journal*, 2, pp. 3- 6.

SUMMARY

STUDY OF THE OPTIMAL SEPARATION OF LIMONENE FROM THE PEEL OF CITRUS RELICULATA IN HAM YEN – TUYEN QUANG

Tran Van Chi*, Le Thi Nga, Nguyen Van Tung, Vu Thi Hang, Cao Thi Duyen, Le Thi Phuong, Luu Hong Son, Ta Thi Luong
TNU - University of Agriculture and Forestry

The purpose of this study was to investigate the single NaCl concentration, the solvent /material ratio and the distillation time which affected the extraction process in the orange peel grown in Ham Yen- Tuyen Quang. The corresponding survey results: 8%; 2.5 / 1 (v / w); 80 minutes. On the basis of the factors affecting the extraction conditions, we found that the concentration of NaCl, solvent/material ratio and distillation time strongly influence the extraction process. Application of Box-Behnken design found the optimal conditions for the limonene extraction process from *Citrus reliculata* with concentration of NaCl of 7.5%, solvent/ material ratio 2.546/1 (v/ w), distillation time 79.69 minutes, limonene of 2.916 gr (w/w). Experimental results showed high degree of compatibility with the model.

Keywords: *Citrus reliculata*, Limonene, extraction, optimize, Box-Behnken

Ngày nhận bài: 20/8/2018; **Ngày phản biện:** 17/9/2018; **Ngày duyệt đăng:** 31/10/2018

* Tel: 0965 051219