

NGHIÊN CỨU TẠO GIẤY PH TỪ ANTHOCYANIN CHIẾT XUẤT TỪ HOA ATISO ĐỎ (*HIBISCUS SABDARIFFA L.*) ĐỂ ỨNG DỤNG TRONG PHÂN TÍCH VÀ THỰC PHẨM

● VÕ NGỌC TƯỜNG VI - HOÀNG THỊ NGỌC NHƠN

TÓM TẮT:

Anthocyanin là một chất màu tự nhiên, tan được trong nước tạo ra nhiều màu hấp dẫn cho thực phẩm nhờ vào khả năng đổi màu theo pH của môi trường. Khi pH thay đổi từ môi trường acid sang môi trường bazơ, màu của anthocyanin thay đổi từ đỏ sang xanh và hấp thụ cực đại tại bước sóng $\lambda_{max} = 517 \div 620$ nm ứng với mỗi pH. Việc ứng dụng anthocyanin như một chất chỉ thị trong phân tích là hợp lý và khả quan. Nghiên cứu này tập trung khảo sát các ảnh hưởng trong quá trình sản xuất giấy thử pH từ anthocyanin và đã chọn được các thông số thích hợp với tỉ lệ pha loãng dịch anthocyanin là 8:2 tương đương nồng độ anthocyanin 1.583 mg/ml; thời gian tẩm dịch vào giấy là 90 giây; khoảng đổi màu của chỉ thị là 5.5-7.5. Về độ nhạy của giấy khi thử trên dãy đệm có pH từ 1 đến 14 cũng cho kết quả khả quan.

Từ khóa: *Hibiscus Sabdariffa L.*, anthocyanin, chất màu, pH, giấy chỉ thị.

1. Đặt vấn đề

Hoa atiso đỏ (*Hibiscus Sabdariffa L.*) từ lâu đã được người Hy Lạp và người La Mã sử dụng như một loại rau ăn hàng ngày. Cây rất giàu phytochemical như polyphenol đặc biệt là anthocyanin, polysaccharide và axit hữu cơ, do đó chúng có tác dụng rất lớn trong việc trị liệu các bệnh tật [1]. Trong y học dân gian, chiết xuất từ đài hoa được sử dụng để điều trị một số bệnh, như: huyết áp cao, bệnh gan và sốt [2]. Về nguồn gốc của chúng có sự khác nhau giữa các tác giả, theo Crane J. [3] cho là một cây bản địa của Tây Phi và từ đó nó được chuyển đến các phần khác của thế giới như châu Á và châu Mỹ, trong khi theo ý kiến

khác của Mat Isa A. và cộng sự cho rằng có nguồn gốc từ Ấn Độ [4] còn AbuTarboush H. và cộng sự cho rằng từ Ả Rập Saudi [5].

Anthocyanin là một hợp chất sinh học chiếm chủ yếu trong thành phần hoa atiso đỏ. Anthocyanin trong atiso đỏ chủ yếu là delphinidin-3-glucoside, sambubioside và cyanidin-3-sambubioside [6, 7]. Anthocyanin có nhiều tác dụng tốt cho sức khỏe như hạ mỡ máu và chống xơ vữa động mạch, giúp hạ huyết áp và bảo vệ gan [8][9]. Ngoài ra, anthocyanin còn có khả năng thay đổi màu sắc theo pH của môi trường. Khi pH môi trường bằng 1 thì các cấu tử anthocyanin ở dạng muối oxonium màu cam đến đỏ, ở pH 4-5

anthocyanin chuyển về dạng bazơ cacbinol hay bazơ chalcon không màu, ở pH 7-8 chúng chuyển về dạng bazơ quinoidal anhydro màu xanh [10].

Với khả năng đổi màu rõ rệt theo pH, anthocyanin có khả năng ứng dụng như một chất chỉ thị pH trong phân tích thực phẩm và hóa học. Nghiên cứu này tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo chỉ thị pH từ anthocyanin nhằm tìm ra phương pháp nâng cao độ nhạy của giấy chỉ thị khi được sử dụng trên thị trường.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Đài hoa *Hibiscus sabdariffa L.* được mua ở thị trấn Ea Kar, huyện Ea Kar - Dak Lak. Đài hoa được rửa sạch, sấy ở nhiệt độ 60°C cho đến khi độ ẩm ≤ 10%, nghiền thành bột mịn và bảo quản trong túi zipper kín tránh ánh sáng.

2.2. Hóa chất

NaOH (96%, Trung Quốc), HCl (36.5%, Trung Quốc), KCl (98%, Trung Quốc), Na₂B₄O₇ (99.5%, Trung Quốc).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Chuẩn bị bột anthocyanin

Đài hoa *Hibiscus Sabdariffa L.* được rửa sạch, sấy ở nhiệt độ 60°C cho đến khi độ ẩm ≤ 10% và được nghiền thành bột mịn. Cân 1 gam mẫu nguyên liệu (tính theo hàm lượng chất khô) bổ sung thêm ethanol 90% với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 (w/v), điều chỉnh pH dung dịch về 3, trích ở 50°C trong 120 phút. Sau thời gian trích, tiến hành ly tâm dịch trích 5.500 vòng trong 15 phút để thu dịch trong nhằm xác định hàm lượng anthocyanin bằng phương pháp pH vi sai. Dịch trích sau khi được xác định hàm lượng anthocyanin được đem đi cô quay chân không ở 40°C trong 60 phút. Dịch sau cô quay được phối trộn với maltodextrin và gum arabic cho đến khi hàm lượng chất khô đạt 25% Brix. Sau đó dịch anthocyanin được sấy phun ở 170°C, lưu lượng nhập liệu 7 ml/phút thu được chế phẩm anthocyanin ở dạng bột.

2.3.2. Khảo sát nồng độ anthocyanin phù hợp để sản xuất chỉ thị pH

Giấy lọc được rửa bằng dung dịch HCl 0.1N sau đó rửa bằng nước và bằng dung dịch amoniac 5%, rửa lại bằng nước cất và sấy khô. Chế phẩm anthocyanin được pha loãng theo tỉ lệ sau 8:2, 6:4, 5:5, 4:6, 2:8 (anthocyanin/dung môi, w/v). Sau đó tiến hành tẩm dung dịch vào giấy lọc để xác định độ nhạy của chỉ thị. Giấy sau khi ngâm được sấy khô ở 50°C trong 60 phút. Giấy chỉ thị anthocyanin

được nhúng lần lượt qua dãy đệm có pH từ 1 đến 14. Theo dõi sự đổi màu của chỉ thị.

2.3.3. Khảo sát thời gian ngâm tẩm anthocyanin vào giấy lọc

Giấy lọc được rửa bằng acid HCl 0.1N, sau đó rửa bằng nước và bằng dung dịch amoniac 5%, rửa lại bằng nước cất và sấy khô. Chế phẩm anthocyanin được pha loãng với dung môi theo tỉ lệ chọn ở kết quả thí nghiệm 2.3.2. Sau đó giấy lọc được tẩm vào dung dịch anthocyanin trong 1 giây, 30 giây, 60 giây, 90 giây, 120 giây, 150 giây. Giấy sau khi ngâm được sấy khô ở 50°C trong 60 phút. Tiếp theo, giấy chỉ thị được nhúng lần lượt qua dãy đệm có pH từ 1 tới 14. Quan sát sự đổi màu của chỉ thị.

2.3.4. Xác định khoảng đổi màu của chỉ thị anthocyanin

Pha dãy dung dịch đệm có pH: 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5 trong các ống nghiệm. Lần lượt nhỏ một giọt dung dịch chế phẩm anthocyanin đã pha loãng theo nồng độ đã chọn ở thí nghiệm 2.3.1. vào mỗi dung dịch đệm. Tiến hành xác định khoảng đổi màu của chỉ thị anthocyanin.

2.4. Phương pháp phân tích và định lượng anthocyanin

Hàm lượng anthocyanin được xác định bằng phương pháp quang phổ UV - VIS. Công thức tính [11]

$$\text{Hàm lượng anthocyanin (mg/g)}$$

$$= A \times DF \times MW \times V \times 1000/L$$

$$A = (A_{\lambda_{max}} - A_{\lambda 700})_{pH=1} - (A_{\lambda_{max}} - A_{\lambda 700})_{pH=4.5}$$

DF: thể tích mẫu pha loãng

L: chiều dài curvet (1cm)

MW: khối lượng phân tử cyanidin - 3 - glucoside = 449.2 g/mol

$$\text{Hệ } \lambda = 26900 \text{ l/mol}$$

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lập lại 3 lần, kết quả được xử lý với phần mềm Microsoft Excel 2016, sự khác biệt và chọn thông số phù hợp dựa trên kết quả phân tích của phần mềm IBM SPSS Statistics 20.

3. Kết quả và thảo luận

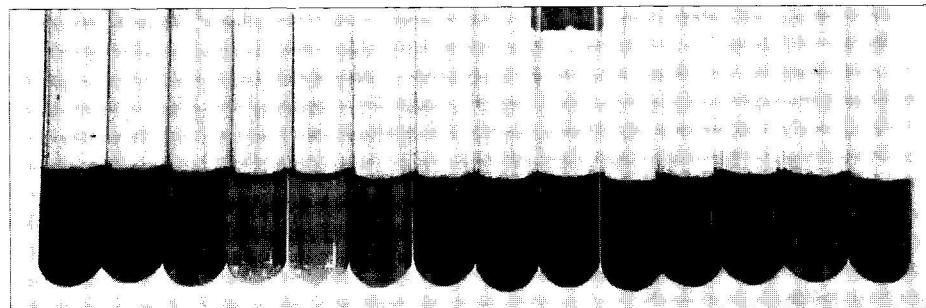
3.1. Khảo sát nồng độ anthocyanin phù hợp để sản xuất chỉ thị pH

Kết quả khảo sát nồng độ anthocyanin được thể hiện ở Bảng 1 + Hình 1.

Qua khảo sát thấy rằng anthocyanin đổi màu rõ rệt qua từng pH (từ đỏ sang xanh). Có thể giải thích trong môi trường pH, anthocyanin tồn tại ở cation flavylium có màu đỏ. Khi pH tăng dần, có sự tấn

Bảng 1. Ảnh hưởng nồng độ anthocyanin để sản xuất giấy pH

pH	Tỉ lệ anthocyanin: dung môi				
	2:8	4:6	5:5	6:4	8:2
1	Không đổi màu	Đỏ nhạt	Đỏ nhạt	Đỏ nhạt	Đỏ đậm
2	Không đổi màu	Đỏ nhạt	Đỏ nhạt	Đỏ nhạt	Đỏ
3	Không đổi màu	Cam nhạt	Hồng nhạt	Hồng nhạt	Đỏ cam
4	Không đổi màu	Không đổi màu	Hồng nhạt	Hồng nhạt	Hồng cam nhạt
5	Không đổi màu	Không đổi màu	Hồng nhạt	Hồng nhạt	Không đổi màu
6	Không đổi màu	Không đổi màu	Hồng nhạt	Hồng nhạt	Tím hồng nhạt
7	Không đổi màu	Không đổi màu	Không đổi màu	Không đổi màu	Tím hồng
8	Không đổi màu	Tím nhạt	Tím nhạt	Tím nhạt	Tím nâu
9	Không đổi màu	Tím nhạt	Tím nhạt	Tím nhạt	Nâu nhạt
10	Không đổi màu	Tím nhạt	Tím nhạt	Tím nhạt	Nâu
11	Không đổi màu	Tím nhạt	Tím nhạt	Tím nhạt	Nâu đậm
12	Không đổi màu	Xanh lá mạ	Tím nhạt	Tím nhạt	Xanh lá mạ nhạt
13	Không đổi màu	Xanh lá mạ	Xanh lá mạ	Xanh lá mạ	Xanh lá mạ
14	Không đổi màu	Xanh lá mạ	Xanh lá mạ	Xanh lá mạ	Xanh lá đậm

Hình 1. Anthocyanin trong dây đệm có pH từ 1 đến 14

công của nước vào vòng pyran C nên anthocyanin chuyển dần sang dạng base carbinol và chalcone không màu. Quá trình này được gọi là quá trình hydrat hóa. Trong dung dịch base, có sự dịch chuyển của H⁺ từ OH⁻ trên vòng B, anthocyanin chuyển sang dạng anion có màu xanh. Khi pH môi trường càng cao, ion H⁺ trong nhóm OH bị phân hủy nên điện tử không còn, màu xanh trở nên xanh hơn bởi ánh sáng hấp thụ trở nên đỏ hơn. Trong môi trường trung tính, cả hai dạng cùng tồn tại nên dung dịch cho màu tím.

Từ Bảng 1 cho thấy, ở tỉ lệ 8:2 thì giấy

anthocyanin có độ nhạy cao nhất và cho kết quả đổi màu rõ rệt nhất. Khi nồng độ anthocyanin quá cao hoặc quá thấp thì đều ảnh hưởng đến độ nhạy của chỉ thị pH. Khi nồng độ anthocyanin quá cao sẽ gây ức chế việc đổi màu của chỉ thị theo pH, còn khi pha loãng quá nhiều thì hàm lượng anthocyanin trong giấy không đủ để có thể biểu hiện rõ ra bên ngoài. Vì vậy, tỉ lệ 8:2 được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Khảo sát thời gian ngâm tẩm anthocyanin vào giấy lọc

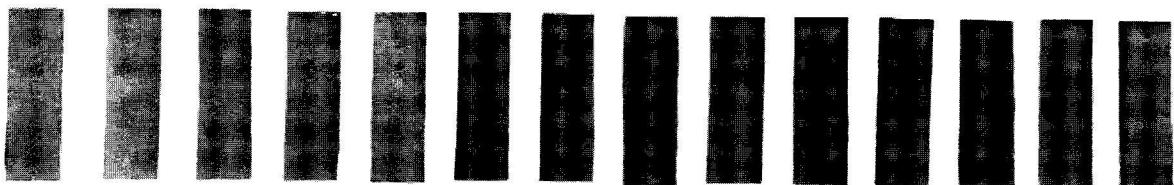
Thời gian ngâm tẩm dịch màu lên giấy lọc có ý nghĩa quan trọng trong việc nhận biết các giá trị pH khác nhau. Kết quả khảo sát thời gian ngâm tẩm anthocyanin vào giấy lọc được thể hiện ở Bảng 2 + Hình 2.

Nếu thời gian tẩm dịch ít hơn 90 giây thì giấy chỉ

Bảng 2. Ảnh hưởng thời gian ngâm tẩm anthocyanin vào giấy lọc

pH	Thời gian					
	1 giây	30 giây	60 giây	90 giây	120 giây	150 giây
1	Không đổi màu	Đỏ nhạt	Đỏ nhạt	Đỏ đậm	Đỏ	Không đổi màu
2	Không đổi màu	Đỏ nhạt	Đỏ nhạt	Đỏ	Đỏ nhạt	Không đổi màu
3	Không đổi màu	Cam nhạt	Hồng nhạt	Đỏ cam	Hồng	Không đổi màu
4	Không đổi màu	Không đổi màu	Hồng nhạt	Hồng nhạt	Hồng nhạt	Không đổi màu
5	Không đổi màu	Không đổi màu	Hồng nhạt	Tím nhạt	Hồng nhạt	Không đổi màu
6	Không đổi màu	Không đổi màu	Hồng nhạt	Tím	Không đổi màu	Không đổi màu
7	Không đổi màu	Không đổi màu	Không đổi màu	Tím xanh	Không đổi màu	Không đổi màu
8	Không đổi màu	Tím nhạt	Tím nhạt	Tím nâu	Tím nhạt	Không đổi màu
9	Không đổi màu	Tím nhạt	Tím nhạt	Nâu	Nâu nhạt	Không đổi màu
10	Không đổi màu	Tím nhạt	Tím nhạt	Xanh đen	Nâu nhạt	Không đổi màu
11	Không đổi màu	Tím nhạt	Tím nhạt	Xanh dương đậm	Nâu nhạt	Không đổi màu
12	Không đổi màu	Xanh lá mạ	Tím nhạt	Xanh dương	Xanh lá nhạt	Không đổi màu
13	Không đổi màu	Xanh lá mạ	Xanh lá mạ	Xanh lá	Xanh lá nhạt	Không đổi màu
14	Không đổi màu	Xanh lá mạ	Xanh lá mạ	Xanh lá đậm	Xanh lá nhạt	Không đổi màu

Hình 2: Sự đổi màu của giấy chỉ thị anthocyanin trong dung dịch đệm có pH từ 1 đến 14



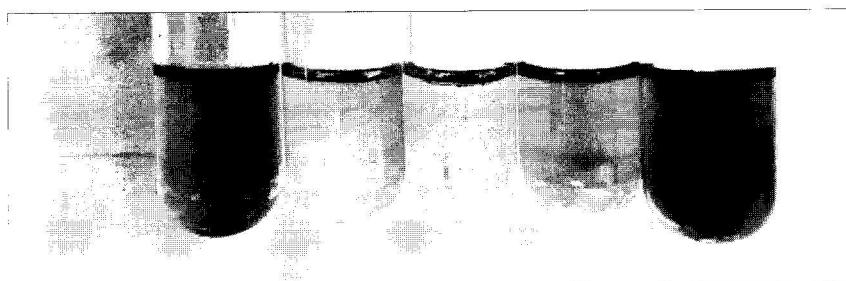
thì không đổi màu ở một số pH xác định, khi thời gian tẩm dịch lớn hơn 90 giây thì giấy cho kết quả tương đối rõ rệt ở các pH xác định, nếu thời gian tẩm giấy là 150 giây thì chỉ thị không cho kết quả (Hình 2). Nguyên nhân là thời gian tẩm anthocyanin ngắn thì hàm lượng anthocyanin trong giấy không đủ để các phản ứng xảy ra, do đó giấy không đổi màu, còn nếu thời gian tẩm dài thì hàm lượng anthocyanin trong giấy quá cao gây ức chế phản ứng giữa anthocyanin với dung dịch pH dẫn đến giấy cũng không đổi màu. Do đó, thời gian tẩm anthocyanin vào giấy lọc phù hợp là 90 giây.

3.3. Xác định khoảng đổi màu của chỉ thị

Khoảng đổi màu của chỉ thị là một yếu tố quan trọng nhằm xác định chất lượng, độ nhạy của chỉ thị đó. Dùng anthocyanin để kết thúc quá trình định phân và tiến hành đo pH tại thời điểm khi dung dịch bắt đầu chuyển từ đỏ sang màu tím xanh, để xác định khoảng pH đổi màu. Để khẳng định lại khoảng đổi màu của anthocyanin, tiến hành xác định khoảng đổi màu bằng phương pháp so màu: Pha dãy dung dịch đệm có pH lần lượt là 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5 trong các ống nghiệm. Nhỏ một giọt anthocyanin lần lượt vào mỗi dung dịch đệm và

Bảng 3. Khoảng đổi màu của chất chỉ thị anthocyanin

pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
Kết quả	Hồng cam nhạt	Cam nhạt	Không đổi màu	Tím hồng	Tím

Hình 3. Dây màu của anthocyanin thay đổi từ pH 5.5 – 7.5

quan sát sự đổi màu. Kết quả thể hiện ở Bảng 3 + Hình 3.

Từ kết quả nghiên cứu đã xác định được khoảng đổi màu của chất chỉ thị anthocyanin nằm trong khoảng pH= 5.0-7.5. Như vậy, khoảng đổi màu của

chất màu anthocyanin khá hẹp và quá trình thay đổi màu rất rõ, đây là một trong những yêu cầu cần thiết cho một chất chỉ thị.

4. Kết luận

Lựa chọn tỉ lệ pha loãng dịch anthocyanin phù hợp là 8:2 (anthocyanin/dung môi, w/v) cho nồng độ anthocyanin tương ứng là

1.583 mg/ml để bước đầu sản xuất giấy chỉ thị pH. Chọn thời gian tẩm dịch lên giấy là 90 giây và khoảng đổi màu của chỉ thị là 5.5-7.5. Kết quả này mở ra nhiều ứng dụng hơn cho các chất màu tách chiết từ thực vật ■

Lời cảm ơn:

Nghiên cứu này do Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo hợp đồng số 78/HĐ - DCT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

- I. I. Da-Costa-Rocha et al. (2014). Hibiscus sabdariffa L.–A phytochemical and pharmacological review. *Food chemistry*, 165, 424-443.
2. B. H. Ali et al. (2005). Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19(5), 369-375.
3. J. C. Crane. (1949). Roselle-a potentially important plant fiber, *Economic Botany*, 3(1), 89-103.
4. A. Mat Isa et al. (1985). Analisis kimia dan pemrosesan roselle (*Hibiscus sabdariffa L.*). *Mardi Research Bulletin*, 13, 68-74.
5. H. M. Abu-Tarboush et al. (1997). Some nutritional and functional properties of karkade (*Hibiscus sabdariffa*) seed products. *Cereal Chemistry*, 74(3), 352-355.
6. A. A. Abou-Arab et al. (2011), Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*). *Journal of American Science*, 7(7), 445-456.
7. M. A. Madrau et al. (2009). Effect of drying temperature on polyphenolic content and antioxidant activity of apricots. *European Food Research and Technology*, 228(3), 441.
8. A. G. Al-Hashimi (2012), Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. *African Journal of Food Science*, 6(21), 506-511.

9. A. Herrera-Arellano et al. (2004). Effectiveness and tolerability of a standardized extract from Hibiscus sabdariffa in patients with mild to moderate hypertension: A controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine*, 11(5), 375-382.
10. V. Thị Kim Oanh and V. Thị Hằng (2015), Ảnh hưởng của xử lý chất chống nâu hóa đến chất lượng và tuổi thọ của quả đào Lào Cai bảo quản lạnh, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, No. 7, p. 1179.
11. A. F. M. A. Nordiyannah Anuar, Naziz Saat. (2013). Optimization of Extraction Parameters by Using Response Surface Methodology, Purification, and Identification of Anthocyanin Pigments in Melastoma malabathricum Fruit. *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2013/810547>.

Ngày nhận bài: 29/12/2020

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 5/1/2021

Ngày chấp nhận đăng bài: 12/1/2021

Thông tin tác giả:

1. VÕ NGỌC TƯỜNG VI

2. ThS. HOÀNG THỊ NGỌC NHƠN

Khoa Công nghệ thực phẩm

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh

**A RESEARCH TO CREATE PH PAPER
FROM ANTHOCYANIN EXTRACTED
FROM RED ATISO FLOWER (*HIBISCUS SABDARIFFA L.*)
TO USE IN ANALYSES AND FOOD INDUSTRY**

● VO NGOC TUONG VI

● Master, HOANG THI NGOC NHON

Food Science and Technology Faculty

Ho Chi Minh City University of Food Industry

ABSTRACT:

Anthocyanin is a natural, water-soluble colorant that creates many attractive colors for foods thanks to its ability to change color according to the pH of the environment. When the pH changes from acid to base medium, anthocyanin color changes from red to blue and it is absorbed maximum at wavelength $\lambda_{max} = 517 \div 620$ nm for each pH. With this useful feature, the application of anthocyanin as an analytical indicator is reasonable and satisfactory. This study focuses on investigating the effects in the production of pH test papers from anthocyanins and has selected the appropriate parameters with anthocyanin dilution ratio of 8:2 equivalent to 1,508 mg/ml anthocyanin concentration. Time to impregnate the paper is 90 seconds. Indicator color change range is from 5.5 to 7.5. The paper's sensitivity when it was tested on buffers with pH from 1 to 14 also gave positive results.

Keywords: *Hibiscus Sabdariffa L.*, anthocyanin, colorants, pH, indicator pH.