

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ĐIỀU KIỆN PHẢN ỨNG ĐẾN HIỆU SUẤT XÀ PHÒNG HOÁ CAO CHIẾT LUTEIN ESTER THU NHẬN TỪ HOA CÚC VẠN THỌ (*Tagetes erecta* L.)

Lê Mỹ Kim Vương^{1,*}, Hoàng Thị Huệ An¹, Trần Thị Phương Anh¹,
Trần Ngọc Lệ², Nguyễn Thị Minh Nguyệt³, Trần Văn Hiếu³, Nguyễn Minh Đăng³

TÓM TẮT

Hoa cúc vạn thọ (*Tagetes erecta* L.) đã được nghiên cứu rộng rãi do chứa hàm lượng lutein dồi dào và chất lượng cao - một sắc tố carotenoid có nhiều hoạt tính sinh học quý, đặc biệt cho mắt. Lutein được thu nhận sau khi xử lý hoa với enzym; chiết trong dung môi không phân cực và cuối cùng thủy phân trong môi trường kiềm mạnh. Giai đoạn thủy phân lutein ester bởi tác nhân hoá học (KOH) được nghiên cứu nhằm hoàn thiện quy trình thu nhận lutein tinh khiết. Các điều kiện phản ứng được khảo sát sử dụng phương pháp HPLC để đánh giá hiệu suất phản ứng. Đã xác định được các điều kiện phản ứng thích hợp như: Tỷ lệ nồng độ KOH/lutein ester 0,18 w/v ở nhiệt độ 70°C trong 80 phút cho hiệu suất 83,54% *trans* - lutein.

Từ Khóa: *Lutein, lutein este, HPLC pha đảo, xà phòng hóa.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lutein là một sắc tố carotenoid có màu vàng cam đẹp được sử dụng làm phẩm màu thực phẩm tự nhiên (E161b) và ứng dụng rộng rãi trong y dược, đặc biệt làm giảm nguy cơ mắc bệnh về mắt ở người cao tuổi (thoái hóa điểm vàng, đục thủy tinh thể...) [1]. Trong hoa cúc vạn thọ (*Tagetes erecta* L.) chứa hàm lượng carotenoid tổng số trong cánh hoa 1,0 - 1,6% (theo khối lượng khô), trong đó khoảng 90% là lutein este, chỉ 5% là zeaxanthin este [2], [3], [4]. Nghiên cứu của Shao (2001) [5] và Joseph và cs (2013) [6] cho thấy, lutein este rất bền, chỉ bị thủy phân một phần trong cơ thể. Do đó, lutein este (LE) cần phải được chuyển hoá thành lutein tự do trong các chế phẩm chứa lutein bổ sung cho con người [5], [7].

Quá trình thủy phân lutein este thường được thực hiện bằng 2 phương pháp: Hoá học và sinh học. Phương pháp sinh học sử dụng enzym lipase ít được áp dụng do hiệu quả kinh tế không cao khi

ứng dụng trong công nghiệp [8]. Phương pháp hoá học (phương pháp xà phòng hoá) dùng tác nhân kiềm mạnh, tuy ít tốn kém nhưng thường phải tiến hành ở nhiệt độ cao, thời gian lâu nên hiệu suất thu nhận lutein tự do thấp [6], [9].

Một số quy trình xà phòng hóa lutein ester đã được Sarkar và cs (2012) [4], Khachik (2001) [10], Kumar và cs (2004) [11], Swaminathan và Madavalapil (2009) [12], Joseph và cs (2013) [13], Hoàng Thị Huệ An và cs (2014) [14] tiến hành nghiên cứu. Quy trình trong các nghiên cứu có sự khác biệt nhiều về lượng tác nhân xà phòng hoá (nồng độ LE và KOH), điều kiện phản ứng (nhiệt độ, thời gian) cũng như không đề cập đến hiệu suất quy trình. Nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt là do các nghiên cứu trên đã sử dụng một số phương pháp phân tích khác nhau (sắc ký bản mỏng, sắc ký lỏng HPLC, đo quang UV-VIS...) để đánh giá ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình xà phòng hoá.

Để làm sáng tỏ vấn đề trên, cần khảo sát đầy đủ và hệ thống hơn về ảnh hưởng của các yếu tố phản ứng đến hiệu suất chuyển hóa lutein ester thành lutein tự do, từ đó đưa ra quy trình thích hợp cho phép xà phòng hóa lutein ester với hiệu suất cao và sản phẩm chất lượng cao. Do đó nghiên cứu

¹ Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

² Trung tâm Thí nghiệm và Thực hành, Trường Đại học Nha Trang

³ Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ lọc, hóa dầu, Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

*Email: vuonglmk@ntu.edu.vn

“Ảnh hưởng của các điều kiện phản ứng đến hiệu suất xà phòng hoá cao chiết lutein ester thu nhận từ hoa cúc vạn thọ” là rất cần thiết.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Lutein este (LE, lutein oleoresin) thu nhận từ hoa cúc vạn thọ theo quy trình của Hoàng Thị Huệ An và cs (2014) [14]. Hoa sau khi thu hoạch được cắt lấy cánh, loại bỏ những cánh hỏng, sau đó được xử lý bằng Viscozym và đem chiết bằng dung môi hexan với tỷ lệ 2: 1 v/w ở 50°C trong 24 giờ, chiết 1 lần. Dịch chiết được đem cô quay chân không ở nhiệt độ dưới 40°C thu được dịch chiết lutein este.

Lutein đối chứng (tinh khiết >90%) của Công ty Biopurify (Trung Quốc), bảo quản trong tối, ở -20°C đến khi sử dụng. Butylated hydroxytoluene (BHT) của Hãng Sigma - Aldrich. n-hexane, ethanol (EtOH), axetat ethyl (AcOEt), KOH, Na₂SO₄, NaCl (tinh khiết phân tích) (Xilong, Trung Quốc), các dung môi HPLC của Hãng Merck (Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xà phòng hoá lutein este và tinh chế lutein tự do

Cân a (g) mẫu LE vào bình cầu cổ nhám 50 ml, thêm V ml dung dịch KOH trong EtOH 96°. Đun hỗn hợp ở 70°C trong 1 giờ (tránh ánh sáng). Thêm V ml nước cất vào hỗn hợp phản ứng, lắc đều. Chiết hỗn hợp với ethyl acetat (2 V ml), 3 lần. Rửa pha hữu cơ với nước cất, làm khan bằng Na₂SO₄ khan, lọc. Dịch chiết lutein tự do được định mức đến vạch 25 ml bằng ethyl axetat. Bảo quản dung dịch ở -20°C cho đến khi phân tích.

Xác định hiệu suất xà phòng hoá lutein este:

Dịch chiết lutein tự do trong ethyl axetat được pha loãng 100 lần bằng axeton và phân tích bằng HPLC. Hiệu suất xà phòng hoá (H, %), hiệu suất thu nhận *trans*-lutein (H_{trans}, %) và *cis*-lutein (H_{cis}, %) lần lượt được tính theo các công thức:

$$H (\%) = S_{Lutein} * 100 / S_{Lutein ester}$$

$$H_{trans} (\%) = S_{trans} * 100 / S_{Lutein ester}$$

$$H_{cis} (\%) = S_{cis} * 100 / S_{Lutein ester}$$

Trong đó: S_{Lutein} là diện tích peak lutein tự do (cả *trans*-lutein và *cis*-lutein) trên sắc ký đồ của mẫu sau xà phòng hoá (so sánh với mẫu lutein đối chứng); S_{trans} và S_{cis} là diện tích peak đồng phân *trans*-lutein và *cis*-lutein trên sắc ký đồ của mẫu sau khi xà phòng hoá, được phân biệt dựa vào phổ hấp thụ UV-VIS trong vùng 300 - 350 nm; S_{Lutein ester} là tổng diện tích tất cả các peak thu được trên sắc ký đồ của mẫu lutein este không xà phòng hoá, cũng được chiết và phân tích trong điều kiện giống hệt mẫu đem xà phòng hoá.

Điều kiện chạy HPLC:

Cột phân tích: TSKgel ODS - 100V (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), tốc độ dòng: 1,0 mL/phút, nhiệt độ cột: 25°C, thể tích bơm mẫu: 20 µL, đầu dò PDA, ghi sắc ký đồ ở bước sóng 450 nm.

Chế độ rửa giải gradient: 100% A (0 - 10 phút), 100% A đến 100% B (10 - 25 phút), 100% B (25 - 60 phút), 100% B đến 100% A (60 - 70 phút), 100% A (70 - 75 phút), trong đó:

A = axetonitrile: methanol: dichloromethane: nước 45: 40: 10: 5 v/v/v/v.

B = axetonitrile: methanol: dichloromethane: nước 45: 14: 40: 1 v/v/v/v.

2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện phản ứng đến hiệu suất xà phòng hoá lutein este

Nồng độ lutein este:

Tiến hành xà phòng hoá LE và chiết lutein tự do như đã mô tả ở trên, trong đó nồng độ KOH được cố định 0,15 g/ml; nồng độ LE trong hỗn hợp phản ứng lần lượt là 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8, 0,9 g/ml. Sau khi phản ứng hoàn tất, xác định hiệu suất phản ứng các mẫu khảo sát. Từ đó, chọn nồng độ LE thích hợp.

Nồng độ KOH:

Tiến hành xà phòng hoá LE và chiết lutein tự do như đã mô tả ở trên, trong đó nồng độ LE được cố định 0,3 g/ml; nồng độ KOH trong hỗn hợp phản ứng lần lượt là 0, 0,025, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30 g/ml. Sau khi phản ứng hoàn tất, xác định hiệu suất phản ứng các mẫu khảo sát. Từ đó, chọn nồng độ KOH và rút ra tỷ lệ KOH/este thích hợp.

Nhiệt độ phản ứng:

Tiến hành xà phòng hoá LE và chiết lutein tự do như đã mô tả ở trên, trong đó: LE 0,3 g/ml, KOH 5% w/v trong EtOH với các mẫu có nhiệt độ phản ứng thay đổi lần lượt là: 40, 50, 60, 70 và 80°C. Sau khi phản ứng hoàn tất, xác định hiệu suất phản ứng các mẫu khảo sát. Từ đó, chọn nhiệt độ thích hợp.

Thời gian phản ứng:

Tiến hành xà phòng hoá lutein este và chiết lutein tự do như đã mô tả ở trên, trong đó nồng độ lutein este được cố định 0,3 g/ml; nồng độ KOH 5% w/v trong EtOH ở 70°C với các mẫu có thời gian phản ứng thay đổi lần lượt là: 20, 40, 60, 80, 100, 120 và 180 phút. Sau khi phản ứng hoàn tất, xác định hiệu suất phản ứng các mẫu khảo sát. Từ đó, chọn thời gian thích hợp.

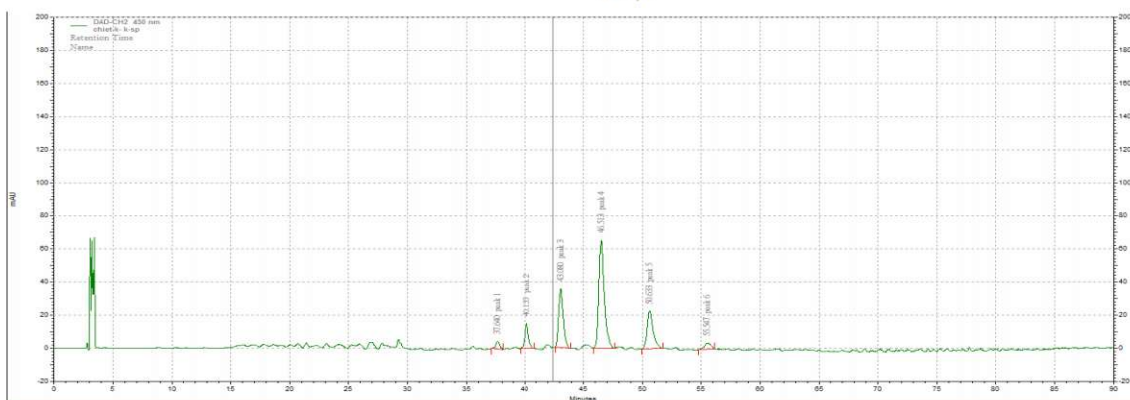
Thử nghiệm điều kiện xà phòng hoá thích hợp:

Cân 3 mẫu LE (20 g/mẫu) vào bình cầu 250 ml, thêm 25 ml dung dịch KOH (nồng độ tối ưu được xác định). Lắp sinh hàn hồi lưu, đun nóng hỗn hợp ở nhiệt độ và thời gian đã được xác định từ kết quả các thí nghiệm trên. Hỗn hợp sau phản ứng được thêm nước cất đến thể tích gấp đôi rồi chiết với ethyl axetat, rửa, làm khan với Na₂SO₄ rồi định mức đến 500 ml. Pha loãng 100 lần bằng axeton, lọc qua màng lọc PTFE 0,45 µm rồi bơm vào thiết bị HPLC. Từ đó, đánh giá hiệu suất xà phòng hoá.

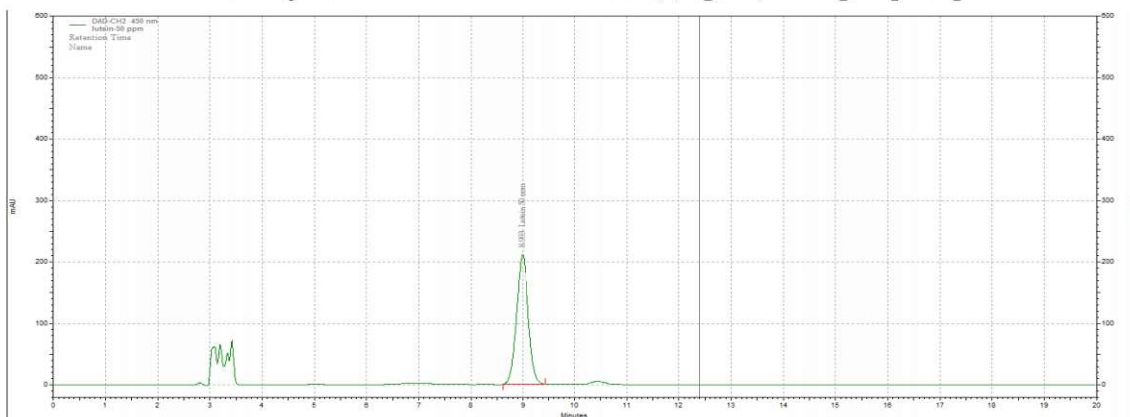
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nhận biết các peak trên sắc ký đồ HPLC

Mẫu LE chiết từ hoa cúc vạn thọ trong nghiên cứu (chưa xà phòng hoá) được phân tích. Kết quả HPLC cho thấy, hỗn hợp chứa chủ yếu các dạng este khác nhau của lutein, trong đó không phát hiện lutein dạng tự do khi so sánh với phổ đồ của lutein đối chứng trong cùng một điều kiện (Hình 1 và 2).

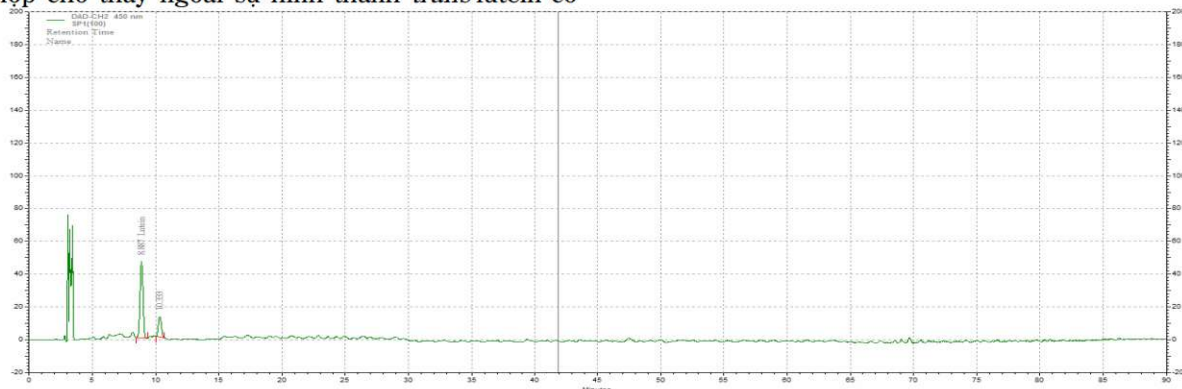


Hình 1. Sắc ký đồ HPLC của mẫu lutein este (0,2 g/ml) không xà phòng hoá

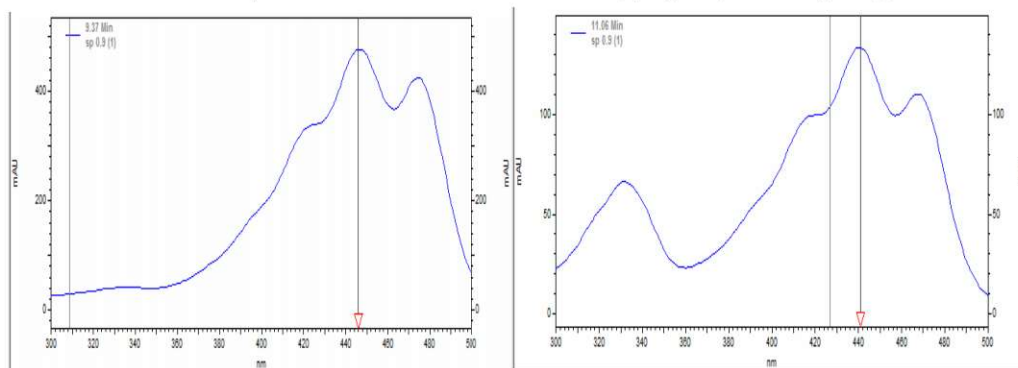


Hình 2. Sắc ký đồ mẫu lutein đối chứng *trans*-lutein có RT ~ 8,9 phút

Sau quá trình xà phòng hoá ở 70°C trong 3 giờ, thời gian lưu 8,9 phút, còn có đồng phân *cis*-lutein ở 10,3 phút (Hình 3 và 4).



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC của mẫu lutein este (0,2 g/ml) sau xà phòng hoá



Hình 4. Phổ hấp thụ UV-VIS: (trái) *trans*-lutein có $\lambda_{\max} = 424, 446, 474$ nm, RT 8,9 phút; (phải) *cis*-lutein có $\lambda_{\max} = 328, 418, 442, 468$ nm, RT 10,3 phút

Hình 3 cho thấy, với cột HPLC đang sử dụng (cột C18 kích thước 250 mm x 4,6 mm; cỡ hạt 5 μm) không phát hiện được peak của zeaxanthin (đồng phân vị trí của lutein) có trong hỗn hợp phản ứng. Kết quả nghiên cứu của Hoàng Thị Huệ An (2009) cho thấy, cột này không có khả năng phân giải cặp đồng phân lutein/zeaxanthin [15]. Để phân giải cặp đồng phân này cần dùng các cột C18 có cỡ hạt nhỏ hơn (cỡ 3 μm), hoặc dùng cột có pha tĩnh tương tác với lutein và zeaxanthin chọn

lọc hơn (như cột C30 hoặc cột silica) [16], [17]. Do các cột HPLC nói trên không được sử dụng phổ biến ở Việt Nam nên trong nghiên cứu này chỉ đánh giá hàm lượng zeaxanthin qua hàm lượng lutein tổng.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ LE đến hiệu suất

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ LE ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất xà phòng hoá H% (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng nồng độ lutein este đến H%

$C_{(LE)}$ (g/ml)	KOH*/LE (w/w)	H_{trans} (%)	H_{cis} (%)	H (%)
0,1	1,50	15,10	2,98	18,08
0,2	0,75	16,78	4,75	21,53
0,3	0,50	17,41	4,97	22,38

0,4	0,38	15,82	6,14	21,96
0,5	0,30	20,10	5,54	25,64
0,6	0,25	50,68	12,40	63,08
0,8	0,19	77,32	15,49	92,81
0,9	0,17	32,15	9,60	41,75

Ghi chú: $C_{KOH} = 0,15 \text{ g/ml}$

Ở vùng nồng độ LE thấp (0,1 - 0,5 g/ml), ứng với vùng tỷ lệ KOH/LE lớn (1,5 - 0,3 lần), hiệu suất chuyển hoá LE thành lutein tự do (dạng *trans*, *cis* hay tổng số) đều rất thấp. Nguyên nhân có thể do sự phân huỷ lutein tự do tạo thành khi có mặt lượng kiềm dư khá lớn. Khi tiếp tục tăng nồng độ LE, H % tăng lên đáng kể, đạt cực đại (H_{trans} 77,32%) khi nồng độ LE 0,8 g/ml (tương ứng với tỷ lệ KOH/LE 0,19), nhưng sau đó lại giảm mạnh. Thực nghiệm cho thấy khi nồng độ LE quá lớn (>0,8 g/ml), hỗn hợp rất đặc, do đó khó khuấy trộn ngay cả khi đun nóng đến 70°C. Do đó, việc giảm H% ở vùng nồng độ LE lớn có thể được giải thích bởi sự giảm khả năng tiếp xúc các tác chất

trong hỗn hợp phản ứng. Kết quả trên cho thấy, để hiệu suất phản ứng cao nhất nên chọn nồng độ LE ở 0,8 g/ml.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ KOH đến hiệu suất

Nồng độ dung dịch KOH ảnh hưởng mạnh đến hiệu suất phản ứng. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, khi cố định nồng độ LE ở 0,3 g/ml, H% tăng mạnh khi tăng nồng độ KOH từ 0 - 0,05 g/ml, nhưng sau đó lại giảm dần khi nồng độ KOH tăng hơn. Điều này được giải thích bởi sự phân huỷ lutein tự do trong môi trường kiềm dư.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ KOH đến H% và phòng hoá LE

C_{KOH} (g/ml)	KOH/LE (w/w)	H_{trans} (%)	H_{cis} (%)	H (%)
0,000	0,00	0,00	0,00	0,00
0,025	0,08	18,95	5,21	24,15
0,050	0,17	56,88	9,22	66,10
0,100	0,33	53,35	5,21	58,56
0,150	0,50	16,74	4,53	21,27
0,200	0,67	11,20	2,52	13,72
0,250	0,83	8,90	2,74	11,63
0,300	1,00	4,12	1,34	5,45

Ghi chú: $C_{LE} = 0,3 \text{ g/ml}$

Sự suy giảm H% và phòng hoá LE trong môi trường kiềm dư được Swaminathan và Madavalapil (2009) [12] ghi nhận với nồng độ LE và KOH xác định lần lượt là 0,8 và 0,15 g/ml, tương ứng với tỷ lệ nồng độ KOH/LE khoảng 0,19 w/w, so với điều kiện của nghiên cứu này thiết lập được ở bảng 1 và

2: C_{LE} 0,8 g/ml và C_{KOH} 0,05 g/ml, tỷ lệ nồng độ KOH/LE lần lượt là 0,19 và 0,17 w/w. Mặc dù giá trị nồng độ khác xa nhau, nhưng các giá trị tỷ lệ nồng độ KOH/LE lại khá gần nhau. Với tỷ lệ thích hợp này (0,17 - 0,19), tùy theo nồng độ LE trong hỗn hợp mà phải dùng nồng độ KOH khác nhau.

Điều này cũng giải thích tại sao nồng độ KOH trong kết quả các nghiên cứu khác nhau thường không giống nhau.

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ xà phòng hoá đến hiệu suất

Kết quả khảo sát cho thấy, nhiệt độ cũng ảnh hưởng mạnh đến H% và chất lượng sản phẩm lutein tạo thành (Bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hiệu suất xà phòng hoá

Nhiệt độ (°C)	H _{trans} (%)	H _{cis} (%)	H (%)
40	2,24	0,00	2,24
50	6,51	0,00	6,51
60	8,60	0,00	8,60
70	56,90	9,22	66,12
80	59,25	15,39	74,64

Bảng 3 cho thấy, ở 40°C, H% rất thấp (2,24%). Khi tăng nhiệt độ từ 40 - 60°C, H% tăng lên nhưng chậm (từ 2,24 - 8,60%). Nếu tiếp tục gia nhiệt từ 60 - 70°C, H% tăng rất mạnh, nhưng sau đó lại chậm dần. Thực nghiệm cho thấy, ở 40°C hỗn hợp phản ứng là một khối lỏng đặc sệt, rất khó khuấy trộn. Khi đun nóng, LE dần chảy lỏng, dễ khuấy hơn. Như vậy, sự tăng H% khi tăng nhiệt độ có thể được giải thích bởi sự gia tăng khả năng tiếp xúc các tác chất với nhau, nhờ đó tốc độ phản ứng tăng lên. Bảng 3 cũng cho thấy, ở nhiệt độ không quá 60°C, sản phẩm lutein tự do hình thành chỉ có đồng phân *trans*, không có đồng phân *cis*. Tuy nhiên, khi trên 60°C, đồng phân *cis* xuất hiện và tỷ lệ đồng phân

cis/trans tăng dần khi nhiệt độ tăng. Do vậy, mặc dù H% ở 80°C cao hơn ở 70°C (lần lượt là 74,64% và 66,12%) nhưng lại có H_{cis} % (~ 15,39%) cao hơn đáng kể so với H% này ở 70°C (~ 9,22%). Do vậy, để H% cao đồng thời đảm bảo chất lượng của sản phẩm tương đối tốt (hàm lượng *cis*-lutein thấp), đã chọn thực hiện phản ứng xà phòng hoá ở 70°C.

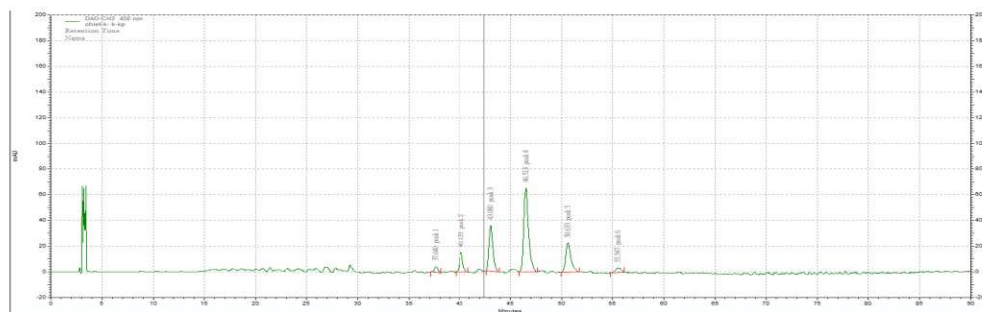
3.5. Ảnh hưởng của thời gian xà phòng hoá đến hiệu suất

Kết quả theo dõi tiến trình xà phòng hoá cho thấy, ở nhiệt độ khảo sát 70°C, trong 20 phút đầu tiên, H% chuyển hoá lutein este thành lutein tự do ở các dạng đồng phân *trans*, *cis* và tổng đều tăng mạnh (Bảng 4).

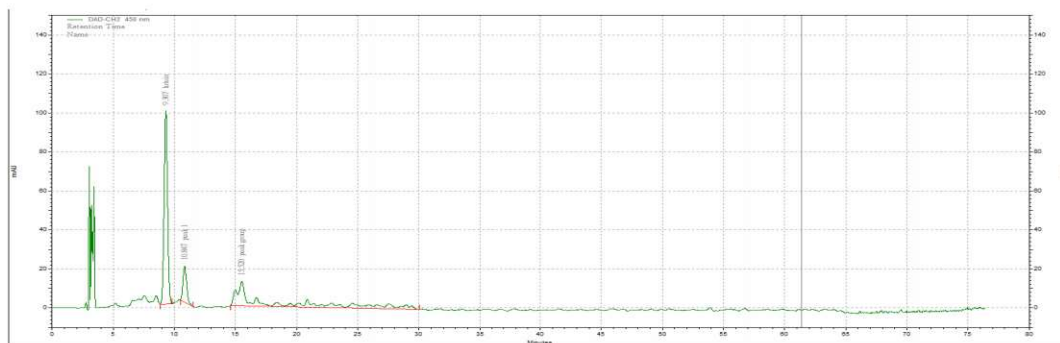
Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian đến H% xà phòng hoá lutein este

Thời gian (phút)	H _{trans} (%)	H _{cis} (%)	H (%)
20	54,98	11,10	66,07
40	57,70	10,55	68,25
60	61,54	13,20	74,74
80	67,65	14,30	81,95
100	57,93	14,08	72,01
120	55,12	15,56	70,68
180	41,70	10,60	52,29

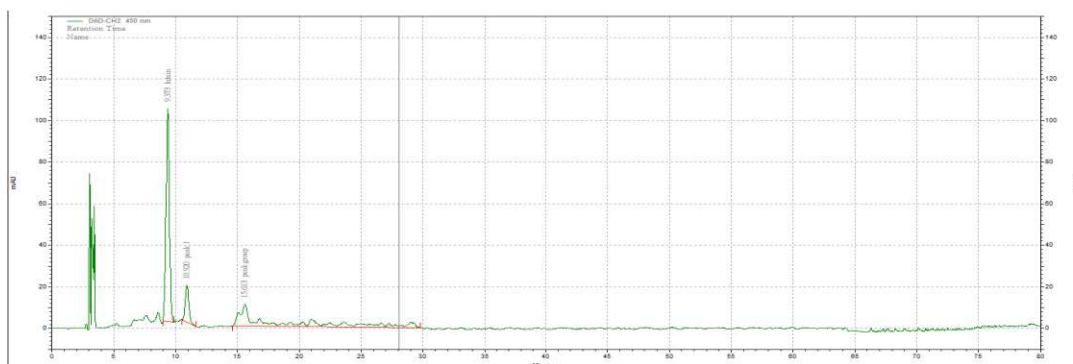
Các sắc ký đồ HPLC LE ban đầu và sau xà phòng hoá (Hình 5) cho thấy, chỉ sau 20 phút, các peak LE hầu như biến mất và xuất hiện các peak *trans*-lutein (RT ~ 9,3 phút) và *cis*-lutein (RT~10,9 phút).



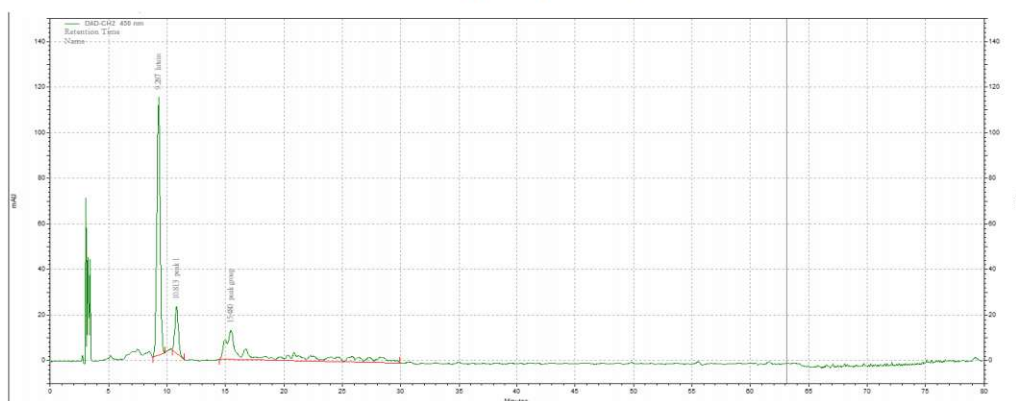
a) Mẫu chưa xà phòng hóa



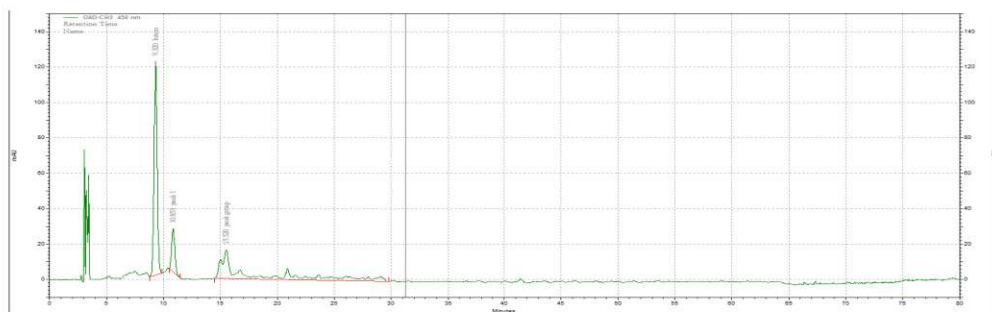
b) Mẫu xà phòng hóa 20 phút



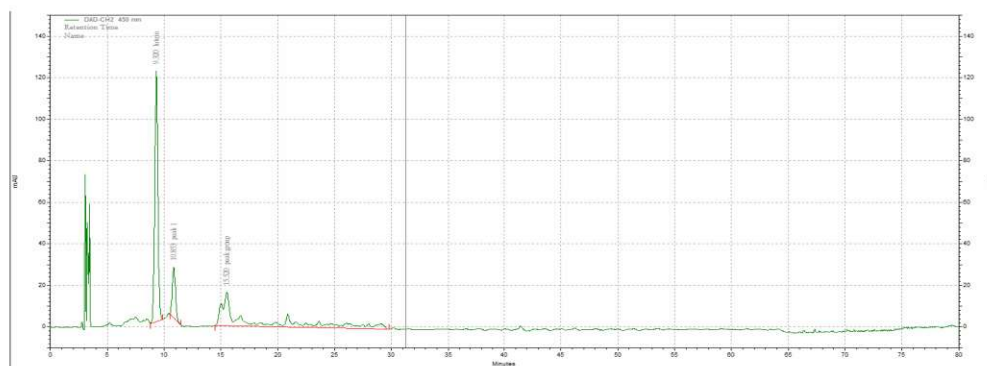
c) Mẫu xà phòng hoá 40 phút



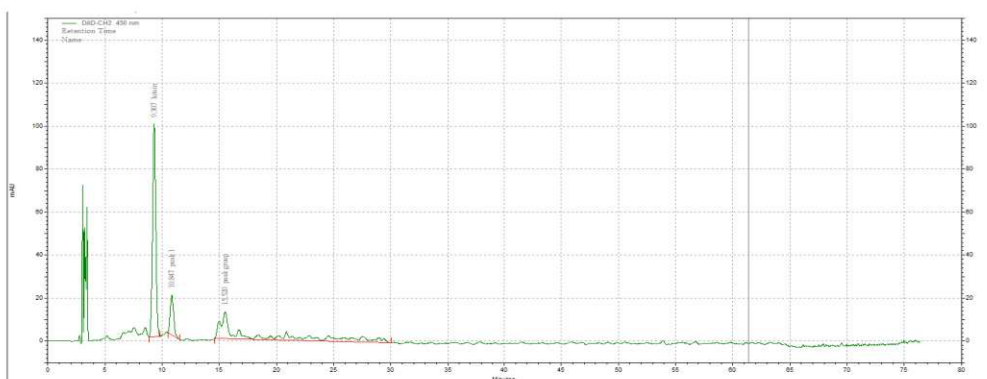
d) Mẫu xà phòng hoá 60 phút



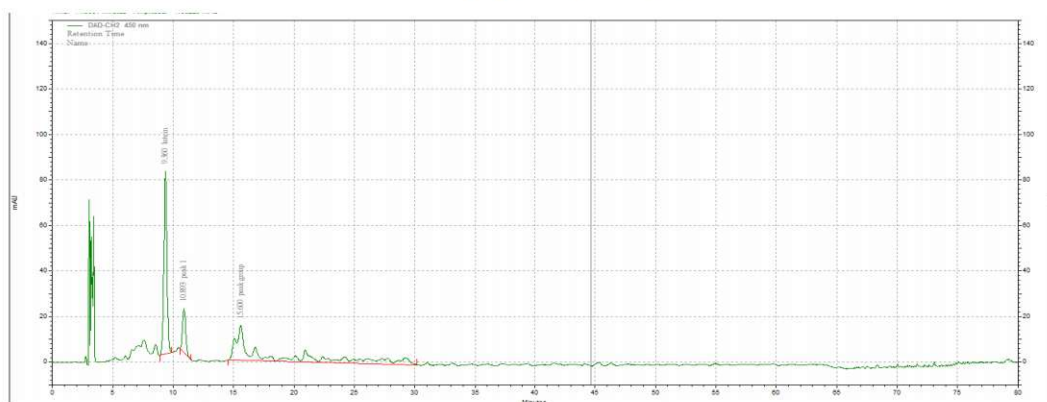
a) Mẫu xà phòng hoá 80 phút



b) Mẫu xà phòng hoá 100 phút



c) Mẫu xà phòng hoá 120 phút



d) Mẫu xà phòng hoá 180 phút

Hình 5. Sắc ký đồ HPLC của các mẫu xà phòng hoá trong các khoảng thời gian khác nhau

Tiếp tục đun nóng phản ứng từ 20 - 80 phút, H% thu nhận lutein tự do dạng *trans* và lutein tổng số tăng lên với tốc độ chậm hơn và sau đó giảm đi nếu kéo dài thời gian phản ứng. Trong khi đó, hiệu suất hình thành dạng *cis*-lutein hầu như không thay đổi khi thời gian phản ứng tăng từ 20 - 180 phút. Điều này chứng tỏ ở 70°C, dạng *cis*-lutein tương đối bền, trong khi đó dạng *trans* kém bền

hơn. Sự giảm hiệu suất thu nhận *trans*-lutein sau hơn 80 phút xà phòng hóa có thể được giải thích bởi sự chuyển hóa dạng đồng phân này sang dạng đồng phân *cis* hoặc các dạng sản phẩm phân hủy khác. Kết quả nghiên cứu trên đây chỉ ra rằng thời gian thích hợp nhất để xà phòng hóa lutein este ở 70°C là 80 phút. Thời gian phản ứng này dài hơn 50 phút so với thời gian trong nghiên cứu của

Swaminathan và Madavalapil (2009) [12]. Sự khác biệt này là do trong quy trình của Swaminathan và Madavalapil (2009) [12] phản ứng xà phòng hóa được tiến hành ở nhiệt độ cao hơn (từ 70 - 80°C).

Việc tăng nhiệt độ phản ứng từ 70 - 80°C, mặc dù làm tăng H% nhưng đồng thời cũng làm tăng tỷ lệ đồng phân *cis* trong sản phẩm, do đó làm giảm hoạt tính sinh học của sản phẩm lutein thu nhận được. Do vậy, đã chọn nhiệt độ xà phòng hoá là 70°C trong thời gian 80 phút.

3.6. Nghiên cứu đánh giá tính ổn định quy trình quy mô phòng thí nghiệm

Như vậy, các yếu tố ảnh hưởng đến H% phản ứng xà phòng hoá LE từ hoa cúc vạn thọ: Nồng độ tác chất, nhiệt độ, thời gian đã được xác định. Đã tiến hành thử nghiệm quy trình xà phòng hoá, áp dụng các yếu tố trên nhằm đánh giá H% của quy trình. Kết quả thử nghiệm được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả thử nghiệm quy trình xà phòng hoá

Ký hiệu mẫu	H _{trans} (%)	H _{cis} (%)	H (%)
SP1	72,91	13,56	86,47
SP2	64,67	13,41	78,08
SP3	70,03	14,24	84,27
Trung bình	69,20	13,74	82,94
% RSD	6,05	3,22	5,25

Theo đó, ở điều kiện thử nghiệm, H% xà phòng hoá là 82,94%, trong đó: *trans*-lutein 69,20% và *cis*-lutein 13,74%. Nói cách khác, sản phẩm lutein tự do thu được chứa khoảng 83,54% *trans*-lutein.

4. KẾT LUẬN

Tinh chế lutein tinh khiết từ mẫu hoa cúc vạn thọ trải qua nhiều giai đoạn, từ xử lý cánh hoa bằng enzym, chiết Soxhlet thu cao chiết lutein este, xà phòng hoá trong môi trường kiềm mạnh, dư. Mỗi giai đoạn đều ảnh hưởng rất nhiều đến hiệu suất và chất lượng thu nhận lutein tự do. Trong nghiên cứu này đã tập trung vào việc kiểm soát phản ứng xà phòng hoá lutein este bằng cách xác định các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng,

thông qua đánh giá hiệu suất xà phòng hoá bằng phương pháp HPLC. Kết quả thực nghiệm cho thấy, phương pháp có ưu điểm không những xác định chính xác hiệu suất tổng cộng phản ứng, mà còn đánh giá được chất lượng sản phẩm do có thể phân biệt được hai dạng *cis*-lutein và *trans*-lutein trên sắc ký đồ. Nhờ vậy, đã thu được quy trình thu nhận lutein tự do với hiệu suất cao (82,94%) và độ tinh khiết cao (83,54%) dưới điều kiện thực hiện phản ứng như sau: Tỷ lệ nồng độ KOH/lutein este 0,18 w/v ở nhiệt độ 70°C trong 80 phút.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ dự án "Hoàn thiện quy trình công nghệ chiết xuất, tinh chế các hoạt chất lutein, zeaxanthin từ cây cúc vạn thọ", mã số CNHD. DASXTN. 026/17-18 thuộc Chương trình nghiên cứu khoa học công nghệ trọng điểm quốc gia phát triển công nghiệp hóa được đến năm 2020. Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Bộ Công thương đã cấp kinh phí thực hiện dự án này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Rodriguez - Amaya, D. B. (2001). A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. *ILSI Press*, USA.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2010). Scientific Opinion on the re-evaluation of lutein (E 161b) as a food additive. *EFSA*; 8 (7), 1678, Parma, Italy.
- Madhavi, D. L. (2002). Process for isolation of mixed carotenoid from plants. *US Patent*: 6380442 B1.
- 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.
- Shao, A. (2001). The role of Lutein in Human Health. *J. American Nutraceutical Association*, 4 (2), 8 - 19.
- Joseph, S., Nadu, T., Anandane, A., Nagar, R. R. (2013)., Process for isolation and purification of carotenoids, *US Patent* 2013/00661 17 A1.
- Madhavi, D. L. (2002). Process for isolation of mixed carotenoid from plants. *US Patent*: 6380442 B1.

8. Sujith, P. 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 enzyme biocatalysis. *J. International Food Research*, 19 (3), 847 - 856.
9. Britton, G., Liaanen-Jensen, S., Pfander, H. (1995). Carotenoids 1A: Isolation and Analysis. *Birkhäuser Verlag*, Basel, Switzerland.
10. Khachik, F. (2001) Process for extraction and purification of lutein, zeaxanthin and rare carotenoids from Marigold flowers and plants. *US Patent* 6,262,284 B1.
11. Kumar, S. T. K., Abdnlkadir; S. P., Sebastian, S. (2004). Process for the preparation of xanthophyll crystals. *US Patent*: 6,743,953 B2.
12. Swaminathan, S., Madavalapil, K. P. (2009). Isolation and purification of carotenoids from Marigold flowers. *US Patent*: 7,622,599 B2.
13. Joseph, S., Nadu, T., Anandane, A., Nagar, R. R. (2013)., Process for isolation and purification of carotenoids, *US Patent* 2013/00661 17 A1.
14. Hoàng Thị Huệ An và cs (2014). 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. Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu khoa học tỉnh Khánh Hoà.
15. Hoàng Thị Huệ An (2009). Nghiên cứu định lượng astaxanthin và carotenoid đi kèm trong đối tượng thủy sản bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Luận án Tiến sĩ chuyên ngành Hóa Phân tích. Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
16. Khachik, F. (1995). Process for isolation, purification and recrystallization of lutein from marigold oleoresin and uses thereof. *US Patent* 5382714.
17. Tee E. Siong, Lim Chin Lam (1992). Analysis of Carotenoids in Vegetables by HPLC. *J. ASEAN Food*, 7, 2.

EFFECTS OF REACTIVE CONDITIONS ON SAPONIFICATION PERFORMANCE LUTEIN ESTER EXTRACT FROM MARIGOLD FLOWERS (*Tagetes erecta* L.)

**Le My Kim Vuong, Hoang Thi Hue An, Tran Thi Phuong Anh, Tran Ngoc Le
Nguyen Thi Minh Nguyet, Tran Van Hieu, Nguyen Minh Dang**

Summary

Tagetes erecta L. marigold flowers represent a subject widely studied in research due to their high content and quality of lutein - a natural pigment possessing various biological activity, particularly for human eyes. Lutein is usually obtained by main steps including enzyme-based treatment, solvent extraction, and alkaline hydrolysis. In this paper, the hydrolysis of lutein ester using a chemical agent (KOH) was controlled with the aim to obtain optimized processing of lutein isolation. Reactional conditions were investigated by an HPLC - based method to identify yield of reaction. Results showed that at ratio [KOH]/[lutein ester] 0.17 - 0.19 w/v at 70°C in 80 minutes, the yield was 83.54% of *trans*-lutein.

Keywords: *Lutein, lutein ester, HPLC reversed phase, saponificat.*

Người phản biện: TS. Vũ Đức Chiến

Ngày nhận bài: 22/02/2023

Ngày thông qua phản biện: 20/3/2023

Ngày duyệt đăng: 27/3/2023