

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT CHLOROPHYLL TỪ PHÂN TẦM

STUDY ON EXTRACTION PROCESS OF CHLOROPHYLL FROM SILKWORM FERTILIZER

Phạm Quỳnh Trang^{1,3}, Đỗ Trung Sỹ¹, Trần Hữu Quang¹, Hoàng Thị Bích²,
Phạm Thị Hồng Minh², Vũ Minh Quang³, Nguyễn Thị Hương^{3,*}

TÓM TẮT

Chlorophyll là sản phẩm của quá trình quang hợp trong tự nhiên, có nhiều ứng dụng trong đời sống. Tách chiết chlorophyll từ phân tằm sẽ mang lại hiệu quả kinh tế cao. Bằng phương pháp xác định hàm lượng chlorophyll của Lichtenthaler. H.K., nhóm nghiên cứu đã xác định được hàm lượng chlorophyll tổng là 0,598%, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết chlorophyll: Hệ dung môi acetone: NH₄OH bằng 9/1, v.v, tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi chiết 5% (w/v), nhiệt độ chiết trong khoảng 25 - 30°C, thời gian ủ mẫu 24h, quá trình chiết thực hiện trong bóng tối.

Từ khóa: Chlorophyll, phân tằm, chiết xuất.

ABSTRACT

Naturally occurring chlorophyll with many applications is a photosynthetic product. Chlorophyll derivatives derived from silkworm fertilizer have generated the high economic values. A study conducted by Lichtenthaler. H.K. et al, revealed that the total chlorophyll content reaches up to 0.598% from silkworm fertilizer with the optimized conditions, including acetone: NH₄OH (9:1, v/v), 5% of material/ solvent ration (w/v), 24h extraction treatment in room temperature and dark.

Keywords: Chlorophyll, silkworm fertilizer, extract.

¹Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

*Email: Huongphap2016@gmail.com

Ngày nhận bài: 25/01/2020

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 25/6/2020

Ngày chấp nhận đăng: 26/02/2021

1. MỞ ĐẦU

Chlorophyll là nhóm chất màu tự nhiên phong phú nhất và là nguồn chất màu xanh lá cho tất cả các loài thực vật, tảo, vi khuẩn lam, là thành phần trong hệ quang hợp của cây xanh và vi khuẩn quang hợp [3]. Chlorophyll được ứng dụng phổ biến trong thực phẩm, mỹ phẩm, công nghệ nano và điều trị ung thư [4, 6]. Đặc biệt gần đây đã thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học trong việc ứng dụng các loại thuốc quang trị liệu [10].

Phân tằm (Tằm sa, tám mề) có tên khoa học là Silkworm Fertilizer là vị thuốc được dùng nhiều trong dân

gian, còn có tác dụng chữa bệnh tiểu đường [1]. Trong quá trình tiêu hóa của tằm, chlorophyll không bị tiêu hóa và được đào thải theo đường phân. Vì vậy trong phân tằm hàm lượng chlorophyll cao hơn rất nhiều so với các nguyên liệu thực vật, rong tảo thông thường. Tách chiết chlorophyll từ phân tằm không chỉ có ưu điểm là nguyên liệu dồi dào, không bị giới hạn về thời gian và mùa vụ mà còn tốn ít dung môi hóa chất và có hiệu quả kinh tế cao, đồng thời có thể kết hợp thu nhận các hoạt chất quý khác.

Có rất nhiều phương pháp tách chiết chlorophyll từ phân tằm đã được công bố. Một số các nghiên cứu của nhóm tác giả Deng Xiangyuan và cộng sự [14] đã tách chiết chlorophyll bằng phương pháp siêu âm ở 50°C, trong 60 phút. Nồng độ chlorophyll thu được 13,825 mg/l. Mặt khác nhóm tác giả cũng đã tách chiết chlorophyll dưới sự chiếu xạ vi sóng với hệ dung môi acetone/ethanol = 2/1, áp suất 0,4MPa, công suất 300W thời gian chiếu xạ 50 giây. Nồng độ chlorophyll đạt được 14,325mg/l [15].

Tuy nhiên hiện nay ở nước ta rất ít các công trình nghiên cứu khai thác và tách chiết chlorophyll từ phân tằm. Trong khuôn khổ nghiên cứu của chúng tôi, một số dung môi khác nhau và các điều kiện tách chiết khác nhau được đưa vào thử nghiệm. Thông qua kết quả thực nghiệm, ảnh hưởng của điều kiện tách chiết khác nhau sẽ được đánh giá và so sánh, từ đó rút ra điều kiện phù hợp nhất được sử dụng để tách chiết chlorophyll từ phân tằm, làm cơ sở khoa học cho việc xây dựng quy trình tách chiết chlorophyll ở quy mô lớn hơn.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Phân tằm được thu mua tại Vũ Thư - Thái Bình vào mùa xuân hè (tháng 2-6) ở những con tằm đã lớn. Phân tằm tươi là những hạt mề, đường kính 4mm. Phân tằm tươi được phơi khô dưới ánh nắng mặt trời và giữ ở nơi khô ráo. Sau khi chuyển đến cơ sở nghiên cứu, phân tằm được sàng lọc loại bỏ tạp chất, đóng túi ni lông 50g/túi, hút chân không và bảo quản ở -18°C.

Các chất chuẩn chlorophyll a, chlorophyll b được mua của hãng Sigma - Aldrich, độ tinh sạch ≈ 95%.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng Công nghệ Vật liệu và Môi trường, Viện Hóa học và Trung tâm Phát triển Công nghệ và Vật liệu sạch, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.1. Quy trình chiết tách chlorophyll

Phân tằm sau khi xử lý loại bỏ các thành phần tạp thô như cành, lá dẫu (5 gam) được xay nghiền cùng 100 ml hỗn hợp dung môi acetone: NH₄OH (9/1, v/v). Hỗn hợp sau đó được lưu trong chai thủy tinh sẫm màu ở các khoảng thời gian khác nhau từ 0 đến 30 giờ. Sau khi lọc bỏ bã, dung dịch được ly tâm với tốc độ 6000 vòng/ phút trong khoảng 5 phút. Dịch chiết chlorophyll được xác định hàm lượng chlorophyll a, chlorophyll b và chlorophyll tổng bằng phương pháp của Lichtenthaler, H.K. [9, 12, 13].

2.2.2. Xác định hàm lượng chlorophyll

Dịch chiết chlorophyll được hòa loãng bằng acetone 80% và đo độ hấp thụ quang trên máy so màu UV-VIS (LABOMED - Mỹ) ở bước sóng 663nm and 645nm với mẫu trắng là acetone 80% [5, 7, 9].

Lượng chlorophyll (µg) trong 1g cao chiết được xác định theo công thức dưới đây:

$$\% \text{ Chlorophyll a } [12,7. (A_{663}) - 2,69. (A_{645})] \cdot \frac{V}{10^6 \cdot W} \cdot 100\%$$

$$\% \text{ Chlorophyll b } [22,9. (A_{645}) - 4,68. (A_{663})] \cdot \frac{V}{10^6 \cdot W} \cdot 100\%$$

$$\% \text{ Chlorophyll a + b } = \% \text{ Chlorophyll a } + \% \text{ Chlorophyll b}$$

Trong đó:

A: Độ hấp thụ quang.

V: Thể tích dung dịch chiết sau khi hòa với acetone 80%.

W: Khối lượng cao chiết.

2.2.3. Phương pháp tinh sạch chlorophyll

Việc phân tích, phân tách các phần dịch chiết được thực hiện bằng các phương pháp sắc ký khác nhau như sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột thường (CC) với pha tĩnh là silica gel (Merck) và sắc ký rây phân tử với pha tĩnh là sephadex LH-20 (Merck) [8,2].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả đánh giá hàm lượng chlorophyll trong phân tằm so với một số nguyên liệu giàu chlorophyll

Một số nguyên liệu thực vật (lá dẫu tằm, cỏ linh lăng Alfalfa, Spinach,...) và bột tảo xoắn Spirulina được sử dụng để đánh giá, so sánh với hàm lượng chlorophyll được tách chiết từ phân tằm. Phương pháp định lượng chlorophyll được xác định theo tiêu chuẩn Hoa Kỳ [9,11].

Theo bảng 1 và hình 1, hàm lượng nước trong các nguyên liệu nghiên cứu có sự chênh lệch rất lớn. Trong các loại thực vật khảo sát hàm lượng nước dao động từ 45,43 đến 91,03%. Nhóm nguyên liệu thực vật có hàm lượng nước thấp: lá chè, lá tre, lá bồ ngót (45 - 55%), nhóm có hàm lượng nước cao là lá spinach, dẫu tằm, cỏ linh lăng

(71- 91%). Tảo spirulina có hàm lượng nước rất cao 95,31%, trong khi phân tằm có hàm lượng nước 32,71%.

Bảng 1. Hàm lượng chlorophyll từ một số loại nguyên liệu

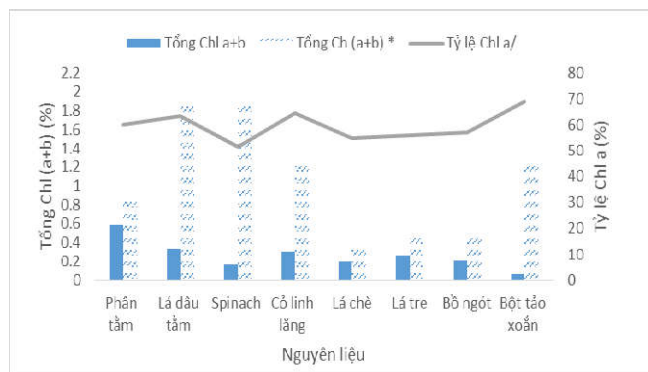
TT	Nguyên liệu	Hàm lượng nước (%)	Hàm lượng (%)				Chla ratio
			Chl a	Chl b	Σ Chl (a+b)	Σ Chl (a+b)*	
1	Phân tằm (silkworm fertilizer)	32,71	0,375	0,223	0,598	0,902	62,713
2	Lá dẫu tằm (Morus alba)	82,15	0,216	0,125	0,340	1,907	63,343
3	Spinach (Spinacia oleracea)	91,03	0,086	0,080	0,166	1,850	51,743
4	Cỏ linh lăng (Medicago sativa)	75,14	0,194	0,107	0,302	1,213	64,481
5	Tảo xoắn (Spirulina platensis)	95,31	0,040	0,018	0,058	1,231	69,147
6	Lá chè (Camellia sinensis)	45,43	0,107	0,088	0,195	0,357	54,892
7	Lá tre (Bambusoideae)	46,73	0,148	0,117	0,265	0,497	55,947
8	Lá bồ ngót (Sauropus androgynous)	55,78	0,119	0,089	0,207	0,469	57,233

Chl a: Chlorophyll a

Chl b: Chlorophyll b

Tổng Chl (a+b): hàm lượng tổng chlorophyll (a+b) tính theo nguyên liệu tươi.

Tổng Chl (a+b)*: hàm lượng tổng chlorophyll (a+b) tính theo nguyên liệu khô tuyệt đối



Hình 1. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa tổng chlorophyll theo nguyên liệu tươi, khô và tỷ lệ chlorophyll a trong nguyên liệu nghiên cứu

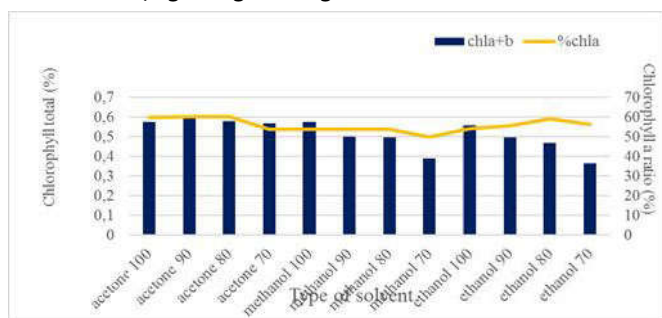
Chính sự chênh lệch hàm lượng nước rất lớn nên nếu qui về hàm lượng khô tuyệt đối, hàm lượng chlorophyll trong một số nguyên liệu nghiên cứu dao động từ 0,357 đến 1,907%, thấp nhất là lá chè 0,357% và cao nhất là lá dẫu tằm 1,907%. Các nguyên liệu có hàm lượng chlorophyll cao: lá dẫu tằm (1,907%), cỏ linh lăng (1,850%) và spinach (1,213 %). Đây là những nguyên liệu đang được sử dụng rất nhiều trong nước và trên thế giới để thu nhận chlorophyll và các dẫn xuất chlorophyll. Tuy nhiên, trong thực tế, những nguyên liệu này có hàm lượng nước rất lớn, khoảng 75 - 90%, lượng chlorophyll thu được tương ứng là 0,216; 0,086 hay 0,194% sinh khối tươi. Vì quá trình tách chlorophyll đạt hiệu quả trên đối tượng là nguyên liệu tươi nên lượng dung môi và thiết bị sử dụng để thu được 1kg chlorophyll là rất lớn.

Phân tằm là nguyên liệu tách chiết chlorophyll tiềm năng khi hàm lượng chlorophyll thu được từ phân tằm tươi (độ ẩm 32,71%) là 0,598%, tương ứng 0,902% sinh khối khô. Nếu sử dụng nguyên liệu này để tách chiết chlorophyll sẽ thu được lượng chlorophyll lớn, giá thành rẻ, giảm lượng dung môi sử dụng, giảm qui mô thiết bị đồng thời còn thu được nhiều hoạt chất sinh học quý trong phân tằm. Đây là qui trình kép, vừa thu chlorophyll, vừa thu các hoạt chất sinh học có giá trị.

3.2. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình chiết chlorophyll từ phân tằm

3.2.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi đến hiệu quả chiết chlorophyll từ phân tằm

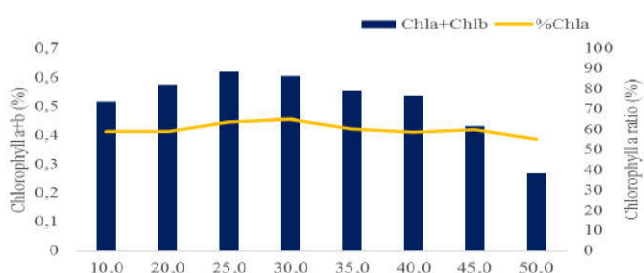
Kết quả khảo sát trên hình 2 cho thấy methanol, acetone và ethanol là những dung môi tốt được sử dụng để chiết xuất chlorophyll. Hàm lượng chlorophyll của phân tằm sử dụng các dung môi khác nhau (methanol, acetone và ethanol 70 - 100%) dao động trong khoảng từ 0,336 - 0,593%.



Hình 2. Ảnh hưởng của dung môi đến hiệu quả chiết chlorophyll từ phân tằm

Do đó, dựa trên các kết quả thu được, chlorophyll a (Chla), chlorophyll b (Chlb), tổng nồng độ chlorophyll và tỷ lệ Chla thay đổi theo loại và tỷ lệ dung môi được sử dụng. Acetone 90% là dung môi thu được tổng lượng diệp lục cao nhất 0,593% và Chla là 60,435%.

3.2.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu quả chiết chlorophyll từ phân tằm



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu quả chiết chlorophyll từ phân tằm

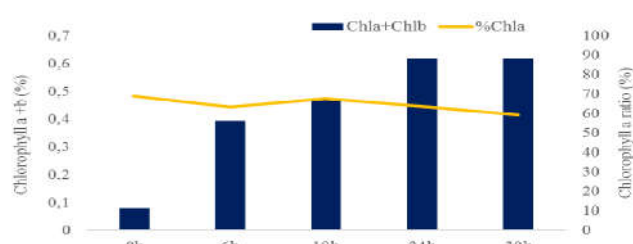
Kết quả thu được trên hình 3 cho thấy ở nhiệt độ 25 - 30°C (nhiệt độ phòng), tổng hàm lượng chlorophyll đạt được cao hơn hàm lượng ở nhiệt độ khác. Hàm lượng chlorophyll lần lượt là 0,598 và 0,585% và tỷ lệ chla đạt 63,81% ở 25°C.

Nhiệt độ tăng thúc đẩy quá trình chiết xuất chlorophyll từ vật liệu. Tuy nhiên, trong trường hợp này, do độ nhạy cảm cao với nhiệt của chlorophyll, chlorophyll

đã được chuyển đổi thành một hợp chất mới - pheophytin (ô liu đen), làm giảm lượng chlorophyll trong vật liệu. Do đó, khi nhiệt độ vượt quá 35°C, hàm lượng chlorophyll và tỷ lệ chla giảm.

3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian ủ mẫu đến hiệu quả chiết chlorophyll từ phân tằm

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian ủ mẫu đến hiệu quả chiết chlorophyll được trình bày trong hình 4. Trong khoảng thời gian ủ mẫu từ 0h đến 30h cho thấy sự thay đổi lớn về hàm lượng chlorophyll tổng đạt giá trị cao nhất 0,635% khi quá trình ủ tiến hành trong 24h, vượt quá thời gian này, hàm lượng chlorophyll tổng thu được không đổi và sẽ giảm dần nếu thời gian ủ quá nhiều do chlorophyll không bền ở điều kiện tự nhiên. Vì vậy chúng tôi chọn thời gian ủ mẫu là 24h.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian ủ mẫu đến hiệu quả chiết chlorophyll từ phân tằm

Kết quả nghiên cứu về một số yếu tố ảnh hưởng đến việc chiết xuất chlorophyll từ phân tằm cho thấy acetone 90% là dung môi thích hợp cho quá trình chiết xuất chlorophyll. Nhiệt độ 25°C, tỷ lệ vật liệu/dung môi là 5% và thời gian chiết trong 24 giờ được chọn để chiết xuất chlorophyll.

3.3. Kết quả của tinh sạch chlorophyll

3.3.1. Kết quả tinh sạch chlorophyll sử dụng sắc ký cột silica gel cỡ hạt 0,040 - 0,063mm

Cao chiết acetone phân tằm (TA-25g) được tiến hành sắc ký qua cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane: methanol (D:M) tỷ lệ từ 10:1→1:1. Kiểm tra các phân đoạn nhỏ bằng sắc ký lớp mỏng và hiện màu bằng thuốc thử vanilin-H₂SO₄, sau đó dồn những phân đoạn giống nhau lại, ta thu được 3 phân đoạn chính TA1→TA3.

Phân đoạn TA2 (5,2g) được phân tách trên cột silica gel bằng hệ dung môi dichloromethane: methanol tỷ lệ (3:1), thu được bốn phân đoạn nhỏ từ TA2A→TA2D. Phân đoạn TA2C sau khi cất loại dung môi thu được hỗn hợp chất rắn chlorophyll dưới dạng vô định hình, màu vàng xanh khối lượng 1,2g.

Phân đoạn TA2C được phân tách bằng sắc ký bản mỏng điều chế silica gel pha thường, dung môi triển khai bản mỏng n-butanol: ethanol: nước (4:1:2) thu được 2 hợp chất sạch chlorophyll a (8,0mg) và chlorophyll b (10,0mg).

3.3.2. Kết quả tinh sạch chlorophyll sử dụng sắc ký cột rây phân tử với pha tĩnh là sephadex LH-20

Cao chiết acetone phân tằm (RA-25g) được tiến hành sắc ký qua cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải

ethanol. Kiểm tra các phân đoạn nhỏ bằng sắc ký lớp mỏng và hiện màu bằng thuốc thử vanilin-H₂SO₄, sau đó dồn những phân đoạn giống nhau lại, ta thu được 3 phân đoạn RA1→RA3.

Phân đoạn RA1 (8,6g) được tinh chế lại bằng cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải ethanol thu được hỗn hợp chất rắn chlorophyll dưới dạng vô định hình, màu vàng xanh RA1A (1,8g).

Phân đoạn RA1A được phân tách bằng sắc ký bản mỏng điều chế silica gel pha thường, dung môi triển khai bản mỏng n-butanol: ethanol: nước (4:1:2) thu được 2 hợp chất sạch chlorophyll a (8,0mg) và chlorophyll b (10,0mg).

Từ kết quả trên cho thấy tinh chế chlorophyll từ phân tằm sử dụng sắc ký cột rây phân tử với pha tĩnh là sephadex LH-20 cho hiệu quả cao hơn sử dụng sắc ký cột silica gel.

Hàm lượng chlorophyll tổng thu được cao hơn: (1,8g/25g) so với (1,2g/25g) khi sử dụng sắc ký cột silica gel cỡ hạt 0,040 - 0,063mm.

Sử dụng sephadex LH-20 có khả năng tái sử dụng nhiều lần và dung môi rửa giải bằng ethanol không gây độc.

Chính vì vậy phương pháp tinh chế bằng sắc ký cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải bằng ethanol được ưu tiên sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

4. KẾT LUẬN

Thông qua các kết quả thu nhận được trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy việc tách chiết chlorophyll từ phân tằm cho hàm lượng chlorophyll (0,598%) cao hơn so với các nguyên liệu tươi khác. Ngoài ra việc lựa chọn hệ dung môi acetone: NH₄OH (9/1, v/v) cho hiệu quả chiết suất tối ưu nhất. Quá trình chiết thực hiện trong bóng tối nhằm tránh sự phân hủy của chlorophyll dưới tác dụng của ánh sáng mặt trời. Các kết quả này là rất quan trọng và là cơ sở khoa học cho việc xây dựng quy trình tách chiết chlorophyll ở quy mô công nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Vo Van Chi, 2012. *Từ điển Cây thuốc Việt Nam*. NXB Y học tập 1.
- [2]. Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. NXB Đại học Quốc gia Hồ Chí Minh.
- [3]. T. Cibic, O. Blasutto, K. Hancke, G. Johnsen, 2007. *Microphytobenthic species composition, pigment concentration, and primary production in sublittoral sediments of the Trondheimsfjord (Norway)*. Journal of Phycology, vol. 43, pp. 1126-1137.
- [4]. R. Devesa, A. Moldes, F. Díaz-Fierros, M. Barral, 2007. *Extraction study of algal pigments in river bed sediments by applying factorial design*. Talanta, vol. 72, pp. 1546-1551.
- [5]. A. R. Grinham, T. J. Carruthers, P. L. Fisher, J. W. Udy, W. C. Dennison, 2007. *Accurately measuring the abundance of benthic microalgae in spatially variable habitats, Limnology and Oceanography*. Methods, vol. 5, pp. 119-125.
- [6]. Humphrey A. M., 1980. *Nature and distribution of carotenoids*. Food Chemistry, Vol. 5, pp. 57-67.

[7]. S. E. Hagerthey, J. William Louda, P. Mongkronsri, 2006. *Evaluation of pigment extraction methods and a recommended protocol for periphyton chlorophyll a determination and chemotaxonomic assessment*. Journal of phycology, vol. 42, pp. 1125-1136.

[8]. Khalyfa A., Kermasha S., Alli I., 1992. *Extraction, Purification, and Characterization of Chlorophylls from Spinach Leaves*. J. Agric. Food Chem., Vol. 40, pp. 215-220.

[9]. Lichtenthaler H. K., 1987. *Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes*. Methods Enzymol., Vol. 148, pp. 350-382.

[10]. Scheer H., 1991. *The distribution and extraction of the chlorophylls*. CRC Press: Boca Raton, FL.

[11]. J.D. Strickland, T.R. Parsons, 1972. *Pigment analysis*. A practical handbook of seawater analysis, pp 185-205.

[12]. K. Tada, H. Yamaguchi, S. Montani, 2004. *Comparison of Chlorophyll a concentrations obtained with 90% acetone and N, N-dimethylformamide extraction in coastal seawater*. Journal of oceanography, vol. 60, pp. 259-261.

[13]. K.H. Wiltshire, M. Boersma, A. Moller, H. Buhtz, 2000. *Extraction of pigments and fatty acids from the green alga Scenedesmus obliquus (Chlorophyceae)*. Aquatic Ecology, vol. 34, pp. 119-126.

[14]. Deng Xiangyuan, SHA Peng, GAO Kun, 2011. *Study on Ultrasonic-assisted Organic solvent extraction process for chlorophyll extraction from silkworm faeces*. Chinese Agricultural Science Bulletin, Vol.33, pp. 125-136.

[15]. Deng Xiangyuan, SHA Peng, GAO Kun, 2012. *Study on microwave-assisted organic solvent extraction process for chlorophyll extraction from silkworm faeces*. Journal of Northeast Agricultural University, Vol.08, pp. 08- 15.

AUTHORS INFORMATION

Pham Quynh Trang^{1,3}, Do Trung Sy¹, Tran Huu Quang¹, Hoang Thi Bich²,
Pham Thi Hong Minh², Vu Minh Quang³, Nguyen Thi Huong³

¹Institute of Chemistry, Vietnamese Academy of Science and Technology

²Institute of Natural Products Chemistry, Vietnamese Academy of Science and Technology

³Hanoi University of Industry