**Một số phương pháp hiện đại chiết tách, thu hồi và định lượng chất chống oxi hóa trong trà xanh**

**I. Giới thiệu chung**

Trà xanh là sản phẩm lâu đời được người dân Việt Nam sử dụng. Hiện nay cây trà được trồng chủ yếu ở vùng trung du Bắc Bộ như Thái Nguyên, Phú Thọ… Sở dĩ trà xanh được biết đến nhiều chính là thành phần chất chống oxi hóa. Chất chống oxi hóa trong trà xanh là polyphenol trong đó đặc biệt là Epigallocatechin gallate (EGCG). Quá trình oxy hóa của cơ thể là tác nhân chính gây ra nhiều loại ung thư khác nhau. Do đó, chất chống oxy hóa trong trà xanh sẽ giúp làm giảm nguy cơ mắc căn bệnh này. EGCG, caffein và L-theanine đều giúp cải thiện chức năng và sức khoẻ của não. Các polyphenol cũng giúp bảo vệ các nơron giúp chống lại sự sa sút trí tuệ, bệnh Alzheimer’s và Parkinson. Polyphenol – EGCG tìm thấy trong trà xanh có thể làm giảm cholesterol – yếu tố chính gây nên bệnh tim ở người cao tuổi. Trà xanh cũng làm giảm huyết áp bằng cách tăng lưu lượng máu trong cơ thể, tăng hoạt động trao đổi chất. Ngoài ra, chất chống oxi hóa trong trà xanh còn giúp con người phóng chống bệnh tiểu đường, cải thiện chức năng gan nhằm nâng cao tuổi thọ của người sử dụng. Vì vậy những nghiên cứu chiết tách, định lượng và ứng dụng chất chống oxi hóa từ trà xanh đang ngày càng được chú trọng.

**II. Các phương pháp tách và phân tích định lượng**

**2.1. Chuẩn dịch chiết (Chiết chất chống oxi hóa)**

 **Phương pháp 1:** Nguyên liệu được búp trà, rửa sạch, sau đó hấp để vô hoạt enzyme và xác định độ ẩm. Cân lượng mẫu lá trà hấp (tương ứng 2,00 g chất khô) vào bình chưng cất có chứa một thể tích nước theo tỉ lệ nước:chất khô xác định. Lắp ống sinh hàn và ninh chưng ở nhiệt độ cài đặt trong bể ổn nhiệt với thời gian định trước (90oC và 30 phút). Sau mỗi lần chiết, hỗn hợp chiết được định mức trong bình định mức 250 ml, lọc thu được dịch chiết.

 **Phương pháp 2:** Nguyên liệu tươi được băm nhỏ bằng máy cắt (Super Blender, MX-T2GN, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd, Japan) trước khi tiến hành chiết. Nước được sử dụng làm dung môi chiết với tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/15 (w/v), nhiệt độ và thời gian chiết lần lượt là 90oC và 30 phút (Dương Thị Kim Nguyên và cộng sự, 2012). Qúa trình chiết được thực hiện trong bể ổn nhiệt (Elma, S 300H, Elmasonic, Germany). Dịch lọc trong thu được sau quá trình ly tâm ở 4oC, tốc độ 5.000 vòng trong 15 phút (Centrifuge, Labentech, Mega 17R, Germany), thu được dịch chiết [3].

**2.2. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa**

**2.2.1. Phương pháp DPPH**

 **Nguyên tắc:** Khả năng chống oxy hóa của các chiết xuất được đánh giá thông qua khả năng trung hòa gốc tự do theo phương pháp được mô tả bởi Min-Jer Lu và cộng sự. Nguyên tắc của phương pháp dựa vào khả năng các chất chống oxy hóa chuyển hóa gốc tự do 1,1-diphenyl 2-picryl hydrazyl thành sản phẩm phân tử làm cho dung dịch chuyển từ màu tím sang vàng.

 **Tiến hành như sau:** Dịch chiết được pha loãng ở các nồng độ khác nhau (dịch chiết có hàm lượng polyphenol (tương đương axit gallic) 100ppm). Lấy 1ml của dịch chiết cho vào ống nghiệm trong đó có chứa 1 ml dung dịch DPPH 0,1 mM trong methanol. Votex hỗn hợp và ủ 40 phút trước khi đo độ hấp thụ quang ở 517 nm bằng quang phổ kế. Methanol dùng thay cho dịch chiết để chuẩn bị mẫu trắng. Từ kết quả đo được xác định khả năng ức chế gốc tự do IC theo công thức sau:

IC=$\frac{A\_{Blank}-A\_{Sample}}{A\_{Blank}}×100$

 Trong đó:

 Ablank: độ hấp thụ quang của mẫu trắng

 Asample: độ hấp thụ quang của mẫu dịch chiết

 Từ giá trị IC của các dung dịch có nồng độ pha loãng khác nhau dùng phương pháp nội suy để tính giá trị IC50 tức là nồng độ dịch chiết tại đó khả năng ức chế gốc tự do DPPH (IC) bằng 50%.

**2.2.2. Phương pháp ABTS**

- Nguyên tắc: Dựa trên sự so sánh khả năng chống oxi hóa với acid ascorbic (ascorbic acid equivalent antioxidant capacity-AEAC) với ABTS

- Tiến hành:

 + ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylebenzothiaziline-6-sulfonate)): 7,4 mM ABTS trong methanol với 2,6 mM K2S2O8, được lưu trữ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 12-16 giờ.

 + Dung dịch ABTS khi đo phải được pha loãng với methanol để hấp thu từ 0,7 - 0,9 AU ở 734 nm. Sau đó, 60 µl chất chống oxy hóa chiết xuất hoặc chuẩn đối chứng được trộn với 1000 µl ABTS đã chuẩn bị và giữ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng. Sau 30 phút đo độ hấp thụ tại 734 nm.

- Kết quả: % Chống oxi hóa = [(Ac- As) / Ac] x100

 Trong đó: Ac: mật độ quang của chuẩn

 As: Mật độ quang của mẫu

 Trong đó xây dựng đường chuẩn với nồng độ acid ascorbic từ 500-1000 µM . Các gốc tự do phản ứng được thể hiện dưới dạng µmol AEAC/100g DW [4].

**2.2.3. Phương pháp FRAP**

- Nguyên tắc: Dựa trên khả năng khử ion sắt ferric -tripyridyl-triazine (Fe3+ -TPTZ) của chất chống oxi hóa tạo phức màu xanh và đo độ hấp thụ ánh sáng ở 593 nm.

- Tiến hành:

 + Thuốc thử ferric-TPTZ chuẩn bị bằng cách trộn 300 mM đệm axetat, pH 3,6, 10 mM TPTZ trong 40 mM HCl và 20 mM FeCl3.6H2O theo tỷ lệ 10: 1: 1 (v/v/v). Thuốc thử FRAP được chuẩn bị mới trước mỗi thí nghiệm. Cuối cùng 60 µl dung dịch chuẩn ở các nồng độ khác nhau và dịch chiết mẫu được trộn với thuốc thử 1000 µl FRAP và ủ ở 370C trong thời gian phản ứng. Đo độ hấp thụ tại 593 nm tại 30 phút.

 + Đường chuẩn được đo ở các nồng độ 500, 600, 700, 800, 900 và 1000 µM của acid ascorbic.

 + Nồng độ chất chống oxy hóa được xác định dựa trên quá trinh làm giảm Fe3+ -TPTZ tương đương 1mM FeSO4.7H2O [4].

**2.3. Định lượng các thành phần chất chống oxi hóa trong trà**

**2.3.1. Xác định hàm lượng Epigalocatechin Galate (EGCG) bằng phương pháp HPLC**

 Hàm lượng EGCG trong các dịch chiết chè được định lượng bằng phương pháp HPLC với các điều kiện như sau: Hệ thống HPLC của hãng Waters, Mỹ, sử dụng cột C18 (250×4 mm; 10µm), bước sóng đo của detector UV-VIS là 256 nm, thể tích nạp mẫu 10µl, pha động là hệ dung môi acetonitrile : nước: acid phosphoric theo tỉ lệ thể tích 11,5:88,5:0,1. Chất chuẩn EGCG mua từ hãng Sigma (Mỹ) với hàm lượng tối thiểu 98% được sử dụng để pha dãy các dung dịch chuẩn. Kết quả phân tích các dung dịch chuẩn cho phương trình đường chuẩn C [2].

 EGCG (M) = 0,0006 × chiều cao pic + 5 ×10-7 với hệ số tương quan R2 = 1,00.

**2.3.2. Định lượng polyphenol tổng số theo phương pháp Folin-Denis**

**a. Cơ sở phương pháp**

 Dựa vào phản ứng oxi hoá các hợp chất polyphenol bằng thuốc thử Folin-Denis tạo ra sản phẩm màu xanh lam. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với hàm lượng polyphenol trong một phạm vi nhất định. Dựa vào cường độ màu đo được ở bước sóng λ = 760 nm và đồ thị chuẩn của axit gallic với thuốc thử này có thể xác định được hàm lượng polyphenol trong dịch chiết của sản phẩm.

**b. Cách tiến hành**

**- Xây dựng đồ thị chuẩn axit gallic**

 Cân chính xác 10 mg axit gallic hòa tan và thêm nước cất tới vạch trong bình định mức 100ml thu được dung dịch axit gallic 0,1mg/ml. Lần lượt lấy từ 0,1-0,6ml dung dịch trên tiến hành phản ứng so màu như sau: cho một thể tích nhất định dung dịch axit gallic 0,1mg/ml vào bình định mức 10 ml, thêm 0,5ml thuốc thử Folin-Denis, lắc đều. Sau 3 phút thêm 1ml dung dịch Na2CO3 bão hòa lắc đều và bổ sung nước cất tới vạch định mức. Để yên trong 10 phút rồi ly tâm trong 20 phút sau đó đem đi so màu ở bước sóng λ = 760 nm. Dùng nước cất làm chuẩn khi so màu. Từ tương quan giữa số mg axit gallic và cường độ màu đo được, ta dựng được đồ thị đường chuẩn axit gallic theo phương pháp thống kê.

**- Xác định hàm lượng polyphenol trong dịch chiết**

 Lấy 1ml dịch chiết ban đầu và pha loãng 100 lần. Sau đó lấy 1ml dịch chiết vừa pha loãng vào bình định mức 10 ml, thêm 0,5ml thuốc thử Folin – Denis, lắc đều, để phản ứng diễn ra trong 3 phút rồi thêm vào 1ml dung dịch Na2CO3 bão hòa, lắc đều và bổ sung nước cất đến vạch định mức. Để yên trong 30 phút rồi đem so màu ở bước sóng 760 nm với nước cất làm chuẩn. Kết quả so màu phải cho cường độ màu >1.0 thì cần tiến hành pha loãng dịch chè hơn nữa để có được cường độ màu < 1.0.

**b. Công thức tính**

 Hàm lượng polyphenol tổng số tính theo công thức:

%PP = $\frac{X.V.k.100}{1000.v.m(1-w)}$

 Trong đó:

 X: số mg axit gallic xác định theo đồ thị chuẩn (mg/ml)

 V: Thể tích dịch chiết từ m (g) mẫu chè xanh vụn (100ml)

 v: Thể tích dịch chiết đem pha loãng (1ml)

 k: Hệ số pha loãng dịch chiết

 m: Khối lượng chè xanh vụn đem chiết (g)

 1000: Hệ số chuyển đổi thành g

 100: Hệ số chuyển đổi thành %

**c. Hóa chất**

- Thuốc thử Folin – Denis

 Tungstat Wolframate (Na2WO4.H2O) 100g

 Photphomolypdic axit 20g

 Photphoric axit 85% 50ml

 Nước cất vừa đủ 750ml.

 Đưa toàn bộ các chất trên vào bình cầu 1000 ml, đun trên bếp đun bình cầu có sinh hàn trong 2h, để nguội và thêm nước cất đến vạch trong bình định mức 1000ml.

- Dung dịch Natri cacbonat (Na2CO3) bão hòa

 Na2CO3 khan: 35g

 Nước cất : 100 ml

 Đun nhẹ trên nồi cách thủy (70-800C), khuấy đều cho Na2CO3 tan hết. Dùng giấy lọc, lọc lấy phần trong.

**III. Quy trình chiết thu chất chống oxi hóa từ trà xanh**

 Dịch chiết với ethanol có màu xanh diệp lục và chứa các thành phần phân cực khác như đường, axit amin, protein, cafein. Diệp lục hỗ trợ quá trình oxy hóa, do đó để đạt hiệu quả chống oxy hóa cao, cần loại bỏ thành phần này. Đường, axit amin, protein có thể gây các phản ứng không mong muốn trong những sản phẩm được xử lí ở nhiệt độ cao nên cũng cần loại bỏ. Chlorophyll và các thành phần ưa béo được loại bỏ khỏi dịch chiết ethanol bằng cách chiết với chloroform, sử dụng tỉ lệ1:1(v/v). Sau khi chiết, bỏ pha chloroform có màu xanh diệp lục, pha ethanol/nước thu được có màu vàng nhạt. Các thành phần tạp chất có độ phân cực cao được loại bỏ bằng cách chiết với ethyl acetate, là dung môi ít phân cực hơn (tỉ lệ1 : 1 theo thể tích). Để đạt hiệu quả chiết lặp lại quy trình chiết trên thêm một lần [1].

Chiết bằng Etanol nồng độ 72,5: 82,2oC, thời gian 32,2 phút

Dịch chiết

Chiết với ethylacetate

tỉlệ1/1 (v/v), 3 lần

Chiết với chloroform

tỉ lệ1/1 (v/v)

Cô quay/ Sấy chân không

Lạnh đông

Sấy thăng hoa

Chất chống oxi hóa

**Hình 1. Quy trình thu nhận chế phẩm chống oxy hóa dạng bột**

**IV. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG VÀ KHẢ NĂNG CHỐNG OXI HÓA TRONG TRÀ XANH**

Kết quả phân tích mẫu trà xanh thu hoạch vào cuối tháng tư cho kết quả chạy HPLC trên hình 2 và bảng 1, 2. Kết quả cho thấy trong trà xanh hàm lượng thành phần chống oxi hóa khá cao cao hơn trong trà đã qua quá trình oxi hóa là trà olong và trà đen [5, 6, 7].



Chuẩn

Mẫu trà xanh

**Hình 2. Kết quả phân tích HPLC trà xanh**

(1) theanine (7) (+)-catechin

(2) theobromine (8) (−)-epicatechin

(3) gallic acid (9) (−)-epigallocatechin gallate

(4) (+)-gallocatechin (10) (+)-gallocatechin gallate

(5) caffeine (11) (−)-epicatechin gallate

(6) (−)-epigallocatechin (12) (+)-catechin gallate

**Bảng 1. Hàm lượng một số chất chống oxi hóa trong trà xanh**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **TT** | **Thành phần** | **Hàm lượng** |
| 1 | theanine | 6.46±0.83 |
| 2 | theobromine | 8.81±0.19 |
| 3 | Gallocatechin (GC) | 2.28±0.06 |
| 4 | Epigallocatechin (EGC) | 30.52±0.32 |
| 5 | Catechin (C) | 2.48±0.03 |
| 6 | Epicatechin (EC) | 11.84±0.11 |
| 7 | epigallocatechin gallate (EGCG) | 105.37±0.71 |
| 8 | gallocatechin gallate (GCG) | 6.73±0.06 |
| 9 | Tổng Catechin | 200.40±1.71 |

**Bảng 2. Hoạt tính chống oxi hóa của trà xanh**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **TT** | **Phương pháp** | **Hoạt tính chống oxi hóa** **(mM/g trà khô)** |
| 1 | ABTS | 4,293.33 |
| 2 | FRAP | 1,555.06 |
| 3 | DPPH | 1,423.22 |

**Bảng 3. Khả năng chống oxi hóa ở một số loại trà**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **TT** | **Loại trà** | **Hàm lượng (mol/g trà khô)** |
| 1 | Xanh | 571 |
| 2 | Olong | 373 |
| 3 | Đen | 365 |

**V. Kết luận**

 - Đánh giá hoạt tính chống oxi hóa trong trà xanh bằng 3 phương pháp: ABTS, FRAP, DPPH

 - Phân tích định lượng chất chống oxi hóa trong trà xanh bằng HPLC và Folin-Denis

 - Hàm lượng chất chống oxi hóa trong trà xanh phụ thuộc vào thời điểm thu hái, giống trà và phương pháp sản xuất trà.

 - Chất chống oxi hóa trong trà xanh có thể được chiết tách và bổ sung vào thực phẩm là hướng nghiên cứu có tính ứng dụng cao.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. ĐẶNG MINH NHẬT, NGHIÊN CỨU THU NHẬN CHẾ PHẨM CHỐNG OXY HÓA TỰ NHIÊN TỪ LÁ CHÈ GIÀ, TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ, Tập 48, số6, 2010 Tr. 89-98.

2. Nguyễn Phương Thảo, LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC, NGHIÊN CỨU BỔ SUNG CHẾ PHẨM POLYPHENOL CHÈ VÀO THỰC PHẨM CHỨC NĂNG, Đại học bách Khoa Hà Nội, năm 2011.

3. Nguyễn Xuân Duy và Hồ Bá Vương, HOẠT TÍNH CHỐNG OXI HÓA VÀ ỨC CHẾ ENZYME POLYPHENOLOXIDASE CỦA MỘT SỐ LOẠI THỰC VẬT ĂN ĐƯỢC Ở VIỆT NAM, Tạp chí Khoa học và Phát tri ển 2013, tập 11 , số 3: 364 -372.

4. Lan-Sook Lee, Sang-Hee Kim, Young-Boong Kim and Young-Chan Kim, Quantitative Analysis of Major Constituents in Green Tea with Different Plucking Periods and Their Antioxidant Activity, Molecules 2014,19, p 9173-9186.

5. S. Aafrin Thasleema, Green Tea as an Antioxidant- A Short Review, Journal. Pharmaceutical. Sciences. & Research. Vol.5(9), 2013, 171 – 173.

6. Priyanka Sharma\*and Pradeep K. Goyal, Anti-Oxidative and Anti-Metalotoxic Properties of Green Tea Catechin: A

Preliminary Study, American Journal of Ethnomedicine, 2015, Vol. 2, No. 1, p 21-68.

7. Anna Masek1,\*, Ewa Chrzescijanska2, Malgorzata Latos1, Marian Zaborski1, Anna Podsędek3, Antioxidant and Antiradical Properties of Green Tea Extract Compounds, International Journal of ELECTROCHEMICAL SCIENCE, 12 (2017), p 6600 – 6610.