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 NHŨ TƯƠNG KÍCH THƯỚC NANO TỪ CÁNH HOA CÚC VẠN THỌ (*TAGETES ERECTA* L.)

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 9.44.01.14

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội, 2023

Công trình được hoàn thành tại: Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ lọc, hóa dầu – Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

GS. TS Vũ Thị Thu Hà

Viện Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

PGS. TS Nguyễn Thanh Bình

Trường Đại học Khoa học tự nhiên

Đại học Quốc Gia Hà Nội

Phản biện 1: PGS.TS. Trịnh Thị Thủy

Viện Hóa học

Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ VN

Phản biện 2: PGS.TS. Trần Thu Hương

Trường Hóa và Khoa học sự sống

Đại học Bách khoa Hà Nội

Phản biện 3: PGS.TS. Ninh Đức Hà

Viện Khoa học & Công nghiệp quân sự

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp nhà nước họp tại Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện: Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

GIỚI THIỆU VỀ LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của luận án

Lutein và zeaxanthin là hai đồng phân thuộc nhóm carotenoit và trong quá trình chiết, tách, tinh chế hai hợp chất này luôn đi cùng với nhau. 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.

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, … 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.

Hầu hết các sản phẩm thương phẩm lutein trên thế giới đều được chiết xuất từ nguồn nguyên liệu cánh hoa Cúc vạn thọ (*Tageles erecta L.)*. Xu hướng thế giới cũng như tại Việt Nam đang tìm kiếm và sử dụng các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên có hoạt tính sinh học trong phòng ngừa và chữa trị các bệnh. Lutein chiết tách từ cánh hoa Cúc vạn thọ 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 lớn và khó tan trong nước nên khi đưa hai chất này vào hấp thụ trong cơ thể gặp rất nhiều khó khăn. Một giải pháp khắc phục nhược điểm đó là giảm kích thước các hoạt chất xuống kích cỡ nano để tăng khả năng hấp thụ cũng như tăng hoạt tính sinh học của chúng. Hướng nghiên cứu chiết tách, tinh chế lutein và zeaxanthin ở Việt Nam cho mục đích dược dụng chưa được quan tâm nghiên cứu.

Trên cơ sở này, hướng nghiên cứu chiết tách, tinh chế lutein, zeaxanthin và bào chế chế phẩm dạng nhũ tương kích thước nano từ cánh hoa Cúc vạn thọ được lựa chọn để thực hiện đề tài luận án.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Nằm trong khuôn khổ các hướng nghiên cứu của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ lọc, hóa dầu (PTNTĐ), mục tiêu chính của luận án là:

- Nghiên cứu chiết tách, tinh chế lutein và zeaxanthin từ cây Cúc vạn thọ một cách hệ thống để thu được sản phẩm đạt tiêu chuẩn dược điển Mĩ, tiến tới có thể thương mại hóa;
- Bào chế ra hệ phân tán nano của lutein, zeaxanthin có độ ổn định cao nhằm định hướng cho các hướng ứng dụng trong dược phẩm.

3. Các nội dung chính của luận án

- Lựa chọn nguyên liệu và phương pháp sơ chế, bảo quản nguyên liệu Cúc vạn thọ;
- Chiết, tách, tinh chế lutein và zeaxanthin đạt tiêu chuẩn dược điển Mĩ (USP 40);
- Phân lập được lutein và zeaxanthin có độ tinh khiết cao cao nhằm chủ động chất chuẩn phân tích trong các phòng thí nghiệm;
- Kiểm nghiệm độ ổn định và độc tính của lutein và zeaxanthin;
- Bào chế nhũ tương nano lutein có tính ổn định cao nhằm tăng sinh khả dụng của lutein qua đường uống.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Các kết quả đã đạt được của luận án có ý nghĩa trong việc tinh chế ra lutein có độ tinh khiết cao và bào chế ra nhũ tương nano lutein bằng phương pháp đơn giản, có thể tiến tới thương mại hóa. Việc chủ động

cung ứng nguồn dược chất lutein và zeaxanthin trong nước sẽ góp phần tăng cường sức khỏe nhãn khoa cho người Việt Nam.

5. Đóng góp mới của luận án

- 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 ºC 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 Mĩ 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.

- 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.

- 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.

6. Cấu trúc của luận án

Luận án gồm 152 trang (không kể phụ lục), 63 bảng, 57 hình vẽ, được phân bố thành các phần gồm: Mở đầu (2 trang); Tổng quan lý thuyết (32 trang); Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu (19 trang); Kết quả và thảo luận (80 trang); Kết luận (2 trang); Các đóng góp mới của luận án (1 trang); Danh mục các công trình khoa học đã công bố (1 trang); Tài liệu tham khảo (15 trang) bao gồm 162 tài liệu tham khảo.

A. NỘI DUNG CHÍNH CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

Nguồn lutein tự nhiên được biết nhiều nhất là trong hoa Cúc vạn thọ *(Tageles erecta L.)*. Hoạt tính nổi bật nhất của lutein là khả năng bảo vệ mắt khỏi thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi, chống lại tổn thương thần kinh võng mạc, và đục thủy tinh thể, … Lutein còn có hoạt tính chống oxi hóa và bắt giữ gốc tự do, chống ung thư, kháng viêm, bảo vệ tim mạch, ….

Trên thế giới, đã nhiều công bố về chiết tách, tinh chế lutein và zeaxanthin từ hoa Cúc vạn thọ nhưng vẫn còn rất nhiều khó khăn để thu được lutein ở dạng tinh khiết cao.

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 Mĩ, từ hoa Cúc vạn thọ.

CHƯƠNG 2: THỰC NGHIỆM

2.1. Dụng cụ, hóa chất và thiết bị

Các hóa chất, vật tư có nguồn gốc từ Sigma Aldrich, Merk, Mỹ, Trung Quốc và Việt Nam. Luận án sử dụng các dụng cụ phổ biến trong phòng thí nghiệm như cốc thủy tinh, cột chiết thủy tinh, pipet paster, micro pipet, … các thiết bị phân tích như UV-Vis, HPLC, LC – MS/MS, các thiết bị khác như tủ sấy, máy cô quay chân không, máy khuấy, máy siêu âm, máy đồng hóa,….

Nguyên liệu: Hoa Cúc vạn thọ tươi tại Việt Nam được trồng tại Nam Định, thu hoạch từ tháng 12 năm trước đến tháng 5 năm kế tiếp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu.

2.2.1. Phương pháp sơ chế - bảo quản nguyên liệu

Cúc vạn thọ tươi được tách cuống, đài hoa và nhụy thu lấy phần cánh hoa màu vàng cam. Hoa được đem xử lý sấy mẫu theo các quy trình nghiên cứu và nghiền mịn, bảo quản ở túi kín -10 °C.

Lấy 1000 g mẫu tươi được sấy khô bằng các phương pháp khác nhau, sau đó nghiền mịn và ngâm chiết 24 giờ với etyl axetat, cô quay thu cao chiết, phân tích bằng UV - Vis để xác định hàm lượng lutein tổng số. Từ đó, lựa chọn phương pháp sấy và bảo quản phù hợp.

2.2.1. Phương pháp tiền xử lý nguyên liệu bột hoa Cúc vạn thọ khô

Mẫu bột cánh hoa khô được tiền xử lý với NaOH, axit sunfuric hoặc axit citric, sau đó được ngâm chiết để thu lấy lutein este. Cao chiết được phân tích hàm lượng lutein tổng số bằng thiết bị UV-Vis. Các yếu tố ảnh hưởng được nghiên cứu: nhiệt độ, thời gian, nồng độ chất xử lý. Từ đó chọn ra phương pháp tiền xử lý nguyên liệu.

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

100 g bột cánh hoa cúc được ngâm với dung môi chiết trong khoảng thời gian 2 - 24 giờ, có khuấy, ở nhiệt độ từ 30 °C đến 70 °C. Sau khi ngâm chiết xong, sử dụng phương pháp lọc hút chân không, với giấy lọc Whatman số 1, thu lấy dịch lọc. Dịch lọc được cất loại dung môi, thu lấy cao chiết bằng máy cô quay chân không, nhiệt độ thiết bị gia nhiệt 50 - 60 °C. Cao chiết được bảo quản ở -10 °C, hút chân không và tránh ánh sáng. Hàm lượng lutein tổng số trong cao chiết được xác định bằng thiết bị UV-Vis.

2.2.4. 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 được từ từ về 60 °C. Thêm dung môi ít phân cực (*n*-hexan/ etyl axetat) vào hệ dung dịch etanol/nước. Tiếp tục khuấy 10 phút rồi dừng khuấy, toàn bộ dung dịch được rót lên phễu, chờ phân lớp. 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 2 lần. Dịch chiết được gom lại, cô quay chân không.

2.2.5. Thủy phân cao chiết và tinh chế tinh thể lutein tự do

Dùng dung dịch KOH trong EtOH 96° để thủy phân cao chiết thu được lutein thô.

Lutein thô được hòa tan trong EtOH sau đó bổ sung H_2O, ở nhiệt độ 50 °C. 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 8 giờ.

Lutein sau khi tinh chế được xác định điều kiện bảo quản, độ ổn định, độc tính cấp và độc tính bán trường diễn.

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

Phân lập lutein và zeaxanthin bằng cột sắc ký silicagel

2.3. Các phương pháp bào chế nano nhũ tương lutein

Phương pháp bào chế

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 9.000 vòng/phút 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 nano nhũ tương bằng máy đồng hóa D-160 ở 10.000 vòng/phút trong 2 phút ở 25 ^{o}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 ^{o}C.

***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.

Đánh giá: Nano nhũ tương lutein được đánh giá hình dạng, kích thước tiểu phân và độ ổn định.

2.4. Các phương pháp phân tích hàm lượng lutein, zeaxanthin

Hàm lượng lutein, zeaxanthin được phân tích bằng các thiết bị UV-Vis, HPLC, LC-MS/MS.

Sắc kí lớp mỏng, sắc ký cột được dùng để xác định sự có mặt của lutein, zeaxanthin trong nguyên liệu và phân lập lutein và zeaxanthin.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều (H^1 NMR và ^{13}C-NMR.) và hai chiều (HMBC, HSQC) trong dung môi $CDCl_3$, CD_3OD được dùng để nhận dạng lutein và zeaxanthin.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả lựa chọn nguồn nguyên liệu Cúc vạn thọ và phương pháp sơ chế.

3.1.1. Kết quả khảo sát phương pháp phơi mẫu trong bóng râm

Thời gian phơi cánh hoa Cúc vạn thọ tươi thích hợp nhất là 36 giờ. Sau khi phơi CVT khô có hàm ẩm 16,6 %, hàm lượng lutein tổng số đạt 8,5 mg/g hoa khô.

3.1.2. Kết quả khảo sát phương pháp sấy có quạt gió

Thời gian sấy thích hợp cho phương pháp sấy bằng tủ sấy có quạt gió là 24 giờ, nhiệt độ sấy 50 °C. Sau khi sấy, CVT khô có hàm ẩm 5,0 %, hàm lượng lutein tổng số đạt 12,6 mg/g hoa khô.

3.1.3. Kết quả khảo sát phương pháp sấy ở điều kiện chân không

Nhiệt độ sấy chân không tốt nhất là 50 °C trong 16 giờ. Sau khi sấy, CVT khô có hàm ẩm là 1 %, hàm lượng lutein tổng số đạt 12,9 mg/g hoa khô.

3.1.4. So sánh lựa chọn phương pháp sấy phù hợp

Trong phòng thí nghiệm: Sử dụng phương pháp sấy trong chân không trong 16 giờ ở 50 ^{o}C để hàm lượng lutein trong CVT đạt giá trị cao nhất.

Qui mô lớn: Sử dụng phương pháp sấy bằng tủ sấy, có quạt gió trong 24 giờ ở 50 ^{o}C. Phương pháp này cho hiệu quả sấy cao, gần bằng sấy trong chân không nhưng chi phí đầu tư, vận hành thấp hơn nhiều so với sấy trong môi trường chân không.

3.2. Kết quả chiết tách, tinh chế lutein và zeaxanthin đạt tiêu chuẩn dược điển

3.2.1. Kết quả tiền xử lý nguyên liệu bột hoa Cúc vạn thọ khô

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. Theo đó, bột CVT được tiền xử lý bằng axit citric 0,6 % ở nhiệt độ 50 ^{o}C trong 2 giờ với tỷ lệ nguyên liệu/tác nhân là 1/10 g/mL. Bột CVT được tiền xử lý bằng axit citric, sau đó chiết 2 lần cho hiệu quả chiết lutein este (hiệu suất 92,95 %) tốt hơn bột CVT chưa được xử lý chiết 4 lần (hiệu suất 92,33 %).

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

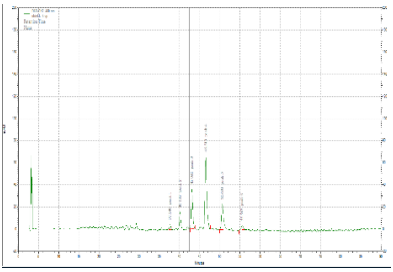
Lutein este được chiết từ bột hoa Cúc vạn thọ khô bằng dung môi etyl axetat trong 6 giờ ở 60 ^{o}C; tỷ lệ dung môi 10/1 (v/w); tốc độ khuấy 200 vòng/phút với 2 lần chiết. Hiệu suất chiết đạt 92,95 %, là mức giá trị khá cao.

3.2.3. Kết quả quá trình làm giàu cao chiết bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng

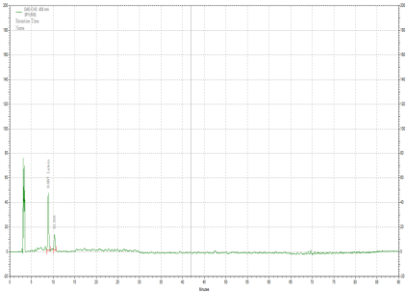
- *n*-hexan được sử dụng làm dung môi chiết lỏng – lỏng trong quá trình làm giàu lutein trong cao chiết.

- *Điều kiện quá trình làm giàu:* cao chiết được pha trong hệ dung môi etanol/nước tỷ lệ 7/3 (v/v); làm giàu lutein bằng dung môi *n*-hexan theo phương pháp chiết lỏng-lỏng; Tỉ lệ cao chiết tổng/dung môi etanol-nước/dung môi *n*-hexan = 1/10/15; Thời gian chiết 10 phút/lần; số lần chiết 2 lần; nhiệt độ chiết 60 °C. Hiệu suất thu hồi hoạt chất sau làm giàu đạt 96,9 %.

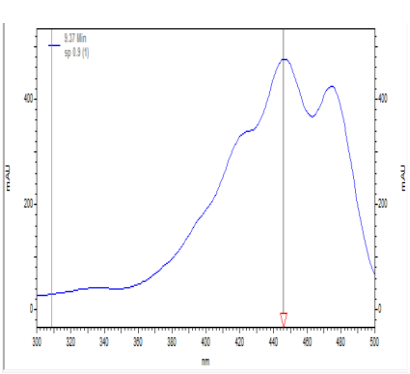
3.2.4. Kết quả quá trình thủy phân cao chiết giàu lutein và zeaxanthin



Hình 3.1. Sắc ký đồ HPLC của cao chiết chưa thủy phân (lutein este)

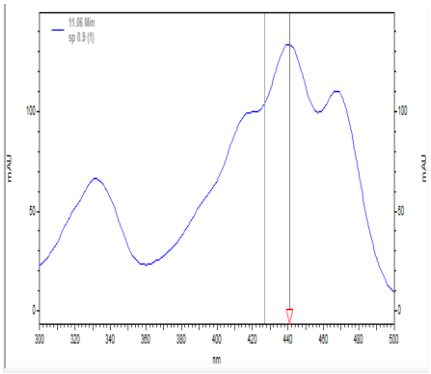


Hình 3.2. Sắc ký đồ HPLC của cao chiết sau khi thủy phân (lutein tự do)



trans-lutein:

λ_{max} = *424; 446; 474 (nm)*



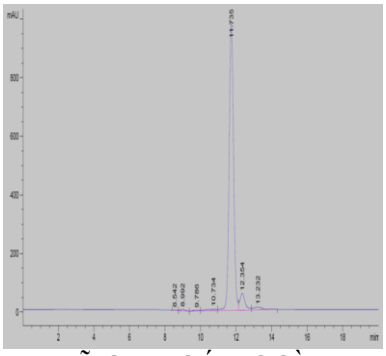
cis-lutein:

λ_{max} = *328; 418; 442; 468 nm*

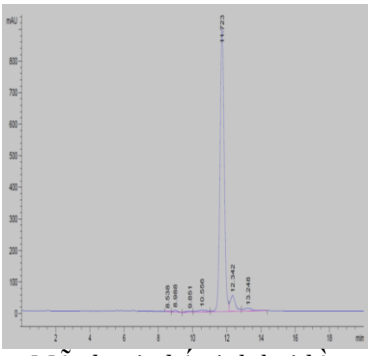
Hình 3.3. Phổ hấp thụ UV-Vis mẫu lutein

Điều kiện tối ưu để thủy phân cao chiết giàu lutein của hoa Cúc vạn thọ như sau: Cao chiết sau làm giàu được hòa tan trong etanol với tỷ lệ cao chiết/ etanol = 0,8 g/mL, thủy phân cao chiết bằng KOH với tỷ lệ KOH/cao chiết = 0,18 (w/w) ở 70 ^{o}C trong 80 phút. Hiệu suất thủy phân lutein este đạt 82,94 %.

3.2.5. Kết quả quá trình tinh chế sản phẩm lutein và zeaxanthin



Mẫu lutein kết tinh lần 1



Mẫu lutein kết tinh hai lần

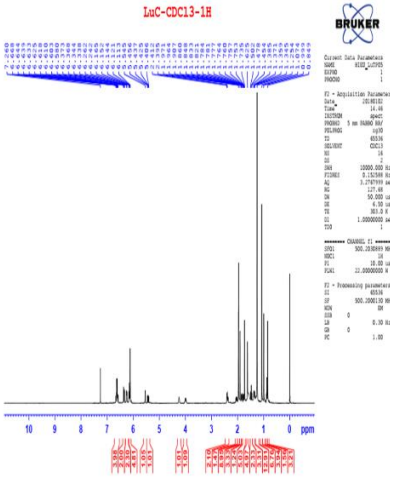
Hình 3.4. Kết quả HPLC của mẫu tinh thể lutein sau kết tinh

Cao chiết sau thủy phân được tinh chế bằng hệ dung môi etanol/nước tỷ lệ 1/1 (v/v) ở 50 ^{o}C, nước là tác nhân kết tinh, tỷ lệ dung môi 100/1 (v/w). Hiệu suất quá trình kết tinh chế đạt 76,3 %. Sản phẩm sau quá trình tinh chế có hàm lượng lutein tổng 96 % trong đó có 88,9 % lutein và 7,1 % zeaxanthin.

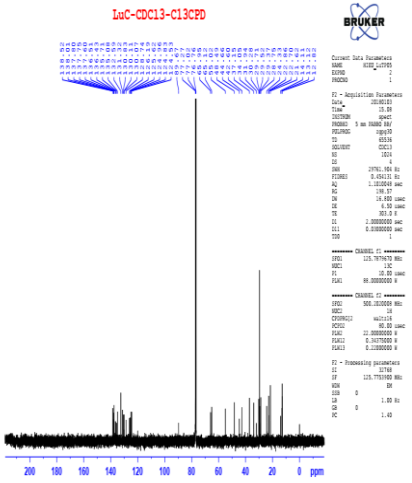
3.2.6. Kết quả phân lập lutein và zeaxanthin làm chất chuẩn phân tích

Lutein sau khi tinh chế được sử dụng để phân lập lutein và zeaxanthin bằng phương pháp sắc ký cột silicagel.

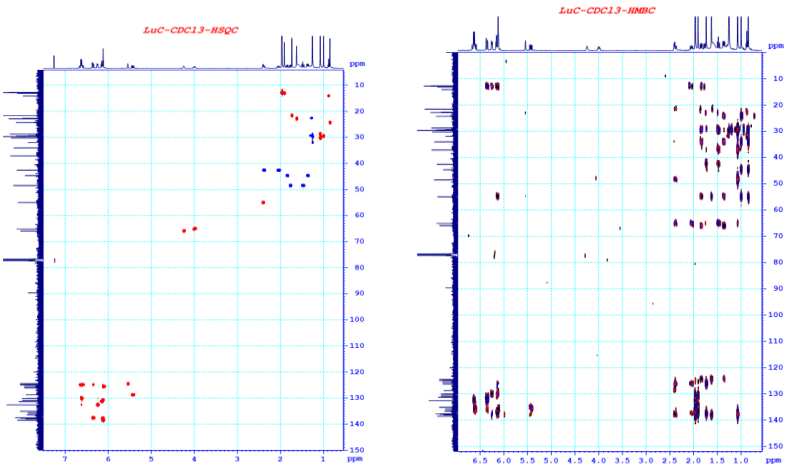
Từ hỗn hợp sản phẩm chứa 96 % lutein tổng đã phân lập được 260 mg chất chuẩn lutein (hàm lượng trên 98 %) và 6 mg chất chuẩn zeaxanthin (hàm lượng trên 95 %) đạt chỉ tiêu chất lượng làm chất chuẩn phân tích cho HPLC. Cấu trúc của chất chuẩn lutein sau khi phân lập cũng đã được xác định.



Hình 3.5. Phổ ^{1}H-NMR của chất chuẩn lutein

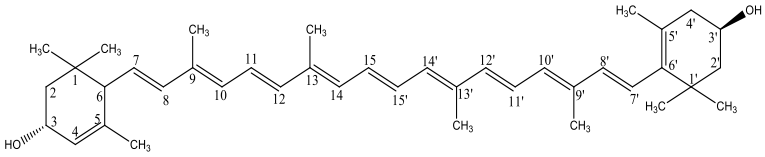


Hình 3.6. Phổ ^{13}C-NMR của chất chuẩn lutein



Phổ HSQC *Phổ HMBC*

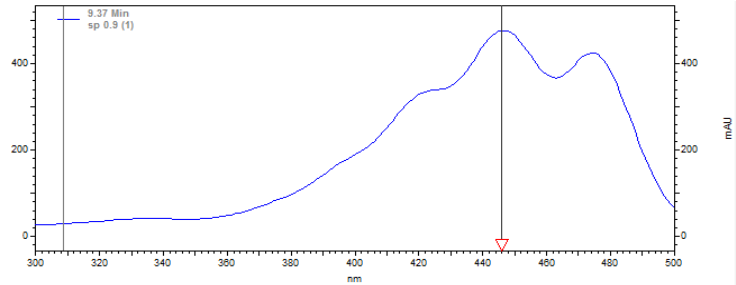
Hình 3.7. Phổ HSQC và phổ HMBC của chất chuẩn lutein



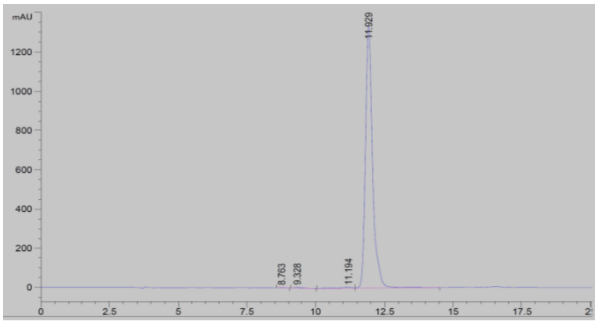
Lutein

Hình 3.8. Cấu trúc hóa học của lutein

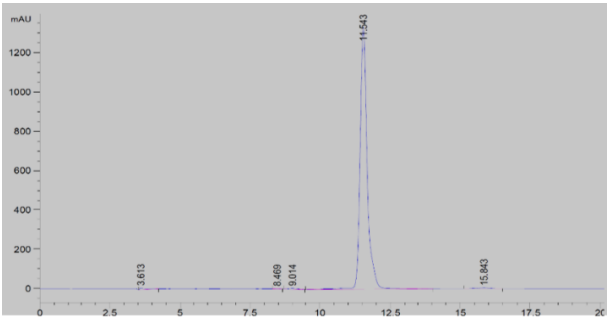
Lutein sau khi phân lập được phân tích bằng UV-Vis, HPLC, LC – MS/MS để đối chứng với chất chuẩn của Sigma Aldrich.



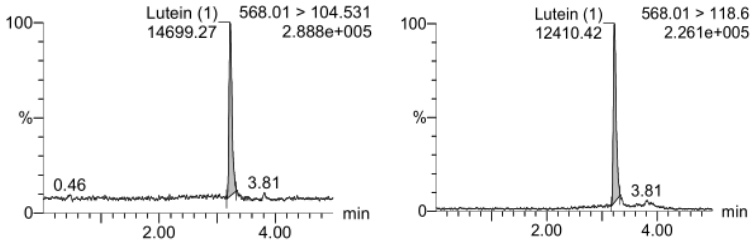
Hình 3.9. Phổ tử UV-Vis của lutein



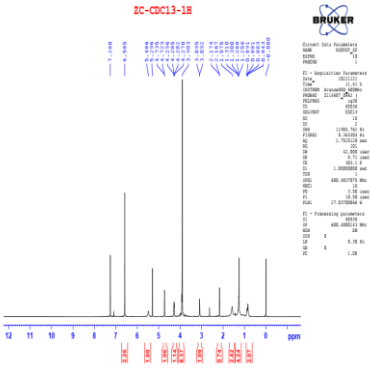
Hình 3.10. Sắc ký đồ HPLC của chất chuẩn lutein đối chứng



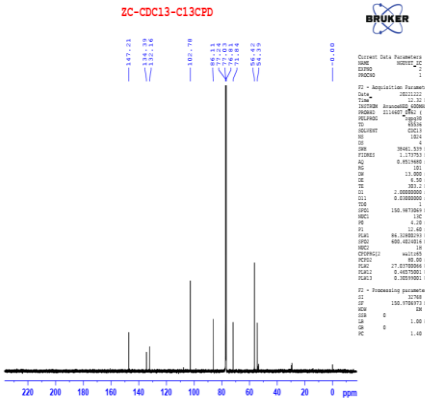
Hình 3.11. Sắc ký đồ HPLC của chất chuẩn lutein tinh chế



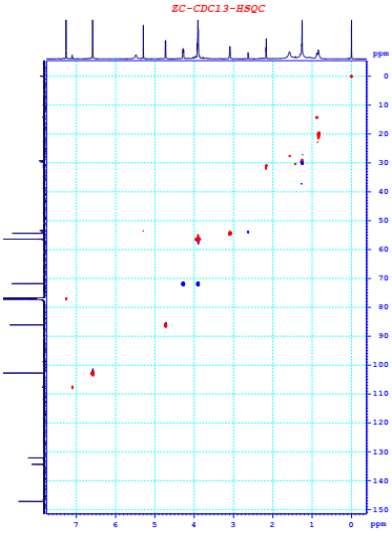
Hình 3.12. Sắc ký đồ LC-MS/MS của chất chuẩn lutein tinh chế



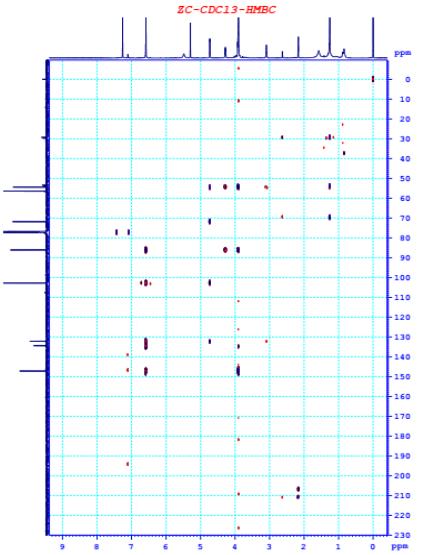
Hình 3.13. Phổ ^{1}H-NMR của chất chuẩn zeaxanthin



Hình 3.14. Phổ ^{13}C-NMR của chất chuẩn zeaxanthin

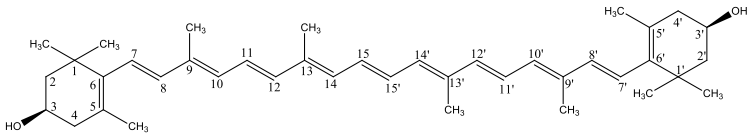


Phổ HSQC

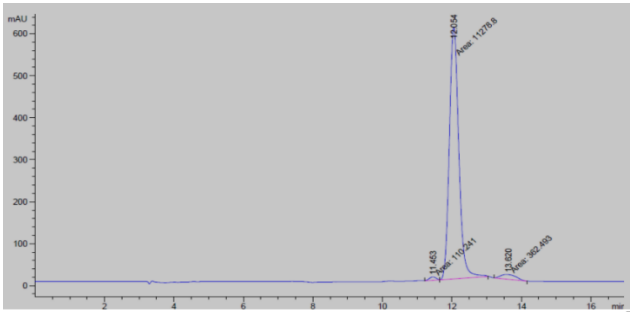


Phổ HMBC

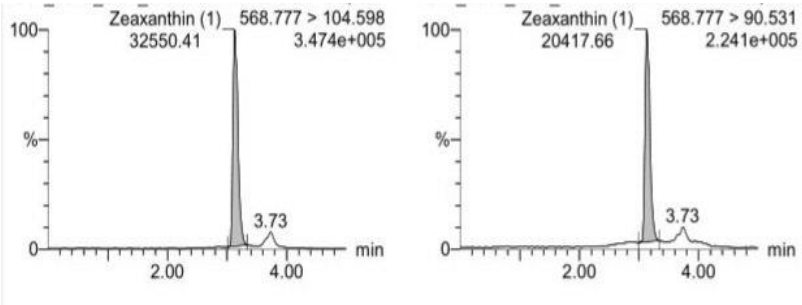
Hình 3.15. Phổ HSQC và phổ HMBC của chất chuẩn zeaxanthin



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học của zeaxanthin



Hình 3.17. Sắc ký đồ HPLC của chất chuẩn zeaxanthin tinh chế



Hình 3.18. Sắc ký đồ LC-MS/MS của chất chuẩn zeaxanthin tinh chế

3.2.7. Nghiên cứu phương án bảo quản sản phẩm lutein và zeaxanthin

Lutein bị ảnh hưởng mạnh bởi ánh sáng, cường độ ánh sáng liên tục khiến cho lutein dễ chuyển hóa chất lượng, giảm nhanh chất lượng. bảo quản dưới ánh áng tự nhiên cũng làm giảm chất lượng của lutein. Chất

lượng lutein giảm từ 96,3 % xuống 87,9 % sau 1 tuần, sau 2 tuần hàm lượng còn lại 84,2 %; sau 3 tuần, hàm lượng lutein giảm xuống 75,7 % và sau 4 tuần hàm lượng lutein giảm còn 74,1 %. Kết quả còn cho thấy lutein được bảo quản tốt trong môi trường tránh ánh sáng hoặc trong bình kín màu nâu. Tuy nhiên, trong điều kiện tiếp xúc với môi trường, lutein có xu hướng bị oxy hóa, làm giảm dần chất lượng của lutein. Lutein gần như không thay đổi chất lượng trong 4 tuần khi bảo quản tránh ánh sáng và để lạnh tại -10 ^{o}C.

3.3. Đánh giá tính ổn định của phương pháp chiết tách, tinh chế lutein từ hoa Cúc vạn thọ

Kết quả đánh giá tính ổn định của phương pháp chiết tách, tinh chế lutein từ lượng lớn bột Cúc vạn thọ khô trong bảng 3.1.

Phương pháp chiết tách, tinh chế lutein từ hoa Cúc vạn thọ có độ ổn định cao. Sản phẩm với độ tinh khiết 92,9 %, đạt tiêu chuẩn dược điển Mĩ USP 40. Kết quả được kiểm nghiệm độc lập ở Viện Thực phẩm chức năng.

Bảng 3.1. Kết quả chất lượng sản phẩm lutein

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức chất lượng	
			Yêu cầu cần đạt	Thực tế đạt được
1	Tổng hàm lượng lutein và zeaxanthin	%	≥ 80	92,9
2	Hàm lượng lutein	%	≥74	85,85
3	Hàm lượng zeaxanthin	%	≤ 8,4	7,05
4	Hình thức	-	màu vàng cam	màu đỏ, cam
5	Tro sulfate	%	≤ 2,0	1,0
6	Mất khối lượng sau sấy khô	%	≤ 1,0	Không đáng kể

3.4. Kiểm nghiệm độ ổn định và độc tính của lutein

3.4.1. Nghiên cứu độ ổn định của lutein

Lutein được kiểm nghiệm có độ tinh khiết 96,3%. Kết quả kiểm nghiệm cho thấy: bảo quản trong môi trường chân không ở các nhiệt độ khảo sát, hàm lượng lutein tổng vẫn đảm bảo > 90 %, độ ổn định của sản phẩm có thể trên 9 tháng. Tuy nhiên kết quả cũng cho thấy quá trình bảo quản mẫu ở nhiệt độ thấp (-10 ^{o}C), hàm lượng lutein ít biến đổi hơn so với ở các khoảng nhiệt độ cao hơn.

Như vậy, sản phẩm lutein hoàn toàn có thể bảo quản ở nhiệt độ thường hoặc nhiệt độ mát trong tủ bảo quản mẫu với điều kiện chân không và tránh ánh sáng.

3.4.2. Kết quả thử nghiệm độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của lutein

- *Độc tính cấp (LD_{50}) theo đường uống trên chuột nhắt trắng:* Chưa tìm thấy LD_{50} của hỗn hợp lutein và zeaxanthin theo đường uống trên chuột nhắt trắng với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống là 3000 mg/kg thể trọng.

- *Độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng:* Trên các lô chuột dùng hỗn hợp lutein và zeaxanthin liều 1,68 mg/kg thể trọng/ngày, và liều 8,40 mg/kg thể trọng/ngày, trong 90 ngày liên tục, cho thấy:

+ Chuột khỏe mạnh, tăng trọng tốt, đều;

+ Không làm thay đổi các chỉ số huyết học (hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu);

+ Không làm thay đổi 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 gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận.

3.5. Kết quả tạo nano nhũ tương lutein

3.5.1. Lựa chọn thông số để thiết kế thí nghiệm

Tween 80, span 60 được chọn là các chất nhũ hóa để bào chế nano nhũ tương lutein. Pectin được sử dụng trong 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

3.5.2. Thiết kế thí nghiệm

Công thức nano nhũ tương lutein được thiết kế theo bảng 3.2.

Bảng 3.2. Công thức nano nhũ tương

Stt	Thành phần	Hàm lượng
1	Lutein	5 %
2	Dầu đậu nành	1 %
3	Tween 80 (X_1)	Thay đổi
4	Span 60 (X_2)	Thay đổi
5	Pectin (X_3)	Thay đổi
6	Nước cất 2 lần	100 ml

Hàm mục tiêu:

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

Ma trận thí nghiệm được thiết kế bằng phần mềm Modde gồm 17 thí nghiệm.

3.5.3. Phân tích quy luật tác động

Dữ liệu thực nghiệm 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.

Phương trình hồi quy có dạng:

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

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

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. 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.

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

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

Nano nhũ tương lutein trong, có màu cam đậm; độ khúc xạ ánh sáng là 1,35 ± 0,02; tỷ trọng 1,02 ± 0,01 g/ml; phân tán hoàn toàn trong nước.

3.6. Nghiên cứu xử lý các vấn đề môi trường

Trong quá trình sản xuất thử nghiệm, axit citric sử dụng trong quá trình tiền xử lý nguyên liệu đã được thu hồi và tái sử dụng nhiều lần**.**

Bã chiết sau khi được loại bỏ hoàn toàn dung môi bằng phương pháp sấy, được sử dụng làm phân bón hữu cơ vi sinh.

KẾT LUẬN

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 ^{o}C, 16 giờ;
   - Bột CVT khô được tiền xử bằng axit citric 0,6 % ở 50 ^{o}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 ^{o}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 ^{o}C. Hiệu suất làm giàu cao chiết 96,9 %;
   - Thủy phân cao chiết: KOH(C_2H_5OH) /cao chiết = 0,18 (w/w), nồng độ KOH trong C_2H_5OH = 0,144 (g/ml), nồng độ cao chiết = 0,8 g/mL, 70 ^{o}C, 80 phút. Hiệu suất thủy phân đạt 82,94 %;
   - Tinh chế lutein: etanol/nước = 1/1 (v/v); 50 ^{o}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 ^{o}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 phân tán 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.

B. DANH MỤC 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 $6E_1$, 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*, 57(2): 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 nano nhũ tương lutein, *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, tập 20, số đặc biệt, trang 65-69.
5. 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.