



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002730

(51)⁷ **C07C 403/24; C07B 61/00**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00104

(22) 01/04/2019

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/06/2019 375A

(73) Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ lọc, hóa dầu (VN)
Số 2 Phạm Ngũ Lão, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội

(72) Vũ Thị Thu Hà (VN); Nguyễn Thị Minh Nguyệt (VN); Nguyễn Thị Phương Hòa (VN); Nguyễn Thị Bảy (VN); Nguyễn Minh Đăng (VN).

(54) **PHƯƠNG PHÁP TÍNH CHẾ LUTEIN THU ĐƯỢC TỪ QUÁ TRÌNH XÀ PHÒNG HÓA
CAO CHIẾT (OLEORESIN) HOA CÚC VẠN THỌ (TAGELES ERECTA L.)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp tính chế lutein thu được từ quá trình xà phòng hóa cao chiết (oleoresin) hoa cúc vạn thọ (*Tageles erecta* L.) để thu được hợp chất lutein đạt tiêu chuẩn của 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. Phương pháp cũng thu hồi tối đa dung môi hữu cơ sử dụng trong quá trình tính chế, nhờ đó không phát thải hóa chất gây ô nhiễm môi trường.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp sản xuất và phân lập hợp chất lutein. Đặc biệt hơn, giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp tinh chế hợp chất lutein thu được từ quá trình xà phòng hóa cao chiết hoa cúc vạn thọ. Đồng thời, giải pháp cũng chú trọng đến việc xử lý dịch thải sau quá trình tinh chế để thu hồi và tái sử dụng dung môi.

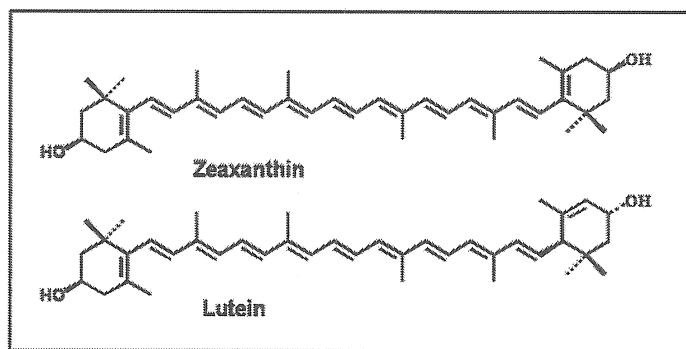
Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

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. 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.

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.

Lutein 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 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.



Công thức cấu tạo của lutein và zeaxanthin

Mặc dù đã có nhiều phương pháp được đề xuất để phân lập và tinh chế lutein nhưng vẫn còn rất nhiều khó khăn để thu được lutein ở dạng tinh khiết cao.

Năm 1995, nhóm nghiên cứu của Frederick Khachik kết tinh lại tinh thể lutein trong hệ dung môi diclometan/ *n*-hexan (1/1) bằng cách: hòa tan lutein 70% trong 550 ml diclometan chứa 1% trietylamin. Sau đó *n*-hexan được thêm từ từ cho đến khi hệ trở nên mờ đục, toàn bộ hệ được giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -20°C đến -10°C, sau khoảng 3 giờ lutein kết tinh hoàn toàn. Tinh thể được lọc và rửa bằng 200 ml *n*-hexan (0°C). Sau đó, sấy chân không ở 50°C trong 3 ngày. Lutein tinh khiết đạt hàm lượng trên 97%. Năm 2001, Frederick Khachik và các cộng sự tiến hành hòa tan 2 gam lutein 70% trong 20 ml tetrahydrofuran (THF) và 30 ml nước cất để kết tinh lại. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng 10 phút. Dung môi được loại bỏ bằng phương pháp ly tâm. Sau khi lấy lutein tinh thể ra khỏi dung dịch, rửa tinh thể lần nữa bằng 20 ml etanol. Ly tâm, sau đó sấy khô dưới chân không cao tại nhiệt độ phòng thu được 1,2 gam lutein tinh thể đạt độ tinh khiết 97%.

Năm 2010, Yaping Zhao và các cộng sự công bố tinh chế được lutein có độ tinh khiết 98% bằng cách hòa tan 1,135 gam lutein 89% trong 760 ml etanol.

Các nghiên cứu đã công bố là những quá trình nhiều bước; tốn thời gian và sử dụng những dung môi hữu cơ có hại hoặc sử dụng dung môi không có hại thì lượng dung môi quá lớn (Yaping Zhao, 2010). Khi sử dụng các loại dung môi như THF, diclometan và *n*-hexan, việc kiểm soát lượng dung môi tồn dư trong hoạt chất là không dễ dàng. Do đó, cần phải phát triển một phương pháp đơn giản, hiệu quả, kinh tế, không độc hại và không gây ô nhiễm môi trường để thu được lutein có độ tinh khiết cao đạt tiêu chuẩn dược điển Mỹ, đáp ứng nhu cầu sử dụng lutein ngày càng cao.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất phương pháp tinh chế hợp chất lutein có độ tinh khiết cao, đơn giản, hiệu quả, không độc hại và không gây ô nhiễm môi trường.

Để đạt được mục đích nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp tinh chế hợp chất lutein bằng cách kết tinh lại lutein có độ tinh khiết chưa cao thu được từ quá trình xà phòng hóa cao chiết hoa cúc vạn thọ (*Tageles erecta L.*) và các sản phẩm có nguồn gốc thực vật khác chứa lutein. Phần dịch thải từ quá trình kết tinh lại được tận dụng để làm dung môi hữu cơ có ích.

Phương pháp tinh chế hợp chất lutein theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

- a) hòa tan lutein thu được từ quá trình xà phòng hóa cao chiết hoa cúc vạn thọ trong lượng tối thiểu etanol ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40-70°C để thu dung dịch lutein bão hòa;
- b) lọc bỏ tạp chất không tan ra khỏi dung dịch lutein bão hòa dưới áp suất giảm;
- c) thêm từ từ nước vào dung dịch lutein bão hòa thu được ở bước b) theo tỉ lệ thể tích nước/dung dịch lutein bão hòa nằm trong khoảng từ 1/1 đến 1,5/1 để kết tinh lại lutein;

d) tách loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được kết tủa lutein màu cam; rửa kết tủa này 3 lần bằng nước cất ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 50°C; sau đó sấy khô trong chân không để thu được hợp chất lutein tinh khiết.

Ngoài ra, phương pháp theo giải pháp hữu ích cũng có thể bao gồm thêm bước:

e) chưng cất dịch thải từ quá trình kết tinh lại để thu hồi dung môi tái sử dụng.

Phương pháp theo giải pháp hữu ích này cho phép tinh chế được lutein có độ tinh khiết cao, thời gian kết tinh ngắn, lượng dung môi ít, không sử dụng dung môi độc hại nên có thể triển khai ở quy mô công nghiệp. Ngoài ra, toàn bộ dịch thải từ quá trình kết tinh lại được chưng cất để thu hồi dung môi, nhờ đó không phát sinh nước thải chứa hóa chất từ quá trình tinh chế lutein.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ khối thể hiện quá trình tinh chế lutein theo giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Thuật ngữ “lutein thu được từ quá trình xà phòng hóa cao chiết” được sử dụng trong giải pháp hữu ích là lutein có bán trên thị trường hoặc có thể thu được sau khi xà phòng hóa cao chiết cánh hoa cúc vạn thọ chứa lutein với hàm lượng 70%.

Thuật ngữ “lutein tinh khiết” được sử dụng trong giải pháp hữu ích có nghĩa là lutein thu được từ bước kết tinh lại, độ tinh khiết tối đa đạt 98% khối lượng.

Phương pháp tinh chế hợp chất lutein được thể hiện trên hình 1.

Trước hết, để có thể kết tinh lại lutein, điều kiện tiên quyết là phải lựa chọn được dung môi hoặc hệ dung môi hòa tan tốt hợp chất lutein. Các dung môi có khả năng hòa tan hợp chất lutein bao gồm metanol, etanol, axeton, THF và một

số hệ dung môi của chúng với nước. THF, axeton cho khả năng hòa tan rất tốt, dễ dàng hòa tan hoàn toàn hợp chất lutein ngay khi ở nhiệt độ thường. Tuy nhiên THF và metanol là các dung môi độc hại nên không được lựa chọn; 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 trong khoảng 5 phút. Hít ở nồng độ 1000 ppm sẽ gây kích ứng ở mắt và cổ họng trong vòng 1 giờ. Các dung môi như *n*-hexan và etyl axetat làm hòa tan một phần hợp chất lutein ở nhiệt độ thường, nhiệt độ tăng sẽ làm tăng khả năng hòa tan hợp chất lutein nhưng không hoàn toàn, gây khó khăn trong việc kết tinh lại hợp chất lutein. Etanol là dung môi không có độc tính, ở nhiệt độ phòng, độ tan của hợp chất lutein trong etanol thấp nhưng khi tăng nhiệt độ độ tan của hợp chất lutein tăng. Quá trình hòa tan hợp chất lutein trong etanol được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 70°C và áp suất môi trường, tốt nhất là ở nhiệt độ 50°C. Nếu nhiệt độ trên 70°C, hiệu quả quá trình tinh chế giảm do hợp chất lutein là hợp chất dễ bị oxy hóa, bị phân hủy bởi nhiệt, ánh sáng. Nếu nhiệt độ dưới 40°C hiệu quả tinh chế không cao hơn nhưng lượng etanol sử dụng nhiều gây lãng phí dung môi. Theo giải pháp hữu ích, ở nhiệt độ 50°C, tỉ lệ khối lượng lutein thô (g) / thể tích etanol (ml) là 1/100. Thời gian hòa tan trên máy khuấy từ nhiệt là 5 phút. Sau đó, lọc bỏ tạp chất không tan để thu được dung dịch lutein bão hòa.

Các dung môi tinh khiết đơn lẻ thể hiện khả năng hòa tan tốt hợp chất lutein, nhưng rất khó khăn trong việc kết tinh lại, khi sử dụng phương pháp bay hơi dung môi và hạ nhiệt độ lại không tạo ra tinh thể. Vì vậy phương pháp theo giải pháp hữu ích hướng đến là bên cạnh dung môi (DM1) hòa tan tốt hợp chất lutein ở bước a), cần thêm dung môi ở bước c) (DM2) không hòa tan hợp chất lutein nhưng hòa tan vô hạn hoặc hòa tan rất tốt DM1. Dung môi thích hợp nhất được lựa chọn là nước vì lutein là hợp chất kém phân cực không tan trong nước nhưng etanol lại tan vô hạn trong nước. Tiến hành cho nước vào dung dịch lutein bão hòa, tinh thể xuất hiện gần như tức thì. Trong hệ chứa nước, etanol và hợp chất lutein đã có sự cạnh tranh vai trò của chất tan khiến cho tinh thể lutein tách ra nhanh chóng. Tính

chất này của chúng cũng giúp cho hiệu suất kết tinh một mẻ tốt hơn. Tỷ lệ nước/dung dịch lutein bão hòa nằm trong khoảng từ 1/1 đến 1,5/1 (theo thể tích), tốt nhất là 1,2/1 để hiệu suất kết tinh lutein cao nhất.

Tách loại dịch lỏng ở áp suất giảm thu được tinh thể lutein màu vàng cam. Tinh thể được rửa nhiều lần bằng nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 50°C và sấy khô trong chân không ở nhiệt độ 40°C để thu được lutein tinh khiết. Ưu tiên sử dụng nhiệt độ của nước nằm trong khoảng từ 30°C đến 50°C. Ở nhiệt độ cao hơn 50°C, lutein bị phân hủy bởi nhiệt dẫn đến hiệu suất tinh chế giảm. Ở nhiệt độ thấp hơn 30°C, khả năng hòa tan tạp chất giảm dẫn đến lutein thu được có độ tinh khiết không cao.

Dịch thải từ quá trình tái kết tinh được chưng cất thu hồi etanol để tái sử dụng làm dung môi hữu cơ. Nước thải và lượng nhỏ tạp chất rắn không có độc tố được thải xả theo đúng quy trình xả thải.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sẽ được hiểu một cách rõ hơn từ các ví dụ dưới đây. Các ví dụ này chỉ có tính chất minh họa nhưng không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1

3 gam lutein thu được từ quá trình xà phòng hóa cao chiết hoa cúc vạn thọ được hòa tan hoàn toàn trong 250ml etanol ở nhiệt độ 60°C. Thời gian hòa tan trên máy khuấy từ nhiệt là 5 phút. Lọc nóng dưới áp suất giảm trong thời gian khoảng 1-2 phút, loại bỏ tạp chất không tan để được dung dịch lutein. Thêm từ từ cho đến hết 300ml nước vào dung dịch lutein để hợp chất lutein kết tinh lại hoàn toàn.

Tách loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được kết tủa lutein màu cam; rửa kết tủa này 3 lần bằng nước cất ở nhiệt độ 50°C; sau đó sấy khô trong chân không ở nhiệt độ 40°C để thu được lutein tinh khiết. Khối lượng lutein tinh khiết

thu được là 1,85 gam. Lutein được phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần, gồm sắc ký lỏng ACQUITY UPLC H-Class và khối phổ Xevo TQ MS của Waters, độ tinh khiết đạt 90%.

Dịch thải từ quá trình tái kết tinh được chưng cất thu hồi etanol để tái sử dụng làm dung môi hữu cơ.

Ví dụ 2

3 gam lutein thu được từ quá trình xà phòng hóa cao chiết hoa cúc vạn thọ được hòa tan hoàn toàn trong 300ml etanol ở nhiệt độ 50°C. Thời gian hòa tan trên máy khuấy từ nhiệt là 5 phút. Lọc nóng dưới áp suất giảm trong thời gian khoảng 1-2 phút, loại bỏ tạp chất không tan để thu được dung dịch lutein. Thêm từ từ cho đến hết 300ml nước vào dung dịch lutein để hợp chất lutein kết tinh lại toàn.

Tách loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được kết tủa lutein màu cam; rửa kết tủa này 3 lần bằng nước cất ở nhiệt độ 50°C; sau đó sấy khô trong chân không ở nhiệt độ 40°C để thu được lutein tinh khiết. Khối lượng lutein tinh khiết thu được là 1,65 gam. Lutein được phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần, gồm sắc ký lỏng ACQUITY UPLC H-Class và khối phổ Xevo TQ MS của Waters, độ tinh khiết đạt 95%.

Dịch thải từ quá trình tái kết tinh được chưng cất thu hồi etanol để tái sử dụng làm dung môi hữu cơ.

Ví dụ 3

3 gam lutein thu được từ quá trình xà phòng hóa cao chiết hoa cúc vạn thọ được hòa tan hoàn toàn trong 300ml etanol ở nhiệt độ 50°C. Thời gian hòa tan trên máy khuấy từ nhiệt là 5 phút. Lọc nóng dưới áp suất giảm trong thời gian khoảng 1-2 phút, loại bỏ tạp chất không tan để thu được dung dịch lutein. Thêm từ từ cho đến hết 360ml nước vào dung dịch lutein để hợp chất lutein kết tinh lại hoàn toàn.

Tách loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được kết tủa lutein màu cam; rửa kết tủa này 3 lần bằng nước cất ở nhiệt độ 30°C; sau đó sấy khô trong chân không ở nhiệt độ 40°C để thu được lutein tinh khiết. Khối lượng lutein tinh khiết thu được là 1,93 gam. Lutein được phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần, gồm sắc ký lỏng ACQUITY UPLC H-Class và khối phổ Xevo TQ MS của Waters, độ tinh khiết đạt 97%.

Dịch thải từ quá trình tái kết tinh được chưng cất thu hồi etanol để tái sử dụng làm dung môi hữu cơ.

Ví dụ 4

3 gam lutein thu được từ quá trình xà phòng hóa cao chiết hoa cúc vạn thọ được hòa tan hoàn toàn trong 300ml etanol ở nhiệt độ 50°C. Thời gian hòa tan trên máy khuấy từ nhiệt là 5 phút. Lọc nóng dưới áp suất giảm trong thời gian khoảng 1-2 phút, loại bỏ tạp chất không tan để thu được dung dịch lutein. Thêm từ từ cho đến hết 360ml nước vào dung dịch lutein để hợp chất lutein kết tinh lại hoàn toàn.

Tách loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được kết tủa lutein màu cam; rửa kết tủa này 3 lần bằng nước cất ở nhiệt độ 50°C; sau đó sấy khô trong chân không ở nhiệt độ 40°C để thu được lutein tinh khiết. Khối lượng lutein tinh khiết thu được là 1,92 gam. Lutein được phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần, gồm sắc ký lỏng ACQUITY UPLC H-Class và khối phổ Xevo TQ MS của Waters, độ tinh khiết đạt 98%.

Dịch thải từ quá trình tinh chế được chưng cất thu hồi etanol để tái sử dụng làm dung môi hữu cơ.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Phương pháp theo giải pháp hữu ích cho phép tinh chế được hợp chất lutein đạt tiêu chuẩn của dược điển Mỹ (USP 40). Ngoài ra, việc xử lý dịch thải từ phương pháp theo giải pháp hữu ích vừa tái sử dụng được dung môi vừa không ảnh hưởng ô nhiễm môi trường.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tinh chế hợp chất lutein thu được từ quá trình xà phòng hóa cao chiết (oleoresin) hoa cúc vạn thọ (*Tageles erecta L.*) bao gồm các bước:

a) hòa tan lutein thu được từ quá trình xà phòng hóa cao chiết (oleoresin) hoa cúc vạn thọ trong lượng tối thiểu etanol ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40⁰C đến 70⁰C để thu được dung dịch lutein bão hòa;

b) lọc bỏ tạp chất không tan ra khỏi dung dịch lutein bão hòa dưới áp suất giảm;

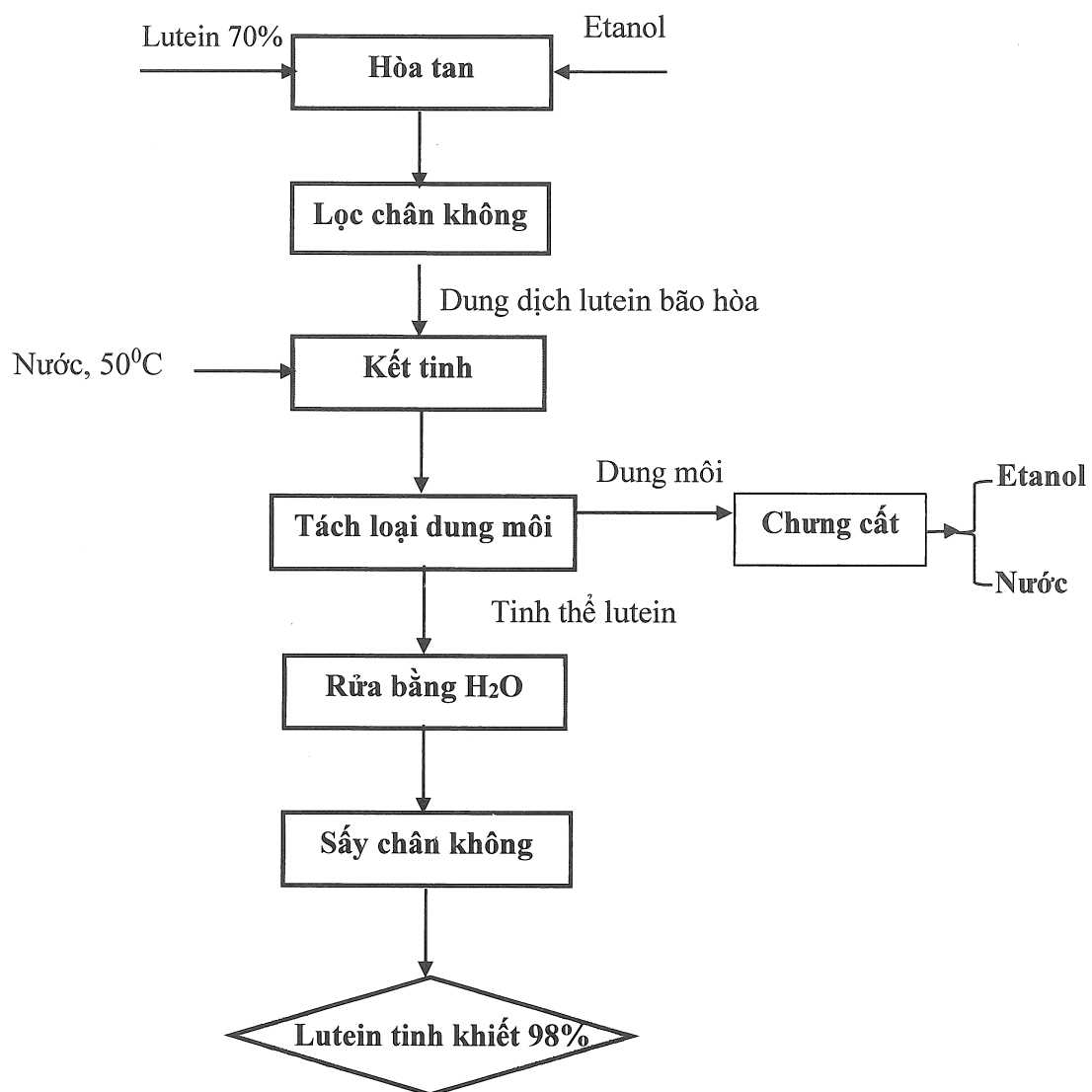
c) thêm từ từ nước vào dung dịch lutein bão hòa thu được ở bước b) theo tỉ lệ thể tích nước/dung dịch lutein bão hòa nằm trong khoảng từ 1/1 đến 1,5/1 để kết tinh lại lutein;

d) tách loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được kết tủa lutein màu cam; rửa kết tủa này 3 lần bằng nước cất ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 50⁰C; sau đó sấy khô trong chân không để thu được hợp chất lutein tinh khiết.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước:

e) chưng cất dịch thải từ quá trình tinh chế để thu hồi dung môi tái sử dụng.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước a) của phương pháp này tốt nhất là được thực hiện ở nhiệt độ 50⁰C và tỉ lệ thể tích nước/dung dịch lutein bão hòa được thực hiện ở bước c) tốt nhất là 1,2/1.



Hình 1: Quá trình tinh chế lutein theo giải pháp hữu ích