

CHIẾT TÁCH AXIT (-)-HYDROXY CITRIC TỪ VỎ QUẢ BỨA BẰNG VI SÓNG

Đến Tòa soạn 01-9-2009

ĐẶNG QUANG VINH¹, ĐÀO HÙNG CUỒNG¹, NGUYỄN THUỜNG², HUỲNH SANG¹

¹Trường Đại học sư phạm-Đại học Đà Nẵng

²Trường Đại học Duy Tân

ABSTRACT

Surveys on the process of extracting acid from dried rinds of *Garcinia oblongifolia* Champ. ex Benth using microwave in terms of time, machine power and solid/liquid rate, have resulted in such findings as: the best time allocation for extracting is 25 minutes; machine power works best at level 2 (microwave power is 400W); suitable rate of solid/liquid is 0.071 (approximately 150 ml solvent per 10 g of sample). The total amounts acid and (-)-hydroxycitric acid extracted from 100g dried rinds of *Garcinia oblongifolia* Champ. ex Benth are 18.592 g and 10.137 g, respectively. This is the first finding on extraction of (-)-HCA from dried rinds of *Garcinia oblongifolia* Champ. ex Benth using microwave.

Keywords: *Garcinia oblongifolia*, (-)-hydroxycitric acid, microwave.

I - MỞ ĐẦU

Axit (-)-hydroxy citric (HCA) là một thành phần chủ yếu trong lá, vỏ quả bứa [2], *G. Cowa* [1], *G. cambogia* [3, 7], *G. indica* [4], □ các loại cây này được trồng khá phổ biến ở vùng Đông Nam á, ấn Độ để lấy quả làm gia vị. HCA có tác dụng ngăn chặn quá trình tích mỡ và cải thiện balance mỡ máu. HCA sẽ kìm hãm quá trình chuyển hóa lượng đường thừa trong cơ thể thành mỡ, giúp ngăn chặn quá trình béo phì, đặc biệt là đối với những người dư cân có chế độ ăn quá nhiều bột đường. Không những giúp giảm cân, HCA còn cải thiện giảm các loại mỡ có hại cho sức khỏe như tryglycerid, LDL cholesterol, cholesterol toàn phần và tăng HDL cholesterol là loại mỡ có tác dụng bảo vệ thành mạch. HCA làm gia tăng quá trình tổng hợp glycogen và tăng độ oxy hóa, đốt cháy mỡ thừa. ở người dùng HCA, lượng đường thừa trong cơ thể sẽ không chuyển sang dạng mỡ dự trữ mà sẽ được tổng hợp thành glycogen dự trữ tại gan và cơ.

Khi mức glycogen bão hòa, dưới tác dụng của hydroxy citric axit, lượng đường thừa này sẽ kích hoạt quá trình chuyển axit béo vào tế bào để đốt cháy tạo thành năng lượng cho tế bào, làm giảm lượng mỡ thừa dự trữ trong cơ thể [5, 6, 8, 9]. Các sản phẩm chiết xuất từ cây bứa dùng để giảm cân được bán trên thị trường hiện nay khá phổ biến.

Các phương pháp chiết xuất (-)-HCA hiện nay thường được sử dụng là phương pháp chiết Soxhlet và chưng cất trong nồi áp suất, thường tốn thời gian và sử dụng nhiệt độ cao để làm chuyển hoá (-)-HCA thành dạng lacton của nó làm mất khả năng hoạt tính sinh học. Ngày nay, năng lượng vi sóng với tính thông dụng, dễ áp dụng và dễ đạt công suất theo yêu cầu rất đáng được quan tâm. Việc nghiên cứu một phương pháp chiết xuất mới trên cơ sở năng lượng vi sóng là rất cần thiết, giúp xây dựng một quy trình hoàn chỉnh để chiết xuất axit (-)-hydroxy citric từ lá, vỏ quả bứa.

Bài báo này trình bày quy trình chiết xuất axit (-)-hydroxy xitric từ vỏ quả bứa bằng năng lượng vi sóng và các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất của quy trình.

II - NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu và hóa chất

Vỏ quả của cây bứa dùng làm nguyên liệu được thu hái tại xã Hòa Liên, huyện Hòa Vang, Thành phố Đà Nẵng. Tất cả các dung môi và hóa chất sử dụng cho máy sắc ký lỏng cao áp được cung cấp bởi hãng Merck. Chất chuẩn là (-)-Calcium threo-hydroxycitrate tribasic hydrate, BioChemika, *Garcinia cambogia* Extract, ~19,5% as Ca, cung cấp bởi hãng Sigma-Aldrich, công thức $C_{12}H_{10}Ca_3O_{16}.xH_2O$, khối lượng phân tử 530,43, axit threo-hydroxycitric 67,3%. Sử dụng nước cất để chiết axit hữu cơ và nước cất 02 lần cất dùng cho HPLC, metanol loại dùng cho sắc ký, H_3PO_4 loại PA.

2. Hệ thống chiết xuất bằng vi sóng

Hệ thống chiết bằng vi sóng bao gồm lò vi sóng và bình cầu 1000 ml có gắn sinh hàn. Lò vi sóng của hãng Sanyo seri EM-S1057 với các thông số kỹ thuật như sau: công suất tối đa: 700 W; thể tích lò 17 lít; kích thước bên ngoài 458 × 365 × 295 mm; khối lượng 13,7 kg; nguồn điện 220 V, 50 Hz; lò có 05 cấp độ máy tương ứng với 05 mức phát năng lượng vi sóng có các công suất khác nhau, cụ thể: MICRO 1 (80W), MICRO 2 (400 W), MICRO 3 (500 W), MICRO 4 (650 W), MICRO 5 (800 W), có nút điều chỉnh thời gian và cấp độ máy. Thời gian tối đa cho một lần hoạt động của lò là 60 phút [10].

3. Máy sắc ký lỏng cao áp và điều kiện sắc ký

Hệ thống sắc ký lỏng cao áp được sử dụng để nghiên cứu gồm máy sắc ký lỏng cao áp hãng Merck Hitachi D7000 trang bị với bơm loại D7100 hãng Merck Hitachi, và lắp cột sắc ký Lichrospher RP18 5 μm × 4,6 mm × 250 mm. Quá trình dò được thực hiện bằng detector D7240 Autosampler D7200, phần mềm Multi — HSM manager. Pha động là dung dịch axit photphoric 0,1% với tốc độ dòng 1,0 ml/phút.

Chất chuẩn và mẫu được lọc qua màng lọc 0,45 μm và tiêm vào HPLC.

4. Chuẩn bị dung dịch chuẩn và xây dựng đường chuẩn

Chuẩn bị HCA tự do: Calcium threo-hydroxycitrat tribasic hydrate (15 mg) cho vào cốc 50 ml chứa 5,0 ml nước, và xử lý với 500 mg Dowex 50 $[H^+]$. Hỗn hợp được khuấy trong thời gian 10 phút sử dụng khuấy từ. Tách lấy phần dung dịch, và nhựa trao đổi ion được rửa với nước có pH trung tính. Nước rửa và dung dịch được trộn lẫn và làm thành 50 ml, khuấy trộn, và lọc sử dụng giấy lọc.

Xây dựng đường chuẩn: Phương pháp xây dựng đường chuẩn được thực hiện bằng cách dựa vào kết quả phân tích một chuỗi các mẫu HCA chuẩn. Năm mẫu dung dịch chuẩn chứa lần lượt là 37,28; 49,70; 62,13; 14,55 và 86,79 ppm HCA tự do được tiêm vào HPLC, điều kiện sắc ký như nêu ở trên, và kết quả thu được các diện tích pic. Đường cong HCA được vẽ dựa trên biểu diễn sự phụ thuộc giữa nồng độ của HCA và diện tích pic (trung bình của 03 lần chạy).

Khoảng nồng độ mẫu chuẩn cần để xây dựng đường chuẩn được xác định dựa vào nồng độ thực của HCA có trong mẫu. Khoảng nồng độ này tính từ giá trị giới hạn dưới (LLOQ) đến giá trị giới hạn trên (ULOQ).

5. Quy trình chiết xuất bằng năng lượng vi sóng

Vỏ quả bứa khô: Quả bứa sau khi rửa sạch, hong khô, sau đó bỏ quả để loại bỏ ruột và hạt. Vỏ quả được cắt nhỏ, sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 70 - 80°C thời gian 36 giờ đến khi vỏ quả khô hoàn toàn, xay thành bột mịn và sử dụng để chiết axit hữu cơ.

Cân khoảng 10 g mẫu vỏ khô, cho vào bình cầu 1000 ml với thể tích A nước cất. Cho bình cầu vào hệ thống chiết bằng vi sóng trong thời gian B và với cấp độ máy là C. Sau khi hết thời gian, máy tự động báo chuông. Dùng vải lọc muslin để lọc dung dịch trong bình cầu, thu được dịch chiết. Dịch chiết có màu đỏ, đục. Trộn lẫn dung dịch chiết với 4 gram than hoạt tính và ngâm trong nước ấm 30 phút. Sau đó,

tiến hành lọc dịch chiết bằng phễu buchne và giấy lọc, than hoạt tính được rửa lại 2 lần, mỗi lần 10 ml nước cất. Dịch chiết sau khi xử lý bằng than hoạt tính có màu vàng nhạt. Trộn lẫn dịch chiết và dung dịch nước rửa, cô đặc đến 50 ml, xử lý với 100 ml etanol, để trong vòng 30 phút để kết tủa hết pectin (kết tủa màu trắng sữa). Lọc chân không để tách riêng phần dịch nổi và kết tủa. Phần kết tủa rửa 2 lần với 20 ml etanol và lọc để thu hồi axit. Trộn các dịch nổi, cô đặc và thêm nước cất để chuẩn đến 100 ml. Tiến hành chuẩn độ axit-bazơ để xác định hàm lượng axit tổng có trong mẫu. Phần mẫu sau khi chuẩn độ còn lại được lưu giữ ở 4°C đến khi sử dụng cho HPLC để xác định HCA.

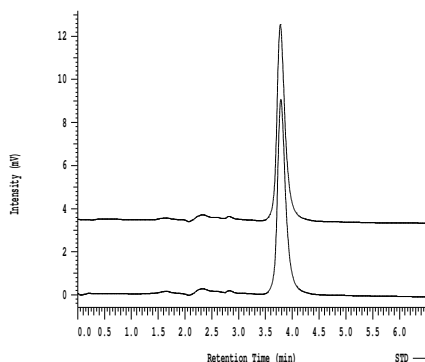
Thực hiện lại nhiều lần thí nghiệm trên bằng cách thay đổi các tham số A, B, C để khảo sát hiệu suất của quá trình chiết xuất theo thời gian chiết, cấp độ máy và tỷ lệ rắn/lỏng.

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả xây dựng đường chuẩn và xác định (-)-HCA bằng HPLC

Đường chuẩn được xác định bằng cách thay đổi nồng độ của 05 mẫu chuẩn, với nồng độ lần lượt là 37,28; 49,70; 62,13; 14,55 và 86,79 ppm, phương trình đường chuẩn: $y = 14971x - 9212,4$ với y là diện tích pic của HCA, x là nồng độ HCA, hệ số tương quan $R^2 = 0,9997$.

Thành phần axit hữu cơ xác định bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp và phương pháp

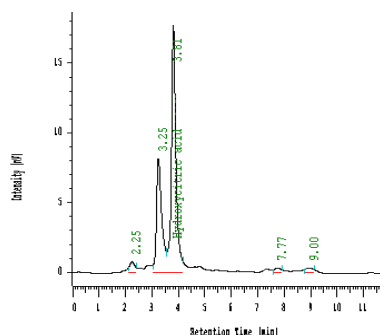


Hình 1: Sắc kí đồ mẫu axit HCA chuẩn

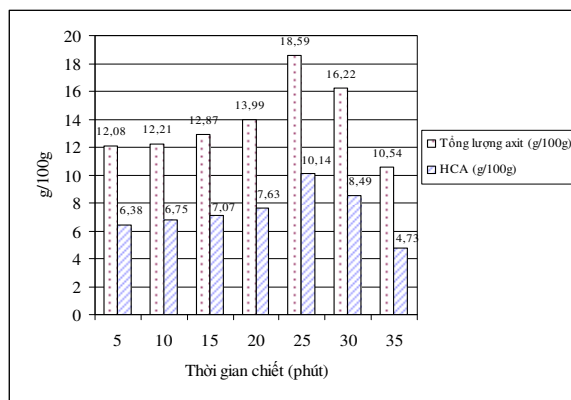
chuẩn độ được thể hiện trong biểu đồ hình 3, 4 và 5. Tổng lượng axit xác định bằng phương pháp chuẩn độ axit-bazơ có kết quả lớn hơn lượng (-)-HCA xác định bằng HPLC. Giá trị thu được chủ yếu của phương pháp HPLC được tính đến chỉ là HCA, bởi vì giá trị thu được từ diện tích pic của HCA lớn nhất. Axit chủ yếu được tìm thấy trong vỏ quả bưởi chiết bằng năng lượng vi sóng bằng HPLC là (-)-HCA, được thể hiện trên sắc kí đồ hình 2. Trên sắc kí đồ, HCA cho pic đơn trong tất cả các mẫu chiết. Xác định pic HCA dựa vào pic của axit HCA chuẩn xuất hiện ở thời gian lưu là 3,802 phút (hình 1). Thời gian lưu của HCA được tìm thấy trong tất cả các mẫu là $3,82 \pm 0,01$ phút.

2. Kết quả chiết xuất theo thời gian

Tổng lượng axit và (-)-HCA chiết tách được từ vỏ quả bưởi bằng năng lượng vi sóng tăng theo thời gian được thể hiện tại biểu đồ hình 3. Theo biểu đồ hình 3, tổng lượng axit và (-)-HCA tăng theo thời gian chiết đến thời gian là 25 phút đạt giá trị lớn nhất (tổng lượng axit 18,592 g/100g và HCA 10,137g/100g) và tiếp tục tăng thời gian chiết thì tổng lượng axit giảm dần. Điều này có thể được giải thích như sau: khi thời gian chiết tách tăng thì thời gian tiếp xúc giữa dung môi là nước và vỏ quả bưởi tăng lên nên lượng axit được chiết tách tăng lên. Tuy nhiên, khi lượng axit đã được chiết tách ra hết vỏ quả bưởi mà thời gian chiết tách vẫn còn thì lượng axit được chiết tách có nguy cơ bị biến tính bởi năng lượng vi sóng, nên lượng axit giảm dần.



Hình 2: Sắc kí đồ mẫu vỏ quả bưởi khô chiết trong nước bằng năng lượng vi sóng

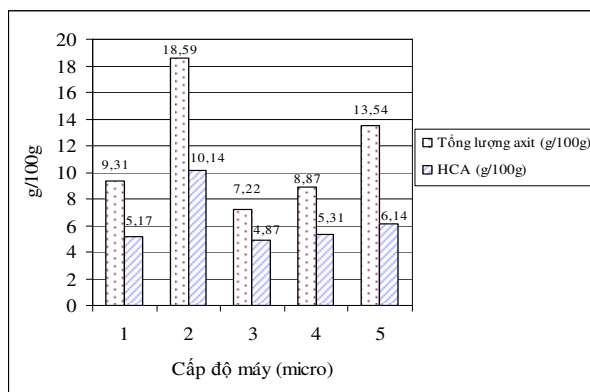


Hình 3: Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của tổng lượng axit và lượng (-)-HCA vào thời gian chiết

3. Kết quả chiết xuất theo cấp độ máy

Tổng lượng axit và (-)-HCA chiết tách được từ vỏ quả bứa bằng năng lượng vi sóng tăng theo cấp độ máy (cường độ vi sóng) được thể hiện ở biểu đồ hình 4. Khi tăng công suất của năng lượng vi sóng hay tăng cấp độ máy thì tổng lượng axit và (-)-HCA tăng, khi tiếp tục tăng cấp độ máy lên micro 3, 4, 5 thì lượng axit chiết được có xu hướng giảm dần hay thay đổi không đáng kể. Điều này có thể được giải thích như

sau: khi ở cấp độ thấp thì công suất của máy cung cấp năng lượng vi sóng ít nên lượng axit được chiết tách ra ít. Khi tăng công suất năng lượng vi sóng của máy, tức là tăng cấp độ máy thì lượng axit được chiết tách ra nhiều hơn. Tuy nhiên, khi năng lượng vi sóng quá lớn thì có thể gây biến tính lượng axit đã được chiết tách ra nên làm cho lượng axit cuối cùng thu được giảm dần hay biến đổi không đáng kể. Mức năng lượng thích hợp là tương ứng với cấp độ micro 2 (400 W) của máy.



Hình 4: Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của tổng lượng axit và lượng (-)-HCA vào cấp độ máy

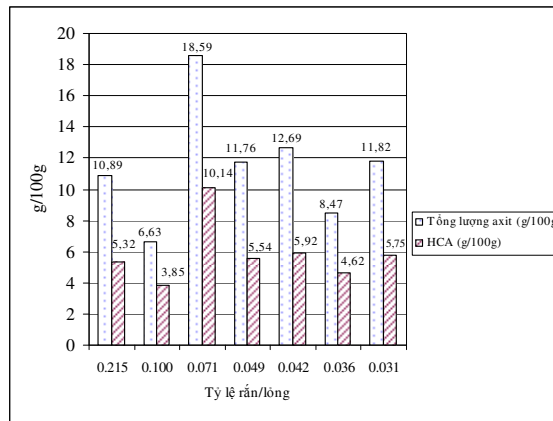
4. Kết quả chiết xuất theo tỷ lệ rắn lỏng

Tổng lượng axit và (-)-HCA chiết tách được từ vỏ quả bứa bằng năng lượng vi sóng theo tỷ lệ

rắn lỏng được thể hiện ở biểu đồ hình 5. Khi tăng tỷ lệ dung môi hay giảm theo tỷ lệ rắn lỏng thì tổng lượng axit và (-)-HCA chiết tách tăng dần, khi tỷ lệ rắn/lỏng đạt 0,071 thì lượng axit

đạt lớn nhất và nếu tiếp tục tăng lượng dung môi (giảm tỷ lệ rắn/lỏng) thì lượng axit và (-)-HCA giảm và thay đổi không đáng kể. Điều này có thể được giải thích như sau: khi tăng lượng dung môi chiết tách trên một khối lượng chất rắn được chiết tách thì chúng ta tăng khả năng hòa tan của axit được chiết tách từ pha rắn sang pha lỏng nên lượng axit thu được tăng lên. Tuy nhiên, vì thời gian chiết (15 phút) và công suất

vi sóng (400W) là cố định do đó năng lượng vi sóng cung cấp cho dịch chiết (mẫu) là không đổi, vì vậy khi tăng lượng dung môi lên thì lúc đầu lượng axit chiết được sẽ tăng và sau đó giảm là do khi tăng lượng dung môi chiết thì thời gian sôi của dịch chiết dài hơn, lượng axit chiết ra do chuyển động nhiệt sẽ giảm. Tỷ lệ rắn lỏng cho kết quả cao nhất là 0,071, tức là khoảng 150 ml dung môi cho khoảng 10 g vỏ bứa khô.



Hình 5: Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của tổng lượng axit và lượng (-)-HCA vào tỷ lệ rắn lỏng

IV - KẾT LUẬN

Bằng phương pháp chiết tách sử dụng năng lượng vi sóng đã chiết tách được axit (-)-hydroxy citric từ vỏ quả bứa khô. Kết quả khảo sát quá trình chiết tách axit hydroxyl citric từ vỏ quả bứa khô bằng phương pháp sử dụng năng lượng vi sóng theo thời gian, cấp độ máy và tỷ lệ rắn lỏng cho thấy: Thời gian chiết suất hiệu quả nhất là 25 phút; Cấp độ máy thích hợp là cấp 2 (năng lượng vi sóng 400W); Tỷ lệ rắn lỏng thích hợp là: 0,071 (tương đương 150 ml dung môi cho khoảng 10 g chất rắn); Tổng lượng axit và axit (-)- HCA chiết được lần lượt là 18,592 g/100 g mẫu vỏ quả khô và 10,137 g/100 g mẫu vỏ quả khô.

Từ kết quả nghiên cứu này, có thể khẳng định năng lượng vi sóng có thể sử dụng để chiết tách (-)-HCA từ nguyên liệu vỏ quả bứa khô để làm các sản phẩm giảm cân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bhabani S. Jena, Guddadarangavvanahally. Jayaprakasha, Kunnumpurath K. Sakariah. Journal of Agricultural and Food chemistry, 50(12), 3431 - 3434 (2002).
2. Đào Hùng Cường, Đặng Quang Vinh. Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng, 3 (20), 137 - 143 (2007).
3. G. K. Jayaprakasha, K. K. Sakariah. Journal of Chromatography A, 806(2), 337 - 339 (1998).
4. G. K. Jayaprakasha, K. K. Sakariah. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 28(2), 379 - 384 (2002).
5. B. S. Jena, G. K. Jayaprakasha, R. P. Singh, K. K. Sakariah. Journal of Agricultural and Food chemistry, 50(1), 10 - 22 (2002).
6. Kriketos AD, Thompson HR, Greene H, Hill JO. Int J Obes Relat Metab Disord

- 23(8) (1999).
7. Y. S. Lewis, S. Neelakantan. *Phytochemistry*, 4, 619 - 625 (1965).
 8. Y. S. Lewis. Isolation and properties of hydroxycitric acid, In *Methods in Enzymology*; Colowick, S. P., Kaplan, N. O., Eds. Academic Press: New York, 13, 613 - 619 (1969).
 9. J. M. Lowenstein. *The Journal of Biological Chemistry*, 246(3), 629 - 632 (1971).
 10. *Microwave Oven User Guide*, Seri EM-S1057, Sanyo Electric Co., LTD