

## XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN TỐI ƯU LOẠI *CHLOROPHYLL* TRONG DỊCH CHIẾT LÁ NEEM BẰNG NƯỚC CÁT THEO PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG

Vũ Văn Độ<sup>(1)</sup>, Nguyễn Hồng Nguyên<sup>(2)</sup>, Nguyễn Lý Minh Trí<sup>(3)</sup>

(1) Viện sinh học nhiệt đới Tp. HCM

(2) Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM

(3) Trường Đại học Kỹ thuật công nghệ Tp. HCM

(Bài nhận ngày 01 tháng 03 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 01 tháng 12 năm 2011)

**TÓM TẮT:** Để tạo ra các loại chế phẩm từ dịch chiết lá cây thì hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết gây ảnh hưởng không tốt đến chất lượng của chế phẩm và thời gian bảo quản sẽ không được lâu. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành loại chlorophyll có trong dịch chiết lá neem (dung môi chiết là ethanol) bằng nước cát, dịch chiết sau khi loại chlorophyll vẫn giữ được các hoạt chất có hoạt tính sinh học diệt ấu trùng muỗi truyền bệnh sốt xuất huyết, sốt rét, viêm não Nhật Bản. Các yếu tố: thời gian để lạnh làm tủa chlorophyll, hàm lượng chlorophyll trong dịch lúc đầu, tỷ lệ nước cát thêm vào dịch chiết ảnh hưởng tới hiệu suất loại chlorophyll. Bằng phương pháp bề mặt đáp ứng đã chỉ ra điều kiện tối ưu cho quy trình loại chlorophyll theo hàm lượng chlorophyll trong dịch lúc đầu, tỷ lệ giữa dịch chiết và nước cát tương ứng là 16,8 µg/ml và 1,3 (13:10; v:v). Thời gian để lạnh ảnh hưởng không có ý nghĩa đến hiệu suất loại chlorophyll. Kết quả thu được cho thấy loại được 93,8% (thực tế là 90%) so với hàm lượng chlorophyll trong dịch lúc đầu.

**Từ khóa:** Chlorophyll; Limonoid; Cây neem (*Azadirachta indica* A.Juss.).

### MỞ ĐẦU

Hiện nay, ở những nước nhiệt đới nói chung và Việt Nam nói riêng, tình trạng dịch sốt xuất huyết, sốt rét và viêm não Nhật Bản bùng phát khá mạnh. Để phòng chống muỗi truyền các dịch bệnh trên, ngành Y tế dự phòng nước ta thường sử dụng biện pháp tẩm hóa chất xua diệt muỗi vào màn ngủ và vận động nhân dân thực hiện thói quen ngủ mắc màn [5].

Trên thị trường có nhiều sản phẩm phòng chống muỗi với những cách thức sử dụng khác nhau: loại diệt muỗi bằng nhang hoặc bình xịt, loại thuốc chống muỗi dùng cho cá nhân dưới

dạng kem bôi, thuốc xịt lên da có hương thơm, loại thiết bị đuổi muỗi bằng máy siêu âm, đèn diệt muỗi, máy xông muỗi... Các khuyến cáo sử dụng cho biết các sản phẩm trừ muỗi như nhang trừ muỗi, kem bôi chống muỗi... đều được sử dụng. Tuy nhiên, đây là các thuốc có chứa hóa chất nên sẽ có tác dụng phụ đối với trẻ em, nhất là trẻ em dưới 5 tuổi không nên sử dụng hoặc tiếp xúc với các sản phẩm này vì hệ thống chức năng miễn dịch của trẻ chưa hoàn chỉnh. Đặc biệt, trong nhang khói có chứa nhiều hóa chất sẽ ảnh hưởng đến hệ thần kinh, hô hấp nếu sử dụng trong thời gian dài [5].

Việc sử dụng thuốc hóa học phun trừ diệt muỗi về lâu dài để lại ảnh hưởng không tốt cho môi trường và con người. Do vậy, chúng tôi đã nghiên cứu chế tạo chế phẩm diệt muỗi từ lá cây neem (*Azadirachta indica* A.Juss.) ở Việt Nam thường gọi là cây xoan chịu hạn, chế phẩm thân thiện với môi sinh [3]. Một trong những vấn đề đặt ra trước khi tạo thành chế phẩm là loại chlorophyll trong dịch chiết lá neem để tạo ra chế phẩm có chất lượng tốt hơn và thời gian bảo quản được lâu hơn. Việc loại chlorophyll trong dịch chiết phải bảo toàn được các hoạt chất diệt ấu trùng muỗi trong dịch lúc đầu [5]. Hiện nay, việc xử lý chlorophyll trong dịch chiết lá neem, người ta sử dụng nhiều kỹ thuật khác nhau. Và theo tài liệu mà chúng tôi đã tham khảo, cùng với một số thực nghiệm chúng tôi đã làm, các phương pháp loại chlorophyll bằng các dung môi hữu cơ, hỗn hợp dung môi hữu cơ như: ethanol, isopropanol, hexan, aceton... hoặc dùng các chất hấp phụ bentonite, silaca gel(silica adsorbents) cũng đều làm giảm đáng kể hàm lượng hoạt chất limonoid trong dịch chiết [6].

Chúng tôi đã dùng nước cất để rửa chlorophyll, nước gây ảnh hưởng không đáng kể đến các hoạt chất có hoạt tính sinh học (limonoid) diệt ấu trùng muỗi trong lá neem và đồng thời các hoạt chất này tan được trong nước [4] [5].

Nồng độ chlorophyll trong dịch chiết, thời gian để lạnh dịch, tỷ lệ giữa nước và dịch chiết có ảnh hưởng đến hiệu suất loại chlorophyll và hiệu suất loại chlorophyll đã được chúng tôi nghiên cứu, khảo sát. Dựa trên những kết quả

thực nghiệm, điều kiện tối ưu cho quá trình loại chlorophyll đã được xác định bằng phương pháp bề mặt đáp ứng với sự hỗ trợ của phần mềm xử lý số liệu JMP 4.0, Microsoft Excel [1] [2].

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Hóa chất

Bột lá neem sử dụng trong nghiên cứu được thu hái từ cây neem trồng tại rừng neem tỉnh Ninh Thuận.

Dùng ethanol làm dung môi chiết các hoạt chất có hoạt tính sinh học diệt ấu trùng muỗi trong bột lá neem [5]. Cho nước cất vào dịch chiết theo tỷ lệ, để lạnh ở 5°C làm rửa chlorophyll. Sử dụng phương pháp trắc quang trên máy so màu Genesis 20 (hãng Thermo Spectronic) với bước sóng 645 nm để xác định hàm lượng chlorophyll trong dung dịch, dung dịch đo màu sẽ được pha loãng 6 lần [7].

### Thiết kế thực nghiệm

Theo dõi ảnh hưởng của ba yếu tố: tỷ lệ giữa dịch chiết và nước ( $x_1$ ), thời gian để lạnh dịch ( $x_2$ ) và nồng độ chlorophyll có trong dịch chiết lúc đầu ( $x_3$ ) tới hàm mục tiêu là phần trăm khối lượng chlorophyll giảm so với dịch lúc đầu ( $y$ ). Điều kiện tối ưu hóa quá trình rửa chlorophyll được xác định bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Các biến được mã hóa theo phương trình (1), với các số liệu được sử dụng trong bảng thiết kế thực nghiệm (Bảng 1):

$$X_t = \frac{x_t - x_{gt}}{\Delta x_t} \quad (1)$$

Trong đó:  $x_i$  là giá trị thực của biến  $X_i$ ;  $x_{0i}$  là giá trị tâm quay của bề mặt đáp ứng và  $\Delta x_i$  là khoảng thay đổi.

**Bảng 1.** Bảng thiết kế thực nghiệm

Nhân tố	Nhân tố gốc (x)	Biến mã hóa (X)		
		-1	0	1
Tỷ lệ (dịch chiết: nước)	$x_1$	0,5	1	1,5
Thời gian	$x_2$	1	2	3
Nồng độ chlorophyll	$x_3$	1	1,5	2

Quan hệ giữa hàm mục tiêu (y) và các nhân tố (x) được mô tả theo phương trình bậc hai, phương trình (2) [1]:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \left( \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i \right)^2 + \sum_{i < j} a_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

Trong nghiên cứu này n có giá trị bằng 3 nên phương trình (1) có thể triển khai thành:

$$y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 + a_{12} x_1 x_2 + a_{13} x_1 x_3 + a_{23} x_2 x_3 + a_{11} x_1^2 + a_{22} x_2^2 + a_{33} x_3^2 \quad (3)$$

Cần tiến hành 16 thí nghiệm để hồi quy và xác định các hệ số trong phương trình (3):  $a_0, a_1, a_2, a_3, a_{12}, a_{13}, a_{23}, a_{11}, a_{22}, a_{33}$ . Ý nghĩa thống kê của các hệ số hồi quy được xác định bằng cách kiểm tra chuẩn Student. Phương trình hồi quy bậc hai được xác định dựa trên kết quả kiểm tra chuẩn Fisher. Mức độ phù hợp của mô hình hồi quy được thể hiện qua giá trị của  $R^2$ . Tất cả các công việc trên được xác định bằng phần mềm JMP 4.0 và việc xác định điều kiện

tối ưu được xác định bằng hàm solver trong Microsoft Excel.

**Quy trình thực nghiệm**

**Quy trình tủa chlorophyll**

Lấy 10 ml dung dịch chiết đã biết nồng độ chlorophyll cho vào ống nghiệm, tiếp theo cho nước cất vào ống nghiệm theo tỷ lệ nhất định (cả hai cùng ở nhiệt độ phòng), sau đó để lạnh ở 5°C trong thời gian xác định làm tủa chlorophyll. Tiến hành lọc mẫu, xác định độ màu.

**Phương pháp xác định độ màu**

Màu của chlorophyll trong dung dịch được xác định bằng phương pháp trắc quang tại bước sóng  $\lambda$  (645 nm),  $A_{645}$ . Từ đó tính ra được hàm lượng chlorophyll. Phương trình đường chuẩn chlorophyll đo ở bước sóng 645nm [5]:

$$y = 0,643 \times x \quad (4)$$

Trong đó x là nồng độ chlorophyll ( $\mu\text{g/ml}$ )

y là độ đo quang ở 645nm

Phương trình trên có  $R^2 = 0,999$ .

Hàm lượng limonoid tổng (Azadirachtin related limonoids, AZRL,) được xác định bằng phương pháp so màu ở bước sóng 577 nm theo phương pháp của Jianming Dai [7].

**Bảng 2.** Bảng kết quả phân tích lượng limonoids, chlorophyll trước và sau khi loại chlorophyll

	Chlorophyll ( $\mu\text{g/ml}$ )	Limonoids (mg/ml)
Trước khi loại chlorophyll	16,8	1,3 (100%)

Sau khi loại chlorophyll	1,7	1,2 (92,31%)
--------------------------	-----	--------------

Hàm lượng chlorophyll sau xử lí giảm 90% so với lúc đầu, hàm lượng limonoids thay đổi không đáng kể.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Kết quả phân trăm khối lượng chlorophyll giảm trong dịch chiết theo bảng kế hoạch thực nghiệm được trình bày trên Bảng 2. Dựa trên những kết quả thực nghiệm thu được trên Bảng 2, sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) để phân tích cho các kết quả trình bày trên Bảng 3.

**Bảng 3.** Kết quả thực nghiệm theo bảng kế hoạch thực nghiệm

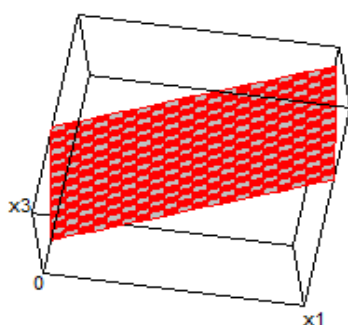
STT	Tỷ lệ dịch chiết : nước (x <sub>1</sub> )	Thời gian để lạnh dịch chiết (giờ) (x <sub>2</sub> )	Độ đo quang chlorophyll (độ đo quang) (x <sub>3</sub> )	y (chlorophyll giảm %)
1	1,5	3	1	65,3
2	0,5	1	2	28
3	2	2	1,5	66,5
4	1	3,5	1,5	87,9
5	0,5	3	2	22,5
6	1	2	0,7	22,5
7	1	2	2,5	92,6
8	1,5	3	2	84,5
9	1,5	1	2	81,4
10	1,5	1	1	62,6
11	1	0,5	1,5	82,3
12	0,5	1	1	10,9
13	0,5	3	1	8
14	1	2	1,5	87,1
15	1	2	1,	88,5
16	0,2	2	1,5	8,1

**Bảng 4.** Các hệ số hồi quy thu được từ thực nghiệm

y	Estimate	Std. Err	P	t Ratio
---	----------	----------	---	---------

Constant	0,8271066	0,057425	<0,0001	14,4
$x_1$	0,2362995	0,032384	<0,0001	7,3
$x_3$	0,1334961	0,032384	0,0017	4,12
$x_1 \times x_1$	-0,192712	0,035665	0,0002	-5,4
$x_3 \times x_3$	-0,11589	0,035665	0,0077	-3,25

Những kết quả phân tích trên cho thấy nồng độ chlorophyll có trong dịch lúc đầu và tỷ lệ giữa dịch chiết : nước là hai nhân tố có ảnh hưởng đến hiệu suất loại chlorophyll (hàm mục tiêu y), nhân tố thời gian để lạnh ảnh hưởng không có ý nghĩa đến hàm mục tiêu y, xem Hình 1.



**Hình 1.** Sự biến thiên của hiệu suất loại chlorophyll (y) theo tỷ lệ dịch chiết : nước ( $x_1$ ) và nồng độ chlorophyll trong dịch lúc đầu ( $x_3$ )

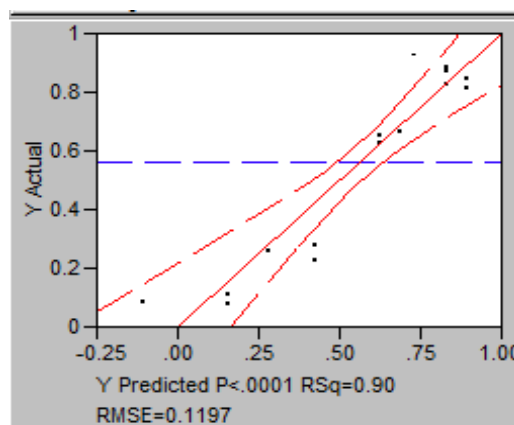
Từ Bảng 4 có thể viết được phương trình hồi quy, mô tả sự phụ thuộc của y vào nhân tố  $x_1$  và  $x_2$  như sau:

$$y = 0,2362995x_1 + 0,1334961x_3 - 0,192712x_1^2 - 0,11589x_3^2 + 0,8271066$$

$$\text{Hệ số tương quan } R^2 = 0,903$$

Những kết quả ở Bảng 4 cho thấy mô hình tiên đoán có thể dự đoán giá trị y với độ chính xác cao là 90,3 %, sự khác biệt giữa những giá

trị thu được từ mô hình dự đoán và những giá trị thực nghiệm chỉ có một sự sai khác nhỏ, xem Hình 2.



**Hình 2.** Tương quan giữa giá trị y thực nghiệm với y dự đoán từ mô hình

Dựa trên những số liệu thực nghiệm thu được, với sự hỗ trợ của phần mềm hàm Solver trong Microsoft Excel, có thể tìm ra được điều kiện tối ưu để tiến hành quá trình tủa loại chlorophyll. Cụ thể, tỷ lệ giữa dịch chiết : nước là 1,3(v:v), nồng độ chlorophyll trong dịch chiết lúc đầu là 16,8  $\mu\text{g/ml}$ , hiệu suất loại chlorophyll dự đoán là 93,8 %. Yếu tố thời gian để lạnh ( $x_2$ ) ảnh hưởng không đáng kể đến hàm y.

Ở điều kiện tối ưu trên, hiệu suất loại chlorophyll thực tế là 90 %. Kết quả thực

nghiệm này cho thấy mô hình dự đoán có độ chính xác cao, đảm bảo độ tin cậy.

## KẾT LUẬN

Kết quả loại chlorophyll bằng nước đối với dung môi dùng để chiết hoạt chất là ethanol cho hiệu suất tốt. Việc sử dụng nước loại chlorophyll trong trường hợp này giúp các hoạt chất có hoạt tính sinh học trong dịch chiết được bảo toàn, đồng thời chế phẩm được bảo quản

tốt hơn. Kết quả nghiên cứu chỉ ra điều kiện tối ưu để tiến hành quá trình loại chlorophyll là tỷ lệ giữa dịch chiết: nước là 13 : 10(v:v), nồng độ chlorophyll trong dịch chiết lúc đầu là 16,8 µg/ml, thời gian để lạnh ảnh hưởng không đáng kể. Hiệu suất loại chlorophyll trên lí thuyết là 93,8 % (thực tế là 90 %).

## DETERMINING OPTIMIZED CONDITIONS FOR REMOVAL OF CHLOROPHYLL IN EXTRACTED LIQUID FROM NEEM LEAVES BY DISTILLED WATER BY RESPONSE SURFACE METHOD

Vu Van Do<sup>(1)</sup>, Nguyen Hong Nguyen<sup>(2)</sup>, Nguyen Ly Minh Tri<sup>(3)</sup>

(1) Institute of Tropical Biology of HCM city

(2) Nong Lam University of HCM city

(3) University of Technique and Technology HCM city

**ABSTRACT:** Chlorophyll content in liquid ethanol extract of neem's leaves has bad effect on quality and storage time of the extract. In this study, we tried to remove remaining chlorophyll in the liquid ethanol extract of neem's leaves by distilled water. The results showed that after chlorophyll removing, the liquid extract still retained almost all the biological activity ingredients (limonoid). Three effecting factors, i.e., (i) The time to cool to precipitate chlorophyll in the extracted liquid, (ii) The initial content of chlorophyll; (iii) The ratio between the extracted liquid and distilled water added all affect chlorophyll removal efficiency, have been studied. The Response Surface Method (RSM) showed that, the optimal conditions for removing chlorophyll process, the ratio between extracted liquid and distilled water respectively is 16.8 µg/ml and 1.3 (13:10; v:v). The time to cool to precipitate chlorophyll in the extracted liquid did not have significantly affect on the performance of the removing chlorophyll's contents.

**Keywords:** Chlorophyll; Limonoid; Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss.); Response surface method (RSM); Microsoft Excel; Software JMP 4.0; Optimal conditions; ethanol (96°).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Cảnh, *Quy hoạch thực nghiệm*, Đại Học Quốc Gia Tp. HCM, trang 30-68 (2004).
- [2]. Nguyễn Cảnh, *Quy hoạch tuyến tính*, Đại Học Quốc Gia Tp. HCM, trang 10-100 (2004).
- [3]. Lâm Công Định, *Giới thiệu cây xoan chịu hạn (Azadirachta indica A. Juss.) nhập nội vào vùng cát nóng hạn Phan Thiết – Tuy Phong, Sở Nông – Lâm nghiệp Thuận Hải (1991).*
- [4]. Nguyễn Việt Kinh, *Giáo trình dược chất thiên nhiên*, Đại học Y – Dược Tp.HCM (2009).
- [5]. Vũ Văn Độ, Võ Thị Long, *Thử nghiệm khả năng diệt ấu trùng muỗi Aedes aegypti và Anopheles dirus của dịch chiết lá neem (Azadirachta indica A. Juss.) trồng tại Việt Nam*, HỘI NGHỊ KHOA HỌC, các biện pháp phòng trừ sâu bệnh không gây ô nhiễm môi sinh, NXB.Nông nghiệp, Tp. Hồ Chí Minh (2007).
- [6]. Diosady L. L., *Chlorophyll removal from edible oils*, International Journal of Applied Science and Engineering, 3, 81-88 (2005).
- [7]. Jianming Dai, Varoujan A, Yalayan, G.S. Vijaya Raghavan and Jocelyn R. Pare., *Extraction and colorimetric determination of azadirachtin related limonoids in neem seed kernel*, J. Agric. Food Chem, 47, 3738-3742 (1999).