

# **KHẢO SÁT QUÁ TRÌNH TÁCH GENIPOSIDE TỪ DỊCH TRÍCH CỦA QUẢ DÀNH DÀNH (*GARDENIA JASMINOIDES* ELLIS)**

Phạm Thành Quân – Đỗ Chí Bảo – Tống Văn Hằng

Trường Đại học Kỹ thuật

Francois Cormier - Edward Farnworth - Marie Rose Van Calsteren.

Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 3600

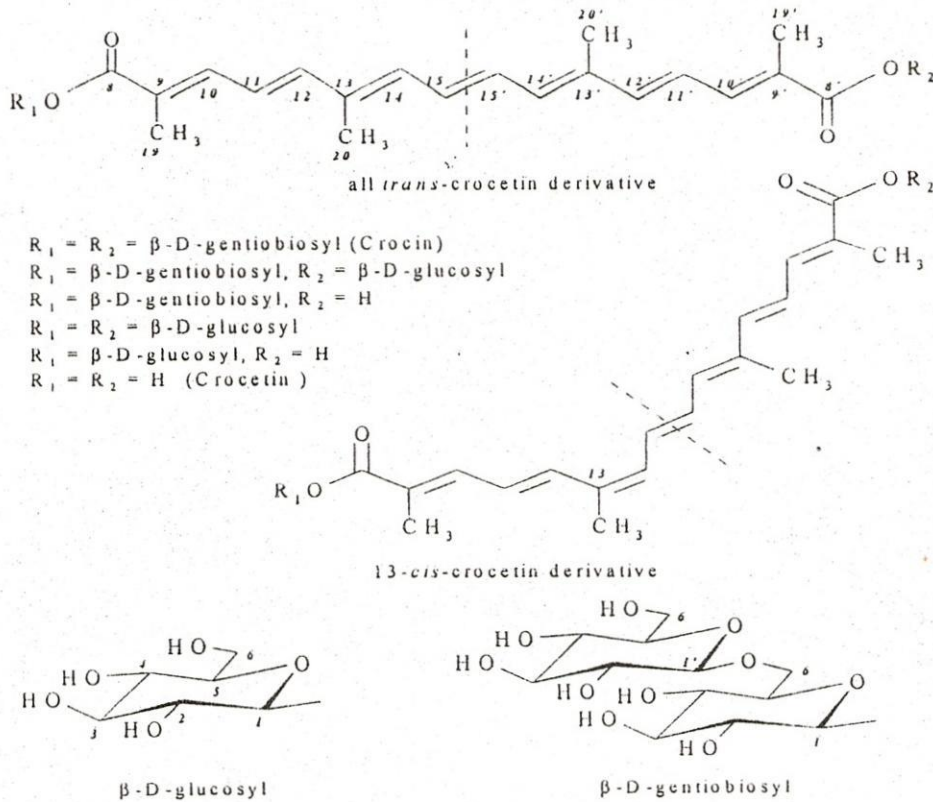
Casavant Boulevard West, St. Hyacinthe (Québec), Canada

(Bài nhận ngày 27/09/1999)

**TÓM TẮT :** *Quá trình tách geniposide từ dịch trích của quả dành dành (Gardenia jasminoides Ellis) được thực hiện bằng quá trình hấp phụ và khử hấp phụ trên nhựa Amberlite XAD 16 để sản xuất chất màu thực phẩm crocin không chứa iridoid. Sử dụng dung dịch nước EtOH 10% ( thể tích/thể tích) để rửa giải iridoids, và EtOH 50% ( thể tích/thể tích) để rửa giải crocin và dẫn xuất crocetin.*

## **GIỚI THIỆU**

Vì sự an toàn và sức khỏe của con người, một số các chất màu tổng hợp dùng trong thực phẩm bị cấm sử dụng (Shewfelt and Ahmed, 1977) dù chúng có độ bền cao, cường độ mạnh và sắc màu đa dạng (Francis, 1984). Chính vì vậy hiện nay trên thế giới hiện nay có xu hướng sử dụng rộng rãi các chất màu thực phẩm có nguồn gốc tự nhiên thay thế các chất màu tổng hợp. Hàng loạt các loại trái cây, rau quả và hoa đã và đang được nghiên cứu như là các nguồn cung cấp đầy triển vọng của chất màu thực phẩm. Những thành tựu kỹ thuật trong việc trích và sản xuất annatto (*Bixa orellana* L.) và saffron (*Crocus sativus* Linne) nhưng vì giá thành sản xuất tương đối cao dẫn đến việc tìm nguồn nguyên liệu mới cho loại chất màu thực phẩm tự nhiên này. Cùng một loại chất màu này có hàm lượng lớn và giá thành rẻ hơn rất nhiều có thể tìm thấy ở quả dành dành (*Gardenia jasminoides* Ellis) là loại cây được trồng khắp các vùng khí hậu nhiệt đới trong đó có Việt Nam (Bắc Ninh, Quảng Ninh, Ninh Thuận, Long An). [1]



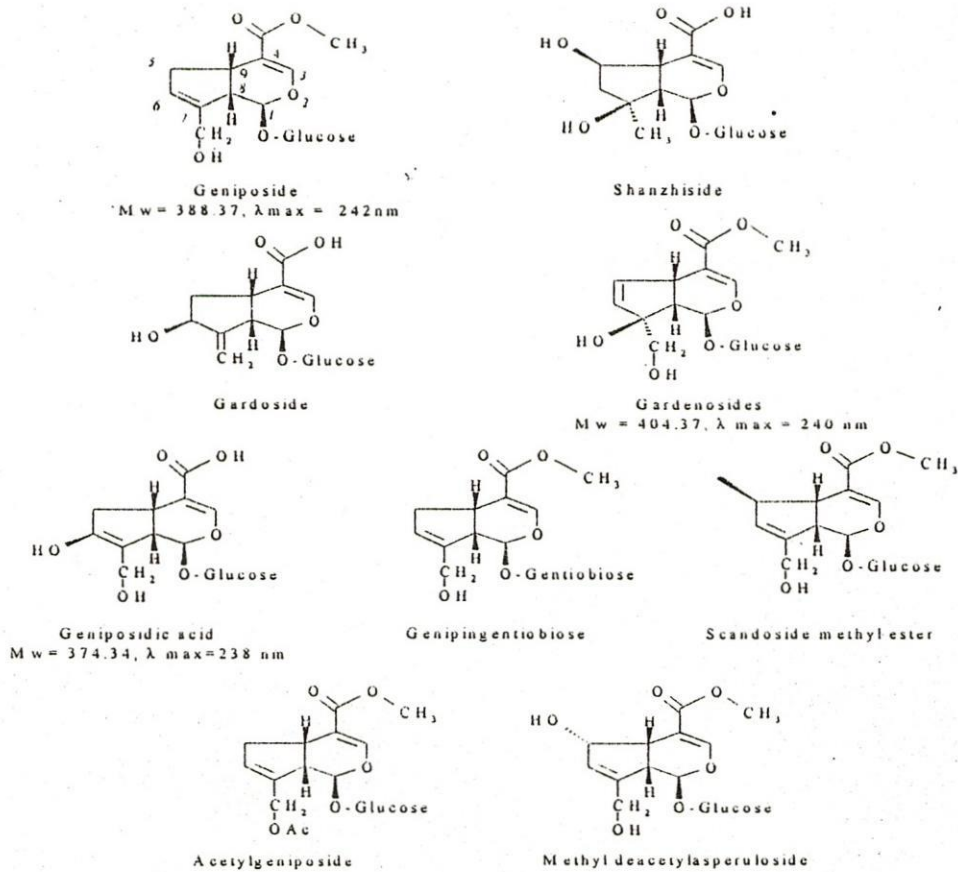
Hình 1 : Cấu trúc của dẫn xuất crocetin

Quả dành dành chứa ba nhóm chất màu chính: crocin - là loại hợp chất carotenoid tan được trong nước-, iridoides, và flavanoids. {2-5} Tính tan được trong nước của carotenoid crocin và các dẫn xuất của chúng mở ra lĩnh vực áp dụng rộng rãi của chúng vào các sản phẩm thực phẩm và các sản phẩm khác. Là hợp chất carotenoid, crocin và dẫn xuất cũng được biết rằng có tính chất chống oxi hóa. {2,3}

Việc nghiên cứu về dịch trích của quả dành dành (*Gardenia jasminoides* Ellis) cần phải được thực hiện để khai thác và áp dụng hiệu quả hơn nữa các hợp chất tự nhiên trong các ngành công nghiệp. Vì dịch trích của quả dành dành chứa lượng iridoid, hợp chất này bị hạn chế sử dụng ở Bắc Mỹ và Châu Âu nhưng chúng được sử dụng rộng rãi ở Châu Á. Việc loại các hợp chất iridoid chủ yếu là geniposide làm cho chất màu tinh khiết hơn và không bị mất màu và chuyển thành xanh lá cây trong quá trình sử dụng. Việc nghiên cứu về quá trình tách loại các iridoid trong dịch trích của quả dành dành là cần thiết để nâng cao chất lượng chất màu thực phẩm tự nhiên và phát triển hơn nữa việc sử dụng các hợp chất tự nhiên.

Mục đích của chúng tôi là tách geniposide - hợp chất iridoid chủ yếu có trong dịch trích của quả dành dành (*Gardenia jasminoides* Ellis) bằng quá trình hấp





Hình 2 : Cấu trúc của Iridoids từ quả dành dành (*Gardenia jasminoides* Ellis)

phụ và khử hấp phụ trên nhựa Amberlite XAD-16 để sản xuất chất màu thực phẩm crocin không chứa iridoid.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Nguyên liệu

Geniposide được mua từ công ty Wako như là chất chuẩn dùng trong HPLC. Nhựa hấp phụ Amberlite XAD-16 được mua từ công ty Sigma ( St-Louis, MO). Các đặc tính của nhựa như sau: là nhựa đa vòng thơm kỵ nước, bề mặt riêng: 800 m<sup>2</sup>/g, thể tích xốp 1.82 ml/g và kích thước hạt qua sàng ướt là 20-60 mesh. EtOH, MeOH, axit axetic loại dùng cho HPLC của hãng Fisher được dùng trong phân tích.

### Chuẩn bị dịch trích thô

Quả dành dành sấy khô được cắt nghiền thành những mảnh nhỏ có kích thước trung bình khoảng 1 mm, được trích với dung dịch EtOH 50% ( tỷ lệ quả dành dành/ dung môi là 1:3 ( khối lượng/ thể tích)) tại 25°C trong tối trong 72 giờ. Hỗn hợp được ly tâm tại 1600 g và được lọc. Nước qua lọc được cô đặc trong thiết bị cô đặc chân không dưới áp suất thấp 150 – 200 mmHg nhiệt độ thấp hơn 25°C thu được

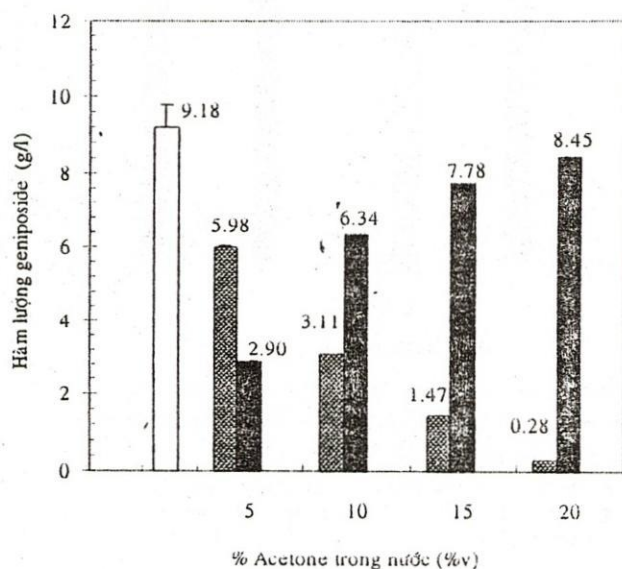
dịch trích thô. Dịch trích thô này được dùng làm thí nghiệm và được phân tích bằng HPLC.

### **Sắc ký lỏng cao áp (HPLC)**

Các thông số của phân tích iridoid bằng HPLC được thực hiện theo phương pháp của Van Calsteren và cộng sự (1997) [5], Cormier và cộng sự (1997) [59] và Dufresne và cộng sự (1997) [67]

Mẫu được phân tích bằng HPLC sử dụng hệ thống máy Beckman Gold System (San Ramon, CA, USA) gồm bộ phận lấy mẫu tự động (autosampler – model 502) với thể tích mỗi lần bơm mẫu là 20 $\mu$ l và được điều nhiệt ở 4°C, hệ thống điều khiển dung môi có chương trình (model 126), phần mềm Gold System (version 8.10), bộ đầu dò photodiode array (model 168) (từ 200-500nm) ghi tại 440 nm và 240 nm, cột sắc ký (đường kính trong 0.46 cm, dài 25 cm) được nhồi ODS-2 (C18) kích thước hạt 10  $\mu$ m (hãng Chromatographic Sciences, Montreal, QC, Canada).

Pha động là dung dịch acid acetic 1% trong nước (dung môi A) và dung dịch acid acetic 1% trong EtOH (dung môi B) với tốc độ 1ml/phút với chế độ chạy như sau: tuyến tính từ 100 % A đến 50 % A + 50% B trong 10 phút, sau đó tăng tuyến tính đến 100 % B trong 30 phút. Cột được rửa với 100% B trong 10 phút và cân bằng với 100 % A trong 15 phút.



**Hình 3:** Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch rửa giải acetone lên quá trình tách iridoid bằng cột hấp phụ nhựa Amberlite XAD-16 (20g), tỷ lệ dịch trích / nhựa = 1:2 (v/w).

- ▨ Hàm lượng geniposide trong phân đoạn crocin (g/l)
- Hàm lượng geniposide trong phân đoạn iridoid (g/l)
- Hàm lượng geniposide trong dịch trích ban đầu (g/l)

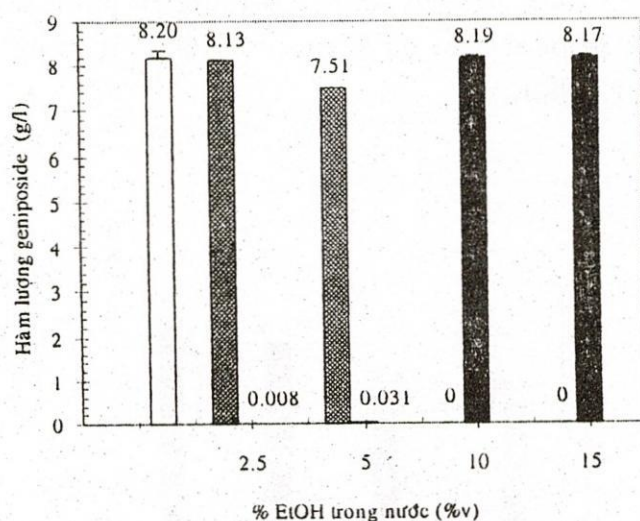


### Tách loại iridoid

Lượng cho trước dịch trích thô của quả dành dành được cho qua cột hấp phụ với chất hấp phụ là nhựa Amberlite XAD-16. Các dẫn xuất của crocetin bị hấp phụ trên nhựa Amberlite XAD-16. Cột hấp phụ được rửa bằng nước ( 50 ml x 3 ) để loại các hợp chất không bị hấp phụ và các chất vô cơ. Dung dịch acetone trong nước ( 3-15 % thể tích) hoặc ethanol trong nước ( 5-15% thể tích ) (50 mlx3) được dùng để khử hấp phụ ( rửa giải) các iridoid để thu được phân đoạn iridoid có chứa geniposide là cấu tử chính. Kế đến dùng dung dịch ethanol trong nước ( 30-60% thể tích) được dùng để khử hấp phụ ( rửa giải) để thu được phân đoạn crocin. Hai phân đoạn này được bốc hơi dưới chân không cho đến một thể tích cho trước nhất định và được đem đi phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp HPLC.

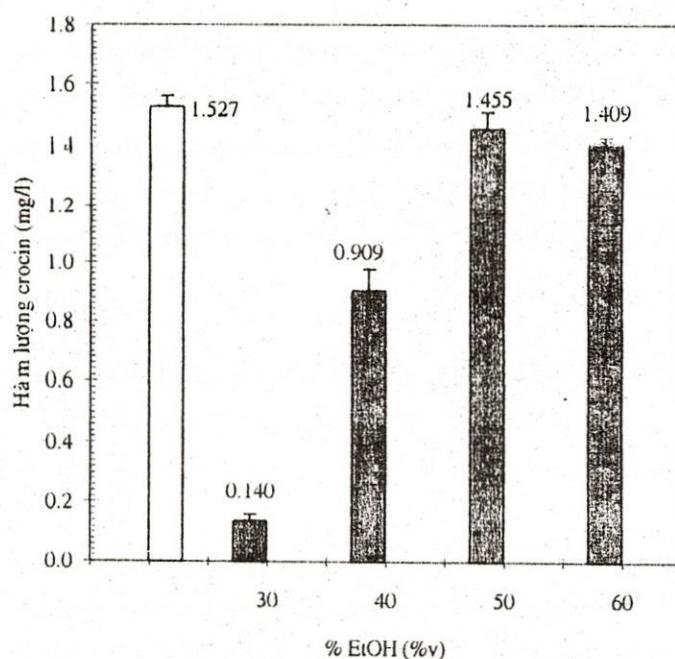
### KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Các kết quả thí nghiệm được trình bày trên Hình 3-5 và Bảng 1.



Hình 4: Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch rửa giải ethanol lên quá trình tách geniposide bằng cột hấp phụ nhựa Amberlite XAD-16 (20g), tỷ lệ dịch trích/ nhựa = 1:2 (v/w).

- ▨ Hàm lượng geniposide trong phân đoạn crocin (g/l)
- Hàm lượng geniposide trong phân đoạn iridoid (g/l)
- Hàm lượng geniposide trong dịch trích ban đầu (g/l)



Hình 5: Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch rửa giải ethanol lên hàm lượng crocin thu hồi được khi được hấp phụ trên cột nhựa Amberlite

**Bảng 1:** Lượng bảo hòa của crocin và geniposide của dịch trích thô khi hấp phụ trên nhựa Amberlite XAD-16 dùng EtOH 50% để rửa giải.

Thí Nghiệm	A <sub>440</sub> của crocin	A <sub>240</sub> của geniposide	Lượng crocin (mg/g nhựa hấp phụ)	Lượng geniposide (mg/g nhựa hấp phụ)
1	0.08195	0.71681	0.0745	73.52
2	0.07135	0.66723	0.0649	68.43
3	0.08192	0.69674	0.0745	71.46
4	0.07692	0.75289	0.0699	77.22
5	0.09044	0.75268	0.0822	77.20
6	0.08558	0.76120	0.0778	78.07
Trung bình	0.08136	0.72459	0.0740	74.32
Sai số	0.00665	0.03757	0.0060	3.85

Hệ số pha loãng cho HPLC: Kdil = 200, Khối lượng nhựa hấp phụ: m = 20 g, Tổng thể tích rửa giải là: v = 0.2 l

Dùng dung dịch acetone có nồng độ acetone đến 20 % thể tích để rửa giải iridoid chủ yếu là geniposide là không hiệu quả kinh tế và hiệu suất tách loại là 96,9% so với lượng geniposide ban đầu của dịch trích ( Hình 3). Mặc khác có đến 0.28mg geniposide/l tương ứng với 3.1 % lượng geniposide ban đầu còn lẫn trong phân đoạn crocin sau khi rửa giải cột với dung dịch EtOH 50% để thu hồi crocin và dẫn xuất. Sử dụng dung dịch acetone không thích hợp cho việc tách loại iridoid ở quy mô công nghiệp vì giá thành cao và an toàn lao động kém.



Ảnh hưởng của nồng độ ethanol của dung dịch ethanol dùng để rửa giải để loại iridoid ra khỏi cột hấp phụ được trình bày trong Hình 4. Ở nồng độ ethanol 10% thể tích, geniposide được rửa giải hoàn toàn khỏi nhựa và phân đoạn crocin không chứa bất kỳ iridoid nào. Hiệu suất tách loại iridoid là gần như 100%. Sử dụng dung dịch ethanol 10% rửa giải iridoid- chủ yếu là geniposide- có những ưu điểm sau:

1. Ethanol là dễ tìm, an toàn lao động hơn và giá thành thấp hơn acetone.
2. Có thể tận dụng các dung dịch ethanol thu hồi ở các công đoạn khác trong quy trình để pha chế dung dịch ethanol 10% dùng để rửa giải.

Ảnh hưởng của nồng độ ethanol của dung dịch ethanol dùng để rửa giải crocin và các dẫn xuất được trình bày ở Hình 5. Khi nồng độ ethanol tăng từ 30 đến 60 % thì hàm lượng crocin có trong phân đoạn crocin tăng từ 0,140 mg/l đến 1,409 mg/l và hiệu suất thu hồi crocin tăng từ  $9,2 \pm 1,4$  % đến  $92,3 \pm 1,1$  %. Khi sử dụng dung dịch EtOH 50% để rửa giải crocin thì hiệu suất thu hồi crocin đạt cao nhất  $95,3 \pm 3,5$  %.

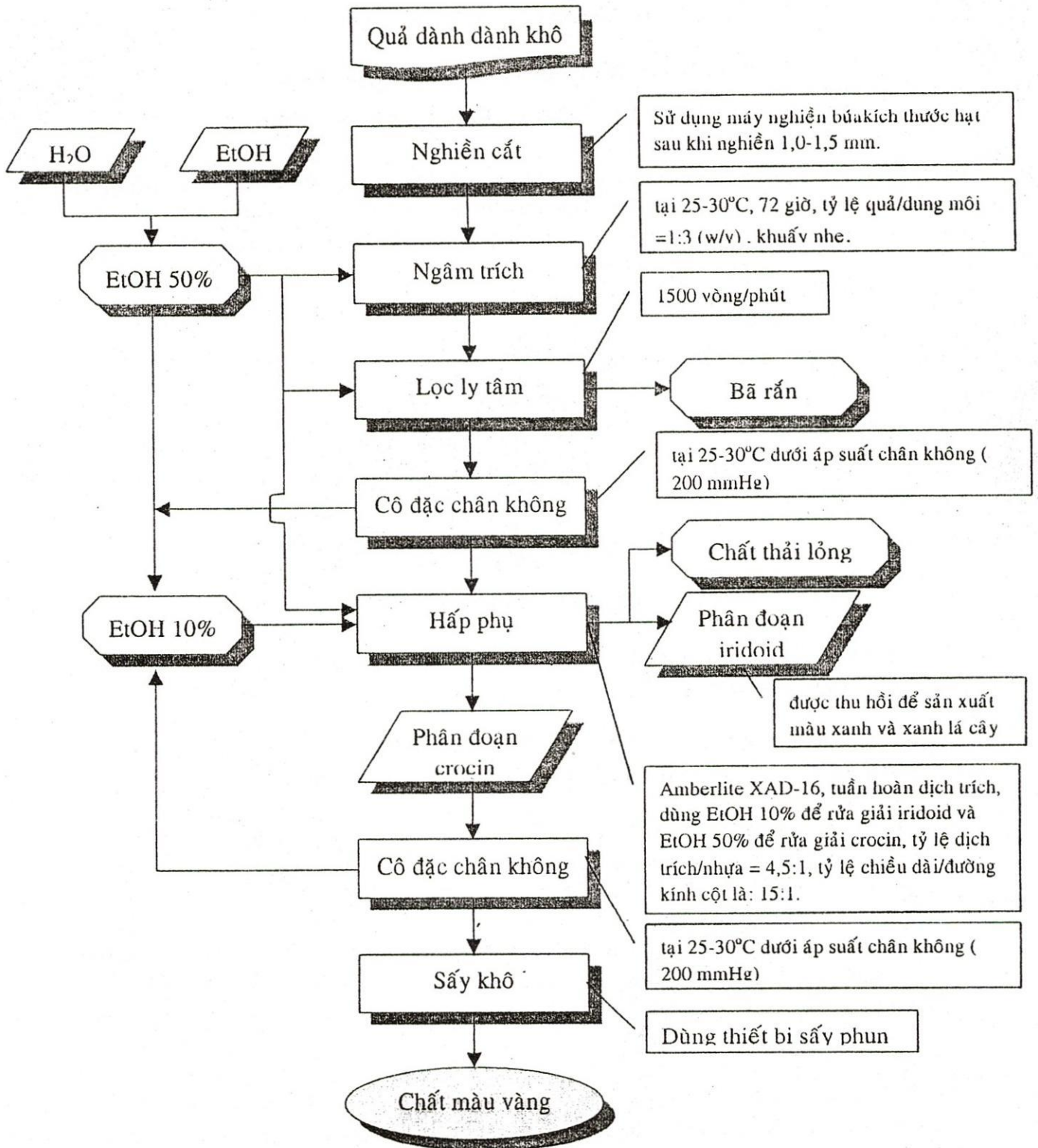
Khi nhựa hấp thụ Amberlite XAD-16 được bão hòa bằng dịch trích thô của quả dành dành, lượng crocin và geniposide cùng được hấp phụ trên nhựa là  $0,0740 \pm 0,060$  mg/g và  $74,32 \pm 3,85$  mg/g nhựa. Lượng chất bị hấp phụ trên nhựa Amberlite chủ yếu là geniposide ( Bảng 1).

## **KẾT LUẬN**

Quá trình tách iridoids từ dịch trích của quả dành dành được thực hiện nhờ quá trình hấp phụ. Việc sử dụng dung dịch EtOH 10% để rửa giải iridoid và EtOH 50% để rửa giải crocin từ cột hấp phụ XAD 16 có những ưu điểm sau:

1. Dung môi là có sẵn và rẻ tiền, không độc hại trong việc sản xuất ở qui mô lớn
2. Dung môi có thể thu hồi và sử dụng lại được.

Lượng bão hòa của crocin và geniposide cùng hấp phụ trên nhựa Amberlite XAD-16 được tìm ra là 0,0740 ( mg/g nhựa hấp phụ và 74,32 ( 3, 85 mg/g nhựa hấp phụ. Hiệu suất thu hồi crocin là 93,5 ( 3,5 % khi sử dụng ethanol 50% thể tích để rửa giải crocin từ cột nhựa Amberlite XAD-16. Một sơ đồ qui trình sản xuất chất màu vàng tan trong nước từ quả dành dành được đề nghị trên hình 6



Hình 6: Sơ đồ qui trình sản xuất màu vàng crocin



**THE PROCESS OF SEPARATION OF IRIDOIDS FROM THE EXTRACT OF GARDENIA  
FRUIT (*GARDENIA JASMINOIDES* ELLIS)**

**Pham Thanh Quan – Do ChiBao – Tong Van Hang**

**Francois Cormier - Edward Farnworth - Marie Rose Van Calsteren.**

**ABSTRACT** : The process of separation of iridoids from the extract of gardenia fruit (*Gardenia jasminoides* Ellis) to obtain the yellow pigments (mainly crocin) was the adsorption-desorption process by using polymeric adsorbent of Amberlite XAD16. 10 % (v/v) EtOH for the elution of iridoids and 50% (v/v) EtOH for the elution of crocin from the polymeric adsorbent of Amberlite XAD16 were used in the separation of crude extract of gardenia.

**Key-words**: carotenoids, dẫn xuất crocetin , iridoid, geniposide, HPLC, hấp phụ.

**Lời cảm tạ**

Chúng tôi chân thành cảm ơn sự ủng hộ tài chính của Agence de Coopération Culturelle et Technique (Paris, France).

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. F.J. Francis, 1992, Miscelaneous Colorants, In *Natural Food Colorant* ,G.A.F. Hendry, and J.D. Houghton (Eds.) p. 249-252, Blackie, New York & Glasgow.
2. T. Ichi, Y. Higashimura, and T. Koda, 1995, Food Chemical Properties of Gardenia Yellow Pigments, *Foods Food Ingredients J.Jpn.* ,165, p. 96-103.
3. T. Ichi, Y. Higashimura, T. Katayama, T. Koda, T. Shimizu, M. Tada, M. 1995, Food Chemical Properties of Crocetin Derivatives in Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis), *J. Jpn Soc. Food Sci. Tech.* , 42, 784-789.
4. S. Pfister, P. Meyer, A. Steck, and H. Pfander, 1996, Isolation and Structure Elucidation of Carotenoid-Glycosyl Ester in Gardenia Fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and Saffron (*Crocus sativus* Linne), *Journal of Agric.Food Chem.*,Vol. 44 , p. 2612-2615, American Chemical Society.
5. M-R. Van Calsteren, M. C. Bissonnette, F. Cormier, C. Dufrense, T. Ichi, J. C. Y. Leblanc, D. Perreault, and I. Roever, 1997, Spectroscopic Characterization of Crocetin Derivatives from *Crocus sativus* and *Gardenia jasminoides*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 45, p1055-1061.
6. F.J Francis, 1987, Lesser-Known Food Colorants, *Food Technology*, Vol. 41(4), p.62-68.
7. Jiangsu New Medical College (1986), *Dictionary of Chinese Crude Drugs*, p.1984.

Shanghai Scientific and Technologic Publisher, Shanghai.

8. S.R. Sampathu, S. Shivashankar, and Y.S. Lewis, 1984, Saffron (*Crocus sativus* Linn.) - Cultivation, processing, chemistry and standardization, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol.20, issue 2, p134-135.
9. Oshima, K. Sagara, and T. Yoshida, 1988, Determination of geniposide, gardenoside, geniposidic acid, and genipin 1- $\beta$ -gentiobioside in *Gardenia jasminoides* by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 455 (1988) p. 410-414, Elsevier Science Publishers B.V, Amsterdam, Netherlands.
10. S. Fujikawa, S. Nakamura, K. Koga, and J-I. Kumada, Continuous Blue Pigment Formation by Gardenia Fruit Using Immobilized Growing Cells, *Journal of Fermentation Technology*, 1987, Vol.65, No. 6, 711-715.
11. Edge, D.J. McGarvey, and T.G. Truscott, 1997, New Trends in Photobiology (Invited Review) : The carotenoids as anti-oxidants - a review, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41, p189-200, Elsevier Science S.A.
12. Tanaka, H. Okemoto, and N. Kuwghara, 1995, Crocetin-containing coloring, *United States Patent* US542447.
13. F. Cormier, C. Dufresne, and S. Dorion, 1995, Enhanced crocetin glucosylation by means of maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin encapsulation, *Biotechnology Techniques*, Vol. 9, 553-556.
14. Dufresne, F. Cormier, and S. Dorion, 1997, *In Vitro* Formation of Crocetin Glucosyl Ester by *Crocus sativus* Callus Extract, *Plant Medica*, Vol.63, p. 150-153, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York.
15. Koga, S. Fujikawa, and Y. Fukui, 1989, Natural blue dye composition and colorant using the same: prepared by reacting taurine and genipin *United States Patent* US4878921.
16. Toyama, H. Inoue, T. Shigu, Y. Takeda, T. Ikumoto, H. Okuyama, and O. Yamamoto, 1981, Red coloring composite and the method for its production, *United States Patent* US4247698.
17. J. Choe, 1994, Purifying stabilised gardenia yellow pigment, *Korean Patent* KR9404527-B1.
18. R. H. Snow, B. H. Kaye, C. E. Capes, R. F. Conley, J. Sheehan, and W. B. Pietsch, 1973, Section 8: Size Reduction and Size Enlargement, In *Chemical Engineers Handbook*, R. H. Perry, and C. H. Chilton, Eds., 5<sup>th</sup>, 8-22, McGraw-Hill, Inc., New York.