

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO TẬP ĐOÀN HÓA CHẤT VIỆT NAM
VIỆN HÓA HỌC CÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

NGUYỄN THỊ MINH NGUYỆT

**NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH, TINH CHẾ LUTEIN,
ZEAXANTHIN VÀ BÀO CHẾ CHẾ PHẨM DẠNG NHỮ
TƯƠNG KÍCH THƯỚC NANO TỪ CÁNH HOA CÚC VẠN
THỌ (*TARGETES ERECTA* L.)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội, 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO TẬP ĐOÀN HÓA CHẤT VIỆT NAM
VIỆN HÓA HỌC CÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

NGUYỄN THỊ MINH NGUYỆT

**NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH, TINH CHẾ LUTEIN,
ZEAXANTHIN VÀ BÀO CHẾ CHẾ PHẨM DẠNG NHỮ
TƯƠNG KÍCH THUỐC NANO TỪ CÁNH HOA CÚC VẠN
THỌ (*TARGETES ERECTA* L.)**

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 9.44.01.14

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS Vũ Thị Thu Hà

PGS.TS Nguyễn Thanh Bình

Hà Nội, 2023

LỜI CAM ĐOAN

Đề tài: “Nghiên cứu chiết tách, bào chế và đặc tính của nano lutein, zeaxanthin từ cây Cúc vạn thọ” nằm trong khuôn khổ các hướng nghiên cứu của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ lọc, hóa dầu. Tôi xin cam đoan đề tài là một công trình nghiên cứu độc lập, không có sự sao chép của người khác. Các số liệu nghiên cứu khoa học và kết quả nghiên cứu của luận án là trung thực. Các tài liệu tham khảo đã được ghi rõ nguồn trích dẫn.

Hà Nội, ngày 02 tháng 07 năm 2023

Nguyễn Thị Minh Nguyệt

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến GS. TS Vũ Thị Thu Hà và PGS. TS Nguyễn Thanh Bình - hai người Thầy đã định hướng khoa học và tận tình hướng dẫn tôi thực hiện luận án. Thầy, Cô là người đã dạy cho tôi sự nghiêm túc trong khoa học, luôn tin tưởng và động viên, khích lệ tôi hoàn thành luận án!

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn trân trọng tới Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam, phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ lọc, hóa dầu đã nhiệt tình giúp đỡ, tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi hoàn thành luận án!

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban chủ nhiệm chương trình Hóa Dược (dự án Hoàn thiện quy trình công nghệ chiết xuất, tinh chế các hoạt chất lutein, zeaxanthin từ cây Cúc vạn thọ) của Bộ Công thương đã hỗ trợ kinh phí thực hiện luận án!

Tôi xin chân thành cảm ơn trường Đại học Hàng hải Việt Nam, Viện Môi trường – Trường Đại học Hàng hải Việt Nam đã quan tâm và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn những người thân trong gia đình và bạn bè đã luôn ở bên, giúp đỡ, động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận án!

Hà Nội, ngày 02 tháng 07 năm 2023

Nguyễn Thị Minh Nguyệt

MỤC LỤC

| | |
|---|-----|
| LỜI CAM ĐOAN | i |
| LỜI CẢM ƠN..... | ii |
| MỤC LỤC | i |
| DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT | v |
| DANH MỤC BẢNG | vii |
| DANH MỤC HÌNH | x |
| MỞ ĐẦU | 1 |
| CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN | 3 |
| 1.1. LUTEIN VÀ ZEAXANTHIN | 3 |
| 1.1.1. Nguồn gốc lutein trong tự nhiên | 5 |
| 1.1.2. Hoạt tính của lutein | 5 |
| 1.1.3. Ứng dụng của lutein..... | 9 |
| 1.2. CHI CÚC VẠN THỌ | 10 |
| 1.3. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH VÀ TINH CHẾ LUTEIN..... | 12 |
| 1.3.1. Tiền xử lý nguyên liệu hoa Cúc vạn thọ..... | 13 |
| 1.3.2. Các phương pháp chiết tách lutein este | 14 |
| 1.3.3. Các phương pháp làm giàu cao chiết chứa lutein este..... | 17 |
| 1.3.4. Các phương pháp thủy phân lutein este..... | 17 |
| 1.3.5. Phương pháp tinh chế lutein..... | 19 |
| 1.3.6. Kết tinh lại zeaxanthin | 20 |
| 1.4. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH LUTEIN VÀ ZEAXANTHIN | 21 |

| | |
|---|----|
| 1.5. MỘT SỐ BIỆN PHÁP CẢI THIẾN SINH KHẢ DỤNG CỦA LUTEIN DÙNG ĐƯỜNG UỐNG | 23 |
| 1.5.1. Bào chế hệ nano tinh thể | 23 |
| 1.5.2. Bào chế hệ phân tán rắn..... | 26 |
| 1.5.3. Bào chế micell..... | 26 |
| 1.5.4. Bào chế vi nhũ tương/ nhũ tương nano | 26 |
| 1.5.5. Ưu điểm và nhược điểm của các hệ phân tán | 28 |
| 1.6. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU Ở VIỆT NAM..... | 30 |
| 1.7. MỘT SỐ KẾT LUẬN RÚT RA TỪ TỔNG QUAN TÀI LIỆU | 32 |
| CHƯƠNG 2: THỰC NGHIỆM..... | 34 |
| 2.1. NGUYÊN LIỆU, HÓA CHẤT, DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ..... | 34 |
| 2.1.1. Nguyên liệu, hóa chất | 34 |
| 2.1.2. Dụng cụ và thiết bị..... | 35 |
| 2.2. PHƯƠNG PHÁP THỰC NGHIỆM..... | 37 |
| 2.2.1. Sơ chế - bảo quản nguyên liệu | 37 |
| 2.2.2. Xác định hàm lượng lutein tổng trong bột hoa Cúc vạn thọ | 38 |
| 2.2.3. Tiền xử lý nguyên liệu hoa Cúc vạn thọ..... | 38 |
| 2.2.4. Chiết tách cao chiết giàu lutein từ nguyên liệu cánh hoa Cúc vạn thọ | 39 |
| 2.2.5. Làm giàu cao chiết..... | 40 |
| 2.2.6. Thủy phân cao chiết và tinh chế tinh thể lutein..... | 41 |
| 2.2.7. Điều chế chất chuẩn lutein và zeaxanthin phân tích HPLC..... | 43 |
| 2.2.8. Xác định điều kiện bảo quản và độ ổn định của lutein..... | 45 |
| 2.2.9. Thu hồi và tái sử dụng các nguồn thải trong quá trình chiết tách lutein..... | 45 |
| 2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ĐỘ TÍNH CẤP VÀ ĐỘ TÍNH BÁN TRƯỜNG ĐIỆN CỦA LUTEIN | 46 |

| | |
|--|-----|
| 2.3.1. Nghiên cứu độc tính cấp LD ₅₀ | 46 |
| 2.3.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn | 48 |
| 2.3.3. Các chỉ tiêu đánh giá..... | 48 |
| 2.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP BÀO CHẾ NHỮ TƯƠNG NANO LUTEIN | 48 |
| 2.4.1. Phương pháp bào chế..... | 48 |
| 2.4.2. Phương pháp đánh giá | 50 |
| 2.4.3. Phương pháp qui hoạch thực nghiệm và tối ưu hóa | 50 |
| 2.5. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG LUTEIN, ZEAXANTHIN | 50 |
| 2.5.1. UV-Vis | 50 |
| 2.5.2. Sắc ký lỏng | 51 |
| 2.5.3. Các phương pháp phân tích khác..... | 52 |
| CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN | 54 |
| 3.1. LỰA CHỌN NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP SƠ CHẾ, BẢO QUẢN | 54 |
| 3.1.1. Đánh giá chất lượng và lựa chọn nguyên liệu..... | 54 |
| 3.1.2. Phơi mẫu trong bóng râm..... | 55 |
| 3.1.3. Sấy CVT tươi bằng các phương pháp khác | 56 |
| 3.2. CHIẾT TÁCH VÀ TINH CHẾ LUTEIN VÀ ZEAXANTHIN ĐẠT TIÊU CHUẨN DƯỢC ĐIỀN | 59 |
| 3.2.1. Tiền xử lý nguyên liệu bột hoa Cúc vạn thọ khô..... | 59 |
| 3.2.2. Chiết tách cao chiết giàu lutein este từ nguyên liệu hoa Cúc vạn thọ..... | 64 |
| 3.2.3. Làm giàu cao chiết bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng | 70 |
| 3.2.4. Thủy phân cao chiết giàu lutein este..... | 76 |
| 3.2.5. Tinh chế lutein..... | 88 |
| 3.2.6. Phân lập lutein và zeaxanthin làm chất chuẩn phân tích..... | 95 |
| 3.2.7. Phương pháp bảo quản sản phẩm lutein và zeaxanthin..... | 108 |

| | |
|--|-----|
| 3.3. KIỂM NGHIỆM ĐỘ ỔN ĐỊNH VÀ ĐỘC TÍNH CỦA SẢN PHẨM..... | 109 |
| 3.3.1. Độ ổn định của sản phẩm lutein..... | 109 |
| 3.3.2. Thử nghiệm độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của sản phẩm lutein | 110 |
| 3.4. BÀO CHẾ NHỮ TƯƠNG NANO LUTEIN | 118 |
| 3.4.1. Lựa chọn thông số để thiết kế thí nghiệm | 118 |
| 3.4.2. Thiết kế thí nghiệm | 123 |
| 3.4.3. Phân tích quy luật tác động | 125 |
| 3.4.4. Lựa chọn công thức bào chế nhũ tương nano tối ưu | 128 |
| 3.4.5. Một số tính chất hóa - lý của hệ vi nhũ tương lutein..... | 129 |
| 3.5. TÁI SỬ DỤNG CÁC NGUỒN THẢI TRONG QUÁ TRÌNH CHIẾT TÁCH LUTEIN TỪ HOA CÚC VẠN THỌ | 130 |
| 3.5.1. Thu hồi và tái sử dụng tác nhân tiền xử lý | 130 |
| 3.5.2. Xử lý bã chiết | 131 |
| KẾT LUẬN | 134 |
| NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN..... | 136 |
| DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ | 137 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | 138 |
| PHỤ LỤC | 153 |

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

| Chữ viết tắt | Tiếng Anh | Tiếng Việt |
|--------------|---|--|
| AC | Acetone | Axeton |
| ACN | Acetonitrile | Axetonitril |
| AST | Aspatat transaminase | |
| ANOVA | Analysis of variance | Phân tích phương sai |
| ALT | Alanine transaminase | |
| CVT | Marigold | Cúc vạn thọ |
| COSY | Correlated spectroscopy | |
| DC | | Dược chất |
| DEPT | Distortionless enhancement by polarization transfer | Phổ xác định số lượng proton trên cacbon |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | Phân tử mang thông tin di truyền |
| EtOH | Ethanol | Etanol |
| FA | Formic acid | Formic axit |
| FDA | Food and drug administration | Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm |
| HBV | Hepatitis B virus | Virus viêm gan B |
| Hex | <i>n</i> -Hexan | <i>n</i> -Hexan |
| HPLC | High performance liquid chromatography | Sắc kí lỏng hiệu năng cao |
| HSQC | Heteronuclear single-quantum coherence | Kỹ thuật HSQC của phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều |
| HMBC | Heteronuclear multiple-quantum coherence | Kỹ thuật HMBC của phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều |
| LC-MS | Liquid chromatography-mass spectrometry | Sắc ký lỏng khối phổ |

| | | |
|------------------|--|--|
| LC-MS/MS | Liquid chromatography-tandem mass spectrometry | Sắc ký lỏng kết hợp khối phổ |
| LD ₅₀ | Lethal dose | Liều gây chết trung bình 50% |
| NMR | Nuclear magnetic resonance | Cộng hưởng từ hạt nhân |
| PTEN | | Gen PTEN |
| SKD | | Sinh khả dụng |
| SNEDDS | Self-nano emulsifying drug delivery system | Hệ vận chuyển thuốc tự tạo nano nhũ |
| TLC | Thin layer chromatography | Sắc ký bản mỏng |
| THF | Tetrahydrofuran | Tetrahydrofuran |
| TLTK | References | Tài liệu tham khảo |
| UV-Vis | Ultraviolet-Visible | Phương pháp hấp phụ tử ngoại, ánh sáng nhìn thấy |
| v/v | Volume/volume | Tỷ lệ thể tích/thể tích |
| v/w | Volume/ weight | Tỷ lệ thể tích/khối lượng |
| w/v | Weight/ volume | Tỷ lệ khối lượng/ thể tích |
| w/w | Weight/weight | Tỷ lệ khối lượng/khối lượng |

DANH MỤC BẢNG

| | |
|---|----|
| Bảng 1.1. Công thức phân tử và tính chất vật lý của lutein và zeaxanthin | 4 |
| Bảng 1.2. Hàm lượng lutein trong một số loài thực vật | 5 |
| Bảng 1.3. Hiệu quả của lutein đối với bệnh tiểu đường và các bệnh khác | 7 |
| Bảng 1.4. Hoạt tính kháng viêm của lutein | 8 |
| Bảng 1.5. Hiệu quả kháng virus của lutein..... | 8 |
| Bảng 1.6. Tác dụng bảo vệ của lutein về bệnh tim mạch..... | 8 |
| Bảng 1.7. Các phương pháp phân tích lutein, zeaxanthin | 21 |
| Bảng 1.8. Phương pháp phân tích lutein, zeaxanthin theo dược điển Mĩ USP 40 | 23 |
| Bảng 1.9. Một số phương pháp bào chế nano tinh thể | 24 |
| Bảng 1.10. Ưu, nhược điểm của các hệ phân tán | 29 |
| Bảng 1.11. Tiêu chuẩn của dược điển Mĩ đối với nguyên liệu lutein | 32 |
| Bảng 2.1. Danh mục nguyên vật liệu, hóa chất sử dụng trong luận án | 34 |
| Bảng 2.2. Danh mục dụng cụ, thiết bị sử dụng trong luận án | 35 |
| Bảng 2.3. Bảng ngoại suy liều tương đương giữa các loài | 47 |
| Bảng 2.4. Điều kiện sắc kí phân tích lutein, zeaxanthin theo HPLC | 51 |
| Bảng 3.1. Hàm lượng lutein tổng của các nguồn nguyên liệu | 54 |
| Bảng 3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian phơi mẫu trong bóng râm đến chất lượng CVT..... | 55 |
| Bảng 3.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến chất lượng CVT..... | 56 |
| Bảng 3.4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian sấy đến chất lượng CVT | 57 |
| Bảng 3.5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ tác nhân tới quá trình xử lý bột CVT khô. 59 | |
| Bảng 3.6. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tới quá trình tiền xử lý bột CVT khô..... | 60 |
| Bảng 3.7. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian tới quá trình xử lý bột CVT | 62 |
| Bảng 3.8. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tác nhân tiền xử lý tới quá trình chiết lutein este từ bột CVT..... | 63 |
| Bảng 3.9. Kết quả chiết bột CVT với dung môi chiết khác nhau..... | 64 |
| Bảng 3.10. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi etyl axetat/ nguyên liệu đến quá trình chiết bột CVT | 65 |
| Bảng 3.11. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết bột CVT..... | 66 |
| Bảng 3.12. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến quá trình chiết bột CVT..... | 67 |

| | |
|--|-----|
| Bảng 3.13. Kết quả chiết bột CVT phụ thuộc vào số lần chiết | 68 |
| Bảng 3.14. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến hiệu quả chiết | 69 |
| Bảng 3.15. Kết quả đánh giá các điều kiện tối ưu của quá trình chiết lutein este từ bột CVT.... | 70 |
| Bảng 3.16. Kết quả đánh giá các điều kiện tối ưu của quá trình chiết lutein từ lượng lớn bột CVT | 70 |
| Bảng 3.17. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của tỷ lệ EtOH/H ₂ O vào khả năng hòa tan cao chiết tổng..... | 71 |
| Bảng 3.18. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi <i>n</i> -hexan/dung dịch cao chiết đến hiệu suất làm giàu cao chiết..... | 72 |
| Bảng 3.19. Kết quả chiết lỏng - lỏng <i>n</i> -hexan ở các nhiệt độ khác nhau | 73 |
| Bảng 3.20. Kết quả chiết lỏng-lỏng <i>n</i> -hexan ở các thời gian chiết khác nhau | 74 |
| Bảng 3.21. Kết quả chiết lỏng - lỏng <i>n</i> -hexan phụ thuộc vào số lần chiết..... | 75 |
| Bảng 3.22. Kết quả đánh giá độ ổn định của phương pháp làm giàu cao chiết | 76 |
| Bảng 3.23. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của tỷ lệ cao chiết/etanol đến hiệu suất thủy phân . | 78 |
| Bảng 3.24. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ KOH/cao chiết đến hiệu suất thủy phân cao chiết | 80 |
| Bảng 3.25. Kết quả thủy phân cao chiết ở các nhiệt độ khác nhau | 81 |
| Bảng 3.26. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất thủy phân lutein este trong cao chiết | 84 |
| Bảng 3.27. Kết quả đánh giá các điều kiện tối ưu của quá trình thủy phân cao chiết..... | 87 |
| Bảng 3.28. Kết quả khảo sát độ hòa tan của lutein trong dung môi..... | 88 |
| Bảng 3.29. Kết quả lựa chọn phương pháp kết tinh khác nhau..... | 89 |
| Bảng 3.30. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi đến quá trình kết tinh lại lutein | 90 |
| Bảng 3.31. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ hệ dung môi/ lutein thô đến quá trình kết tinh lại | 90 |
| Bảng 3.32. Kết quả kết tinh lại lutein trong điều kiện tối ưu | 91 |
| Bảng 3.33. Kết quả HPLC của mẫu M1-1 và M1-tổng..... | 93 |
| Bảng 3.34. Kết quả so sánh chất chuẩn lutein tinh chế và mẫu đối chứng | 102 |
| Bảng 3.35. Kết quả LC-MS/MS của chất chuẩn lutein tinh chế | 103 |
| Bảng 3.36. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến chất lượng lutein..... | 108 |
| Bảng 3.37. Kết quả kiểm nghiệm độ ổn định của lutein | 109 |
| Bảng 3.38. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp theo đường uống của lutein trên chuột..... | 110 |

| | |
|---|-----|
| Bảng 3.39. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến trọng lượng chuột..... | 111 |
| Bảng 3.40. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến số lượng hồng cầu | 111 |
| Bảng 3.41. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến hàm lượng huyết sắc tố..... | 112 |
| Bảng 3.42. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến hematocrit | 112 |
| Bảng 3.43. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc thử đến số lượng bạch cầu | 113 |
| Bảng 3.44. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến số lượng tiểu cầu | 113 |
| Bảng 3.45. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc thử đến hoạt độ AST, ALT..... | 114 |
| Bảng 3.46. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ albumin và cholesterol toàn phần | 115 |
| Bảng 3.47. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến nồng độ creatinin..... | 115 |
| Bảng 3.48. Kết quả xác định ảnh hưởng của chất hoạt động bề mặt ura dầu đến kích thước tiểu phân trung bình của nhũ tương..... | 118 |
| Bảng 3.49. Kết quả xác định ảnh hưởng của chất hoạt động bề mặt ura nước đến kích thước tiểu phân trung bình của nhũ tương..... | 119 |
| Bảng 3. 50. Trạng thái của pha dầu khi thay đổi nồng độ lutein..... | 119 |
| Bảng 3. 51. Trạng thái của hệ nhũ tương lutein khi thay đổi tỷ lệ tween 80 | 120 |
| Bảng 3. 52. Trạng thái của hệ nhũ tương lutein khi thay đổi hàm lượng span 60 | 121 |
| Bảng 3. 53. Trạng thái của hệ nhũ tương lutein khi thay đổi hàm lượng pectin | 123 |
| Bảng 3. 54. Công thức nhũ tương nano..... | 124 |
| Bảng 3. 55. Biến đầu vào..... | 124 |
| Bảng 3. 56. Ma trận thí nghiệm và biến phụ thuộc | 125 |
| Bảng 3. 57. Mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy của các yếu tố tối ưu | 126 |
| Bảng 3. 58. Kết quả đầu ra công thức tối ưu | 128 |
| Bảng 3. 59. Đánh giá công thức tối ưu..... | 128 |
| Bảng 3. 60. Một số tính chất hóa - lý của hệ vi nhũ tương lutein | 129 |
| Bảng 3. 61. Kết quả khảo sát số lần tái sử dụng tác nhân tiền xử lý..... | 130 |
| Bảng 3. 62. Kết quả xử lý bã chiết làm phân bón | 131 |
| Bảng 3. 63. Kết quả khảo sát hàm lượng H ₂ S và NH ₃ phát sinh trong quá trình ủ phân bón .. | 132 |

DANH MỤC HÌNH

| | |
|---|----|
| Hình 1.1. Cấu trúc của lutein và zeaxanthin..... | 3 |
| Hình 1.2. Hoa Cúc vạn thọ (<i>Tagetes L.</i>)..... | 10 |
| Hình 1.3. Cấu tạo phân tử của lutein este | 13 |
| Hình 1.4. Sơ đồ bào chế vi nhũ tương..... | 27 |
| Hình 2.1. Sơ đồ lựa chọn phương pháp sơ chế cánh hoa CVT tươi..... | 37 |
| Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu ảnh hưởng của tiền xử lý bột CVT khô..... | 38 |
| Hình 2.3. Sơ đồ nghiên cứu khảo sát lựa chọn dung môi và các điều kiện chiết..... | 39 |
| Hình 2.4. Sơ đồ nghiên cứu quá trình làm giàu cao chiết | 40 |
| Hình 2.5. Sơ đồ nghiên cứu thủy phân cao chiết thô và tinh chế tinh thể lutein từ cao chiết thô | 42 |
| Hình 2.6. Sơ đồ sơ chế, tiền xử lý, chiết tách, tinh chế lutein..... | 43 |
| Hình 2.7. Sơ đồ nghiên cứu phân lập điều chế chất chuẩn lutein và zeaxanthin | 44 |
| Hình 2.8. Sơ đồ nghiên cứu thu hồi và tái sử dụng tác nhân tiền xử lý | 45 |
| Hình 2.9. Sơ đồ nghiên cứu bào chế nhũ tương nano lutein | 49 |
| Hình 3.1. Ảnh hưởng của thời gian phơi mẫu trong bóng râm đến chất lượng CVT..... | 55 |
| Hình 3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến chất lượng CVT..... | 56 |
| Hình 3.3. Ảnh hưởng của thời gian sấy đến chất lượng CVT | 58 |
| Hình 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới quá trình tiền xử lý bột CVT khô | 61 |
| Hình 3.5. Ảnh hưởng của thời gian tới quá trình xử lý bột CVT | 62 |
| Hình 3.6. Ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất chiết | 64 |
| Hình 3.7. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu đến hiệu suất chiết | 65 |
| Hình 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết bột CVT | 66 |
| Hình 3.9. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình chiết bột CVT | 67 |
| Hình 3.10. Ảnh hưởng của số lần chiết đến quá trình chiết bột CVT | 68 |
| Hình 3.11. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến hiệu quả chiết..... | 68 |
| Hình 3.12. Ảnh hưởng tỷ lệ dung môi <i>n</i> -hexan/dung dịch cao chiết tới quá trình làm giàu cao chiết..... | 72 |
| Hình 3.13. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới quá trình làm giàu cao chiết..... | 73 |
| Hình 3.14. Ảnh hưởng của thời gian tới quá trình làm giàu cao chiết | 74 |
| Hình 3.15. Sắc ký đồ HPLC của cao chiết chưa thủy phân (lutein este) | 76 |

| | |
|---|-----|
| Hình 3.16. Sắc ký đồ HPLC của cao chiết sau khi thủy phân..... | 77 |
| Hình 3.17. Sắc ký đồ lutein đối chứng | 77 |
| Hình 3.18. Sắc ký đồ UV-Vis lutein..... | 77 |
| Hình 3.19. Ảnh hưởng của tỷ lệ cao chiết/etanol đến hiệu suất thủy phân | 79 |
| Hình 3.20. Ảnh hưởng của tỷ lệ KOH/cao chiết đến hiệu suất thủy phân cao chiết | 80 |
| Hình 3.21. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới quá trình thủy phân cao chiết | 81 |
| Hình 3.22. Sắc ký đồ HPLC của các mẫu cao chiết sau khi thủy phân ở các nhiệt độ khác nhau. | 83 |
| Hình 3.23. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất thủy phân lutein este trong cao chiết..... | 84 |
| Hình 3.24. Sắc ký đồ HPLC của các mẫu cao chiết sau khi thủy phân ở các khoảng thời gian khác nhau | 86 |
| Hình 3.25. Dịch lọc các mẫu thu hồi sau lọc lần 1..... | 92 |
| Hình 3.26. Sắc ký đồ HPLC của mẫu tinh thể lutein sau kết tinh..... | 92 |
| Hình 3.27. Sắc ký đồ HPLC sản phẩm lutein sau thủy phân | 93 |
| Hình 3.28. Kết quả HPLC sản phẩm lutein tinh chế | 93 |
| Hình 3.29. Quy trình hoàn thiện chiết tách và tinh chế lutein và zeaxanthin đạt tiêu chuẩn dược điển Mĩ từ cánh hoa CVT. | 94 |
| Hình 3.30. Kết quả sắc ký bản mỏng sử dụng các hệ dung môi khác nhau | 96 |
| Hình 3.31. Hình ảnh chất chuẩn lutein đã điều chế..... | 97 |
| Hình 3.32. Sắc ký đồ UV-Vis của lutein | 97 |
| Hình 3.33. Phổ ¹ H-NMR của lutein..... | 98 |
| Hình 3.34. Phổ ¹³ C-NMR của lutein | 98 |
| Hình 3.35. Phổ HSQC và phổ HMBC của lutein..... | 99 |
| Hình 3.36. Cấu trúc hóa học của lutein | 100 |
| Hình 3.37. Sắc ký đồ HPLC của dung môi | 100 |
| Hình 3.38. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn LZ5-11..... | 101 |
| Hình 3.39. Sắc ký đồ HPLC của chất chuẩn lutein đối chứng | 101 |
| Hình 3.40. Sắc ký đồ HPLC của chất chuẩn lutein tinh chế | 101 |
| Hình 3.41. Sắc ký đồ LC-MS của chất chuẩn lutein tinh chế | 102 |
| Hình 3.42. Hình ảnh chất chuẩn zeaxanthin đã tinh chế | 103 |
| Hình 3.43. Cấu trúc hóa học của zeaxanthin | 103 |
| Hình 3.44. Phổ ¹ H-NMR của zeaxanthin | 104 |
| Hình 3.45. Phổ ¹³ C-NMR của zeaxanthin | 104 |

| | |
|---|-----|
| Hình 3.46. Phổ HSQC và phổ HMBC của zeaxanthin..... | 105 |
| Hình 3.47. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn zeaxanthin LZ14-15 | 105 |
| Hình 3.48. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn zeaxanthin Z14.3 | 106 |
| Hình 3.49. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn zeaxanthin ZD2 | 106 |
| Hình 3.50. Sắc ký đồ HPLC của chất chuẩn zeaxanthin tinh chế | 106 |
| Hình 3.51. Sắc ký đồ LC-MS của chất chuẩn zeaxanthin tinh chế | 107 |
| Hình 3.52. Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến chất lượng lutein | 108 |
| Hình 3.53. Kết quả kiểm nghiệm độ ổn định của lutein..... | 109 |
| Hình 3. 54. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột thí nghiệm..... | 116 |
| Hình 3. 55. Hình ảnh vi thể gan, lách, thận chuột nghiên cứu | 117 |
| Hình 3. 56. Biểu diễn đường đồng mức của các yếu tố. | 127 |
| Hình 3. 57. Các sản phẩm vi nhũ tương lutein | 129 |

MỞ ĐẦU

Lutein ($C_{40}H_{56}O_2$) và zeaxanthin ($C_{40}H_{56}O_2$) là một trong những chất màu tự nhiên (mã số: E161b) đã được Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm (FDA) ở Canada, Úc, New Zealand và Bộ Y tế Việt Nam công nhận là an toàn và cho phép sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm. Đây là một loại sắc tố carotenoid có màu vàng - cam thường có trong nhiều loài thực vật, đặc biệt là có trong cánh hoa Cúc vạn thọ (*Tagetes erecta* L.) với hàm lượng khá lớn.

Lutein là hoạt chất có hoạt tính bảo vệ mắt và da khỏi tác hại của bức xạ khả kiến có năng lượng cao, ngăn ngừa một số bệnh về mắt ở người cao tuổi (thoái hóa điểm vàng, đục thủy tinh thể), giảm nguy cơ mắc chứng xơ vữa động mạch và một số bệnh ung thư, cải thiện khả năng nhận thức, năng lực ngôn ngữ và trí nhớ ở người cao tuổi. Do ánh sáng tập trung chủ yếu ở điểm vàng nên đây là nơi dễ bị tổn thương nhất. Lutein và zeaxanthin, với chức năng chống oxy hóa, đã giúp bảo vệ sự toàn vẹn của điểm vàng ở mắt. Thoái hóa điểm vàng là bệnh gây mù lòa và không điều trị được, nhưng có thể phòng bệnh hiệu quả bằng một chế độ dinh dưỡng giàu lutein và zeaxanthin. Cơ thể con người không thể tự tổng hợp được lutein và zeaxanthin, do đó việc bổ sung các sản phẩm chứa lutein và zeaxanthin là cần thiết.

Lutein và zeaxanthin cũng có nhiều trong vi tảo; trong nhiều loại thực phẩm như lá đinh lăng, quả gấc, cải xoăn, rau bina, ... nhưng hầu hết các sản phẩm lutein và zeaxanthin trên thế giới đều được chiết xuất từ nguồn nguyên liệu cánh hoa Cúc vạn thọ (*Tagetes erecta* L.). Xu hướng thế giới cũng như tại Việt Nam đang tìm kiếm và sử dụng các hợp chất phòng ngừa và chữa trị các bệnh có nguồn gốc thiên nhiên. Lutein và zeaxanthin chiết tách từ cánh hoa Cúc vạn thọ (*Tagetes erecta* L.) là sản phẩm hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học và dược lý cao.

Mặc dù lutein và zeaxanthin có dược tính cao nhưng kích thước phân tử lớn và khó tan trong nước nên khó hấp thụ khi đưa hai chất này vào trong cơ thể. Một giải pháp khắc phục nhược điểm đó là giảm kích thước phân tử các hoạt chất đến kích cỡ nano để tăng khả năng hấp thụ cũng như tăng hoạt tính sinh học của lutein và zeaxanthin.

Việc nghiên cứu tách chiết và tinh chế lutein và zeaxanthin ở Việt Nam cho mục đích dược dụng chưa được quan tâm nghiên cứu. Nguồn nguyên liệu hoạt chất này chủ

yếu là do nhập khẩu từ các nước khác. Gần đây, có một số công trình nghiên cứu triển khai liên quan tới việc chiết xuất cao chiết giàu lutein và zeaxanthin từ hoa Cúc vạn thọ ở Việt Nam để bào chế thực phẩm chức năng. Tuy nhiên, chưa có công trình nào liên quan tới việc sản xuất chế phẩm lutein và zeaxanthin đạt tiêu chuẩn dược điển Mỹ từ hoa Cúc vạn thọ. Hướng nghiên cứu tạo hệ phân tán nano của lutein và zeaxanthin vẫn còn mới.

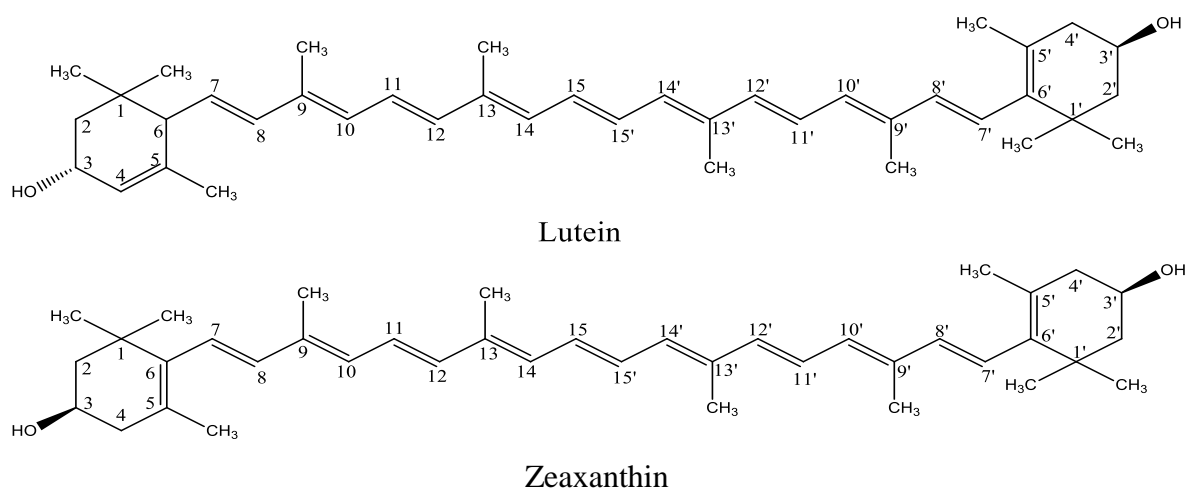
Mục tiêu của luận án là nghiên cứu chiết tách, tinh chế lutein và zeaxanthin từ cây Cúc vạn thọ một cách có hệ thống để thu được sản phẩm đạt tiêu chuẩn dược điển Mỹ và bào chế ra hệ phân tán kích thước nano của lutein, zeaxanthin nhằm định hướng cho các hướng ứng dụng trong dược phẩm ở Việt Nam. Hy vọng kết quả nghiên cứu đạt được trong luận án sẽ là cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn, rộng hơn của những đề tài liên quan đến ứng dụng của lutein và zeaxanthin.

Nội dung nghiên cứu của luận án là: (1) lựa chọn nguyên liệu và phương pháp sơ chế, bảo quản nguyên liệu Cúc vạn thọ; (2) tinh chế được lutein đạt tiêu chuẩn dược điển Mỹ để nâng cao giá trị khoa học cũng như giá trị thực tiễn của sản phẩm lutein; (3) phân lập được lutein và zeaxanthin có độ tinh khiết cao nhằm chủ động chất chuẩn phân tích trong các phòng thí nghiệm, khắc phục tình trạng khan hiếm chất chuẩn lutein, zeaxanthin tại Việt Nam; (4) đánh giá độc tính cấp, độc tính bán trường diễn và độ ổn định của lutein; (5) bào chế được lutein “tan” có tính ổn định cao nhằm tăng sinh khả dụng của lutein qua đường uống.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. LUTEIN VÀ ZEAXANTHIN

Lutein có công thức phân tử $C_{40}H_{56}O_2$ là một loại hoạt chất carotenoid, cấu trúc mạch cacbon C40 gồm 8 đơn vị isoprene chứa 2 vòng 6 cạnh ở mỗi đầu phân tử và mạch chính polyen gồm nhiều nối đôi liên hợp, tạo ra nhiều đồng phân khác nhau, đồng thời với 2 nhóm hoạt động hydroxyl gắn ở 2 đầu tạo tính năng oxy hóa cho phân tử (hình 1.1). Lutein trong tự nhiên thường tồn tại ở cấu hình all-trans [1]. Lutein là sản phẩm sau khi thủy phân cao chiết cánh hoa Cúc vạn thọ (*Tagetes erecta* L.) [2, 3]. Cao chiết sau khi thủy phân chứa khoảng 80,0 % carotenoid, trong đó có hơn 74,0 % lutein và ít hơn 8,5% zeaxanthin (hình 1.1), một đồng phân thường đi cùng với lutein [4, 5]. Bảng 1.1 trình bày công thức phân tử, tên gọi, các tính chất vật lý cơ bản của lutein và đồng phân zeaxanthin.



Hình 1.1. Cấu trúc của lutein và zeaxanthin

Lutein và zeaxanthin là hai đồng phân, chỉ khác nhau ở vị trí của một liên kết đôi và cấu hình tuyệt đối của một nhóm hydroxyl. Trong quá trình chiết tách, tinh chế, hai hợp chất này luôn đi cùng với nhau. Lutein và zeaxanthin có cùng vai trò sinh học nên dạng hỗn hợp này không làm giảm hoạt tính của sản phẩm. Hàm lượng hoạt chất của sản phẩm được hiểu là hàm lượng tổng của hai hợp chất. Trên thực tế, hỗn hợp này có thể được gọi tên theo hoạt chất chiếm tỷ lệ lớn là lutein hoặc gọi là lutein và zeaxanthin. Trong khuôn khổ của luận án, thuật ngữ lutein được sử dụng thay cho hỗn hợp lutein và zeaxanthin.

Bảng 1.1. Công thức phân tử và tính chất vật lý của lutein và zeaxanthin

| Lutein | |
|--------------------|--|
| CAS Number | 127-40-2 |
| Công thức phân tử | C ₄₀ H ₅₆ O ₂ |
| Khối lượng phân tử | 568,87 g/mol |
| Tên gọi | (1R,4R)-4-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-18-[[4R)-4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl]-3,7,12,16-tetramethyl-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanonaen-1-yl]-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-ol |
| Phân lớp | Xanthophyll |
| Trạng thái rắn | Bột hoặc tinh thể có màu từ da cam đến đỏ |
| Nhiệt độ nóng chảy | 190 °C |
| Zeaxanthin | |
| CAS Number | 144-68-3 |
| Công thức phân tử | C ₄₀ H ₅₆ O ₂ |
| Khối lượng phân tử | 568,87 (g/mol) |
| Tên gọi | (1R,1'R)-4,4'-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-3,7,12,16-Tetramethyl-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanonaen-1,18-diyl]bis(3,5,5-trimethyl-3-cyclohexen-1-ol) |
| Phân lớp | Xanthophyll |
| Trạng thái rắn | Bột hoặc tinh thể có màu từ da cam đến đỏ |
| Nhiệt độ nóng chảy | 215 °C |

Lutein là hợp chất kém phân cực nên không tan trong nước nhưng tan trong các dung môi hữu cơ. Cụ thể, khả năng hòa tan lutein trong một số dung môi hữu cơ lần lượt là: hexan (20 mg/L), axetonitril (100 mg/L), metanol (200 mg/L), etanol (300 mg/L), axeton (800 mg/L), etyl axetat (800 mg/L), diclometan (800 mg/L), THF (8000 mg/L), ... [6].

Phân tử lutein có 10 nối đôi liên hợp nên hấp thụ mạnh tia tử ngoại và ánh sáng xanh (hấp thụ cực đại ở 445 nm và 473 nm), do đó lutein ở dạng bột có màu đỏ cam và ở dạng dung dịch có màu vàng cam. So với zeaxanthin (có 11 nối đôi liên hợp), các cực đại hấp thụ (λ_{\max}) của lutein thấp hơn khoảng 4 - 6 nm [4, 6].

Lutein rất nhạy với axit và chất oxy hóa nhưng lại bền vững với kiềm. Với cấu trúc phân tử chứa chuỗi polyen liên hợp và nhóm hydroxyl ở hai đầu phân tử, lutein dễ bị oxy hóa bởi oxy không khí, phản ứng với các tác nhân axit, bị phân hủy bởi ánh sáng, bị đồng phân hóa từ dạng *all-trans* thành dạng *cis* dưới tác dụng của nhiệt, dẫn đến sự giảm hoạt tính của lutein [7, 8, 9]. Vì vậy, trong quá trình tiến hành nghiên cứu, lutein phải được hạn chế tiếp xúc với ánh sáng, nhiệt độ cao, ... để tránh làm phân hủy lutein. Trong các mô động - thực vật lutein có khả năng liên kết với các axit béo, lipid, lipoprotein tạo thành các cấu trúc bền vững hơn so với dạng lutein tự do.

1.1.1. Nguồn gốc lutein trong tự nhiên

Bảng 1.2. Hàm lượng lutein trong một số loài thực vật

| STT | Mẫu khô | Hàm lượng lutein | TLTK |
|-----|----------------------|----------------------|----------|
| 1 | Cánh hoa Cúc vạn thọ | 9 ‰ | [29] |
| 2 | Cải bó xôi | 640 µg/g | [30, 31] |
| 3 | Rau thì là | 1100-1200 µg/g | [32] |
| 4 | Cải xoăn | 1310 µg/g | [33] |
| 5 | Vi tảo | 24 mg/L | [34] |
| 6 | Gạo | 900 µg/g | [35] |
| 7 | Ngô (phần lõi) | 39 µg/g | [36] |
| 9 | Bí ngô | 65,6 ± 9,7 µg/100g | [37] |
| 10 | Cây lạc tiên | 2346,3 ± 1292,9 µg/g | [38] |
| | Lá | 672,9 ± 402,7 µg/g | |
| | Đọt non | 214 ± 117,9 µg/g | |
| 11 | Hoa ly | 245,61 ± 5,12 µg/g | [39] |
| 12 | Múi mít | 37,02a µg/100 g | [40] |
| 15 | Cỏ viola 3 màu | 896 µg/100g | [41] |

Nguồn lutein tự nhiên có nhiều nhất là trong hoa Cúc vạn thọ (CVT) [2] và nhiều loài thực vật khác trong tự nhiên như tảo, trà, cây cỏ, hoa quả và rau xanh [10-16]. Lutein trong các loại rau xanh ăn lá được coi là nguồn quan trọng bổ sung lutein từ thực phẩm [17].

Nhiều nhà nghiên cứu đã cố gắng thiết lập cơ sở dữ liệu của carotenoid bao gồm lutein trong các loại rau, trái cây. Những dữ liệu này giúp ích cho việc ước tính các chế

độ ăn uống chứa lutein, cung cấp cơ sở cho các nghiên cứu dịch tễ học về mối liên hệ giữa lượng lutein và nguy cơ các bệnh mãn tính [18-22]. Một số nguồn lutein được đưa ra trong bảng 1.2. Hàm lượng lutein khác nhau tùy thuộc vào từng loài, bộ phận thu hoạch, môi trường cây phát triển, điều kiện bảo quản và phương pháp xử lý, nghiên cứu [23-28].

1.1.2. Hoạt tính của lutein

1.1.2.1. Hoạt tính của lutein đối với chức năng của mắt

Lutein và zeaxanthin là hai carotenoit duy nhất có trong võng mạc của mắt, còn các carotenoit khác thì chỉ có chứa trong huyết tương và trong các tổ chức khác của cơ thể. Lutein và zeaxanthin có vai trò tạo nên màu vàng của điểm vàng võng mạc, là nơi thu nhận các tín hiệu ánh sáng và giúp chúng ta nhìn thấy được mọi vật thể [42]. Một số thử nghiệm *in vitro*, trên mô hình động vật, thử nghiệm lâm sàng hoặc các nghiên cứu dịch tễ học đã được tiến hành để đánh giá hiệu quả tiềm năng bảo vệ của lutein chống lại tổn thương thần kinh võng mạc, thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi, đục thủy tinh thể v.v... [43-47]. Hoạt tính nổi bật nhất của lutein là khả năng bảo vệ mắt khỏi thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác và tác động của tia UV. Hiệu quả của việc bổ sung lutein và zeaxanthin đã được chứng minh lâm sàng cho thấy lutein và zeaxanthin đóng vai trò làm bộ lọc ánh sáng có bước sóng ngắn, ngăn ngừa và làm giảm các gốc tự do trong tế bào biểu mô sắc tố võng mạc và vành mạch, do đó có lợi cho chức năng thị giác. Các nghiên cứu chỉ ra rằng bổ sung 10 mg lutein và 2 mg zeaxanthin (không có β -caroten) hàng ngày trong thời gian 5 năm có thể giảm 10-25% nguy cơ tiến triển bệnh thoái hóa điểm vàng [48, 49].

1.1.2.2. Hoạt tính chống oxy hóa và bắt giữ gốc tự do

Một số nghiên cứu *in vitro* [49-52] đã xác nhận rằng lutein là một chất bắt giữ gốc tự do hiệu quả từ hidro peoxit (H_2O_2), anion supeoxit và các gốc tự do khác, chẳng hạn như gốc tự do hydroxyl, gốc tự do lipid, gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, cation và 2,2-azinobis-3-etylbenzothiazoline-6-sulfonic. Lutein cũng được xác định là một tác nhân bảo vệ quan trọng cung cấp khả năng chống oxy hóa, ngăn ngừa sự tổn thương màng tế bào, ức chế hoạt động của peoxit hóa lipid và phản ứng Fenton [30]. Khả năng quét gốc tự do của lutein phụ thuộc vào nồng độ lutein [52]. Nồng độ lutein ức chế hiệu quả 50% (IC_{50}) lần lượt có giá trị là 7,54; 3,54 mg/mL đối với các gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; 2,2-azobis-3-etylbenzothiazolin-6-sulphonic. Lutein có thể quét gốc peoxinitrit, gốc nitơ dioxit và có thể bảo vệ DNA, protein và lipoprotein.

1.1.2.3. Hoạt tính chống ung thư

Thử nghiệm *in vitro* [52] cho thấy lutein có hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan người Hep3B trong giai đoạn G (0)/G (1) của chu kỳ tế bào và gây hoại tử tế bào hoặc apoptosis. Thử nghiệm trên mô hình chuột Wistar cho thấy lutein có khả năng ức chế ung thư gan gây ra bởi dietyl nitro amin. Lutein chiết tách từ vi tảo *Chlorella vulgaris* [53] thể hiện hoạt tính kháng tế bào ung thư ruột kết HCT116 với giá trị IC₅₀ là 40,31±4,43 mg/mL. Thử nghiệm trên mô hình chuột đang điều trị dimetyl hidrazin đã chứng minh lutein có khả năng chống lại ung thư ruột kết thông qua điều tiết các hoạt động tăng sinh của K-ras, protein kinaza B và protein β-catenin trong các khối u. Các kết quả thử nghiệm lâm sàng gợi ý rằng một chế độ ăn uống giàu lutein cùng với carotenoit khác có thể làm giảm nguy cơ của nhiều loại ung thư như ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng biểu mô, ung thư nội mạc tử cung và ung thư cổ tử cung hoặc ung thư vú [54-59].

1.1.2.4. Các hoạt tính khác

Bảng 1.3 đến bảng 1.6 giới thiệu tóm tắt các chức năng sinh học đã được chứng minh khác của lutein như: điều trị bệnh tiểu đường và các bệnh liên quan; chống viêm và kháng sinh; bảo vệ tim mạch.

Bảng 1.3. Hiệu quả của lutein đối với bệnh tiểu đường và các bệnh khác

| Mô hình | Chức năng | TLTK |
|--|---|------|
| Tiểu đường trên chuột Wistar | Ngăn chặn các tác động do bệnh tiểu đường gây ra như: rối loạn sinh hóa, mô học và sự thay đổi ở võng mạc | [60] |
| Streptozotocin gây tiểu đường trên chuột | Ngăn chặn sự phát triển và tiến triển của đục thủy tinh thể | [60] |
| Tế bào lympho từ chuột tiểu đường | Ngăn chặn áp lực oxy hóa, ức chế hoạt tính của NF-kB gây ra bởi nồng độ đường cao. | [61] |
| Bệnh nhân không tăng sinh võng mạc tiểu đường | Cải thiện thị lực, tăng độ nhạy cảm tương phản, giảm độ dày hố mắt | [62] |
| Streptozotocin gây ra tiểu đường C57BL/6 chuột | Ngăn chặn sự oxy hóa cục bộ trong võng mạc bệnh nhân đái tháo đường. Ngăn chặn suy giảm độ dày của plexiform bên trong lớp hạt nhân và số lượng tế bào hạch. | [63] |

Bảng 1.4. Hoạt tính kháng viêm của lutein

| Mô hình | Cơ chế | TLTK |
|---|---|-------------|
| Lipopolysacarit (LPS) - kích thích dòng tế bào đại thực bào chuột RAW 264,7 | Giảm biểu hiện của các enzym tổng hợp oxit nitơ ở cả mức độ mRNA và protein | [64] |
| LPS - liên quan đến đại thực bào | Ức chế sự hoạt hóa của NF-κB và tăng hoạt tính oxy hóa của gen PTEN | [65] |
| Đồng dạng cụ thể của polymeaza DNA động vật có vú | Ức chế polymeaza DNA β và λ của động vật có vú | [66] |
| Các tế bào biểu mô dạ dày AGS | Ức chế hidro peoxit gây ra hoạt tính của NF-κB và IL-8 | [67] |

Bảng 1.5. Hiệu quả kháng virus của lutein

| Mô hình | Cơ chế | TLTK |
|---|---|-------------|
| Ổn định HBV-sản xuất các tế bào của nguyên bào gan HepG2 2.2.15 | Ức chế sự bài tiết của HBsAg, ức chế hoạt động của HBV, ức chế sao chép HBV | [68] |
| Một nhóm gồm 279 cư dân Hawaii | Giảm nguy cơ nhiễm virus u nhú ở người qua đường hậu môn | [69] |

Bảng 1.6. Tác dụng bảo vệ của lutein về bệnh tim mạch

| Mô hình | Chức năng | TLTK |
|---|--|-------------|
| Nhóm 63257 đàn ông và phụ nữ Trung Quốc | Giảm nguy cơ nhồi máu cơ tim cấp | [70] |
| Động mạch chủ của lợn Guinea | Ngăn ngừa tích tụ cholesterol, giảm oxy hóa LDL và các cytokine viêm nhiễm | [71] |

1.1.3. Ứng dụng của lutein

1.1.3.1. Trong dược phẩm

Lutein có tác dụng chống oxy hóa, hấp thụ gốc tự do và tia tử ngoại, làm giảm nguy cơ xơ vữa động mạch, giúp duy trì sức khỏe tim mạch, ngăn ngừa ung thư [72]. Lutein là carotenoit chủ yếu ở điểm vàng, giúp cải thiện khả năng truyền tin qua khe kết nối trong võng mạc, cần thiết cho quá trình xử lý hình ảnh và sự phát triển của thần kinh thị giác [73]. Lutein chiếm đến 66 – 77 % lượng carotenoit hình thành não bộ của người, có chức năng quan trọng trong việc phát triển và kích thích khả năng học hỏi, sự hình thành cảm xúc và ghi nhớ của trẻ em, cải thiện tình trạng suy giảm chức năng nhận thức ở người cao tuổi [74]. Lutein đã được đưa vào sữa cho bé, thuốc bổ cho người cao tuổi.

Lutein có tác dụng làm giảm nguy cơ mắc bệnh tim mạch, ngăn ngừa một số dạng ung thư (như ung thư vú, cổ tử cung, ...) do khả năng chống oxy hoá khá tốt. Phụ nữ có nồng độ lutein trong máu ở mức cao thì khả năng ung thư vú giảm 88 % [75].

Lutein là chất ức chế sự tắc nghẽn mạch máu, viêm khớp, giảm đau viêm xương khớp và tàn tật ở 16 triệu người Mỹ [76]. Viện Y học Quốc gia Hoa Kỳ đã phát hiện ra những người có nồng độ lutein trong máu cao (khoảng 70%) ít có khả năng bị viêm khớp đầu gối và các mô liên kết khác.

Lutein làm giảm các rối loạn mắt như thoái hóa điểm vàng, đục thủy tinh thể, bệnh võng mạc, ... Ở người, lutein tập trung ở điểm vàng của mắt, da, vú và mô cổ tử cung. Lutein được coi là một vi chất dinh dưỡng cần thiết cho thị lực bình thường [77, 78] và được sử dụng chủ yếu trong các sản phẩm chăm sóc mắt nhằm giảm mệt mỏi thị giác, giảm tỷ lệ mắc các bệnh về mắt.

1.1.3.2. Trong thực phẩm

Lutein được phép sử dụng làm chất màu trong chế biến thực phẩm (mã số E161b). Lutein ở dạng chế phẩm hòa tan trong nước được sử dụng để nhuộm vỏ ngoài cho giò chả, các bán thành phẩm từ thịt gà, sữa chua, bánh nướng, kẹo, nước giải khát, nước ép trái cây, ngũ cốc điểm tâm, các sản phẩm từ sữa, trứng, thực phẩm cho trẻ sơ sinh và trẻ mới biết đi, chất béo, dầu, nước thịt, nước sốt và súp hỗn hợp [79]. Theo quy định của EU, Canada, Úc, New Zealand, ... lutein có thể được sử dụng với mức 0,5 - 2 mg/ngày [80].

1.2.3.3. Trong mỹ phẩm

Lutein được sử dụng để chống nếp nhăn và bảo vệ da khỏi tác hại của tia cực tím. Lutein và lutein este dễ dàng thâm nhập vào da và cho hiệu quả chống nắng tốt [81]. Một số chế phẩm kem chống nắng công thức thảo dược chứa lutein este chiết suất từ *Tagetes erecta* L. đã được sản xuất [82].

1.1.3.4. Trong chăn nuôi

Lutein được dùng để làm chất phụ gia trong chế biến thức ăn nuôi cá cảnh, thức ăn cho gia súc và gia cầm để tạo màu vàng cho da gà và lòng đỏ trứng, ...

1.2. CHI CÚC VẠN THỌ

Tên tiếng Việt: Cúc vạn thọ.

Tên tiếng Anh: Marigold.

Tên khoa học: *Tagetes* spp.

Họ: Cúc (**Asteraceae**)

Chi CVT (*Tagetes* L.) có khoảng 60 loài cây thân thảo một năm và lâu năm trong họ Cúc [83]. Chúng có nguồn gốc tại khu vực kéo dài từ tây nam Hoa Kỳ qua Mêxicô và về phía nam tới khắp Nam Mỹ.



Hình 1.2. Hoa Cúc vạn thọ (*Tagetes* L.)

Các loài khác nhau có kích thước cao từ 0,05 - 2,2 m. Chúng có các lá lông chim màu xanh lục với hoa có màu từ trắng, vàng kim, da cam, vàng tới gần như đỏ, đường kính khoảng 0,1 tới 4 - 6 cm. Tán lá của CVT có mùi thơm như xạ và hăng, mặc dù các giống, thứ sau này được tạo ra là không có mùi. Cây hoa CVT sinh trưởng nhanh, tốt trong điều kiện ánh sáng đầy đủ. Cây chịu nóng tốt. CVT rất dễ trồng bằng cách tách

bụi, gieo hạt hay nhân giống bằng chồi; ngọn cây trồng bằng chồi mầm thường nhỏ, không cao và mau ra hoa. Cây CVT không kén đất trồng, thích hợp nhất là đất thịt nhẹ, nhưng nếu là đất cát pha, đất sét pha, đất có lẫn sỏi đá, v.v... cây hoa này vẫn sống được. Điều đòi hỏi là đất phải cao ráo, đủ ẩm và không úng nước. Đất nhiễm phèn và nhiễm mặn cũng không trồng được CVT.

Trên thế giới, CVT chia ra làm ba loài nguyên và loài lai sau đây [83]:

Loài Cúc vạn thọ châu Phi (African Marigold) hay CVT châu Mỹ (American Marigold). Tên khoa học là *Tagetes erecta* L., tiếng Anh gọi là African Marigold. Đây thường là giống vạn thọ cây cao nhất và hoa cũng to nhất. Đáng kể nhất hiện nay là loài hoa kép, to, nở tròn xoe không chồi gọi là Ánh Nguyệt (Moonlight), cây cao chừng 40 cm và mọc dày khít nhau. Trổ hoa sớm như là các giống vạn thọ lai. Cây làm bồn cảnh hay cắt cành cắm hoa rất đẹp.

Cúc vạn thọ Châu Phi cũng có hoa kép to và cây cao khoảng 50-70 cm, hạt đem gieo thường cho nhiều hoa màu sắc khác nhau, lẫn lộn từ cam đến vàng, vàng kim, vàng chanh, vàng bơ. Tên gọi chung là Gold-n Vanilla, thường được trồng trong chậu cảnh hay bồn hoa để trang trí. Các loài khác của giống này đáng kể ra là Tuổi Vàng (Golden Age), cây cao hơn 75 cm và Doublon, cây cao đến 1,50 m và hoa rất to, có đường kính 12,5 cm.

Loài Cúc vạn thọ Pháp [84]. Tên khoa học là *Tagetes patula* L., tiếng Anh gọi là French Marigold. Loài này thường hấp dẫn hơn loài cúc ở châu Phi, hoa cũng nhỏ hơn. Hoa có đủ màu, đủ kiểu, dân chúng Âu Mỹ thường trồng giống hoa đơn, một lớp cánh hoa dài, có cồi. Giống Oai Vệ (Majestic) cao khoảng 30 cm, hoa vàng đơn, cánh sọc nâu hay sọc màu gỗ đỏ, cồi vàng. Loài Janie cao chừng 20 cm hoa có ba màu được ưa thích là vàng, đỏ lửa và vàng kim, nhưng cũng còn có màu gỗ đỏ, màu cam đậm, màu quýt tiêu đỏ son, hay lẫn lộn nhiều màu. Loài lùn Naughty Marietta, chỉ cao 25 cm, hoa đơn, cánh bên trong điểm vết nâu. Loài Mắt Cọp (Tiger eyes), cao 30-35 cm là một Vạn thọ lạ vì lẽ cánh đơn đỏ huyết ở viền bìa ngoài hoa, còn bên trong nở như là Cúc vàng cam. Loài Nữ Hoàng (Queen series) hoa nở tựa hoa trà mi, hải đường, cây lùn 25-30 cm, v.v. Cùng như mọi loài CVT Pháp khác, ở những vùng có khí hậu nóng, cây có thể cao hơn 60 cm như giống Kỳ Hoa Sọc Đỏ (Striped Marvel) thân cao 75 cm, hoa màu sọc đỏ.

Loài Cúc vạn thọ lá nhỏ. Tên khoa học là *Tagetes tenuifolia*. Hoa đơn cánh, có còi và nhỏ 1-2 cm. Loài hay trồng ở Âu Mỹ là StafireMix, lá thơm mùi chanh bưởi, nhất là khi trời nóng nực.

Loài lai. Loài lai Antigua Yellow là loài CVT vàng tươi, hoa kép to có đường kính 7-8cm, ở nước ta được trồng ở làng hoa Gò Vấp. Cây mọc khít và cao 30-50 cm. Loài lai Inca Hybrid hoa kép có đường kính 10-13 cm, cây cao 50-70 cm chịu nhiệt độ đến 39-40 °C. Giống tam nhiễm lai triploid, thuộc nhóm F1 là giống phối hợp cây lùn của Vạn thọ Pháp và hoa kép to của Vạn thọ Châu Phi, chịu được lạnh và nóng.

Hiện nay, có hai loại CVT được trồng phổ biến ở nước ta là CVT Pháp, hay CVT lùn (*Tagetes patula* L.) và CVT châu Phi (cũng có tên thường gọi là CVT cao; tên khoa học là *Tagetes erecta* L.). CVT Pháp thường gọi là CVT có cuống hoa màu vàng sẫm, giống hoa Nhật, cánh hoa vừa có màu vàng thẫm lại vừa có màu vàng nhạt. CVT châu Phi, hoa vàng nghệ và vàng hoàng yến (*Tagetes erecta* L.). Bên cạnh việc chơi hoa và trang trí, cây CVT còn được sử dụng như một dược phẩm chữa bệnh. Lá và hoa được dùng trong điều trị các bệnh về đường tiêu hóa, kích thích tuần hoàn máu.

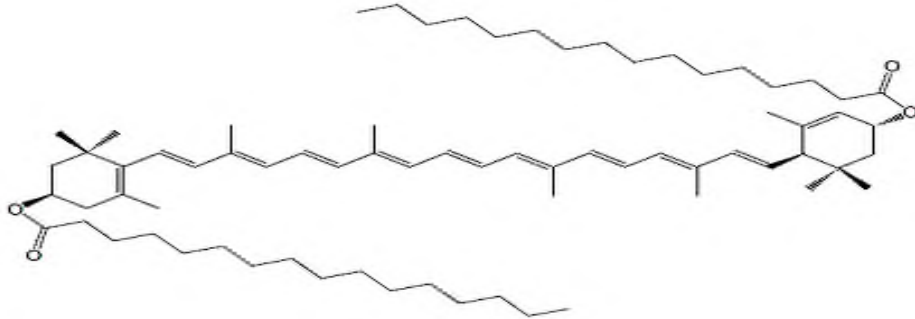
CVT là loài thực vật rất thích hợp với các vùng có khí hậu nhiệt đới và hiện đang được trồng nhiều ở Peru, Ấn Độ, Mexico, Trung Quốc, Thái Lan, ... để cung cấp nguyên liệu cho công nghiệp tách chiết, tinh chế lutein [83]. CVT cũng sinh trưởng rất tốt và có thể được trồng quanh năm ở nhiều địa phương của nước ta.

Cánh hoa CVT châu Phi (*Tagetes erecta* L.) là nguồn nguyên liệu lutein tự nhiên lý tưởng cho việc thu nhận lutein este do chứa hàm lượng carotenoit khá cao (khoảng 1,6 % trọng lượng khô) và gần như tinh khiết (trên 95 % carotenoit là lutein este, còn lại là dạng đồng phân zeaxanthin este [85]). Ngoài thành phần chính là lutein este, zeaxanthin este, hoa CVT còn chứa một lượng nhỏ hơn antheraxanthin, flavoxanthin, cryptoxanthin, β -caroten và khoảng 11 loại carotenoit khác [86]. Do vậy, cần phải loại bỏ các tạp chất trong cánh hoa CVT để thu được lutein.

1.3. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH VÀ TINH CHẾ LUTEIN

Thành phần chính trong cao chiết CVT (oleoresin) là lutein este. Lutein este là một dẫn xuất của lutein, có một hoặc nhiều chuỗi axit béo liên kết với lutein thông qua các nhóm hydroxyl ở hai đầu của lutein. Các este béo trong CVT chủ yếu là lutein dipalmitat. Ngoài ra, còn có lutein dimyristat, lutein palmitat stearat, lutein myristat palmitat, lutein distearat và một lượng nhỏ lutein myristat stearat. Cao chiết CVT chứa

hơn 80 % là carotenoid tổng số, trong đó lutein chiếm 70 -78 %, zeaxanthin (2-9 %) và một số carotenoid khác. Các công bố khoa học cũng cho thấy, cao chiết chứa sáp (14 %) và axit béo (1 %) [85] nên cần phải loại các tạp chất này trong quá trình chiết tách và tinh chế lutein.



Hình 1. 3. Cấu tạo phân tử của lutein este [85].

Lutein dưới dạng este bền, khi vào cơ thể con người chỉ bị thủy phân một phần thành dạng tự do rồi mới được hấp thụ vào huyết thanh. Vì vậy, để tạo ra những chế phẩm lutein bổ sung cho con người, sau khi thu được oleoresin cần thủy phân lutein este để thu được lutein tự do [87]. Như vậy, nguyên tắc chung điều chế lutein tự do từ hoa CVT (*Tagetes erecta* L.) là: *sơ chế, bảo quản nguyên liệu hoa CVT → tiền xử lý nguyên liệu hoa CVT → chiết xuất cao chiết giàu lutein este bằng (hệ) dung môi thích hợp → thủy phân cao chiết để chuyển lutein este thành lutein tự do → kết tinh, tinh chế → xử lý bảo quản → tinh thể lutein có độ tinh khiết cao.*

1.3.1. Tiền xử lý nguyên liệu hoa Cúc vạn thọ

Tiền xử lý CVT nhằm mục đích tăng hiệu quả chiết lutein este, giảm thời gian và số lần chiết. Các tác nhân được sử dụng trong quá trình xử lý thường là dung dịch kiềm loãng hoặc dung dịch axit loãng. Cả hai loại tác nhân này đều có tác dụng bẻ gãy mạch dài của xenlulo và lignin có trong bột hoa CVT. Điều này dẫn tới quá trình chiết lutein este sau đó được diễn ra dễ dàng hơn.

Sujith và cộng sự [88] nghiên cứu tiền xử lý hoa CVT tươi với dung dịch NaOH 0,5% (0,125 M, pH 8,5) trong 48 giờ tại nhiệt độ phòng. Tỷ lệ cánh hoa/dung dịch ngâm 1/1.

Bolanos và cộng sự [89] dùng enzym thương mại nồng độ 0,05 ($\pm 0,01$ %, w/v) và endo-1,4- β -D-glucanaza để tiền xử lý CVT. Enzym được trộn với cánh hoa khô tỷ lệ 1:12 (w/v) và giữ nhiệt độ khoảng 28 °C. Bột hoa sau khi được xử lý với enzym được chiết bằng *n*-hexan với tỷ lệ 1/6 (w/v) ở nhiệt độ 35 °C trong 15 phút. Kết quả cho thấy

chỉ mất 4 phút chiết, 96 % xanthophyll được thu hồi, trong khi nếu không xử lý enzym phải mất 10 phút và hàm lượng cao chiết cao nhất chỉ 29,3 ($\pm 0,1$) g.

Halagur và cộng sự [90] tiến xử lý cánh hoa CVT tươi bằng NaOH (0,5 %, pH 8,5), axit citric (1 %, pH = 4) và visco enzym (0,2 %, pH = 4,5). Tỷ lệ hoa/dung dịch tiến xử lý là 1/1, w/w. Kết quả việc tiến xử lý mẫu cho thấy, độ ẩm của mẫu giảm từ 19 % đối với các mẫu không xử lý, xuống 6,25; 5,04 và 3,83 % tương ứng đối với các mẫu xử lý bằng NaOH, axit citric và enzym, dẫn tới thời gian sấy mẫu cũng giảm từ 25h xuống còn 10h đối với các mẫu tiến xử lý. Hiệu quả chiết màu và khối lượng cao chiết tăng đáng kể.

Phương pháp xử lý nguyên liệu bằng enzym cho hiệu quả khá cao nhưng phương pháp xử lý phức tạp, về phương diện kinh tế, chi phí tốn kém. Các phương pháp tiến xử lý đơn giản hơn (như ủ tươi, xử lý bằng kiềm, axit), mặc dù cho hiệu suất sản phẩm thấp hơn, nhưng xét về khía cạnh thực tiễn, có thể áp dụng hiệu quả hơn. Do vậy, ba loại tác nhân tiến xử lý là NaOH, H₂SO₄ và axit citric được khảo sát, đánh giá trong luận án này.

1.3.2. Các phương pháp chiết tách lutein este

1.3.2.1. Chiết bằng dung môi thông thường

Levy [91] ngâm bột hoa CVT khô trong dung môi hexan (8/ 1, L/kg) ở nhiệt độ phòng. Tách lấy dịch chiết, cô đuổi dung môi để thu cao chiết chứa lutein este. Thêm isopropanol vào cao chiết ở nhiệt độ phòng để loại bỏ các tạp chất không thuộc nhóm xanthophyll. Sản phẩm sau đó được cô quay chân không để loại bỏ isopropanol. Kết quả thu được cao chiết chứa 69% lutein este trong đó tỷ lệ đồng phân *trans*-lutein/*cis*-lutein là 90/10.

Boonnoun và cộng sự [92] chiết bột cánh hoa CVT với quy trình như sau: 100 g bột hoa CVT khô được chiết với 500 mL *n*-hexan trong bình 1 L, trong 4 giờ ở 40 °C. Sau khi chiết, hỗn hợp được để yên 20 phút cho kết tủa lắng xuống. Keo tủa được loại bỏ, thành phần carotenoit trong dịch *n*-hexan được cô quay chân không ở 40 °C. Cao chiết được làm khô triệt để bằng sấy chân không tại 30°C trong 8 giờ, bảo quản cao chiết ở -20 °C.

Nhóm nghiên cứu của Vechpanich & Shotipruk [93] chiết 10 mẻ bột hoa CVT, mỗi mẻ 100 g nguyên liệu. Với mỗi mẻ, sử dụng 500 mL *n*-hexan chiết ở 40 °C trong 4 giờ. Dịch chiết được bay hơi dung môi bằng cô quay chân không ở 40 °C, 15 phút. Cao

chiết tiếp tục được làm khô 2 giờ trong tủ hút chân không (30 °C). Kết quả mỗi 100 g bột hoa CVT thu được 10 g cao chiết khô.

Wang và các cộng sự [94] chiết 24 kg bột hoa CVT 4 lần với *n*-hexan theo tỷ lệ 1:4 (w/v). Gôm dịch chiết, thu hồi dung môi bằng cô quay chân không ở 40 °C. Kết quả được 772 g cao chiết, chiếm 3,2 % nguyên liệu.

Sáng chế US 8425948 B2 [95] đưa ra một phương pháp chiết lutein este kết hợp với thủy phân cao chiết. Bột hoa CVT (100 g) được đồng nhất trong hỗn hợp 1000 mL tetrahydrofuran (THF) và 250 mL etanol chứa KOH 10 % ở nhiệt độ phòng. Độ pH bằng 12 được duy trì trong suốt quá trình chiết. Sau khoảng 2 giờ, lutein este bị thủy phân hoàn toàn, hỗn hợp phản ứng được lọc lấy cặn rắn, sau đó hoàn tan trong 1000 mL THF. Dịch hòa tan được lọc bỏ cặn và thu dịch lọc, dung môi của dịch lọc được loại bỏ bằng cô quay chân không ở 40 °C. Cao chiết khô được hòa vào 700 mL nước và còn thực phẩm (tỷ lệ 1/1, v/v) trong vòng 10 phút. Ly tâm và rửa cặn rắn 2 lần đến khi pH bằng 7. Chất rắn được tiếp tục rửa bằng 100 mL etanol, ly tâm, làm khô bằng phương pháp sấy chân không tại nhiệt độ phòng. Kết quả thu được 2 g tinh thể lutein màu vàng, với hàm lượng lutein khoảng 70 %.

Hojnik và các đồng sự [96] chiết bột CVT khô (< 0,315 mm, độ ẩm 5,15 % w/w) trong bình 3 cổ với dung môi *n*-hexan; nhiệt độ 40 °C; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 5 L/kg; tỷ lệ dung dịch KOH/nguyên liệu 3,75 L/kg và nồng độ KOH trong etanol là 5 % (w/v). Kết quả, 80 % tổng lutein trong nguyên liệu ban đầu được chiết chỉ trong thời gian 4 phút.

Ruen-ngam và các đồng sự [97] đã chiết lutein este trong vi tảo *Chlorella sorokiniana* MB-1 (hàm lượng lutein tổng khoảng 5,21 mg/g). Theo đó, THF cho hiệu suất thu hồi lutein 87,0 % (20 phút) và 99,5 % (40 phút) tại 850 mbar ở 25 °C. Dung môi etanol cho hiệu suất thu hồi 86,2 % lutein este ở 450 mbar, 35 °C trong 40 phút. Lutein sau khi chiết được ổn định trong dầu olive hoặc dầu hướng dương với chu kỳ bán hủy 53,1 và 63,8 ngày.

Sáng chế US 8425984 B2 của Sethuraman [98] chiết tách zeaxanthin từ quả câu kỷ tử như sau: 455,5 g quả câu kỷ tử được cho vào trong nước (1000 mL), ngâm qua đêm tại nhiệt độ phòng. Dịch chiết tách bằng phương pháp gạn lọc. Sau đó đồng nhất với hỗn hợp dung môi chứa 2000 mL THF và 250 mL etanol KOH 10 %. Dung dịch được duy trì ở pH 12. Sau 2 giờ, zeaxanthin este bị thủy phân hoàn toàn. Chất rắn được rửa với THF 500 mL. Dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm ở 40 °C. Cặn sau đó

được hòa vào 100 mL hỗn hợp nước/etanol (tỷ lệ 1/1, v/v) trong 10 phút. Tiếp theo là ly tâm để loại bỏ phần dung môi, thu lấy chất rắn. Rửa chất rắn 2 lần cho đến khi pH bằng 7. Rửa lần cuối bằng 30 mL etanol, thu được tinh thể zeaxanthin (0,48 g, 75 %).

1.3.2.2. Chiết siêu tới hạn

Các nghiên cứu ứng dụng phương pháp chiết kỹ thuật cao cũng được chú trọng trong nghiên cứu chiết tách lutein. Điển hình là sử dụng phương pháp chiết siêu tới hạn chiết lutein este có độ tinh khiết cao.

Sujith và các đồng sự [88] chỉ ra rằng chiết siêu tới hạn lutein este từ bột hoa CVT cho hiệu quả tốt hơn rất nhiều so với cách chiết bằng dung môi thông thường. Thủy phân lutein este cho thấy hàm lượng carotenoit đạt 88 % và lutein đạt 90,7 %. Quá trình thủy phân lutein este sử dụng xúc tác lipaza ở 50 °C; pH = 7; nồng độ enzym xúc tác 0,33. Enzym mất hoạt tính khoảng 25 % sau 8 lần sử dụng tại 50 °C trong khoảng 12 ngày.

Lutein este được chiết tách từ vi tảo *Chlorella vulgaris* [97] như sau: 10 gam hỗn hợp dung môi và tảo (35/65, w/w) được cho vào xylanh 50 mL của hệ thống chiết siêu tới hạn. Tốc độ dòng dung môi 3 mL/phút. Áp suất tối ưu 40 MPa và duy trì nhiệt độ ở 40 °C. Dung môi là sự kết hợp giữa CO₂ siêu tới hạn và etanol. Hiệu suất thu hồi lutein cao nhất $52,9 \pm 0,02$ % và độ chọn lọc $43,1 \pm 0,02$ %.

Lutein este được chiết từ *Chlorella pyrenoidose* [99] bằng phương pháp chiết CO₂ tới hạn kết hợp với siêu âm ở 27 °C; áp suất 21 MPa; dung môi CO₂ 1,5 mL/g etanol, năng lượng siêu âm 1000 W. Kết quả thu được hàm lượng lutein este cao nhất là 124,01 mg/100 g nguyên liệu.

Trong các công bố trên, chiết lutein este bằng phương pháp siêu tới hạn cho hiệu quả chiết cao hơn chiết bằng dung môi thông thường, nhiệt độ chiết thấp, làm giảm khả năng phân hủy của lutein este. Tuy nhiên, chiết siêu tới hạn khó áp dụng cho quy mô lớn hơn, ngoài phòng thí nghiệm. Vì lý do đó, phương pháp sử dụng dung môi thông thường được lựa chọn để chiết lutein este từ hoa CVT.

n-Hexan và THF là hai dung môi được các tác giả sử dụng nhiều nhất để chiết lutein este, tuy nhiên THF độc và hiệu quả chiết bằng *n*-hexan chưa cao. Nhằm tìm kiếm dung môi ít độc hại và cho hiệu quả chiết cao để chiết tách lutein este, các dung môi khác như metanol, etanol, axeton, *n*-hexan, etyl axetat được khảo sát trong luận án này.

1.3.3. Các phương pháp làm giàu cao chiết chứa lutein este

Mục đích của quá trình làm giàu cao chiết là loại bỏ các tạp chất như chất béo, dầu, muối, epoxit, sáp, ... để thu được cao chiết giàu lutein este.

1.3.3.1. Làm giàu bằng nước

Nhóm nghiên cứu của Suijth [88] làm giàu cao chiết bằng nước như sau: 18,36 kg cao chiết hàm lượng carotenoit 40,02 g/kg cao chiết được đồng nhất với 92 L nước ở nhiệt độ 45 °C trong 15 phút. Hỗn hợp được để lắng và lọc bằng lọc hút chân không. Cao chiết không tan được chuyển vào bình chứa, lặp lại quá trình rửa với 92 L nước ở cùng điều kiện nhiệt độ để loại bỏ thành phần tạp tan trong nước. Cặn lọc với độ ẩm khoảng 8 % được thêm vào 36 L etanol. Hỗn hợp được khuấy trong khoảng 10 - 15 phút, sau đó để lắng. Gạn lọc thu lấy dịch etanol. Quá trình trên lặp lại 3 lần, thu được 5,24 kg oleoresin với hàm lượng carotenoit tổng 124,39 g/kg (12,44 % carotenoit), cụ thể chứa 79,83% *trans*-lutein, 4,02% *trans*-zeaxanthin, 0,23% β -carotene, 0,56% cryptoxanthin, 15,36% *cis*-isome và epoxit, phân tích bằng HPLC.

1.3.3.2. Làm giàu bằng etanol

Kuman và các cộng sự [100] làm giàu cao chiết với dung môi là etanol. Các tạp chất tan trong etanol được loại bỏ để làm giàu cao chiết chứa lutein este. Theo đó, 2,0 kg cao chiết hàm lượng carotenoit 51,28 g/kg ở bước trên được đồng nhất với 2L etanol ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Hỗn hợp được để lắng và tách lớp. Gạn lọc, thu lấy phần cao chiết không tan. Lặp lại quá trình thêm 2 lần với 2L etanol mỗi lần. Kết quả thu được 0,672 kg cao chiết với hàm lượng carotenoit 142,8 g/kg tổng (14,28 % carotenoit), cụ thể chứa 73,22 % *trans*-lutein, 4,90 % *trans* -zeaxanthin, 1,62 % β -carotene, 0,79 % cryptoxanthin và 19,38 % *cis*-isome và epoxit, phân tích bằng HPLC).

Etanol và nước là những dung môi được các tác giả sử dụng để làm giàu cao chiết. Tuy nhiên, etanol và nước đều là các dung môi phân cực, trong khi đó, cao chiết chủ yếu chứa lutein este là hợp chất ít phân cực và các phần tạp chất khác như: chất béo, dầu, muối, epoxit, sáp, ... nên nếu chỉ dùng một dung môi để làm giàu cao chiết thì hiệu quả làm giàu không cao bằng sử dụng hệ nhiều dung môi và thực hiện phương pháp chiết lỏng-lỏng.

1.3.4. Các phương pháp thủy phân lutein este

Quá trình thủy phân lutein este từ cao chiết hoa CVT có thể thực hiện bằng phương pháp hóa học hoặc sinh học. Phương pháp hóa học sử dụng tác nhân kiềm mạnh (thường

là KOH) trong ancol hữu cơ (thường là iso propanol hoặc etanol) để cắt đứt liên kết este giữa các nhóm –OH trong phân tử lutein với các axit béo. Phương pháp hóa học thường phải tiến hành ở nhiệt độ cao nên có thể gây ra sự phân hủy lutein tự do. Do đó, một số tác giả nghiên cứu sử dụng phương pháp sinh học, trong đó sử dụng enzym lipaza để thủy phân lutein este ở nhiệt độ phòng nhằm hạn chế sự phân hủy hoạt chất. Tuy nhiên, phương pháp này hiện nay ít được áp dụng rộng rãi do tính ứng dụng không cao [90]. Sau đây là một số công bố thủy phân lutein este tiêu biểu:

Wang và các cộng sự [94] nghiên cứu thủy phân cao chiết bằng KOH với các bước như sau: 772 g cao chiết được hòa tan trong isopropanol (1:1.5, w/v) thêm KOH 15 % (5:3, v/v), khuấy ở 70 °C trong 6 giờ trong môi trường N₂. Sản phẩm thủy phân được phân tán trong nước (1:3, v/v) và chiết lỏng - lỏng với etyl axetat 3 lần. Gom dịch chiết etyl axetat được làm khan với Na₂SO₄ khan sau đó cô quay chân không. Cao chiết (263,4 g) tái hòa tan trong *n*-hexan (1:4, w/v) trong bình tam giác, khuấy ở 40 °C trong thời gian 1 giờ, sau đó toàn bộ bình được đặt trong thiết bị đá (1 giờ), cuối cùng đặt hệ trong tủ lạnh tại 4 °C trong 20 phút để loại bỏ axit béo và chlorophyll. Quá trình được lặp lại 3 lần. Sản phẩm cuối cùng được cô quay chân không ở 40 °C, qua đêm thu được 170,2 g lutein khô.

Swaminathan và cộng sự [95] tiến hành thủy phân cao chiết bằng cách cho 1 g cao chiết hoa CVT hòa tan trong 2 mL etanol tại 75 °C. Thêm từ từ vào hỗn hợp một lượng dung dịch KOH 45 %. Hỗn hợp được khuấy trong 1 phút. Sau mỗi giờ lại khuấy một lần. Sau phản ứng, hỗn hợp phản ứng được hạ nhiệt độ xuống 65 °C. pH được điều chỉnh về 7,0 bằng axit HCl. Thêm vào hỗn hợp phản ứng 50 mL etyl axetat, siêu âm 30 ± 5 °C, trong 15 phút. Hỗn hợp để lắng và tách hai pha. Thu lấy pha trên là pha etyl axetat có màu vàng, giàu lutein tự do. Pha dưới là xà phòng, nước và muối. Thu hồi toàn bộ lutein bằng cách chiết một lần nữa với 50 mL etyl axetat kết hợp với siêu âm. Sản phẩm được đưa đi phân tích HPLC. Kết quả cho thấy: Thời gian thủy phân tối ưu là 4 giờ, tỷ lệ dung dịch KOH/cao chiết oleoresin là 0,5/1 (mL/g), nồng độ KOH tối ưu là 40 % (w/v).

Bolanos và cộng sự [89] dùng 200 g cao chiết hoa CVT thủy phân trong dung dịch KOH (nồng độ 45 %) duy trì ở nhiệt độ từ 65 đến 70 °C cho đến khi trên 98 % lutein este được chuyển hóa thành lutein tự do. Quá trình thủy phân tiến hành trong 35 phút.

Joseph và cộng sự [102] đã cải tiến quy trình thủy phân lutein oleoresin bằng dung dịch KOH trong nước với sự có mặt của hỗn hợp rượu béo (ancol lauryl) và axit béo (axit caprylic capric) để bảo vệ lutein khỏi bị oxy hóa ở nhiệt độ cao như sau: 10 kg oleoresin được đun nóng và khuấy ở 45 °C trong 5-10 phút cho đồng nhất. Thêm từ từ 1,95 kg KOH 95 % trong 3 kg nước và 0,86 kg axit caprylic capric, 4,3 kg ancol lauryl, khuấy đều và gia nhiệt ở 80 °C trong 3 giờ. Hiệu suất phản ứng đạt 80,15 %. Phương

pháp này tuy không dùng dung môi EtOH và sản phẩm carotenoit thu được có độ tinh khiết cao (91,75 % carotenoit tổng số) nhưng phải dùng hỗn hợp axit caprylic capric, ancol lauryl và nước với lượng khá lớn, khó có khả năng thu hồi, yêu cầu thiết bị phức tạp (ly tâm tốc độ cao).

Như vậy, đa số phương pháp thủy phân đều sử dụng KOH trong ancol. Tuy nhiên, không có sự tương đồng về điều kiện thủy phân lutein este. Nguyên nhân là do các tác giả đã sử dụng các dung môi khác nhau (*n*-hexan, ete dầu mỏ, etyl axetat, ...) để chiết lutein tự do từ hỗn hợp thủy phân cũng như dùng các phương pháp và kỹ thuật khác nhau (TLC, UV-Vis, HPLC) để đánh giá hiệu suất quá trình thủy phân. Vì vậy, việc đánh giá lại ảnh hưởng của điều kiện thủy phân đến hiệu suất chuyển hóa lutein este thành lutein tự do, từ đó chọn lựa phương pháp thích hợp cho việc thủy phân lutein este là cần thiết.

1.3.5. Phương pháp tinh chế lutein

Lutein tự do thu được sau quá trình thủy phân cao chiết hoa CVT có độ tinh khiết thường đạt dưới 80 % [89, 94, 95, 103], do vậy cần phải kết tinh lại để thu được lutein có độ tinh khiết cao.

1.3.5.1. Tinh chế bằng hệ dung môi nước/etanol

R. Kumar và các cộng sự [104] tinh chế lutein bằng cách hòa tan 1,135 gam lutein 89 % trong 760 ml etanol ở nhiệt độ môi trường. Theo đó, thu được 0,5291 g lutein có độ tinh khiết 98 % (hiệu suất 51,3 %) và 0,2817 g lutein có độ tinh khiết 92 % (hiệu suất 25,7 %), tổng hiệu suất thu hồi đạt 77 %.

Swaminathan [95] tinh chế lutein bằng cách cho lutein thô thu được từ quá trình thủy phân hòa tan vào nước, tỷ lệ lutein thô (g)/nước (mL) là 1/8, ở 75 °C, độ pH bằng 7,0. Lọc loại bỏ dung môi, thu lấy kết tủa màu cam. Tiếp tục rửa kết tủa một lần nữa bằng etanol, tỷ lệ lutein thô (g)/etanol (mL) là 1/3, ở 50 °C trong 10 phút. Kết quả thu được lutein có độ tinh khiết 90,83 % với hiệu suất thu hồi đạt 76,76 %.

Bolanos và cộng sự [89] đưa ra phương pháp tách, tinh chế lutein sau quá trình thủy phân cao chiết của cánh hoa CVT như sau: 200 g cặn được đồng nhất trong hỗn hợp nước cất (700 mL)/etanol (300 mL), tại nhiệt độ phòng trong 30 phút. Hỗn hợp sau đó được lọc, loại bỏ dung môi, thu lấy kết tủa màu cam. Rửa kết tủa bằng nước cất cho đến khi nước rửa hết màu và pH trung tính. Tiếp tục rửa kết tủa một lần nữa bằng 200 mL etanol và *n*-hexan lạnh (0 °C-5 °C). Kết quả thu được tinh thể lutein có độ tinh khiết trên 70 %.

1.3.5.2. Kết tinh lại bằng diclometan/hexan

Nhóm nghiên cứu của Frederick Khachik [105] kết tinh lại lutein trong hệ dung môi diclometan/*n*-hexan (1/1, v/v) bằng cách hòa tan lutein 70 % trong 550 ml diclometan chứa 1 % trietylamin. Thêm từ từ *n*-hexan vào hệ cho đến khi hệ trở nên mờ đục, giữ ở nhiệt độ từ -20 °C đến -10 °C trong 3 giờ thu được lutein tinh thể. Tinh thể được lọc và rửa với 200 ml *n*-hexan (0 °C). Sau đó sấy chân không ở 50 °C trong 3 ngày. Kết quả được lutein có độ tinh khiết 97 %.

1.3.5.3. Tinh chế bằng THF/Nước

Frederick Khachik và các cộng sự [106] tiến hành hòa tan 2 g lutein 70 % trong 20 ml tetrahydrofuran (THF) và 30 ml nước cất để tinh chế lutein. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng 10 phút. Dung môi được loại bỏ bằng phương pháp ly tâm. Kết tủa lutein được lấy ra khỏi dung dịch, tiếp tục rửa kết tủa bằng 20 ml etanol, ly tâm, sau đó sấy khô trong chân không tại nhiệt độ phòng thu được 1,2 g lutein đạt độ tinh khiết 97 %.

1.3.5.4. Kết tinh lại bằng hexan/axeton (80/20)

Halagur và cộng sự [90] tiến hành cho 25,01 g cao chiết thô hòa tan trong 100 mL hệ dung môi *n*-hexan/axeton (80/20, v/v) tại nhiệt độ phòng 30 phút. Kết tủa của tinh thể lutein được lọc, rửa với metanol. Tinh thể màu vàng cam được sấy chân không tại nhiệt độ phòng 72 giờ.

1.3.6. Kết tinh lại zeaxanthin

Swaminathan [98] cho zeaxanthin (0,48 g, 75 %) hòa tan trong THF (5 mL) và nước (10 mL) để kết tinh lại. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Chất rắn được tách ra bằng ly tâm. Loại bỏ dung dịch, tinh thể zeaxanthin được rửa bằng 5 mL etanol. Ly tâm và làm khô ở điều kiện chân không trong khoảng 8 giờ ở nhiệt độ phòng. Kết quả thu được 0,35 g zeaxanthin.

Như vậy, sau khi tinh chế, độ tinh khiết của lutein đều được tăng lên đáng kể. Dung môi được sử dụng tinh chế lutein thường là hệ hai dung môi, điều này có thể được giải thích là do một số dung môi độc lập có khả năng hòa tan tốt lutein nhưng không thể kết tinh lại lutein bằng phương pháp hạ nhiệt độ hoặc bay hơi dung môi. Trong các hệ dung môi đã công bố, hệ dung môi etanol/nước có tính an toàn cao nhất nhưng thời gian tinh chế kéo dài. Với mục đích thu được lutein có độ tinh khiết cao, thời gian tinh chế ngắn,

lượng dung môi ít, không sử dụng bất kì dung môi độc hại nào, các nghiên cứu xác định dung môi và điều kiện tinh chế sẽ được tiến hành khảo sát trong luận án này.

1.4. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH LUTEIN VÀ ZEAXANTHIN

Phân tích lutein và zeaxanthin được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau với những điều kiện khác nhau tùy thuộc vào nguồn gốc thu nhận lutein từ nguồn thực vật khác nhau, chất lượng lutein cũng ảnh hưởng đến việc lựa chọn phương pháp. Phương pháp phân tích chủ yếu được sử dụng là HPLC, UV-Vis, LC-MS với các điều kiện cụ thể (bảng 1.7). Không thể sử dụng phương pháp GC để phân tích hàm lượng lutein do lutein là hợp chất kém bền với nhiệt.

Theo dược điển Mỹ thì có hai phương pháp chính để phân tích hàm lượng lutein và zeaxanthin là UV - Vis và LC [110].

Bảng 1. 7. Các phương pháp phân tích lutein, zeaxanthin

| | Phương pháp | Điều kiện | TLTK |
|---|--------------------|--|-------------|
| 1 | UV-Vis | Mẫu được hòa tan trong <i>n</i> -hexan. λ_{\max} : 474 nm. | [29] |
| 2 | UV-Vis | Mẫu được hòa tan trong dung môi chứa axetonitril/metanol/ <i>n</i> -hexan/diclometan (85/10/2,5/2,5, v/v). λ_{\max} : 446 nm. | [96] |
| 3 | UV-Vis | Mẫu được hòa tan trong <i>n</i> -hexan. λ_{\max} : 446 nm. | [88] |
| 4 | HPLC | Cột: C18, λ_{\max} : 447 nm. Dung môi: <i>n</i> -hexan/etyl axetat (65/35, v/v). | [29] |
| 5 | HPLC | Cột: C-30 YMC 30 Water (250 x 4,6 mm, 5 μ m) Pha động: metanol/axetonitril (20/80, v/v) λ_{\max} : 450 nm và 660 nm | [32] |
| 6 | HPLC | Cột: YMC RP-30 (4,6x250 mm) Dung môi: THF/metanol (1/9, v/v) λ_{\max} : 446 nm. | [97] |

| | Phương pháp | Điều kiện | TLTK |
|----|--------------------|--|-------------|
| 7 | HPLC | Cột: ZORBAX SB CN (75 mm×4,6 mm, 3,5 μm) Dung môi A: 3,153 g/l HCOONH ₄ trong H ₂ O Dung môi B: metanol λ_{\max} : 446 nm. | [103] |
| 8 | HPLC | Cột: Lichrocart C-18 (30 cm), Dung môi A: axetonitril/metanol (9/1, v/v) Dung môi B: etyl axetat. λ_{\max} : 450 nm | [103] |
| 9 | HPLC | Cột: Ultrasphere C18 (250 × 4,6 mm i.d., 5 μm, Beckman, Fullerton, CA). Dung môi: etanol/diclometan/axetonitril/nước (67,5/22,5/9,5/0,5, v/v). λ_{\max} : 450 nm. | [107] |
| 10 | HPLC | Cột HPLC: C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) Dung môi: axetonitril/metanol/nước/etyl axetat (70/9,6/0,4/20, v/v). λ_{\max} : 446 nm. | [108] |
| 11 | HPLC | Cột YMC C30 (150 × 2,1 mm, 3 μm). Dung môi: MTBE/etanol (2/8, v/v) λ_{\max} : 445 nm. | [109] |
| 12 | LC-MS | Cột: Lichrocart C-18 (30 cm) Dung môi A: axetonitril/metanol (9/1, v/v) Dung môi B: etyl axetat λ_{\max} : 450 nm Điều kiện MS: Điện thế 1,6 kV, nhiệt độ buồng ion hóa 400 °C. Nhiệt độ bay hơi dung môi 250 °C. Quét phổ trong khoảng từ m/z 200 đến 800. | [98] |

Bảng 1. 8. Phương pháp phân tích lutein, zeaxanthin theo dược điển Mĩ USP 40

| TT | Phương pháp phân tích | Điều kiện |
|----|--------------------------------|--|
| 1 | UV-Vis Xác định lutein tổng | λ_{\max} : 446 nm Dung môi: <i>n</i> -hexan/axeton/toluen/etanol (10/7/7/6, v/v) Dung dịch gốc: 0,3 mg/ml trong dung môi <i>n</i> -hexan/axeton/toluen/etanol (10/7/7/6, v/v) Dung dịch mẫu pha nồng độ 3,0 $\mu\text{g/ml}$ từ dung dịch gốc với etanol |
| 2 | LC | Cột: 4,6 mm x 25 cm, 5 μm λ_{\max} : 446 nm Dung môi pha động: <i>n</i> -hexan/etylaxetat (3/1, v/v) |

1.5. MỘT SỐ BIỆN PHÁP CẢI THIỆN SINH KHẢ DỤNG CỦA LUTEIN DÙNG ĐƯỜNG UỐNG

Nhiều công trình nghiên cứu về dược động học của lutein cho thấy: độ tan thấp, chuyển hóa mạnh và thải trừ nhanh là các lý do chính dẫn đến sinh khả dụng (SKD) của lutein thấp. Do đó, các biện pháp cải thiện SKD của lutein chủ yếu tập trung là làm tăng độ tan, giảm chuyển hóa hoặc sử dụng chất ức chế quá trình chuyển hóa của lutein và giảm thải trừ, kéo dài thời gian lưu thông trong đường tiêu hóa của lutein. Để đạt được mục tiêu này, các công trình nghiên cứu đã đề cập đến các biện pháp làm thay đổi đặc tính vật lý của dược chất (DC) như giảm kích thước phân tử (KTTP) xuống kích cỡ nanomet (bào chế hệ nano tinh thể) và tạo dạng bào chế trung gian chứa lutein như hệ phân tán rắn, hệ micell, vi nhũ tương, nhũ tương nano, hệ tự nhũ hóa hoặc dạng liên hợp.

1.5.1. Bào chế hệ nano tinh thể

Nano tinh thể dược chất là tinh thể với kích thước dưới 1 μm , mang đặc tính của tiểu phân nano và tinh thể [111], [112]. Tiểu phân nano tinh thể có thể cải thiện độ tan và tăng sinh khả dụng (SKD) của DC. Một số phương pháp bào chế nano tinh thể được trình bày ở bảng 1.9 [113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120].

Bảng 1. 9. Một số phương pháp bào chế nano tinh thể

| TT | Phương pháp | Nguyên tắc | Ưu nhược điểm |
|----|--|---|---|
| 1 | Nghiền (cả nghiền khô và nghiền ướt) | Sử dụng lực phân chia là lực va chạm, nén ép, mài mòn và lực ma sát do tương tác giữa tiểu phân với thành buồng nghiền, giữa các bi với nhau và giữa tiểu phân với tiểu phân. | Đơn giản, áp dụng được cho cả DC có độ tan thấp hoặc không tan. Tuy nhiên, chi phí thiết bị đắt tiền, dễ nhiễm vi sinh vật, tạp từ thiết bị mài mòn và hạn chế về kích thước buồng nghiền. |
| | Nghiền khô | Sự giảm KTTP trong quá trình nghiền khô do ma sát, sự cọ mòn, va chạm và đứt gãy của tương tác tiểu phân với tiểu phân hoặc tiểu phân với thiết bị. | Thời gian nghiền kéo dài, năng lượng đầu vào cao gây nóng thiết bị và ảnh hưởng đến độ ổn định của DC nhạy cảm với nhiệt, các viên bi có thể bị mài mòn do va chạm với thành buồng nghiền tạo ra tạp. |
| | Nghiền ướt | Nghiền ướt là quá trình giảm KTTP trong đó tiểu phân rắn được phân tán vào môi trường lỏng. | Được sử dụng nhiều hơn nghiền khô để tránh tác động của nhiệt và rút ngắn thời gian nghiền, đồng thời trực tiếp tạo ra dạng bào chế. |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2 | <p style="text-align: center;">Đồng nhất hóa áp suất cao</p> | <p>Tiểu phân DC được phân chia bằng cách nén qua một khe hẹp dưới áp lực cao trong các thiết bị đồng nhất hóa. Lực phân chia tiểu phân chủ yếu là lực nén ép và va đập.</p> | <p>Phương pháp này tạo ra ít tiểu phân kích thước micro, ít nhiễm tạp, khắc phục nhược điểm của hai phương pháp nghiền và kết tủa, năng suất cao, áp dụng được với DC nhạy cảm với nhiệt, có thể thu được nhũ tương nano ít có sự khác nhau giữa những lô mẻ, dễ dàng tái sản xuất. Tuy nhiên, đòi hỏi số vòng đồng nhất hóa cao và DC nên ở dạng siêu mịn.</p> |
|---|---|---|---|

1.5.2. Bào chế hệ phân tán rắn

Hệ phân tán rắn là hệ phân tán của DC (hoặc ở trạng thái phân tử hòa tan trong dạng vô định hình hoặc bán tinh thể) trong một chất mang trơ có khả năng tăng độ tan và tốc độ hòa tan của DC ít tan.

Cơ chế làm tăng tốc độ hòa tan do giảm kích thước tiểu phân (KTTP) đến mức độ rất mịn có thể đến mức độ phân tử, tăng tính thấm ướt nhờ sự có mặt chất mang ưa nước và chất hoạt động bề mặt. Ngoài ra, do cấu trúc xốp, diện tích bề mặt đặc hiệu tăng cũng như thay đổi trạng thái kết tinh của DC sang trạng thái vô định hình dẫn đến tốc độ hòa tan tăng [121].

1.5.3. Bào chế micell

Micell là một tập hợp của các phân tử chất hoạt động bề mặt phân tán trong một dịch huyền phù với kích thước tiểu phân từ 10 đến 100 nm. Đặc tính chức năng của micell dựa vào chất hoạt động bề mặt hai đầu, vùng "đầu ưa nước" tiếp xúc với dung môi xung quanh, bảo vệ các vùng "đuôi kỵ nước" ở bên trong hạt micell [111].

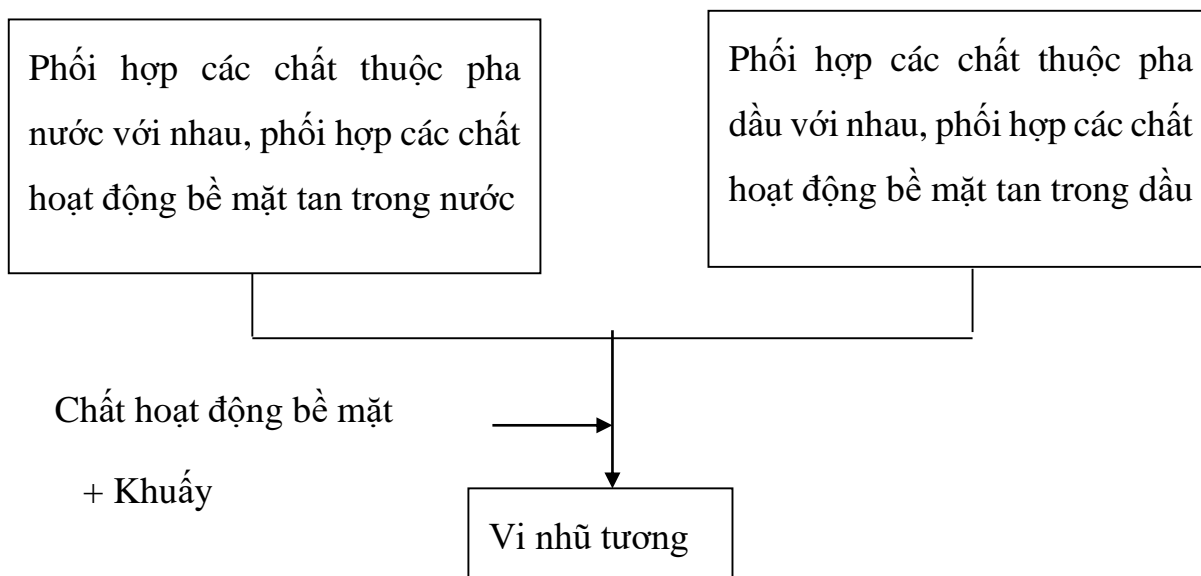
Do có cấu trúc hai đầu, micell là hệ đưa thuốc triển vọng với các DC ít tan và SKD thấp. Đầu kỵ nước bên trong đóng vai trò như một kho chứa đối với DC ít tan. Hệ micell tăng SKD đường uống của DC do bảo vệ DC khỏi môi trường khắc nghiệt trong hệ thống dạ dày, ruột, giải phóng DC một cách kiểm soát ở vị trí đích, kéo dài thời gian lưu trong ruột [122].

1.5.4. Bào chế vi nhũ tương/ nhũ tương nano

Vi nhũ tương là các hỗn hợp đẳng hướng quang học, thành phần gồm dầu, nước và các chất hoạt động bề mặt. Các DC kỵ nước có thể được hòa tan trong pha dầu của vi nhũ tương D/N [123].

Hệ nhũ tương nano có ưu điểm ổn định nhiệt động học tốt hơn nhũ tương và nhũ tương quy ước, trong suốt, dễ bào chế và có đặc tính riêng vì sử dụng dung môi hòa tan cả DC ưa nước và kỵ nước. Hơn nữa, vì kích thước giọt nhỏ, phân tử DC trong nhũ tương nano có thể đi qua màng tế bào, dẫn đến tăng nồng độ trong huyết tương và tăng SKD [124].

Vi nhũ tương có phương pháp bào chế đơn giản được thể hiện trong sơ đồ hình 1.4.



Hình 1.4. Sơ đồ bào chế vi nhũ tương

Trình tự phối hợp các chất trong vi nhũ tương gần như không ảnh hưởng tới sự hình thành hệ nhưng đôi khi lại ảnh hưởng đến thời gian hình thành.

Vi nhũ tương gồm có các thành phần sau:

Pha dầu: gồm những chất lỏng không phân cực như dầu lạc, dầu nành, dầu hướng dương, isopropyl myristat, triglycerit mạch cacbon trung bình, axit oleic, ... và các chất hòa tan hay đồng tan vào chúng như metanol, terpen, tinh dầu, ...

Pha nước: gồm những chất lỏng phân cực như nước, etanol, propylen glycol và những chất dễ hòa tan hay đồng tan vào chúng.

Chất hoạt động bề mặt: là những chất có khả năng làm giảm sức căng bề mặt phân chia pha, qua đó giúp hình thành vi nhũ tương. Một số chất HDBM hay dùng như natri lauryl sulfat, polyoxietylen oleyl ete, cremophor EL²... Trong công thức vi nhũ tương, tỷ lệ chất HDBM cao hơn trong nhũ tương thông thường.

Một chất HDBM điển hình là những hợp chất hai đầu, tức là trong phân tử có chứa đầu ưa nước và đầu ưa dầu.

- Đầu ưa nước của chất HDBM thường được cấu tạo bởi các nhóm chức phân cực như nhóm hydroxyl $-OH$, carboxyl $-COO^-$, sulfat SO_4^{2-} , sunfit SO_3^{2-} nên có mômen lưỡng cực cao.

- Đầu ưa dầu thường là gốc hydrocacbon không phân cực hoặc ít phân cực (có mômen lưỡng cực thấp).

Chỉ những chất HĐBM mà trong phân tử có hai thành phần này không cân bằng mới có thể làm giảm năng lượng tự do bề mặt pha, từ đó làm giảm sức căng bề mặt phân cách hai pha. Khi cho chất HĐBM vào hỗn hợp pha nước và pha dầu, các phân tử chất HĐBM sẽ tự sắp xếp trên bề mặt hai pha tạo thành cấu trúc tự liên kết có dạng micell hình cầu, micell hình ống, micell dạng bản mỏng, hoặc micell đảo...

1.5.5. Ưu điểm và nhược điểm của các hệ phân tán

Theo hướng nghiên cứu cải thiện độ tan của lutein và zeaxanthin, các biện pháp có thể áp dụng là bào chế dưới dạng hệ nano tinh thể, hệ tự nhũ hóa, vi nhũ tương, hệ micell hoặc hệ phân tán rắn, ... [125, 126]. Hệ nano tinh thể có ưu điểm là dễ dàng ứng dụng vào thực tiễn, tỷ lệ DC cao, phù hợp với cả DC ít tan trong nước và dầu, dễ dàng ứng dụng vào các dạng thuốc rắn dùng đường uống. Nhược điểm của hệ nano tinh thể là chỉ thích hợp với DC có độ ổn định cao, không thích hợp để bào chế các DC độc và DC có chỉ định điều trị hẹp; hệ nano tinh thể cũng chưa kiểm soát được quá trình giải phóng DC, phương thức bào chế phức tạp, ... Vi nhũ tương khả năng hòa tan cao và cải thiện tính thấm do sự có mặt của các chất hoạt động bề mặt, nhưng lại kém ổn định. Tương tự, hệ micell chất hoạt động bề mặt và hệ tự nhũ hóa cũng có khả năng cải thiện độ tan và tính thấm do tỷ lệ chất hoạt động bề mặt sử dụng khá cao. Bên cạnh các nhược điểm của vi nhũ tương, hệ micell chất hoạt động bề mặt và tự nhũ hóa còn có thể gây kích ứng đường tiêu hóa khi dùng đường uống do tỷ lệ chất hoạt động bề mặt cao. Hệ phân tán rắn dễ bào chế, tiểu phân DC được phân tán trong hệ chất mang có độ xốp cao do đó giải phóng DC nhanh. Hệ phân tán rắn có thể cải thiện độ tan và tốc độ hòa tan đáng kể hơn so với phương pháp thay đổi dạng kết tinh của DC, đồng thời hệ phân tán rắn còn làm chậm sự tái kết tinh hoặc kết tụ của phân tử DC hoặc cụm phân tử do tương tác phân tử và cản trở không gian trong hệ chất mang [127]. Kỹ thuật tạo hệ phân tán rắn có thể tạo ra tiểu phân kích thước mịn mà không cần năng lượng đầu vào quá cao [128]. Nhược điểm của hệ phân tán rắn liên quan đến độ ổn định nhiệt động học. DC ở dạng vô định hình được tạo ra trong hệ phân tán rắn thường không ổn định về mặt vật lý và có thể chuyển sang dạng kết tinh trong quá trình bảo quản. Hệ phân tán rắn phải sử dụng chất mang với tỷ lệ tương đối lớn mới có thể cải thiện được độ tan và độ hòa tan của DC. Hơn nữa, sự có mặt của chất mang có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của hệ phân tán rắn do đa số các chất mang đều hút ẩm mạnh [129]. Ưu, nhược điểm của từng hệ phân tán được trình bày tóm tắt ở bảng 1.10.

Bảng 1. 10. Ưu, nhược điểm của các hệ phân tán

| Dạng bào chế | Ưu điểm | Nhược điểm |
|------------------|--|---|
| Hệ nano tinh thể | <ul style="list-style-type: none"> - Cải thiện được tốc độ hòa tan so với DC ban đầu. - Thích hợp cho dạng bào chế dùng đường uống [130, 131]. | <ul style="list-style-type: none"> - Đòi hỏi DC có tính ổn định cao. - Không thích hợp với DC độc và DC có chỉ định điều trị hẹp. - Năng lượng yêu cầu cao. - Chưa có sự kiểm soát quá trình giải phóng DC. |
| Nhũ tương nano | <ul style="list-style-type: none"> - Kỹ thuật bào chế đơn giản. - Khả năng hấp thụ DC cao. - Thích hợp cho dạng bào chế dùng đường uống. - Giá thành thấp. | <ul style="list-style-type: none"> - Xu hướng tách pha. - Chưa có sự kiểm soát quá trình giải phóng DC. |
| Micell polyme | <ul style="list-style-type: none"> - Có thể kiểm soát giải phóng DC. | <ul style="list-style-type: none"> - Giới hạn trong việc lựa chọn polyme thích hợp. - Chưa có phương pháp bào chế thích hợp để nâng cấp quy mô. |
| Hệ phân tán rắn | <ul style="list-style-type: none"> - Tạo kích thước phân tử mịn với năng lượng đầu vào thấp. | <ul style="list-style-type: none"> - Độ ổn định nhiệt động học kém. - Lượng chất mang lớn. |

Căn cứ vào việc phân tích ưu, nhược điểm của các biện pháp đã trình bày ở trên, hướng bào chế hệ nhũ tương nano được lựa chọn nghiên cứu trong luận án này.

P. Niamprem và các cộng sự [129] đã bào chế hệ vận chuyển thuốc tự tạo nano nhũ (SNEDDS). SNEDDS được cấu tạo bởi hỗn hợp lexol và emulmetik 900, labrsol và tween 80 được xem như dầu, chất hoạt động bề mặt và đồng chất hoạt động bề mặt. SNEDDS bào chế được có kích thước 250 nm, độ tan và tính tương thích sinh học qua đường uống của lutein tăng lên đáng kể. Tuy nhiên, SNEDDS cho thời gian nhả thuốc nhanh hơn 2 lần.

Frede và cộng sự [132] sử dụng lecithin, tween 20, tocopherol, biozate và lactoglobulin để tạo nhũ mang lutein. Pha dầu gồm 2,5 mM lutein, 0,1 mM α -tocopherol làm chất chống oxy hóa để ức chế quá trình oxy hóa lutein và 0,01 g/ml lecithin trong EtOH/MCT - dầu (50/50, v/v). Pha nước gồm 0,05 g/ml β -lactoglobulin, biozate hoặc tween 20 trong nước. Nhũ tương (20 % dầu trong nước (O/W, v/v) được điều chế trong ống sẫm màu bằng cách trộn và khuấy 1 ml pha dầu và 4 ml pha nước trong 10 phút với

tốc độ khuấy 500 vòng/phút. Nhũ tương được đồng nhất bằng cách sử dụng máy đồng nhất siêu âm trong 5 phút. Kích thước tiểu phân nhũ tương chứa lutein đạt các giá trị từ 0,26 đến 0,61 μm , nhũ lutein đã cải thiện tính tương thích sinh học của lutein. Hơn nữa, sự kết hợp của lecithin, tween 80 và α -tocopherol ngăn chặn sự phân hủy của lutein.

Liu và cộng sự [133] tạo nhũ nano chứa lutein. Lutein được hòa tan trong dietylen glycol monoethyl ete (Transcutol). Lutein trong transcutol (0,2 g trong 19 g) được trộn với dầu ngô (1,8 g) và span 20 (3,0 g) ở 80 °C trong bể khô. Pluronic F68 (2,0 g) và cyclodextrin (2,0 g) được phân tán trong 72 g nước. Cuối cùng, huyền phù lutein trong nước được điều chế bằng cách siêu âm hỗn hợp của lutein (0,2 %), dầu ngô (0,8 %), transcutol (19%) và nước (80 %) trong 1,5 phút với thiết bị siêu âm đầu dò. Kích thước tiểu phân nhũ nano chứa lutein đạt 91 – 97 nm, độ ổn định KTTP đạt 3 – 4 tuần, độ tan của nhũ nano chứa lutein tăng 9,2 lần so với huyền phù lutein.

Murillo và cộng sự [134] tạo hệ huyền phù nano lutein dầu trong nước bằng cách sử dụng công thức chứa 8,4 % d- α -tocopheryl polyetylen glycol succinat, 11,2 % dầu (60:40 hỗn hợp caprylic và axit capric), 70,4 % nước, 10 % bột lutein (5 % lutein). Kết quả, tạo ra các huyền phù nano có KTTP đạt 254,2 nm và nồng độ lutein cao hơn 2 lần so với lutein dạng bột.

Như vậy, các nghiên cứu bào chế nhũ tương nano lutein đã được nghiên cứu, độ tan của nhũ tương nano lutein được cải thiện đáng kể so với lutein dạng bột. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu giảm được kích thước của lutein xuống dưới 100 nm để đạt yêu cầu của nhũ tương nano trong dược phẩm [135]. Độ ổn định của nhũ tương nano cũng chưa được đề cập đến.

1.6. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU Ở VIỆT NAM

Việc sử dụng CVT để hỗ trợ chữa bệnh từ lâu đã được lưu truyền trong dân gian nhưng các nghiên cứu chuyên sâu về thành phần và hoạt tính của các chất trong CVT còn tương đối hạn chế.

Trần Thị Huyền Nga và cộng sự [136] đã nghiên cứu tách chiết lutein este từ mẫu cánh hoa CVT thu được hàm lượng lutein este cao nhất là 714 mg/100g bằng dung môi *n*-hexan và cao chiết CVT được phối với cao lá gấc, cao mướp đắng để tạo thực phẩm chức năng.

Lê Huy Hoàng và cộng sự [137] đã nghiên cứu, sản xuất viên nén thực phẩm chức năng chứa lutein điều chế từ cánh hoa cúc vạn thọ có tác dụng tăng cường thị lực cho bộ đội hoạt động trong điều kiện thiếu ánh sáng. Các tác giả đã bào chế được 2.000 viên nén thực phẩm chức năng dưỡng mắt, thành phần chính là hỗn hợp carotenoit từ thiên nhiên, gồm lutein từ cánh hoa cúc vạn thọ và β -caroten từ rau củ quả kết hợp với một số dưỡng chất có lợi khác như protein, glucit, ... Sản phẩm đạt tiêu chuẩn thực phẩm chức năng do Bộ Y tế quy định.

Nhóm nghiên cứu của PGS.TS Hoàng Thị Huệ An [138, 139, 140, 141] đã nghiên cứu chiết tách lutein từ CVT. Trước tiên, nguyên liệu hoa CVT (*Tagetes erecta L.*) được tiền xử lý bằng enzym viscozyme nhằm “nới lỏng cấu trúc” dẫn đến tăng cường hiệu quả chiết. Tiếp theo, CVT được chiết bằng dung môi *n*-hexan. Dịch chiết thu được làm khan bằng Na_2SO_4 rồi được cô đuổi dung môi để thu cao chiết. Cao chiết được thủy phân bằng hỗn hợp rượu kiềm nhằm giải phóng lutein và zeaxanthin tự do. Sản phẩm sau khi thủy phân được tách xà phòng, trung hòa hỗn hợp thu được và kết tinh lutein và zeaxanthin bằng nước nóng. Tinh thể tạo thành được lọc, sấy chân không ở 50 °C. Sản phẩm thu được được cấp đông ở -20 °C để bảo quản và được sử dụng làm chất màu thực phẩm. Lutein đạt độ tinh khiết 92 % được sử dụng cho việc làm màu thực phẩm.

Mặc dù đã được nghiên cứu khá công phu nhưng nghiên cứu này còn bộc lộ một số vấn đề như sau: Chưa nghiên cứu một cách hệ thống từ khâu chế biến sơ bộ nguyên liệu đến khâu bảo quản sản phẩm; Chưa khảo sát các loại dung môi chiết khác ngoài dung môi không phân cực *n*-hexan nên hiệu quả chiết không cao, thời gian chiết lâu (lutein thu nhận từ hoa CVT tươi có độ tinh khiết hơn 90 %, tổng số carotenoit hơn 96 %, hiệu suất thu hồi lutein hơn 52,83 %; còn sản phẩm thu nhận từ bột hoa CVT khô chiết bằng Soxhlet có tổng số carotenoit hơn 82%, hiệu suất thu hồi lutein hơn 75 %); Chưa nghiên cứu làm giàu cao chiết trước khi tiến hành thủy phân; Chưa nghiên cứu phương pháp tinh chế lutein đạt tiêu chuẩn dược điển Mỹ (bảng 1.11). Mục tiêu nghiên cứu của tác giả là tách được lutein, ứng dụng sản phẩm làm chất màu thực phẩm, không hướng tới mục tiêu ứng dụng làm dược phẩm.

Bảng 1.11. Tiêu chuẩn của dược điển Mỹ đối với nguyên liệu lutein [110]

| TT | Tên chỉ tiêu | Đơn vị | Mức chất lượng cần đạt |
|----|-------------------------------------|--------|--|
| 1 | Hình thức | - | Tinh thể, màu vàng nhạt đến vàng cam đậm |
| 2 | Tổng hàm lượng lutein và zeaxanthin | % kl | ≥ 80 |
| 3 | Hàm lượng lutein | % kl | ≥ 74 |
| 4 | Hàm lượng zeaxanthin | % kl | $\leq 8,4$ |

PGS. TS. Hoàng Thị Huệ An cùng nhóm nghiên cứu cũng đã phát triển sản phẩm lutein thành các vi nang [140] tan trong nước bằng phương pháp sấy phun sử dụng vật liệu bọc mantodextrin và 1000ml vi nhũ tương lutein [139] ổn định bởi hệ chất nhũ hóa tween 80-Span 80 như sau: lutein (0,4%, w/w), dầu nành (1,6 %, w/w), tween 80 (20%, w/w), span 80 (10 %, w/w), vitamin E (0,06%, w/w), NATA-MU (0,05 %, w/w), nước cất 2 lần (67,94 %, w/w). Sản phẩm vi nhũ tương lutein có hàm lượng lutein là $0,38 \pm 0,01$ (%), dư lượng dung môi hữu cơ và kim loại nặng dưới mức cho phép. Sản phẩm bền về mặt động học, carotenoid tổng số suy giảm $< 7,8\%$ sau 30 ngày bảo quản trong bóng tối ở $- 20$ °C. Sản phẩm được ứng dụng làm chất màu thực phẩm. Tuy nhiên, sản phẩm không thích hợp để tạo màu cho các dạng thực phẩm lỏng giàu nước, bảo quản ở nhiệt độ phòng với thời hạn sử dụng dài (nước giải khát, nước tăng lực, ...) mà chỉ có thể ứng dụng đối với một số sản phẩm dạng sệt yêu cầu bảo quản lạnh, thời gian bảo quản ngắn (sữa chua, tào hủ tươi) và thích hợp hơn để tạo màu cho thực phẩm dạng rắn (bánh quy, kẹo gum, chả cá, ...).

Các công trình nghiên cứu trong nước về chiết tách, tinh chế lutein còn khá hạn chế, hướng nghiên cứu tạo hệ phân tán nano của lutein vẫn còn mới. Vì vậy, kết quả nghiên cứu đạt được trong luận án có thể là cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn, rộng hơn của những đề tài liên quan ứng dụng của lutein cho dược phẩm.

1.7. MỘT SỐ KẾT LUẬN RÚT RA TỪ TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Quá trình tổng quan tài liệu chỉ ra rằng có khá nhiều phương pháp khác nhau để chiết xuất, tinh chế lutein và các tác giả trong nước đã nghiên cứu khá công phu, đạt được những kết quả khả quan nhưng mới dừng ở phòng thí nghiệm với mục đích sử

dụng sản phẩm làm hợp chất tạo màu thực phẩm. Để thực hiện được mục tiêu tinh chế được hoạt chất lutein từ hoa CVT, ứng dụng trong dược phẩm, còn cần phải giải quyết những vấn đề khoa học như sau:

- Cần phải nghiên cứu một cách hệ thống từ khâu chế biến sơ bộ nguyên liệu CVT đến khâu bảo quản sản phẩm lutein;
- Cần phải nghiên cứu tinh chế được lutein đạt tiêu chuẩn dược điển Mỹ để nâng cao giá trị khoa học cũng như giá trị thực tiễn của sản phẩm lutein;
- Cần phải nghiên cứu phân lập được lutein và zeaxanthin có độ tinh khiết cao nhằm chủ động chất chuẩn phân tích trong các phòng thí nghiệm, khắc phục tình trạng khan hiếm chất chuẩn lutein, zeaxanthin tại Việt Nam;
- Cần phải bào chế được lutein “tan” nhằm tăng sinh khả dụng của lutein qua đường uống.

Chính vì thế, đề tài luận án sẽ tiến hành thực hiện các nội dung như sau:

- Nghiên cứu một cách hệ thống các phương pháp sơ chế và bảo quản đối với các nguồn nguyên liệu khác nhau để đảm bảo chất lượng nguyên liệu;
- Nghiên cứu xử lý nguyên liệu trước khi chiết để nâng cao hiệu quả quá trình chiết;
- Nghiên cứu một cách hệ thống các loại dung môi chiết khác ngoài dung môi không phân cực *n*-hexan; nghiên cứu làm giàu cao chiết bột hoa CVT trước khi tiến hành thủy phân cao chiết;
- Nghiên cứu kết tinh, tinh chế để được tinh thể lutein bằng các dung môi thân thiện môi trường với cách tiến hành đơn giản;
- Nghiên cứu tìm ra phương pháp bảo quản lutein tinh thể phù hợp, nhằm tránh quá trình oxy hóa làm biến đổi, phân hủy lutein;
- Nghiên cứu phân lập được lutein và zeaxanthin để sử dụng làm chất chuẩn phân tích;
- Nghiên cứu kiểm nghiệm chất lượng lutein theo dược điển Mỹ; đánh giá độ tinh cấp, độ tinh bán trường diễn và độ ổn định của lutein;
- Bào chế nhũ tương nano lutein.

CHƯƠNG 2: THỰC NGHIỆM

2.1. NGUYÊN LIỆU, HÓA CHẤT, DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ

2.1.1. Nguyên liệu, hóa chất

Cúc vạn thọ *Tagetes erecta* L. được trồng tại Nam Định. Hoa được thu hái vào tháng 12 năm trước đến tháng 5 của năm kế tiếp, bảo quản trong các điều kiện thích hợp. CVT tươi được tách cuống, đài hoa và nhụy, thu lấy phần cánh hoa màu vàng cam. Mẫu hoa được giám định thực vật bởi Tiến sĩ Nguyễn Quốc Bình, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các loại hóa chất sử dụng trong nghiên cứu có nguồn gốc từ Mỹ, Châu Âu và Trung Quốc. Ngoài ra, nghiên cứu còn sử dụng các loại hóa chất công nghiệp có nguồn gốc từ Trung Quốc và Việt Nam. Danh mục nguyên vật liệu, hóa chất được trình bày ở bảng 2.1.

Bảng 2.1. Danh mục nguyên vật liệu, hóa chất sử dụng trong luận án

| STT | Nguyên vật liệu, hoá chất | Thông số kỹ thuật | Xuất xứ |
|-----|---------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 1 | Hoa CVT tươi | Hoa tươi màu vàng cam, không dập nát | Nam Định Việt Nam |
| 2 | Axit citric | Độ tinh khiết 99 % | Sigma Aldrich |
| 3 | Axit citric | Dạng khan | Trung Quốc |
| 4 | KOH | Tinh khiết | BioExtra |
| 5 | KOH | Hàm lượng KOH ≥ 90 % | Hàn Quốc |
| 6 | NaOH | Độ tinh khiết ≥ 98 % | BioExtra |
| 7 | Etanol | Độ tinh khiết $\geq 99,7$ % | Merk |
| 8 | Etanol thực phẩm | Hàm lượng etanol ≥ 96 % | Việt Nam |
| 9 | Axetonitril | Độ tinh khiết ≥ 99 % | Merk |
| 10 | Metanol | Độ tinh khiết $\geq 99,7$ % | Merk |
| 11 | Etyl axetat | Độ tinh khiết ≥ 99 % | Merk |

| STT | Nguyên vật liệu, hoá chất | Thông số kỹ thuật | Xuất xứ |
|-----|---|--|-----------------|
| 12 | <i>n</i> -Hexan | Độ tinh khiết $\geq 99,5\%$ | Merk |
| 13 | Axeton | Độ tinh khiết $\geq 99,5\%$ | Merk |
| 14 | Chất chuẩn lutein | Tinh khiết phân tích $\geq 98\%$ | Sigma Aldrich |
| 15 | Chất chuẩn zeaxanthin | Tinh khiết phân tích $\geq 95\%$ | Sigma Aldrich |
| 16 | Bộ sắc ký bản mỏng | Phủ 1 lớp silica gel 60 | Sigma Aldrich |
| 17 | Dung môi HPLC | Tinh khiết HPLC | Merk |
| 18 | Silica gel | Mesh 230– 400 (40 – 63 μm) | Merk |
| 19 | Bộ phụ tùng và cột sắc ký HPLC thay thế | Đạt tiêu chuẩn kỹ thuật của nhà sản xuất | Agilent – Mỹ |
| 20 | Nước cất | Tinh khiết | PTNTĐ CNLHD |
| 21 | Nước sạch | Đạt độ sạch theo TCVN | Việt Nam |
| 22 | Tween 80 | Tinh khiết | Trung Quốc |
| 23 | Span 60 | Tinh khiết | Trung Quốc |
| 24 | Các hóa chất khác | Tinh khiết | Đức, Trung Quốc |

2.1.2. Dụng cụ và thiết bị

Danh mục dụng cụ, thiết bị sử dụng trong luận án được trình bày ở bảng 2.2.

Bảng 2.2. Danh mục dụng cụ, thiết bị sử dụng trong luận án

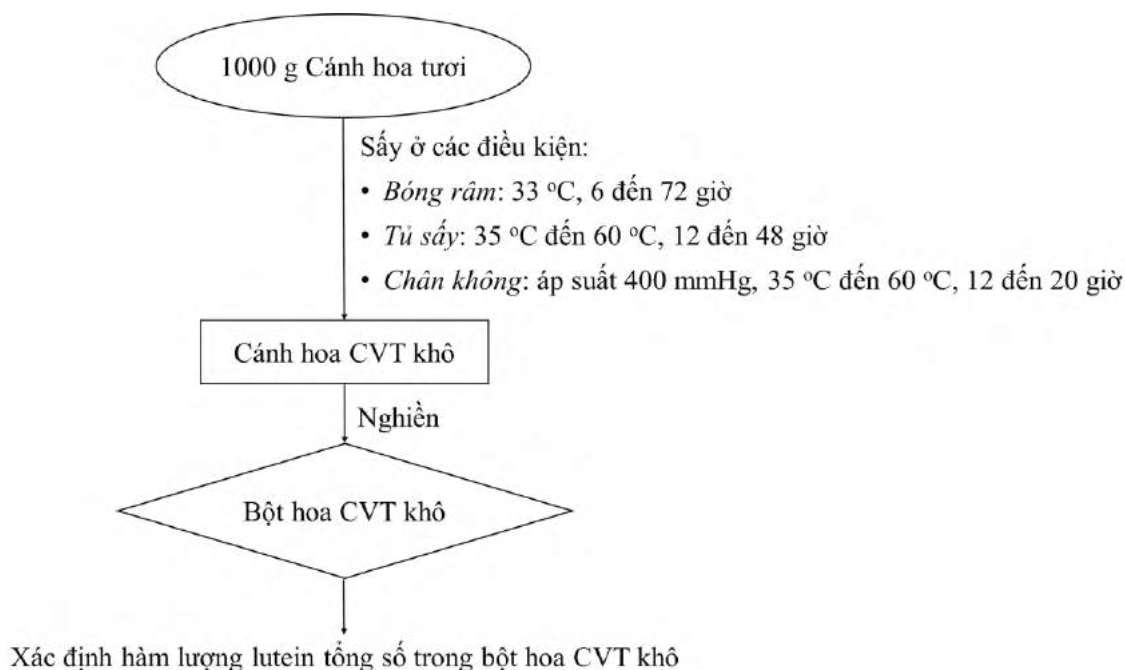
| STT | Dụng cụ, thiết bị | Thông số kỹ thuật chính | Xuất xứ |
|-----|-------------------------------|--|------------|
| 1 | Cột chiết | Vật liệu thủy tinh Đường kính cột từ 15 mm đến 50 mm. | Đức |
| 2 | Nhiệt kế | Khoảng đo đến 200 °C | Trung Quốc |
| 3 | Bơm chân không | Độ chân không đến 10 mmHg | Đức |
| 4 | Tủ sấy chân không Vacucell | Dung tích lòng 55 L, nhiệt độ làm việc +5 đến 200 °C | Đức |

| STT | Dụng cụ, thiết bị | Thông số kỹ thuật chính | Xuất xứ |
|-----|-----------------------------------|---|-------------------------|
| 5 | Tủ sấy quạt gió BINDER | Thể tích: 53 L Nhiệt độ max: 300 °C Bộ điều khiển với thiết bị cài đặt hẹn giờ từ 00 – 99 giờ Điều chỉnh tốc độ quạt tải nhiệt, chức năng cài đặt thời gian chờ và trì hoãn thời gian gia nhiệt. | Đức |
| 6 | Máy nghiền nguyên liệu | SHBO SB 100, điện áp 220V, công suất 670W. | Trung Quốc |
| 7 | Thiết bị sắc ký lỏng HPLC | Model: Agilent 1200 Cột C18- pha đảo Nhiệt độ làm việc đến 50 °C Detector: DAD | Mỹ |
| 8 | Máy đo UV-Vis Agilent | Bước sóng 200 -800 nm | Mỹ |
| 9 | Thiết bị đo LC – MS/MS | Model: ACQUITY UPLC H-Class/Xevo TQ MS Cột pha đảo ACQUITY UPLC C18 BEH 130Å, 1,7 µm, 2,1×100 mm | Mỹ |
| 10 | Máy siêu âm | Elmasonic S | Đức |
| 11 | Máy đồng hóa | D-160/10 | Trung Quốc |
| 12 | Máy khuấy từ, có gia nhiệt | Gia nhiệt từ 0-400 °C | Trung Quốc |
| 13 | Máy cô quay chân không | Hãng Buchi | Đức |
| 14 | Hệ thiết bị có khuấy qui mô pilot | Dung tích 500 L, 50 L Vật liệu SUS 304 | PTNTĐ CNLHD |
| 15 | Các thiết bị khác | - | Việt Nam, Trung Quốc |

2.2. PHƯƠNG PHÁP THỰC NGHIỆM

2.2.1. Sơ chế - bảo quản nguyên liệu

Sơ đồ mô tả quá trình sơ chế - bảo quản nguyên liệu được đưa ra trên hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ lựa chọn phương pháp sơ chế cánh hoa CVT tươi.

CVT tươi được tách cuống, đài hoa và nhụy thu lấy cánh hoa màu vàng cam. Hoa tươi được sấy đến vừa khô giòn. Chế độ sấy thích hợp (nhiệt độ, thời gian) được xác định bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm từng phần, cụ thể:

Khối lượng CVT tươi ở mỗi thí nghiệm là 1000 g.

Phơi mẫu trong bóng râm: Nhiệt độ trung bình trong thời gian phơi là 33 °C.

Sấy bằng tủ sấy: Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ sấy (từ 35 °C đến 60 °C) và thời gian sấy (12 giờ đến 48 giờ).

Sấy ở điều kiện chân không: Áp suất chân không trong quá trình sấy được cố định ở 400 mmHg. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ sấy (từ 35 °C đến 60 °C) và thời gian sấy (12 giờ đến 20 giờ).

CVT tươi sau khi sấy được nghiền thành bột mịn (kích thước 0,2 – 0,5 mm), giữ trong bao bì kín, tránh ánh sáng, bảo quản ở -10 °C

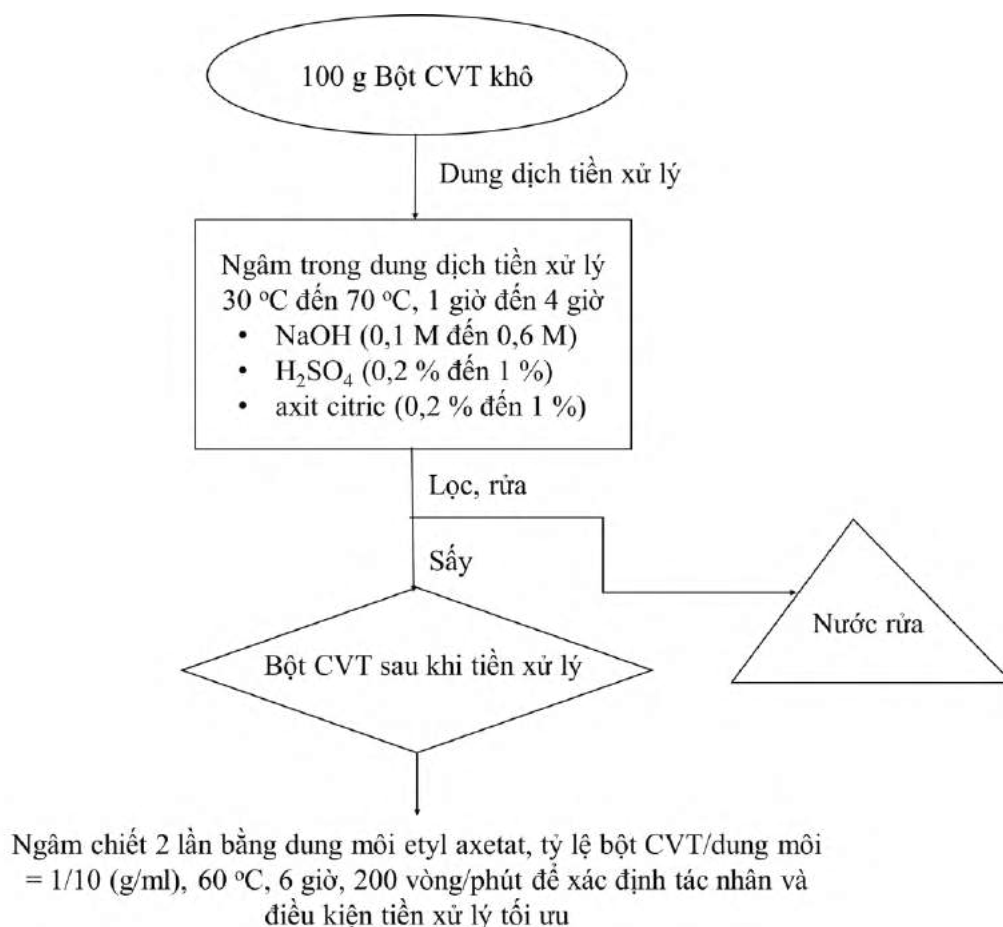
Xác định hàm lượng lutein tổng của từng mẫu bột CVT khô thu được sau khi sấy (theo mục 2.2.2), từ đó xác định được chế độ sấy CVT tươi.

2.2.2. Xác định hàm lượng lutein tổng trong bột hoa Cúc vạn thọ [29, 142]

Cân chính xác G (g) mẫu phân tích (khoảng 1g) cho vào bình tam giác, thêm 20 ml etyl axetat, vặn nút kín. Ngâm mẫu ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng, thời gian khoảng 24 giờ, sau đó lọc lấy dịch. Lặp lại quá trình trên thêm 5 lần với phần bã cho đến khi dịch chiết nhận được không có màu. Gộp các dịch chiết lại đem đi xác định hàm lượng lutein tổng bằng phương pháp UV-Vis (mục 2.5.1).

2.2.3. Tiền xử lý nguyên liệu hoa Cúc vạn thọ

Các bước nghiên cứu được tóm tắt theo sơ đồ hình 2.2.



Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu ảnh hưởng của tiền xử lý bột CVT khô

Bột CVT khô thu được sau khi sấy CVT tươi ở điều kiện chân không lần lượt được tiền xử lý với NaOH, axit sunfuric và axit citric. Chế độ tiền xử lý (nhiệt độ, thời gian, nồng độ tác nhân) được xác định bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm từng phần, cụ thể: Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ (từ 30 °C đến 70 °C), và thời gian (1 giờ đến 4 giờ) đối với cả 3 tác nhân, tác nhân lần lượt khảo sát, nồng độ NaOH (0,1 M đến 0,6 M), H₂SO₄ (0,2 % đến 1 %), axit citric (0,2 % đến 1 %).

Bột CVT ($m_{\text{bột CVT}}$) sau khi tiền xử lý được ngâm chiết 2 lần bằng dung môi etyl axetat với tỷ lệ bột CVT/dung môi = 1/10 (g/mL), tại 60 °C, tốc độ khuấy 200 vòng/phút trong 6 giờ.

Xác định khối lượng cao chiết ($m_{\text{cao chiết}}$), hàm lượng lutein tổng trong cao chiết bằng phương pháp UV-Vis (mục 2.5.1), tính toán hiệu suất chiết để lựa chọn được tác nhân và các điều kiện tiền xử lý tốt nhất. Hiệu suất chiết được xác định như sau:

$$\begin{aligned} \text{Hiệu suất chiết lutein este} &= \frac{m_{\text{cao chiết}} \times \text{hàm lượng lutein tổng trong cao chiết}}{m_{\text{bột CVT}} \times \text{hàm lượng lutein tổng trong bột CVT}} \times 100, \% \\ &= \frac{m_{\text{Lu cao chiết}}}{m_{\text{bột CVT}} \times \text{hàm lượng lutein tổng trong bột CVT}} \times 100, \% \end{aligned}$$

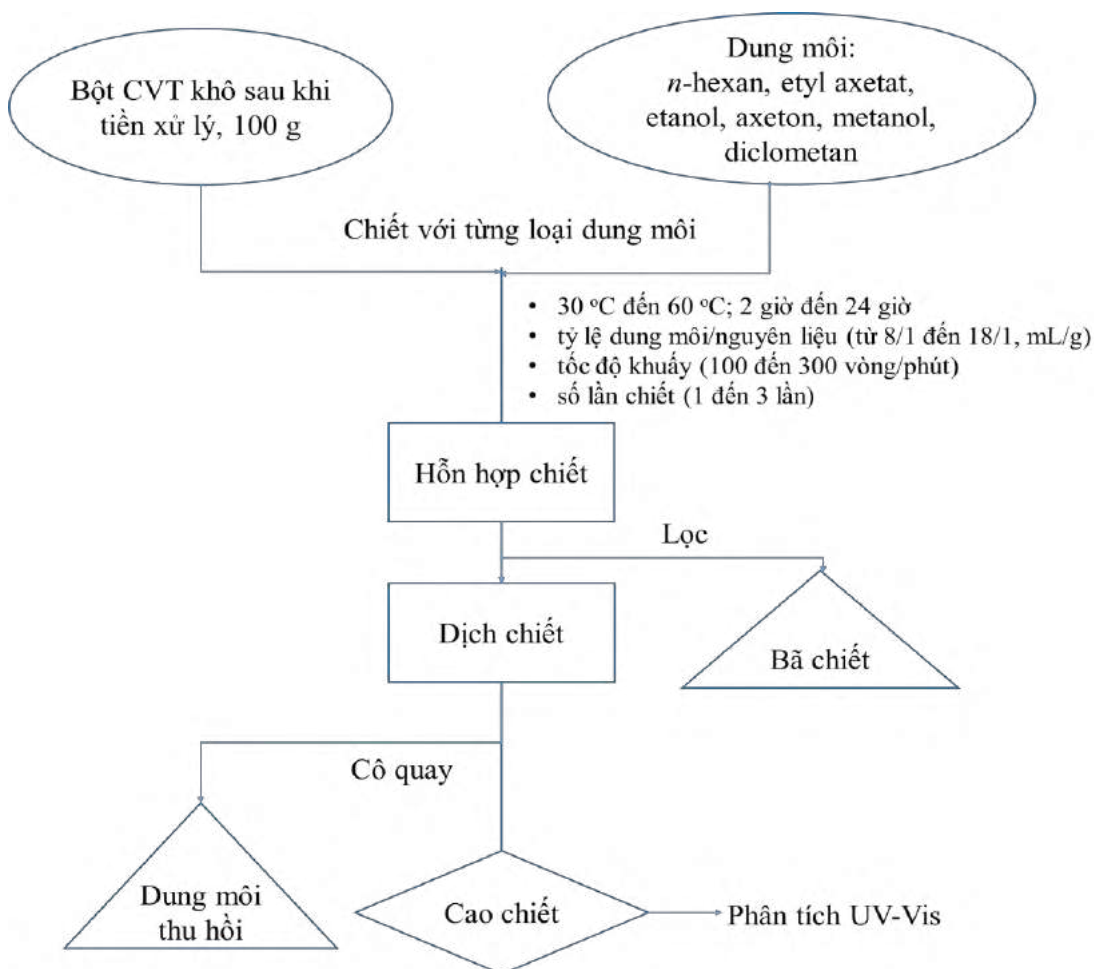
$m_{\text{cao chiết}}$: Khối lượng cao chiết thu được, g

$m_{\text{Lu cao chiết}}$: Khối lượng lutein tổng trong cao chiết, mg

$m_{\text{bột CVT}}$: Khối lượng CVT khô được chiết, gam

2.2.4. Chiết tách cao chiết giàu lutein từ nguyên liệu cánh hoa Cúc vạn thọ

Sơ đồ tiến hành thí nghiệm được trình bày ở hình 2.3.



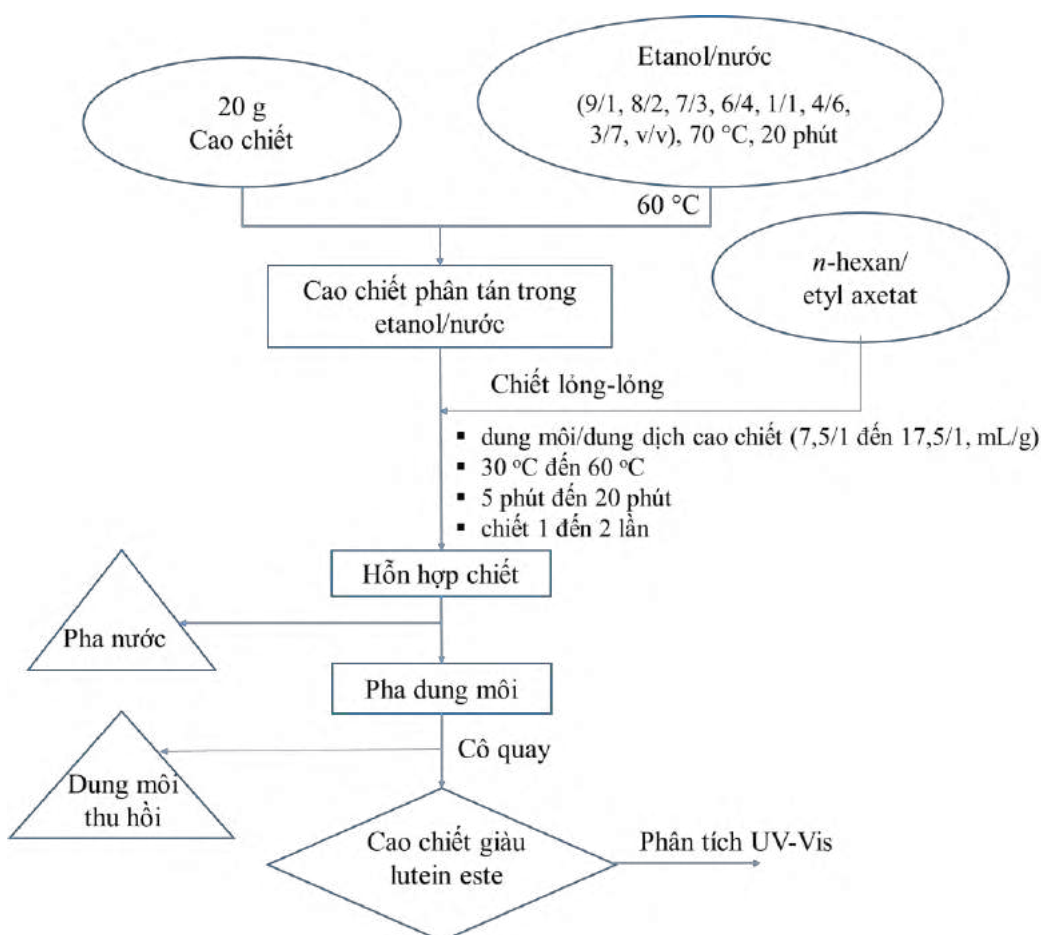
Hình 2.3. Sơ đồ nghiên cứu khảo sát lựa chọn dung môi và các điều kiện chiết

100 g bột CVT khô sau khi tiền xử lý được chiết bằng các dung môi chiết khác nhau để thu cao chiết chứa lutein este. Các yếu tố ảnh hưởng tới hiệu quả chiết lutein este được xác định bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm từng phần, cụ thể: Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của dung môi chiết (*n*-hexan, etyl axetat, etanol, axeton, metanol), nhiệt độ chiết (từ 30 °C đến 60 °C), thời gian chiết (2 giờ đến 24 giờ), tỷ lệ dung môi (ml)/nguyên liệu (g) (từ 8/1 đến 18/1), số lần chiết (1 đến 3 lần), tốc độ khuấy (100 đến 300 vòng/phút).

Xác định khối lượng cao chiết, hàm lượng lutein tổng trong cao chiết bằng phương pháp UV-Vis (mục 2.5.1), tính toán hiệu suất chiết nhằm lựa chọn được dung môi và điều kiện chiết lutein este từ bột CVT khô tối ưu nhất.

2.2.5. Làm giàu cao chiết

Sơ đồ tiến hành thí nghiệm làm giàu cao chiết được trình bày ở hình 2.4.



Hình 2.4. Sơ đồ nghiên cứu quá trình làm giàu cao chiết

20 gam cao chiết được hòa tan vào dung môi etanol 99,7 %, đun nóng ở 30-70 °C, cho tan hoàn toàn, thêm từng phần nước cất vào dung dịch. Sau khi thêm nước cất,

duy trì nhiệt độ 70 °C trong 20 phút, tiếp tục khuấy cho tan đều cao chiết. Giảm nhiệt độ của hệ từ từ về 60 °C được hệ cao chiết phân tán trong dung môi etanol/nước.

Thêm dung môi ít phân cực (*n*-hexan/ etyl axetat) vào hệ phân tán cao chiết trong etanol/nước. Tiếp tục khuấy rồi dừng khuấy, toàn bộ dung dịch được rót lên phễu, chờ phân lớp trong 20 phút. Do tỷ trọng và độ phân cực khác nhau xa nên quá trình phân lớp khá nhanh. Thu lấy lớp dịch chiết phía trên chứa lutein este. Pha nước phía dưới được rót ra cốc khác. Lớp dưới lặp lại quy trình chiết cho đến khi dung dịch chiết hết màu. Dịch chiết được gom lại, cô quay chân không. Cao chiết sau khi làm giàu được cân và đo UV-Vis để đánh giá hiệu quả.

Các yếu tố ảnh hưởng tới hiệu quả làm giàu cao chiết được xác định bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm từng phần, cụ thể: Tiến hành khảo sát: tỷ lệ EtOH/H₂O hòa tan cao chiết, tỷ lệ dung môi/dung dịch cao chiết (7,5/1 đến 15/1, mL/g), nhiệt độ chiết lỏng lỏng (từ 30 °C đến 60 °C), thời gian chiết (5 phút đến 20 phút), số lần chiết (1 đến 2 lần), ảnh hưởng của dung môi chiết (*n*-hexan, etyl axetat).

Hiệu suất quá trình làm giàu được tính bằng công thức:

$$\text{Hiệu suất làm giàu cao chiết} = \frac{m_{\text{sau}} \times \text{hàm lượng lutein tổng}_{\text{sau}}}{m_{\text{trước}} \times \text{hàm lượng lutein tổng}_{\text{trước}}} \times 100, \%$$

$m_{\text{trước}}$: Khối lượng cao chiết trước khi làm giàu

m_{sau} : Khối lượng cao chiết sau khi làm giàu

hàm lượng lutein tổng_{trước}: Hàm lượng lutein tổng trong cao chiết trước khi làm giàu.

hàm lượng lutein tổng_{sau}: Hàm lượng lutein tổng trong cao chiết sau khi làm giàu.

2.2.6. Thủy phân cao chiết và tinh chế tinh thể lutein

Sơ đồ tiến hành thí nghiệm được trình bày ở hình 2.5.

Thí nghiệm thực hiện như sau: Cân chính xác một lượng cao chiết cho vào bình cầu cổ nhám 50 mL. Thêm vào đó V mL dung dịch KOH trong etanol 96°. Lắp sinh hàn hồi lưu, đun nóng và khuấy đều hỗn hợp ở 40 - 80 °C trong 20 - 120 phút (trong điều kiện tránh ánh sáng).

Sau khi phản ứng kết thúc, thêm nước cất vào hỗn hợp đến thể tích gấp đôi, lắc đều. Lọc, rửa tinh thể lutein tạo thành bằng nước/etanol tỷ lệ 4/6.

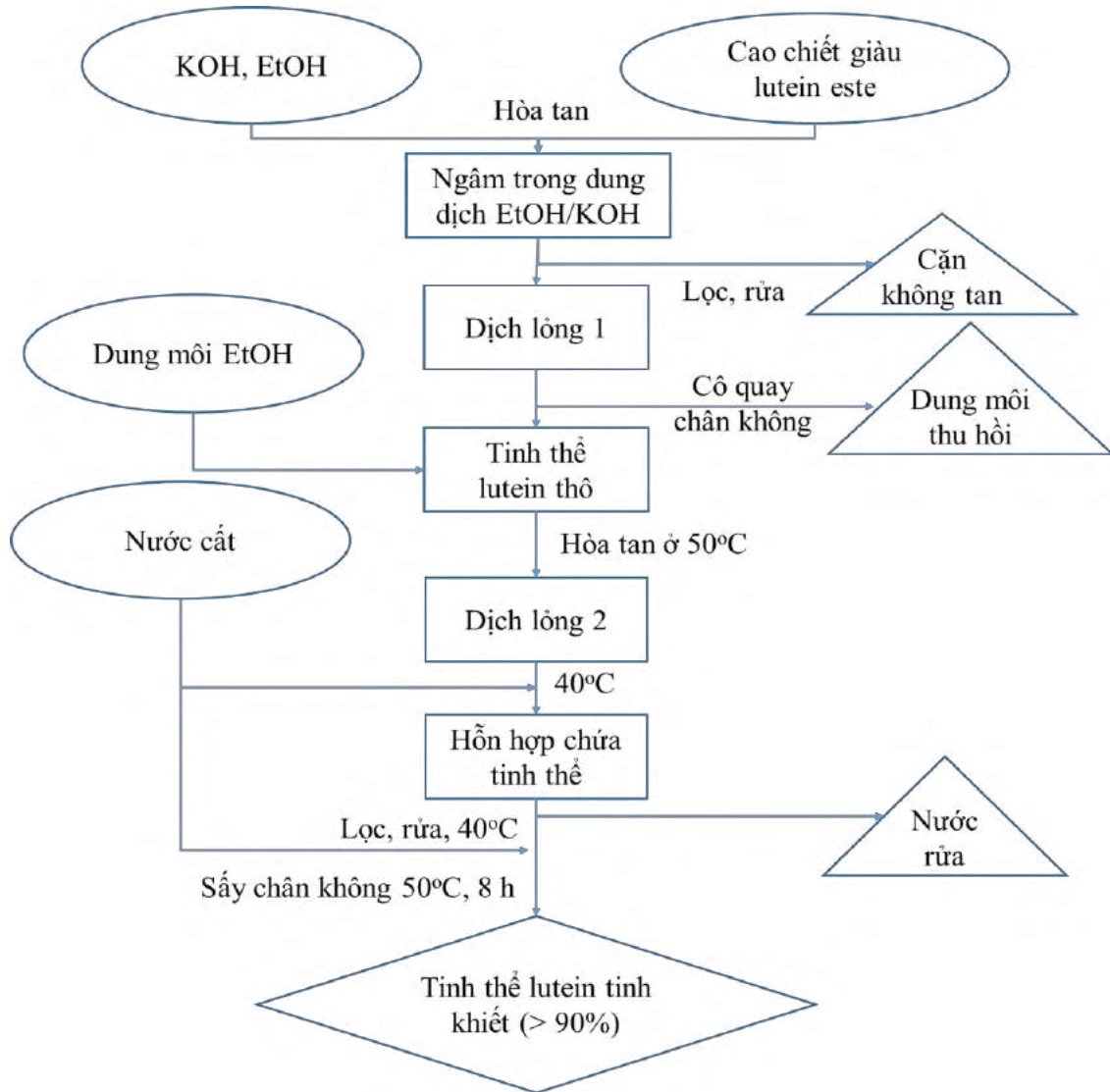
Hiệu suất thủy phân được tính theo công thức:

$$\text{Hiệu suất thủy phân (\%)} = S_{\text{lutein}} * 100 / S_{\text{lutein este}}$$

Trong đó:

S_{lutein} : là diện tích peak lutein tự do (dạng *trans* và dạng *cis*) trên sắc ký đồ của mẫu sau khi thủy phân (nhận biết peak lutein nhờ mẫu lutein đối chứng; phân biệt các peak *trans*- và *cis*-lutein dựa vào sự khác biệt về phổ hấp thụ UV-Vis của chúng).

$S_{\text{lutein este}}$: là tổng diện tích tất cả các peak thu được trên sắc ký đồ khi phân tích mẫu oleoresin (tức lutein este) có cùng nồng độ không thủy phân nhưng cũng được chiết và phân tích trong điều kiện giống hệt mẫu đem thủy phân.



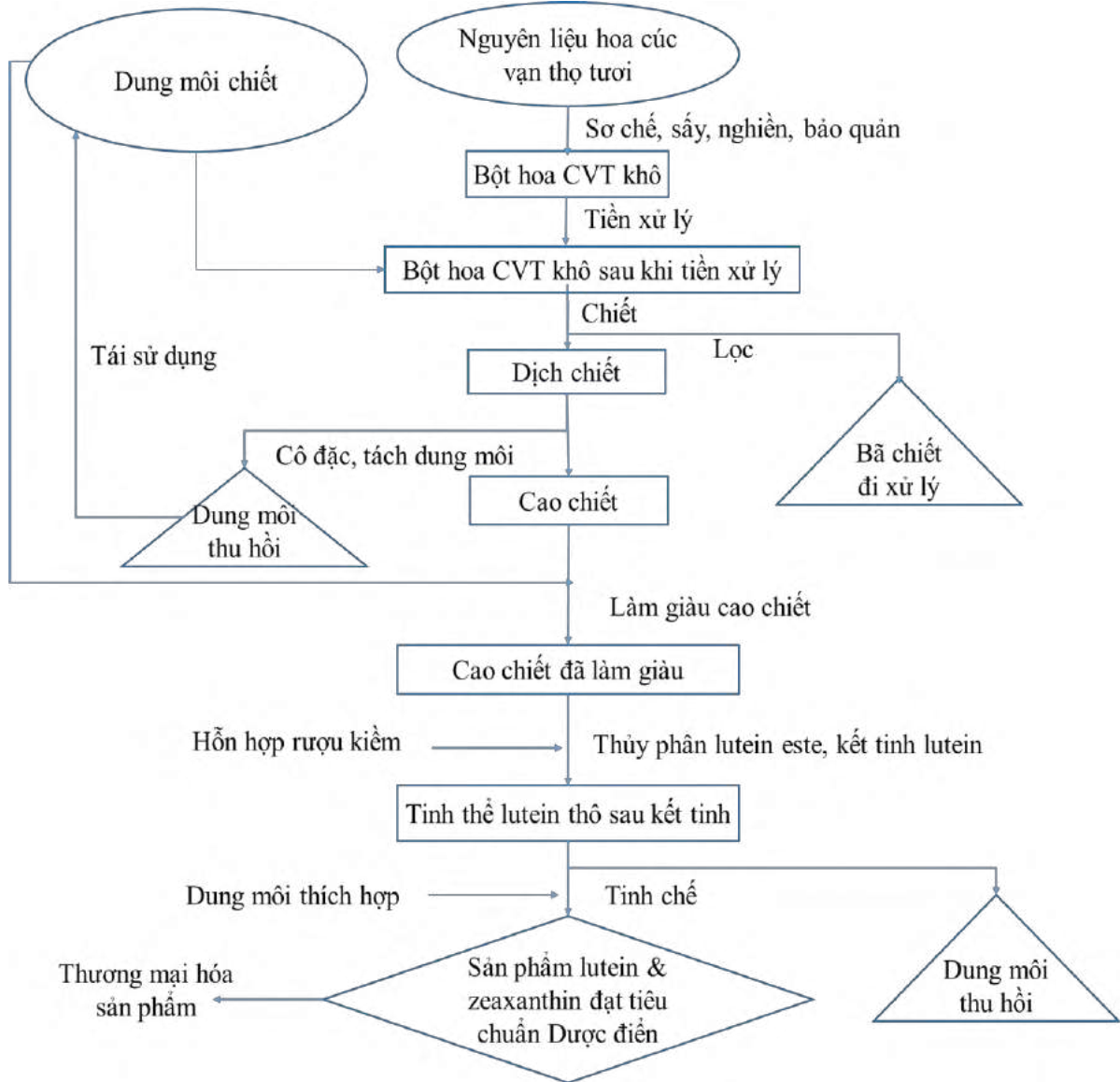
Hình 2.5. Sơ đồ nghiên cứu thủy phân cao chiết thô và tinh chế tinh thể lutein từ cao chiết thô

Lutein được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại theo quy trình sau: lutein thô được hòa tan trong etanol sau đó bổ sung H₂O (tỷ lệ thể tích 1/1), ở nhiệt độ 50 °C. Hạ nhiệt độ xuống 40 °C để tinh thể kết tinh lại nhanh hơn. Lọc nóng thu lấy tinh thể và rửa nhiều lần bằng nước nóng. Tinh thể được sấy bằng tủ sấy chân không ở nhiệt độ 50 °C trong 8h. Sản phẩm được kiểm tra hàm lượng lutein bằng HPLC. Cân và đánh giá hiệu quả tinh chế lutein.

Hiệu suất tinh chế được tính theo công thức:

$$\text{Hiệu suất tinh chế} = \frac{\text{khối lượng lutein đã tinh chế} \times \text{độ tinh khiết lutein tinh chế}}{\text{khối lượng lutein thô} \times \text{độ tinh khiết của lutein thô}} \times 100\%, \%$$

Quá trình tổng thể sơ chế, tiền xử lý, chiết tách, tinh chế lutein từ hoa Cúc vạn thọ được tóm tắt theo sơ đồ sau (hình 2.6).



Hình 2.6. Sơ đồ sơ chế, tiền xử lý, chiết tách, tinh chế lutein

2.2.7. Điều chế chất chuẩn lutein và zeaxanthin phân tích HPLC

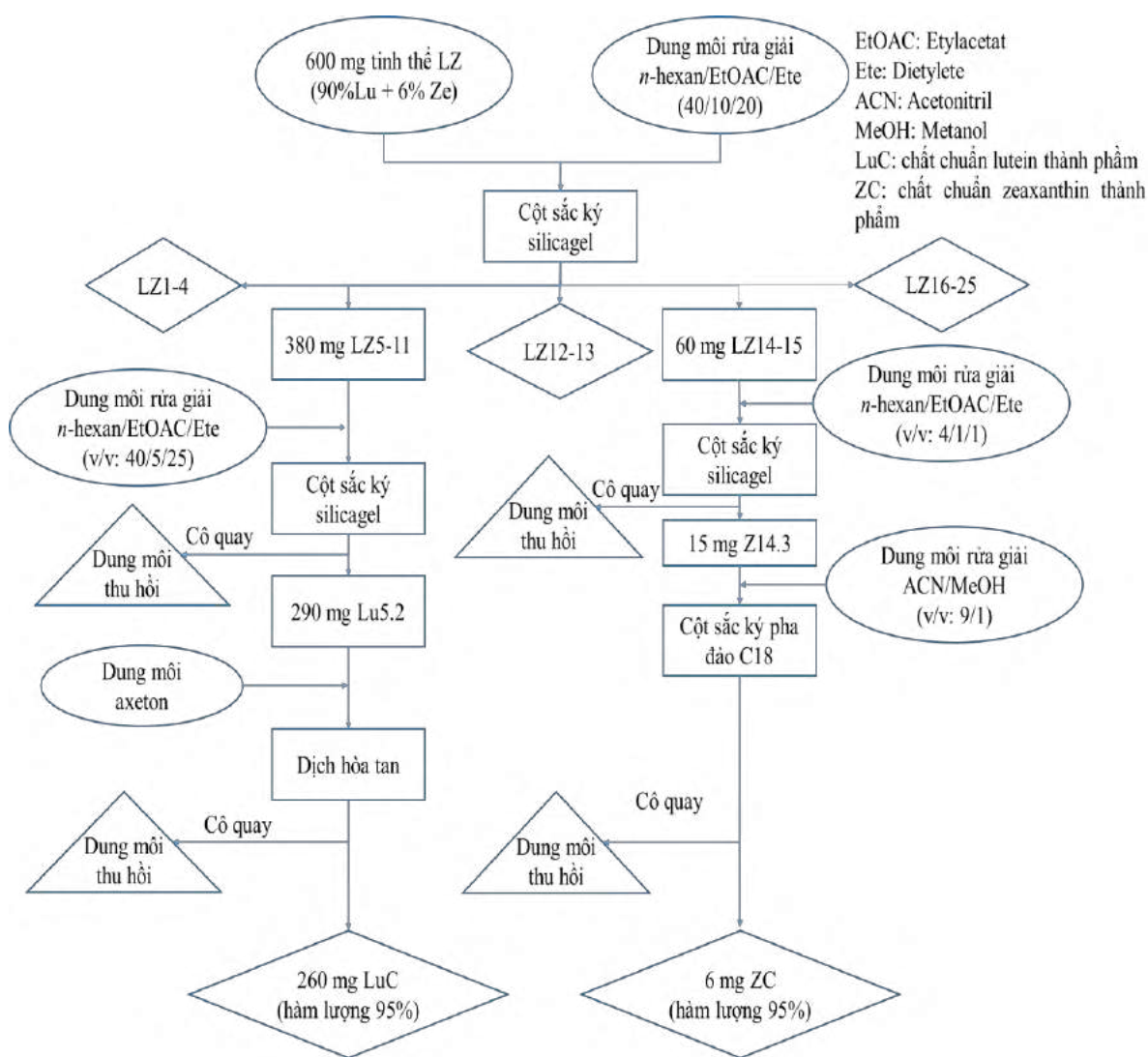
Tiến hành thí nghiệm điều chế chất chuẩn lutein và zeaxanthin phân tích HPLC được trình bày ở hình 2.7.

Các bước tiến hành như sau: 600 mg tinh thể lutein và zeaxanthin sạch (tổng hàm lượng 96 % chứa khoảng 90 % lutein và 6 % zeaxanthin) được hòa tan trong dung môi ethyl axetat (EtOAc), ở 60 °C. Sau đó cô quay với silica gel và chuyển hỗn hợp lên cột sắc ký silica gel pha thường, sử dụng dung môi rửa giải *n*-hexan/EtOAc/dietyl ete

(40/10/20, v/v/v) thu được 25 phân đoạn. Trong đó các phân đoạn từ LZ5 đến LZ11 chứa nhiều lutein được gộp chung. Phân đoạn LZ14 và LZ15 chứa zeaxanthin cao hơn trong nguyên liệu đầu gộp chung lại. Phân đoạn LZ5-11 thu được tổng 380 mg và LZ14-15 thu được tổng 60 mg.

Phân đoạn LZ5-11 tiếp tục được sắc ký trên cột silica gel pha thường, dung môi rửa giải *n*-hexan/EtOAc/ete (40/5/25, v/v/v), thu được phân đoạn Lu5.2 (290 mg). Dịch được cô đuổi dung môi, thu được 260 mg chất sạch LuC có hàm lượng lutein > 95 % đạt yêu cầu chất chuẩn HPLC.

Phân đoạn LZ14-15 tiếp tục được sắc ký trên cột silica gel pha thường, dung môi rửa giải *n*-hexan/EtOAc/ete (4/1/1, v/v/v), thu được phân đoạn Z14.3 (15 mg). Tiếp tục được sắc ký với dung môi rửa giải ACN/MeOH (9/1, v/v) trên cột sắc ký pha đảo C18, sau đó cô đuổi dung môi thu được 6 mg chất sạch ZC có hàm lượng zeaxanthin > 95 % đạt yêu cầu chất chuẩn HPLC.



Hình 2.7. Sơ đồ nghiên cứu phân lập điều chế chất chuẩn lutein và zeaxanthin

2.2.8. Xác định điều kiện bảo quản và độ ổn định của lutein

2.2.8.1. Xác định điều kiện bảo quản lutein

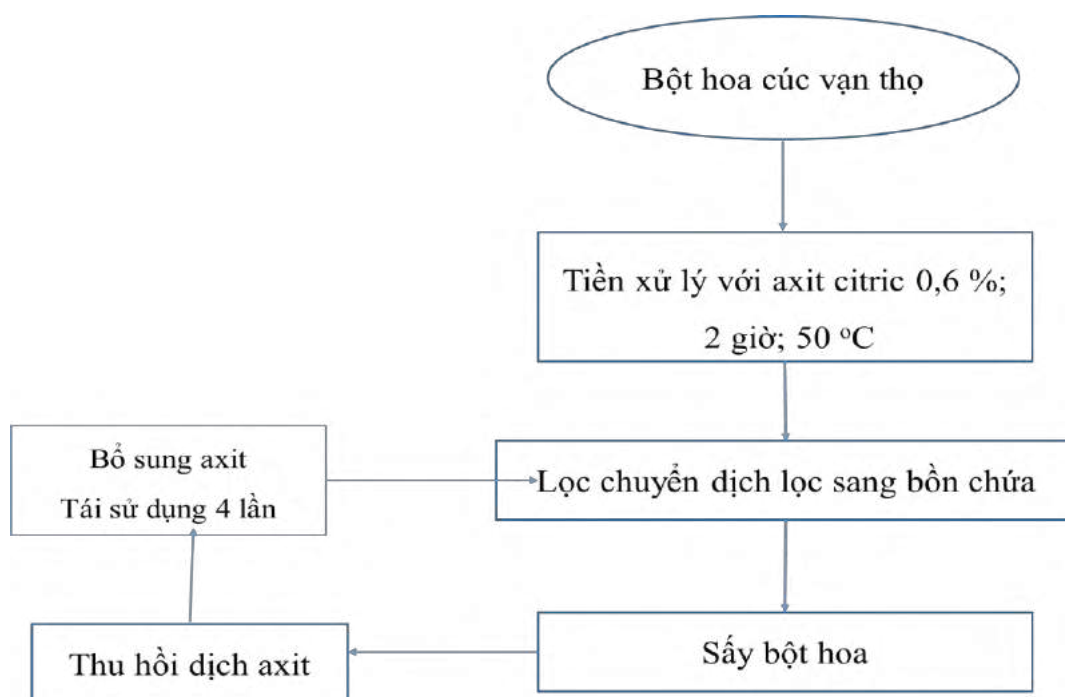
Lutein sau khi tinh chế được bao kín, đặt trong môi trường chân không và bảo quản bằng các phương pháp khác nhau như: bảo quản dưới ánh sáng tự nhiên; tránh ánh sáng ở nhiệt độ môi trường; tránh ánh sáng ở -10°C . Định lượng lutein theo thời gian để xác định điều kiện bảo quản tốt nhất.

2.2.8.2. Xác định độ ổn định của lutein

Lutein sau khi tinh chế được bao kín, đặt trong môi trường chân không, tránh ánh sáng và bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau như: -10°C , 0°C , nhiệt độ môi trường $25-30^{\circ}\text{C}$. Trích mẫu theo thời gian để định lượng lutein bằng phương pháp HPLC.

2.2.9. Thu hồi và tái sử dụng các nguồn thải trong quá trình chiết tách lutein

2.2.9.1. Thu hồi và tái sử dụng tác nhân tiền xử lý



Hình 2.8. Sơ đồ nghiên cứu thu hồi và tái sử dụng tác nhân tiền xử lý

Dung dịch thải ra sau quá trình tiền xử lý được thu hồi; để lắng qua đêm (hoặc sau 4-8 giờ); hút dịch sang thiết bị chứa; kiểm tra nồng độ axit citric theo phương pháp chuẩn độ thể tích. Sau đó, được bổ sung thêm axit citric vừa đủ để tái sử dụng trong quá trình tiền xử lý tiếp theo.

Sau khi tái sử dụng dịch lần nhiều tạp hữu cơ, biến màu nên được bổ sung NaOH để đưa pH về 7 trước khi chuyển qua làm nước tưới quá trình chế tạo phân bón hoặc rửa khu vực chế tạo phân bón.

2.2.9.2. Tái sử dụng bã chiết CVT làm phân bón

Bã thải bột CVT (gồm xenlulo, hemixenlulo, lignin, protein, chất béo, ...) sau khi loại bỏ hoàn toàn dung môi bằng phương pháp sấy được trộn đều với các loại phân chuồng, phân lân hoặc super lân, NPK, ... với tỷ lệ: 7 kg bã bột CVT/3 kg phân chuồng/300 g phân lân.

Hòa chế phẩm kháng nấm Trichoderma (tỷ lệ 1g chế phẩm/kg nguyên liệu) với nước tạo dung dịch loãng và phun đều. Quá trình phun có thể kết hợp trong lúc đảo trộn nguyên liệu.

Phun nước đều lên phân để tạo độ ẩm khoảng 50-55%. Có thể dùng nước xả quá trình tiền xử lý bột hoa CVT hoặc nước rửa tinh thể giai đoạn kết tinh để tưới. Sau đó, đảo trộn đều, dùng bạt nylon màu tối (xanh đậm, đen) đậy kín.

Sử dụng kết hợp avoT1 với avoAdd của Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ lọc, hóa dầu làm tăng tốc độ phân hủy chất hữu cơ và tăng hiệu quả khử mùi trong quá trình xử lý bã thải bột hoa CVT.

Dung dịch avoT1 được pha chế bằng cách hòa tan 100 mL chế phẩm avoT1 với 4 L nước sinh hoạt đạt tiêu chuẩn, hạn sử dụng dung dịch avoT1 không quá 2 ngày. Tương tự với chế phẩm avoAdd, 100 mL chế phẩm avoAdd được hòa tan trong 4 L nước sinh hoạt đạt tiêu chuẩn, hạn sử dụng dung dịch avoAdd không quá 3 ngày. Hỗn hợp gồm 100 mL avoAdd kết hợp với 100 mL avoT1 có thể xử lý được 0,5 m³ bã thải bột hoa.

Phun dung dịch chế phẩm vào khối bã thải bột hoa cần xử lý kết hợp đảo trộn, sau đó dùng tấm bạt phủ kín. Sau mỗi 4 ngày, mở tấm phủ, đảo trộn đều, bổ sung lượng nước cần thiết bằng cách phun tạo ẩm nhằm tạo độ ẩm tương đương độ ẩm tại thời điểm bắt đầu xử lý rồi đậy tấm phủ lại.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ ĐỘC TÍNH BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA LUTEIN

2.3.1. Nghiên cứu độc tính cấp LD₅₀

Xác định LD₅₀ của thuốc thử trên chuột nhắt trắng chủng Swiss đường uống bằng phương pháp của Litchfield – Wilcoxon, theo qui định của Bộ Y tế Việt Nam và hướng

dẫn của Tổ chức Y tế thế giới về đánh giá tính an toàn và hiệu lực của thuốc [143,144,145,146,147, 148].

Nghiên cứu được tiến hành tại Học viện Quân Y và Bệnh viện Quân y 103.

Chuột nhắt trắng chủng Swiss gồm 50 con chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con. Trước khi thí nghiệm chuột nhịn ăn 12 giờ, cho uống nước bình thường.

Sau 12 giờ nhịn ăn, cho chuột uống thuốc với mức liều 0,2 mL/10 g thể trọng và với các liều tăng dần. Tìm liều cao nhất không gây chết chuột, liều thấp nhất gây chết 100 % số chuột và các liều trung gian. Chuột được uống thuốc cưỡng bức, thuốc thử được đưa thẳng vào dạ dày chuột bằng kim cong đầu tù.

Liều thực nghiệm được xác định bằng cách ngoại suy liều mẫu thử dùng cho động vật thí nghiệm theo quy định của Bộ Y tế (bảng 2.3).

Bảng 2.3. Bảng ngoại suy liều tương đương giữa các loài [145]

| Loài ngoại suy | | | | | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|------------|------------|--------------|
| Loài thực nghiệm | Chuột nhắt trắng | Chuột cống | Thỏ | Chó | Người |
| Chuột nhắt trắng | 1 | 0,55 | 0,25 | 0,15 | 0,085 |
| Chuột cống | 1,82 | 1 | 0,45 | 0,27 | 0,15 |
| Thỏ | 4 | 2,20 | 1 | 0,60 | 0,34 |
| Chó | 6,67 | 3,67 | 1,67 | 1 | 0,57 |
| Người | 11,76 | 6,47 | 2,94 | 1,76 | 1 |

Theo đó, với liều bổ sung 10 mg lutein và 2 mg zeaxanthin hàng ngày để giảm nguy cơ tiến triển bệnh thoái hóa điểm vàng [48, 49] thì liều thực nghiệm tối thiểu trên chuột nhắt trắng và chuột cống được xác định lần lượt là 2,88 mg/ kg thể trọng/ ngày và 1,68 mg/kg thể trọng/ngày (giả sử trọng lượng trung bình của người trưởng thành là 50kg).

Theo dõi tình trạng chung (vận động, bài tiết...) và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc thử lần đầu.

Tiến hành phẫu tích quan sát tình trạng các tạng ngay sau khi có chuột chết để xác định nguyên nhân gây độc.

2.3.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn được thực hiện theo qui định của Bộ Y tế Việt Nam, hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và hướng dẫn của OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) về đánh giá tính an toàn và hiệu lực của thuốc [143,144,145,146,147, 148].

Nghiên cứu được tiến hành tại Học viện Quân Y và Bệnh viện Quân y 103.

Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 con. Các chuột được cho uống thuốc hoặc nước cất liên tục trong 90 ngày, thể tích cho uống là 10 mL/kg thể trọng/24 giờ.

- *Lô chứng sinh lý*: uống nước cất.

- *Lô trị 1*: uống thuốc thử liều 1,68 mg/kg thể trọng/ngày

- *Lô trị 2*: uống thuốc thử liều 8,40 mg/kg thể trọng/ngày (liều gấp 5 lần liều lô trị 1).

2.3.3. Các chỉ tiêu đánh giá

- *Sinh lý - dược lý*: theo dõi tình trạng chung, hoạt động, ăn uống, cân nặng của chuột.

- *Huyết học*: hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu.

- *Sinh hóa*: nồng độ men gan AST, ALT trong máu, creatinin máu, albumin huyết tương, cholesterol toàn phần máu.

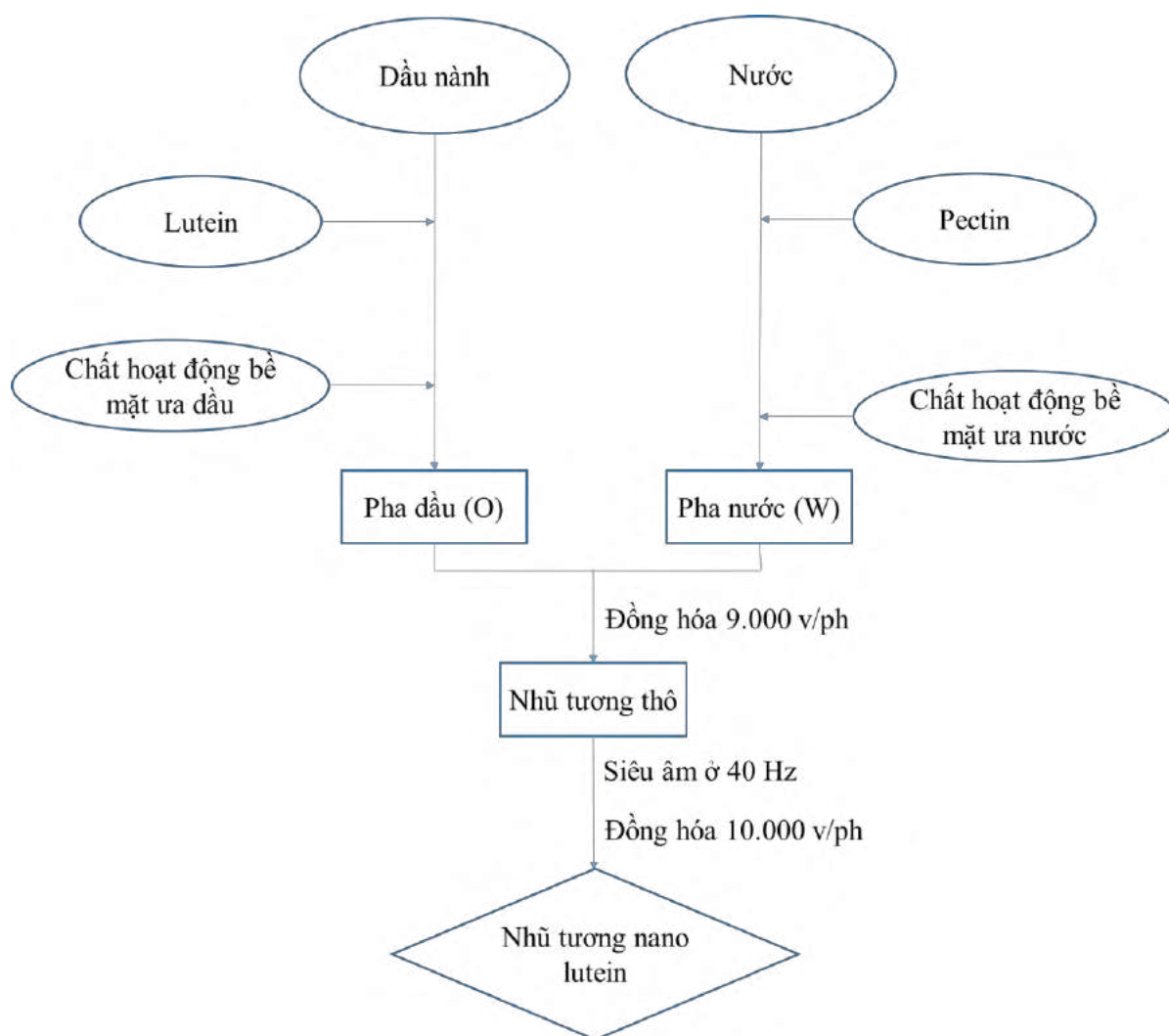
- *Mô bệnh học*: vào ngày thứ 90, giết chuột, quan sát hình ảnh đại thể gan, lách, thận. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, lách, thận của ít nhất 30 % số chuột ở mỗi lô. Các xét nghiệm vi thể được thực hiện tại Bộ môn khoa Giải phẫu bệnh – Pháp y, bệnh viện Quân y 103.

Thời điểm xét nghiệm: lấy máu xét nghiệm các chỉ số sinh hóa, huyết học, xác định cân nặng của chuột tại 3 thời điểm: xuất phát điểm, 45 ngày, sau 90 ngày uống thuốc. Thời gian theo dõi: 90 ngày.

2.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP BÀO CHẾ NHỮ TƯƠNG NANO LUTEIN

2.4.1. Phương pháp bào chế

Sơ đồ tiến hành thí nghiệm được trình bày ở hình 2.9.



Hình 2.9. Sơ đồ nghiên cứu bào chế nhũ tương nano lutein

Chuẩn bị pha dầu: Hòa tan lutein, chất hoạt động bề mặt ưa dầu trong dầu nành, đun nóng đến 60 °C.

Chuẩn bị pha nước: Hòa tan pectin, chất hoạt động bề mặt ưa nước tan trong nước, đun nóng đến 70 °C.

Phối hợp hai pha, tác động lực gây phân tán sử dụng máy đồng hóa ở tốc độ khảo sát để tạo thành nhũ tương thô dầu/nước (D/N).

Bào chế nano bằng cách siêu âm ở tần số 40 Hz trong khoảng thời gian 3-15 phút. Đồng nhất hóa kích thước nhũ tương nano bằng máy đồng hóa D-160 ở 10.000 vòng/phút trong 2 phút ở 25 °C.

Bảo quản trong lọ thủy tinh tối màu, nắp kín ở nhiệt độ phòng. Thời gian làm việc và thời gian nghỉ để siêu âm được đặt là 5 s và 7 s để chống quá nhiệt. Tuần hoàn nước lạnh qua bể chứa giúp ổn định nhiệt độ mẫu từ 30 – 40 °C.

2.4.2. Phương pháp đánh giá

- Đánh giá kích thước tiểu phân

Sản phẩm nhũ tương nano được đánh giá về hình dạng và kích thước tiểu phân trung bình bằng kính hiển vi điện tử Philips Tecnai 10 microscope và máy NanoPlus HD.

- Đánh giá độ ổn định

Bảo quản khoảng 20 ml nhũ tương nano trong lọ thủy tinh tối màu, kín ở 25 °C. Đánh giá hình dạng và KTTP nhũ tương nano ở các thời gian xác định bằng cách quan sát trên kính hiển vi điện tử. Xác định độ ổn định (DOD) là khoảng thời gian (ngày) khi nhũ tương nano đã có sự thay đổi về kích thước so với thời điểm ban đầu.

2.4.3. Phương pháp qui hoạch thực nghiệm và tối ưu hóa

- Thiết kế thí nghiệm: Sử dụng phương pháp thiết kế theo mô hình mặt hợp tử tại tâm với sự trợ giúp của phần mềm Modde [149] để khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới kích thước nhũ tương nano trung bình và độ ổn định của nhũ tương bao gồm: hàm lượng tween 80, span 60, pectin với các mức khác nhau. Các yếu tố này gọi là biến độc lập hay tham số. Kích thước nhũ tương nano trung bình và độ ổn định của nhũ tương được gọi là biến phụ thuộc hay hàm mục tiêu (Y_1 , Y_2). Sử dụng phần mềm thiết kế tối ưu Modde để thiết kế thí nghiệm, phần mềm đưa ra các thí nghiệm cần tiến hành.

- Tối ưu hóa: Sau khi có kết quả làm thực nghiệm, sử dụng phần mềm Modde để phân tích ảnh hưởng các biến độc lập đến hàm mục tiêu bằng việc thiết lập phương trình hồi quy bậc 2 về mối tương quan giữa hàm mục tiêu và biến độc lập.

Ngoài ra, phần mềm còn đưa ra dự đoán điều kiện tối ưu để kích thước nhũ tương nano trung bình nhỏ nhất ($Y_1 = \min$) và độ ổn định của nhũ tương cao nhất ($Y_2 = \max$). Sau khi thu được điều kiện tối ưu từ phần mềm, làm lại thí nghiệm để thẩm định kết quả tối ưu

2.5. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG LUTEIN, ZEAXANTHIN

2.5.1. UV-Vis

Các mẫu cao chiết được định lượng lutein bằng phương pháp UV-Vis trên thiết bị của hãng Agilent với các thông số kỹ thuật và điều kiện vận hành sau:

- Chuẩn bị mẫu: Cao chiết sau khi cô quay loại bỏ hoàn toàn dung môi chiết, G (g) pha mẫu trong V (mL) dung môi thích hợp, như *n*-hexan hoặc etanol. Sau đó pha loãng D lần.
- Chế độ đo Blank: dung môi pha mẫu được cho vào cuvet, đo chế độ Blank với mẫu trắng là dung môi *n*-hexan.
- Chế độ đo mẫu: thay cuvet dung môi bằng cuvet chứa dung dịch pha mẫu, đo ở chế độ quét bước sóng cực đại từ 800 nm xuống 200 nm.
- Mẫu trước khi đo được pha loãng 8,10 hoặc 20 lần tùy thuộc độ đậm và độ màu của chất pha mẫu sao cho độ hấp thụ quang nằm trong khoảng 0,3 đến 0,8 là tối ưu.

Hàm lượng lutein trong mẫu đo được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng lutein (mg/g)} = \frac{A * V * D}{\epsilon * G}$$

A: độ hấp thụ quang của mẫu.

V: thể tích pha mẫu. mL

D: độ pha loãng

€: hệ số hấp thụ, dung môi *n*-hexan: 2500

G: khối lượng mẫu pha: g

2.5.2. Sắc ký lỏng

2.5.2.1. Hệ HPLC Agilent

Bảng 2.4. Điều kiện sắc kí phân tích lutein, zeaxanthin theo HPLC

| | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Cột sắc ký | RP 18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) |
| Nhiệt độ cột | 30 °C |
| Pha động | Axetonitrile/MeOH(9/1) |
| Detector | UV-Vis DAD |
| Bước sóng (nm) | 446 |
| Tốc độ dòng (mL/phút) | 0,5 |
| Thể tích tiêm (µL) | 10 |
| Nồng độ dung dịch thử (mg/mL) | Định lượng 0,2 hoặc 0,1 |

Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) của hãng Agilent là hệ thiết bị phân tích có sẵn của Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ lọc, hóa dầu. Luận án sử dụng

HPLC để xác định cụ thể số lượng tạp chất và tính toán dựa trên tỷ lệ phần trăm diện tích và dựa trên đường chuẩn.

Các mẫu sản phẩm được định lượng lutein, zeaxanthin bằng phương pháp HPLC với các thông số kỹ thuật và điều kiện vận hành được trình bày ở bảng 2.4.

2.5.2.2. Phương pháp định lượng lutein bằng LC-MS/MS

- Thiết bị: hệ thống ACQUITY UPLC H-Class/Xevo TQ MS của Waters, USA
- Phần mềm: MassLynx phiên bản 4.1
- Cột pha đảo ACQUITY UPLC C18 BEH 130Å, 1,7 μm , 2,1 \times 100 mm.
- Pha động gồm dung môi A: metanol + 0,1 % axit formic (FA); dung môi B: Axetonitrile + 0,1 % FA và dung môi C: nước + 0,1 % FA.
- Quá trình rửa giải gradient được thực hiện như sau: 0-1,0 phút, 20 % A, 80 % B; 1-3 phút, 2 % A, 98 % B; 3-5 phút, 20 % A, 80 % B. Nhiệt độ cột và mẫu được đặt tương ứng ở 35 °C và 28 °C. Thể tích tiêm là 5 μL .
- Điều kiện MS được tối ưu hóa là: ESI +

Qua nghiên cứu khảo sát đã đưa ra được các điều kiện để chuẩn bị mẫu phân tích và định lượng bằng sắc ký HPLC và LC-MS/MS để kiểm tra hàm lượng lutein và zeaxanthin như trên.

Quá trình phân tích HPLC thực hiện tại PTN Trọng điểm Lọc hóa dầu và kiểm nghiệm theo tiêu chuẩn dược điển Mỹ tại Trung tâm kiểm nghiệm, Viện thực phẩm chức năng.

Các mẫu cao chiết trong nghiên cứu thủy phân cao chiết giàu lutein được thực hiện tại trường Đại học Nha Trang – Khánh Hòa bằng thiết bị HPLC, cột PR18 và hệ dung môi MeCN/MeOH/CH₂Cl₂/H₂O.

Quá trình phân tích LC-MS/MS thực hiện tại trường Đại học Hàng hải Việt Nam.

2.5.3. Các phương pháp phân tích khác

- **Định tính bằng sắc ký lớp mỏng:** Sử dụng TLC để xác định sự có mặt của lutein và zeaxanthin có trong nguyên liệu, kiểm tra vết trong quá trình phân lập để xác định phân đoạn có chứa hợp chất nghiên cứu và giúp tìm hệ dung môi thích hợp.

- **Phương pháp trọng lượng:** Phương pháp trọng lượng được sử dụng sơ bộ để xác định hợp chất toàn phần hay lượng sản phẩm chiết được, xác định hợp chất phân lập qua đó tính được hiệu suất của mỗi quá trình. Đây là phương pháp đơn giản, chủ yếu được sử dụng để đánh giá hiệu suất chiết và phân lập.

Hàm lượng hợp chất chiết được xác định theo công thức:

$$X\% = \frac{N}{m(1 - Ha)} \times 100\%$$

Trong đó:

- X: hàm lượng lutein toàn phần trong mẫu
- N: Khối lượng lutein toàn phần chiết được
- m: khối lượng mẫu đem chiết
- Ha: Độ ẩm của mẫu

- **Sắc ký cột**

Sắc ký cột được dùng để tách, tinh chế lutein và zeaxanthin.

Pha tĩnh silica gel 60, cỡ hạt 40 - 63 μm của Merck hoặc silica gel pha đảo C18. Pha động là các dung môi và hệ dung môi thích hợp: *n*-hexan, etyl axetat, dietyl ete, ...

- **Cộng hưởng từ hạt nhân NMR**

Đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều (^1H NMR và ^{13}C -NMR., DEPT) và hai chiều (COSY, HMBC, HSQC) trong dung môi CDCl_3 , CD_3OD tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- **Phương pháp nhận dạng lutein và zeaxanthin trong nguyên liệu**

Đối tượng nghiên cứu là chất đã biết cấu trúc. Dữ liệu chuẩn dùng để nhận dạng chất nhằm cung cấp thông tin hồ sơ nhận dạng chuẩn. Việc nhận dạng chất dựa vào:

- So sánh phổ của chất phân tích với phổ chất chuẩn trong cùng một điều kiện.
- So sánh thông tin phổ, dữ liệu hóa lý, hằng số vật lý của chất với tài liệu khoa học hoặc thông tin đã công bố. Tập hợp các dữ liệu chuẩn đó có thể khẳng định hợp chất là đúng đối tượng nghiên cứu.

Các phương pháp được sử dụng để xây dựng bộ dữ liệu có thể gồm: Đo điểm chảy, đo phổ UV-Vis (trong dung môi), kết quả HPLC, đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều (^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT) và hai chiều (COSY, HMBC, HSQC).

Qua quá trình tổng quan tài liệu và thực tế phân tích mẫu, không phải lúc nào cũng có thể phân tích đầy đủ hết được tất cả các phương pháp nên cần phương pháp xác định nhanh định tính và định lượng và phương pháp phân tích chính xác, dùng làm phương pháp kiểm tra. Phương pháp UV-Vis thực tế không phân biệt được lutein este, zeaxanthin este và dạng lutein, zeaxanthin tự do mà chỉ cho kết quả lutein tổng. Vì vậy, phương pháp đo phổ UV-Vis được lựa chọn để xác định nhanh lutein tổng.

Phương pháp HPLC, LC-MS/MS cho kết quả chính xác hơn về nồng độ các chất (lutein và zeaxanthin tự do) có trong mẫu nghiên cứu. Tuy nhiên thời gian phân tích dài hơn và yêu cầu về thiết bị cao hơn nên được dùng với sản phẩm cuối hoặc để làm phương pháp trọng tài kiểm tra.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. LỰA CHỌN NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP SƠ CHẾ, BẢO QUẢN

3.1.1. Đánh giá chất lượng và lựa chọn nguyên liệu

Hàm lượng lutein tổng của nguyên liệu CVT được trình bày trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Hàm lượng lutein tổng của các nguồn nguyên liệu

| Mẫu | Đặc điểm | Hàm lượng lutein tổng; mg/g CVT khô |
|----------|---|-------------------------------------|
| CVT-VN1 | Bột CVT Việt Nam thu được bằng phương pháp sấy trong tủ sấy có quạt gió, thu hái từ tháng 3 đến tháng 5 | 12,6 |
| CVT- VN2 | Bột CVT Việt Nam thu được bằng phương pháp sấy trong tủ sấy chân không, thu hái từ tháng 3 đến tháng 5 | 12,9 |
| CVT- VN3 | Bột CVT Việt Nam thu được bằng phương pháp sấy trong tủ sấy chân không, thu hái tháng 11 đến tháng 02 | 13,6 |

Quá trình nghiên cứu, khảo sát đánh giá về nguyên liệu, chất lượng nguyên liệu, nhận thấy:

Việt Nam có nhiều vùng trồng CVT như ở Hà Nội, Nam Định, Thái Bình, Hải Phòng, Hưng Yên, Khánh Hòa, ... và nguyên liệu hoa CVT tươi của Việt Nam có chất lượng khá tốt. Chất lượng và sản lượng hoa CVT phụ thuộc vào thời điểm thu hái. CVT-VN1 (12,6 mg lutein/g CVT khô) và CVT-VN2 (12,9 mg lutein/g CVT khô) được thu hái vào mùa hè (từ tháng 3 đến tháng 5) có chất lượng không cao bằng CVT-VN3 (13,6 mg lutein/g CVT khô) được thu hái vào mùa đông xuân (từ tháng 11 đến tháng 2) do cây CVT có thể cho hoa liên tục từ mùa đông cho đến mùa hè, hoa nở rục rở nhất vào mùa xuân và lutein este trong cánh hoa CVT bị phân hủy một phần dưới nhiệt độ cao của mùa hè.

Đề tài luận án bắt đầu thực nghiệm từ tháng 5 năm 2017, CVT-VN1 và CVT-VN2 được dùng trong các nghiên cứu tìm điều kiện tối ưu của quá trình chiết, tách, tinh chế lutein. Các nghiên cứu đánh giá điều kiện tối ưu cần lượng nguyên liệu lớn hơn, sử dụng CVT-VN3.

3.1.2. Phơi mẫu trong bóng râm

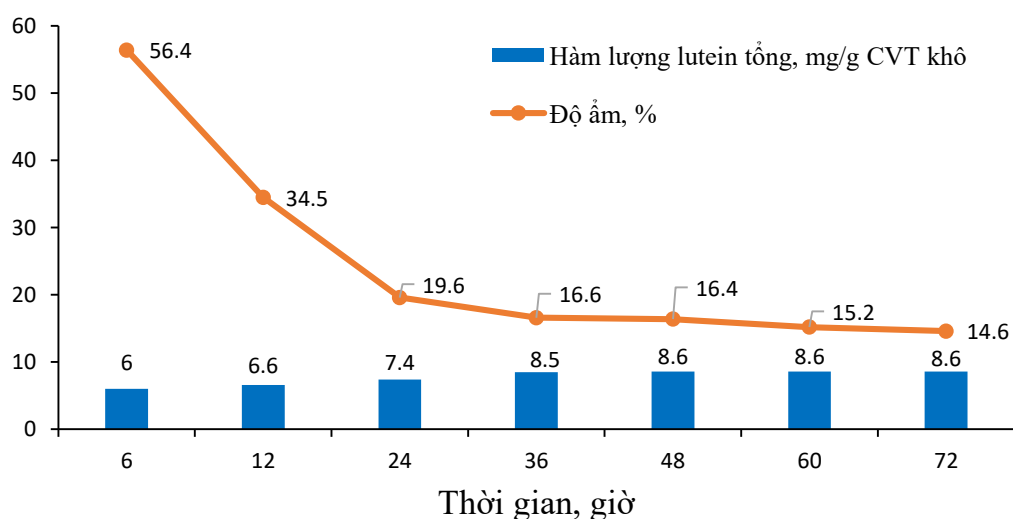
Độ ẩm và hàm lượng lutein tổng của CVT khô sau khi phơi mẫu trong bóng râm được trình bày ở bảng 3.2, hình 3.1.

Bảng 3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian phơi mẫu trong bóng râm đến chất lượng CVT

| Thời gian, giờ | m _{CVT tươi} , g | m _{CVT khô} , g | Độ ẩm, % | Hàm lượng lutein tổng, mg/g CVT khô |
|----------------|---------------------------|--------------------------|-------------|-------------------------------------|
| 6 | 1000 | 273 | 56,4 | 6,0 |
| 12 | 1000 | 190 | 34,5 | 6,6 |
| 24 | 1000 | 159 | 19,6 | 7,4 |
| 36 | 1000 | 153 | 16,6 | 8,5 |
| 48 | 1000 | 152 | 16,4 | 8,6 |
| 60 | 1000 | 150 | 15,2 | 8,6 |
| 72 | 1000 | 147 | 14,6 | 8,6 |

m_{CVT tươi}: Khối lượng CVT tươi, g

m_{CVT khô}: Khối lượng CVT khô thu được sau khi sấy, g



Hình 3.1. Ảnh hưởng của thời gian phơi mẫu trong bóng râm đến chất lượng CVT

Kết quả cho thấy, sau khi sấy 36 giờ, độ ẩm của mẫu đạt 16,6 %, ứng với hàm lượng lutein tổng của CVT sau sấy là 8,5 mg/g. Độ ẩm và hàm lượng lutein tổng của CVT thay đổi không đáng kể khi tăng thời gian sấy.

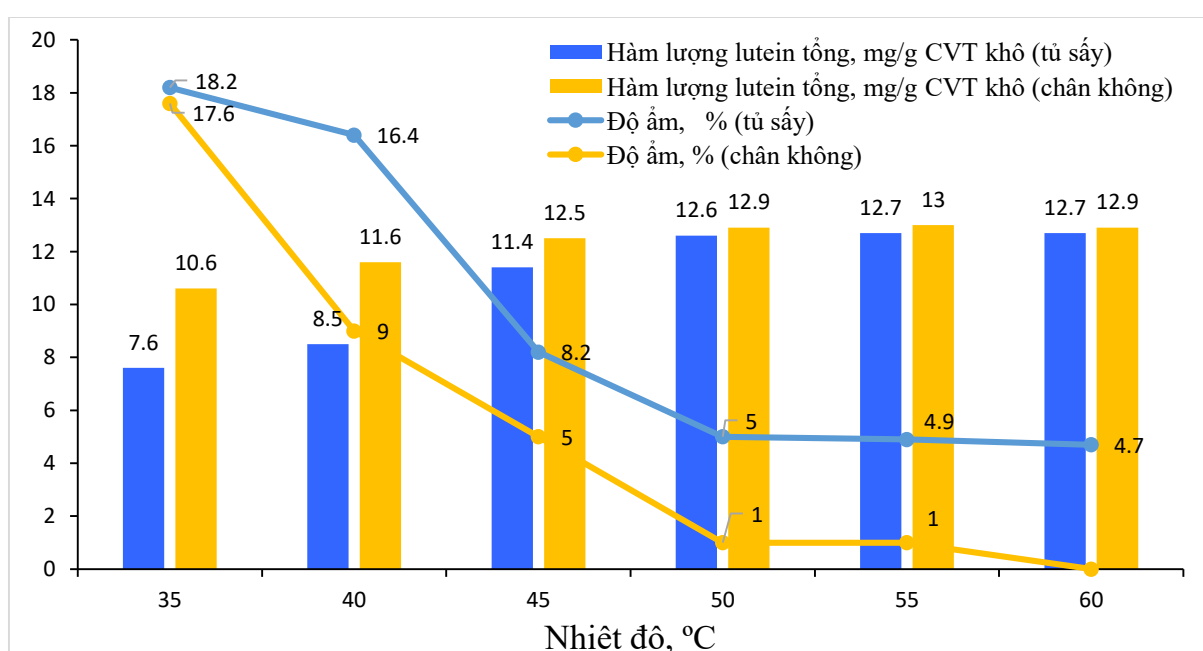
3.1.3. Sấy CVT tươi bằng các phương pháp khác

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ sấy CVT tươi được trình bày trong bảng 3.3, hình 3.2.

Bảng 3.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến chất lượng CVT

| Nhiệt độ, °C | m CVT tươi, g | Phương pháp sấy | | | | | |
|--------------|---------------|-------------------------|------------|-------------------------------------|-------------------------|------------|-------------------------------------|
| | | Tủ sấy có quạt gió | | | Điều kiện chân không | | |
| | | m _{CVT} khô, g | Độ ẩm, % | Hàm lượng lutein tổng, mg/g CVT khô | m _{CVT} khô, g | Độ ẩm, % | Hàm lượng lutein tổng, mg/g CVT khô |
| 35 | 1000 | 214 | 18,2 | 7,6 | 155 | 17,6 | 10,6 |
| 40 | 1000 | 187 | 16,4 | 8,5 | 142 | 9,0 | 11,6 |
| 45 | 1000 | 140 | 8,2 | 11,4 | 131 | 5,0 | 12,5 |
| 50 | 1000 | 135 | 5,0 | 12,6 | 129 | 1,0 | 12,9 |
| 55 | 1000 | 133 | 4,9 | 12,7 | 128 | 1,0 | 13,0 |
| 60 | 1000 | 131 | 4,7 | 12,7 | 128 | 0,0 | 12,9 |

(Điều kiện: tủ sấy có quạt gió, 24 giờ; điều kiện chân không, 16 giờ)



Hình 3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến chất lượng CVT

Kết quả cho thấy:

Đối với phương pháp sấy bằng tủ sấy có quạt gió: Sau 24 giờ, độ ẩm của CVT giảm dần, đồng thời hàm lượng lutein tổng tăng dần khi tăng nhiệt độ sấy từ 35 °C lên 50 °C. Nhiệt độ sấy trên 50 °C, độ ẩm và hàm lượng lutein tổng trong CVT sau sấy thay đổi không đáng kể. Do vậy, để tiết kiệm năng lượng, nhiệt độ sấy CVT tươi bằng tủ sấy được chọn là 50 °C.

Đối với phương pháp sấy ở điều kiện chân không: Sau 16 giờ, độ ẩm của CVT giảm, hàm lượng lutein tổng tăng khi tăng nhiệt độ sấy từ 35 lên 50 °C. Điều này là do, sau 16 giờ, sấy ở 50 °C, độ ẩm trong nguyên liệu đã đạt đến trạng thái cân bằng, nước trong mẫu không bay hơi thêm. CVT sau khi sấy ở 50 °C có độ ẩm 1%, hàm lượng lutein tổng đạt 12,9 mg/g CVT khô.

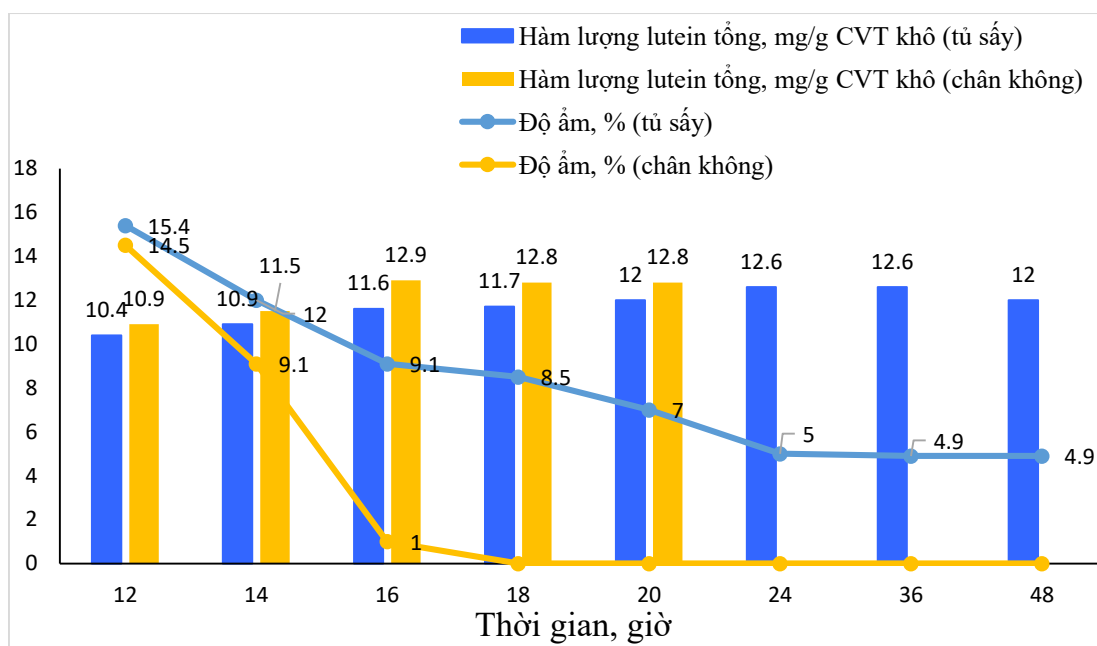
Do vậy, để tiết kiệm năng lượng, nhiệt độ sấy CVT tươi bằng tủ sấy có quạt gió và ở điều kiện chân không đều được chọn là 50 °C.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian sấy CVT tươi được trình bày trong bảng 3.4, hình 3.3.

Bảng 3.4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian sấy đến chất lượng CVT

| Thời gian, giờ | m _{CVT tươi} , g | Phương pháp sấy | | | | | |
|----------------|---------------------------|--------------------------|------------|-------------------------------------|-------------------------------|------------|-------------------------------------|
| | | Tủ sấy có quạt gió | | | Tủ sấy ở điều kiện chân không | | |
| | | m _{CVT khô} , g | Độ ẩm, % | Hàm lượng lutein tổng, mg/g CVT khô | m _{CVT khô} , g | Độ ẩm, % | Hàm lượng lutein tổng, mg/g CVT khô |
| 12 | 1000 | 150 | 15,4 | 10,4 | 146 | 14,5 | 10,9 |
| 14 | 1000 | 143 | 12,0 | 10,9 | 138 | 9,1 | 11,5 |
| 16 | 1000 | 141 | 9,1 | 11,6 | 129 | 1,0 | 12,9 |
| 18 | 1000 | 138 | 8,5 | 11,7 | 129 | 0 | 12,8 |
| 20 | 1000 | 136 | 7,0 | 12,0 | 128 | 0 | 12,8 |
| 24 | 1000 | 133 | 5,0 | 12,6 | - | - | - |
| 36 | 1000 | 132 | 4,9 | 12,6 | - | - | - |
| 48 | 1000 | 131 | 4,9 | 12,0 | - | - | - |

(Điều kiện: 50 °C)



Hình 3.3. Ảnh hưởng của thời gian sấy đến chất lượng CVT

Kết quả cho thấy:

Đối với phương pháp sấy bằng tủ sấy có quạt gió: Sau 24 giờ, độ ẩm đạt đến giá trị không đổi 5,0 %, hàm lượng lutein tổng đạt giá trị 12,6 mg/g CVT khô.

Đối với phương pháp sấy ở điều kiện chân không: khối lượng mẫu giảm dần, hàm lượng lutein tổng tăng dần khi tăng thời gian sấy từ 0 đến 16 giờ. Khối lượng mẫu không giảm khi kéo dài thời gian sấy hơn 16 giờ là do lượng nước trong mẫu gần như không còn.

Như vậy, sấy CVT tươi trong điều kiện chân không thu được CVT khô có độ ẩm rất thấp (1 %), thất thoát lutein trong mẫu thấp (hàm lượng lutein tổng trong CVT khô cao hơn so với 2 phương pháp sấy bằng năng lượng mặt trời và tủ sấy có quạt gió), thời gian sấy ngắn. Điều này được giải thích là do sự chênh lệch áp suất hơi nước trên bề mặt CVT tươi và môi trường xung quanh. Khi áp suất trên bề mặt CVT tươi (P_1) lớn hơn áp suất của môi trường tác nhân sấy (P_2), nước trong CVT sẽ thoát ra môi trường xung quanh. Do đó, ở điều kiện chân không, áp suất P_2 giảm, nước bốc hơi ở nhiệt độ sấy (50 °C) nên tốc độ sấy sẽ tăng lên và lutein tổng trong CVT ít bị tổn thất.

Vậy, phương pháp sấy CVT tươi được xác định như sau:

- Sấy CVT tươi ở điều kiện chân không trong 16 giờ ở 50 °C để hàm lượng lutein tổng trong CVT khô đạt giá trị cao nhất là 12,9 mg/g CVT khô.

- Khi ở qui mô lớn, lượng hoa CVT sử dụng nhiều sẽ sử dụng phương pháp sấy bằng tủ sấy có quạt gió trong 24 giờ ở 50 °C. Phương pháp này cho hiệu quả sấy cao, gần bằng phương pháp sấy trong chân không và có thể đáp ứng được lượng hoa lớn mà phương pháp sấy trong điều kiện chân không không đáp ứng được.

3.2. CHIẾT TÁCH VÀ TINH CHẾ LUTEIN VÀ ZEAXANTHIN ĐẠT TIÊU CHUẨN DƯỢC ĐIỂN

3.2.1. Tiền xử lý nguyên liệu bột hoa Cúc vạn thọ khô

3.2.1.1. Ảnh hưởng của nồng độ tác nhân

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ các tác nhân đến quá trình tiền xử lý bột CVT khô được trình bày trong bảng 3.5.

Bảng 3.5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ tác nhân tới quá trình xử lý bột CVT khô

| Tác nhân tiền xử lý | | | | | | | | |
|---------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------|-------------------------------|--------------------|
| NaOH | | | H ₂ SO ₄ | | | Axit citric | | |
| Nồng độ, M | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % | Nồng độ, % | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % | Nồng độ, % | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % |
| 0,1 | 1018 | 78,9 | 0,2 | 962 | 74,6 | 0,2 | 1058 | 82,0 |
| 0,2 | 1032 | 80,0 | 0,4 | 1070 | 82,9 | 0,4 | 1092 | 84,7 |
| 0,3 | 1130 | 87,6 | 0,6 | 1078 | 83,6 | 0,6 | 1199 | 92,95 |
| 0,4 | 1130 | 87,6 | 0,8 | 1070 | 82,9 | 0,8 | 1190 | 90,89 |
| 0,5 | 1132 | 87,7 | 1,0 | 1072 | 83,1 | 1,0 | 1130 | 87,6 |

(Điều kiện: 100 g bột CVT khô, 12,9 mg lutein/g; NaOH 50 °C, axit citric 50 °C, H₂SO₄ 40 °C)

Thực nghiệm cho thấy:

Với tác nhân NaOH: dùng NaOH có nồng độ $\geq 0,6$ M, mẫu bị đóng bánh, khó khuấy trộn, hiệu suất thu hồi lutein trong mẫu giảm. Điều này được giải thích là do lignin

trong hoa CVT tách ra khỏi xenlulo, phân hủy tạo thành trạng thái dẻo, lỏng dính, đồng thời lutein este trong mẫu bị thủy phân giải phóng lutein tự do. Khối lượng lutein trong cao chiết đạt giá trị lớn nhất ở mẫu xử lý bằng NaOH 0,3 M đến 0,5 M.

Với tác nhân H₂SO₄: khi tăng nồng độ axit, hiệu suất chiết lutein este tăng dần, tuy nhiên mức độ tăng này không nhiều trong khoảng nồng độ H₂SO₄ 0,4 đến 1 %.

Với tác nhân axit citric: hiệu suất chiết lutein este tăng khi tăng nồng độ axit citric từ 0,2 lên 0,6 %. Mẫu xử lý với axit citric 0,6 % chiết được 1199 mg lutein tổng, ứng với hiệu suất chiết lutein este đạt 92,95 % là mức giá trị cao.

Do vậy, để sử dụng hóa chất hiệu quả, dung dịch NaOH 0,3 M, H₂SO₄ 0,4 %, axit citric 0,6 % được chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

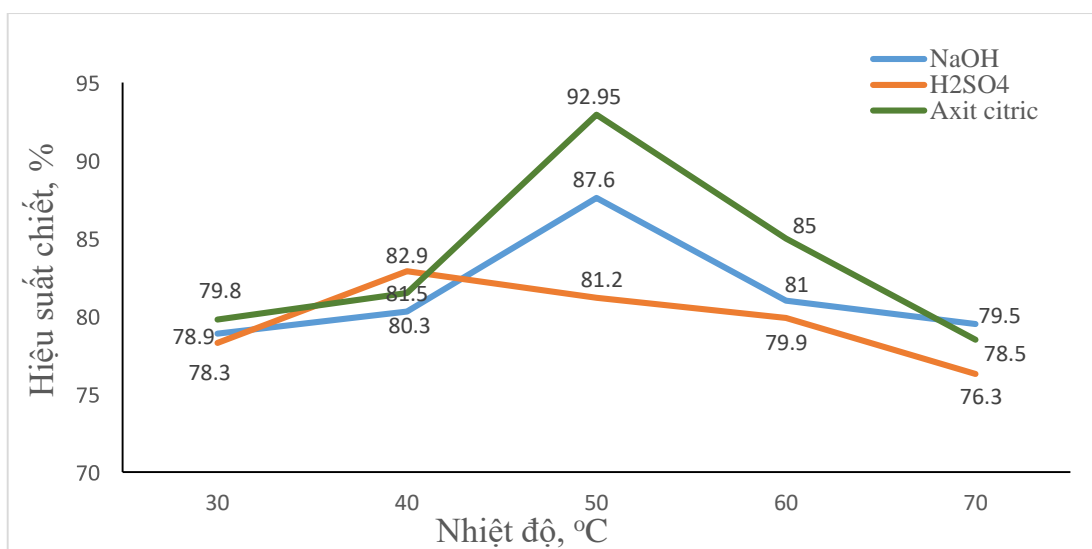
3.2.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình tiền xử lý bột CVT khô bằng các tác nhân khác nhau được trình bày trong bảng 3.6, hình 3.4.

Bảng 3.6. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tới quá trình tiền xử lý bột CVT khô

| Nhiệt độ, °C | Tác nhân tiền xử lý | | | | | |
|--------------|-------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|
| | NaOH | | H ₂ SO ₄ | | Axit citric | |
| | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % |
| 30 | 1018 | 78,9 | 1010 | 78,3 | 1030 | 79,8 |
| 40 | 1036 | 80,3 | 1070 | 82,9 | 1051 | 81,5 |
| 50 | 1130 | 87,6 | 1047 | 81,2 | 1199 | 92,95 |
| 60 | 1045 | 81,0 | 1031 | 79,9 | 1096 | 85,0 |
| 70 | 1026 | 79,5 | 984 | 76,3 | 1013 | 78,5 |

(Điều kiện: 100 g bột CVT khô, 12,9 mg lutein /g; 2 giờ; NaOH 0,3 M, axit citric 0,6 %, H₂SO₄ 0,4 %)



Hình 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới quá trình tiền xử lý bột CVT khô

Kết quả cho thấy:

Với tác nhân NaOH: khối lượng lutein tổng trong cao chiết thu được tăng khi nhiệt độ xử lý tăng và giảm khi nhiệt độ tăng lên trên 50 °C. Trong quá trình thực nghiệm, nhiệt độ trên 60 °C, bột CVT bị đóng bánh, chuyển màu, khó khuấy trộn. Điều này được giải thích là do lignin trong hoa CVT tách ra khỏi xenlulo và phân hủy tạo thành trạng thái dẻo và lỏng dính. Ngoài ra, khi nhiệt độ tăng, hiệu suất chiết lutein este giảm là do NaOH đã thủy phân xenlulo, màng tế bào giúp tăng khả năng chiết tách nhưng đồng thời NaOH cũng thủy phân lutein este trong mẫu giải phóng lutein tự do nên khối lượng lutein tổng thu được trong cao chiết giảm.

Với tác nhân H₂SO₄: hiệu suất chiết lutein este tăng khi tăng nhiệt độ từ 30 °C lên 40 °C.

Với tác nhân axit citric: khối lượng lutein tổng chiết được tăng lên khi tăng nhiệt độ xử lý mẫu từ 30 lên 50 °C. Ở 50 °C, khối lượng lutein tổng chiết được là 1199 mg, ứng với hiệu suất 92,95 %, là mức giá trị khá cao.

Với cả 3 tác nhân, khi xử lý ở nhiệt độ cao (NaOH, axit citric trên 50 °C, H₂SO₄ trên 40 °C), khối lượng lutein tổng thu được trong cao chiết đều giảm. Điều này được giải thích là do lutein este chứa liên kết polyen nên dễ bị oxi hóa, kém bền nhiệt, bị phân hủy ở nhiệt độ cao. Vì vậy, nhiệt độ tiền xử lý bột CVT khô bằng NaOH, axit citric được chọn là 50 °C, bằng H₂SO₄ được chọn là 40 °C.

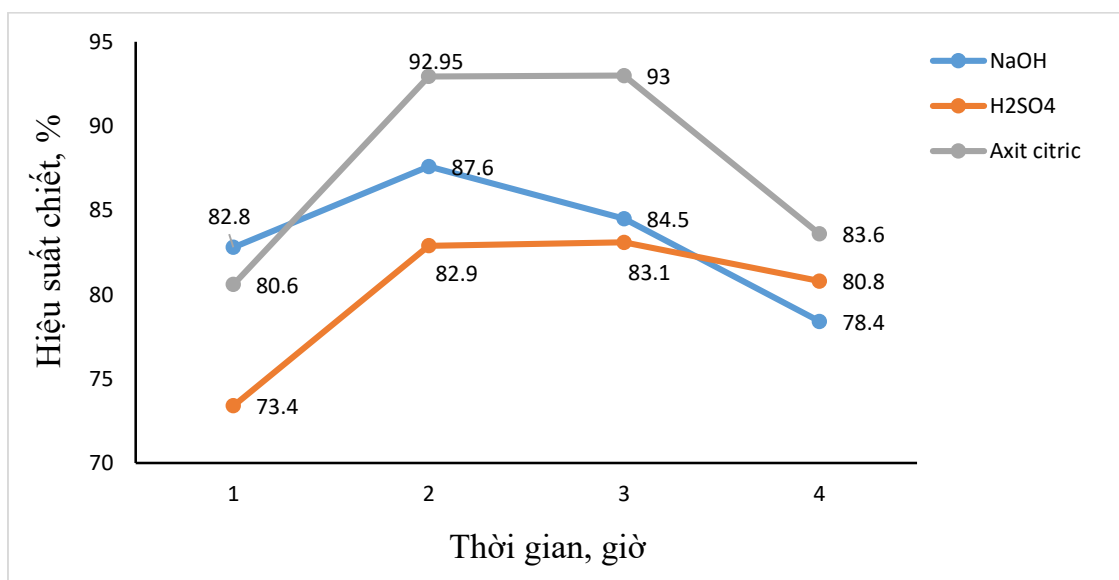
3.2.1.3. Ảnh hưởng của thời gian

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian tới quá trình tiền xử lý bột CVT bằng các tác nhân khác nhau được trình bày trong bảng 3.7, hình 3.5.

Bảng 3.7. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian tới quá trình xử lý bột CVT

| Thời gian, giờ | Tác nhân tiền xử lý | | | | | |
|----------------|-------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|
| | NaOH | | H ₂ SO ₄ | | Axit Citric | |
| | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % |
| 1 | 1068 | 82,8 | 947 | 73,4 | 1040 | 80,6 |
| 2 | 1130 | 87,6 | 1070 | 82,9 | 1199 | 92,95 |
| 3 | 1190 | 84,5 | 1072 | 83,1 | 1200 | 93,0 |
| 4 | 1012 | 78,4 | 1042 | 80,8 | 1079 | 83,6 |

(Điều kiện: 100 g bột CVT khô, 12,9 mg lutein /g; NaOH 0,3 M; 50 °C, H₂SO₄ 0,4 %; 40 °C, axit citric 0,6 %; 50 °C)



Hình 3.5. Ảnh hưởng của thời gian tới quá trình xử lý bột CVT

Kết quả cho thấy:

Hiệu suất chiết lutein este tăng khi thời gian tiền xử lý bằng NaOH tăng từ 1 giờ lên 2 giờ. Điều này có thể giải thích là xử lý thời gian càng dài với NaOH, thành tế bào và xenlulo bị phá vỡ càng nhiều, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình chiết lutein este

nhưng cũng làm tăng lượng lutein este bị thủy phân. Khi thời gian xử lý mẫu trên 2 giờ thì khối lượng cao chiết tăng nhưng hàm lượng lutein tổng trong cao chiết giảm mạnh dẫn đến hiệu suất chiết lutein este giảm.

Hiệu suất chiết lutein este tăng khi tăng thời gian tiền xử lý từ 1 giờ lên 2 giờ đối với cả hai tác nhân H₂SO₄ và axit citric tăng. Sau 2 giờ tiền xử lý, khối lượng lutein tổng trong cao chiết thu được với tác nhân H₂SO₄ là 1070 mg, ứng với hiệu suất chiết lutein este 82,9 %; với tác nhân axit citric là 1199 mg, ứng với hiệu suất 92,95 %.

Thời gian tiền xử lý tăng lên 3 giờ, hiệu suất chiết lutein este tăng lên không đáng kể. Do vậy, thời gian tiền xử lý bột CVT khô đối với cả 3 tác nhân đều được chọn là 2 giờ.

3.2.1.4. Lựa chọn phương pháp tiền xử lý

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các tác nhân tiền xử lý tới quá trình chiết lutein este từ bột CVT khô được trình bày trong bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tác nhân tiền xử lý tới quá trình chiết lutein este từ bột CVT

| Mẫu | Số lần chiết | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % |
|---|--------------|-------------------------------|--------------------|
| CVT1 không tiền xử lý | 1 | 590 | 45,74 |
| | 2 | 902 | 69,92 |
| | 3 | 1080 | 83,72 |
| | 4 | 1191 | 92,33 |
| | 5 | 1230 | 95,35 |
| CVT1 xử lý với NaOH 0,3 M | 2 | 1130 | 87,60 |
| CVT1 xử lý với H ₂ SO ₄ 0,4 % | 2 | 1070 | 82,95 |
| CVT1 xử lý với axit citric 0,6 % | 2 | 1199 | 92,95 |

(Điều kiện quá trình chiết: 100 g bột CVT khô, 12,9 mg lutein /g; dung môi/nguyên liệu: 10/1, mL/g; 6 giờ; 60 °C; tốc độ khuấy 200 vòng/phút)

Kết quả cho thấy, bột CVT sau khi được tiền xử lý đều cho hiệu quả chiết cao hơn với số lần chiết ít hơn so với bột CVT chưa xử lý, tốt nhất là tiền xử lý bằng axit citric. Cụ thể, bột CVT được tiền xử lý bằng axit citric, sau đó chiết 2 lần cho hiệu quả chiết lutein este (hiệu suất 92,95 %) tương đương với bột CVT chưa được xử lý chiết 4 lần (hiệu suất 92,33 %).

Axit citric có tính an toàn cao, thường được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, lượng axit citric dư thừa trong cơ thể dễ dàng trao đổi và bài tiết ra ngoài. Vì những lí do trên, axit citric 0,6 % được chọn để tiền xử lý bột CVT tại 50 °C, thời gian xử lý 2 giờ, tỷ lệ nguyên liệu/tác nhân là 1/10 g/mL.

3.2.2. Chiết tách cao chiết giàu lutein este từ nguyên liệu hoa Cúc vạn thọ

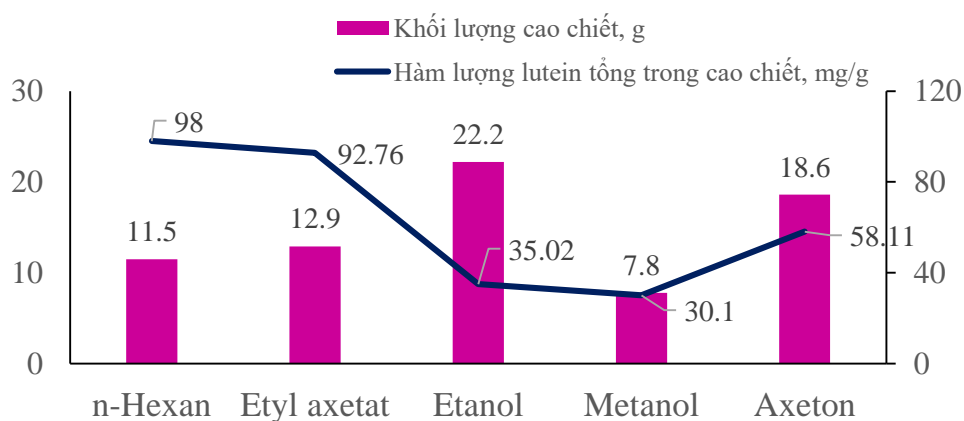
3.2.2.1. Xác định dung môi chiết

Kết quả nghiên cứu xác định dung môi chiết được trình bày trong bảng 3.9, hình 3.6.

Bảng 3.9. Kết quả chiết bột CVT với dung môi chiết khác nhau

| Dung môi | m _{cao chiết} , g | Hàm lượng lutein tổng trong cao chiết, mg/g | m _{Lu cao chiết} , mg | Hiệu suất chiết, % |
|-------------|----------------------------|---|--------------------------------|--------------------|
| n-Hexan | 11,5 | 98,00 | 1127 | 87,36 |
| Etyl axetat | 12,9 | 92,76 | 1199 | 92,95 |
| Etanol | 22,2 | 35,02 | 777 | 60,23 |
| Metanol | 7,8 | 30,10 | 235 | 18,21 |
| Axeton | 18,6 | 58,11 | 108 | 83,72 |

(Điều kiện: 100 g bột CVT, 12,9 mg lutein/g; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu = 10/1, mL/g; tốc độ khuấy 200 vòng/phút; 6 giờ; 60 °C; chiết 2 lần)



Hình 3.6. Ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất chiết

Kết quả chỉ ra rằng, chiết bằng etanol và axeton thu được khối lượng cao chiết khá cao lần lượt là 22,2 g và 18,6 g nhưng hàm lượng lutein tổng trong cao chiết thấp. Điều này được giải thích do etanol và axeton là các dung môi phân cực nên khả năng chiết chọn lọc lutein este của các dung môi phân cực này kém, lượng chất được chiết có

thể hòa tan lớn hơn, khối lượng cao chiết lớn nhưng lutein este là chất ít phân cực nên hàm lượng lutein este trong cao chiết thấp.

Chiết bột CVT bằng *n*-hexan và etyl axetat cho khối lượng lutein tổng trong cao chiết lần lượt là 1127 và 1199 mg, ứng với hiệu suất chiết 87,36 và 92,95 %. Trong đó, khả năng chiết của etyl axetat tốt hơn so với *n*-hexan, điều này là do *n*-hexan và etyl axetat là các dung môi chiết kém phân cực và sự thâm nhập của etyl axetat vào trong nguyên liệu tốt hơn *n*-hexan, ái lực với lutein este của etyl axetat mạnh hơn, etyl axetat và lutein este đều chứa liên kết – COO – nên khả năng hòa tan lutein este trong etyl axetat cao hơn *n*-hexan, sự chuyển động tự do của các phân tử lutein este theo chiều hướng tạo cân bằng nồng độ chất tan trong dịch chiết xảy ra nhanh hơn. Vì lý do đó, dung môi được lựa chọn để chiết bột CVT là etyl axetat.

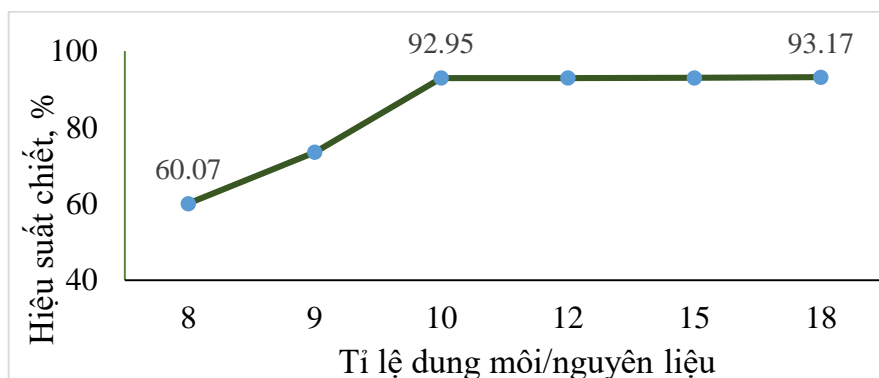
3.2.2.2. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết

Kết quả nghiên cứu khảo sát tỷ lệ dung môi/nguyên liệu trong quá trình chiết được trình bày trong bảng 3.10, hình 3.7.

Bảng 3.10. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi etyl axetat/ nguyên liệu đến quá trình chiết bột CVT

| Tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % |
|-----------------------------|-------------------------------|--------------------|
| 8/1 | 775 | 60,07 |
| 9/1 | 948 | 73,49 |
| 10/1 | 1199 | 92,95 |
| 12/1 | 1199 | 92,95 |
| 15/1 | 1200 | 93,00 |
| 18/1 | 1202 | 93,17 |

(Điều kiện: 100 g bột CVT, 12,9 mg lutein/g; dung môi etyl axetat; tốc độ khuấy 200 vòng/phút; 6 giờ; 60 °C; chiết 2 lần)



Hình 3.7. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu đến hiệu suất chiết

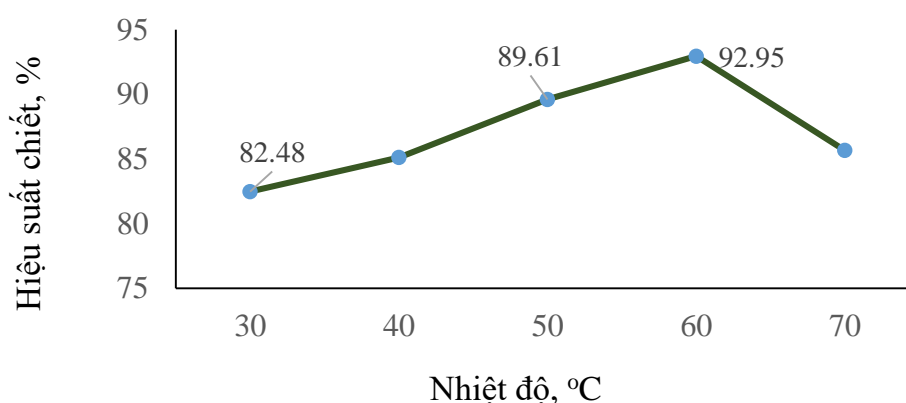
Kết quả cho thấy, hiệu suất chiết tăng khi tăng tỷ lệ dung môi/nguyên liệu từ 8/1 lên 10/1 nhưng với tỷ lệ cao hơn thì hiệu suất chiết gần như không thay đổi. Điều này có thể giải thích là do với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu nhỏ hơn 10/1 (v/w), lượng dung môi chưa đủ ngập hết nguyên liệu, lutein este chỉ được chiết một phần, do đó, hiệu suất chiết khá thấp (dưới 75 %). Khi tỷ lệ này từ 10/1 trở lên, nguyên liệu được tiếp xúc hoàn toàn với dung môi, lutein este tách ra khỏi nguyên liệu. Xét về phương diện kinh tế, không cần thiết phải sử dụng lượng dung môi quá nhiều. Vậy, tỷ lệ dung môi (ml)/nguyên liệu (gam) thích hợp nhất được chọn là 10/1.

Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết được trình bày trong bảng 3.11, hình 3.8.

Bảng 3.11. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết bột CVT

| Nhiệt độ chiết, °C | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % |
|--------------------|-------------------------------|--------------------|
| 30 | 1064 | 82,48 |
| 40 | 1098 | 85,11 |
| 50 | 1156 | 89,61 |
| 60 | 1199 | 92,95 |
| 70 | 1105 | 85,66 |

(Điều kiện: 100 g bột CVT, 12,9 mg lutein/g; dung môi etyl axetat; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, 10/1 mL/g; tốc độ khuấy 200 vòng/phút; 6 giờ; chiết 2 lần)



Hình 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết bột CVT

Kết quả chỉ ra rằng, khả năng chiết lutein este trong CVT của dung môi etyl axetat tăng khi tăng nhiệt độ chiết từ 30 lên 60 °C. Ở 60 °C, hiệu suất chiết lutein este đạt 92,95 %, là mức giá trị khá cao. Khi nhiệt độ chiết tăng đến 70 °C, hiệu quả chiết giảm (85,66 %), điều này được giải thích là do lutein este là hợp chất kém bền, dễ bị oxy hóa và phân

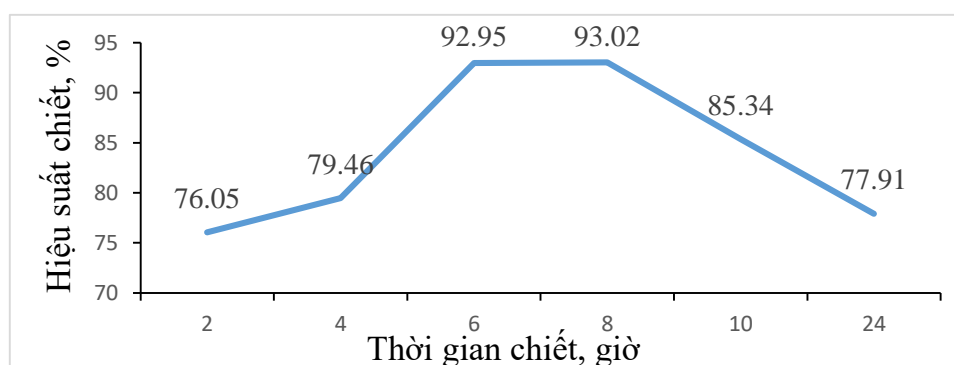
hủy bởi nhiệt dẫn tới hiệu suất chiết giảm. Vì vậy, để đảm bảo hiệu quả chiết lutein cao, nhiệt độ chiết được lựa chọn là 60 °C.

Kết quả khảo sát thời gian chiết được trình bày trong bảng 3.12, hình 3.9.

Bảng 3.12. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến quá trình chiết bột CVT

| Thời gian chiết, giờ | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % |
|----------------------|-------------------------------|--------------------|
| 2 | 981 | 76,05 |
| 4 | 1025 | 79,46 |
| 6 | 1199 | 92,95 |
| 8 | 1200 | 93,02 |
| 10 | 1101 | 85,34 |
| 24 | 1050 | 77,91 |

(Điều kiện: 100 g bột CVT, 12,9 mg lutein/g; dung môi etyl axetat; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, 10/1 mL/g; tốc độ khuấy 200 vòng/phút; 60 °C; chiết 2 lần)



Hình 3.9. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình chiết bột CVT

Kết quả chỉ ra rằng, hiệu suất chiết tăng cùng chiều với sự tăng thời gian chiết từ 2 giờ lên 8 giờ. Thời gian chiết là 2, 4, 6, 8 giờ, hiệu suất chiết lần lượt đạt là 76,05; 79,46; 92,95, 93,02 %. Tuy nhiên, thời gian kéo dài hơn 10 giờ thì hiệu quả chiết có xu hướng giảm, với 10 giờ chiết, hiệu suất chiết còn 85,34 %; với 24 giờ chiết, hiệu suất chiết chỉ còn 77,91 %. Điều này là do khi ngâm chiết CVT quá lâu ở 60 °C, các liên kết polyein trong lutein este kém bền bị oxy hóa bởi nhiệt dẫn tới sự giảm hiệu suất chiết lutein este. Ngoài ra, thời gian chiết kéo dài, các chất trong nguyên liệu không thể tan vào dung môi thêm được nữa, quá trình hòa tan lutein este trong dung môi chiết giảm dần và quá trình bay hơi dung môi tăng lên, hiệu quả chiết giảm.

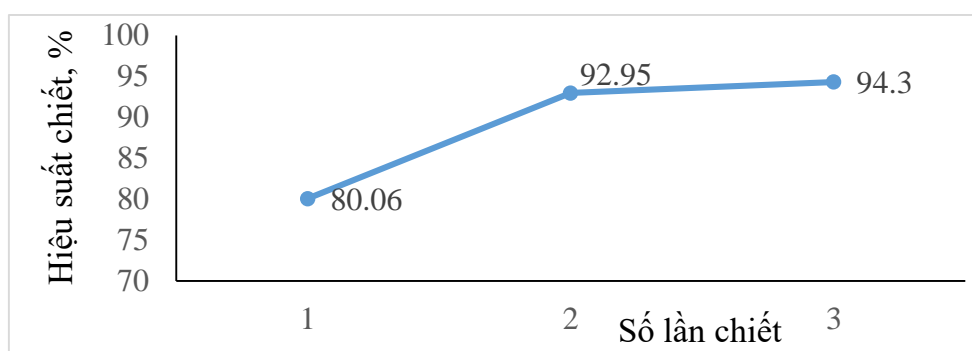
Hiệu suất chiết lutein este tăng không đáng kể khi tăng thời gian chiết từ 6 giờ lên 8 giờ. Do đó, xét trên phương diện kinh tế, thời gian chiết lựa chọn là 6 giờ.

Kết quả nghiên cứu khảo sát số lần chiết bột CVT được trình bày trong bảng 3.13, hình 3.10.

Bảng 3.13. Kết quả chiết bột CVT phụ thuộc vào số lần chiết

| Số lần chiết | m _{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % |
|--------------|-------------------------------|--------------------|
| 1 | 1040 | 80,06 |
| 2 | 1199 | 92,95 |
| 3 | 1225 | 94,30 |

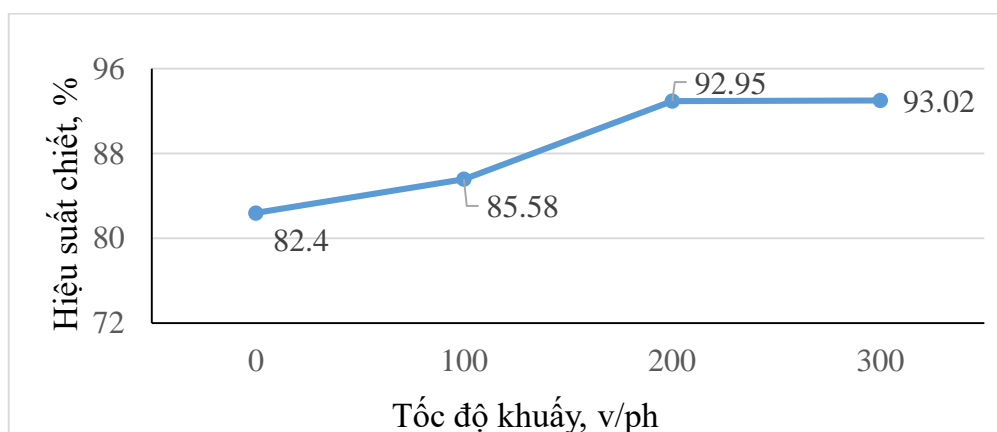
(Điều kiện: 100 g bột CVT, 12,9 mg lutein/g; dung môi etyl axetat; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, 10/1 mL/g; tốc độ khuấy 200 vòng/phút; 60 °C; 6 giờ)



Hình 3.10. Ảnh hưởng của số lần chiết đến quá trình chiết bột CVT

Khi tăng số lần chiết từ 1 lên 2 lần thì hiệu suất chiết lutein este tăng (80,06 % lên 92,95 %), nhưng chiết 3 lần thì hiệu suất chiết tăng không đáng kể (94,3 %). Điều này là do sau 2 lần chiết, lutein este còn lại trong nguyên liệu rất ít, gradient nồng độ giữa bề mặt phân cách pha rắn (nguyên liệu) với dung môi nhỏ, dẫn đến tốc độ chiết tăng không đáng kể. Do vậy, số lần chiết được chọn là 2 để tăng hiệu quả chiết.

Kết quả khảo sát tốc độ khuấy được trình bày trong hình 3.11, bảng 3.14.



Hình 3.11. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến hiệu quả chiết

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến hiệu quả chiết

| Tốc độ khuấy, vòng/phút | m_{Lu} cao chiết, mg | Hiệu suất chiết, % |
|--------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| 0 | 1063 | 82,40 |
| 100 | 1104 | 85,58 |
| 200 | 1199 | 92,95 |
| 300 | 1200 | 93,02 |

(Điều kiện: 100 g bột CVT, 12,9 mg lutein/g; dung môi etyl axetat; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, 10/1 mL/g; 60 °C; 6 giờ; chiết 2 lần)

Kết quả cho thấy, khi dùng máy khuấy hiệu quả chiết tăng, điều này được giải thích là do khi khuấy trộn nguyên liệu tiếp xúc với dung môi tốt hơn, xuất hiện hiện tượng khuếch tán đối lưu, tạo nên sự dịch chuyển của dịch chiết kéo theo chất tan vào dòng khuếch tán nên lutein este được tách ra nhanh hơn. Tốc độ khuấy 200 vòng/phút, hiệu suất chiết đạt 92,95 %, là mức giá trị khá cao. Vì vậy, không cần thiết phải khuấy với tốc độ 300 vòng/phút do ở tốc độ khuấy này, hiệu suất chiết lutein tăng không đáng kể và trên thực tế cần phải kiểm soát tốt điều kiện công nghệ.

Với các kết quả khảo sát đạt được ở trên, điều kiện tối ưu để chiết tách cao chiết lutein từ bột CVT khô là: dung môi etyl axetat; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu: 10/1, mL/g; thời gian chiết: 6 giờ; nhiệt độ chiết: 60 °C; tốc độ khuấy: 200 vòng/phút; chiết 2 lần.

3.2.2.3. Đánh giá độ ổn định của quá trình chiết lutein este từ bột CVT

Kết quả chiết tách lutein este của hai nguồn nguyên liệu CVT-VN2 và CVT-VN3 được trình bày trong bảng 3.15.

Kết quả chỉ ra rằng, với điều kiện chiết tối ưu, quá trình chiết hai loại bột CVT của Việt Nam đều ổn định và hiệu suất chiết lutein este đạt ở mức giá trị cao (92,95 %).

Kết quả đánh giá các điều kiện tối ưu của quá trình chiết lutein với lượng lớn bột CVT được trình bày trong bảng 3.16.

Bảng 3.15. Kết quả đánh giá các điều kiện tối ưu của quá trình chiết lutein este từ bột CVT

| Mẫu | CVT-VN2 | CVT-VN3 |
|---|---------|---------|
| Hàm lượng lutein tổng trong bột CVT, mg/g CVT | 12,90 | 13,60 |
| $m_{\text{cao chiết}}$, g | 12,93 | 13,31 |
| Hàm lượng lutein tổng trong cao chiết, mg/g cao chiết | 92,76 | 94,98 |
| $m_{\text{Lu cao chiết}}$, mg | 1199 | 1264 |
| Hiệu suất thu hồi, % | 92,95 | 92,95 |

(Điều kiện: 100 g bột CVT; dung môi etyl axetat; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, 10/1 mL/g; 60 °C; 6 giờ; 200 vòng/phút; chiết 2 lần; lặp lại thí nghiệm 3 lần)

Bảng 3.16. Kết quả đánh giá các điều kiện tối ưu của quá trình chiết lutein từ lượng lớn bột CVT

| Khối lượng bột CVT khô, kg | 1 | 5 | 15 |
|----------------------------------|-------|-------|-------|
| Khối lượng cao chiết, kg | 0,135 | 0,675 | 2,01 |
| Hàm lượng lutein, mg/g cao chiết | 92,8 | 92,0 | 90,08 |
| $m_{\text{Lu cao chiết}}$, g | 12,5 | 62,1 | 181,4 |
| Hiệu suất chiết, % | 91,91 | 91,32 | 88,92 |

(Điều kiện: bột CVT-VN2, 13,60 mg lutein /g bột CVT; dung môi etyl axetat; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, 10/1 mL/g; 60 °C; 6 giờ; 200 vòng/phút; chiết 2 lần)

Kết quả cho thấy, quá trình chiết lutein este từ bột CVT có tính ổn định cao với các nguồn nguyên liệu khác nhau và lượng lớn nguyên liệu.

3.2.3. Làm giàu cao chiết bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng

Cao chiết chứa lutein este được làm giàu bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng với một pha là dung dịch cao chiết hòa tan trong etanol (pha 1), pha còn lại là dung môi chiết chứa *n*-hexan hoặc etyl axetat (pha 2). Nước được bổ sung vào pha (1) nhằm làm tăng độ phân cực giữa hai pha (1) và (2). Điều này được giải thích là do có sự chuyển pha của lutein este từ pha lỏng (1) sang pha lỏng (2) do tính tan của lutein este khác nhau trong hai pha lỏng này.

3.2.3.1. Xác định tỷ lệ EtOH/H₂O hòa tan cao chiết

Kết quả nghiên cứu xác định tỷ lệ EtOH/H₂O hòa tan cao chiết được trình bày trong bảng 3.17.

Bảng 3.17. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của tỷ lệ EtOH/H₂O vào khả năng hòa tan cao chiết tổng

| Tỷ lệ EtOH/H ₂ O, v/v | Hiện tượng | Nhận xét |
|----------------------------------|---|-----------|
| 9/1 | - Cao chiết tan tốt - Dung dịch không phân lớp với <i>n</i> -hexan - Dung dịch không phân lớp etyl axetat | Không đạt |
| 8/2 | - Cao chiết tan tốt - Dung dịch không phân lớp với <i>n</i> -hexan - Dung dịch không phân lớp etyl axetat | Không đạt |
| 7/3 | - Cao chiết tan tốt - Dung dịch phân lớp với <i>n</i> -hexan - Dung dịch phân lớp với etyl axetat | Đạt |
| 6/4 | - Cao chiết tan tốt - Dung dịch không phân lớp với <i>n</i> -hexan - Dung dịch phân lớp với etyl axetat | Đạt |
| 1/1 | - Cao chiết tạo huyền phù - Dung dịch không phân lớp với <i>n</i> -hexan - Dung dịch phân lớp với etyl axetat | Không đạt |
| 4/6 | - Cao chiết tạo huyền phù - Dung dịch phân lớp với <i>n</i> -hexan - Dung dịch phân lớp với etyl axetat | Không đạt |
| 3/7 | - Cao chiết đóng rắn - Dung dịch phân lớp với <i>n</i> -hexan - Dung dịch phân lớp với etyl axetat | Không đạt |

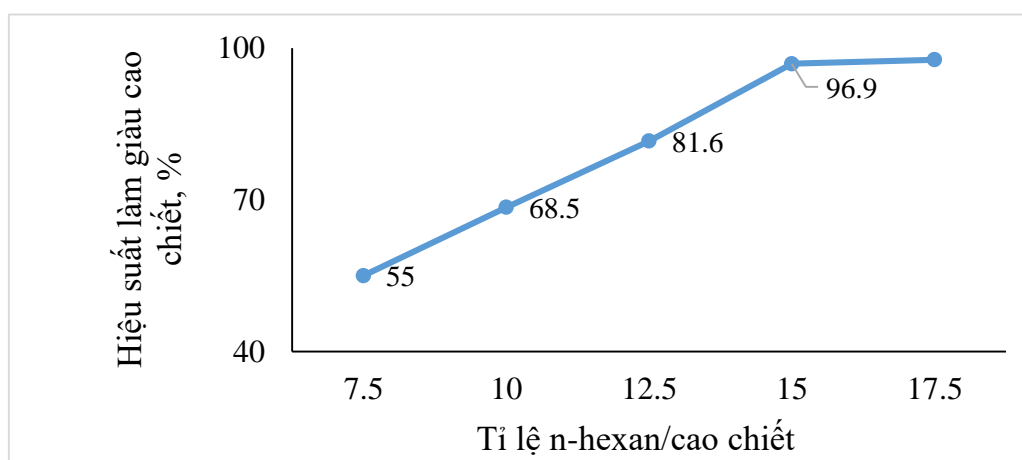
(Điều kiện: 60 °C, tỷ lệ dung môi/cao chiết 15/1 mL/g, 10 phút)

3.2.3.2. Làm giàu lutein este bằng *n*-hexan

Kết quả nghiên cứu làm giàu lutein este bằng dung môi *n*-hexan, thông qua khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi *n*-hexan/dung dịch cao chiết đến hiệu suất chiết, được trình bày trong bảng 3.18, hình 3.12.

Bảng 3.18. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi *n*-hexan/dung dịch cao chiết đến hiệu suất làm giàu cao chiết

| Tỷ lệ <i>n</i> -hexan/cao chiết, mL/g | Khối lượng cao chiết sau làm giàu, g | Hàm lượng lutein, mg/g cao chiết sau làm giàu | Hiệu suất làm giàu cao chiết, % |
|---------------------------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------|
| 7,5/1 | 6,3 | 161,9 | 55,0 |
| 10/1 | 7,5 | 169,4 | 68,5 |
| 12,5/1 | 8,8 | 172,0 | 81,6 |
| 15/1 | 9,7 | 185,4 | 96,9 |
| 17,5/1 | 9,8 | 185,0 | 97,7 |



Hình 3.12. Ảnh hưởng tỷ lệ dung môi *n*-hexan/dung dịch cao chiết tới quá trình làm giàu cao chiết

Kết quả cho thấy, hiệu suất chiết lỏng – lỏng tăng cùng chiều với sự tăng thể tích dung môi chiết *n*-hexan, cụ thể hơn là khi tăng thể tích *n*-hexan, hàm lượng lutein este trong cao chiết thu được tăng lên, dẫn đến tăng hiệu suất làm giàu lutein este. Ở tỷ lệ *n*-hexan/cao chiết là 15/1 (mL/g), thu được 9,7 g cao chiết giàu lutein, với hàm lượng lutein este trong cao chiết sau làm giàu là 185,4 mg/g, ứng với hiệu suất làm giàu cao chiết đạt 96,9 %. Điều này được lý giải là nhờ sự có mặt của lượng lớn *n*-hexan, sự phân

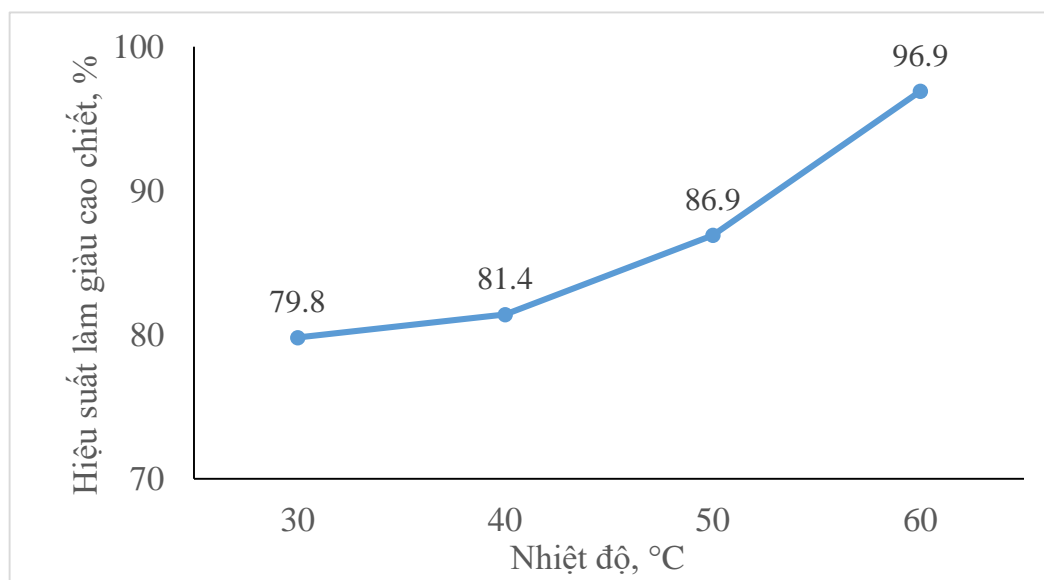
bổ lutein este trong hai pha có sự thay đổi theo chiều hướng ưu tiên cho sự dịch chuyển từ pha EtOH/H₂O sang pha *n*-hexan. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng lượng *n*-hexan lên trên tỷ lệ 15/1 (mL/g), hiệu suất chiết lỏng – lỏng tiếp tục tăng nhưng không đáng kể. Do vậy, xét về phương diện kinh tế, không cần thiết phải sử dụng lượng dung môi *n*-hexan quá nhiều. Vậy, lựa chọn tỷ lệ *n*-hexan/cao chiết là 15/1 (mL/g).

Kết quả khảo sát nhiệt độ làm giàu lutein bằng *n*-hexan được trình bày trong bảng 3.19, hình 3.13.

Bảng 3.19. Kết quả chiết lỏng - lỏng *n*-hexan ở các nhiệt độ khác nhau

| Nhiệt độ chiết, °C | Khối lượng cao chiết sau làm giàu, g | Hàm lượng lutein, mg/g cao chiết sau làm giàu | Hiệu suất làm giàu cao chiết, % |
|--------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------|
| 30 | 8,1 | 182,8 | 79,8 |
| 40 | 8,2 | 184,2 | 81,4 |
| 50 | 8,7 | 185,4 | 86,9 |
| 60 | 9,7 | 185,4 | 96,9 |

(Điều kiện: 20 g cao chiết 92,76 mg lutein/g; 200 mL EtOH/H₂O (7/3, v/v); *n*-hexan/cao chiết (15/1, mL/g), chiết lỏng – lỏng 2 lần, 10 phút/lần)



Hình 3.13. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới quá trình làm giàu cao chiết

Kết quả chỉ ra rằng khối lượng cao chiết giàu lutein este và hiệu suất làm giàu cao chiết tăng dần khi tăng nhiệt độ chiết từ 30 lên 60 °C. Tại 60 °C, thu được 9,7 g cao chiết giàu lutein este, với hàm lượng 185,4 mg lutein/g cao chiết, ứng với hiệu suất làm giàu đạt 96,9 %, là mức giá trị khá cao. Vì vậy, không cần thiết phải tiếp tục khảo sát thực

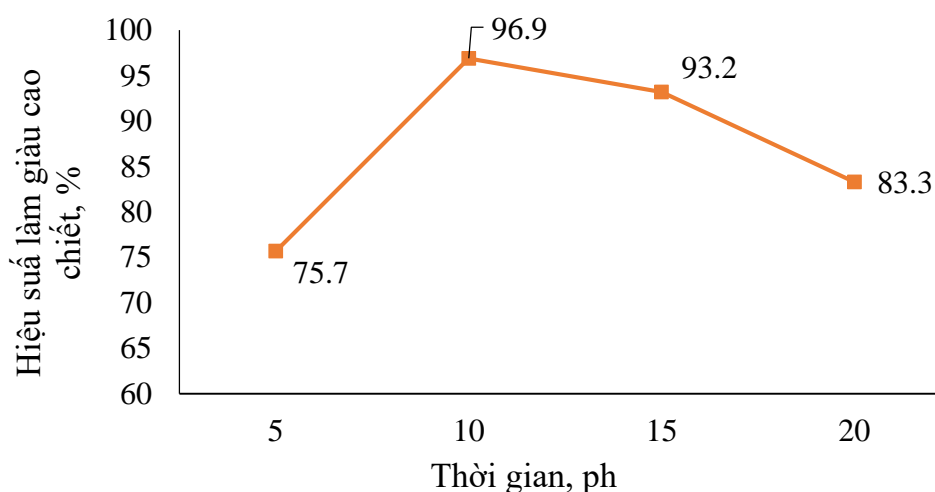
nghiệm tại 69 °C (nhiệt độ sôi của *n*-hexan) do ở nhiệt độ đó, trên thực tế cần phải khống chế tốt điều kiện công nghệ và thiết bị để không thất thoát *n*-hexan. Vì lý do đó, nhiệt độ được chọn là 60 °C.

Kết quả khảo sát thời gian làm giàu lutein bằng *n*-hexan được trình bày trong bảng 3.20, hình 3.14.

Bảng 3.20. Kết quả chiết lỏng-lỏng *n*-hexan ở các thời gian chiết khác nhau

| Thời gian chiết (phút) | Khối lượng cao chiết sau làm giàu, g | Hàm lượng lutein, mg/g cao chiết sau làm giàu | Hiệu suất làm giàu cao chiết, % |
|------------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------|
| 5 | 7,8 | 180,1 | 75,7 |
| 10 | 9,7 | 185,4 | 96,9 |
| 15 | 9,8 | 176,5 | 93,2 |
| 20 | 9,2 | 168,1 | 83,3 |

(Điều kiện: *n*-hexan/cao chiết (15/1, mL/g); chiết lỏng – lỏng 2 lần, 10 phút/lần, 60 °C)



Hình 3.14. Ảnh hưởng của thời gian tới quá trình làm giàu cao chiết

Kết quả chỉ ra rằng khối lượng cao chiết giàu lutein este và hiệu suất thu hồi tăng dần khi tăng thời gian chiết từ 5 lên 10 phút/lần chiết. Với thời gian chiết mỗi lần 10 phút, thu được 9,7 g cao chiết giàu lutein este, hàm lượng 185,4 mg lutein/g cao chiết, ứng với hiệu suất thu hồi lutein đạt 96,9 %, là mức giá trị khá cao. Khi thời gian chiết dài hơn, hiệu quả chiết giảm. Điều này được giải thích là do sau 10 phút, sự chuyển lutein este từ pha EtOH/H₂O sang pha *n*-hexan gần như không xảy ra và lutein este bị

phân hủy khi kéo dài thời gian chiết ở nhiệt độ cao. Vì các lí do trên, thời gian chiết được chọn là 10 phút/lần chiết.

Kết quả khảo sát số lần chiết được trình bày trong bảng 3.21.

Bảng 3.21. Kết quả chiết lỏng - lỏng *n*-hexan phụ thuộc vào số lần chiết

| Số lần chiết | Khối lượng cao chiết sau làm giàu, g | Hàm lượng lutein, mg/g cao chiết sau làm giàu | Hiệu suất làm giàu cao chiết, % |
|--------------|--------------------------------------|---|---------------------------------|
| 1 | 7,9 | 183,6 | 78,2 |
| 2 | 9,7 | 185,4 | 96,9 |

(Điều kiện: 20 g cao chiết 92,76 mg lutein/g; 200 mL EtOH/H₂O (7/3, v/v); *n*-hexan/cao chiết (15/1, mL/g); 10 phút/lần; 60 °C)

Kết quả chỉ ra rằng khối lượng cao chiết giàu lutein este và hiệu suất làm giàu cao chiết tăng khi tăng số lần chiết từ 1 lên 2 lần. Sau 2 lần chiết, thu được 9,7 g cao chiết giàu lutein este, với hàm lượng 185,4 mg lutein/g cao chiết, ứng với hiệu suất làm giàu lutein este đạt 96,9 %, là mức giá trị khá cao. Do đó, không cần thiết phải tiếp tục khảo sát thực nghiệm chiết 3 lần. Vậy, cao chiết được làm giàu với 2 lần chiết lỏng - lỏng.

3.2.3.3. Làm giàu lutein este bằng dung môi etyl axetat

Tương tự như với dung môi *n*-hexan, quá trình làm giàu cao chiết với dung môi etyl axetat cũng được nghiên cứu. Kết quả, để làm giàu 20 g cao chiết CVT cần 300 ml etyl axetat, thời gian chiết 10 phút, nhiệt độ chiết tại 60 °C, sau 5 lần chiết hiệu suất làm giàu cao chiết đạt 88,9 %.

3.2.3.4. Lựa chọn dung môi chiết và đánh giá tính ổn định của quá trình làm giàu cao chiết

Kết quả làm giàu cao chiết chứa lutein este cho thấy chiết bằng *n*-hexan hiệu quả hơn so với chiết bằng etyl axetat. Điều này có thể giải thích là do khả năng phân lớp giữa EtOH/H₂O với *n*-hexan tốt hơn so với etyl axetat và khi nhiệt độ chiết cao, etyl axetat bị tan một phần vào EtOH /nước. Vì vậy, *n*-hexan được sử dụng làm dung môi chiết lỏng–lỏng trong quá trình làm giàu cao chiết. Theo đó, cao chiết được hòa tan trong dung môi EtOH/H₂O (7/3, v/v); tỷ lệ cao chiết/dung môi EtOH/H₂O/dung môi *n*-hexan = 1/10/15 (g/mL/mL); thời gian chiết 10 phút/lần; chiết 2 lần; nhiệt độ chiết 60 °C.

Kết quả đánh giá độ ổn định của quá trình làm giàu cao chiết được trình bày ở bảng 3.22.

Bảng 3.22. Kết quả đánh giá độ ổn định của phương pháp làm giàu cao chiết

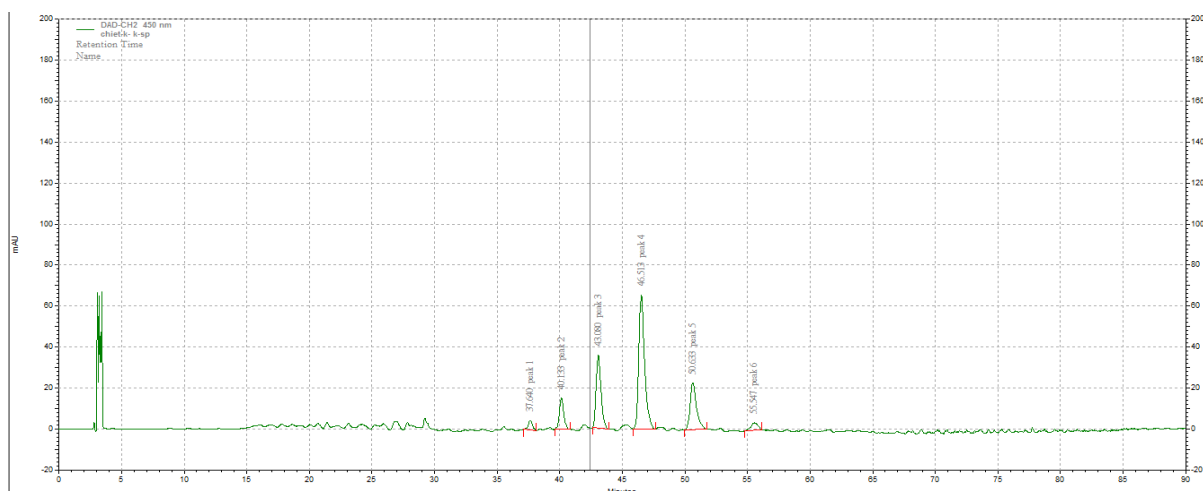
| Khối lượng cao chiết trước khi làm giàu, kg | Cao chiết sau khi làm giàu | | |
|---|----------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| | Khối lượng, kg | Hàm lượng lutein, mg/g cao chiết | Hiệu suất làm giàu, % |
| 0,1 | 0,047 | 185,0 | 96,5 |
| 0,5 | 0,236 | 183,6 | 96,2 |
| 1,8 | 0,853 | 181,2 | 95,4 |

(Điều kiện: cao chiết trước khi làm giàu lutein tổng 90,08 mg/g)

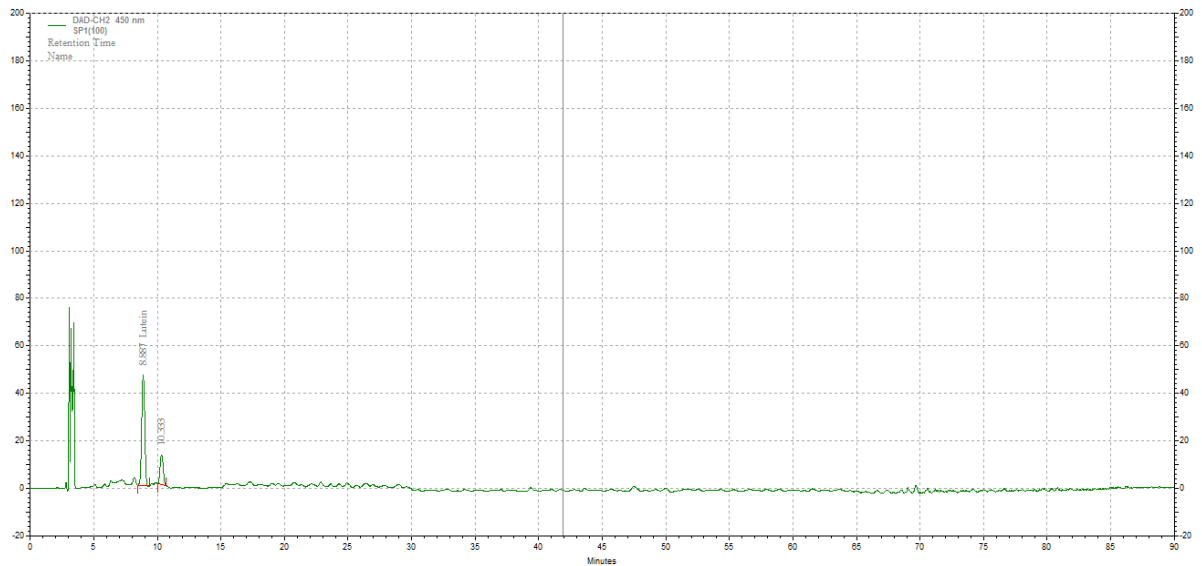
Kết quả cho thấy, khối lượng cao chiết cần làm giàu lutein este tăng dần nhưng cao chiết thu được sau làm giàu đều có hàm lượng lutein tổng lớn, ứng với hiệu suất làm giàu cao chiết đạt $\geq 95,4\%$, là mức giá trị khá cao khi khối lượng cao chiết làm giàu cho 1 lần thí nghiệm tăng từ 20 g lên 1,8 kg. Vì vậy, làm giàu cao chiết bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng với dung môi EtOH/H₂O và *n*-hexan có độ ổn định tốt, hiệu suất thu hồi cao. Kết quả đạt được cao hơn kết quả của Kuman [100] và Peter [88], điều này có thể giải thích là do chiết lỏng-lỏng với hai pha dung môi EtOH/H₂O và *n*-hexan thu hồi lutein este tốt hơn hơn so với Kuman chỉ sử dụng EtOH và Peter sử dụng EtOH và H₂O.

3.2.4. Thủy phân cao chiết giàu lutein este

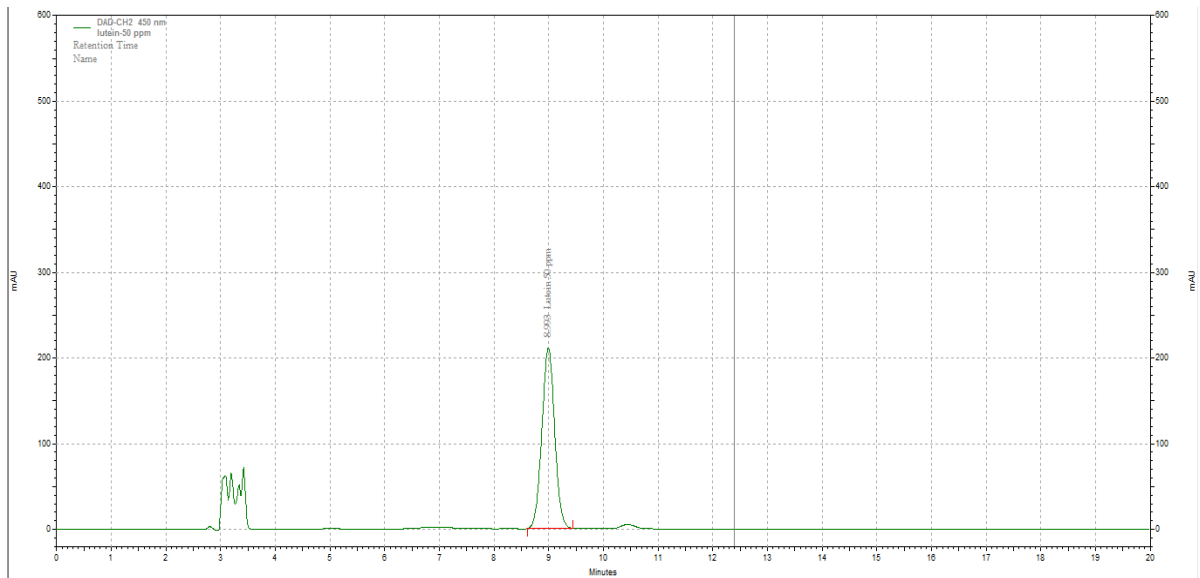
Kết quả HPLC quá trình thủy phân cao chiết giàu lutein bằng KOH trong etanol được thể hiện ở hình 3.15, 3.16, 3.17 và 3.18.



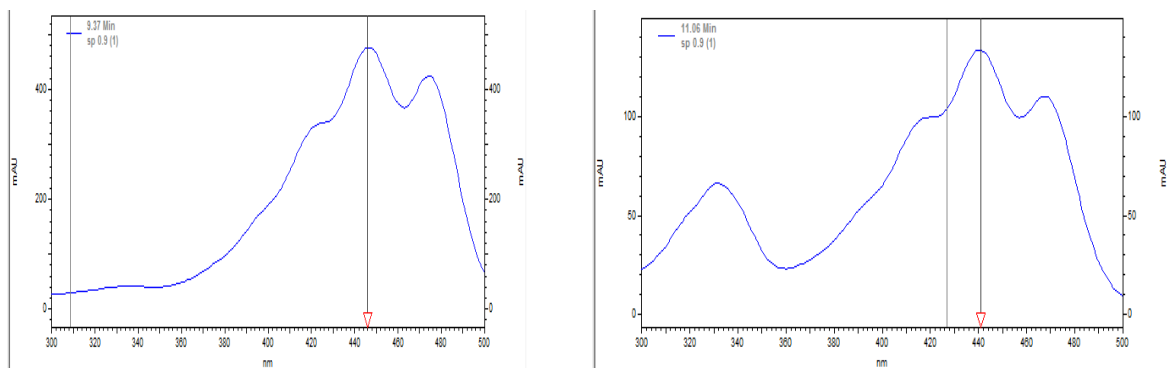
Hình 3.15. Sắc ký đồ HPLC của cao chiết chưa thủy phân (lutein este)



Hình 3.16. Sắc ký đồ HPLC của cao chiết sau khi thủy phân



Hình 3.17. Sắc ký đồ lutein đối chứng



trans-lutein: $\lambda_{\max} = 424; 446; 474$ (nm) *cis*-lutein: $\lambda_{\max} = 328; 418; 442; 468$ nm

Hình 3.18. Sắc ký đồ UV-Vis lutein

(Điều kiện: tỷ lệ KOH/cao chiết 0,18 w/w; nồng độ cao chiết 0,8 g/mL; 70 °C; 80 phút)

Hình 3.15 chỉ ra rằng cao chiết từ mẫu hoa CVT nghiên cứu là hỗn hợp chứa chủ yếu các este khác nhau của lutein, lutein tự do không phát hiện được.

Hình 3.16, 3.17. và 3.18 chỉ ra rằng ở thời gian lưu khoảng 8,9 phút có sự xuất hiện đồng phân *trans*- lutein và thời gian lưu khoảng 10,3 phút có sự xuất hiện của đồng phân *cis*-lutein.

Các sắc ký đồ HPLC cho thấy không phát hiện được peak của zeaxanthin. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hoàng Thị Huệ An [138, 139], cụ thể, cột PR 18 không có khả năng phân giải cặp đồng phân lutein/zeaxanthin. Vì vậy, hiệu suất quá trình thủy phân được đánh giá qua hàm lượng lutein tự do thu được.

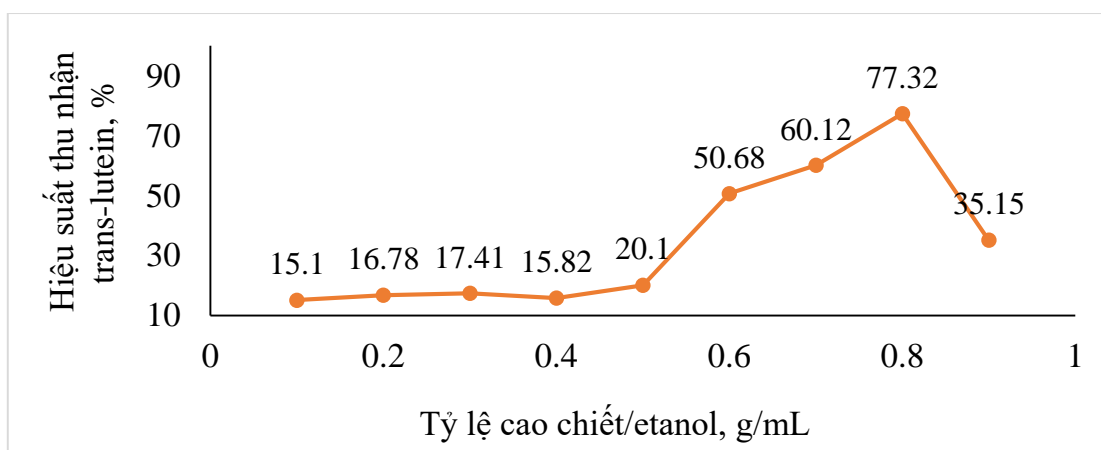
3.2.4.1. Nghiên cứu tỷ lệ cao chiết/etanol

Kết quả nghiên cứu xác định tỷ lệ cao chiết/tác nhân thủy phân được trình bày trong bảng 3.23, hình 3.19.

Bảng 3.23. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của tỷ lệ cao chiết/etanol đến hiệu suất thủy phân

| Tỷ lệ cao chiết (g/mL) | KOH/cao chiết (w/w) | Hiệu suất thu nhận <i>trans</i> -lutein (%) |
|------------------------|---------------------|---|
| 0,1 | 1,50 | 15,10 |
| 0,2 | 0,75 | 16,78 |
| 0,3 | 0,50 | 17,41 |
| 0,4 | 0,38 | 15,82 |
| 0,5 | 0,30 | 20,10 |
| 0,6 | 0,25 | 50,68 |
| 0,7 | 0,25 | 45,16 |
| | 0,20 | 60,12 |
| 0,8 | 0,20 | 62, 71 |
| | 0,19 | 67,30 |
| | 0,18 | 77,32 |
| 0,9 | 0,17 | 35,15 |

(Điều kiện: 10 g cao chiết; 70 °C; 80 phút)



Hình 3.19. Ảnh hưởng của tỷ lệ cao chiết/etanol đến hiệu suất thủy phân

Kết quả cho thấy, khi tỷ lệ cao chiết/etanol thấp (0,1–0,5 g/mL), ứng với tỷ lệ KOH/cao chiết lớn (1,5 – 0,3 lần), hiệu suất chuyển hóa lutein este thành lutein tự do (dạng *trans*, *cis*- hay tổng số) đều rất thấp. Điều này có thể giải thích là do sự phân hủy lutein tự do khi lượng kiềm dư khá lớn.

Hiệu suất thủy phân tăng lên khi tăng tỷ lệ cao chiết/etanol và đạt cực đại ở tỷ lệ 0,8 g/mL (ứng với tỷ lệ KOH/cao chiết là 0,19), nhưng sau đó lại giảm mạnh. Quá trình thực nghiệm cho thấy khi tỷ lệ cao chiết quá lớn (> 0,8 g/mL), hỗn hợp phản ứng rất đặc, khó khuấy trộn dù được đun nóng đến 70 °C. Điều này được giải thích là do khả năng tiếp xúc của các chất trong hỗn hợp phản ứng giảm.

Vì lí do trên, tỷ lệ cao chiết/etanol là 0,8 g/mL được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.4.2. Nghiên cứu nồng độ KOH trong quá trình thủy phân cao chiết

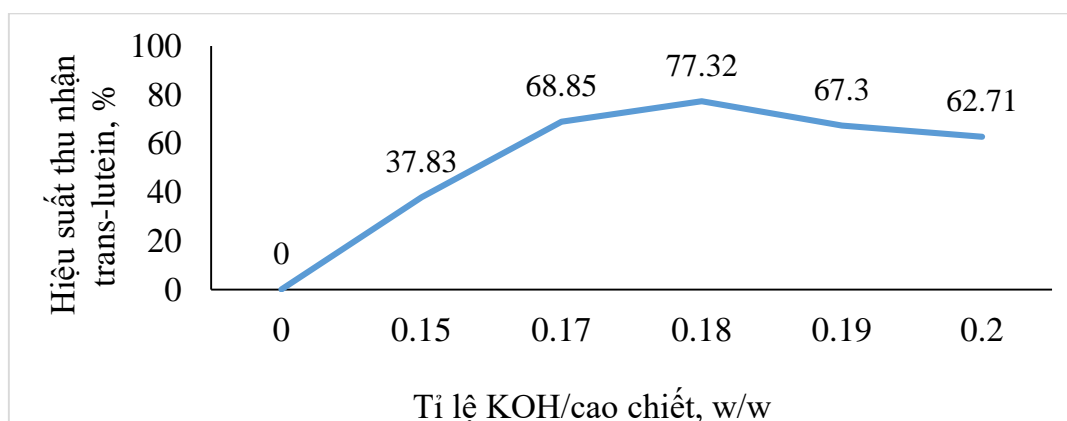
Kết quả nghiên cứu thủy phân cao chiết thông qua khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ KOH/cao chiết được trình bày trong bảng 3.24 và hình 3.20.

Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất phản ứng thủy phân lutein este tăng mạnh khi tỷ lệ KOH/cao chiết tăng từ 0,00 – 0,144 g/mL nhưng lại giảm dần khi tỷ lệ KOH/cao chiết tiếp tục tăng lên. Điều này được giải thích là do sự phân hủy lutein trong môi trường kiềm dư. Sự suy giảm hiệu suất thủy phân lutein este trong môi trường kiềm dư cũng được ghi nhận bởi Chitta Ranjan Sarkar [135] khi thủy phân lutein este bằng KOH trong metanol. Tỷ lệ KOH/cao chiết tối ưu khoảng 0,17-0,19 cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Swaminathan [87]. Vì lí do trên, tỷ lệ KOH/cao chiết là 0,18 w/w được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 3.24. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ KOH/cao chiết đến hiệu suất thủy phân cao chiết

| Lượng KOH | | Hiệu suất thu nhận trans-lutein (%) |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Tính theo KOH (g)/cao chiết (g) | Tương đương C_{KOH} (g/ml EtOH) | |
| 0,00 | 0,000 | 0,00 |
| 0,15 | 0,120 | 37,83 |
| 0,17 | 0,136 | 68,85 |
| 0,18 | 0,144 | 77,32 |
| 0,19 | 0,152 | 67,30 |
| 0,20 | 0,160 | 62,71 |

(Điều kiện: 10 g cao chiết; cao chiết/etanol, 0,8 g/mL; 70 °C; 80 phút)



Hình 3.20. Ảnh hưởng của tỷ lệ KOH/cao chiết đến hiệu suất thủy phân cao chiết

Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất phản ứng thủy phân lutein este tăng mạnh khi tỷ lệ KOH/cao chiết tăng từ 0,00 – 0,144 g/mL nhưng lại giảm dần khi tỷ lệ KOH/cao chiết tiếp tục tăng lên. Điều này được giải thích là do sự phân hủy lutein trong môi trường kiềm dư. Sự suy giảm hiệu suất thủy phân lutein este trong môi trường kiềm dư cũng được ghi nhận bởi Chitta Ranjan Sarkar [135] khi thủy phân lutein este bằng KOH trong metanol. Tỷ lệ KOH/cao chiết tối ưu khoảng 0,17-0,19 cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Swaminathan [87]. Vì lí do trên, tỷ lệ KOH/cao chiết là 0,18 w/w được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

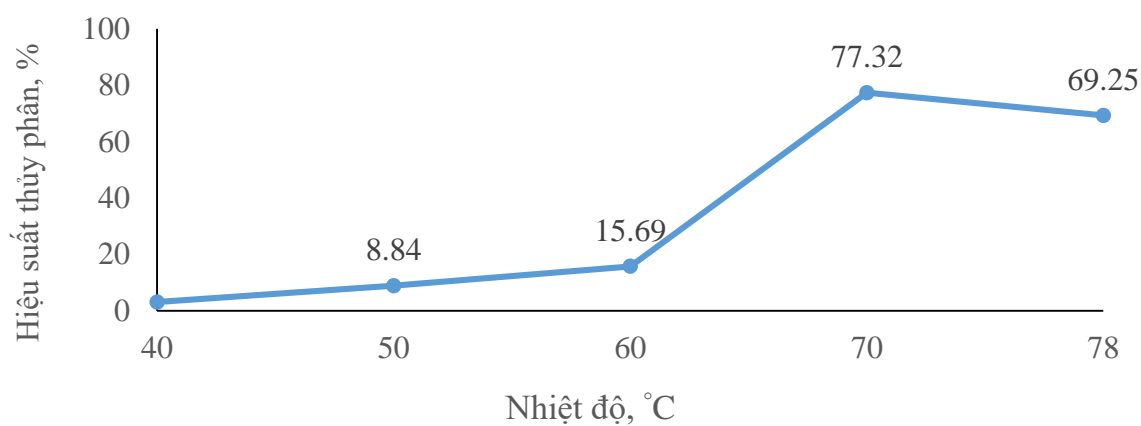
3.2.4.3. Nghiên cứu thời gian và nhiệt độ thủy phân

Kết quả khảo sát nhiệt độ thủy phân cao chiết được trình bày trong bảng 3.25 và hình 3.21.

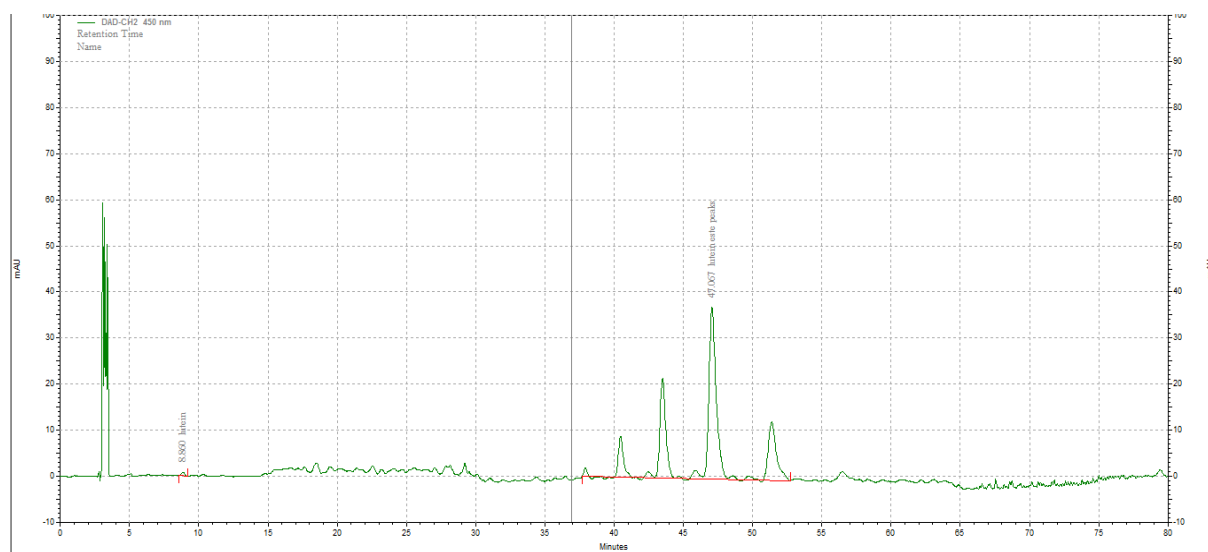
Bảng 3.25. Kết quả thủy phân cao chiết ở các nhiệt độ khác nhau

| Nhiệt độ (°C) | Hiệu suất thu nhận <i>trans</i> -lutein (%) |
|---------------|---|
| 40 | 3,04 |
| 50 | 8,84 |
| 60 | 15,69 |
| 70 | 77,32 |
| 78 | 69,25 |

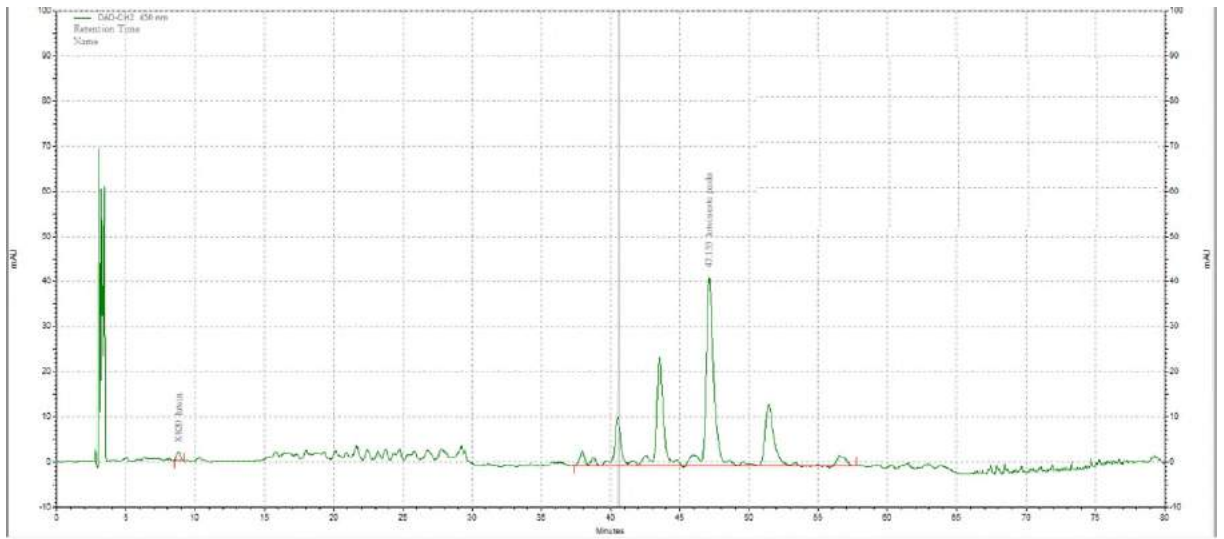
(Điều kiện: 10 g cao chiết; cao chiết/etanol, 0,8 g/mL; KOH/cao chiết, 0,18 w/w; 80 phút)



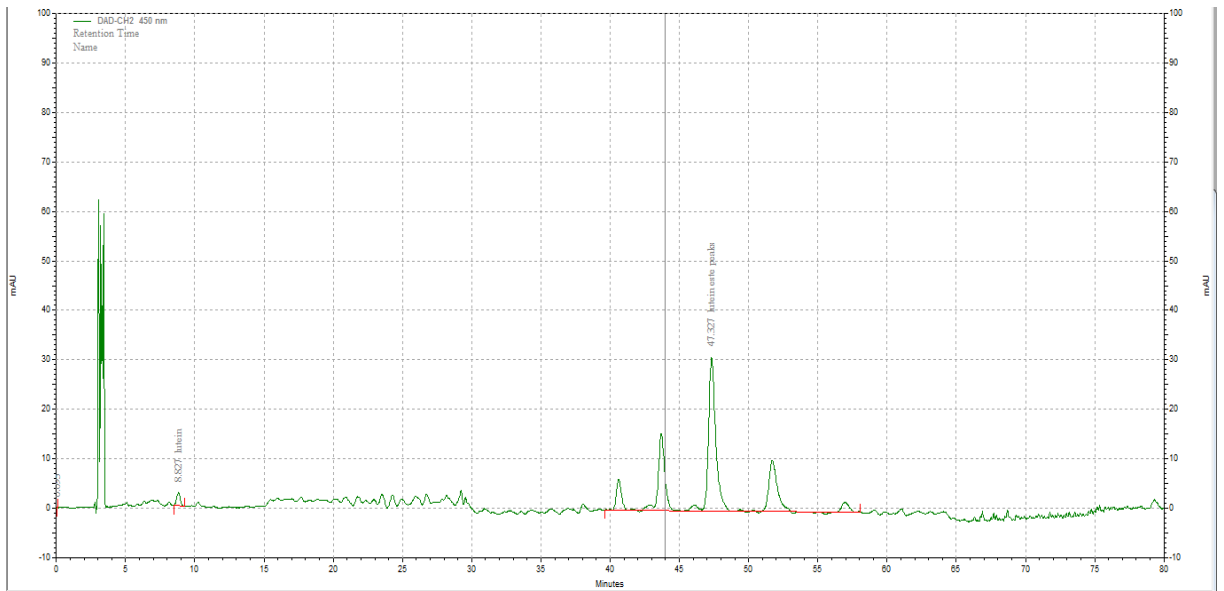
Hình 3.21. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới quá trình thủy phân cao chiết



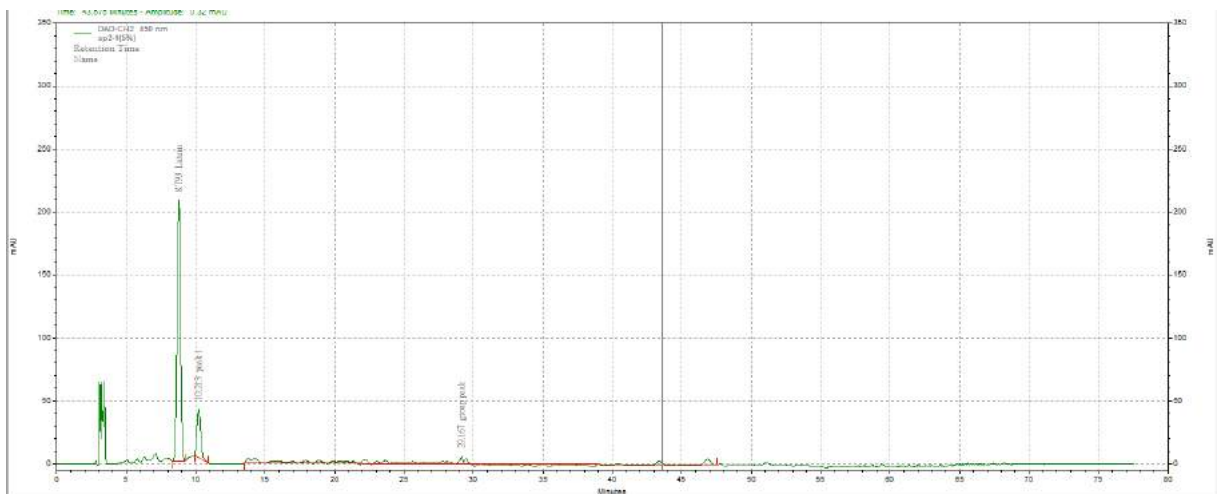
40 °C



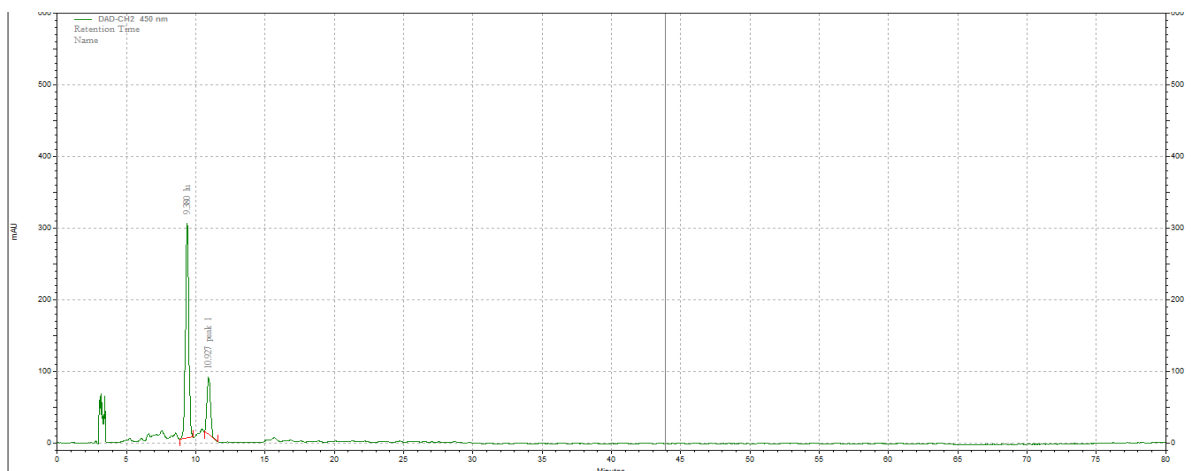
50 °C



60 °C



70 °C



78 °C

Hình 3.22. Sắc ký đồ HPLC của các mẫu cao chiết sau khi thủy phân ở các nhiệt độ khác nhau.

Kết quả cho thấy nhiệt độ ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thủy phân lutein este và chất lượng sản phẩm lutein este hình thành. Ở 40 °C hiệu suất thủy phân rất thấp (3,04 %), tại đó lượng lutein este chưa bị thủy phân lớn, lutein tự do hình thành không đáng kể (hình 3.22). Hiệu suất thủy phân tăng lên nhưng chậm (từ 3,04 % – 15,69 %) khi tăng nhiệt độ từ 40 lên 60 °C. Tiếp tục gia nhiệt từ 60 lên 70 °C thì hiệu suất phản ứng tăng rất mạnh nhưng sau đó giảm.

Quá trình thực nghiệm cũng cho thấy ở 40 °C cao chiết là một khối lỏng đặc sệt, rất khó khuấy trộn. Khi tăng nhiệt độ, cao chiết dần chảy lỏng, dễ khuấy hơn. Như vậy, hiệu suất thủy phân tăng khi tăng nhiệt độ có thể giải thích là do sự gia tăng khả năng tiếp xúc các tác chất (cao chiết và KOH) với nhau, tốc độ phản ứng tăng lên. Tuy nhiên, lutein este và lutein tự do đều là các chất kém bền với nhiệt nên khi nhiệt độ tăng cao, khó kiểm soát các phản ứng phụ, biến đổi chất xảy ra mạnh hơn làm giảm chất lượng sản phẩm.

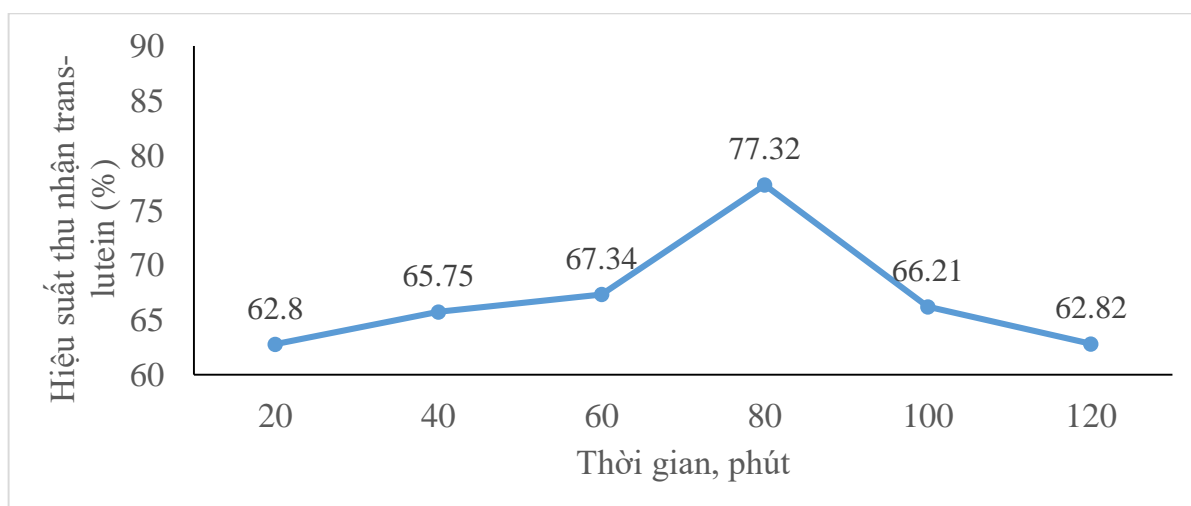
Vì lí do trên, quá trình thủy phân được tiến hành ở 70 °C.

Kết quả khảo sát thời gian thủy phân cao chiết được trình bày trong bảng 3.26 và hình 3.23, 3.24.

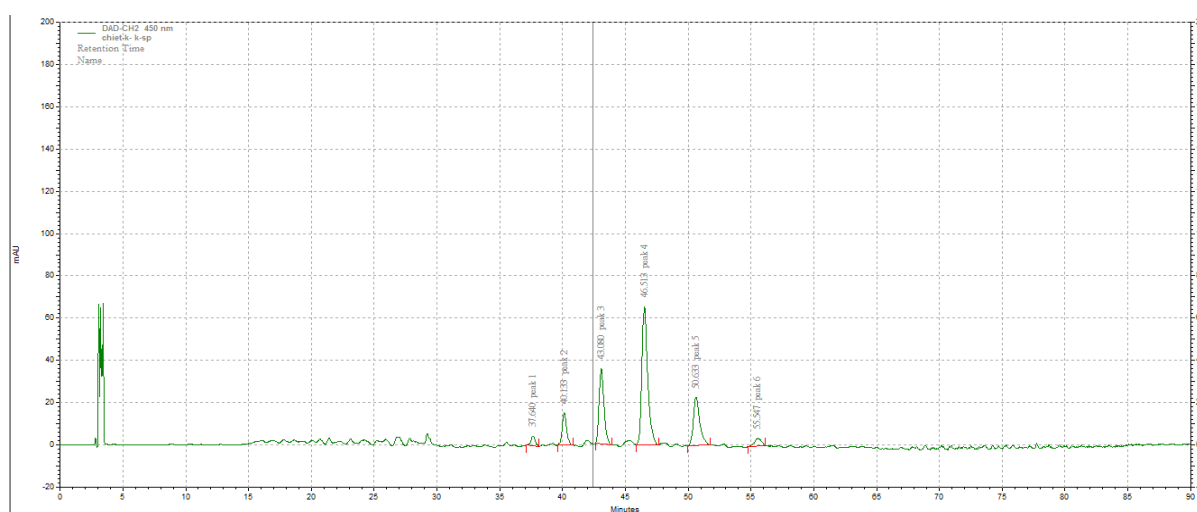
Bảng 3.26. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất thủy phân lutein este trong cao chiết

| Thời gian (phút) | Hiệu suất thu nhận <i>trans</i> -lutein (%) |
|------------------|---|
| 0 | 0,00 |
| 20 | 62,80 |
| 40 | 65,75 |
| 60 | 67,34 |
| 80 | 77,32 |
| 100 | 66,21 |
| 120 | 62,82 |

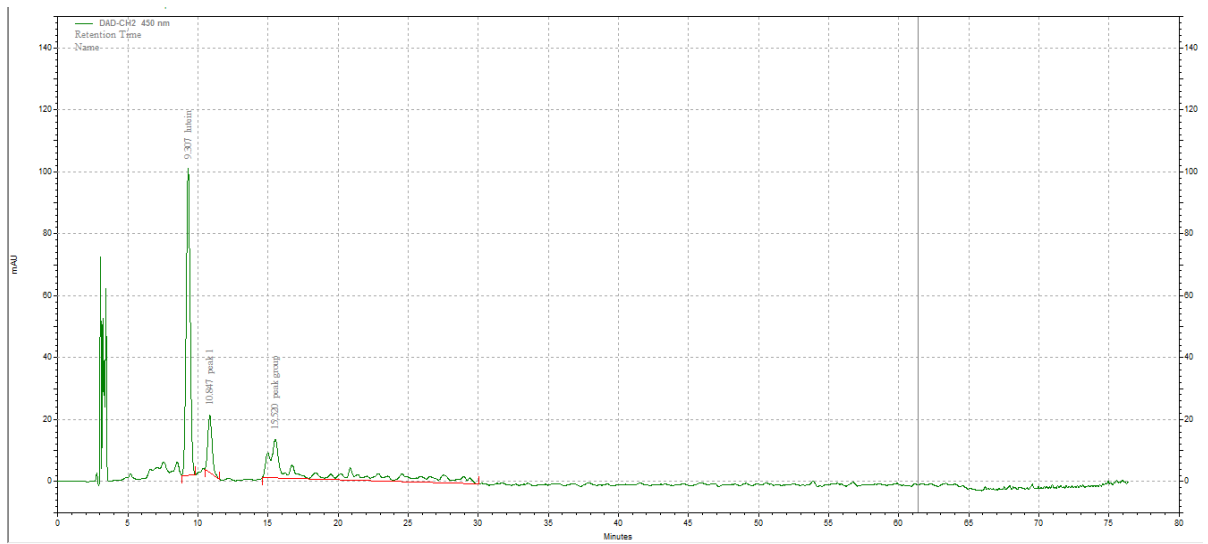
(Điều kiện: 10 g cao chiết; cao chiết/etanol, 0,8 g/mL; KOH/cao chiết, 0,18 w/w; 70 °C)



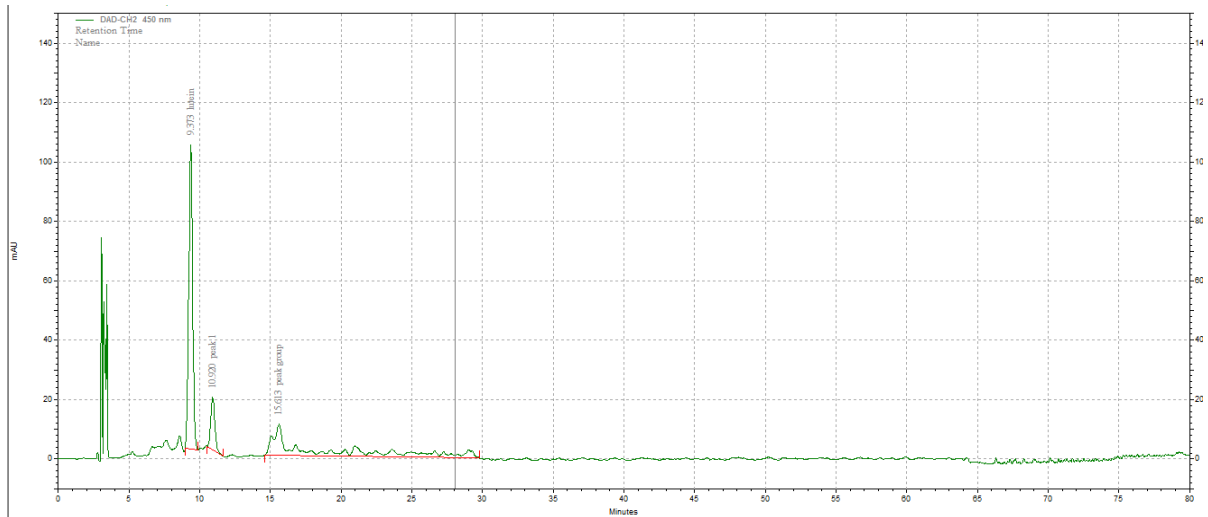
Hình 3.23. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất thủy phân lutein este trong cao chiết



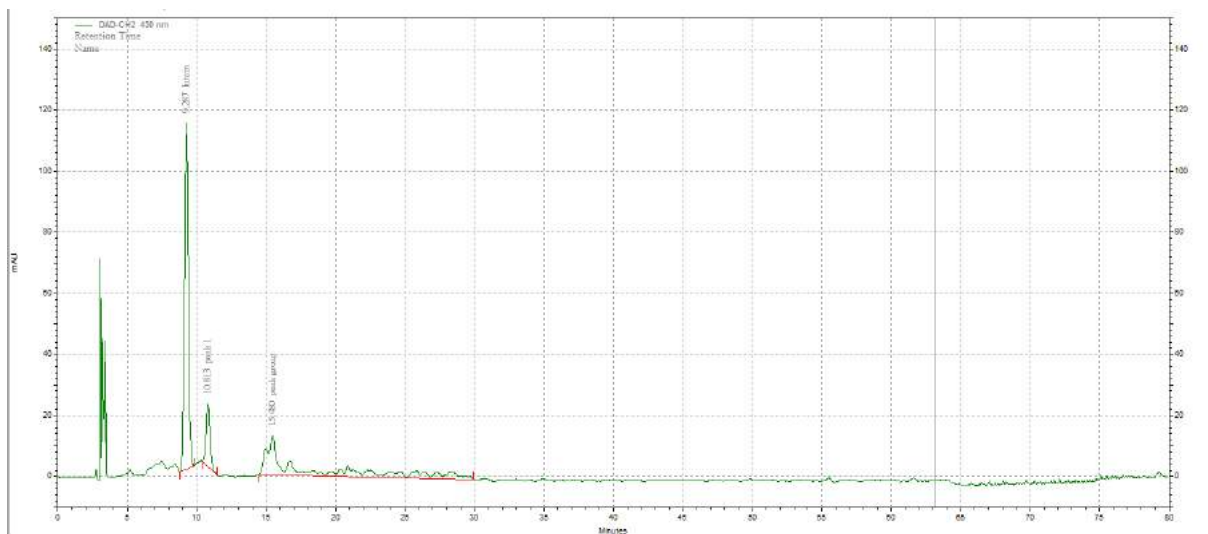
Mẫu chưa thủy phân



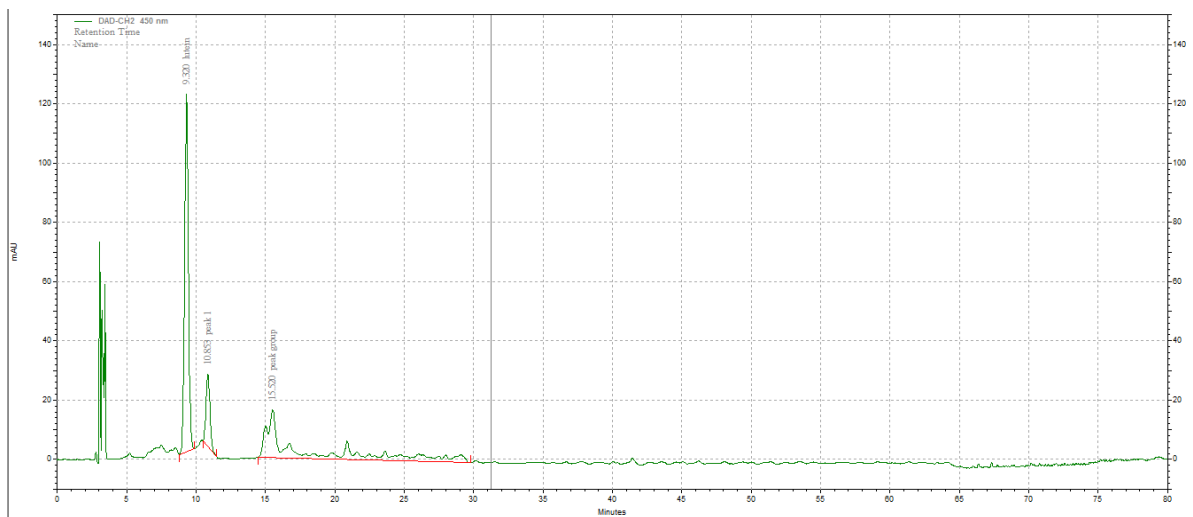
Mẫu thủy phân 20 phút



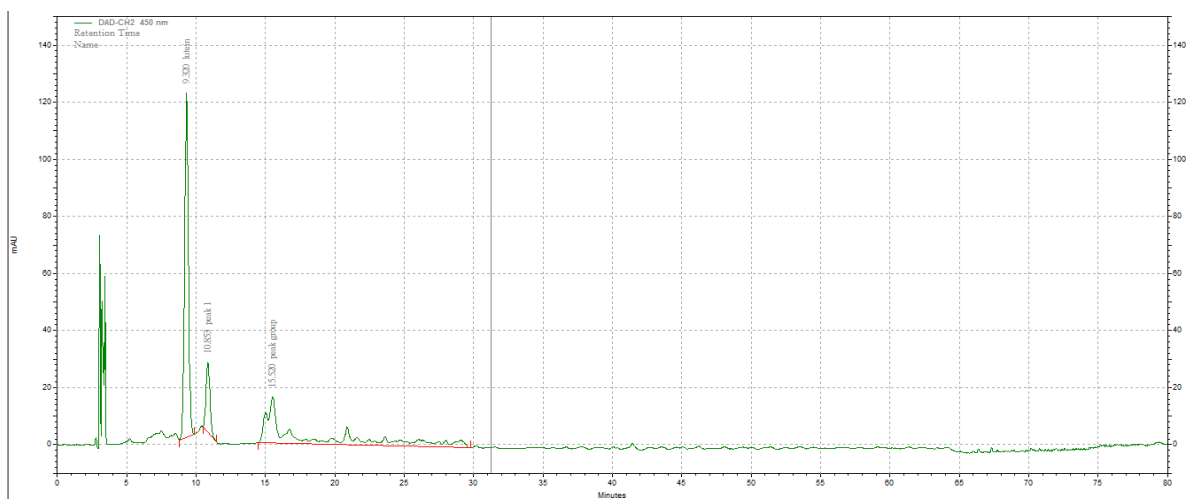
Mẫu thủy phân 40 phút



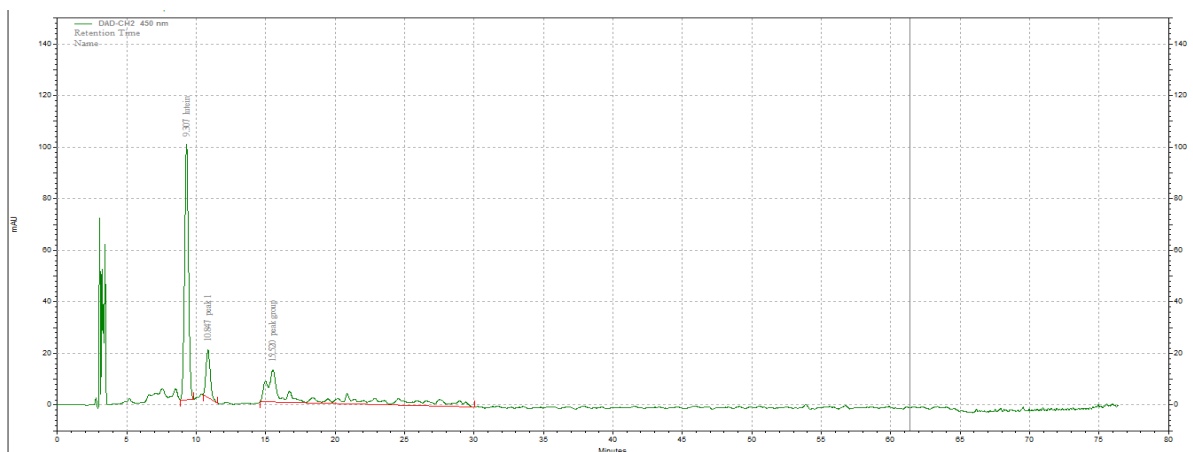
Mẫu thủy phân 60 phút



Mẫu thủy phân 80 phút



Mẫu thủy phân 100 phút



Mẫu thủy phân 120 phút

Hình 3.24. Sắc ký đồ HPLC của các mẫu cao chiết sau khi thủy phân ở các khoảng thời gian khác nhau

Kết quả cho thấy, 20 phút đầu tiên hiệu suất chuyển hóa lutein este thành lutein tự do ở các dạng đồng phân *trans*, *cis* và tổng số đều tăng rất mạnh. Sau 20 phút các peak lutein este hầu như biến mất; ngược lại xuất hiện các peak *trans*-lutein và *cis*-lutein.

Hiệu suất thu nhận lutein tự do dạng *trans* và lutein tổng tăng lên khi tăng thời gian thủy phân từ 20 - 80 phút nhưng giảm đi nếu kéo dài thời gian phản ứng trên 80 phút. Trong khi đó, hiệu suất hình thành dạng *cis*-lutein hầu như không thay đổi khi thời gian phản ứng tăng từ 20 – 120 phút. Điều này có thể giải thích là do ở 70 °C đồng phân *cis*-lutein tương đối bền, còn đồng phân *trans* kém bền hơn và sau 80 phút thủy phân đã xảy ra sự chuyển hóa từ đồng phân *trans* sang đồng phân *cis* hoặc các dạng sản phẩm phân hủy khác. Vậy, thời gian thích hợp nhất để thủy phân cao chiết từ hoa CVT là 80 phút. Thời gian phản ứng này dài hơn 50 phút so với thời gian đề nghị bởi Swaminathan [95]. Sự khác biệt này là do trong nghiên cứu của Swaminathan, phản ứng thủy phân được tiến hành ở nhiệt độ cao hơn (từ 70 - 80 °C). Khi tăng nhiệt độ phản ứng từ 70 lên 80 °C, hiệu suất thủy phân tăng (nhờ vậy rút ngắn thời gian phản ứng) nhưng sẽ làm tăng tỷ lệ đồng phân *cis*, do đó làm giảm hoạt tính sinh học của sản phẩm lutein thu nhận được.

3.2.4.4. Đánh giá tính ổn định của quá trình thủy phân cao chiết

Kết quả đánh giá tính ổn định của quá trình thủy phân cao chiết được trình bày trong bảng 3.27.

Bảng 3.27. Kết quả đánh giá các điều kiện tối ưu của quá trình thủy phân cao chiết

| m_{cao chiết} | Lutein tự do thu được trung bình | | |
|------------------------------|---|---------------------|--|
| | Khối lượng | Hàm lượng, % | Hiệu suất thu hồi, % |
| 100 g | 16,8 g | 83 | 82,94 (<i>trans</i> -lutein 69,20 %, <i>cis</i> -lutein 13,74 %) |
| 2 kg | 0,32 kg | 80 | 75 (<i>trans</i> -lutein 62,50 %, <i>cis</i> -lutein 12,5 %) |

(Điều kiện: tỷ lệ cao chiết/etanol, 0,8 g/mL; tỷ lệ KOH/cao chiết là 0,18 w/w; 70 °C; 80 phút)

Kết quả chỉ ra rằng với các điều kiện tối ưu, thủy phân 100 g cao chiết, thu được 16,8 g sản phẩm với hàm lượng lutein 83 %, ứng với hiệu suất thu hồi lutein đạt trung bình 82,94 %, còn tiến hành thủy phân 2 kg cao chiết, hiệu suất thu hồi lutein đạt 75 %, là mức giá trị khá cao. Vậy, quá trình thủy phân cao chiết có độ ổn định tốt, hiệu suất thu hồi cao.

3.2.5. Tinh chế lutein

Lutein tự do luận án thu được sau quá trình thủy phân cao chiết (gọi là lutein thô) có độ tinh khiết chỉ đạt 80 % - 83 %, do đó cần phải tiến hành kết tinh lại để tăng độ tinh khiết của lutein.

3.2.5.1. Lựa chọn dung môi và phương pháp tinh chế

Kết quả lựa chọn dung môi thông qua độ hòa tan của lutein thô được trình bày trong bảng 3.28.

Bảng 3.28. Kết quả khảo sát độ hòa tan của lutein trong dung môi

| Dung môi | Điều kiện | Hiện tượng | Nhận xét |
|--------------------------|-----------------|------------------|-----------|
| MeOH | Nhiệt độ thường | Tan tốt | Đạt |
| Axeton | Gia nhiệt 50 °C | Tan tốt | Đạt |
| Etanol | Gia nhiệt 50 °C | Tan tốt | Đạt |
| Etyl axetat | Nhiệt độ thường | Tan khá, chậm | Không đạt |
| <i>n</i> -hexan | Gia nhiệt 50 °C | Tan một phần | Không đạt |
| THF | Nhiệt độ thường | Tan tốt và nhanh | Đạt |
| MeOH/H ₂ O | Gia nhiệt 50 °C | Tan một phần | Đạt |
| Axeton/ H ₂ O | Gia nhiệt 50 °C | Tan tốt | Đạt |
| THF/H ₂ O | Nhiệt độ thường | Tan tốt | Đạt |
| Etanol/H ₂ O | Gia nhiệt 50 °C | Tan khá tốt | Đạt |

Như vậy độ tan của lutein thô trong các dung môi tăng dần theo dãy sau:

n-hexan < etyl axetat < MeOH/H₂O < etanol/H₂O < axeton/ H₂O < etanol < MeOH < axeton < THF/H₂O < THF.

Kết quả khảo sát các phương pháp kết tinh lại được trình bày trong bảng 3.29.

Kết quả khảo sát cho thấy, các dung môi tinh khiết đơn lẻ thể hiện khả năng hòa tan tốt lutein, nhưng lại khó khăn trong việc kết tinh lại, điều này là do lutein không có khả năng tạo mầm tinh thể khi dung môi bay hơi hoặc khi hạ nhiệt độ dung dịch. Vì vậy, phương pháp chúng tôi hướng đến là bên cạnh dung môi (DM1) hòa tan tốt lutein thô,

cần thêm dung môi (DM2) không hòa tan lutein nhưng hòa tan vô hạn hoặc hòa tan rất tốt DM1 vì khi đó lutein sẽ kết tủa trong DM1. Dung môi thứ 2 thích hợp nhất được lựa chọn là nước. Với phương pháp kết tinh lại này, không cần thiết phải hạ nhiệt độ dung dịch về nhiệt độ phòng.

Bảng 3.29. Kết quả lựa chọn phương pháp kết tinh khác nhau

| Hệ dung môi | Nhiệt độ | Điều kiện | Kết quả | Nhận xét |
|-------------------------|----------|--------------------|--------------------|-----------|
| MeOH | 50°C | Bay hơi dung môi | Không kết tinh | Không đạt |
| MeOH | 50°C | Hạ nhiệt độ về 0°C | Không kết tinh | Không đạt |
| Axeton | 50°C | Bay hơi dung môi | Không kết tinh | Không đạt |
| Axeton | 50°C | Hạ nhiệt độ về 0°C | Không kết tinh | Không đạt |
| Etanol | 50°C | Bay hơi dung môi | Không kết tinh | Không đạt |
| Etanol | 50°C | Hạ nhiệt độ về 0°C | Không kết tinh | Không đạt |
| THF | 50°C | Hạ nhiệt độ về 0°C | Không kết tinh | Không đạt |
| THF | 50°C | Bay hơi dung môi | Không kết tinh | Không đạt |
| MeOH/H ₂ O | 50°C | Hệ dung môi | Xuất hiện tinh thể | Đạt |
| Axeton/H ₂ O | 50°C | Hệ dung môi | Xuất hiện tinh thể | Đạt |
| THF/H ₂ O | 50°C | Hệ dung môi | Xuất hiện tinh thể | Đạt |
| Etanol/H ₂ O | 50°C | Hệ dung môi | Xuất hiện tinh thể | Đạt |

(Điều kiện: 50°C)

Kết quả thí nghiệm cho thấy, xét về khả năng kết tinh lại, các hệ dung môi MeOH/H₂O, axeton/H₂O, THF/H₂O, etanol/H₂O đều đạt, có thể lựa chọn làm hệ dung môi cho việc kết tinh lại. Tuy nhiên MeOH và THF là dung môi độc hại nên dung môi thích hợp là axeton/H₂O hoặc etanol/H₂O.

Kết quả khảo sát tỷ lệ từng dung môi trong hệ được trình bày trong bảng 3.30.

Kết quả cho thấy, lutein có khả năng hòa tan tốt và kết tinh lại được trong hệ dung môi axeton/nước = 9/1 hoặc etanol/nước = 1/1. Tuy nhiên, hệ dung môi axeton/nước = 9/1, lượng axeton sử dụng lớn và axeton cũng được công nhận là có độc

tính cấp tính và mãn tính thấp nếu bị uống hay hít vào. Hít ở nồng độ cao (khoảng 9200 ppm) có thể gây kích ứng ở cổ họng sau khoảng 5 phút. Hít ở nồng độ 1000 ppm sẽ gây kích ứng ở mắt và cổ họng sau 1 giờ. Vì lí do đó, hệ etanol/nước = 1/1, v/v được sử dụng để kết tinh lại lutein. Sự cạnh tranh vai trò của chất tan (lutein) trong hệ chứa nước và etanol đã tạo điều kiện cho tinh thể lutein tách ra nhanh chóng.

Bảng 3.30. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi đến quá trình kết tinh lại lutein

| Hệ dung môi | Tỷ lệ, v/v | Kết quả | Nhận xét |
|-------------|------------|------------------------------|-----------|
| Axeton/Nước | 100/0 | Không kết tinh | Không đạt |
| Axeton/Nước | 9/1 | Kết tinh | Đạt |
| Axeton/Nước | 8/2 | Khó hòa tan hoàn toàn lutein | Không đạt |
| Axeton/Nước | 7/3 | Khó hòa tan lutein | Không đạt |
| Axeton/Nước | 6/4 | Không hòa tan lutein | Không đạt |
| Axeton/Nước | 1/1 | Không hòa tan lutein | Không đạt |
| Etanol/nước | 1/1 | Kết tinh | Đạt |

(Điều kiện: 50 °C)

Kết quả khảo sát tỷ lệ hệ dung môi/lutein thô được trình bày trong bảng 3.31.

Bảng 3.31. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ hệ dung môi/ lutein thô đến quá trình kết tinh lại

| TT | Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, mL/g | Kết quả | Nhận Xét |
|----|----------------------------------|--|-----------|
| 1 | 100/1 | Lutein tan hoàn toàn tạo dung dịch bão hòa | Đạt |
| 2 | 90/1 | Lutein tan hoàn toàn tạo dung dịch bão hòa | Đạt |
| 3 | 80/1 | Hòa tan chưa hết | Không đạt |
| 4 | 70/1 | Hòa tan chưa hết | Không đạt |
| 5 | 60/1 | Hòa tan chưa hết | Không đạt |

(Điều kiện: 50 °C; etanol/nước = 1/1)

Kết quả cho thấy nguyên liệu lutein thô tan tốt trong dung môi với tỷ lệ hệ dung môi/nguyên liệu từ 90/1 đến 100/1 (mL/g). Tỷ lệ dung môi/lutein sử dụng lớn hơn so với kết quả của Swaminathan [95]. Điều này được giải thích là do hệ etanol/nước được dùng để hòa tan lutein thô tạo dung dịch lutein bão hòa còn Swaminathan dùng nước (nước/lutein: 8/1, mL/g) và etanol (etanol/lutein: 3/1, mL/g) để loại tạp chất tan trong nước và etanol, thu lấy phần lutein tinh thể không tan, dẫn đến hiệu suất thu hồi lutein theo Swaminathan chưa cao.

Tỷ lệ hệ dung môi/nguyên liệu từ 90/1 đến 100/1 (mL/g) thấp hơn rất nhiều so với kết quả mà R. Kumar công bố (1,135 gam lutein 89 % hòa tan trong 760 ml etanol ở nhiệt độ môi trường, 25-30 °C) [104]. Điều này được giải thích là do nhiệt độ hòa tan lutein thô tạo dung dịch bão hòa cao (50 °C), độ tan lutein lớn, tương ứng với lượng dung môi etanol/nước sử dụng ít. Vậy, tỷ lệ hệ dung môi/nguyên liệu là 90/1 đến 100/1 (mL/g) được lựa chọn để kết tinh lại lutein.

3.2.5.2. Đánh giá tính ổn định của quá trình kết tinh lại lutein

Kết quả kết tinh lại 5 mẫu lutein thô (độ tinh khiết 83 %) được trình bày trong bảng 3. 32.

Bảng 3.32. Kết quả kết tinh lại lutein trong điều kiện tối ưu

| Mẫu | Khối lượng lutein thô (g) | Khối lượng tinh thể thu được sau tinh chế (g) | Độ tinh khiết (%) | Hiệu suất (%) |
|-------------------|---------------------------|---|-------------------|---------------|
| M1 | 0,5 | 0,326 | 96,1 | 75,5 |
| M2 | 0,5 | 0,336 | 95,3 | 77,2 |
| M3 | 0,5 | 0,338 | 95,2 | 77,5 |
| M4 | 0,5 | 0,323 | 97,1 | 75,6 |
| M5 | 0,5 | 0,328 | 96,3 | 76,1 |
| Trung bình | 0,5 | 0,330 | 96,0 | 76,3 |

(Điều kiện: 50 °C; etanol/nước = 1/1, v/v; hệ dung môi/lutein thô = 90/1, mL/g)

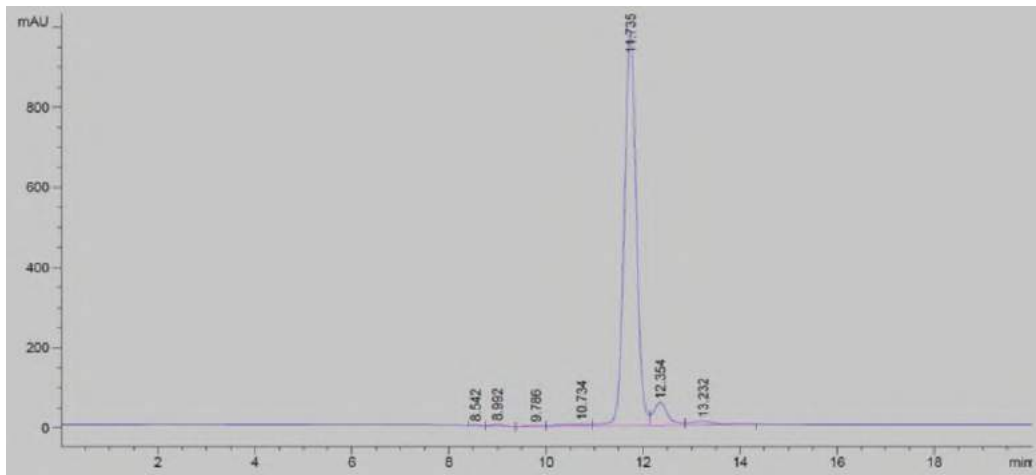
Quá trình thực nghiệm cho thấy, lượng tinh thể lutein thu được nhiều hơn bằng phương pháp lọc, ly tâm. Để tăng hiệu suất tinh chế, dịch lọc sau tinh chế được thu gom

lại, để lắng thu lấy kết tủa và chiết với 200 mL etyl axetat để thu hồi lutein. Lượng chất rắn thu được sau cô quay chân không được tiến hành tinh chế lần 2.

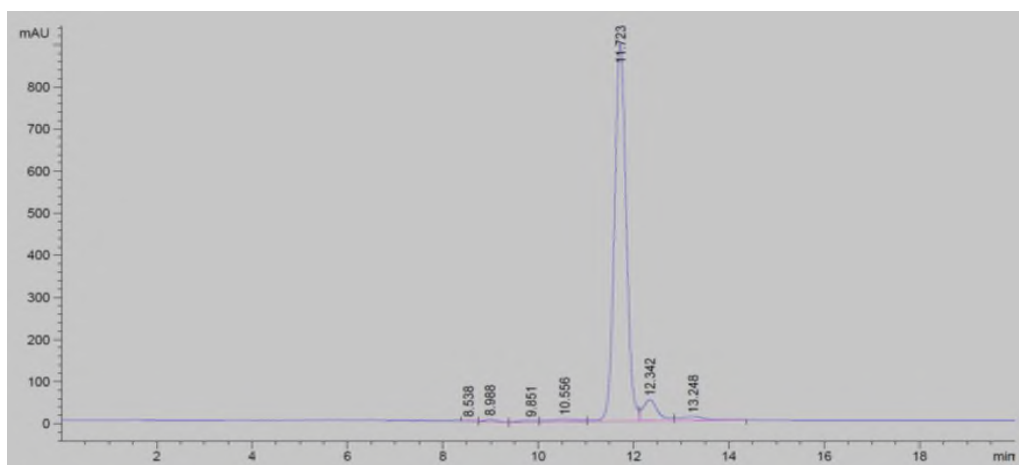


Hình 3.25. Dịch lọc các mẫu thu hồi sau lọc lần 1

Kết quả HPLC của một số mẫu tinh chế được trình bày ở hình 3.26.



Mẫu tinh thể lutein kết tinh lần 1 (M1-1)



Mẫu tinh thể lutein kết tinh hai lần (M1-tổng)

Hình 3.26. Sắc ký đồ HPLC của mẫu tinh thể lutein sau kết tinh

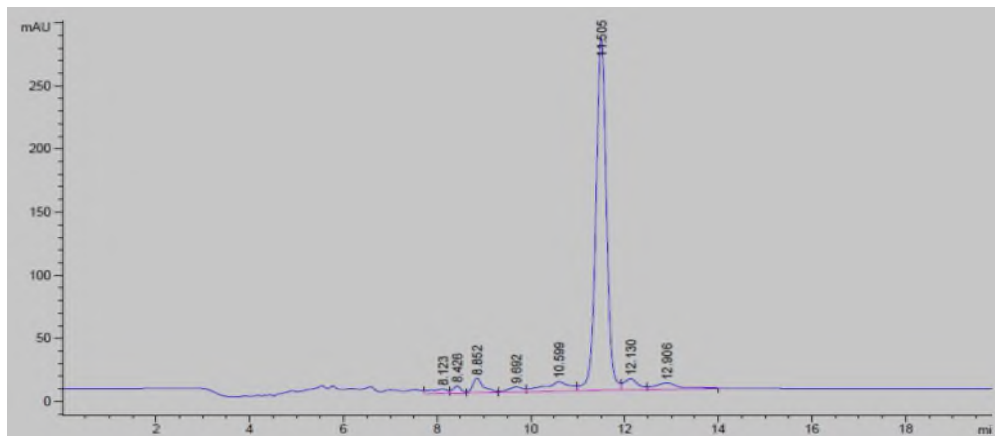
Kết quả, sau hai lần kết tinh lại, trung bình lượng tinh thể thu hồi được 0,392 g từ 0,5 g lutein thô, hàm lượng lutein tổng (độ tinh khiết) đạt trên 95,0 %, hiệu suất thu hồi đạt 90 % (bảng 3.33).

Bảng 3.33. Kết quả HPLC của mẫu M1-1 và M1-tổng

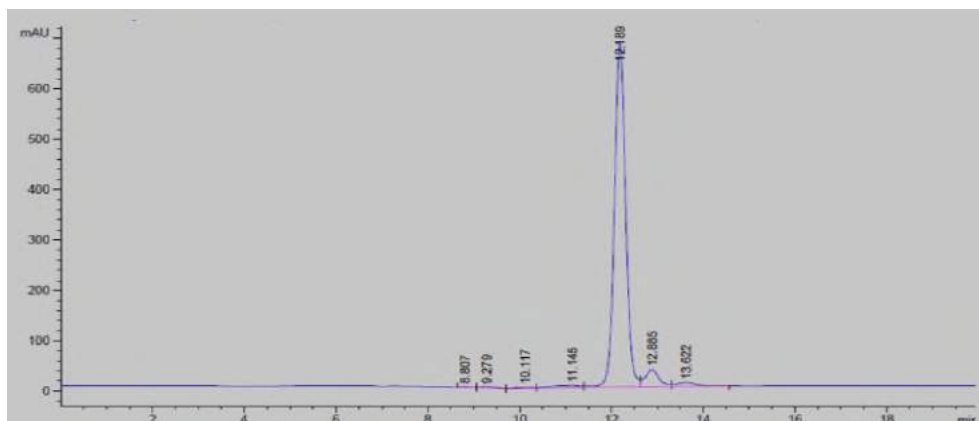
| Mẫu | Lutein, % | Zeaxanthin, % | Tổng lutein và zeaxanthin tinh thể, (%) |
|-----------|-----------|---------------|---|
| M1-1 | 88,9 | 7,1 | 96,0 |
| M1 - tổng | 88,0 | 7,2 | 95,2 |

(M1 - 1 kết tinh 1 lần, M1 - tổng gộp 2 lần kết tinh)

Kết quả phân tích HPLC của lutein sau khi kết tinh lại lượng lớn lutein thô (1,00 kg lutein thô, lặp lại thí nghiệm 3 lần) được trình bày ở hình 3.27 và 3.28. Theo đó, mỗi lần thí nghiệm thu được trung bình 786 g lutein có độ tinh khiết 93 %, ứng với hiệu suất thu hồi lutein đạt 88 %)



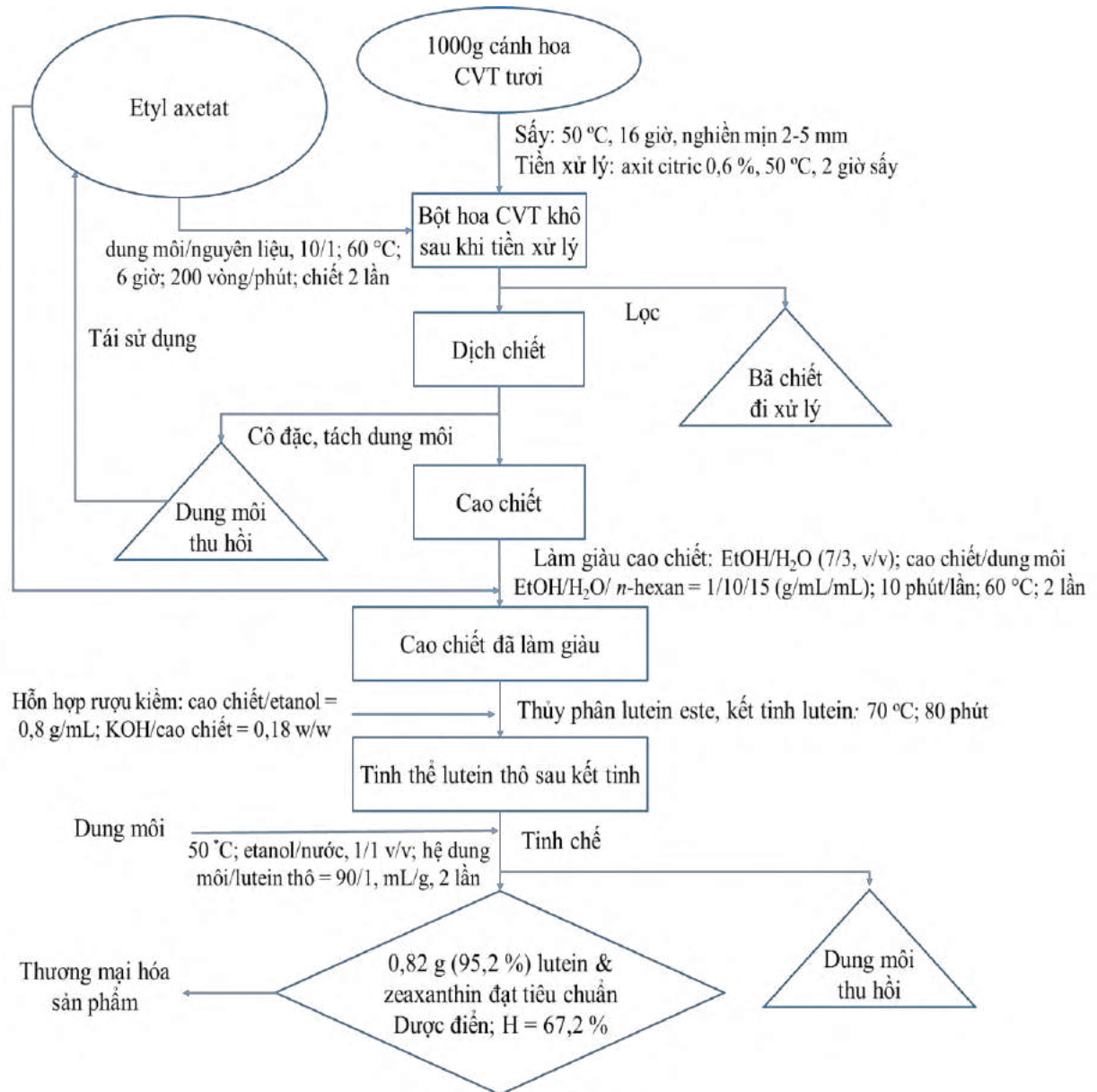
Hình 3.27. Sắc ký đồ HPLC sản phẩm lutein sau thủy phân



Hình 3.28. Kết quả HPLC sản phẩm lutein tinh chế

Quá trình tinh chế lutein thô có tính ổn định cao. Cụ thể, lutein được tinh chế với hệ dung môi etanol/nước, 1/1, v/v; tỷ lệ hệ dung môi/lutein thô là 100/1, mL/g; nhiệt độ dung môi kết tinh là 50 °C; tinh thể được lọc ly tâm. Dịch lọc được thu gom, chiết lỏng - lỏng với dung môi etyl axetat sau đó được tinh chế lần 2.

Vậy, quy trình hoàn thiện chiết tách và tinh chế lutein và zeaxanthin đạt tiêu chuẩn dược điển Mỹ từ cánh hoa cúc vạn thọ được trình bày ở hình 3.29.



Hình 3.29. Quy trình hoàn thiện chiết tách và tinh chế lutein và zeaxanthin đạt tiêu chuẩn dược điển Mỹ từ cánh hoa CVT.

Quy trình chiết tách và tinh chế lutein và zeaxanthin từ hoa Cúc vạn thọ (hình 3.29) đã được áp dụng để bào chế hỗn hợp lutein và zeaxanthin ở qui mô lớn. Cụ thể, từ

800 kg cánh hoa CVT tươi (sấy với quạt gió 100 kg CVT tươi/mẻ) và 960 kg bột hoa CVT khô tiến hành lần lượt các công đoạn: tiền xử lý (30 kg/mẻ), chiết với dung môi ethyl axetat (30 kg/mẻ), làm giàu cao chiết (1,8 – 2,0 kg/mẻ), thủy phân cao chiết sau khi làm giàu (2 kg/mẻ và 11 kg/mẻ), tinh chế lutein thô (0,1 kg/mẻ và 0,8 kg/mẻ) đã thu được 10 kg sản phẩm lutein và zeaxanthin. Hiệu suất các quá trình chiết lutein este, làm giàu cao chiết, thủy phân cao chiết, tinh chế lutein lần lượt là: 88,92 %; 95,4 %; 75 %; 88 %. Sản phẩm này đã được kiểm nghiệm độc lập tại Trung tâm kiểm nghiệm - Viện Thực phẩm chức năng. Theo đó, tổng hàm lượng lutein và zeaxanthin đạt 92,9 % với 85,85 % lutein và 7,05 % zeaxanthin [150]. Kết quả này cho biết, lutein sau khi tinh chế đáp ứng được tiêu chuẩn là nguồn nguyên liệu dược phẩm (dược điển Mỹ USP 40) [110].

3.2.6. Phân lập lutein và zeaxanthin làm chất chuẩn phân tích

Lutein và zeaxanthin là hỗn hợp đồng phân rất khó phân lập. Chưa có tài liệu nào công bố rõ ràng về việc tách riêng hai chất lutein và zeaxanthin làm chất chuẩn phân tích. Các công bố phân tích lutein, zeaxanthin [06, 29, 32, 88, 96, 97, 98, 103, 108, 110] cho thấy thời gian lưu của hai chất khá gần nhau.

3.2.6.1. Nghiên cứu phương pháp phân lập lutein và zeaxanthin

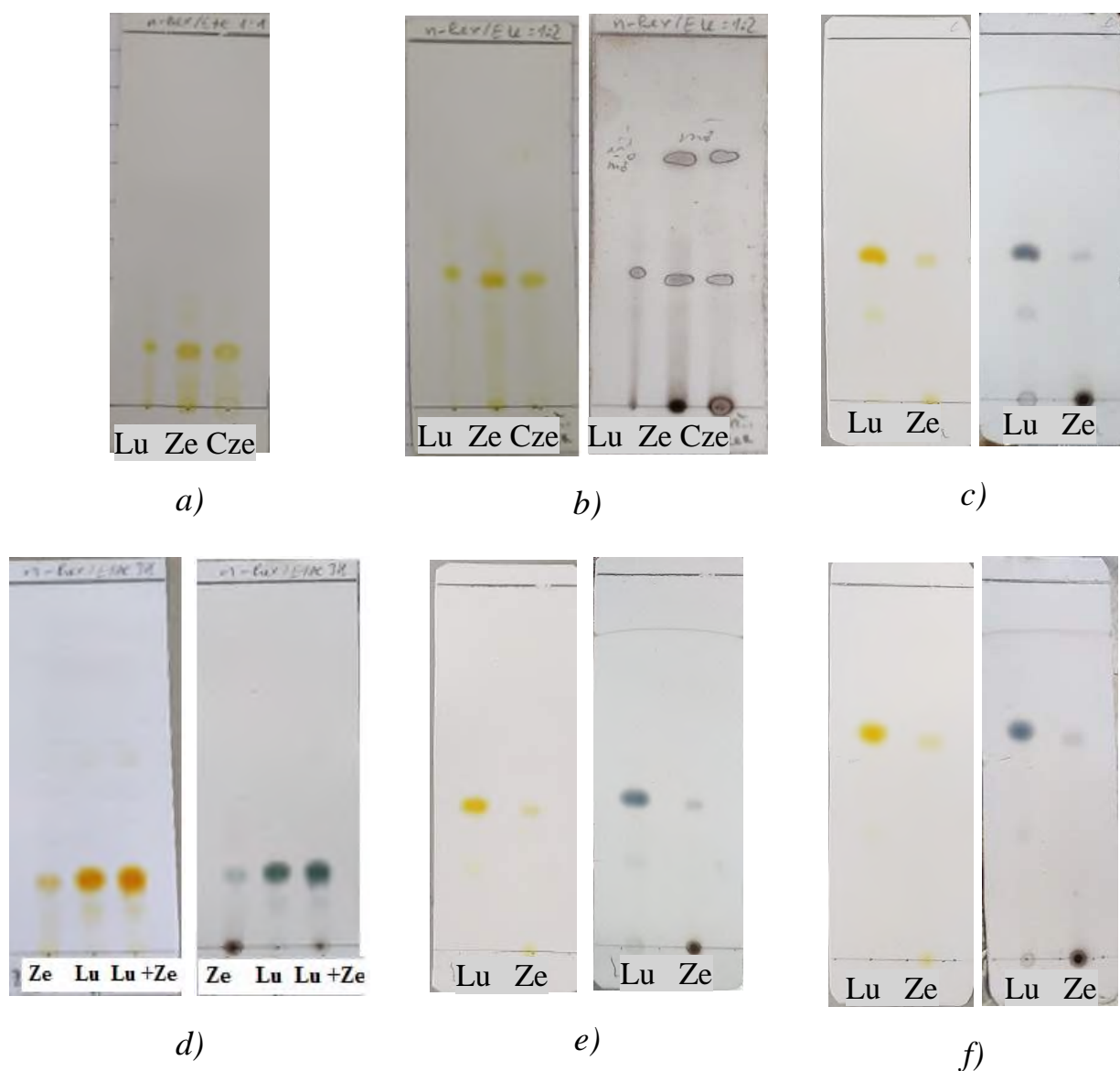
Các hệ dung môi định lượng lutein và zeaxanthin bằng phương pháp HPLC, UV-Vis [06, 29, 32, 88, 96, 97, 98, 103, 108, 110] được dùng để thăm dò lutein và zeaxanthin bằng sắc ký bản mỏng, kết quả thu được như sau (hình 3.30).

Các ký hiệu được sử dụng:

- Lu: mẫu giàu lutein
- Ze: mẫu giàu zeaxanthin
- CZe: cặn zeaxanthin sau khi hòa tan bằng dung môi rửa giải
- Lu+Ze: mẫu giàu lutein/giàu zeaxanthin tỷ lệ 4/1

Quá trình phân lập lutein và zeaxanthin (mục 2.2.7) được thiết lập dựa vào kết quả thu được từ sắc ký bản mỏng. Các điều kiện phân lập bao gồm:

- ✓ Sử dụng cột sắc ký silica gel pha thường
- ✓ Dung môi hòa tan: ethyl axetat ở nhiệt độ thường
- ✓ Dung môi rửa giải *n*-hexan/EtOAc/diethyl ete (40/10/20, v/v/v), thu được 25 phân đoạn.



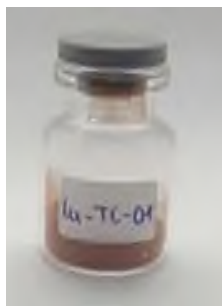
Hình 3.30. Kết quả sắc ký bản mỏng sử dụng các hệ dung môi khác nhau

- a) *n*-hexan/diethyl ete (1/2, v/v), trước và sau nhúng axit, đốt nóng
- b) *n*-hexan/etyl axetat/diethyl ete (40/5/25, v/v/v), trước và sau nhúng axit, đốt nóng
- c) *n*-hexan/etyl axetat (3/1, v/v), trước và sau nhúng axit, đốt nóng.
- d) *n*-hexan/etyl axetat/diethyl ete (4/1/2, v/v/v), trước và sau nhúng axit, đốt nóng.
- e) *n*-hexan/etyl axetat/diethyl ete (4/1/1, v/v/v), trước và sau nhúng axit, đốt nóng

Kết quả cho thấy từ 600 mg tinh thể sau tinh chế (hàm lượng lutein 90% và zeaxanthin 6%), thu được 380 mg mẫu giàu lutein ở các phân đoạn từ LZ5 đến LZ11 và 60 mg mẫu giàu zeaxanthin ở các phân đoạn LZ14 và LZ15.

3.2.6.2. Kết quả điều chế chất chuẩn lutein

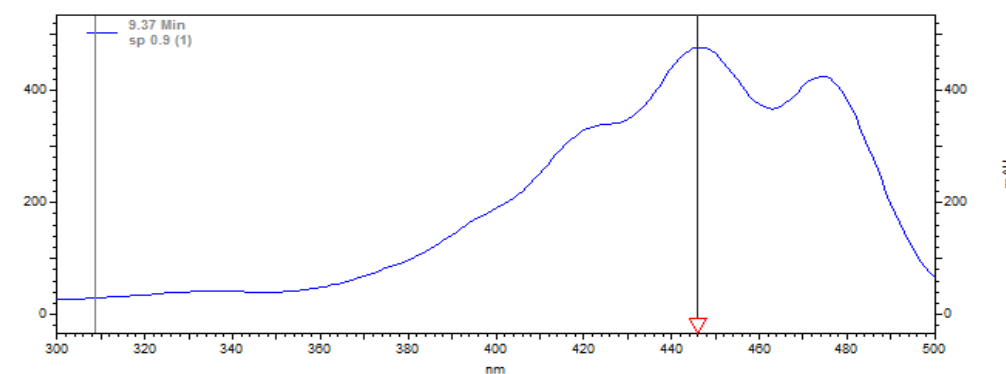
Hình ảnh chất chuẩn lutein đã điều chế được trình bày ở hình 3.31.



Hình 3.31. Hình ảnh chất chuẩn lutein đã điều chế (LuC)

Quan sát bằng mắt thường, chất chuẩn lutein phân lập được có dạng bột, màu nâu đỏ. Kết quả thực nghiệm cho thấy, màu của lutein có thể thay đổi từ vàng cam, đỏ cam và nâu đỏ, tùy thuộc vào độ tinh khiết. Độ tinh khiết của lutein càng cao thì màu của lutein càng đậm.

Kết quả đo UV-Vis của chất chuẩn lutein ở dải đo 200 nm đến 800 nm được trình bày ở hình 3.32. Kết quả cho thấy lutein có độ hấp thụ cao ở các bước sóng cực đại tại: $\lambda_{\max} = 424; 446; 474$ (nm). Trong đó cao nhất ở bước sóng 446 nm.



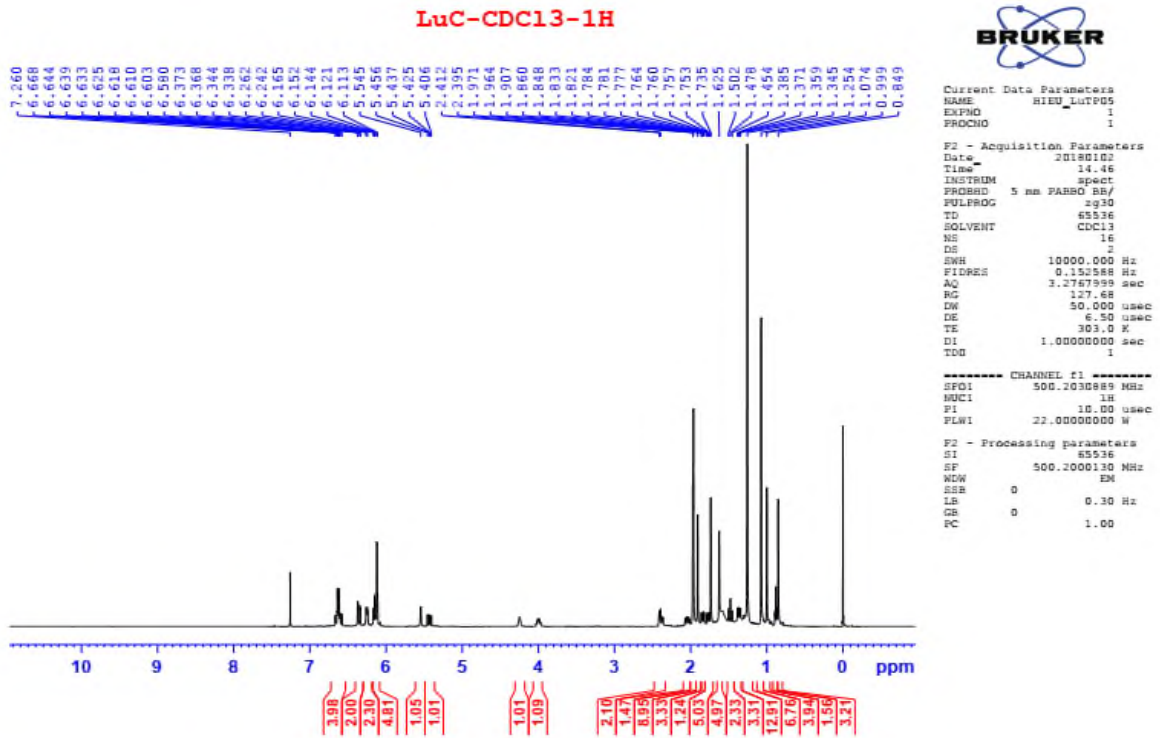
Hình 3.32. Sắc ký đồ UV-Vis của lutein

Hợp chất LuC - tinh thể lutein. $C_{40}H_{56}O_2$. $[M-H]^-$ 567 m/z . IR: 3200- 3500, 1730, 1614 và 1203 cm^{-1} .

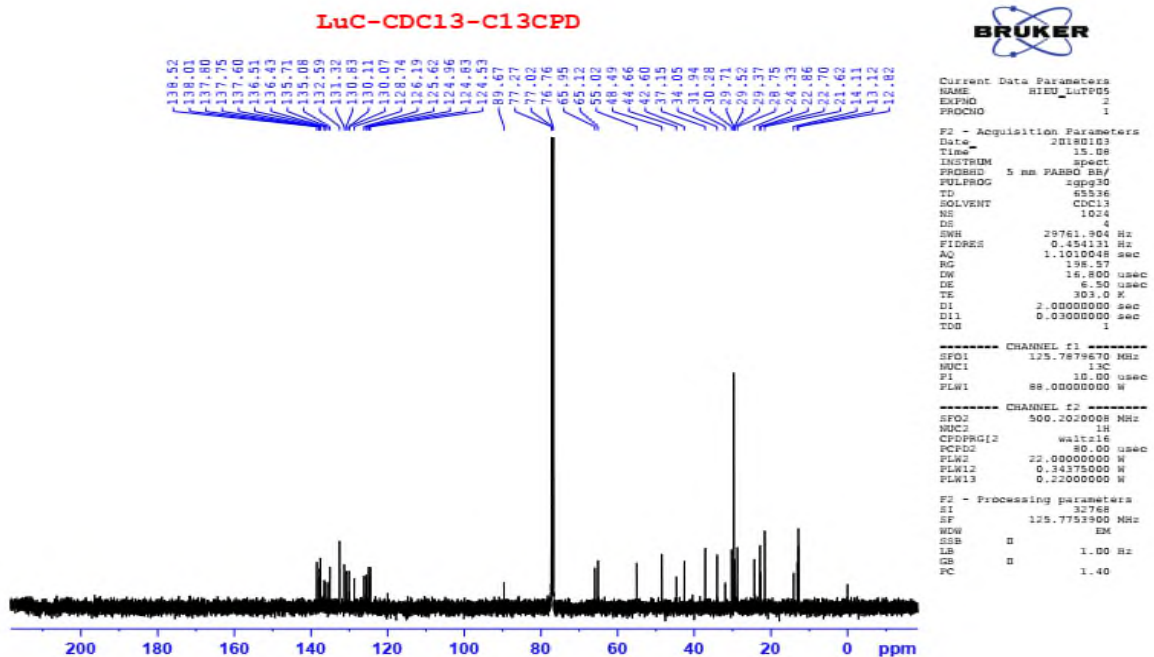
Cấu trúc của lutein sau phân lập đã được xác định chính xác dựa vào các phương pháp phổ một chiều và hai chiều trình bày ở hình 3.33, 3.34 và 3.35.

Trên phổ 1H -NMR xuất hiện tín hiệu của 15 proton olefinic có độ chuyển dịch hoá học δ_H nằm trong vùng từ 5,431 đến 6,656 ppm, cụ thể là các tín hiệu tại δ_H 5,431 (1 H), 5,545 (1 H), 6,121 (5 H), 6,252 (2 H), 6,338 (1 H), 6,3705 (1 H), 6,618 (4 H); 01 proton nhóm metin tại δ_H 2,403 (H-6). Về phía trường cao hơn, tín hiệu cộng hưởng của

proton 03 nhóm metylen tại δ_H 2,369 (H_a-4'), 2,045 (H_b-4'), 1,840 (H_a-2), 1,365 (H_b-2), 1,478 (H_a-2), 1,772 (H_b-2); tín hiệu cộng hưởng của proton 02 nhóm oximetin tại δ_H 4.00 (H-3'), 4.247 (H-3); tín hiệu cộng hưởng của proton 10 nhóm methyl có độ chuyển dịch hoá học nằm trong vùng từ 0,849 đến 1,971 ppm, cụ thể tại δ_H 1,971 (3H), 1,964 (6H), 1,907 (3H), 1,735 (3H), 1,625 (3H), 1,074 (6H), 0,999 (3H), 0,849 (3H).

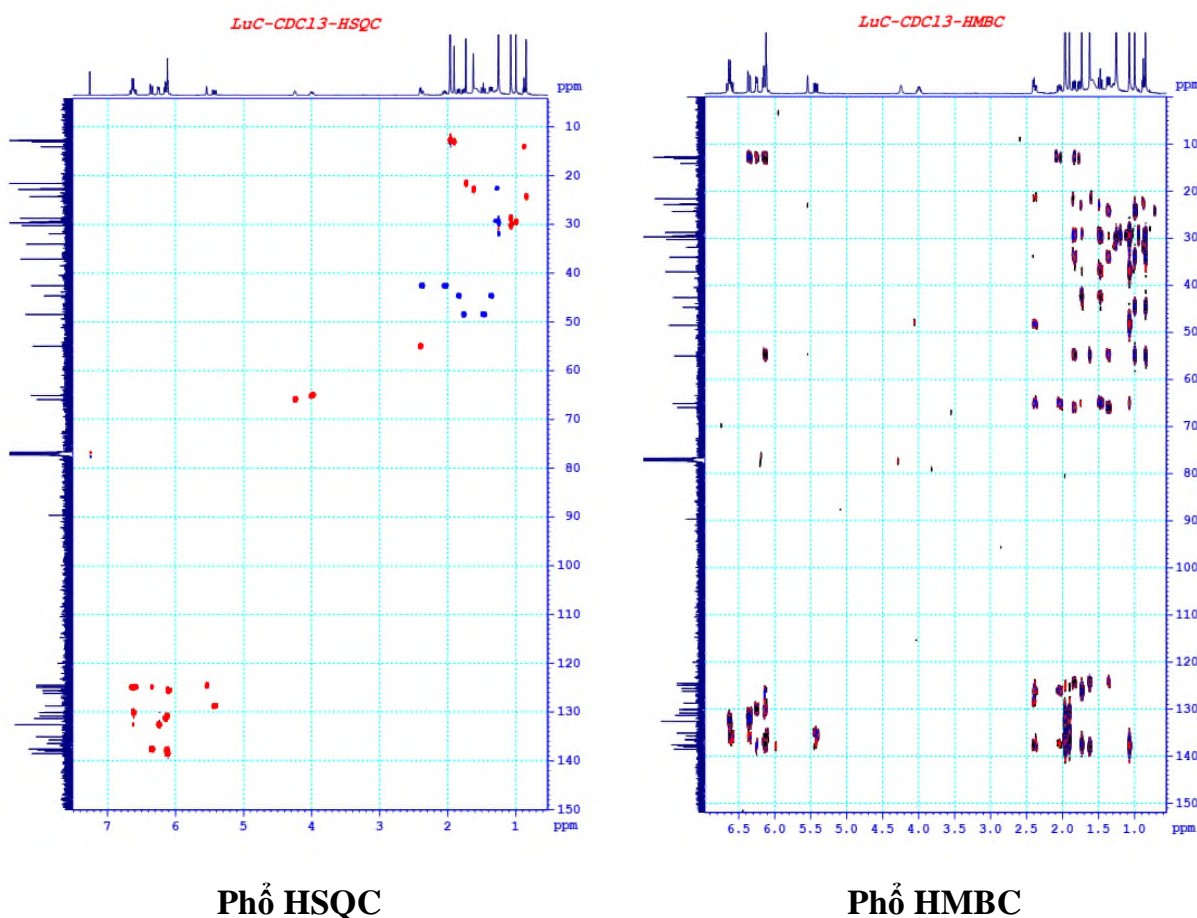


Hình 3.33. Phổ ¹H-NMR của lutein



Hình 3.34. Phổ ¹³C-NMR của lutein

Trên phổ ^{13}C -NMR cho thấy tín hiệu của 40 nguyên tử cacbon, bao gồm: 02 cacbon không liên kết với hydro tại δ_{C} 34,05 (C-1'), 37,15 (C-1); 01 cacbon nhóm metin tại δ_{C} 55,02 (C-6); 02 cacbon nhóm oximetin tại δ_{C} 65,95 (C-3), 65,12 (C-3'); 03 cacbon nhóm metylen tại δ_{C} 44,66 (C-2), 42,60 (C-4'), 48,49 (C-2'); 10 cacbon nhóm metyl tại δ_{C} 12,76 (13-CH₃), 13,12 (9-CH₃), 21,62 (5-CH₃), 30,28 (1-gem-CH₃), 28,75 (1-CH₃), 12,82 (13'-CH₃), 14,11 (9'-CH₃), 22,86 (5'-CH₃), 29,52 (1'-gem-CH₃), 24,33 (1'-CH₃); và 22 cacbon olefinic có độ chuyển dịch hoá học δ_{C} nằm trong vùng từ 124,53 đến 138,52 ppm.



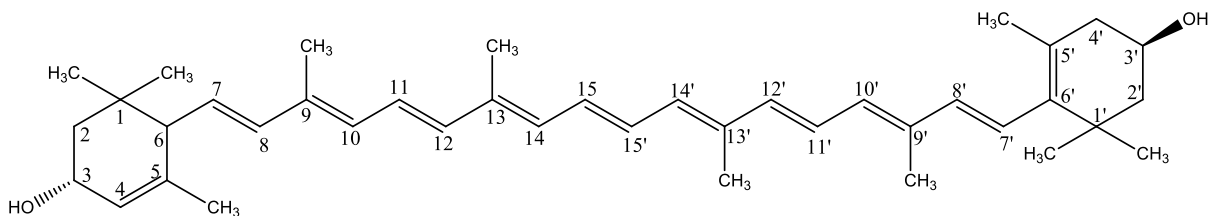
Hình 3.35. Phổ HSQC và phổ HMBC của lutein

Phổ HSQC cho các tương tác giữa proton và cacbon tương ứng.

Phổ HMBC cho thấy tương tác giữa proton H-7 (δ_{H} 6.12 ppm) với cacbon C-6 (δ_{C} 55,02 ppm) và C-5 (δ_{C} 126,2 ppm), tương tác giữa proton H-7' (δ_{H} 6,12 ppm) với cacbon C-6' (δ_{C} 138,01 ppm) và C-5' (δ_{C} 128,74 ppm), chứng tỏ mạch nhánh allen được gắn vào vị trí C-6 và C-6' của hai vòng alicyclic. Tương tác giữa proton của nhóm metyl tại δ_{H} 1,074 (6H, s, 1-CH₃, 1-gem-CH₃) với cacbon C-1 (δ_{C} 37,15 ppm), tương tác giữa proton của nhóm metyl tại δ_{H} 0,849 và 0,999 (6H, s, 1'-CH₃, 1'-gem-CH₃) với cacbon

C-1' (δ_C 34,05 ppm) chứng tỏ hai cặp nhóm methyl được gắn vào hai vị trí C-1 và C-1' tương ứng. Sự chuyển dịch về phía trường thấp của hai carbon C-3 và C-3' chứng tỏ có nhóm hydroxyl gắn vào hai vị trí này.

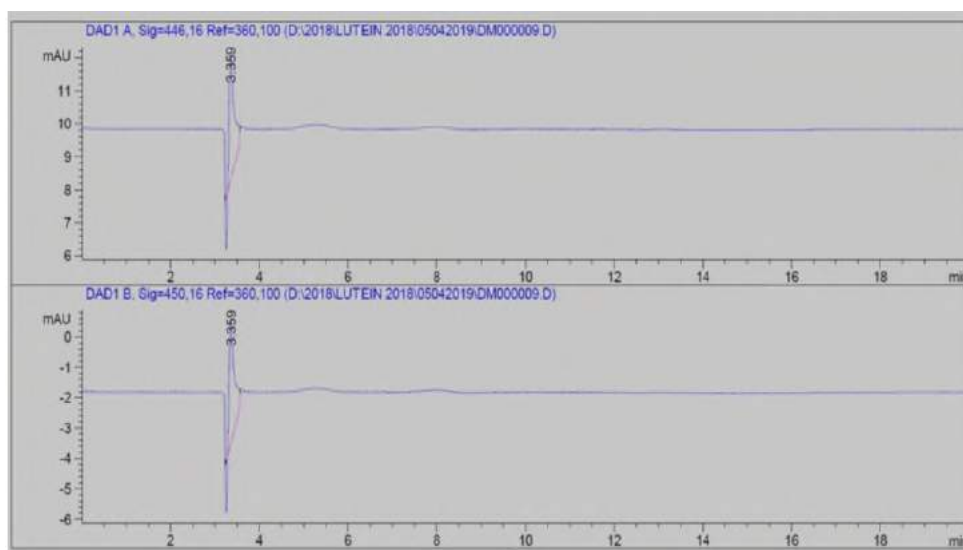
Các dữ liệu phổ trên hoàn toàn trùng khớp với số liệu phổ của lutein [96, 151].



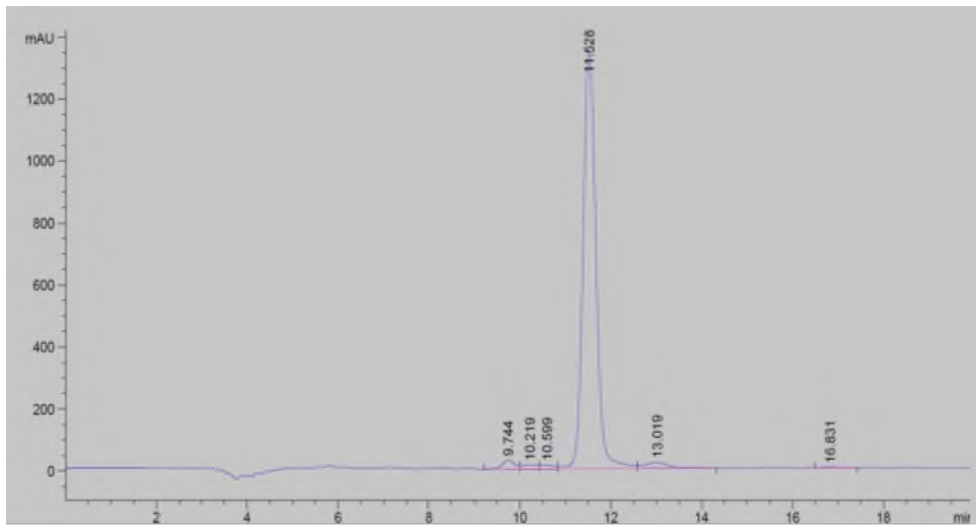
Lutein

Hình 3.36. Cấu trúc hóa học của lutein

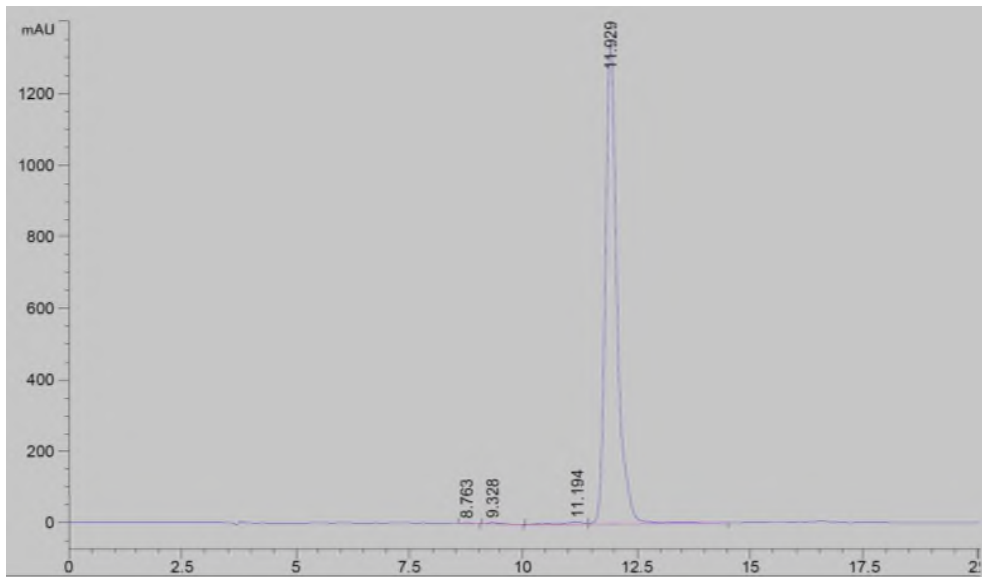
Lutein được xác định và kiểm chứng lại bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả sắc ký đồ được thể hiện lần lượt từ hình 3.37 đến hình 3.41 và bảng 3.34.



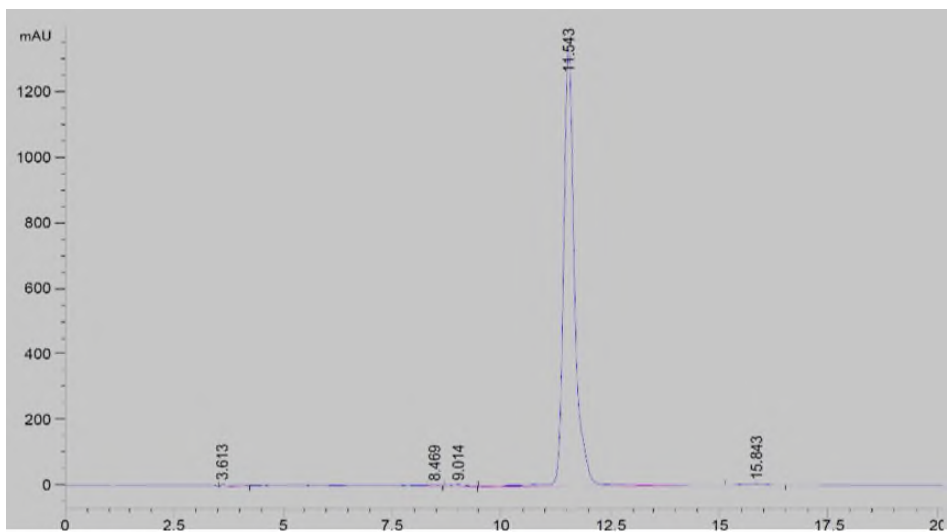
Hình 3.37. Sắc ký đồ HPLC của dung môi



Hình 3.38. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn LZ5-11



Hình 3.39. Sắc ký đồ HPLC của chất chuẩn lutein đối chứng



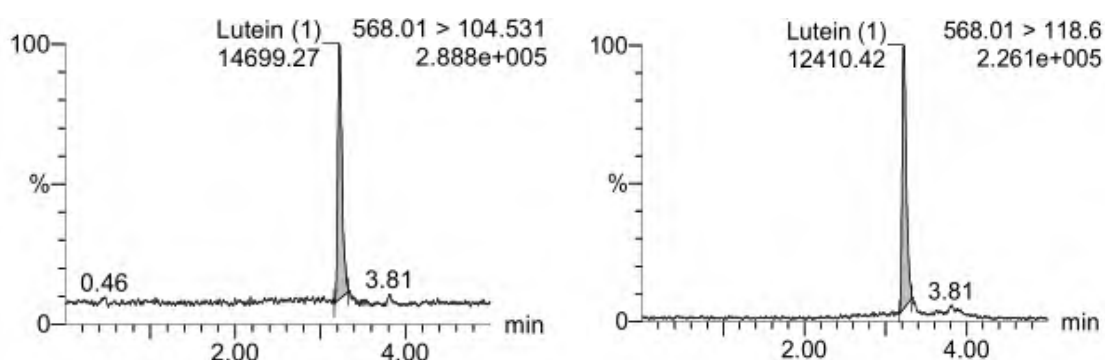
Hình 3.40. Sắc ký đồ HPLC của chất chuẩn lutein tinh chế

Bảng 3.34. Kết quả so sánh chất chuẩn lutein tinh chế và mẫu đối chứng

| Mẫu | Thời gian lưu (phút) | Hàm lượng (%) |
|--|-------------------------|------------------|
| Mẫu lutein chuẩn đối chứng (Sigma Aldrich) | 11,929 | 98,49 |
| Lutein phân đoạn lutein LZ5-11 | 11,528 | 93,69 |
| Chất chuẩn lutein tinh chế | 11,543 | 98,46 |

Kết quả cho thấy, hợp chất được tinh chế là lutein với hàm lượng cao, trên 98 %, đáp ứng được yêu cầu kỹ thuật làm chất chuẩn trong phân tích HPLC.

Kết quả kiểm chứng chất chuẩn lutein sau phân lập bằng phương pháp LC-MS/MS được thể hiện trên hình 3.41 và bảng 3.35. Kết quả cho thấy, mẫu lutein có độ sạch 98 % phù hợp với kết quả HPLC đã đo được.



Hình 3.41. Sắc ký đồ LC-MS/MS của chất chuẩn lutein tinh chế

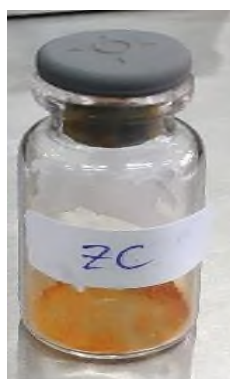
Kết quả chỉ ra rằng, ion phân tử của lutein có trị số m/z là 568,01 và hai phân mảnh ion là 104,531 và 118,6. Điều này có thể giải thích là do LC-MS/MS là sự kết hợp của sắc ký lỏng (LC) với phổ khối (MS). MS/MS là sự kết hợp của hai máy phân tích phổ khối trong một thiết bị đo. Bộ lọc MS đầu tiên cho ion tiền chất, ở đây là ion lutein (568,01), tiếp theo là sự phân mảnh của ion tiền chất dưới năng lượng cao. Sau đó, phổ khối thứ hai lọc các ion sản phẩm, được tạo ra bởi sự phân mảnh với hai mảnh ion 104,531 và 118,6. Hai phân mảnh ion này có thể được tạo thành bởi sự phân mảnh từ hai đầu chứa nhóm OH của lutein, ứng với ion C_7H_4O (104,531) và ion C_8H_6O (118,6). Kết quả này trùng với kết quả khi phân tích chất chuẩn lutein của Sigma Aldrich.

Bảng 3.35. Kết quả LC-MS/MS của chất chuẩn lutein tinh chế

| Hợp chất | Thời gian lưu | Ion phân tử m/z | CV | Phân mảnh ion | CE | Chế độ ion hóa |
|----------|---------------|-----------------|----|---------------|----|----------------|
| Lutein | 3,22 | 568,01 | 38 | 104,531 | 64 | ES+ |
| | 3,22 | 568,01 | 38 | 118,6 | 44 | ES+ |

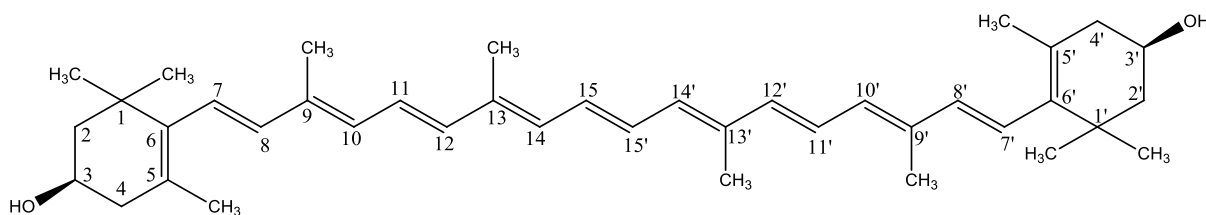
3.2.6.3. Kết quả điều chế chất chuẩn zeaxanthin

Hình ảnh chất chuẩn được trình bày ở hình 3.42. Theo đó, zeaxanthin là bột màu vàng cam.



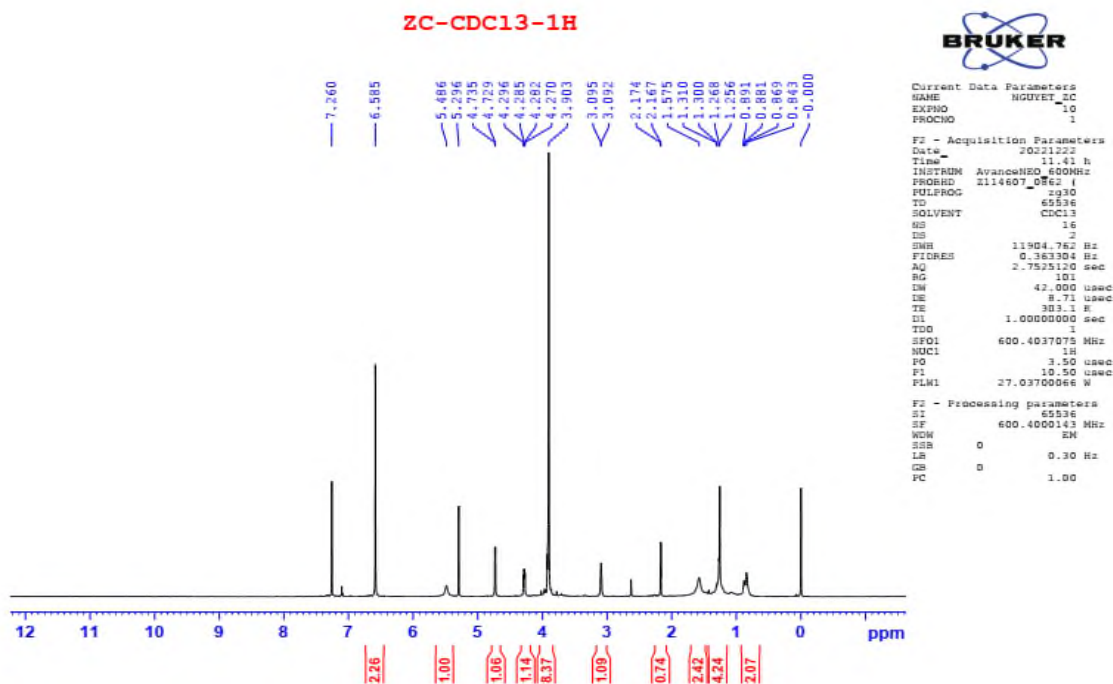
Hình 3.42. Hình ảnh chất chuẩn zeaxanthin đã tinh chế

Cấu trúc hoá học của zeaxanthin sau phân lập (hình 3.43) đã được xác định chính xác dựa vào các phương pháp phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) và $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) trình bày ở hình 3.44, 3.45 và 3.46.



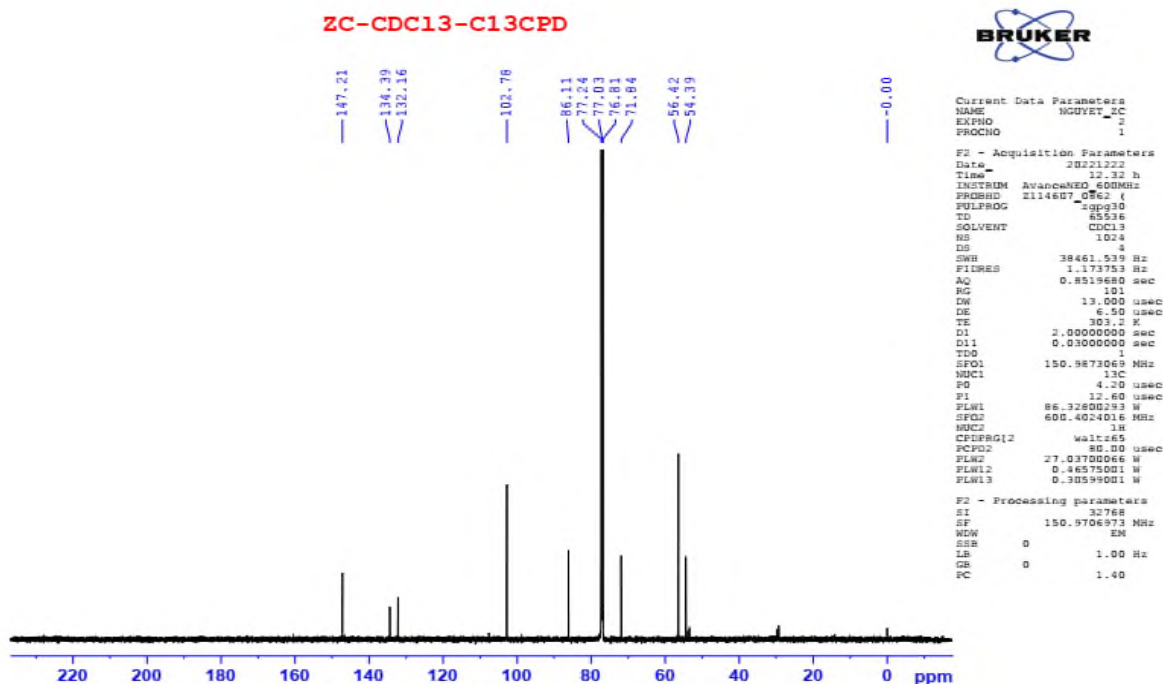
Hình 3.43. Cấu trúc hóa học của zeaxanthin

Do cấu trúc của zeaxanthin đối xứng nên phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất này xuất hiện ít tín hiệu cộng hưởng hơn so với lutein. Cụ thể, trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của zeaxanthin xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của các proton olefinic bị trùng lấp nhau tại δ_{H} 6,585 (overlap), tín hiệu cộng hưởng của proton các nhóm oximetin tại δ_{H} 3,903 (H-3, H-3'), của proton các nhóm metylen tại δ_{H} 1,300 (CH_2 -2, CH_2 -2', CH_2 -4, CH_2 -4'), của proton các nhóm metyl nằm trong vùng từ 0,869 đến 2,170 ppm.

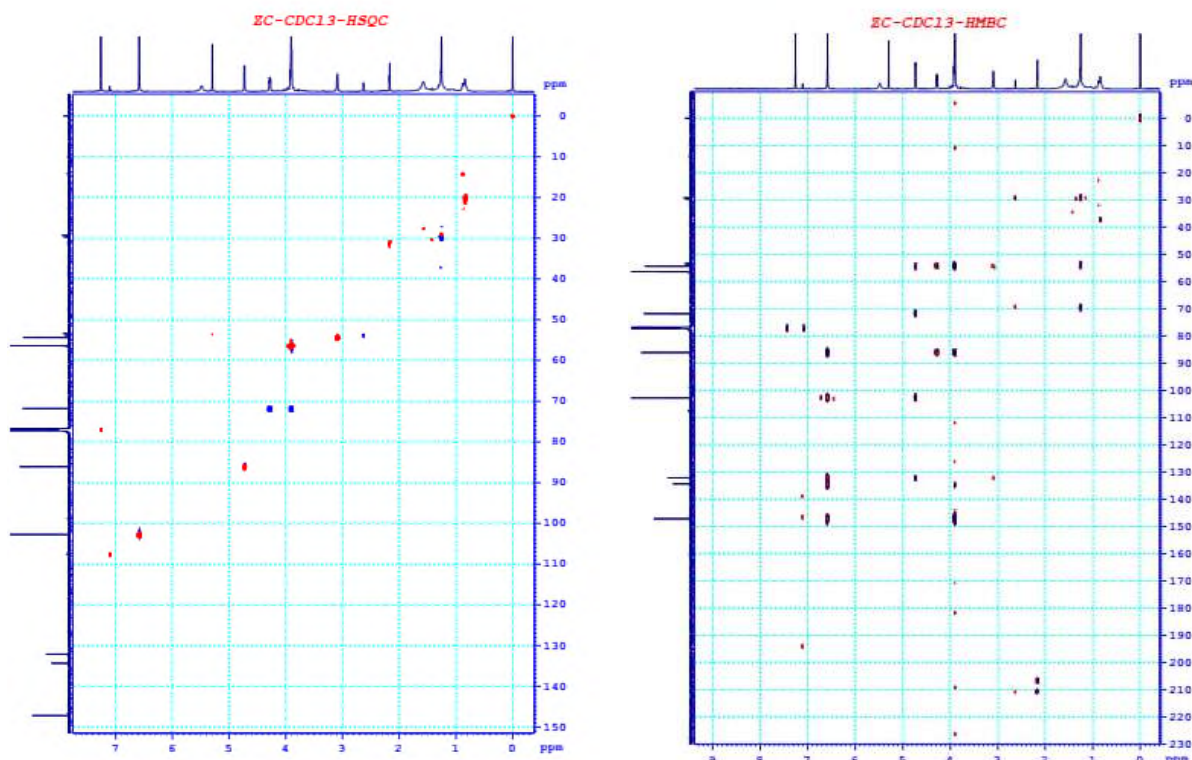


Hình 3.44. Phổ ^1H -NMR của zeaxanthin

Tương ứng, phổ ^{13}C -NMR của zeaxanthin xuất hiện tín hiệu của carbon không liên kết với hydro tại δ_{C} 37,10 (C-1, C-1'), carbon nhóm oximetin tại δ_{C} 54,39 (C-3, C-3'), carbon nhóm metylen tại δ_{C} 30,05 (C-2, C-2', C-4, C-4'), và carbon của các nhóm methyl nằm trong vùng từ 14,00 đến 31,50 ppm. Các carbon olefinic có độ chuyển dịch hoá học δ_{C} nằm trong vùng từ 132,16 đến 147,21 ppm.



Hình 3.45. Phổ ^{13}C -NMR của zeaxanthin



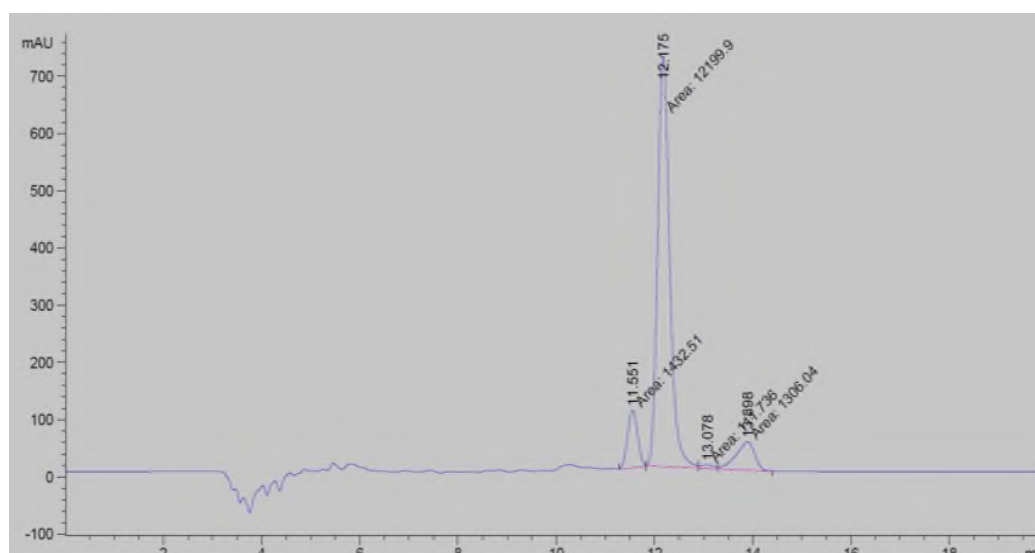
Phổ HSQC

Phổ HMBC

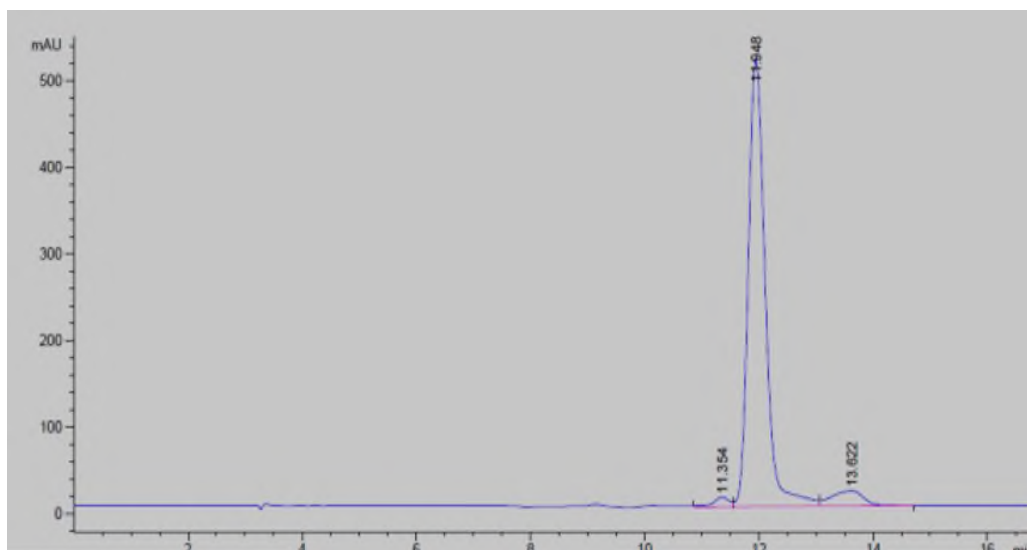
Hình 3.46. Phổ HSQC và phổ HMBC của zeaxanthin

Các dữ liệu phổ trên hoàn toàn trùng khớp với số liệu phổ của zeaxanthin [96, 152].

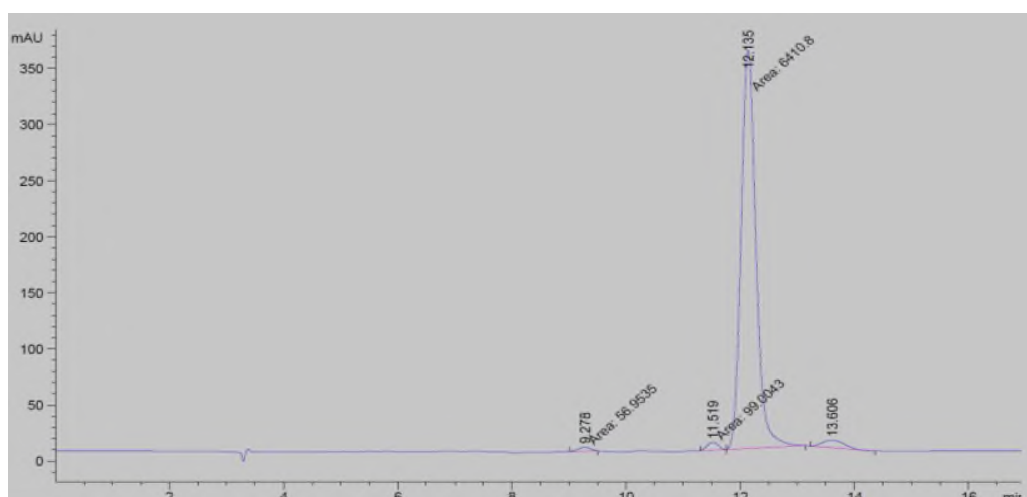
Kết quả phân tích chất chuẩn zeaxanthin bằng HPLC được trình bày từ hình 3.47 đến hình 3.50.



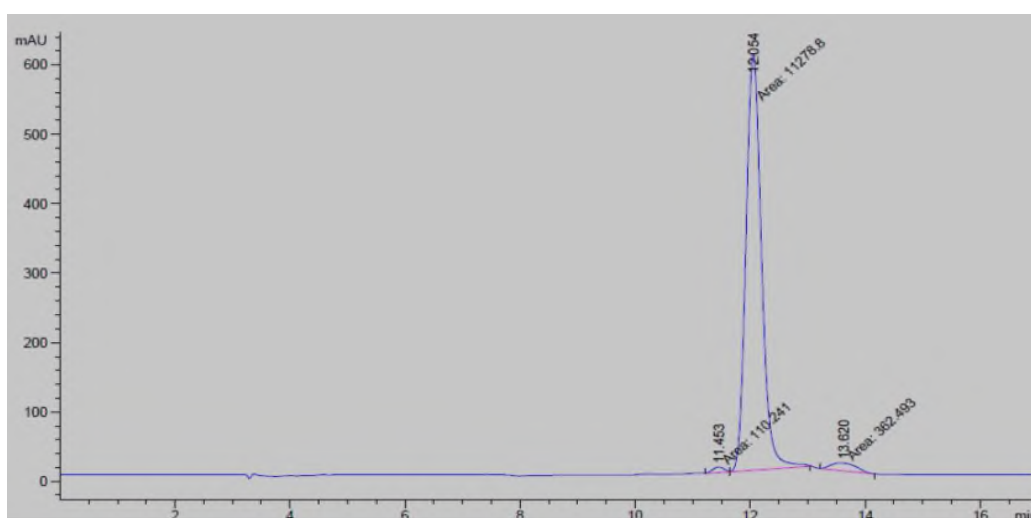
Hình 3.47. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn zeaxanthin LZ14-15



Hình 3.48. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn zeaxanthin Z14.3



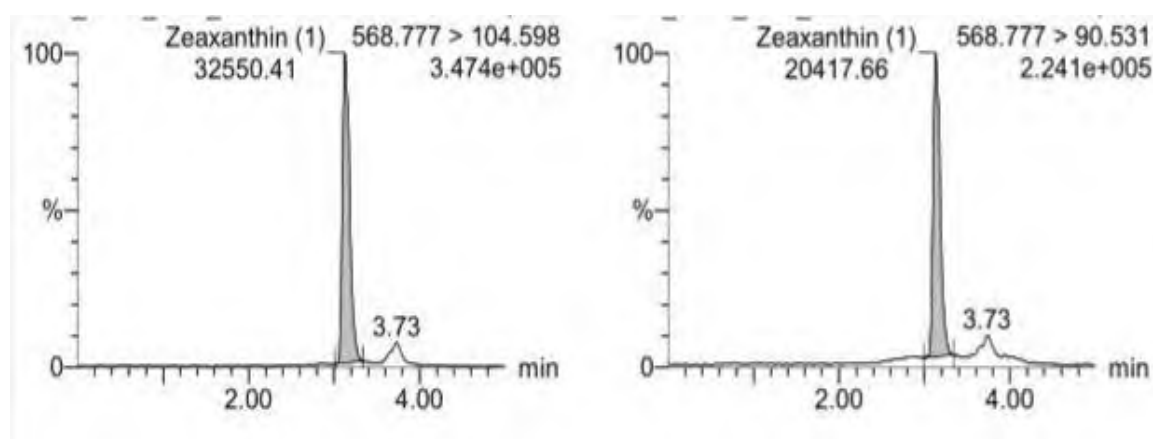
Hình 3.49. Sắc ký đồ HPLC của phân đoạn zeaxanthin ZD2



Hình 3.50. Sắc ký đồ HPLC của chất chuẩn zeaxanthin tinh chế

Kết quả cho thấy, hàm lượng zeaxanthin (thời gian lưu tại 12,175 phút) trong phân đoạn LZ14-15 với dung môi rửa giải *n*-hexan/EtOAc/ete (40/10/20, v/v/v) đạt khoảng 81,06 %. Sau quá trình phân lập bằng sắc ký trên cột silica gel pha thường với dung môi rửa giải *n*-hexan/EtOAc/ete (4/1/1, v/v/v) và cột silica gel pha đảo C18 với dung môi rửa giải ACN/MeOH (9/1, v/v), hàm lượng zeaxanthin đã tăng lên 92,24 % và 95,15 % tương ứng với các mẫu ZD14.3 và ZD2 do các tạp chất đã được loại bỏ. Sau khi kết tinh lại, zeaxanthin có độ tinh khiết 95,97 %, đạt yêu cầu làm chất chuẩn phân tích HPLC đối với chất chuẩn zeaxanthin.

Kết quả kiểm chứng chất chuẩn zeaxanthin sau tinh chế bằng phương pháp LC-MS/MS được thể hiện ở hình 3.51. Mẫu zeaxanthin có độ sạch 95 % phù hợp với kết quả HPLC đã đo được.



Hình 3.51. Sắc ký đồ LC-MS/MS của chất chuẩn zeaxanthin tinh chế

Kết quả chỉ ra rằng, cùng điều kiện phân tích LC-MS/MS nhưng ion phân tử của zeaxanthin có trị số m/z là 568,777 và hai phân mảnh ion là 104,598 và 90,531. Điều này có thể giải thích là do lutein và zeaxanthin là hai đồng phân khác nhau ở vị trí của một liên kết đôi nên ion phân tử đều có giá trị m/z quanh 568. Hai phân mảnh ion của zeaxanthin là 104,598 và 90,531, trong đó phân mảnh 104,598 có giá trị gần giống như phân mảnh 104,531 của lutein, phân mảnh ion còn lại khác nhau. Điều này được giải thích là do lutein và zeaxanthin đều có hai đầu chứa nhóm OH, một trong hai đầu này có cấu trúc giống nhau nên cùng phân mảnh ion quanh giá trị 104, đầu chứa nhóm OH còn lại khác nhau vị trí một liên kết đôi nên phân mảnh ion khác nhau. Hai phân mảnh ion này có thể ứng với ion C_7H_4O (104,598) và ion C_6H_2O (90,531). Kết quả này trùng với kết quả khi phân tích chất chuẩn zeaxanthin của Sigma Aldrich.

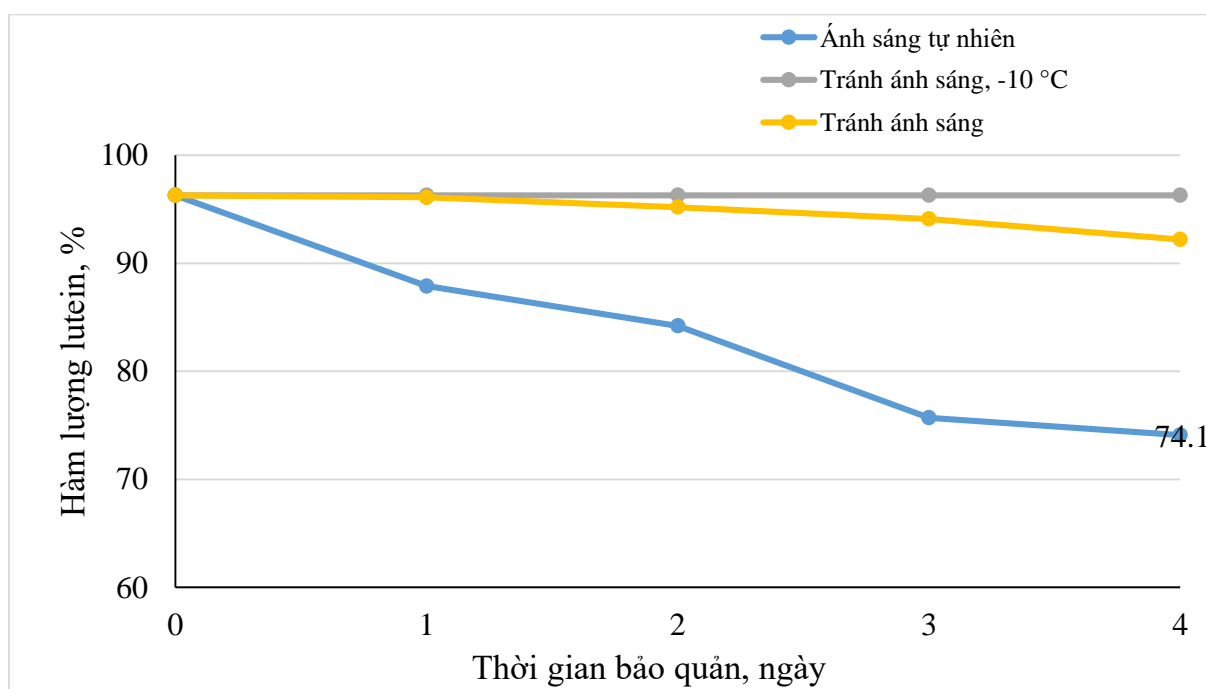
3.2.7. Phương pháp bảo quản sản phẩm lutein và zeaxanthin

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện bảo quản đến chất lượng của lutein được trình bày trong bảng 3.36 và hình 3.52.

Bảng 3.36. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến chất lượng lutein

| Hàm lượng lutein trong sản phẩm (%) | | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Thời gian bảo quản | Ánh sáng tự nhiên, 25 – 30 °C | Tránh ánh sáng, -10 °C | Tránh ánh sáng, 25 – 30 °C |
| t = 0 | 96,3 | 96,3 | 96,3 |
| Sau 1 tuần | 87,9 | 96,3 | 96,1 |
| Sau 2 tuần | 84,2 | 96,3 | 95,2 |
| Sau 3 tuần | 75,7 | 96,3 | 94,1 |
| Sau 4 tuần | 74,1 | 96,3 | 92,2 |

Kết quả cho thấy, lutein bị ảnh hưởng mạnh bởi ánh sáng, cường độ ánh sáng liên tục khiến cho lutein dễ bị chuyển hóa, giảm nhanh chất lượng. Lutein được bảo quản tốt trong môi trường tránh ánh sáng. Lutein gần như không thay đổi chất lượng trong 4 tuần khi bảo quản tránh ánh sáng và để lạnh. Vậy, lutein nên được bảo quản trong môi trường chân không, tránh ánh sáng ở nhiệt độ thấp.



Hình 3.52. Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến chất lượng lutein

3.3. KIỂM NGHIỆM ĐỘ ỔN ĐỊNH VÀ ĐỘC TÍNH CỦA SẢN PHẨM

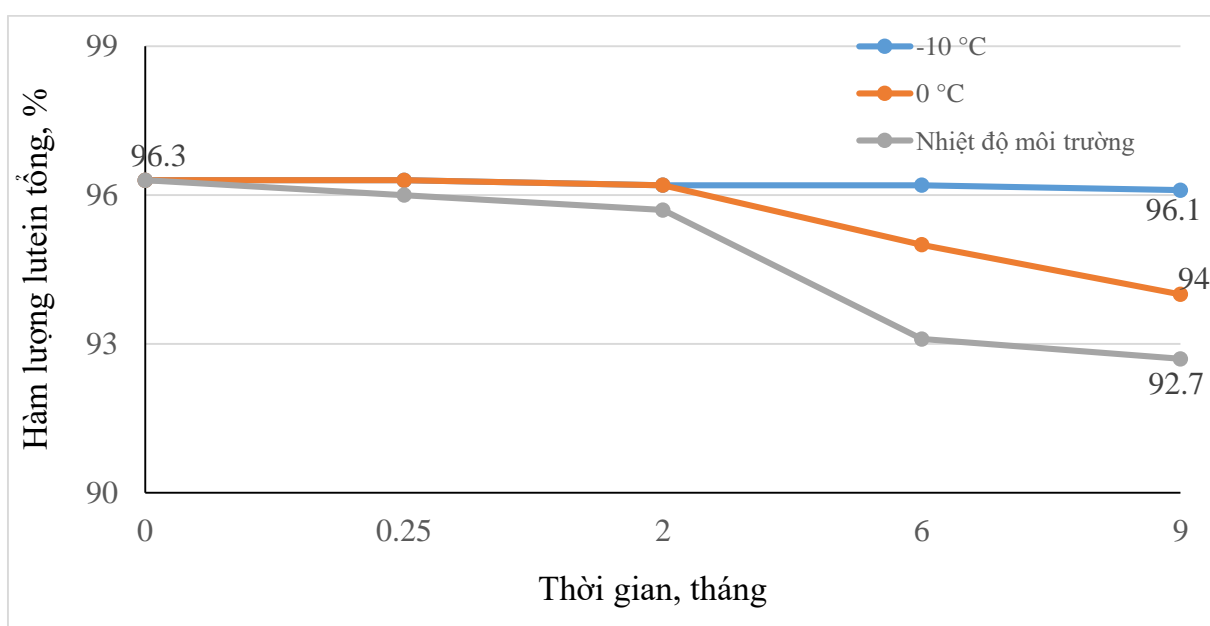
3.3.1. Độ ổn định của sản phẩm lutein

Kết quả kiểm nghiệm độ ổn định của lutein (hàm lượng lutein tổng 92,9 %) được trình bày trong bảng 3.37 và hình 3.53.

Bảng 3.37. Kết quả kiểm nghiệm độ ổn định của lutein

| Hàm lượng lutein tổng (%) | | | | |
|---------------------------|--------------------|-----------------|---------------|---------------------|
| STT | Thời gian bảo quản | Nhiệt độ -10 °C | Nhiệt độ 0 °C | Nhiệt độ môi trường |
| 1 | t=0 | 96,3 | 96,3 | 96,3 |
| 2 | Sau 1 tuần | 96,3 | 96,3 | 96,0 |
| 3 | Sau 2 tháng | 96,2 | 96,2 | 95,7 |
| 4 | Sau 6 tháng | 96,2 | 95,0 | 93,1 |
| 5 | Sau 9 tháng | 96,1 | 94,0 | 92,71 |

Kết quả cho thấy, sau 9 tháng, độ ổn định của lutein đều rất cao dù được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau (môi trường chân không), hàm lượng lutein tổng ở các mẫu đều > 92 %. Mẫu bảo quản ở nhiệt độ thấp (-10 °C), hàm lượng lutein ít biến đổi hơn so với bảo quản ở các khoảng nhiệt độ cao hơn. Vậy, lutein hoàn toàn có thể bảo quản ở nhiệt độ thường hoặc nhiệt độ thấp trong điều kiện chân không, tránh ánh sáng.



Hình 3.53. Kết quả kiểm nghiệm độ ổn định của lutein

3.3.2. Thử nghiệm độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của sản phẩm lutein

Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và quy định của Bộ y tế Việt Nam, ngoại trừ các bài thuốc cổ phương được chiết xuất theo phương pháp truyền thống, tất cả các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu phải đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn trên động vật trước khi đưa vào thử nghiệm trên người. Hỗn hợp lutein và zeaxanthin là hoạt chất chiết xuất từ dược liệu, do đó việc nghiên cứu tính an toàn trong đó gồm nghiên cứu độc tính cấp và độc tính bán trường diễn trên động vật thực nghiệm là cần thiết và bắt buộc.

3.3.2.1. Nghiên cứu độc tính cấp

Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của lutein được trình bày ở bảng 3.38.

Kết quả chỉ ra rằng chuột đã được cho uống lutein tới mức liều cao nhất là 3000 mg/kg/ngày, gấp hơn 1000 lần liều dự kiến có tác dụng (liều dự kiến có tác dụng ở chuột nhất là 2,88 mg/kg/ngày), sau uống lutein 72 giờ và 168 giờ, tất cả chuột thí nghiệm ở các lô đều hoạt động, ăn uống bình thường, chất thải bình thường, không có chuột nào chết. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của R Ravikrishnan và cộng sự [153] đánh giá độc tính cấp của Lutemax 2020 (gồm lutein and zeaxanthin), cho chuột công uống đến liều 2000mg/kg mà không có chuột nào chết, không có dấu hiệu của độc tính. Vậy, chưa tìm thấy LD₅₀ của lutein theo đường uống trên chuột nhất trắng với mức liều cao nhất chuột uống trong 24 giờ là 3000 mg/kg thể trọng/ngày, lutein có tính an toàn cao trong thử nghiệm độc tính cấp theo đường uống.

Bảng 3.38. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp theo đường uống của lutein trên chuột

| Lô chuột | Liều dùng (mg/kg thể trọng) | Thể tích cho uống | Số chuột sống/chết sau 72 giờ | Số chuột sống/chết sau 168 giờ |
|----------|-----------------------------|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Lô 1 | 1000 | 0,2 mL/10 g | 10/0 | 10/0 |
| Lô 2 | 1500 | 0,2 mL/10 g | 10/0 | 10/0 |
| Lô 3 | 2000 | 0,2 mL/10 g | 10/0 | 10/0 |
| Lô 4 | 2500 | 0,2 mL/10 g | 10/0 | 10/0 |
| Lô 5 | 3000 | 0,2 mL/10 g | 10/0 | 10/0 |

3.3.2.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

- Tình trạng chung

Các chuột ở cả lô chứng và các lô dùng thuốc thử lutein đều hoạt động bình thường. Chuột lông mượt, da niêm mạc bình thường, ăn uống bình thường, phân thành khuôn.

- Sự thay đổi thể trọng của chuột

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến trọng lượng của chuột được trình bày ở bảng 3.39.

So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu, trọng lượng chuột ở các lần cân sau đều lớn hơn lần cân trước ($p < 0,01$). So sánh giữa các lô tại cùng thời điểm đánh giá, không có sự khác biệt về trọng lượng chuột ($p > 0,05$).

Bảng 3.39. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến trọng lượng chuột

| Thời điểm | Trọng lượng chuột ($\bar{X} \pm SD$) (g) | | | P giữa các lô |
|---------------------|---|---------------|---------------|-------------------------|
| | Lô chứng (1) | Lô thử 1 (2) | Lô thử 2 (3) | |
| D ₀ (a) | 168,60 ± 4,52 | 171,90 ± 4,53 | 169,80 ± 3,79 | p ₁₋₂ > 0,05 |
| D ₄₅ (b) | 198,16 ± 4,86 | 202,04 ± 8,42 | 201,84 ± 9,17 | p ₁₋₃ > 0,05 |
| D ₉₀ (c) | 216,08 ± 7,64 | 219,11 ± 5,58 | 218,82 ± 5,18 | p ₂₋₃ > 0,05 |
| p trước sau | p _{a-b} < 0,01; p _{b-c} < 0,01; p _{a-c} < 0,01 | | | - |

- Ảnh hưởng của lutein lên các chỉ số huyết học của chuột

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein lên các chỉ số huyết học của chuột được trình bày từ bảng 3.40 đến bảng 3.44.

Bảng 3.40. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến số lượng hồng cầu

| Thời điểm | Hồng cầu chuột ($\bar{X} \pm SD$) | | | P giữa các lô |
|---------------------|---|--------------|--------------|-------------------------|
| | Lô chứng (1) | Lô thử 1 (2) | Lô thử 2 (3) | |
| D ₀ (a) | 8,20 ± 1,98 | 8,59 ± 0,98 | 8,67 ± 1,30 | p ₁₋₂ > 0,05 |
| D ₄₅ (b) | 8,11 ± 0,67 | 8,32 ± 0,67 | 8,28 ± 1,24 | p ₁₋₃ > 0,05 |
| D ₉₀ (c) | 7,96 ± 0,59 | 8,06 ± 0,97 | 8,17 ± 0,52 | p ₂₋₃ > 0,05 |
| p trước sau cùng lô | p _{a-b} > 0,05; p _{a-c} > 0,05; p _{b-c} > 0,05 | | | - |

So sánh trong cùng lô ở các thời điểm trước nghiên cứu, sau uống lutein 45 ngày và sau uống lutein 90 ngày, số lượng hồng cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu số lượng hồng cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, lutein không ảnh hưởng đến số lượng hồng cầu của các chuột thử nghiệm.

Bảng 3.41. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến hàm lượng huyết sắc tố

| Thời điểm | Huyết sắc tố chuột ($\bar{X} \pm SD$) (g/dl) | | | P giữa các lô |
|---------------------|---|----------------|----------------|-------------------------|
| | Lô chứng (1) | Lô thử 1 (2) | Lô thử 2 (3) | |
| D ₀ (a) | 125,90 ± 15,07 | 125,50 ± 9,80 | 124,90 ± 16,72 | p ₁₋₂ > 0,05 |
| D ₄₅ (b) | 125,20 ± 12,40 | 126,10 ± 15,95 | 125,70 ± 15,71 | p ₁₋₃ > 0,05 |
| D ₉₀ (c) | 125,60 ± 12,41 | 126,60 ± 18,27 | 126,20 ± 14,54 | p ₂₋₃ > 0,05 |
| p trước sau cùng lô | p _{a-b} > 0,05; p _{a-c} > 0,05; p _{b-c} > 0,05 | | | - |

So sánh trong cùng lô ở các thời điểm trước nghiên cứu, sau uống lutein 45 ngày và sau uống lutein 90 ngày, nồng độ huyết sắc tố trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu, nồng độ huyết sắc tố trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, nồng độ huyết sắc tố trong máu chuột không bị ảnh hưởng bởi lutein.

Bảng 3.42. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến hematocrit

| Thời điểm | Hematocrit ($\bar{X} \pm SD$) (%) | | | P giữa các lô |
|---------------------|---|--------------|--------------|-------------------------|
| | Lô chứng (1) | Lô thử 1 (2) | Lô thử 2 (3) | |
| D ₀ (a) | 39,93 ± 4,95 | 41,02 ± 3,42 | 40,37 ± 2,64 | p ₁₋₂ > 0,05 |
| D ₄₅ (b) | 41,54 ± 1,80 | 39,71 ± 4,11 | 41,53 ± 1,71 | p ₁₋₃ > 0,05 |
| D ₉₀ (c) | 41,40 ± 2,73 | 41,92 ± 2,66 | 41,69 ± 3,41 | p ₂₋₃ > 0,05 |
| p trước sau cùng lô | p _{a-b} > 0,05; p _{a-c} > 0,05; p _{b-c} > 0,05 | | | - |

So sánh trong cùng lô ở các thời điểm trước nghiên cứu, sau uống lutein 45 ngày và sau uống lutein 90 ngày, hematocrit trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu, hematocrit

trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Vậy, hematocrit trong máu chuột không thay đổi khi chuột uống lutein.

Bảng 3.43. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc thử đến số lượng bạch cầu

| Thời điểm | Bạch cầu máu chuột ($\bar{X} \pm SD$) (G/l) | | | p giữa các lô |
|---------------------|---|--------------|--------------|-------------------------|
| | Lô chứng (1) | Lô thử 1 (2) | Lô thử 2 (3) | |
| D ₀ (a) | 8,95 ± 1,55 | 9,07 ± 1,65 | 8,53 ± 2,34 | p ₁₋₂ > 0,05 |
| D ₄₅ (b) | 8,89 ± 2,65 | 8,91 ± 3,07 | 8,34 ± 1,54 | p ₁₋₃ > 0,05 |
| D ₉₀ (c) | 9,06 ± 2,16 | 8,88 ± 2,52 | 8,69 ± 2,40 | p ₂₋₃ > 0,05 |
| p trước sau cùng lô | p _{a-b} > 0,05; p _{a-c} > 0,05; p _{b-c} > 0,05 | | | - |

So sánh trong cùng lô ở các thời điểm trước nghiên cứu, sau uống lutein 45 ngày và sau uống lutein 90 ngày, số lượng bạch cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu số lượng bạch cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.44. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến số lượng tiểu cầu

| Thời điểm | Số lượng tiểu cầu máu chuột ($\bar{X} \pm SD$) (G/l) | | | p giữa các lô |
|---------------------|---|-----------------|-----------------|-------------------------|
| | Lô chứng (1) | Lô thử 1 (2) | Lô thử 2 (3) | |
| D ₀ (a) | 625,02 ± 145,67 | 627,10 ± 144,16 | 657,20 ± 176,07 | p ₁₋₂ > 0,05 |
| D ₄₅ (b) | 640,60 ± 175,42 | 635,00 ± 68,35 | 647,85 ± 90,89 | p ₁₋₃ > 0,05 |
| D ₉₀ (c) | 612,80 ± 156,32 | 615,75 ± 213,54 | 691,25 ± 177,56 | p ₂₋₃ > 0,05 |
| p trước sau cùng lô | p _{a-b} > 0,05; p _{a-c} > 0,05; p _{b-c} > 0,05 | | | - |

So sánh trong cùng lô ở các thời điểm trước nghiên cứu, sau uống thuốc thử 45 ngày và sau uống thuốc thử 90 ngày, số lượng tiểu cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm nghiên cứu số lượng tiểu cầu trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Ảnh hưởng của thuốc thử lên các chỉ số sinh hóa của chuột

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc thử lên các chỉ số sinh hóa của chuột được trình bày ở bảng 3.45, 3.46 và 3.47.

Bảng 3.45. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc thử đến hoạt độ AST, ALT

| Chỉ số | Thời điểm | Kết quả ($\bar{X} \pm SD, n=8$) | | | p giữa các lô |
|--------------|---------------------|---|----------------|----------------|-------------------------|
| | | Lô chứng (1) | Lô trị 1(2) | Lô trị 2 (3) | |
| AST (u/l) | D ₀ (a) | 129,30 ± 19,65 | 128,40 ± 30,35 | 129,50 ± 29,15 | p ₁₋₂ > 0,05 |
| | D ₄₅ (b) | 124,60 ± 15,28 | 126,10 ± 22,94 | 128,40 ± 24,69 | p ₁₋₃ > 0,05 |
| | D ₉₀ (c) | 118,30 ± 36,09 | 127,90 ± 26,83 | 130,90 ± 30,71 | p ₂₋₃ > 0,05 |
| | p trước sau | p _{a-b} > 0,05; p _{a-c} > 0,05; p _{b-c} > 0,05 | | | - |
| ALT (u/l) | D ₀ (a) | 93,00 ± 26,02 | 84,80 ± 39,95 | 86,60 ± 14,26 | p ₁₋₂ > 0,05 |
| | D ₄₅ (b) | 91,70 ± 20,34 | 81,60 ± 30,18 | 85,80 ± 29,93 | p ₁₋₃ > 0,05 |
| | D ₉₀ (c) | 89,70 ± 15,33 | 86,20 ± 12,98 | 83,50 ± 19,65 | p ₂₋₃ > 0,05 |
| | p trước sau | p _{a-b} > 0,05; p _{a-c} > 0,05; p _{b-c} > 0,05 | | | - |

So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, cũng như so sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, hoạt độ các enzym AST và ALT trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy lutein với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi hoạt độ các enzym AST và ALT, lutein không gây ra hủy hoại tế bào gan trên chuột nghiên cứu.

So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, cũng như so sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, nồng độ albumin và cholesterol toàn phần trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy lutein với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi nồng độ albumin và cholesterol toàn phần trong máu chuột nghiên cứu.

Bảng 3.46. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ albumin và cholesterol toàn phần

| Chỉ số | Thời điểm | Kết quả ($\bar{X} \pm SD, n=8$) | | | P giữa các lô |
|--------------------------------|---------------------|---|--------------|--------------|-------------------------|
| | | Lô chứng (1) | Lô trị 1(2) | Lô trị 2 (3) | |
| Albumin huyết tương (g/l) | D ₀ (a) | 28,18 ± 2,69 | 28,20 ± 1,33 | 28,50 ± 1,61 | p ₁₋₂ > 0,05 |
| | D ₄₅ (b) | 28,42 ± 1,65 | 28,52 ± 1,25 | 28,22 ± 1,93 | p ₁₋₃ > 0,05 |
| | D ₉₀ (c) | 28,31 ± 2,06 | 28,60 ± 1,85 | 28,30 ± 1,89 | p ₂₋₃ > 0,05 |
| | p trước sau | p _{a-b} > 0,05; p _{a-c} > 0,05; p _{b-c} > 0,05 | | | - |
| Cholesterol toàn phần (mmol/l) | D ₀ (a) | 1,06 ± 0,43 | 0,98 ± 0,27 | 1,09 ± 0,31 | p ₁₋₂ > 0,05 |
| | D ₄₅ (b) | 0,99 ± 0,46 | 0,96 ± 0,27 | 1,01 ± 0,34 | p ₁₋₃ > 0,05 |
| | D ₉₀ (c) | 1,10 ± 0,32 | 1,02 ± 0,32 | 0,97 ± 0,42 | p ₂₋₃ > 0,05 |
| | p trước sau | p _{a-b} > 0,05; p _{a-c} > 0,05; p _{b-c} > 0,05 | | | - |

Bảng 3.47. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của lutein đến nồng độ creatinin

| Thời điểm | Creatinin ($\mu\text{mol/l}; \bar{X} \pm SD, n= 8$) | | | P giữa các lô |
|---------------------|---|--------------|--------------|-------------------------|
| | Lô chứng (1) | Lô trị 1(2) | Lô trị 2 (3) | |
| D ₀ (a) | 46,40 ± 4,58 | 46,50 ± 5,93 | 44,80 ± 4,34 | p ₁₋₂ > 0,05 |
| D ₄₅ (b) | 44,20 ± 2,44 | 43,20 ± 4,64 | 45,60 ± 3,60 | p ₁₋₃ > 0,05 |
| D ₉₀ (c) | 48,50 ± 5,26 | 45,70 ± 5,34 | 44,70 ± 3,72 | p ₂₋₃ > 0,05 |
| p trước-sau | p _{a-b} > 0,05; p _{a-c} > 0,05; p _{b-c} > 0,05 | | | - |

So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, cũng như so sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, nồng độ creatinin trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, lutein với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi nồng độ creatinin trong máu chuột nghiên cứu.

3.3.2.3. Kết quả mô bệnh học gan, thận chuột nghiên cứu

- Đại thể

Kết quả đại thể của chuột thí nghiệm được thể hiện ở hình 3.54.



Hình ảnh gan, thận, lách
lô chứng



Hình ảnh gan, thận, lách lô
trị 1



Hình ảnh gan, thận, lách lô
trị 2

Hình 3. 54. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột thí nghiệm

Kết quả cho thấy, màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở hai lô dùng lutein không khác so với chứng khi quan sát đại thể bằng mắt thường dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần. Hình ảnh đại thể các tạng gan, lách, thận của chuột ở các lô trị 1, lô trị 2, là các lô cho uống lutein, có màu nâu đỏ thẫm đồng đều, bề mặt nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết, có đàn hồi khi ấn xuống, không khác biệt so với hình ảnh gan, lách, thận của chuột ở lô chứng.

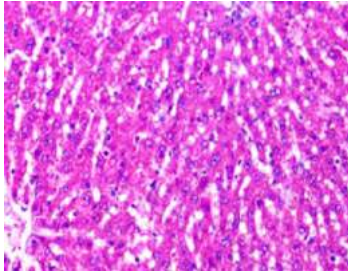
- Vi thể

Kết quả mô bệnh học gan, lách, thận của chuột sau 90 ngày uống thuốc được thể hiện ở hình 3.55.

Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học gan, lách, thận chuột cho thấy lutein dùng đường uống với liều 1,68 mg/kg/ngày, và liều 8,40 mg/kg/ngày liên tục trong 90 ngày, không gây tổn thương trên gan, thận, lách của chuột, không thấy có sự khác biệt về cấu trúc vi thể gan, lách, thận giữa lô trị 1 và lô trị 2 với lô chứng.

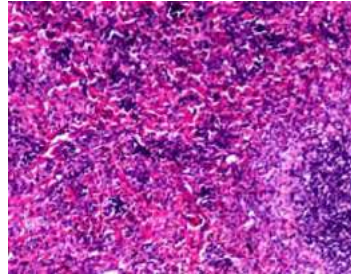
Các kết quả thực nghiệm cho thấy, dùng lutein liều 1,68 mg/kg/ngày và liều 8,40 mg/kg/ngày, trong 90 ngày liên tục, chuột đều khỏe mạnh, tăng trọng tốt, các chỉ số huyết học (hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu), các chỉ tiêu sinh hóa máu đánh giá chức năng gan, thận (hoạt độ các enzym AST, ALT, albumin huyết tương, cholesterol toàn phần, creatinin) không thay đổi, không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận. Vì lí do đó, lutein được coi là an toàn khi sử dụng bằng đường uống.

Hình thái vi thể gan



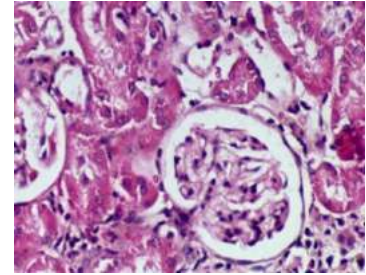
Chuột 4 lô chứng (HE x 400): các bè gan và tiểu thùy gan bình thường, không có thoái hóa, xâm nhập viêm, tĩnh mạch trung tâm không giãn, không xung huyết.

Hình thái vi thể lách

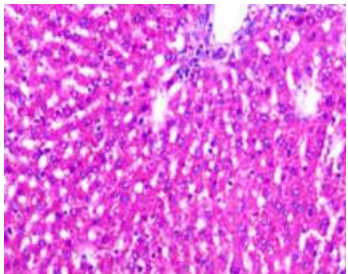


Chuột 8 lô chứng (HE x 400): Các nang lympho với tâm mầm rộng và trung tâm có động mạch bút lông. Cấu trúc lách bình thường.

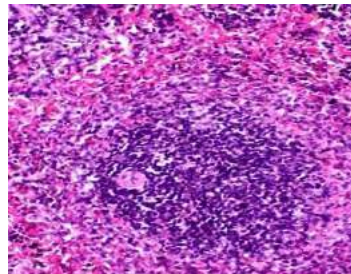
Hình thái vi thể thận



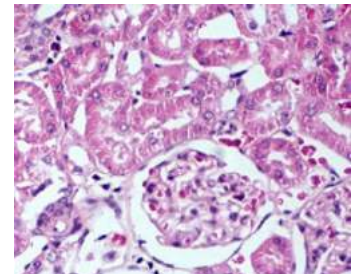
Chuột 6 lô chứng (HE x 400): Các mao mạch trong tiểu cầu và khe thận bình thường. Các tế bào biểu mô ống thận bình thường.



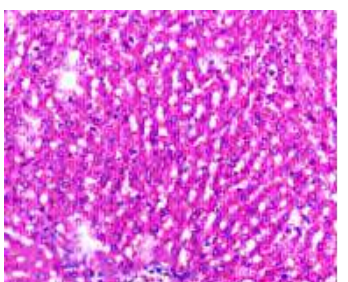
Chuột 16 lô trị 1 (HE x 400): các bè gan và tiểu thùy gan, tế bào gan bình thường. Hình ảnh vi thể không khác biệt so với lô chứng.



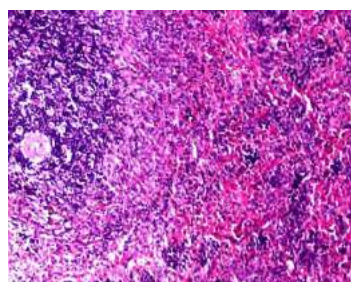
Chuột 14 lô trị 1 (HE x 400): Cấu trúc lách bình thường. Hình ảnh vi thể không khác biệt so với lô chứng.



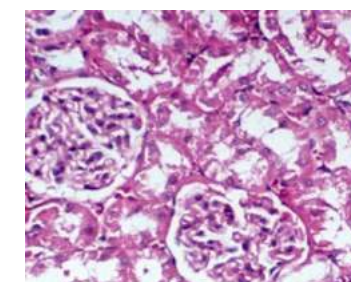
Chuột 12 lô trị 1 (HE x 400): các cấu trúc nhu mô thận bình thường. Hình ảnh vi thể không khác biệt so với lô chứng.



Chuột 22 lô trị 2 (HE x 400): các bè gan và tiểu thùy gan, tế bào gan bình thường. Hình ảnh vi thể không khác biệt so với lô chứng.



Chuột 27 lô tr 2 (HE x 400): Cấu trúc lách bình thường. Hình ảnh vi thể không khác biệt so với lô chứng.



Chuột 24 lô trị 2 (HE x 400): các cấu trúc nhu mô thận bình thường. Hình ảnh vi thể không khác biệt so với lô chứng.

Hình 3. 55. Hình ảnh vi thể gan, lách, thận chuột nghiên cứu

Nghiên cứu bán trường diễn được thực hiện trong thời gian 3 tháng là do theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và quy định của Bộ y tế Việt Nam, thời gian nghiên cứu bán trường diễn trên động vật thường gấp 4 lần thời gian dự kiến dùng trên người. Tuy nhiên, nếu nghiên cứu trên động vật trong thời gian quá dài, đặc biệt khi cho động vật dùng thuốc cường bức (qua kim cong đầu tù), một số yếu tố nhiễu có thể ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu. Vì lí do đó, trong trường hợp thời gian dự định sử dụng trên người là dùng hàng ngày trên 30 ngày thì thời gian nghiên cứu bán trường diễn trên động vật là 3 tháng.

3.4. BẢO CHẾ NHŨ TƯƠNG NANO LUTEIN

3.4.1. Lựa chọn thông số để thiết kế thí nghiệm

3.4.1.1. Lựa chọn chất hoạt động bề mặt ưa dầu

Chất hoạt động bề mặt có khả năng định hướng trên bề mặt phân cách giữa hai pha rắn-lỏng tạo thành một lớp đơn, đa phân tử hoặc các ion bao xung quanh các tiểu phân lutein, đồng thời làm giảm sức căng bề mặt, cải thiện tính thấm của các tiểu phân lutein với môi trường phân tán.

Kết quả xác định kích thước tiểu phân trung bình của nhũ tương nano lutein khi sử dụng các chất hoạt động bề mặt ưa dầu khác nhau được trình bày trong bảng 3.48.

Bảng 3.48. Kết quả xác định ảnh hưởng của chất hoạt động bề mặt ưa dầu đến kích thước tiểu phân trung bình của nhũ tương

| Chất hoạt động bề mặt | Span 60 | Span 80 | Span 40 | Leucithin |
|-----------------------|---------|---------|---------|-----------|
| KTTP, nm | 56 | 89 | 114 | 157 |

(Điều kiện: lutein 5 % trong dầu nành; dầu nành 1 %; tween 80 18 %; pectin 0,06 % và nước cất 100 ml).

Kết quả cho thấy có sự khác biệt về KTTP giữa các mẫu sử dụng chất hoạt động bề mặt ưa dầu khác nhau. Nhũ tương nano lutein sử dụng chất hoạt động bề mặt span 60 có KTTP nhỏ nhất. Vì vậy, span 60 được chọn trong các nghiên cứu tiếp theo.

3.4.1.2. Lựa chọn chất hoạt động bề mặt ưa nước

Kết quả xác định kích thước tiểu phân trung bình của nhũ tương nano lutein khi sử dụng các chất hoạt động bề mặt ưa nước khác nhau được trình bày trong bảng 49.

Bảng 3.49. Kết quả xác định ảnh hưởng của chất hoạt động bề mặt ưa nước đến kích thước tiểu phân trung bình của nhũ tương

| Chất hoạt động bề mặt | Tween 80 | Tween 60 | Poloxame | Cremophor RH40 |
|------------------------------|----------|----------|----------|----------------|
| | 18% | 18% | 18% | 18% |
| KTTP, nm | 56 | 72 | 112 | 134 |

(Điều kiện: lutein 5 % trong dầu nành; dầu đậu nành 1 %; Span 60 4 %; pectin 0,06 % và nước cất 100 ml).

Kết quả cho thấy có sự khác biệt về KTTPTB giữa các mẫu sử dụng chất hoạt động bề mặt khác nhau. Nhũ tương nano lutein sử dụng chất hoạt động bề mặt tween 80 có KTTP nhỏ nhất. Vì vậy, tween 80 được chọn trong các nghiên cứu tiếp theo.

3.4.1.3. Chọn nồng độ lutein/dầu nành

Kết quả khảo sát khả năng hòa tan của lutein trong dầu nành được trình bày trong bảng 3.50.

Bảng 3. 50. Trạng thái của pha dầu khi thay đổi nồng độ lutein

| Nồng độ lutein trong dầu nành (%, w/w) | Trạng thái cảm quan |
|---|----------------------------|
| 1 | Lutein tan hoàn toàn |
| 2 | Lutein tan hoàn toàn |
| 3 | Lutein tan hoàn toàn |
| 4 | Lutein tan hoàn toàn |
| 5 | Lutein tan hoàn toàn |
| 6 | Lutein tan 1 phần |

Thực nghiệm cho thấy, sau một thời gian bảo quản ở nhiệt độ phòng thì các mẫu có nồng độ lutein từ 6 % trở lên, lutein dần tách ra ở dạng các hạt chất rắn nhỏ màu cam lơ lửng trong hệ, sau đó lắng xuống đáy. Điều này là do lutein không tan hết trong dầu nành. Do đó, tỷ lệ lutein trong dầu nành để thiết kế thí nghiệm là 5 % w/w.

3.4.1.4. Chọn tỷ lệ O/W và hàm lượng tween 80

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ O/W và hàm lượng tween 80 đến trạng thái hệ nhũ tương được trình bày ở bảng 3.51.

Bảng 3. 51. Trạng thái của hệ nhũ tương lutein khi thay đổi tỷ lệ tween 80

| Tỷ lệ O/W, (%, w/w) | Hàm lượng tween 80, (%, w/w) | Trạng thái cảm quan |
|------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 0,5 | 12 | Mờ đục |
| 0,5 | 14 | Trong suốt |
| 0,5 | 16 | Trong suốt |
| 0,5 | 18 | Trong suốt |
| 1,0 | 12 | Mờ đục |
| 1,0 | 14 | Trong suốt |
| 1,0 | 16 | Trong suốt |
| 1,0 | 18 | Trong suốt |
| 1,5 | 12 | Mờ đục |
| 1,5 | 14 | Mờ đục |
| 1,5 | 16 | Hơi đục |
| 1,5 | 18 | Hơi đục |

(Điều kiện: pha nước (W), pectin 0,06 %; pha dầu (O), 5 % lutein; span 60 4%)

Kết quả cho thấy, với cùng một tỷ lệ O/W như nhau khi nồng độ tween 80 càng cao thì hệ vi nhũ tương càng trong do các hạt vi nhũ tương lutein/dầu nanh sẽ được bao bọc bởi tween 80 càng nhiều, hệ càng được bảo vệ chống lại sự keo tụ, do đó hệ càng ổn định. Khi nồng độ tween 80 thấp (dưới 14 % w/w), càng tăng tỷ lệ O/W thì hệ càng đục, hệ vi nhũ tương lutein tạo thành không bền vững, các hạt nhũ tương dễ dàng bị keo tụ. Điều này được giải thích là do tween 80 là chất HĐBM ưa nước mạnh (có HLB = 15), hàm lượng tween 80 ảnh hưởng mạnh đến độ đục của hệ nhũ tương tạo thành [154], có nghĩa là nồng độ tween 80 dưới 14 % không đủ để bảo vệ các hạt vi nhũ tương khỏi sự keo tụ. Khi tỷ lệ tween 80 tăng lên thì hệ vi nhũ tương tạo thành rất bền, được phân tán và ổn định tốt trong môi trường nước. Tỷ lệ O/W $\geq 1,5$, hệ mờ đục ở các hàm lượng tween 80.

Ngoài ra, nếu tween 80 được sử dụng với hàm lượng quá cao, có thể tạo ra các micel, đóng vai trò như chất kết dính giữa tiểu phân và thúc đẩy hình thành kết tụ trong

nhũ tương [155]. Tween 80 là phân tử có phần đuôi kỵ nước dài chứa các liên kết chưa bão hòa hấp phụ lên bề mặt tiểu phân lutein và phần đầu lớn tạo ra hàng rào năng lượng không gian ngăn cản hiện tượng kết tụ.

Tween 80 với hàm lượng tối đa 18 % w/w cũng phù hợp với các công bố trước đây. Vì vậy, lựa chọn tỷ lệ O/W 1 % (w/w) và hàm lượng tween 80 từ 14 – 18 % để bào chế nhũ tương lutein.

Nhược điểm của tween 80 là tạo ra lớp hấp phụ mỏng trên bề mặt tiểu phân và tạo ra sự ổn định không gian giữa các tiểu phân kém hiệu quả hơn so với các polyme khối lượng phân tử lớn [156]. Vì vậy, tween 80 sẽ được nghiên cứu phối hợp với một polyme ưa nước.

3.4.1.5. Chọn hàm lượng span 60

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng span 60 đến trạng thái hệ nhũ tương được trình bày ở bảng 3.52.

Bảng 3. 52. Trạng thái của hệ nhũ tương lutein khi thay đổi hàm lượng span 60

| Mẫu | Hàm lượng span 60, % w/w | Trạng thái cảm quan |
|-----|--------------------------|---------------------|
| 1 | 1 | Hơi đục |
| 2 | 2 | Trong mờ |
| 3 | 3 | Trong suốt |
| 4 | 4 | Trong suốt |
| 5 | 5 | Mờ đục |

(Điều kiện: pha nước (W), pectin 0,06 %; pha dầu (O), 5 % lutein; tween 80 18 %)

Kết quả thực nghiệm cho thấy trong khoảng khảo sát thì hàm lượng span 60 có ảnh hưởng đến độ đục của nhũ tương lutein. Hàm lượng span 60 quá cao (≥ 5 % w/w) hoặc quá thấp (≤ 1 % w/w) đều ảnh hưởng đến sự bền vững của trạng thái vi nhũ tương. Nguyên nhân là do span 60 là chất nhũ hóa ưa dầu hơn (có HLB = 4,7), khi cho vào hệ nó sẽ hấp phụ tốt hơn trên các giọt dầu tạo thành lớp hấp phụ thứ nhất (lớp hấp phụ này có tác dụng làm giảm bớt sự cách biệt về độ phân cực giữa pha dầu và pha nước); sau đó các phân tử tween 80 (HLB = 15) sẽ hấp phụ tiếp tục tạo thành lớp hấp phụ thứ hai

ưa nước hơn, làm cho các giọt dầu phân tán và ổn định tốt hơn trong môi trường nước nên hệ sẽ trong suốt. Các tỷ lệ span/ tween tạo ra các hệ thống nhũ hóa có các giá trị HLB khác nhau. Span 60 tạo ra nhũ tương O/ W ổn định và hài hòa khi kết hợp với tween 80. Việc kết hợp sử dụng đồng thời span 60 (có HLB thấp hơn) bên cạnh tween 80 (có HLB cao hơn) là cần thiết vì khi đó sẽ tạo ra 2 lớp nhũ hóa hấp phụ tốt hơn trên bề mặt các vi hạt dầu, giúp làm giảm sự khác biệt về độ phân cực giữa pha dầu và pha nước hiệu quả hơn, do đó giúp bảo vệ hệ vi nhũ tương tốt hơn. Nếu hàm lượng span 60 quá thấp sẽ không đủ để tạo lớp nhũ hóa thứ nhất, ảnh hưởng đến khả năng nhũ hóa của tween 80 nên hệ kém ổn định, các giọt dầu dễ keo tụ và làm hệ bị đục. Ngược lại, hàm lượng span 60 lớn quá thì lượng span 60 dư thừa sẽ hấp phụ cạnh tranh với tween 80, làm cho hệ kém ưa nước và trở nên đục hơn. Vì vậy, lựa chọn hàm lượng span 60 từ 2 – 4 % để bào chế nhũ tương lutein.

3.4.1.6. Lựa chọn polyme ưa nước

Nhũ tương nano được tạo thành kém ổn định về mặt nhiệt động học. Hệ tiêu phân nano sẽ giảm năng lượng bề mặt bằng cách kết tụ hoặc hòa tan và kết tinh trở lại của tiểu phân nhỏ hơn thành tiểu phân lớn hơn (kết tụ Ostwald) [157], [155]. Mặc dù nhũ tương này đã sử dụng chất hoạt động bề mặt nhưng do tween 80 là phân tử nhỏ, tạo ra lớp hấp phụ mỏng trên bề mặt tiểu phân và tạo ra sự ổn định không gian giữa các tiểu phân kém hiệu quả hơn so với các polyme khối lượng phân tử lớn [156]. Vì vậy, kết hợp tween 80 với polyme ưa nước là cần thiết. Sự có mặt của các polyme này trong nhũ tương nano có thể làm giảm năng lượng bề mặt tiểu phân bằng cách hấp phụ trên bề mặt tạo thành lớp áo ưa nước ngăn chặn quá trình kết tụ hoặc tạo sự công kênh về mặt không gian và tích điện cho bề mặt tiểu phân [158]. Trong khuôn khổ các hướng nghiên cứu của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ lọc, hóa dầu, pectin là một polyme ưa nước được chọn để tiến hành khảo sát.

Pectin là một heteropolysaccharit tự nhiên được sử dụng trong dược phẩm và thực phẩm như một chất tạo gel và chất ổn định nhờ khả năng làm tăng độ nhớt của nhũ tương và giảm sức căng bề mặt giữa dầu và nước hoặc để tạo kết cấu nhũ tương [159]. Pectin cũng tham gia vào sự hình thành các hạt nano như một phương tiện vận chuyển thuốc.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng pectin đến trạng thái hệ nhũ tương được trình bày ở bảng 3.53.

Bảng 3. 53. Trạng thái của hệ nhũ tương lutein khi thay đổi hàm lượng pectin

| Mẫu | Hàm lượng pectin, % w/w | Trạng thái cảm quan |
|-----|-------------------------|----------------------------|
| 1 | 0,02 | Trong suốt |
| 2 | 0,04 | Trong suốt |
| 3 | 0,06 | Trong suốt |
| 4 | 0,07 | Pectin không tan hoàn toàn |
| 5 | 0,08 | Pectin không tan hoàn toàn |

(Điều kiện: pha dầu (O), 5 % lutein; tween 80 18 %; span 60 4 %)

Kết quả cho thấy, pectin có nồng độ trên 0,06 % không tan hết trong nước. Vì vậy, lựa chọn hàm lượng pectin từ 0,02 – 0,064 % để bào chế nhũ tương lutein.

Quá trình bào chế dạng nhũ tương nano sẽ tạo ra diện tích bề mặt lớn làm thay đổi năng lượng tự do Gibbs. Nhũ tương nano được tạo thành kém ổn định về mặt nhiệt động học và có xu hướng giảm tổng năng lượng bằng cách kết tụ trở lại. Về mặt động lực học, quá trình kết tụ phụ thuộc vào năng lượng hoạt hóa và năng lượng này bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của polyme ổn định [160]. Các polyme có tác dụng làm giảm kết tụ tiểu phân do tạo sự cồng kênh về không gian và tích điện bề mặt tiểu phân [158]. Do đó, bên cạnh vai trò của chất hoạt động bề mặt, các polyme có vai trò quan trọng đối với nhũ tương nano. Việc sử dụng kết hợp chất hoạt động bề mặt với polyme làm tăng tính ổn định của nhũ tương nano [157].

Mặc dù khá nhiều công trình nghiên cứu về dạng bào chế nhũ tương nano đã được công bố, việc đánh giá và so sánh khả năng của các polyme đến tính ổn định của nhũ tương nano còn rất ít. Polyme ưa nước cùng với chất hoạt động bề mặt tạo ra hàng rào năng lượng, giúp ngăn chặn quá trình kết tụ Ostwald. Đồng thời, sự có mặt của các polyme còn làm tăng độ nhớt, tăng năng lượng biến dạng để phá vỡ tiểu phân [155].

3.4.2. Thiết kế thí nghiệm

Công thức nhũ tương nano lutein được thiết kế theo bảng 3.54.

Bảng 3. 54. Công thức nhũ tương nano

| Stt | Thành phần | Hàm lượng |
|-----|----------------|-----------|
| 1 | Lutein | 5 % |
| 2 | Dầu đậu nành | 1 % |
| 3 | Tween 80 | Thay đổi |
| 4 | Span 60 | Thay đổi |
| 5 | Pectin | Thay đổi |
| 6 | Nước cất 2 lần | 100 ml |

Chú thích:

- Hàm lượng lutein được tính theo khối lượng pha dầu (% w/w)
- Hàm lượng dầu nành, tween 80, span 60, pectin được tính theo khối lượng của toàn hệ sau khi nước được thêm vào (% w/w).

Biến đầu vào trong thiết kế thí nghiệm tối ưu hoá nhũ tương chứa lutein như ở bảng 3.55.

Bảng 3. 55. Biến đầu vào

| Biến độc lập | Kí hiệu | Mức thấp | Mức cao |
|--------------|----------------|----------|---------|
| Tween 80, % | X ₁ | 14 | 18 |
| Span 60, % | X ₂ | 2 | 4 |
| Pectin, % | X ₃ | 0,02 | 0,06 |

Hàm mục tiêu:

- Kích thước nhũ tương nano trung bình (Y₁): $Y_1 \leq 100$ nm.
- Độ ổn định của nhũ tương (Y₂): $Y_2 \rightarrow \max$ (ngày).

Ma trận thí nghiệm được thiết kế bằng phần mềm Modde gồm 17 thí nghiệm. Các công thức nhũ tương nano chứa lutein được bào chế và đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng của nhũ tương nano, kết quả được trình bày ở bảng 3.56.

Bảng 3. 56. Ma trận thí nghiệm và biến phụ thuộc

| Thí nghiệm | X₁ | X₂ | X₃ | Y₁ | Y₂ |
|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| TN1 | 14 | 2 | 0,02 | 109 | 24 |
| TN2 | 18 | 2 | 0,02 | 75 | 23 |
| TN3 | 14 | 4 | 0,02 | 89 | 37 |
| TN4 | 18 | 4 | 0,02 | 56 | 38 |
| TN5 | 14 | 2 | 0,06 | 111 | 33 |
| TN6 | 18 | 2 | 0,06 | 75 | 33 |
| TN7 | 14 | 4 | 0,06 | 89 | 44 |
| TN8 | 18 | 4 | 0,06 | 55 | 44 |
| TN9 | 14 | 3 | 0,04 | 99 | 34 |
| TN10 | 18 | 3 | 0,04 | 65 | 33 |
| TN11 | 16 | 2 | 0,04 | 93 | 27 |
| TN12 | 16 | 4 | 0,04 | 72 | 41 |
| TN13 | 16 | 3 | 0,02 | 82 | 31 |
| TN14 | 16 | 3 | 0,06 | 82 | 39 |
| TN15 | 16 | 3 | 0,04 | 82 | 33 |
| TN16 | 16 | 3 | 0,04 | 82 | 33 |
| TN17 | 16 | 3 | 0,04 | 83 | 33 |

3.4.3. Phân tích quy luật tác động

Dữ liệu thực nghiệm của 17 công thức nhũ tương nano chứa lutein được xử lý bằng phần mềm Modde nhằm phân tích chiều hướng ảnh hưởng của biến đầu vào đối với hàm mục tiêu và sau đó được tối ưu hóa thực nghiệm.

Mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy của các yếu tố được trình bày ở bảng 3.57.

Bảng 3. 57. Mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy của các yếu tố tối ưu

| Yếu tố | Y ₁ (KTTP) | | Y ₂ (DOD) | |
|-------------------------------|-----------------------|-------------|----------------------|------------|
| | E | p | E | p |
| X ₁ | 0,1041 | 4,2226e-013 | 0,1769 | 0,6681 |
| X ₂ | 0,1041 | 1,5679e-011 | 0,1769 | 1,6298e-08 |
| X ₃ | 0,1041 | 0,472216 | 0,1769 | 4,1999e-07 |
| X ₁ X ₁ | 0,1589 | 0,785469 | 0,2702 | 0,924728 |
| X ₂ X ₂ | 0,1589 | 0,361794 | 0,2702 | 0,560259 |
| X ₃ X ₃ | 0,1589 | 0,785462 | 0,27012 | 0,0819046 |
| X ₁ X ₂ | 0,0920 | 0,0382016 | 0,1564 | 0,350425 |
| X ₁ X ₃ | 0,0920 | 0,0382013 | 0,1564 | 1 |
| X ₂ X ₃ | 0,0920 | 0,0382013 | 0,1564 | 0,0199063 |

E: Mức độ ảnh hưởng

p: Độ tin cậy

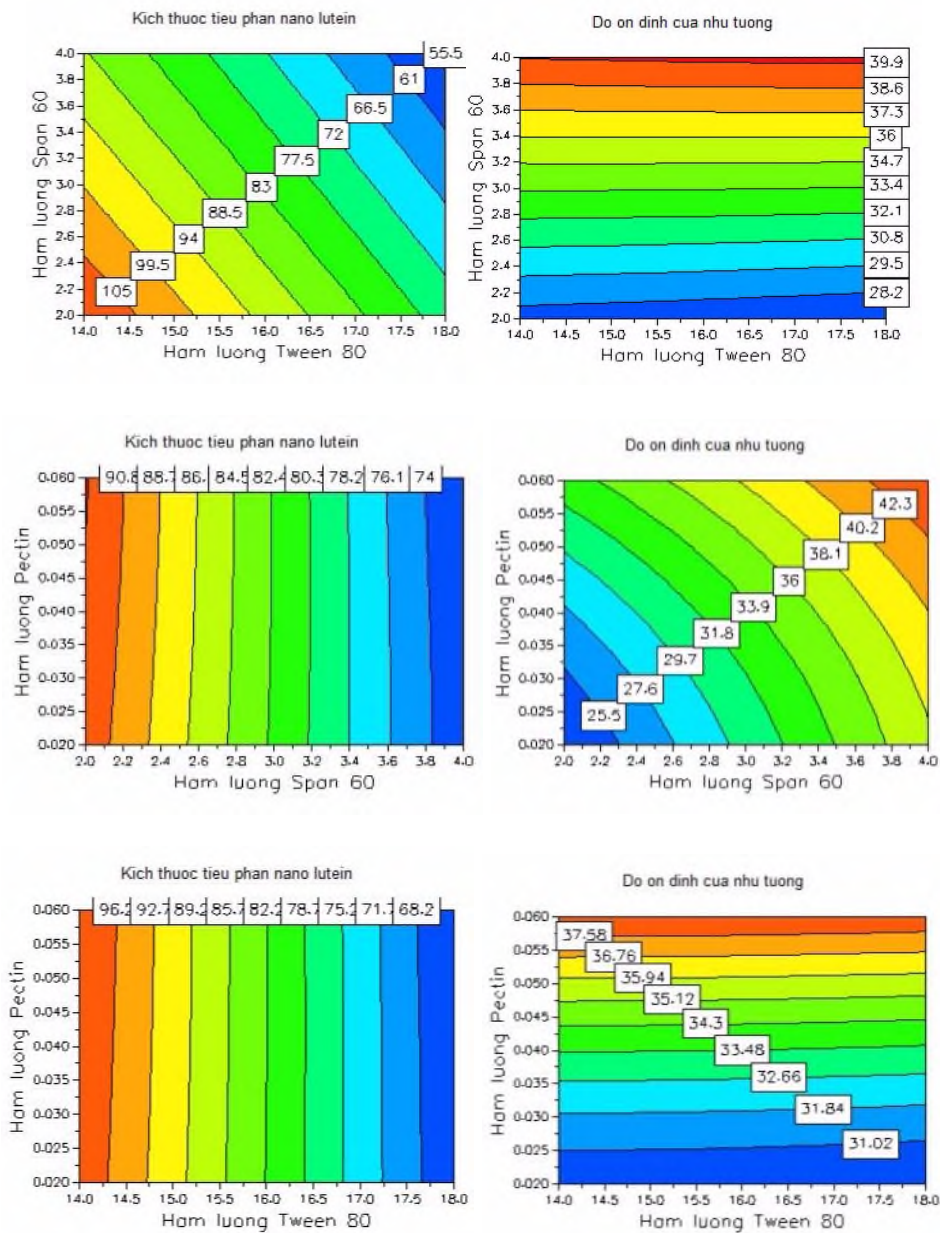
Phân tích giá trị E cho thấy kích thước tiểu phân và độ ổn định bị ảnh hưởng bởi hàm lượng tween 80, span 60 và pectin, tuy nhiên với mức độ khác nhau. Trong đó, tween 80 ảnh hưởng mạnh nhất đến kích thước tiểu phân nhũ tương nano lutein nhưng ít ảnh hưởng tới độ ổn định của nhũ tương. Hàm lượng span 60 và pectin ảnh hưởng mạnh tới độ ổn định của nhũ tương. Pectin không có ảnh hưởng nhiều tới sự hình thành kích thước tiểu phân nhũ tương nano lutein.

Từ kết quả bảng 4 xác định được các biến của phương trình hồi quy trong mô hình thực nghiệm, đó là các yếu tố có độ tin cậy $p < 0,05$ [149], [161]. Như vậy, hàm mục tiêu Y₁ sẽ phụ thuộc vào các yếu tố: X₁, X₂, X₁X₂, X₁X₃ và X₂X₃. Hàm mục tiêu Y₂ phụ thuộc vào các yếu tố: X₂, X₃ và X₂X₃. Phương trình hồi quy có dạng:

$$Y_1 = 82,2328 - 13,519 X_1 - 8,06399 X_2 + 0,234379 X_1X_2 - 0,23438 X_1X_3 - 0,23438 X_2X_3.$$

$$Y_2 = 33,4708 + 5,06543 X_2 + 3,1659 X_3 - 0,469286 X_2X_3.$$

Sự ảnh hưởng đồng thời của hai trong ba yếu tố tối ưu cũng được biểu diễn bằng hình 3. 56.



Hình 3. 56. Biểu diễn đường đồng mức của các yếu tố.

Phân tích ANOVA cho kết quả hệ số hồi quy (R^2) của hàm Y_1 , Y_2 lần lượt là 0,999 và 0,994. Theo Castillo (2007), giá trị $R^2 > 0,75$ thể hiện mô hình được xây dựng tương thích với thực nghiệm [161]. Điều này nghĩa là các biến đầu vào có mối tương quan chặt chẽ với các hàm mục tiêu, mô hình thực nghiệm có tính chính xác, độ tin cậy cao và có sự tồn tại của điểm tối ưu.

3.4.4. Lựa chọn công thức bào chế nhũ tương nano tối ưu

Phần mềm Modde cho biết công thức tạo nhũ tương nano chứa lutein như sau: lutein trong dầu, 5 %; dầu đậu nành, 1 %; tween 80, 18 %; span 60, 4 %; pectin, 0,06 %; nước cất 2 lần, 100 ml.

Kết quả đầu ra của công thức tối ưu được dự đoán như trong bảng 3.58.

Bảng 3. 58. Kết quả đầu ra công thức tối ưu

| Hàm mục tiêu | Y1, nm | Y2, ngày |
|--------------|--------|----------|
| Kết quả | 54,83 | 44,78 |

Kết quả bào chế nhũ tương nano lutein 3 lần, mỗi lần 500 ml được trình bày trong bảng 3.59.

Bảng 3. 59. Đánh giá công thức tối ưu

| Hàm mục tiêu | Lần 1 | Lần 2 | Lần 3 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Y1, nm | 56,12 ± 1,50 | 55,68 ± 0,91 | 56,2 ± 1,09 |
| Y2, ngày | 42,52 ± 2,51 | 44,14 ± 1,63 | 43,50 ± 2,11 |

Kết quả tương đồng với kết quả đã được dự đoán, chứng tỏ bộ dữ liệu tối ưu hóa có độ tin cậy cao.

Kết quả thực nghiệm phân tích qua phần mềm Modde cho thấy, kích thước tiểu phân và độ ổn định của nhũ tương nano lutein bị ảnh hưởng bởi hàm lượng tween 80, span 60 và pectin nhưng với mức độ khác nhau. Trong đó, tween 80 ảnh hưởng mạnh nhất đến kích thước tiểu phân nhũ tương nano lutein nhưng ít ảnh hưởng tới độ ổn định của nhũ tương. Pectin không có ảnh hưởng nhiều tới sự hình thành kích thước tiểu phân nano nhưng ảnh hưởng lớn tới độ ổn định của nhũ tương nano lutein. Độ ổn định của nhũ tương nano bị ảnh hưởng lớn bởi lượng span 60 và pectin. Khi tăng lượng span 60 và pectin, độ ổn định của nhũ tương nano lutein tăng. Kết quả này phù hợp với công bố của Bertrand Muhoza [162].

Vậy, nhũ tương nano lutein đã được bào chế với công thức tối ưu là: lutein (5 % trong pha dầu), dầu đậu nành (1 %), tween 80 (18 %), span 60 (4 %), pectin (0,06 %) và nước cất 2 lần (100 ml).

So với sản phẩm vi nhũ tương lutein mà tác giả Hoàng Thị Huệ An và cộng sự [139] đã bào chế, nhũ tương nano lutein đề tài luận án có kích thước nhỏ hơn rất nhiều, kích thước tiểu phân trung bình đạt tiêu chuẩn dược phẩm (<100 nm) [135], độ ổn định lâu hơn. Sau 24 tháng ở điều kiện bảo quản, quan sát ngoại quan cho thấy hệ nhũ tương không tách lớp, kích thước tiểu phân trung bình đo được là 97 nm. Điều này được giải thích là do dù cùng sử dụng chất hoạt động bề mặt là tween 80, đây là phân tử có phần đuôi kỵ nước dài chứa các liên kết chưa bão hòa, tạo ra lớp hấp phụ mỏng trên bề mặt tiểu phân nhưng nhược điểm của tween 80 là tạo ra sự ổn định không gian giữa các tiểu phân kém hiệu quả hơn so với các polyme có khối lượng phân tử lớn hơn. Đề tài luận án đã phối hợp tween 80 với pectin là một polyme ưa nước. Sử dụng kết hợp tween 80 với pectin đã làm tăng độ ổn định của nhũ tương nano. Sự có mặt của các pectin còn làm tăng độ nhớt, tăng năng lượng biến dạng để phá vỡ tiểu phân dẫn đến kích thước tiểu phân giảm. Ngoài ra, span 60 có chiều dài chuỗi alkyl dài nhất so với các dòng span khác (span 20, span 40, span 80) giúp làm tăng sự bám của thuốc trong các niosomes [154].

3.4.5. Một số tính chất hóa - lý của hệ vi nhũ tương lutein

Bảng 3. 60. Một số tính chất hóa - lý của hệ vi nhũ tương lutein

| STT | Tính chất | Đặc tính |
|-----|------------------------|-----------------------|
| 1 | Cảm quan | Trong, màu cam đậm |
| 2 | Độ khúc xạ ánh sáng | $1,35 \pm 0,02$ |
| 4 | Tỷ trọng, g/ml | $1,02 \pm 0,01$ |
| 5 | Độ tan trong nước | tan vô hạn trong nước |
| 6 | Hàm lượng lutein, mg/l | 6,6 |



Hình 3. 57. Các sản phẩm vi nhũ tương lutein

Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng từ một hợp chất kém phân cực (kém tan trong nước) khi được bào chế dưới dạng vi nhũ tương, lutein trở nên tan rất tốt trong nước. Điều này được giải thích là do có sự hình thành các liên kết giữa lutein với các phân tử chất nhũ hóa, tạo nên hạt micelle có các phân tử chất HDBM bao quanh trong đó phân cực hướng về pha nước.

3.5. TÁI SỬ DỤNG CÁC NGUỒN THẢI TRONG QUÁ TRÌNH CHIẾT TÁCH LUTEIN TỪ HOA CÚC VẠN THỌ

Nguồn phát thải lỏng trong quá trình nghiên cứu chủ yếu là từ quá trình rửa xà phòng và trung hòa, vệ sinh thiết bị. Nước trong các quá trình này sẽ được thu gom và đưa tới thiết bị xử lý nước thải sẵn có của Viện hóa học Công nghiệp Việt Nam để lắng, lọc và trung hòa tới pH =7 (nếu cần) trước khi thải ra môi trường. Trong quá trình tiền xử lý nguyên liệu, lượng nước chứa tác nhân tiền xử lý axit citric được sử dụng cũng tương đối lớn nên cần có phương pháp thu hồi và tái sử dụng phù hợp. Đối với các chất thải rắn, chủ yếu là bã chiết, tiến hành nghiên cứu xử lý tạo ra sản phẩm phụ sử dụng được trong nông nghiệp và không ảnh hưởng tới môi trường.

3.5.1. Thu hồi và tái sử dụng tác nhân tiền xử lý

Kết quả nghiên cứu số lần tái sử dụng tác nhân tiền xử lý được trình bày trong bảng 3.61.

Bảng 3. 61. Kết quả khảo sát số lần tái sử dụng tác nhân tiền xử lý

| Số lần | Nồng độ axit citric sau tiền xử lý (%) | Hiện tượng |
|--------|--|--|
| 1 | 0,21 | Bột CVT giữ nguyên màu sắc, dung dịch tiền xử lý thu hồi có màu vàng cam, độ trong gần như lúc đầu |
| 2 | 0,24 | Bột CVT giữ nguyên màu sắc, dung dịch tiền xử lý thu hồi có màu vàng cam, độ trong gần như lúc đầu |
| 3 | 0,24 | Bột CVT giữ nguyên màu sắc, dung dịch tiền xử lý thu hồi có màu vàng cam, đục hơn lúc đầu |
| 4 | 0,26 | Bột CVT giữ nguyên màu sắc, dịch thu hồi có màu vàng cam, đục hơn thấy rõ, khá nhớt |
| 5 | 0,30 | Bột CVT giữ nguyên màu sắc, dịch thu hồi có màu vàng cam ám đen, độ nhớt khá cao và tạt nhiều. |

(Điều kiện: nồng độ axit citric 0,6 %; 50 °C)

Kết quả cho thấy, sau 4 lần tái sử dụng, tác nhân tiền xử lý lần nhiều tạp hữu cơ, biến màu nên được bổ sung NaOH để đưa pH về 7 trước khi sử dụng làm nước tưới quá trình chế tạo phân bón hoặc rửa khu vực chế tạo phân bón.

3.5.2. Xử lý bã chiết

3.5.2.1. Xử lý bã chiết làm phân bón

Kết quả nghiên cứu xử lý bã chiết làm phân bón được trình bày ở bảng 3.62.

Bảng 3. 62. Kết quả xử lý bã chiết làm phân bón

| Nguyên liệu | Mẻ phối trộn | | |
|--------------------------|--------------|---------|---------|
| | KK- 01 | KK-02 | KK-03 |
| Bã thải bột cục vụn thọt | 3,50 kg | 3,50 kg | 3,50 kg |
| Phân chuồng | 1,50 kg | 1,50 kg | 1,50 kg |
| Phân lân | 150 g | 150 g | 150 g |
| Chế phẩm Trichoderma | 5 g | 5 g | 5 g |
| Chế phẩm xử lý | 0 mL | 50 mL | 50 mL |
| Tổng | 4,00 kg | 3,55 kg | 3,60 kg |

KK- 01: Mẻ số 1 (không sử dụng chế phẩm Avo)

KK-02: Mẻ số 2 (sử dụng chế phẩm avoT1 và chất phụ gia avoAdd)

KK-03: Mẻ số 3 (sử dụng chế phẩm avoT1 và không có chất phụ gia avoAdd).

Kết quả cho thấy, quá trình ủ với các chế phẩm sinh học đã tạo ra phân bón hữu cơ vi sinh từ bã thải bột CVT. Phân bón hữu cơ này giúp tăng thêm độ màu mỡ, độ tơi xốp cho đất bằng cách cung cấp thêm các chất hữu cơ, chất mùn và dinh dưỡng như axit humic, axit fulvic, axit amin, các enzym amylaza, pectinaza, proteaza, xelulaza và khoáng vô cơ N, P mà cây trồng có thể hấp thu được. Đây là sản phẩm phụ có thể dùng bón trực tiếp cho cây trồng, hoa màu hoặc vùng cây nguyên liệu Cục vụn thọt.

3.5.2.3. Xử lý mùi trong quá trình làm phân bón

Kết quả khảo sát hàm lượng H₂S và NH₃ phát sinh trong quá trình ủ phân kỵ khí được trình bày ở bảng 3.63.

Bảng 3. 63. Kết quả khảo sát hàm lượng H₂S và NH₃ phát sinh trong quá trình ủ phân bón

| Chỉ tiêu | Phương pháp phân tích | Kết quả thử nghiệm | | |
|-------------------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | KK-01 (2 lần) | KK-02 (4 lần) | KK-03 (4 lần) |
| H ₂ S, mg/m ³ | MASA Method 701 | 0,28 – 0,23 | 0,22 – 0,47 – 0,19 – 0,09 | 0,27 – 0,60 – 0,28 – 0,17 |
| NH ₃ , mg/m ³ | TCVN 5293:1995 | 0,41 – 0,35 | 0,36 – 0,62 – 0,22 – 0,15 | 0,39 – 0,68 – 0,30 – 0,18 |

* Mẫu KK-01 được lấy 2 lần vào ngày đầu và ngày thứ 40

* Mẫu KK-02 và KK-03 được lấy 4 lần vào ngày đầu và ngày thứ 10, 20 và 35.

Kết quả chỉ ra rằng, sử dụng kết hợp avoAdd với chế phẩm avoT1 làm giảm thời gian xử lý bã chiết CVT từ 40 ngày xuống còn 35 ngày. Ngay từ ngày bắt đầu xử lý đến ngày cuối cùng xử lý, giá trị đo H₂S, NH₃ của KK-01 đều cao hơn KK-02 và KK-03, thêm vào đó, sau 35 ngày giá trị H₂S và NH₃ của KK-01 giảm khá ít. Giá trị H₂S và NH₃ của KK-02 ở cùng thời điểm đều nhỏ hơn KK-03, điều này là do phụ gia avoAdd kết hợp với avoT1 (với thành phần chứa enzyme tyrosinaza, xenluaza, amylaza, proteaza, lipaza, pectinaza, ... axit lactic, axit citric, muối khoáng) làm tăng khả năng khử mùi và phân hủy chất thải hữu cơ.

Trong 10 ngày đầu các giá trị đo H₂S và NH₃ của KK-02 và KK-03 đều tăng rất cao thể hiện đúng bản chất của quá trình phân hủy, trong thời gian đầu các chất thải và khí thải phân hủy nhiều nhất, mặc dù có giá trị đo của H₂S và NH₃ cao. Trong trường hợp không sử dụng chế phẩm, nồng độ H₂S và NH₃ có thể tăng mạnh hơn. Do vậy cần sử dụng bổ sung avoA1 khử mùi xung quanh trong 10 ngày đầu và trong lúc đảo trộn rác thải. Sau 10 ngày xử lý, các giá trị đo H₂S và NH₃ đều giảm nhanh.

Tỷ lệ giảm phát sinh H₂S và NH₃ của mẫu KK-02 đều cao hơn so với KK-03, cụ thể mức giảm phát thải H₂S của mẫu KK-02 là 60 % so với 40 % của mẫu KK-03, mức giảm phát thải NH₃ của mẫu KK-02 là 60 % so với 55 % của mẫu KK-03.

Thể tích khối rác xử lý của các mẫu có sử dụng chế phẩm đều giảm nhiều hơn mẫu phân hủy tự nhiên (mức giảm 30 % so với 20 % ở mẫu phân hủy tự nhiên). Mặc dù hai

mẫu có sử dụng chế phẩm KK-02 và KK-03 được bổ sung nhưng gần như không có nước rỉ. Trong quá trình ủ phân, nhiệt độ trong phân tăng lên và đạt 40 – 50 °C, sự nảy mầm của hạt cỏ bị ức chế, các loại mầm bệnh có trong phân chuồng gây bệnh cho người và gia súc bị diệt.

Vậy, bã chiết CVT sử dụng kết hợp với các chế phẩm Avo đã được xử lý thành phân bón hữu cơ với lượng mùi, khí độc thấp. không phát sinh nước rỉ. Phân hữu cơ sau khi ủ có thể sử dụng tốt cho cây ăn trái, cây công nghiệp, các loại rau màu Sản phẩm phụ này đã giúp quá trình chiết tách lutein từ hoa CVT ít phát thải, tạo ra sản phẩm phụ có giá trị.

KẾT LUẬN

Sau một thời gian thực hiện, luận án đã đạt được những kết quả như sau:

1. Đã xây dựng được qui trình ổn định chiết xuất hoạt chất lutein và zeaxanthin từ hoa Cúc vạn thọ trong phòng thí nghiệm với các bước liên tiếp như sau:
 - Sấy chân không cánh hoa CVT: 50 °C, 16 giờ;
 - Bột CVT khô được tiền xử bằng axit citric 0,6 % ở 50 °C, 2 giờ, tỉ lệ tác nhân/nguyên liệu 10/1 (v/v). Hiệu suất thu hồi đạt 92,95 %;
 - Chiết lutein, zeaxanthin este từ bột CVT khô bằng etyl axetat, 6 giờ, 60 °C, tỷ lệ dung môi 10/1 (v/w), 200 vòng/phút, 2 lần chiết; Hiệu suất chiết đạt 92,95 %;
 - Cao chiết được hòa tan trong etanol/nước (7/3, v/v) và làm giàu; cao chiết/etanol-nước/*n*-hexan = 1/10/15, chiết 2 lần, 10 phút/lần, 60 °C. Hiệu suất làm giàu cao chiết 96,9 %;
 - Thủy phân cao chiết: KOH(C₂H₅OH) /cao chiết = 0,18 (w/w), nồng độ KOH trong C₂H₅OH = 0,144 (g/ml), nồng độ cao chiết = 0,8 g/mL, 70 °C, 80 phút. Hiệu suất thủy phân đạt 82,94 %;
 - Tinh chế lutein: etanol/nước = 1/1 (v/v); 50 °C, tỷ lệ dung môi/lutein = 100/1 (v/w). Hiệu suất tinh chế đạt 76,3 %. Sản phẩm sau quá trình tinh chế có hàm lượng lutein tổng đạt 96 %. Đây là một Giải pháp hữu ích đã được công nhận và cấp Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích số 2730 (2021) ở Việt Nam.
2. Đã ứng dụng qui trình chiết xuất hoạt chất lutein và zeaxanthin từ hoa Cúc vạn thọ trên để bào chế hỗn hợp lutein và zeaxanthin ở qui mô lớn với hiệu suất các quá trình chiết lutein este, làm giàu cao chiết, thủy phân cao chiết, tinh chế lutein lần lượt là: 88,92 %; 95,4 %; 75 %; 88 %. Kết quả thu được 10 kg sản phẩm có hàm lượng lutein tổng 92,9 % với 85,85 % lutein và 7,05 % zeaxanthin (theo kết quả kiểm nghiệm độc lập tại Trung tâm kiểm nghiệm – Viện Thực phẩm chức năng). Sản phẩm đạt tiêu chuẩn dược điển Mĩ USP 40, tiến tới có thể thương mại hóa lutein cho ngành dược phẩm trong nước.
3. Đã phân lập lutein và zeaxanthin từ hỗn hợp sản phẩm bằng phương pháp sắc ký cột silica gel. Từ hỗn hợp sản phẩm chứa 96 % lutein tổng đã phân lập được 260 mg chất chuẩn lutein (hàm lượng trên 98 %) và 6 mg chất chuẩn zeaxanthin (hàm lượng trên 95 %) đạt chỉ tiêu chất lượng làm chất chuẩn phân tích cho HPLC. Lutein và zeaxanthin đạt chất lượng chất chuẩn ở Việt Nam và kết quả này lần đầu tiên đạt được ở trong nước.

4. Đã kiểm nghiệm chất lượng sản phẩm hỗn hợp lutein chiết tách được. Sản phẩm có độ ổn định cao trên 9 tháng trong môi trường chân không, tránh ánh sáng ở - 10 °C. Sản phẩm có thể bảo quản ở nhiệt độ thường, tuy nhiên sau 9 tháng chất lượng bị giảm nhẹ. Sản phẩm không có độc tính cấp và độc tính bán trường diễn khi sử dụng đúng liều và đúng thời gian.
5. Đã bào chế được 1500 mL nhũ tương nano lutein với công thức tối ưu được xác định là: lutein (5 % trong dầu nành), dầu nành (1 %), tween 80 (18 %), span 60 (4 %), pectin (0,06 %) và nước cất 2 lần (100 ml). Sản phẩm nhũ tương nano lutein có kích thước tiểu phân nano đạt xấp xỉ 56 nm, không thay đổi về kích thước và hình dạng sau 43-44 ngày. Nhũ tương nano lutein tan vô hạn trong nước, có độ ổn định lớn và lần đầu được bào chế. Sau 24 tháng ở điều kiện bảo quản, hệ nhũ tương không tách lớp, kích thước tiểu phân 97 nm.
6. Đã nghiên cứu tái sử dụng các nguồn phát thải trong quá trình chiết tách, tinh chế lutein như nghiên cứu thu hồi, tái sử dụng tác nhân tiền xử lý, dung môi chiết và bã chiết được ủ làm phân bón hữu cơ. Đây là một công nghệ khép kín, không chất thải.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Nghiên cứu một cách hệ thống quy trình chiết tách, tinh chế lutein và zeaxanthin từ cánh hoa Cúc vạn thọ, từ chế biến sơ bộ nguyên liệu đến bảo quản sản phẩm. Lutein tự do thu được sau quá trình thủy phân cao chiết đã được kết tinh lại ở 50 °C với hệ dung môi etanol/nước (tỷ lệ 1/1 v/v) để được lutein có độ tinh khiết cao đạt tiêu chuẩn dược điển Mỹ USP 40. Phương pháp cho phép kết tinh lại được lutein có độ tinh khiết cao, thời gian kết tinh rất ngắn, lượng dung môi ít, không sử dụng bất kì dung môi độc hại nào nên có thể triển khai ở quy mô công nghiệp.
2. Phân lập lutein và zeaxanthin từ hỗn hợp sản phẩm bằng phương pháp sắc ký cột silica gel. Từ hỗn hợp sản phẩm chứa 96 % lutein tổng đã phân lập được 260 mg chất chuẩn lutein (hàm lượng trên 98 %) và 6 mg chất chuẩn zeaxanthin (hàm lượng trên 95 %) đạt chỉ tiêu chất lượng làm chất chuẩn phân tích cho HPLC.
3. Bào chế thành công nhũ tương nano chứa lutein với công thức tối ưu được xác định là: lutein (0,5 % trong dầu đậu nành), dầu đậu nành (1 %), tween 80 (18 %), span 60 (4 %), pectin (0,06 %) và nước cất 2 lần (100 ml). Theo đó, kích thước tiểu phân nano đạt xấp xỉ 56 nm, không thay đổi về kích thước và hình dạng sau 43-44 ngày. Sau 24 tháng, ở điều kiện bảo quản, hệ nhũ tương không tách lớp, kích thước tiểu phân là 97 nm.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ

Công trình đã công bố

1. Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Trần Văn Hiếu, Hoàng Thị Huệ An, Nguyễn Thị Bảy, Trần Minh Thư, Nguyễn Thanh Bình, Vũ Thị Thu Hà (2018). “*Ảnh hưởng của dung môi và các điều kiện chiết trong quá trình chiết lutein từ hoa cúc vạn thọ*”, Tạp chí Hóa học, tập 56, số 6E₁, trang 90–93.
2. Nguyen Thi Minh Nguyet, Vu Thi Thu Ha, Nguyen Thanh Binh, Nguyen Minh Dang, Nguyen Thi Bay (2019). “*Quantification of lutein from Marigold flower (Tagetes erecta L.) petals by liquid chromatography – tandem mass spectrometry method*”, Vietnam Journal of Chemistry, vol. 57, no. 2, pp. 240–244.
DOI: 10.1002/vjch.201900020
3. Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Vũ Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Bảy, Nguyễn Phương Hòa, Nguyễn Hoàng Ngân, Nguyễn Thanh Bình (2021). “*Nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn của lutein và zeaxanthin chiết tách từ hoa cúc vạn thọ (Tageles erecta L.)*”, Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học, tập 26, số 2, trang 208–213.
4. Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Thị Bảy, Bạch Thị Tâm, Nguyễn Thanh Bình, Vũ Thị Thu Hà (2021). “*Ảnh hưởng của pectin và các chất nhũ hóa đến kích thước và độ ổn định của nhũ tương nano lutein*”, Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học, tập 20, số đặc biệt, trang 65-69.

Sáng chế khoa học

1. Vũ Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Minh Đăng, Nguyễn Thị Phương Hòa, Nguyễn Thị Bảy (2021). “*Phương pháp tinh chế lutein thu được từ quá trình xà phòng hóa cao chiết (oleoresin) hoa cúc vạn thọ (TAGELES ERECTA L.)*”, Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích, số 2730.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y Tế (2012). *Thông tư Hướng dẫn việc quản lý phụ gia thực phẩm*, Số 27/2012/TT-BYT.
2. European food safety authority (2010). Scientific opinion on the re-evaluation of lutein (E 161b) as a food additive EFSA panel on food additives and nutrient sources added to food (ASN), *Journal European food safety authority*, 8: 1–39.
3. Richard, C. (2004). Lutein from *Tagetes erecta*, *Chemical and Technical Assessment*, 63rd JECFA.
4. Landrum, J.T., Bone, R.A (2001). Lutein, zeaxanthin, and the macula pigment, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385: 28-40.
5. Chandrika, U. G., Salim, N., Wijepala, G. D. D. J., Perera, K. S. U., and Goonetilleke, A. K. E. (2011). Carotenoid and mineral content of different morphotypes of *Centella asiatica* L. (*Gotukola*), *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 62: 552-557.
6. Neal E. Craft (1992). Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and beta-Carotene in Organic Solvents, *J. Agric and Food Chem.*, 40: 431-434.
7. Ranjita Shegokar, Khalil Mitri (2012). Carotenoid Lutein: A promising Candidate for Pharmaceutical and Nutraceutical Applications, *Journal of Dietary Supplements*, 9(3): 183–210.
8. Ammayappan Rajam Srividya, Vaithiyalingam Jagannathan Vishnuvarthan (2014). Physical, chemical and biological properties of lutein: *A review*, 3(5): 105-118.
9. Paul S. Bernstein, Binxing Li, Preejith P. Vachali, Aruna Gorusupudi, Rajalekshmy Shyam, Bradley S. Henriksen, John M. Nolan (2015). Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease, *Journal of Progress in Retinal and Eye Research*: 1-33.
10. Daly, T., Jiwan, M. A., O'Brien, N. M., and Aherne, S. A. (2010). Carotenoid content of commonly consumed herbs and assessment of their bioaccessibility using an in vitro digestion model, *Plant Food Hum. Nutr.*, 65: 164-169.
11. Guil-Guerrero, J. L. and Reboloso-Fuentes, M. M. (2008). Nutrient composition of *Chlorella* sp. And *Monodus subterraneus* cultured in a bubble column bioreactor, *Food Biotechnol.*, 22: 218-233.

12. Kobori, C. N., and Arnaya, D. B. R. (2008). Uncultivated Brazilian green leaves are richer sources of carotenoids than are commercially produced leafy vegetable, *Food Nutr. Bull.*, 29: 320-328.
13. Ren, D., and Zhang, S. H. (2008). Separation and identification of the yellow carotenoids in *Potamogeton crispus* L, *Food Chem.*, 106: 410-414.
14. Wang, X. C., Chen, L., Ma, C. L., Yao, M. Z., and Yang, Y. J. (2010). Genotypic variation of β -carotene and lutein contents in tea germplasms, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, *J. Food Compos. Anal.*, 23: 9-14.
15. Yahia, E. M., Gutierrez-Orozco, F., and Arvizu-de Leon, C. (2011). Phytochemical and antioxidant characterization of mamey (*Pouteria sapota* Jacq. HE Moore & Stearn) fruit, *Food Res. Int.*, 44: 2175-2181.
16. Perry, A., Rasmussen, H., and Johnson, E. J. (2009). Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg product, *J. Food Compos. Anal.*, 22: 9-15.
17. Aizawa, K., and Inakuma, T. (2007). Quantitation of carotenoids in commonly consumed vegetables in Japan, *Food Sci. Technol. Res.*, 13: 247-252.
18. Chandrika, U. G., Basnayake, B. M. L. B., Athukorala, I., Colombagama, P. W. N. M., and Goonetilleke, A. (2010). Carotenoid content and in vitro bioaccessibility of lutein in some leafy vegetables popular in Sri Lanka, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 56: 203-207.
19. Dias, M. G., Camoes, M. F. G. F. C., and Oliveira, L. (2009). Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables, *Food Chem.*, 113: 808-815.
20. Mamatha, B. S., Sangeetha, R. K., and Baskaran, V. (2011). Provitamin-A and xanthophyll carotenoids in vegetables and food grains of nutritional and medicinal importance, *Int. J. Food Sci. Tech.*, 46: 315-323.
21. Murillo, E., Melendez-Martinez, A. J., and Portugal, F. (2010). Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin, *Food Chem.*, 122: 167-172.
22. Hidalgo, A. and A. Brandolini (2008). Protein, ash, lutein and t0Cols distribution in einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp *monococcum*) seed fractions, *Food Chem.*, 107: 444-448.
23. Pinto, E., Carvalho, A. P., Cardozo, K. H. M., Malcata, F. X., dos Anjos, F. M., and Colepicolo, P. (2011). Effects of heavy metals and light levels on the biosynthesis of

- carotenoids and fatty acids in the macroalgae *Gracilaria tenuistipitata* (var. *liui* Zhang & Xia), *Rev. Bras. Farmacogn.*, 21: 349-354.
24. Provesi, J. G., Dias, C. O., and Amante, E. R. (2011). Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree, *Food Chem.*, 128: 195-202.
 25. Wang, Y. C., Chuang, Y. C., and Hsu, H. W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan, *Food Chem.*, 106: 277-284.
 26. Yang, J., Zhu, Z. J., Wang, Z. Z., and Zhu, B. A. (2010). Effects of storage temperature on the contents of carotenoids and glucosinolates in Pakchoi (*Brassica Rapa L. Ssp. Chinensis Var. Communis*), *J. Food Biochem.*, 34: 1186-1204.
 27. Zanatta, C. F., and Mercadante, A. Z. (2007). Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*), *Food Chem.*, 101: 1526-1532.
 28. R. Surendranath, M. Ganga, M. Jawaharlal, K. Anitha (2016). Extraction and Quantification of Marigold Lutein Using Different Solvent Systems, *Int. J. Pharm, Sci. Rev. Res.*, 37(2), Article No. 33: 187-191.
 29. Pratheesh, VB, Benny N and Sujatha CH (2009). Isolation, stabilization and characterization of xanthophyll from marigold flower-*Tagetes erecta L.*, *Modern Applied Science*, 3(2): 19-28.
 30. Kadeem EJ (2011). Identification and Quantitative Estimation of Lutein in Iraqi *Spinacia oleracea* Family Chenopodiaceae by Using Chromatographic Methods, *Baghdad Science Journal*, 8(1): 96-102.
 31. Unea, A., Andjelkovic, M., Socaciu, C., Bobis, O., Neacsu, M., Verhe, R., and Van Camp, J. (2008). Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea L.*), *Food Chem.*, 108: 649-656.
 32. Vatsala, T.M., Rekha R (2013). An Efficient Method for Extracting Lutein from Indian Medicinal Plant *Commelina benghalensis*. A comparative Study On Solvents Efficiency, *Indian Journal of Science and Technology*, 6(2): 3999- 4005.
 33. Lefsrud MG and Kopsell DA, Kopsell DE and Celentano JC (2005). Air temperature affects biomass and carotenoid pigment accumulation in kale and spinach grown in a controlled environment, *Hort Science*, 40(7): 2026-2030.
 34. Cordero BF, Obratsova I, Couso I, Leon R, Vargas MA, Rodriguez giò (2011). Enhancement of Lutein Production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by Improvement of Culture Conditions and Random Mutagenesis, *Marine Drugs*, 9(9): 1607-1624.

35. Valarmathi R., Raveendran M, Robin S and Senthil N (2015). Unravelling the nutritional and therapeutic properties of ‘Kavuni’ a traditional rice variety of Tamil Nadu, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 24(3): 305-315.
36. Kuhnen S., Dias P. F., Ogliari J. B., Maraschin M. (2012). Brazilian Maize Landraces Silks as Source of Lutein: An Important Carotenoid in the Prevention of Age-Related Macular Degeneration, *Food and Nutrition Sciences*, 3: 1609-1614.
37. Azevedo-Meleiro, C. H., and Rodriguez-Amaya, D. B. (2007). Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*, *J. Agr. Food Chem.*, 55: 4027-4033.
38. Tlili, N., Nasri, N., Saadaoui, E., Khaldi, A., and Triki, S. (2009). Carotenoid and tocopherol composition of leaves, buds, and flowers of *Capparis spinosa* grown wild in Tunisia, *J. Agr. Food Chem.*, 57: 5381-5385.
39. Hsu, Y. W., Tsai, C. F., Chen, W. K., Ho, Y. C., and Lu, F. J. (2011). Deterphúation of lutein and zeaxanthin and antioxidant capacity of supercritical carbon dioxide extract from daylily (*Hemerocallis disticha*), *Food Chem.*, 129: 1813-1818.
40. Faria, A. F., Marques, M. C., and Mercadante, A. Z., (2011). Identification of bioactive compounds from jambolao (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions, *Food Chem.*, 126: 1571-1578.
41. Toiu, A., Muntean, E., Oniga, I., and Tamas, M. (2009). Pharmacognostic research on *Viola declinata* Waldst. Et Kit. (Violaceae), *Farmacia*, 57: 218-222.
42. Bone, R. A., Landrum, J. T., and Tarsis, S. L. (1985). Preliminary identification of the human macular pigment, *Vision Res.*, 25: 1531-1535.
43. Cho, E. Y., Hankinson, S. E., Rosner, B., Willett, W. C., and Colditz, G. A. (2008). Prospective study of lutein/zeaxanthin intake and risk of age-related macular degeneration, *Am. J. Clin. Nutr.*, 87:1837-1843.
44. Hu, Y. Z., and Xu, Z. R. (2008). Effects of lutein on the growth and migration of bovine lens epithelial cells in vitro, *J Huazhong U Sci-Med*, 28: 360-363.
45. Johnson, E. J., Chung, H. Y., Caldarella, S. M., and Snodderly, D. M. (2008). The influence of supplemental lutein and docosahexaenoic acid on serum, lipoproteins, and macular pigmentation, *Am. J. Clin. Nutr.*, 87: 1521-1529.
46. Li, S. Y., and Lo, A. C. Y. (2010). Lutein protects RGC-5 cells against hypoxia and oxidative stress, *Int. J. Mol. Sci.*, 11: 2109-2117.

47. Sasaki, M., Ozawa, Y., Kurihara, T., Noda, K., Imamura, Y., Kobayashi, S., Ishida, S., and Tsubota, K. (2009). Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein, during retinal inflammation, *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 50: 1433-1439.
48. San Giovanni, J. P., Chew, E. Y., Clemons, T. E., Ferris, F. L., Gensler, G., Linblad, A. S., Milton, R. C., Seddon, J. M., and Sperduto, R. D. (2007). The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E, and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study - AREDS Report no. 22, *Arch. Ophthalmol-Chic.*, 125: 1225-1232.
49. Weigert, G., Kaya, S., Pemp, B., Sacu, S., Lasta, M., Werkmeister, R. M., Dragostinoff, N., Simader, C., Garhofer, G., Schmidt-Erfurth, U., et al. (2011). Effects of lutein supplementation on macular pigment optical density and visual acuity in patients with age-related macular degeneration, *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 52: 8174-8178.
50. Fu, H., Xie, B., Ma, S., Zhu, X., Fan, G., and Pan, S. (2011). Evaluation of antioxidant activities of principal carotenoids available in water spinach (*Ipomoea aquatica*), *J. Food Compos. Anal.*, 24: 288-297.
51. Tsuboi, M., Etoh, H., Yomoda, Y., Kato, K., Kato, H., Kulkarni, A., Terada, Y., Maoka, T., Mori, H., and Inakuma, T. (2010). Nitration reaction of lutein with peroxynitrite, *Tetrahedron. Lett.*, 51: 676- 678.
52. Moreno, F. S., Toledo, L. P., de Conti, A., Heidor, R., Jordo, A., Vannucchi, H., Cardozo, M. T., and Ong, T. P. (2007). Lutein presents suppressing but not blocking chemopreventive activity during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis and this involves inhibition of DNA damage, *Chem-Biol. Interact.*, 168: 221-228.
53. Cha, K. H., Koo, S. Y., and Lee, D. U. (2008). Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells, *J. Agr. Food Chem.*, 56: 10521-10526.
54. Reynoso-Camacho, R., Gonzalez-Jasso, E., Ferriz-Martinez, R., Villalon-Corona, B., Loarca-Pina, G. F., Salgado, L. M., and Ramos-Gomez, M. (2011). Dietary supplementation of lutein reduces colon carcinogenesis in DMH-treated rats by modulating K-ras, PKB, and β -catenin proteins, *Nutr. Cancer*, 63: 39-45.

55. Beydoun, H. A., Shroff, M. R., Mohan, R., and Beydoun, M. A. (2011). Associations of serum vitamin A and carotenoid levels with markers of prostate cancer detection among US men., *Cancer Cause Control*, 22: 1483-1495.
56. Ghosh, C., Baker, J. A., Moysich, K. B., Rivera, R., Brasure, J. R., and McCann, S. E. (2008). Dietary intakes of selected nutrients and food groups and risk of cervical cancer, *Nutr. Cancer*, 60: 331-341.
57. Mignone, L. I., Giovannucci, E., Newcomb, P. A., Titus-Ernstoff, L., Trentham-Dietz, A., Hampton, J. M., Willett, W. C., and Egan, K. M. (2009). Dietary carotenoids and the risk of invasive breast cancer, *Int. J. Cancer*, 124: 2929-2937.
58. Pelucchi, C., Dal Maso, L., Montella, M., Parpinel, M., Negri, E., Talamini, R., Giudice, A., Franceschi, S., and La Vecchia, C. (2008). Dietary intake of carotenoids and retinol and endometrial cancer risk in an Italian case-control study. *Cancer Cause Control*, 19: 1209-1215, *Int. J. Food Nutr. Saf.* 2012, 1(2): 75-98.
59. Zhang, J. J., Dhakal, I., Stone, A., Ning, B. T., Greene, G., Lang, N. P., and Kadlubar, F. F. (2007). Plasma carotenoids and prostate cancer: A population-based case-control study in Arkansas, *Nutr. Cancer*, 59: 46-53. *Int. J. Food Nutr. Saf.* 2012, 1(2): 75-98 and *Lifestyle (VITAL) study. Am. J. Epidemiol.*, 169: 815-828.
60. Arnal, E., Miranda, M., Barcia, J., Bosch-Morell, F., and Romero, F. J. (2010). Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex, *Neurosci.*, 166: 271-278.
61. Muriach, M., Bosch-Morell, F., Arnal, E., Alexander, G., Blomhoff, R., and Romero, F. J. (2008). Lutein prevents the effect of high glucose levels on immune system cells in vivo and in vitro, *J. Physiol. Biochem.*, 64: 149-157.
62. Hu, B. J., Hu, Y. N., Lin, S., Ma, W. J., and Li, X. R. (2011). Application of lutein and zeaxanthin nonproliferative diabetic retinopathy, *Int. J. Ophthalmol-Chi.*, 4: 303-306.
63. Sasaki, M., Ozawa, Y., Kurihara, T., Kubota, S., Yuki, K., Noda, K., Kobayashi, S., Ishida, S., and Tsubota, K. (2010). Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes, *Diabetologia*, 53: 971-979.
64. Rafi, M. M., and Shafaie, Y. (2007). Dietary lutein modulates inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene and protein expression in mouse macrophage cells (RAW 264.7), *Mol. Nutr. Food Res.*, 51: 333-340.

65. Kim, J. H., Na, H. J., Kim, C. K., Kim, J. Y., Ha, K. S., Lee, H., Chung, H. T., Kwon, H. J., Kwon, Y. G., and Kim, Y. M. (2008). The non-provitarnin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappa B dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3- kinase/PTEN/Akt and NF-kappa B-inducing kinase pathways: Role of H₂O₂ in NF-kappa B activation, *Free Radic. Biol. Med.*, 45: 885-896.
66. Horie, S., Okuda, C., Yamashita, T., Watanabe, K., Kuramochi, K., Hosokawa, M., Takeuchi, T., Kakuda, M., Miyashita, K., Sugawara, F., et al. (2010). Purified canola lutein selectively inhibits specific isoforms of mammalian DNA polymerases and reduces inflammatory response, *Lipids*, 45: 713-721.
67. Kim, Y., Seo, J. H., and Kim, H. (2011). Beta-carotene and lutein inhibit hydrogen peroxide-induced activation of NF-kappa B and IL-8 expression in gastric epithelial AGS cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 57: 216-223.
68. Pang, R., Tao, J. Y., Zhang, S. L., Zhao, L., Yue, X., Wang, Y. F., Ye, P. A., Dong, J. H., Zhu, Y., and Wu, J. G. (2010). In vitro antiviral activity of lutein against hepatitis B virus, *Phytother Res.*, 24: 1627-1630.
69. Shvetsov, Y. B., Hernandez, B. Y., Wilkens, L. R., Thompson, P. J., Franke, A. A., Zhu, X. M., and Goodman, M. T. (2010). Plasma micronutrients and the acquisition and clearance of anal human papillomavirus infection: The Hawaii HPV cohort study, *Cancer Res.*, 70: 9787-9797.
70. Koh, W. P., Yuan, J. M., Wang, R., Lee, Y. P., Lee, B. L., Yu, M. C., and Ong, C. N. (2011). Plasma carotenoids and risk of acute myocardial infarction in the Singapore Chinese health study, *Nutr. Metab. Cardiovas.*, 21: 685-690.
71. Kim, J. E., Leite, J. O., de Ogburn, R., Smyth, J. A., Clark, R. M., and Fernandez, M. L. (2011). A lutein-enriched diet prevents cholesterol accumulation and decreases oxidized LDL and inflammatory cytokines in the aorta of guinea pigs, *J. Nutr.*, 141: 1458-1463.
72. Ribaya, J. D., Jeffrey, B. B. (2004). Lutein and Zeaxanthin and Their Potential Roles in Disease Prevention, *J. Amer. College of Nutri.*, 23 (6): 567- 587.
73. Tso, M. O. M, Lam, T. T. (1994). *Method of retarding and ameliorating central nervous system and eye damage*, US. Patent, 5527533.
74. <http://vietnamnet.vn/vn/doi-song/suc-khoe/99497/phat-hien-moi-vekha-nang-ho-tro-tri-nao-cua-lutein.html>.

75. Swaminathan, S., Madavalapil, K.P. (2009). *Isolation and purification of carotenoids from Marigold flowers*, US. Patent, 7,622,599 B2.
76. Johnson, E.J. (2012). A possible role for lutein and zeaxanthin in cognitive function in the elderly, *Am. J. Clin. Nutr.*: 1-5.
77. John, T.L., Richard, A.B. (2001). Lutein, Zeaxanthin, and the Macular Pigment, *Archives of Biochem. & Biophys.*, 385(1): 28 - 40.
78. WHO (2006). *Safety evaluation of certain food additives*, WHO Food Additives, Series: 54, WHO Press, Geneva.
79. Deutsch, M.J. (1984). Vitamins and other nutrients. Williams, S. (Ed.). Official methods of analysis of the AOAC, 14th ed, *Virginia, Association of Official Analytical Chemists*, 1984: 834-835.
80. EFSA (2010). Scientific Opinion on the re-evaluation of lutein (E 161b) as a food additive, *EFSA Journal*, 8(7):1678.
81. Kale, S, Gaikwad, M, Bhandare, S. (2011). Determination and comparison of in vitro SPF of topical formulation containing Lutein ester from *Tagetes erecta* L. flowers, *Moringa oleifera* Lam seed oil containing Lutein ester, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2 (3):1220–1223.
82. Roberts, R. L., Green, J., & Lewis, B. (2009). Lutein and zeaxanthin in eye and skin health, *Clinics in Dermatology*, 27(2): 195-201.
83. http://en.wikipedia.org/wiki/Tagetes_erecta
84. Saha TN, Singh Kanwar P (2006). Genetic Variability, Heritability and Genetic Advance in French Marigold (*Tagetes patula* L.), *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, 19 (2): 206–208.
85. Cantrill, R. (2016), Lutein from *Tagetes erecta*, *Chemical and Technical Assessment (CTA)*, 52(12), 1-5.
86. F W Quackenbush, Sharon L Miller (2020), Composition and Analysis of the Carotenoids in Marigold Petals, *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 55 (3):617–621.
87. Sarkar, C.R., Bhagawati, B., Das, L., Goswami, B.C., 2012, An efficient condition of Saponification of Lutein ester from marigold flower, *J. Annals of Biological Research*, 3 (3):1461-1466.
88. Peter Amala Sujith, A., Hymavathi, T.V. and Yasoda Devi, P. (2012). A comparative study of the hydrolysis of supercritical fluid extracted lutein esters by

- improved saponification and enzym biocatalysis, *International Food Research Journal*, 19 (3): 847-856.
89. Jose Luis Navarrete-Bolanos, Claudia Leticia Rangel-Cruz, Hugo Jimenez-Islas, Enrique Botello-Alvarez, Ramiro Rico-Martinez (2005). Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using n-hexann, *Food Research International*, 38: 159–165.
 90. Halagur B. Sowbhagya & S. B. Sushma & Navin K. Rastogi & M. Madhava Naidu (2013). Effect of pretreatments on extraction of pigment from marigold flower, *J Food Sci Technol*, 50(1):122–128.
 91. Luis W. Levy (2001). *Trans- xanthophyll ester concentrates of enhanced purity and methods of making the same*, US. Patent, 6191293 B1.
 92. Panatpong Boonnoun, Thanawich Opaskonkun, Phattanon Prasitchoke, Motonobu Goto, and Artiwan Shotipruk (2012). Purification of Free Lutein from Marigold Flowers by Liquid Chromatography, *Engineering journal*, 6 (5): 145-156.
 93. Janya Vechpanich & Artiwan Shotipruk (2010) Recovery of Free Lutein From *Tagetes erecta*: Determination of Suitable Saponification and Crystallization Conditions, *Separation Science and Technology*, 46 (2): 265-271.
 94. Tingting Wang, Juan Han, Yue Tian, Dan Zhang, Yun Wang, Yingchun Wu & Liang Ni (2016). Combined process of reaction, extraction and purification of lutein in marigold flower by isopropanol-KOH aqueous two-phase system, *Separation Science and Technology*, 51: 1490-1498.
 95. Swaminathan Sethuraman, Priya Madavalappil Kunhiraman (2013). *Process for isolation of lutein and zeaxanthin crystals from plant sources*, US. Patent, 8425948 B2.
 96. Mas Hojnik, Mojca S.kerget, Zeljko Knez (2008). Extraction of lutein from Marigold flower petals Experimental kinetics and modelling, *Food Science and Technology* 41, 2008-2016.
 97. Duangkamol Ruen-ngam, Artiwan Shotipruk Prasert Pavasant, Siti Machmudah, Motonobu Goto1 (2012). Selective Extraction of Lutein from Alcohol Treated *Chlorella vulgaris* by Supercritical CO₂, *Chem. Eng. Technol*, 35 (2): 255–260.
 98. Sethuraman et al. (2013). *Process for isolation of lutein and zeaxanthin crystals from plant sources*, US. Patent, 8425984 B2.

99. Xiao-Dan Fan, Yan Hou, Xing-Xin Huang, Tai-Qiu Qiu and Jian-Guo Jiang (2013). Ultrasound-Enhanced Subcritical CO₂ Extraction of Lutein from *Chlorella pyrenoidosa*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(18): 4597-605.
100. Kumar t. K. Et al (2004). *Process for the preparation of xanthophyll crystals*. US. Patent, 6743953 B2.
101. Barzana, E., Rubio, D., Santamaria, R.I, Garcia-Correa, O., Garcia, F., Ridaura Sanz, V.E, Loa pez-Munguiaa, A. (2002). Enzym-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*), *Agric. & Food Chem.*, 50: 4491–4495.
102. Joseph, S., Nadu, T., Anandane, A., Nagar, R. R., (2013). *Process for isolation and purification of carotenoids*, US. Patent, 00661.
103. Miroslav Sivel, Stanislav Kracmar, Miroslav Fisera. Borivoj Klejdus and Vlastimil Kuban (2014). Lutein Content in Marigold Flower (*Tagetes erecta* L.) Concentrates used for Production of Food Supplements, *Czech J. Food Sci.*, 32 (6): 521–52.
104. Rajesh Kumar, Wenli Yu, Cuilan Jlang, Conglei Shi and Yaping (2008). Improvement of the isolation and purification lutein from marigold flower (*Tagetes erecta* L.) and its antioxidant activity, *School of Chemistry and Chemical Technology Shanghai Jiao Tong University*, 1065-1078.
105. Khachik, F. (1995). *Process for isolation, purification and recrystallization of lutein from marigold oleoresin and uses thereof*, US. Patent, 5382714.
106. Khachik, F. (2001). *Process for extraction and purification of lutein, zeaxanthin and rare carotenoids from Marigold flowers and plants*, US. Patent, 6262284 B1.
107. Hua-Bin Li, Yue Jiang, and Feng Chen (2002). Isolation and Purification of Lutein from the Microalga *Chlorella vulgaris* by Extraction after Saponificatio, *J. Agric. Food Chem.*, 50: 1070-1072.
108. Md. Habib Ullah Bhuyian, A.F.M. Ariful Islam, Md. Isha Tareque, Dr. Harun Ar Rashid (2015). Development annd validation of method for determination of lutein by HPLC, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4 (4): 145-156.
109. Jing Tan, Jason Gek Leong Neo, Tania Setiawati and Chunyan Zhang (2017). Determination of Carotenoids in Human Serum and Breast Milk Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with a Diode Array Detector (HPLC-DAD), *Separations*, 4: 19.
110. United States Pharmacopeial Convention (2017). *USP 40-NF35*.

111. Đào Minh Huy, Phạm Thị Minh Huệ (2016). Pha cubic và cubosome: Khái niệm, cấu trúc và ứng dụng, *Tạp chí Dược học*, 479(56): 59-64.
112. Junghanns J. A. H., Muller R. H. (2008). Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications, *International Journal of Nanomedicine*, 3(3): 295 - 309.
113. Junyaprasert V. B., Morakul B. (2015). Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs, *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 10: 13-23.
114. Parvathy K. S., Negi P. S., Srinivas P. (2010). Curcumin-amino acid conjugates: synthesis, antioxidant and antimutagenic attributes, *Food Chemistry*, 120: 523-530.
115. Yadav V. G., Singh S. R. (2012). Nanosuspension: a promising drug delivery system, *An International Research Journal*, 3(5): 217-243.
116. Gao L., Zhang D., Chen M. (2008). Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system, *Journal of Nanoparticle Research*, 10(5): 845-862.
117. Morales J. O., Watts A. B., Mcconville J. T. (2012). Mechanical Particle- Size Reduction Techniques, *Formulating poorly water soluble drugs*, New York: 133-170.
118. Möschwitzer J. P. (2013). Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process, *International Journal of Pharmaceutics* 453: 142-156.
119. Peltonen L., Hirvonen J. (2010). Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 62(11): 1569- 1579.
120. Chang T. L., Zhan H., Liang D., et al. (2015). Nanocrystal technology for drug formulation and delivery, *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 9(1): 1-14.
121. Madgulkar A., Bandivadekar M., Shid T. (2016). Sugars as solid dispersion carrier to improve solubility and dissolution of the BCS class II drug: clotrimazole, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(1): 28- 38.
122. Xu W., Ling P., Zhang T. (2013). Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs, *Journal of Drug Delivery*: 1-15.
123. Mohanty C., Das M., Sahoo S. K. (2012). Emerging role of nanocarriers to increase the solubility and bioavailability of curcumin, *Expert opinion on drug delivery*,

9(11): 1347-1364.

124. Huang Q., Yu H., Ru Q. (2011). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology, *Journal of Food Science*, 75: 50- 57.
125. Douroumis D., Fahr A. (2013). Drug delivery strategies for poorly water soluble drugs, *John Wiley & Sons, Chichester*: 1-600.
126. Loh Z. H., Samanta A. K., Heng P. W. S. (2015). Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10: 255-274.
127. Chen H., Khemtong C., Yang X., et al. (2011). Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs, *Drug Discovery Today*, 16(7/8): 354-360.
128. Lu Y., Park K. (2013). Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 453:198-214.
129. Pattravee Niamprem, Soravoot Rujivipat, and Waree Tiyaboonchai (2013). Development and characterization of lutein-loaded SNEDDS for enhanced absorption in Caco-2 cells. *Pharmaceutical Development and Technology*, Early Online: 1-8.
130. Bertrand Muhoza, Eric Karangwa, Emmanuel Duhoranimana, Xiaoming Zhang and Shuqin Xia (2016). Influence of Pectin on the Stability of Whey Protein Isolate Stabilized Emulsion for Encapsulating Lutein, *Advance Journal of Food Science and Technology*, 12(11): 617-626.
131. Sartorius Stedim Biotech Company (2017). *User guide Bio Pat Modde*, Sweden.
132. Katja Frede, Andrea Henze, Mahmoud Khalil, Susanne Baldermann, Florian J. Schweigert, Harshadrai Rawel (2014). Stability and cellular uptake of lutein-loaded emulsions, *Journal of Functional Foods*, 8: 118-127.
133. Liu CH, Lai KY, Wu WC, Chen YJ, Lee WS, Hsu CY (2015). In vitro scleral lutein distribution by cyclodextrin containing nanoemulsion, *Chem Pharm Bull*, 63: 59-67.
134. Murillo AG, Aguillar D, Norris GH, Di Marco DM, Missimer A, Hu S, et al (2016). Compared with Powdered Lutein, a Lutein Nanoemulsion Increases Plasma and Liver Lutein, Protects against Hepatic Steatosis, and Affects

Lipoprotein Metabolism in Guinea Pigs, *J Nutr*: 235374.

135. Government of India New Delhi (2019). *Guidelines for Evaluation of Nanopharmaceuticals in India*, India.
136. Hà Thị Tâm Tiên, Nguyễn Văn Mùi, Trần Thị Huyền Nga, Hà Thị Bích Ngọc (2006). Điều tra, tách chiết và đánh giá hoạt tính sinh học của lutein ở cúc vạn thọ *Tagetes erecta* L., *Hội thảo 'Khoa học Công nghệ quản lý nông học vì sự phát triển nông nghiệp bền vững ở VN'*, Đại học Nông nghiệp 1, Hà Nội: 344-349.
137. Lê Huy Hoàng và cộng sự (2015). *Nghiên cứu sản xuất viên nén thực phẩm chức năng chứa Lutein điều chế từ cánh hoa cúc vạn thọ, có tác dụng tăng cường thị lực cho bộ đội hoạt động trong điều kiện thiếu ánh sáng*, Đề tài Cấp Sở KH&CN Thành phố Hồ Chí Minh.
138. Hoàng Thị Huệ An và cộng sự (2015). *Xây dựng quy trình công nghệ quy mô phòng thí nghiệm thu nhận lutein từ hoa cúc vạn thọ Tagetes erecta L. ứng dụng làm chất màu thực phẩm*, Đề tài nghiên cứu khoa học cấp Sở KH&CN Khánh Hòa.
139. Hoàng Thị Huệ An và cộng sự (2019). *Hoàn thiện quy trình tách chiết, xây dựng mô hình thiết bị sản xuất thử nghiệm lutein và chế phẩm lutein từ hoa cúc vạn thọ Tagetes erecta L.*, Đề tài nghiên cứu khoa học cấp Sở KH&CN Khánh Hòa.
140. Trần Hải Minh, Hoàng Thị Huệ An, Trần Quang Ngọc (2016). Lutein vi nang tan trong nước điều chế bằng kỹ thuật sấy phun sử dụng vật liệu bọc maltodextrin: đặc tính hóa-lý và khả năng tạo màu thực phẩm, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 1: 102-108
141. Lê Mỹ Kim Vương (2019). *Cải biến phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC) xác định lutein, ứng dụng khảo sát quá trình xà phòng hóa lutein ester*, Luận văn thạc sĩ hóa học, Nha Trang.
142. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (1995). *Carotenoids, Volume 1A, Isolation and Analysis*, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
143. Bộ Y tế (1996). *Quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực thuốc cổ truyền*, Quyết định số 371/BYT-QĐ.
144. Đỗ Trung Đàm (1996). *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, NXB-Y học.
145. Bộ Y tế (2015). *Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu*, Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT.

146. Turner A (1965). Screening method sin pharmacology, *Academic Press*, New York and London: 60-68.
-
147. WHO (1993). *Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines*, Manila, Phillipin: 35.
148. WHO (2000). *General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine*.
149. Sartorius Stedim Biotech Company (2017). *User guide Bio Pat Modde*, Sweden.
150. Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ lọc, hóa dầu (2019). *Hoàn thiện quy trình công nghệ chiết xuất, tinh chế các hoạt chất lutein, zeaxanthin từ cây Cúc vạn thọ*, Dự án sản xuất thử nghiệm, Bộ Công thương.
151. Veronika Nagy, Attila Agócs, Viktória L. Balázs, Dragica Purger, Rita Filep, Viktor Sándor, Erika Turcsi, Gergely Gulyás-Fekete, József Deli (2023). Lutein Isomers: Preparation, Separation, Structure Elucidation, and Occurrence in 20 Medicinal Plants, *Feature Papers in Food Chemistry—2nd Edition*, 28(3): 1187.
152. Frederick Khachik, Gerhard Englert, Charles E. Daitch, Gary R. Beecher, Linda H. Tonucci, William R. Lusby (1992). Isolation and structural elucidation of the geometrical isomers of lutein and zeaxanthin in extracts from human plasma, *Journal of Chromatography*, 582:153-166.
153. R Ravikrishnan, Shraddha Rusia, G Ilamurugan, Ulhas Salunkhe, Jayant Deshpande, J Shankaranarayanan, M L Shankaranarayana, Madhu G Soni (2011). Safety assessment of lutein and zeaxanthin (Lutemax 2020): subchronic toxicity and mutagenicity studies, *Food Chem Toxicol*, 49(11): 2841-8.
154. Bộ Y tế (2006). *Kỹ thuật bào chế và sinh dược học các dạng thuốc, Tập 1*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
155. Peltonen L., Hirvonen J. (2010). Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 62(11):1569- 1579.
156. Sepassi S., Goodwin D. J., Drake A. F., et al. (2007). Effect of polymer molecular weight on the production of drug nanoparticles, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(10): 2655-2666.
157. Bhakay A., Merwade M., Bilgili E., et al. (2011). Novel aspects of wet milling for

the production of microsuspensions and nanosuspensions of poorly water-soluble drugs, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(8): 963-976.

158. Võ Xuân Minh, Phạm Thị Minh Huệ (2013). *Kỹ thuật nano và liposome ứng dụng trong dược phẩm và mỹ phẩm*, Trường Đại Học Dược Hà Nội, Hà Nội: 1-45.
159. Vianna-Filho, R.P., C.L. Petkowicz and J.L. Silveira (2013). Rheological characterization of O/W emulsions incorporated with neutral and charged polysaccharides, *Carbohydr Polym.* 93(1): 266-272.
160. Van Eerdenbrugh B., Van Den Mooter G., Augustijns P. (2008). Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products, *International Journal of Pharmaceutics*, 364: 64-75.
161. Castillo E Del (2007). Process optimization a statistical approach, *Springer Science*: 118-12.
162. Bertrand Muhoza, Eric Karangwa, Emmanuel Duhoranimana, Xiaoming Zhang and Shuqin Xia (2016). Influence of Pectin on the Stability of Whey Protein Isolate Stabilized Emulsion for Encapsulating Lutein, *Advance Journal of Food Science and Technology*, 12(11): 617-626.

PHỤ LỤC