



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027630

(51)⁷ C07C 403/00; C07C 403/02

(13) B

(21) 1-2019-01372

(22) 18/03/2019

(45) 25/03/2021 396

(43) 27/05/2019 374A

(73) Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Hoàng Mai Hà (VN); Đặng Thị Tuyết Anh (VN); Hồ Thị Oanh (VN); Hắc Thị Nhung (VN); Nguyễn Đức Tuyển (VN); Nguyễn Văn Tuyển (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH LYCOPEN TINH KHIẾT TRỰC TIẾP TỪ MÀNG GẮC

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách lycopene có độ tinh khiết trên 98% từ màng gác khô bao gồm các công đoạn chính: sấy màng gác tới độ ẩm phù hợp cho việc chiết tách, chiết tách lycopene bằng phương pháp Soxhlet, tinh chế lycopene bằng phương pháp kết tinh trong hệ hai dung môi.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách hoạt chất có hoạt tính sinh học cao, cụ thể là sáng chế đề xuất phương pháp chiết tách lycopene tinh khiết một cách trực tiếp từ màng gấc khô bằng phương pháp Soxhlet sử dụng các dung môi hữu cơ, phương pháp tinh chế để thu được lycopene có độ tinh khiết trên 98%, phương pháp bảo quản lycopene tinh khiết.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gấc (*Momordica Cochinchinensis* Spreng) là loại trái cây đặc sản của khu vực Đông Nam Á, đặc biệt gần gũi với người dân Việt Nam bởi giá trị dinh dưỡng cao. Trong màng gấc có chứa một số carotenoid (lutein, beta-cryptoxanthin, zeaxanthin, alpha-caroten, beta-caroten, cis-lycopen, và trans-lycopen), vitamin (vitamin C, vitamin E) và một số axit béo (omega-3, omega-6) (H.C.Mai và cộng sự, 2016). Hiện nay, tại Việt Nam, để thuận tiện cho việc sử dụng, bảo quản và vận chuyển, một lượng lớn quả gấc sau thu hoạch được xử lý, tách bỏ vỏ và hạt, sấy nhiệt để tạo màng gấc khô thương phẩm.

Trong đó, hoạt chất lycopene thu hút được nhiều sự quan tâm nhất bởi hoạt tính chống oxy hóa, tiêu diệt gốc tự do cao (Vuong và cộng sự, 2006). Một số nghiên cứu của Mỹ được công bố gần đây cho thấy, lycopene mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe con người như giảm được ung thư bàng quang, tuyến tiền liệt, tiêu hóa, giảm lượng cholesterol, phòng tránh các bệnh về tim mạch, rối loạn lipid máu, đóng vai trò quan trọng đối với hệ miễn dịch... Hoạt chất có tác dụng phòng chữa sạm da, trứng cá, khô da, rụng tóc, nổi sần, dưỡng da, bảo vệ da, giúp da luôn hồng hào, tươi trẻ và mịn màng. Ngoài ra, lycopene có công dụng làm mau lành vết thương, vết bỏng, vết loét (Võ Văn Chi, Cây thuốc An Giang).

Phân tử lycopene có công thức phân tử là $C_{40}H_{56}$ khối lượng 536 Da. Danh pháp IUPAC: (6*E*,8*E*,10*E*,12*E*, 14*E*,16*E*,18*E*, 20*E*, 22*E*, 24*E*, 26*E*) - 2, 6, 10, 14, 19, 23, 27, 31 - Octamethyldotriaconta - 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30 – tridecaen. Hoạt chất có 13 liên kết đôi, trong đó 11 liên kết đôi liên hợp, chính vì vậy nó hoạt động như một chất chống lại các tác nhân oxy hóa như tia UV (Bailey, 2015). Lycopene hấp thụ bức xạ có bước sóng dài của ánh sáng khả kiến và khi phối hợp trong mỹ phẩm dưỡng da, nó có thể giảm ảnh hưởng của tia UV lên da, hoặc có thể bảo vệ da khỏi các ảnh hưởng ngắn hạn (cháy nắng) và dài hạn (ung thư da) của ánh sáng mặt trời. Tuy nhiên, lycopene dễ bị oxy hóa, nhạy cảm với ánh sáng và nhiệt do có các liên kết chưa bão hòa trong cấu trúc phân tử. Lycopene có số đồng phân hóa rộng, kết quả lý thuyết là có 1056 cấu hình *cis* - *trans*. Tuy nhiên chỉ có một vài đồng phân được thực sự tìm thấy trong tự nhiên. Đồng phân *trans* của lycopene là đồng phân phổ biến nhất được tìm thấy trong thực phẩm. Đồng phân 5-*cis* là ổn định nhất sau tất cả các đồng phân *trans*, 9-*cis*, 13-*cis*, 15-*cis*, 7-*cis* và 11-*cis*. Các đồng phân lycopene được tìm thấy trong huyết tương người, sữa mẹ, và các mô của con người chủ yếu là của đồng phân *cis*. Các màu sắc của lycopene có liên quan trực tiếp đến hình thức đồng phân của nó. Các đồng phân *trans* và hầu hết các đồng phân khác của lycopene có màu đỏ, trong khi tetra-*cis* của lycopene có màu cam (T.C. Kha và cộng sự, 2013).

Lycopene dạng bột có màu đỏ tía. Hoạt chất có khả năng hòa tan trong clorofom, hexan, benzen, cacbon disulfit, axeton, ete dầu hỏa, không tan trong các dung môi phân cực như nước, etanol, metanol. Lycopene nhạy cảm với ánh sáng, oxy, nhiệt độ cao và axit (L.T. Vuong và cộng sự, 2006). Lycopene kết tinh với tinh thể hình kim màu đỏ tía, không mùi; nhiệt độ nóng chảy: 172 – 173°C; hấp thụ cực đại (trong ete dầu hỏa) tại các bước sóng là 361, 444, 470 và 502 nm (Raluca Bunghez và cộng sự, 2011).

Lycopene là một carotenoit có trong thực vật và một số loài sinh vật quang hợp khác. Lycopene được tìm thấy trong nhiều loại rau quả có màu đỏ như gấc, cà chua,

đưa hấu, đu đủ, ổi đỏ, bưởi đỏ, bưởi chùm. Theo nghiên cứu của Ishida (2004), Nhung (2010) và Ciriminna (2016), màng gấc chứa hàm lượng lycopene từ 1,5-3,7 mg/g, cao gấp 70-200 lần hàm lượng lycopene trong cà chua và cao hơn tất cả các loại hoa quả khác. Tuy nhiên, cho đến nay, người ta mới chỉ thành công trong việc chiết tách lycopene tinh khiết từ quả cà chua ở quy mô thương mại. Trong một số nghiên cứu đã được công bố, người ta đã chiết tách được dầu gấc bằng phương pháp ép, phương pháp trích ly bằng CO₂ siêu tới hạn... (Kha Chấn Tuyên, 2014). Sau đó, lycopene được chiết tách từ dầu gấc bằng phương pháp xà phòng hóa hoặc sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (Vũ Thị Hồng Phượng, 2016). Tuy nhiên, những phương pháp này không có hiệu quả kinh tế và không thể triển khai ở quy mô thương mại vì những lý do sau:

- Hàm lượng lycopene trong dầu gấc tương đối thấp, vào khoảng 500-2500ppm (Le Thuy Vuong, US/0024275A1) trong khi giá dầu gấc thương phẩm rất cao. Kết quả là giá thành của lycopene chiết tách theo phương pháp này không có tính cạnh tranh.
- Việc chiết tách lycopene từ dầu gấc bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC không thể thực hiện ở quy mô sản xuất.
- Việc chiết tách lycopene từ dầu gấc bằng phương pháp xà phòng hóa tương đối phức tạp, khó phân tách. Dầu gấc sau khi xà phòng hóa không thể hoàn nguyên được và là phế liệu ảnh hưởng đến môi trường.
- Ưu điểm của phương pháp trích ly CO₂ siêu tới hạn (chẳng hạn, xem công bố đơn sáng chế số VN44817, ngày 25/12/2015 cho đơn số 1-2014-02004) là có thể tách dung môi siêu tới hạn ra khỏi dịch chiết dễ dàng bằng cách hạ áp suất, hay đối với trường hợp cần sử dụng thêm các dung môi hữu cơ để hỗ trợ cho quá trình trích ly đạt hiệu quả cao hơn thì lượng dung môi thêm vào ít, do đó không gây ảnh hưởng nhiều đối với môi trường. Hệ thống trích ly hoàn toàn kín, do đó hạn chế được sự phân hủy của hoạt chất bởi ánh sáng và môi trường. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là chi phí đầu tư và bảo dưỡng cho thiết bị rất lớn, đắt đỏ, khó

thực hiện ở quy mô thương mại.

Việc chiết tách lycopene từ màng gấc cũng đã được mô tả trong công bố đơn sáng chế số VN3464, ngày 26/06/2017 cho đơn số 2-2017-00102 sử dụng màng gấc tươi và dung môi DME (dimethyl ete). Phương pháp này có nhược điểm là sử dụng màng gấc tươi (với độ ẩm khoảng 70%) khiến dung môi DME không phân cực khó có thể thẩm thấu để chiết tách lycopene từ màng gấc.

Do đó, cần có quy trình chiết tách lycopene trực tiếp từ màng gấc khô thay vì chiết tách lycopene từ màng gấc tươi với các công đoạn phức tạp hay tách lycopene từ dầu gấc với hiệu quả kinh tế cao hơn và tận dụng được toàn bộ hoạt chất trong màng gấc. Phương pháp chiết tách lycopene trực tiếp từ màng gấc khô này cần đảm bảo được khả năng trích ly bằng dung môi hữu cơ cho hiệu suất trích ly cao, đơn giản, chi phí thấp.

Gần đây, các tác giả đã công bố nghiên cứu về quy trình chiết tách lycopene có độ tinh khiết 90% ở quy mô phòng thí nghiệm (Tạp chí Hóa Học, 55(6), 2017). Đây là những nghiên cứu bước đầu sử dụng phương pháp chiết tách thông thường. Quá trình thực hiện chiết tách lycopene cần ngâm chiết nhiều lần sử dụng lượng lớn dung môi, vừa độc hại vừa ảnh hưởng tới môi trường, nhiều công đoạn và sản phẩm thu được có độ tinh khiết không cao, chưa đạt tiêu chuẩn để có thể ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm. Một nhược điểm khác của phương pháp này là ở chỗ do lycopene không bền mà quy trình này đòi hỏi cần cất loại dung môi nhiều lần, điều này ảnh hưởng đến hiệu suất và độ tinh khiết của sản phẩm.

Do vậy, vẫn có nhu cầu cần cải tiến phương pháp nêu trên theo cách có thể tiến hành một cách đơn giản, chi phí thấp do cần ít nhân công và ít dung môi; và điều quan trọng là nâng cao được hiệu quả tách chiết và độ tinh khiết của sản phẩm để có thể ứng dụng được trong dược phẩm, mỹ phẩm và thương mại.

Nhận thấy rằng, việc chiết tách sử dụng phương pháp trích ly bằng Soxhlet có ưu điểm nổi trội là tiết kiệm dung môi, không tốn các thao tác lọc và bổ sung dung

môi mới như các kỹ thuật khác, đặc biệt tách chiết kiệt được hợp chất mong muốn và cho độ tinh khiết cao.

Năm 2014, trong luận văn thạc sĩ, Saima Haroon có đề cập nghiên cứu trích ly lycopene từ bột cà chua sử dụng phương pháp Soxhlet. Sản phẩm thu được là cao chiết có chứa lycopene, chưa có công đoạn tinh chế, tách lycopene ra khỏi hỗn hợp để thu được bột lycopene tinh khiết.

Hệ kín tuần hoàn Soxhlet có thể chiết được lượng lớn lycopene và trích kiệt được dầu gấc có trong màng gấc khô. Tuy nhiên, đặc tính của dầu gấc là có khả năng hòa tan tốt lycopene. Cho nên việc tách được lycopene tinh khiết một cách triệt để từ dầu gấc nói riêng và màng gấc nói chung đòi hỏi có kỹ thuật cao và công nghệ tinh chế tốt. Do vậy, công đoạn tinh chế lycopene là một trong những bước quan trọng và rất cần thiết.

Trong đơn đăng ký sáng chế, chúng tôi đề xuất sử dụng phương pháp Soxhlet để chiết lycopene một cách trực tiếp từ màng gấc khô sử dụng dung môi hữu cơ. Sau quá trình chiết, lycopene được kết tinh từ dịch chiết sử dụng dung môi etanol để thu được bột lycopene có độ tinh khiết cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp chiết tách lycopene tinh khiết một cách trực tiếp từ màng gấc khô sử dụng các dung môi hữu cơ. Sản phẩm bột lycopene thu được có độ tinh khiết lớn hơn 98%, có thể ứng dụng được trong chế tạo sản phẩm nano lycopene để dùng trong dược phẩm và mỹ phẩm.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp chiết tách lycopene có độ tinh khiết trên 98% từ màng gấc khô bao gồm các công đoạn chính: sấy màng gấc tới độ ẩm phù hợp cho việc chiết tách, chiết tách lycopene bằng phương pháp Soxhlet, tinh chế lycopene bằng phương pháp kết tinh trong hệ hai dung môi. Các điều kiện tối ưu để chiết tách lycopene bao gồm lựa chọn dung môi thích hợp cho quá trình chiết tách và quá trình tinh chế lycopene tinh khiết từ màng

gấc khô để thu được bột lycopene có độ tinh khiết cao.

Sáng chế đề xuất phương pháp chiết tách lycopene có độ tinh khiết trên 98% từ màng gấc khô trong đó màng gấc tươi được sấy trong các điều kiện tối ưu nhằm đảm bảo thu được màng gấc khô có độ ẩm thích hợp cho quá trình chiết tách cũng như giảm thiểu được sự hư hại và sự biến đổi của các thành phần có trong màng gấc tươi.

Sáng chế đề xuất phương pháp chiết tách lycopene có độ tinh khiết trên 98% từ màng gấc khô trong đó công đoạn chiết tách lycopene được thực hiện bằng phương pháp chiết Soxhlet với việc sử dụng các dung môi được chọn từ diclometan, tetrahydrofuran, clorofom. Phương pháp chiết Soxhlet là phương pháp chiết hồi lưu dựa trên quá trình bay hơi và ngưng tụ liên tục của dung môi nên tiết kiệm được dung môi và làm tăng hiệu quả chiết. Do độ tan của hoạt chất lycopene trong các dung môi hữu cơ tương đối thấp, nên khi sử dụng phương pháp chiết Soxhlet sẽ khắc phục được các nhược điểm của các phương pháp chiết tách thông thường như tiêu tốn lượng dung môi lớn, độc hại và đòi hỏi nhiều nhân công và công đoạn xử lý.

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các quá trình chiết tách sử dụng các dung môi nêu trên, việc sử dụng các dung môi này có những ưu và nhược điểm khác nhau, theo đó:

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp chiết tách lycopene có độ tinh khiết trên 98% từ màng gấc khô sử dụng dung môi diclometan.

Theo phương án thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp chiết tách lycopene có độ tinh khiết trên 98% từ màng gấc khô sử dụng dung môi tetrahydrofuran.

Theo phương án thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp chiết tách lycopene có độ tinh khiết trên 98% từ màng gấc khô sử dụng dung môi clorofom.

Sáng chế đề xuất phương pháp chiết tách lycopene có độ tinh khiết trên 98% từ màng gấc khô trong đó sau công đoạn chiết tách là công đoạn tinh chế lycopene để

thu được lycopene có độ tinh khiết trên 98%. Việc lựa chọn dung môi kết tinh đáp ứng yêu cầu về mặt kỹ thuật như khả năng hòa tan hoạt chất lycopene, tính tương thích với các dung môi dùng trong công đoạn chiết tách đã được các tác giả khảo sát một cách kỹ lưỡng. Theo đó, phương pháp chiết tách lycopene theo sáng chế sử dụng dung môi etanol để kết tinh lycopene. Trên thực tế, đây là dung môi không độc, hòa tan kém lycopene nhưng có khả năng hòa tan tốt các carotenoid. Ngoài ra, etanol tương hợp tốt với các dung môi được sử dụng để chiết tách. Điều này có ý nghĩa vô cùng quan trọng bởi việc sử dụng etanol sẽ hỗ trợ việc loại bỏ hoàn toàn dung môi chiết tách ra khỏi sản phẩm, giúp sản phẩm thu được có độ tinh khiết cao và an toàn khi sử dụng.

Theo đó, sáng chế đề xuất:

(1) Phương pháp chiết tách lycopene có độ tinh khiết trên 98% từ màng gấc khô bao gồm các công đoạn:

- a) thu gom màng gấc tươi, sấy khô đến độ ẩm khoảng 7%;
- b) chiết tách màng gấc khô thu được bằng phương pháp Soxhlet sử dụng dung môi được chọn từ diclometan, tetrahydrofuran, clorofom với tỷ lệ dung môi/màng gấc khô khoảng 1,5 trong điều kiện nhiệt độ là nhiệt độ sôi của dung môi, áp suất thường, thời gian chiết tách khoảng 3 giờ;
- c) cô đặc dịch chiết thu được bằng cách cất quay chân không để thu hồi dung môi, quá trình cất quay kết thúc khi dung môi bay hơi hết, thể tích hỗn dịch không thay đổi, thu được hỗn dịch chứa các carotenoit và các axit béo;
- d) bổ sung dung môi etanol vào hỗn dịch cô đặc thu được trong bước c) trên đây với tỷ lệ etanol/dịch chiết là 2, thu được huyền phù;
- e) huyền phù thu được trong bước d) được siêu âm trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ thường để làm tăng khả năng phân tán của dịch chiết vào etanol, xuất hiện lycopene kết tinh trong huyền phù và được để qua đêm để quá trình kết tinh được hoàn toàn;

f) lọc hút chân không huyền phù thu được trong bước e) để thu được phần chất rắn chứa lycopene, dịch lọc được cất quay trong chân không để thu hồi ethanol;

g) chất rắn trên phễu lọc thu được trong bước f) trên đây được tái phân tán trong ethanol, sau đó được siêu âm trong thời gian 10 phút để tách tạp chất, sau đó lọc huyền phù trong điều kiện hút chân không, thu được chất kết tinh;

h) lặp lại quá trình tinh chế trong bước g) để thu được lycopene tinh khiết có màu đỏ tía, với độ tinh khiết trên 98%.

(2) Phương pháp theo mục (1) nêu trên, trong đó tốt hơn là sử dụng diclometan làm dung môi chiết tách, nhiệt độ chiết tách là 40°C, thời gian chiết tách là 3 giờ.

(3) Phương pháp theo mục (1) hoặc (2), trong đó ethanol được thu hồi để tái sử dụng.

(4) Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3, trong đó bước tinh chế bao gồm công đoạn siêu âm để hỗ trợ hiệu quả cho việc tách tạp chất, tạo ra sản phẩm có độ tinh khiết cao trên 98%.

(5) Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), trong đó màng gấc tươi được sấy trong điều kiện thích hợp để thu được màng gấc khô có độ ẩm phù hợp cho việc chiết tách lycopene, bao gồm:

+ sử dụng tủ sấy tuần hoàn khí nóng để tăng tốc độ bay hơi ẩm khỏi màng gấc, trong đó màng gấc được dàn đều trên khay lưới inox chống dính với độ dày 1 lớp hạt màng gấc;

+ nhiệt độ thích hợp cho quá trình sấy màng gấc tươi là khoảng 60°C, thời gian sấy màng gấc tươi là 15 giờ để thu được màng gấc khô có màu đỏ tươi, mùi thơm đặc trưng, khá giòn với độ ẩm khoảng 7%.

Hiệu quả của sáng chế

- Mặc dù hàm lượng lycopene trong màng gấc cao gấp khoảng 70 lần hàm lượng lycopene trong cà chua. Tuy nhiên, cho đến nay, lycopene tinh khiết

được bán thương mại đều được chiết tách từ quả cà chua hoặc qua con đường tổng hợp hữu cơ. Sáng chế đề xuất phương pháp chiết tách lycopene tinh khiết một cách trực tiếp từ màng gấc không chỉ mang lại hiệu quả kinh tế cao mà còn góp phần phát triển việc gieo trồng và thu hoạch gấc một loại quả đặc trưng thế mạnh của Việt Nam.

- Phương pháp chiết tách theo sáng chế là phương pháp dễ thực hiện, kinh tế nhờ sử dụng ít dung môi, tinh chế sản phẩm dễ dàng, hiệu suất thu sản phẩm lycopene cao và độ tinh khiết cao trên 98%, cao hơn hẳn so với các phương pháp đã biết khác. Nhờ vậy, sản phẩm lycopene có thể được ứng dụng làm dược phẩm và mỹ phẩm.
- Một ưu điểm quan trọng của phương pháp nêu trong sáng chế là có thể ứng dụng được ở quy mô công nghiệp. Phương pháp đã được tối ưu hóa các điều kiện chiết tách từ công đoạn sấy màng gấc tươi đến độ ẩm tối ưu thích hợp cho quá trình chiết tách mà không ảnh hưởng đến chất lượng của nguyên liệu đầu vào; công đoạn tinh chế được tối ưu hóa và ứng dụng siêu âm để hỗ trợ cho việc tách tạp chất.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được trình bày cụ thể và được hiểu rõ ràng hơn qua việc mô tả chi tiết sáng chế cùng với các hình vẽ minh họa kèm theo, trong đó:

Hình 1 là hình biểu diễn tốc độ suy giảm khối lượng của màng gấc khi sấy ở các nhiệt độ khác nhau;

Hình 2 là hình biểu thị độ ẩm cuối cùng của màng gấc sấy ở các nhiệt độ khác nhau;

Hình 3 là hình màng hạt gấc khô và lycopene tinh khiết;

Hình 4 là hình vẽ so sánh nồng độ bão hòa của lycopene trong các dung môi hữu cơ;

Hình 5 là hình vẽ mô tả quy trình chiết tách và tinh chế lycopene;

Hình 6 là phổ ^1H -NMR and ^{13}C -NMR của lycopene tinh khiết;

Hình 7 là phổ FT-IR của bột lycopene tinh khiết;

Hình 8 là phổ UV-Vis của mẫu bột lycopene chiết tách được và mẫu lycopene chuẩn có độ tinh khiết 98% của Sigma-Aldrich;

Hình 9 là sắc ký đồ mẫu lycopene chiết tách được khai triển bằng hệ dung môi MeOH:ACN:DCM (10:50:40);

Hình 10 là hình biểu diễn độ bền lycopene bảo quản trong các điều kiện khác nhau theo thời gian: -16°C ; 4°C ; nhiệt độ phòng (RT);

Hình 11 là phổ UV-Vis của mẫu bột lycopene tinh khiết được bảo quản trong các điều kiện khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp chiết tách, tinh chế và bảo quản lycopene bao gồm các công đoạn sau:

Công đoạn 1: Sấy màng gấc tươi

Nguyên liệu là quả gấc thu hoạch vào tháng 1 tại Bắc Giang. Từ quả gấc nguyên liệu, tách phần ruột đỏ (màng đỏ và hạt), loại bỏ hạt, còn phần màng đỏ được dàn đều trên khay lưới inox chống dính với độ dày 1 lớp hạt màng gấc và sấy trong tủ sấy tuần hoàn khí nóng ở các nhiệt độ khác nhau. Trong quá trình sấy chúng tôi xác định độ ẩm của màng gấc và dừng việc sấy khi độ ẩm của mẫu gấc không đổi, hoặc thay đổi rất chậm.

Hình 1 cho thấy, xu hướng chung về động thái giảm ẩm của các mẫu sấy là độ ẩm giảm nhanh ở 5 - 10 giờ sấy đầu tiên. Tốc độ giảm ẩm chậm dần và gần như không giảm ở những giờ cuối cùng. Ở nhiệt độ sấy 60°C , 70°C , 80°C và 90°C , độ ẩm giảm đều trong 10 giờ đầu và chậm dần trong các giờ tiếp sau. Sau 15 giờ sấy ở 60°C và 70°C , khối lượng màng gấc còn lại là 31,5% và 32,0%. Chúng tôi tiếp tục sấy đến 20 giờ tuy nhiên độ ẩm giảm rất ít và không đổi ở những giờ tiếp theo. Nhận thấy, thời gian tiếp xúc với nhiệt và oxy trong không khí càng lâu thì màu sắc

của màng gấc càng đậm và gấc mất đi mùi đặc trưng. Do đó, ở nhiệt độ 60°C và 70°C, thời gian sấy 15 giờ là đủ để làm khô màng gấc. Khi sấy mẫu gấc ở nhiệt độ 80°C và 90°C, độ ẩm giảm nhanh trong 5 giờ đầu tiên, sau 15 giờ, khối lượng màng gấc còn tới 32,5% và 32,7%. Có thể thấy rằng nhiệt độ sấy càng cao thì khả năng loại ẩm càng giảm. Đó là do nhiệt độ cao làm hơi nước bay hơi rất nhanh trên bề mặt, các mao mạch và tế bào ở phía ngoài co lại và ngăn cản việc khuếch tán của hơi nước từ trong ra ngoài bề mặt dẫn đến độ ẩm cuối cùng cao. Ngoài ra, khi sấy ở nhiệt độ càng cao, thì phản ứng phân hủy carotenoit càng mạnh, sấy ở nhiệt độ từ 80°C trở lên thì màu sắc và mùi của màng gấc đều không còn giữ được nét đặc trưng. Màng gấc có màu sẫm hơn và có thoảng mùi khét. Màng gấc sấy ở nhiệt độ cao hơn ngoài việc có nguy cơ bị phân hủy và mất màu, còn có khả năng bảo quản kém hơn do có độ ẩm lớn. Như vậy, nhiệt độ và thời gian thích hợp cho việc sấy màng gấc là 60°C trong vòng 15 giờ.

Độ ẩm cuối cùng của các mẫu màng gấc ở các nhiệt độ khác nhau được đo nhanh bằng máy Kern MRS 120-3, kết quả thể hiện trong hình 2. Độ ẩm cuối cùng của màng gấc sấy ở nhiệt độ 60°C, 70°C, 80°C và 90°C lần lượt là 6,98%; 8,41%; 9,82% và 10,37 %.

Kết quả sấy cho thấy sự khác nhau rõ rệt về màu sắc và mùi của các mẫu màng gấc khi được sấy ở các nhiệt độ khác nhau. So sánh màu sắc và mùi vị của màng gấc sau khi sấy được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Màu sắc và mùi vị màng gấc khi sấy ở các nhiệt độ khác nhau sau 15 giờ

Nhiệt độ	Màu sắc	Mùi vị
60°C	Màu đỏ tươi	Mùi thơm đặc trưng
70°C	Màu đỏ tươi	Mùi thơm đặc trưng
80°C	Màu đỏ sẫm	Thoảng mùi khét
90°C	Màu đỏ rất tối màu	Mùi khét rõ rệt

Như vậy, điều kiện phù hợp cho quá trình sấy màng gấc tươi để thu được màng gấc khô có độ ẩm phù hợp cho việc chiết tách lycopene là:

+ Sử dụng tủ sấy tuần hoàn khí nóng để tăng tốc độ bay hơi ẩm khỏi màng gấc

+ Màng gấc được dàn đều trên khay lưới inox chống dính với độ dày 1 lớp hạt màng gấc.

+ Nhiệt độ thích hợp cho quá trình sấy màng gấc tươi là 60°C.

+ Thời gian cho quá trình sấy màng gấc tươi là 15 giờ.

Với điều kiện sấy như trên, màng gấc khô thu được có màu đỏ tươi, mùi thơm đặc trưng, khá giòn với độ ẩm ~7% (Hình 3A).

Công đoạn 2: Chiết tách lycopene từ màng gấc khô

i) *Xác định dung môi hữu cơ cho phương pháp chiết tách lycopene*

Do cấu trúc không phân cực của lycopene, hoạt chất không tan trong nước, gần như không tan trong các dung môi phân cực như etanol, metanol... và tan kém trong các dung môi như axeton và etylaxetat. Lycopene tan tốt trong diclometan, tetrahydrofuran, clorofom. Các tác giả sáng chế đã tiến hành phương pháp chiết tách lycopene từ màng gấc khô sử dụng các dung môi khác nhau trong số các dung môi diclometan, tetrahydrofuran, clorofom. Trước khi tiến hành, các tác giả đã khảo sát nồng độ bão hòa của lycopene trong các dung môi diclometan, tetrahydrofuran, clorofom và hexan và thu được kết quả như bảng 2 và hình 4.

Bảng 2. Nồng độ bão hòa của lycopene trong một số dung môi hữu cơ

Hoạt chất	Dung môi hữu cơ	Nồng độ bão hòa (mg/g)
Lycopene	Clorofom	12,2
Lycopene	Tetrahydrofuran	6,9
Lycopene	Diclometan	6,7
Lycopene	Hexan	0,5

Từ bảng trên đây có thể thấy rằng, hoạt chất lycopene tan tốt nhất trong dung môi clorofom, tan tương đối tốt trong tetrahydrofuran, diclometan và tan kém trong hexan.

Việc sử dụng mỗi loại dung môi trong số ba dung môi diclometan, tetrahydrofuran, clorofom có các ưu điểm và nhược điểm riêng khác nhau.

Theo một phương án của sáng chế, tốt hơn là sử dụng dung môi diclometan. Việc sử dụng dung môi diclometan có ưu điểm là dung môi này có độc tính thấp hơn, nên việc tồn dư dung môi trong sản phẩm lycopene sẽ ít ảnh hưởng đến sức khỏe người dùng so với các dung môi cloroform và tetrahydrofuran. Ngoài ra, việc sử dụng diclometan còn có ưu điểm là nhiệt độ sôi thấp, tốc độ bay hơi nhanh giúp cho việc chiết tách bằng phương pháp Soxhlet có thể thực hiện được ở nhiệt độ thấp, không làm phân hủy lycopene. Hơn nữa, nhiệt độ bay hơi thấp cũng giúp cho việc loại bỏ hoàn toàn diclometan ra khỏi bột lycopene thành phẩm.

Dưới đây, sáng chế thể hiện công đoạn chung để chiết tách lycopene có thể áp dụng cho cả ba dung môi diclometan, tetrahydrofuran, clorofom.

ii) Chiết Soxhlet dùng chiết tách lycopene từ màng gấc khô

Do độ tan của hoạt chất trong các dung môi hữu cơ tương đối thấp, phương pháp chiết tách thông thường tiêu tốn lượng dung môi lớn, độc hại và đòi hỏi nhiều nhân công. Do đó, phương pháp Soxhlet được lựa chọn để chiết lycopene từ màng gấc khô.

Phương pháp Soxhlet là phương pháp chiết hồi lưu dựa trên quá trình bay hơi và ngưng tụ liên tục nên tiết kiệm được dung môi và tăng hiệu quả chiết. 1 kg màng gấc khô (độ ẩm ~7%) được xếp chặt trong túi lọc đặt trong bình trích ly. 1,5 lít dung môi trích ly diclometan hoặc tetrahydrofuran hoặc clorofom từ bình cầu được đun sôi theo đường ống dẫn hơi đi lên, gặp hệ thống sinh hàn ngưng tụ lại trong bình trích ly. Dung môi hòa tan và trích các carotenoit trong màng gấc, khi đạt một lượng dung môi nhất định sẽ hoàn lưu về bình cầu. Quá trình tiếp tục diễn ra trong khoảng

thời gian 3 giờ cho đến khi dung dịch đi xuống từ ống hoàn lưu dung môi nhạt màu chứng tỏ quá trình trích ly kiệt màng gấc đã hoàn thành. Phương pháp được tiến hành trong điều kiện áp suất thường. Mô tả quá trình chiết bằng phương pháp Soxhlet được thể hiện trên hình 5.

Như vậy, điều kiện phù hợp cho quá trình chiết tách lycopene từ màng gấc khô là:

- + Màng gấc khô có độ ẩm khoảng 7%.
- + Phương pháp chiết Soxhlet
- + Tỷ lệ dung môi/màng gấc khô khoảng 1,5
- + Nhiệt độ chiết tách: Nhiệt độ sôi của dung môi trích ly ở áp suất thường (với diclometan là 40°C, với tetrahydrofuran là 66°C, clorofom là 61°C).
- + Thời gian chiết tách ~ 3 giờ.
- + Cả ba dung môi diclometan, tetrahydrofuran, clorofom đều có thể dùng làm dung môi trích ly. Trong đó, tốt hơn là sử dụng diclometan nhờ độc tính thấp và nhiệt độ sôi thấp.

iii) Tinh chế lycopene từ dịch chiết

Dịch chiết màng gấc khô được cô đặc bằng thiết bị cất quay chân không để thu hồi dung môi. Quá trình cất quay được kết thúc khi thể tích hỗn dịch không thay đổi. Hỗn dịch sau cô đặc gồm các carotenoit như lycopene, beta-caroten, dầu gấc chứa các axit béo (omega-3, omega-6)... Do lycopene có khả năng hòa tan trong các axit béo nên việc tách lycopene khỏi hỗn dịch đòi hỏi kỹ thuật kết tinh. Cho đến nay, các công bố khoa học về chiết tách lycopene từ dầu gấc đều phải sử dụng các phương pháp tốn kém như xà phòng hóa hay phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC.

Do lycopene là hoạt chất tan tốt trong các dung môi hữu cơ không phân cực và tan kém hoặc gần như không tan trong các dung môi phân cực, bởi vậy để tinh chế lycopene, chúng tôi sử dụng dung môi là etanol. Với 1 lít dịch chiết cô đặc, 2 lít dung môi được thêm vào. Hỗn dịch được rung siêu âm khoảng 15 phút ở nhiệt độ thường để hỗ trợ khả năng phân tán của dịch chiết vào etanol. Lycopene dần kết tủa và hỗn

dịch được để qua đêm để quá trình kết tinh lycopene được hoàn toàn. Sau đó, hỗn dịch được lọc chân không để thu phần chất rắn chứa lycopene trên phễu lọc. Phần dịch chiết được cất quay chân không để tách ethanol khỏi dầu gấc. Phần chất rắn chứa lycopene được tái phân tán trong ethanol, rung siêu âm trong 10 phút và lọc chân không. Phần chất rắn trên giấy lọc có màu đỏ tía là lycopene tinh khiết (Hình 3B).

Như vậy, điều kiện thích hợp cho quá trình tinh chế lycopene bao gồm:

+ Dịch chiết màng gấc khô được cô quay chân không để tách và thu hồi dung môi diclometan.

+ Dung môi dùng kết tinh lycopene là ethanol. Đây là dung môi không độc, không hòa tan lycopene nhưng có khả năng hòa tan tốt các carotenoit khác như beta-caroten, lutein, beta-cryptoxanthin, zeaxanthin, alpha-caroten. Ngoài ra, ethanol tương hợp tốt với diclometan giúp loại bỏ hoàn toàn diclometan ra khỏi lycopene.

+ Tỷ lệ ethanol/dịch chiết ~2.

+ Quá trình tái phân tán, lọc rửa trong ethanol được thực hiện trong 2 lần.

Sau tinh chế, lượng lycopene chiết tách được là khoảng 3,2 - 4,4 g/kg màng gấc khô.

Công đoạn 3: Đánh giá chất lượng lycopene sau quá trình chiết tách

i) *Cấu trúc của lycopene*

Cấu trúc của lycopene thu được sau quá trình chiết tách được phân tích bằng phổ hồng ngoại FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của lycopene tinh khiết trong CDCl_3 được thể hiện trên hình 6. Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton cho thấy các tín hiệu đặc trưng cho proton của lycopene. Tín hiệu cộng hưởng và vị trí proton trong lycopene như sau: 6,66–6,17 (14H, m); 5,95 (2H, d, $J = 10,0$ Hz); 5,11 (2H, bs); 2,12 (8H, bs); 1,97 (12H, s); 1,82 (6H, s); 1,69 (6H, s); 1,61 (6H, s). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ chỉ ra các tín hiệu đặc trưng của các nguyên tử C. Quy ghép các tín hiệu cộng hưởng và các nguyên tử carbon trong lycopene cho kết quả như sau: 139,46 (2C); 137,37 (2CH);

136,54 (2C); 136,16 (2C); 135,43 (2CH); 132,65 (2CH); 131,61 (2C); 130,12 (2CH); 125,76 (2CH); 125,16 (2CH); 123,99 (2CH); 40,24 (2CH₂); 26,72 (2CH₂); 25,68 (2CH₃); 17,70 (2CH₃); 16,96 (2CH₃); 12,90 (2CH₃); 12,79 (2CH₃).

Phổ FT-IR cho thấy các tín hiệu đặc trưng của lycopene tinh khiết, cụ thể như bảng 3 và hình 7.

Bảng 3. Các tín hiệu đặc trưng trong phổ FT-IR của lycopene tinh khiết

Bước sóng (cm ⁻¹)	Dao động
3038,65	CH _{str} (SP ²)
2912,80; 2854,41	CH _{str} (SP ³)
1625,97	C=C _{str} (Trans)
1439,47; 1390,90	CH ₂ (Bending)
1101,89; 959,77	CH(Trans)
613,64	R ₂ C=CR

ii) *Định lượng lycopene bằng quang phổ hấp thụ UV-VIS*

Cân chính xác 20 mg lycopene tinh khiết vào bình nón chứa 20 g dung môi diclometan, siêu âm đến khi lycopene tan hết. Sử dụng pipet hút và cân chính xác 100 mg dung dịch trên vào bình nón 100 ml chứa 50 g dung môi, thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 2 ppm.

Dùng diclometan làm mẫu trắng. Quét phổ hấp thụ của dung dịch vừa pha bằng máy đo quang phổ hấp thụ UV-VIS SP-3000 nano trong dải bước sóng từ 200-800nm. Kết quả cho thấy, ở cùng một nồng độ, đỉnh hấp thụ ở 517 nm của mẫu lycopene mà chúng tôi chiết tách được cao hơn mẫu lycopene chuẩn có độ tinh khiết 98% của Sigma-Aldrich khoảng 1% (Hình 8). Như vậy có thể kết luận là độ tinh khiết của mẫu lycopene mà chúng tôi chiết tách được đạt độ tinh khiết trên 98%.

iii) *Định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC*

Điều kiện sắc ký:

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC-20A
- Cột sắc ký: Supelco C18 (25cm × 4,6mm, 5µm).
- Detector UV-Vis: 472nm
- Pha động: Metanol: Diclometan: Acetonitril 10:40:50 (thể tích/thể tích), chứa 0,05% BHT
- Tốc độ dòng: 1ml/phút
- Dung môi pha mẫu: DCM
- Thể tích tiêm mẫu: 10µl
- Thời gian rửa giải: 20 phút

Cách xây dựng đường chuẩn:

- Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 5mg chất chuẩn lycopene vào bình định mức tối thiểu 50ml; thêm khoảng 30ml diclometan (DCM), siêu âm đến tan hoàn toàn; bổ sung DCM đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch lycopene chuẩn gốc.
- Pha loãng dung dịch chuẩn gốc để được các dung dịch chuẩn có nồng độ 0,02mg/ml; 0,04mg/ml; 0,06mg/ml; 0,08mg/ml.
- Lọc các dung dịch qua màng lọc 0,45µm trước khi tiêm mẫu.
- Phân tích các mẫu chuẩn bằng HPLC.
- Xây dựng đường chuẩn tương quan giữa nồng độ lycopene và diện tích peak.

Phương pháp định lượng lycopene trong mẫu thử

- Chuẩn bị mẫu thử: cân chính xác một lượng mẫu thử chứa khoảng 5mg lycopene vào BDM 10ml, thêm DCM, siêu âm đến tan hoàn toàn, bổ sung DCM đến vạch; dùng pipet chính xác hút 1ml dung dịch trên cho vào BDM 10ml, bổ sung DCM đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45µm.
- Chuẩn bị mẫu đối chiếu: cân chính xác khoảng 5mg lycopene chuẩn vào bình định mức 10ml, tiến hành pha loãng tương tự mẫu thử. Lọc mẫu qua màng lọc

0,45 μ m trước khi tiêm mẫu.

Kết quả phân tích độ tinh khiết

Mẫu lycopene chiết được từ màng gấc khô được xác định độ tinh khiết bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (Hình 9), kết quả được tính theo mối tương quan với diện tích pic của chất chuẩn.

Kết quả xây dựng đường chuẩn tương quan giữa nồng độ lycopene và diện tích pic sắc ký:

Bảng 4. Kết quả sự phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ lycopene

C (mg/ml)	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10
Diện tích peak (mAU.s)	190053	409109	630078	830095	1055123

Nhận xét: Kết quả trên cho thấy có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic tại bước sóng 472nm và nồng độ lycopene trong khoảng khảo sát từ 0,02mg/ml đến 0,1mg/ml với hệ số tương quan hồi quy $R^2 = 0,999$ đảm bảo độ chính xác cho phương pháp định lượng các dung dịch chứa lycopene nồng độ từ 0,02-0,1mg/ml bằng HPLC.

Bảng 5. Kết quả định lượng lycopene trong sản phẩm chiết

Mẫu	Lycopene chuẩn	Lycopene chiết tách
Khối lượng (mg)	5,0	5,0
Diện tích pic (mAU.s)	512169	513278
Hàm lượng lycopene (%)	98	98,21

Như vậy, Kết quả định lượng bằng HPLC cho thấy lycopene chiết tách được đạt độ tinh khiết > 98%, kết quả phù hợp với kết quả định lượng bằng phổ UV-Vis.

Công đoạn 4. Bảo quản lycopene

Với cấu trúc gồm 13 liên kết đôi, trong đó 11 liên kết đôi liên hợp, lycopene có nhược điểm là không bền, dễ bị oxy hóa, dễ bị phân hủy bởi nhiệt và ánh sáng trong

quá trình chế biến và bảo quản, làm giảm sinh khả dụng của hoạt chất này. Bởi vậy, phương pháp bảo quản lycopene cần đảm bảo ít làm ảnh hưởng đến quá trình phân hủy của lycopene, không làm thay đổi cấu trúc của hoạt chất. Chúng tôi đã tiến hành bao gói lycopene trong giấy bạc để tránh ánh sáng, hút chân không để loại oxy và bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau. Hàm lượng lycopene trong mẫu bảo quản được định lượng bằng phổ UV-Vis. Kết quả định lượng trong hình 10 và 11 cho thấy độ bền của lycopene tăng khi bảo quản ở nhiệt độ thấp. Lycopene bị phân hủy nhanh chóng khi bảo quản ở nhiệt độ phòng. Ở nhiệt độ 4°C, tương ứng với nhiệt độ ngăn mát của tủ lạnh, lycopene bị phân hủy chậm hơn. Ở nhiệt độ -16°C, lycopene tương đối bền, hàm lượng lycopene còn lại 92% sau 3 tháng bảo quản. Việc bảo quản lycopene ở các nhiệt độ thấp hơn có thể nâng cao độ bền của lycopene nhưng không phù hợp cho việc sản xuất và sử dụng trong thực tế.

Như vậy, điều kiện bảo quản lycopene là:

- + Bao gói lycopene trong giấy bạc và hút chân không.
- + Bảo quản ở -16°C.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phương pháp chiết tách lycopene từ màng gấc khô sử dụng dung môi diclometan

1 kg màng gấc khô (độ ẩm ~7%) được xếp chặt trong túi lọc đặt trong bình trích ly. 1,5 lít dung môi diclometan từ bình cầu được đun sôi (ở nhiệt độ sôi của diclometan là 40°C) theo đường ống dẫn hơi đi lên, gặp hệ thống sinh hàn ngưng tụ lại trong bình trích ly. Dung môi hòa tan và chiết tách các carotenoit trong màng gấc, khi đạt một lượng dung môi nhất định sẽ hoàn lưu về bình cầu. Quá trình trích ly liên tục trong khoảng thời gian 3 giờ.

Dịch chiết màng gấc khô được cô đặc bằng thiết bị cất quay chân không để thu hồi diclometan cho đến khi thể tích hỗn dịch còn khoảng 0,2 Lit. Tiếp theo, 0,4 Lit dung môi etanol được thêm vào. Hỗn dịch được rung siêu âm khoảng 15 phút ở nhiệt độ thường để hỗ trợ khả năng phân tán của dịch chiết vào etanol. Lycopene dần

kết tủa và hỗn dịch được để qua đêm để quá trình kết tinh lycopene được hoàn toàn. Sau đó, hỗn dịch được lọc chân không để thu phần chất rắn chứa lycopene trên phễu lọc. Phần dịch chiết được cất quay chân không thu hồi ethanol. Phần chất rắn chứa lycopene được tái phân tán trong ethanol, rung siêu âm trong 10 phút và lọc chân không. Quá trình tái phân tán, lọc rửa trong ethanol được thực hiện trong 2 lần. Cuối cùng, ta thu được khoảng 3,2 - 4,4 g lycopene tinh khiết (trên 98%) có màu đỏ tía. Lượng lycopene chiết tách được phụ thuộc vào chất lượng màng gấc khô.

Việc sử dụng diclometan trong việc chiết tách lycopene từ màng gấc khô trong ví dụ này có ưu điểm ở chỗ, diclometan có nhiệt độ sôi thấp, dễ bay hơi khiến cho tốc độ bay hơi, ngưng tụ và hồi lưu dung môi cao giúp giảm thời gian chiết tách. Cũng nhờ có nhiệt độ sôi thấp, quá trình chiết tách diễn ra ở nhiệt độ thấp (chỉ 40°C) nên giảm được sự phân hủy do nhiệt độ của lycopene.

Ví dụ 2: Phương pháp chiết tách lycopene từ màng gấc khô sử dụng dung môi tetrahydrofuran

Phương pháp tương tự như trong ví dụ 1. Nhiệt độ chiết tách là nhiệt độ sôi của tetrahydrofuran ở 66°C. Tetrahydrofuran có khả năng phân tán tốt vào màng gấc nên có tốc độ và hiệu quả chiết tách lycopene cao hơn diclometan. Tuy nhiên, do tetrahydrofuran có nhiệt độ sôi cao nên tốc độ bay hơi chậm hơn diclometan. Kết quả là thời gian chiết tách không ngắn hơn so với việc sử dụng diclometan. Hiệu suất và độ tinh khiết tương đương với việc sử dụng diclometan.

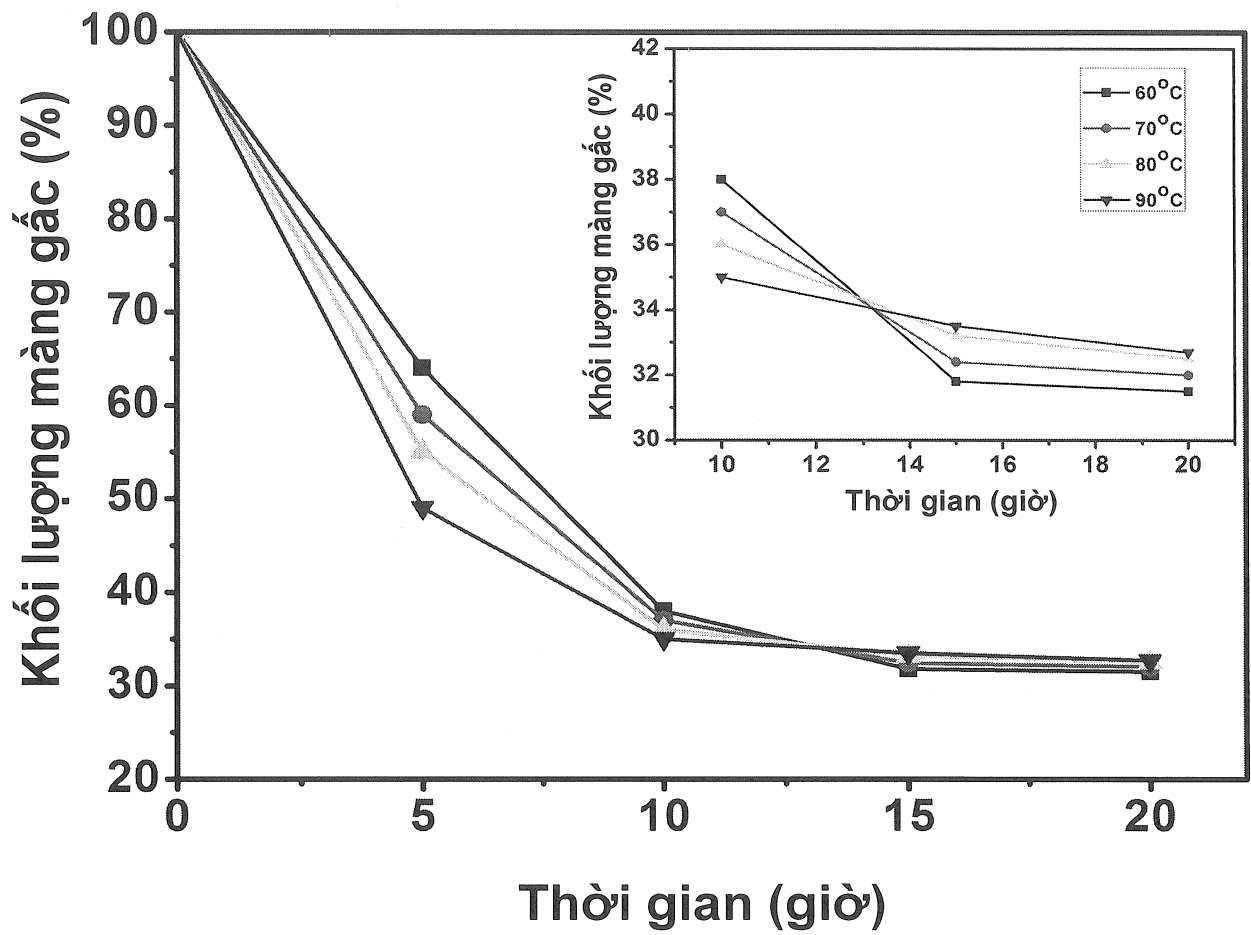
Ví dụ 3: Phương pháp chiết tách lycopene từ màng gấc khô sử dụng dung môi clorofom

Phương pháp tương tự như trong ví dụ 1. Nhiệt độ chiết tách là nhiệt độ sôi của clorofom ở 61°C. Lycopene có độ hòa tan cao nhất trong cloroform (gần gấp đôi so với diclometan) nên cloroform có hiệu quả chiết tách lycopene cao hơn diclometan. Tuy nhiên, do cloroform có nhiệt độ sôi cao hơn diclometan nên tốc độ bay hơi chậm hơn. Kết quả là thời gian chiết tách, hiệu suất và độ tinh khiết tương đương với việc sử dụng diclometan.

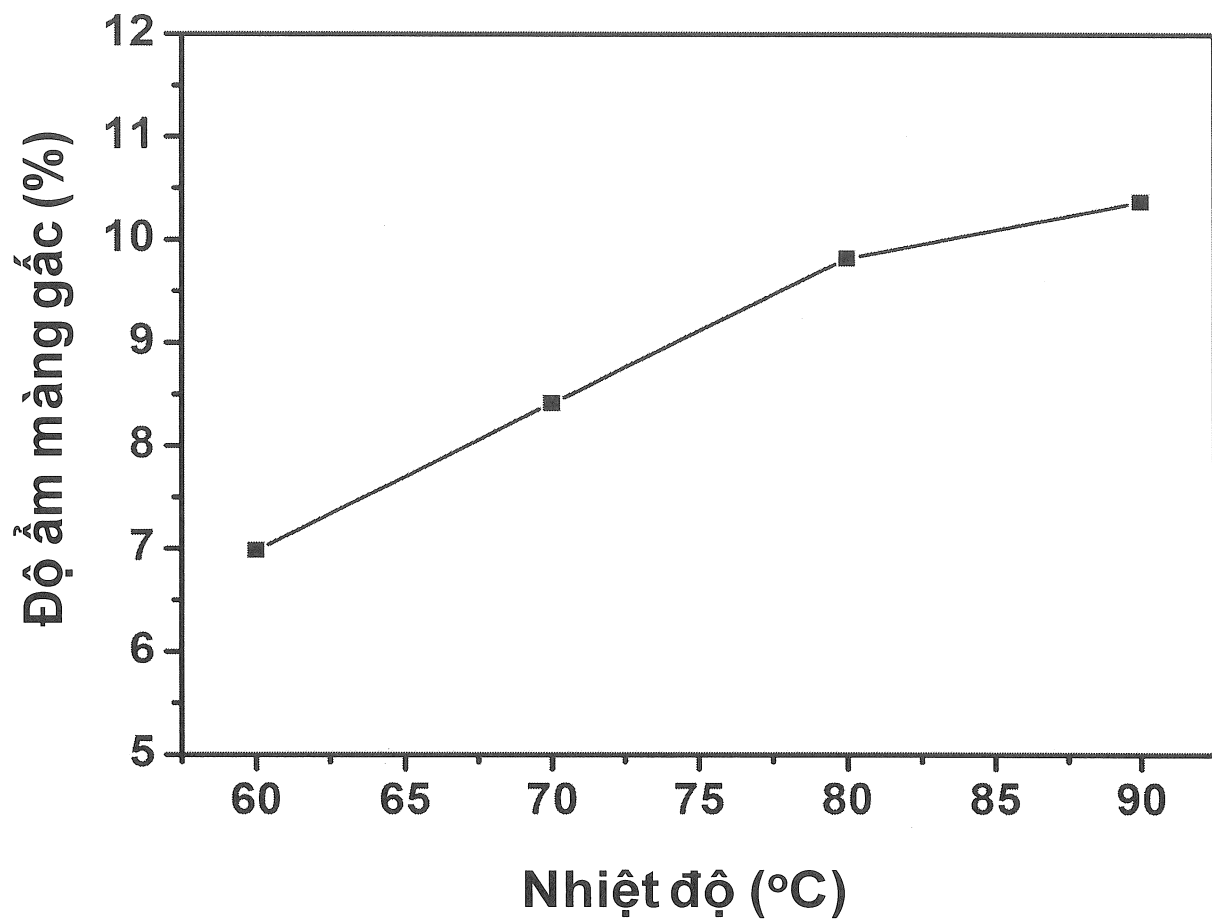
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp chiết tách lycopene có độ tinh khiết trên 98% từ màng gấc khô bao gồm các công đoạn:
 - a) thu gom màng gấc tươi, sấy khô đến độ ẩm khoảng 7%;
 - b) chiết tách màng gấc khô thu được bằng phương pháp Soxhlet sử dụng dung môi được chọn từ diclometan, tetrahydrofuran, clorofom với tỷ lệ dung môi/màng gấc khô khoảng 1,5, trong điều kiện nhiệt độ là nhiệt độ sôi của dung môi, áp suất thường, thời gian chiết tách khoảng 3 giờ;
 - c) cô đặc dịch chiết thu được bằng cách cất quay chân không để thu hồi dung môi, quá trình cất quay kết thúc khi dung môi bay hơi hết, thể tích hỗn dịch không thay đổi, thu được hỗn dịch chứa các carotenoit và các axit béo;
 - d) bổ sung dung môi etanol vào hỗn dịch cô đặc thu được trong bước c) trên đây với tỷ lệ etanol/dịch chiết là 2, thu được huyền phù;
 - e) huyền phù thu được trong bước d) được siêu âm trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ thường để làm tăng khả năng phân tán của dịch chiết vào etanol, xuất hiện lycopene kết tinh trong huyền phù và để qua đêm để quá trình kết tinh được hoàn toàn;
 - f) lọc hút chân không huyền phù thu được trong bước e) để thu được phần chất rắn chứa lycopene, dịch lọc được cất quay trong chân không để thu hồi etanol;
 - g) chất rắn trên phễu lọc thu được trong bước f) trên đây được tái phân tán trong etanol, sau đó được siêu âm trong thời gian 10 phút để tách tạp chất, sau đó lọc huyền phù trong điều kiện hút chân không, thu được chất kết tinh;
 - h) lặp lại quá trình tinh chế trong bước g) để thu được lycopene tinh khiết có màu đỏ tía, với độ tinh khiết trên 98%.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tốt hơn là sử dụng diclometan làm dung môi chiết tách, nhiệt độ chiết tách là 40°C, thời gian chiết tách là 3 giờ.

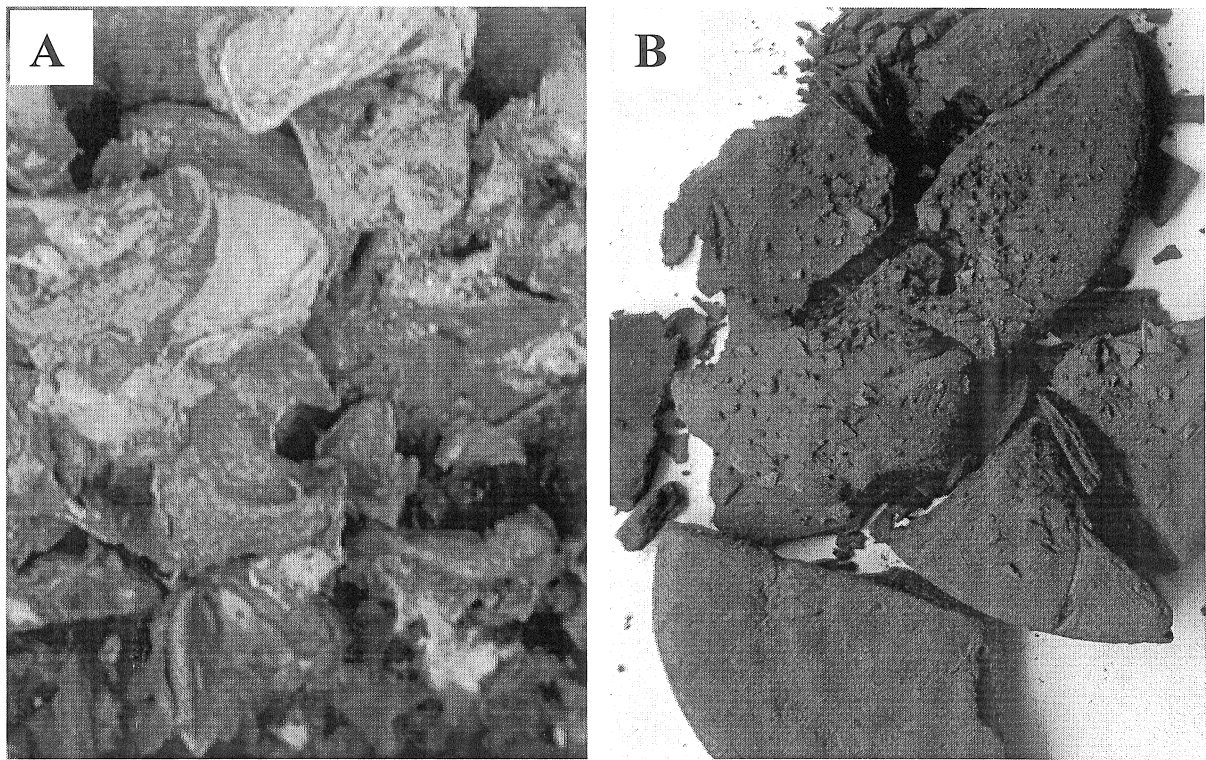
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó etanol được thu hồi để tái sử dụng.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó bước tinh chế bao gồm công đoạn siêu âm để hỗ trợ hiệu quả cho việc tách tạp chất, tạo ra sản phẩm có độ tinh khiết cao trên 98%.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó màng gấc tươi được sấy trong điều kiện thích hợp để thu được màng gấc khô có độ ẩm phù hợp cho việc chiết tách lycopene, bao gồm:
 - + sử dụng tủ sấy tuần hoàn khí nóng để tăng tốc độ bay hơi ẩm khỏi màng gấc, trong đó màng gấc được dàn đều trên khay lưới inox chống dính với độ dày 1 lớp hạt màng gấc;
 - + nhiệt độ thích hợp cho quá trình sấy màng gấc tươi là khoảng 60°C, thời gian sấy màng gấc tươi là 15 giờ để thu được màng gấc khô có màu đỏ tươi, mùi thơm đặc trưng, khá giòn với độ ẩm khoảng 7%.



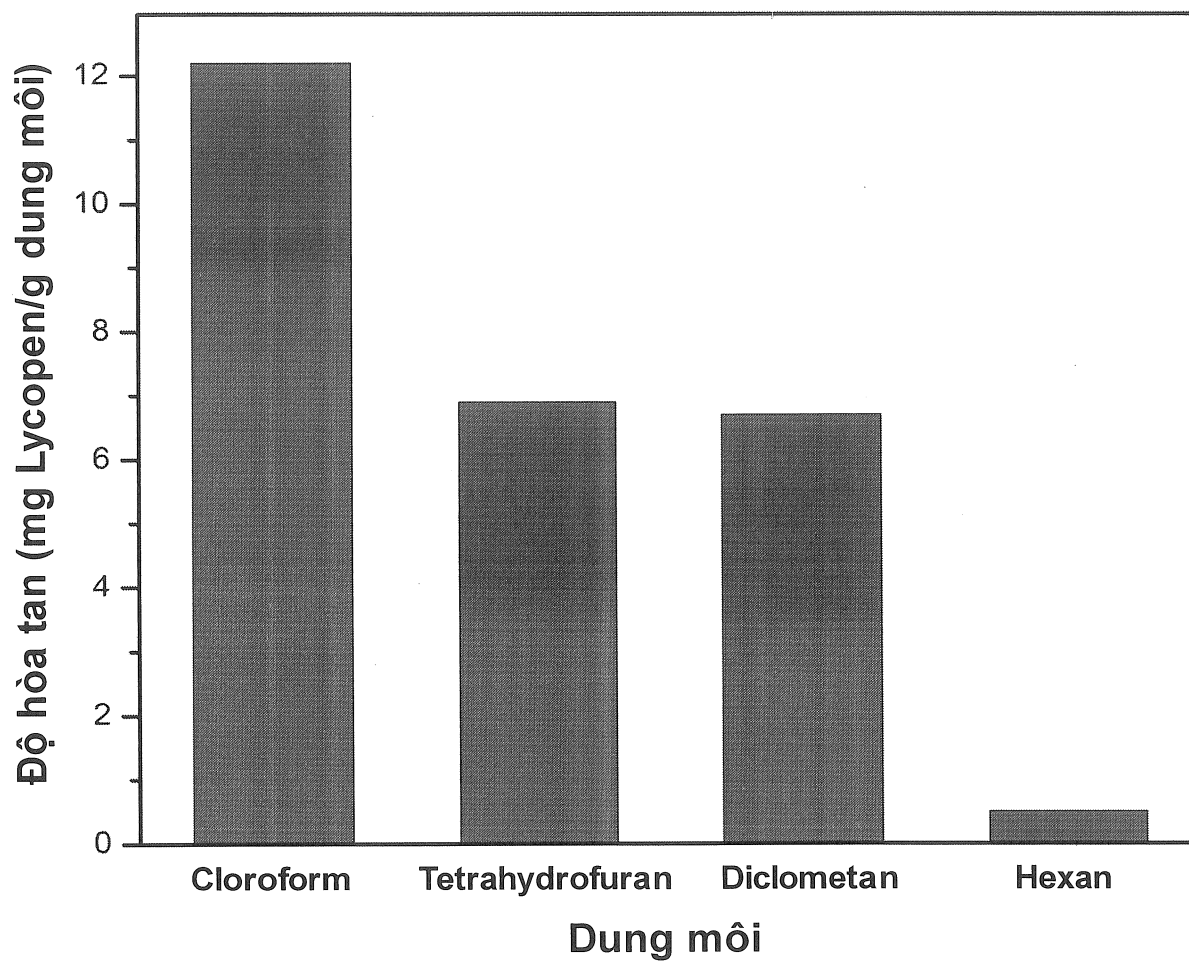
Hình 1. Sự suy giảm khối lượng của màng gác khi sấy ở các nhiệt độ khác nhau



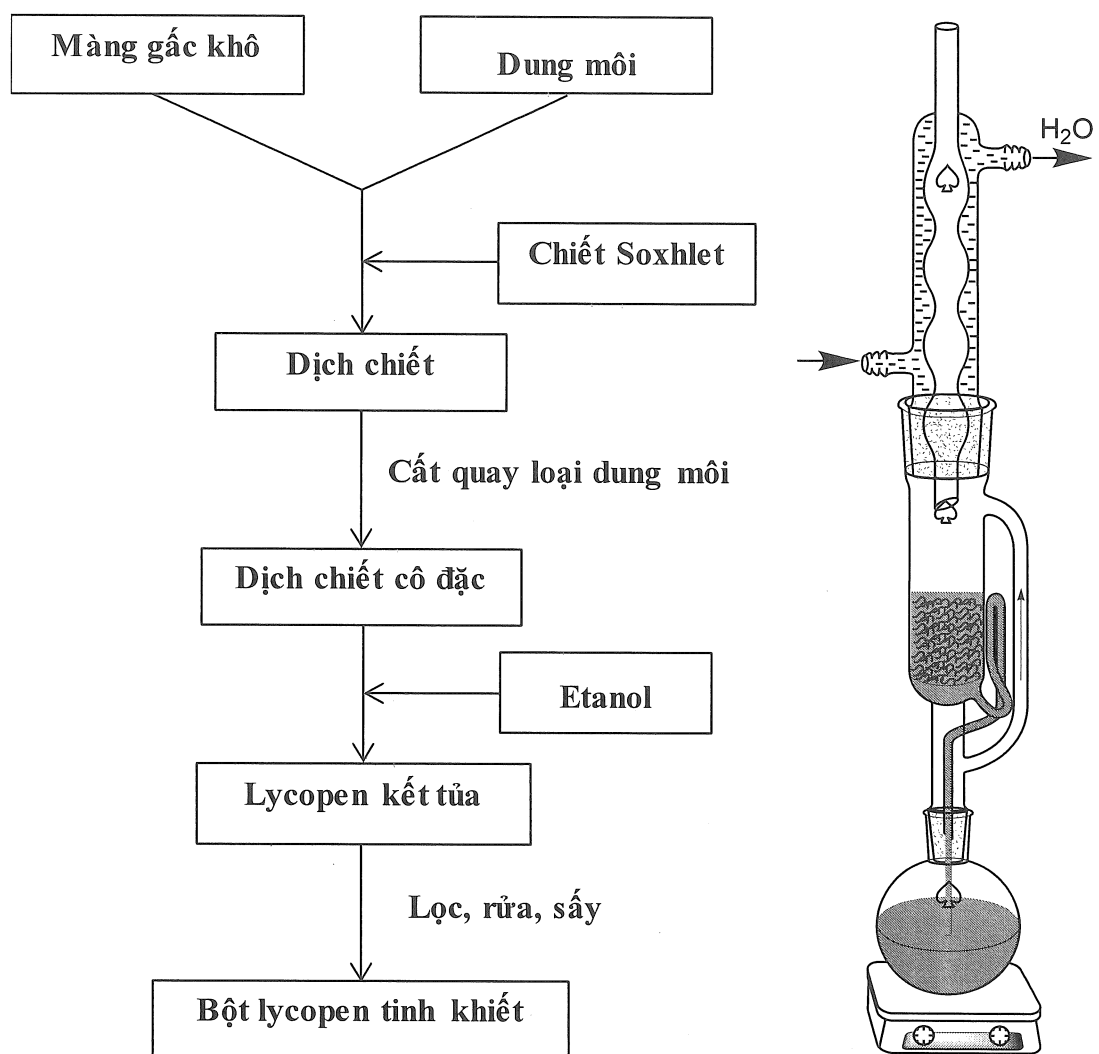
Hình 2. Đồ thị độ ẩm cuối cùng của màng gấc sấy ở các nhiệt độ khác nhau



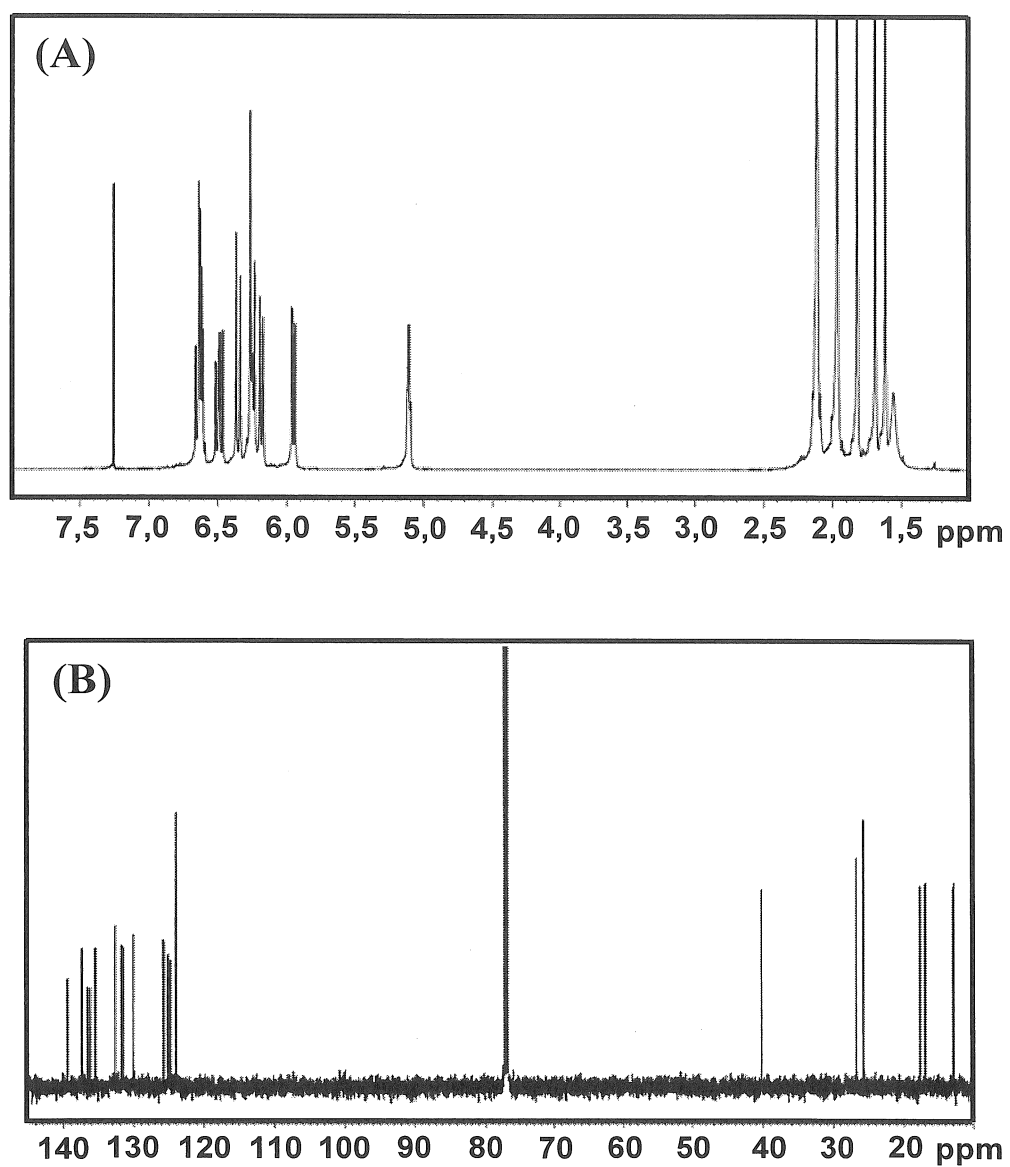
Hình 3. Màng hạt gấc khô (A) và lycopene tinh khiết chiết tách được (B)



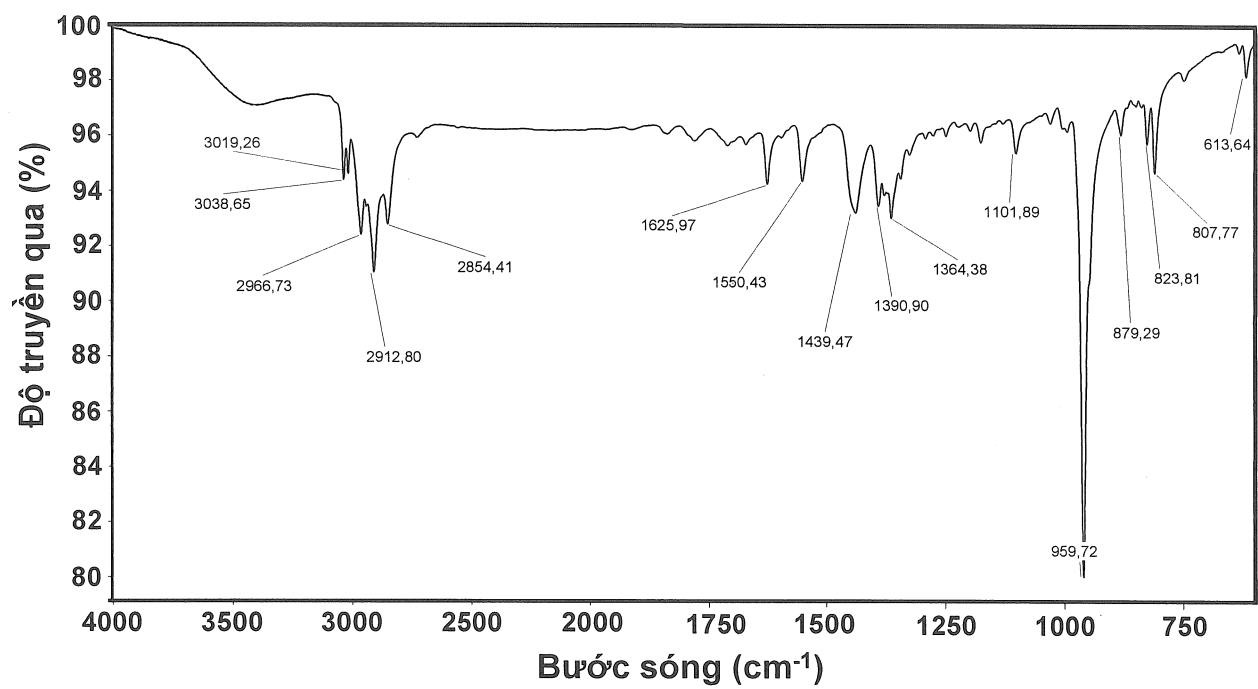
Hình 4. Nồng độ bão hòa của lycopene trong các dung môi hữu cơ



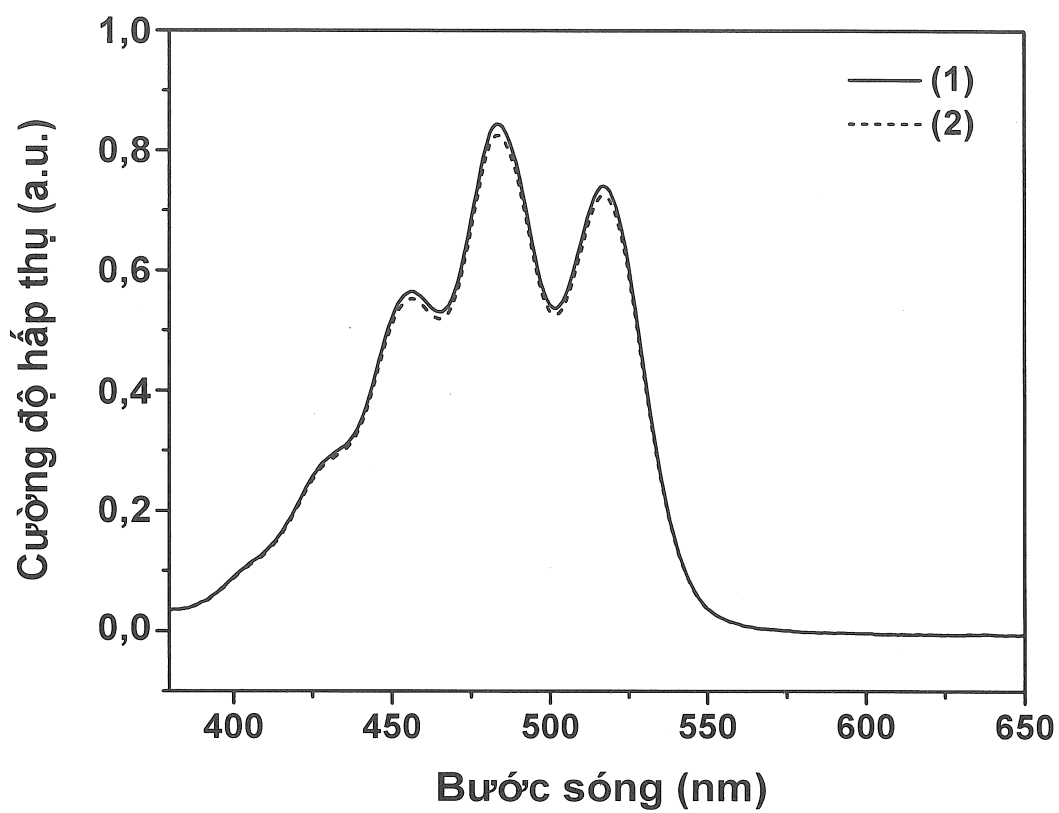
Hình 5. Quy trình chiết tách và tinh chế lycopene



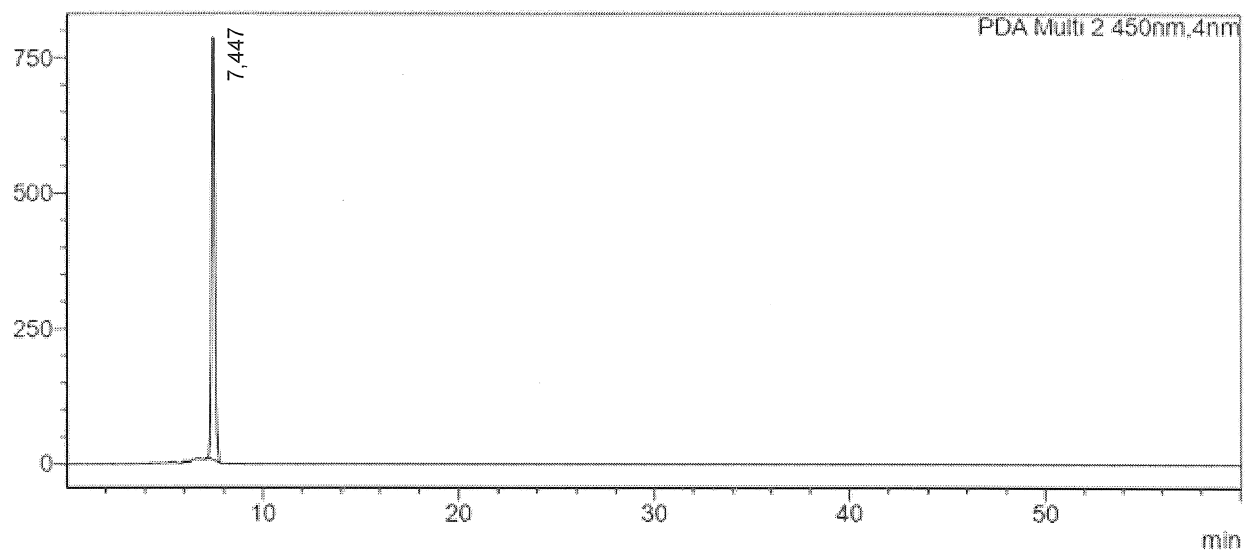
Hình 6. Phổ ^1H -NMR (A) và ^{13}C -NMR (B) của lycopene tinh khiết chiết tách được



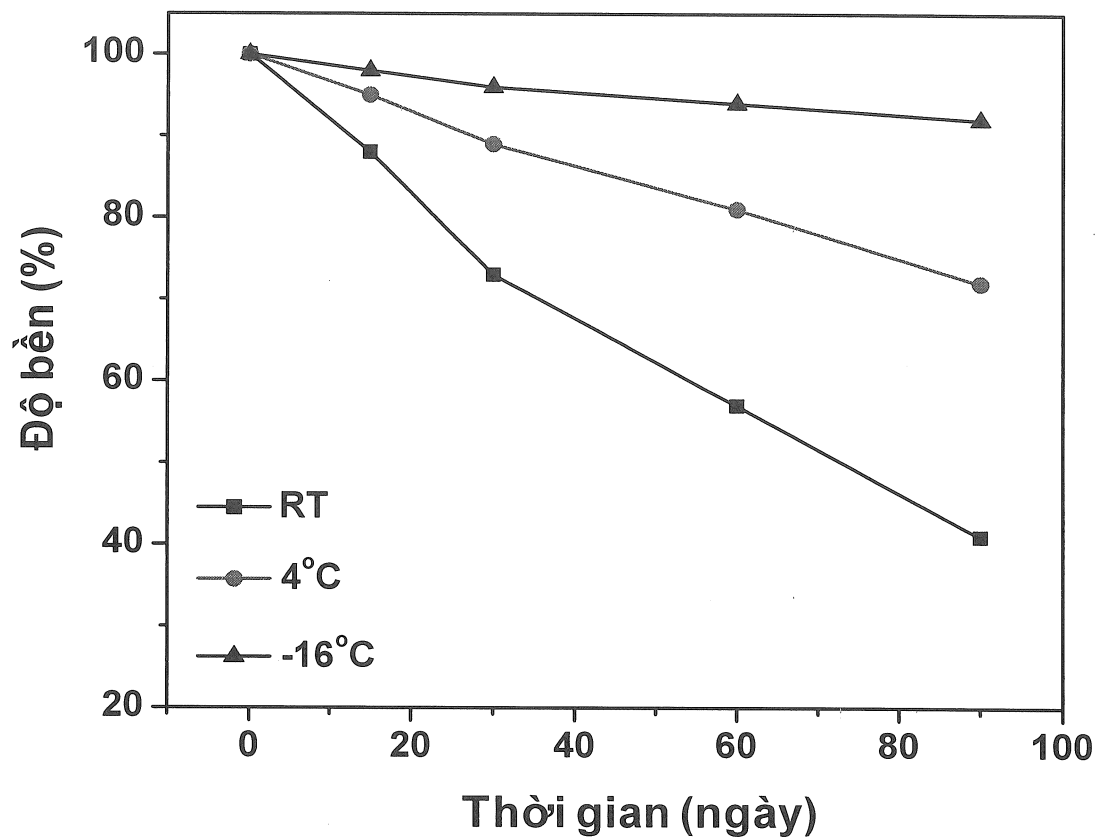
Hình 7. Phổ FT-IR của bột lycopene tinh khiết chiết tách được



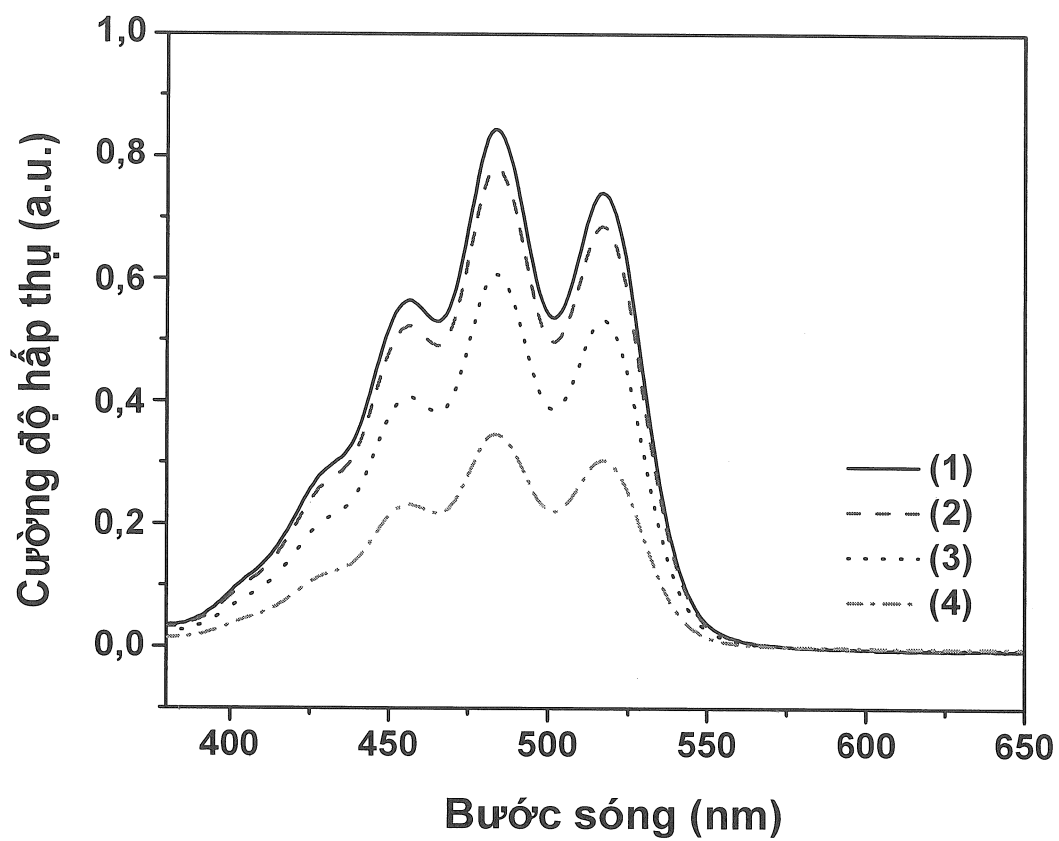
Hình 8. Phổ UV-Vis của mẫu lycopene chiết tách được (1) và mẫu lycopene chuẩn có độ tinh khiết 98% của Sigma-Aldrich (2)



Hình 9. Sắc ký đồ mẫu lycopene chiết tách được khai triển bằng hệ dung môi MeOH:ACN:DCM (10:50:40)



Hình 10. Độ bền lycopene bảo quản trong các điều kiện khác nhau theo thời gian: -16°C; 4°C; nhiệt độ phòng (RT)



Hình 11. Phổ UV-Vis của mẫu bột lycopene tinh khiết được bảo quản trong các điều kiện khác nhau : (1)- Mẫu tại thời điểm ban đầu; (2)- Sau 90 ngày bảo quản ở 16°C; (3)- Sau 90 ngày bảo quản ở 4°C; (4)- Sau 90 ngày bảo quản ở nhiệt độ phòng (RT)