

Tối ưu hóa phản ứng thủy phân mật bò cho quy trình tách axit cholic bằng phương pháp bề mặt đáp ứng

Trần Bội An, Phan Minh Vương, Phạm Cao Thanh Tùng, Phan Thanh Thảo*

Viện Công nghệ Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đến Tòa soạn 7-7-2016; Chấp nhận đăng 6-02-2017

Abstract

Hydrolysis reaction of cow bile was used to convert bile acid into free cholic acid. This study examined the implementation conditions of the hydrolysis reaction to optimize the performance obtained free acid using RMS method combined with CCD model. Meanwhile reaction yield and cholic acid content was determined by HPLC-ELSD method. Research results showed that a good connection could establish between the concentration of free cholic acid converting from the conjugate acid hydrolysis and temperature, concentration of NaOH, hydrolysis time. Response surface model was used to optimize the hydrolysis conditions. Highest free cholic acid content (98.66 to 98.91 %) was obtained in optimal conditions with 10.38 % NaOH concentration, at 92.35 °C, for 7.25 hours.

Keywords. Bile acid, hydrolysis, cholic acid.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Axit mật có tác dụng giúp tiêu hóa và hấp thu chất béo, vitamin. Axit mật cũng có tác dụng điều chỉnh sự cân bằng nồng độ cholesterol, triglyceride, glucose và năng lượng trong tế bào. Axit cholic là axit mật sơ cấp tiêu biểu, có mặt trong hầu hết các loại mật động vật, có nhiều ứng dụng quan trọng trong điều trị bệnh [1, 2]. Axit cholic còn có vai trò là nguyên liệu tổng hợp một số các axit mật có giá trị trị liệu cao với trữ lượng trong tự nhiên rất thấp như axit ursodeoxycholic, acid chenodeoxycholic [3-6]. Axit cholic trong tự nhiên thường tồn tại ở dạng liên hợp với nhóm tauro- và glyco-, vì vậy để thu được acid cholic tự do cần phải phải thực hiện phản ứng thủy phân để tách các nhóm liên hợp này. Hiệu suất của phản ứng thủy phân dịch mật có ý nghĩa quan trọng đối với công đoạn tách chiết axit cholic từ kết tủa axit mật thô, do đó cần phải tối ưu hóa hiệu suất phản ứng thủy phân này để đạt được hiệu suất tách axit cholic cao nhất.

Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được thực hiện theo mô hình phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) với mô hình tâm phức hợp (CCD) để tối ưu hóa phản ứng thủy phân dịch mật bò.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Dịch mật bò được cung cấp bởi Công ty chế biến

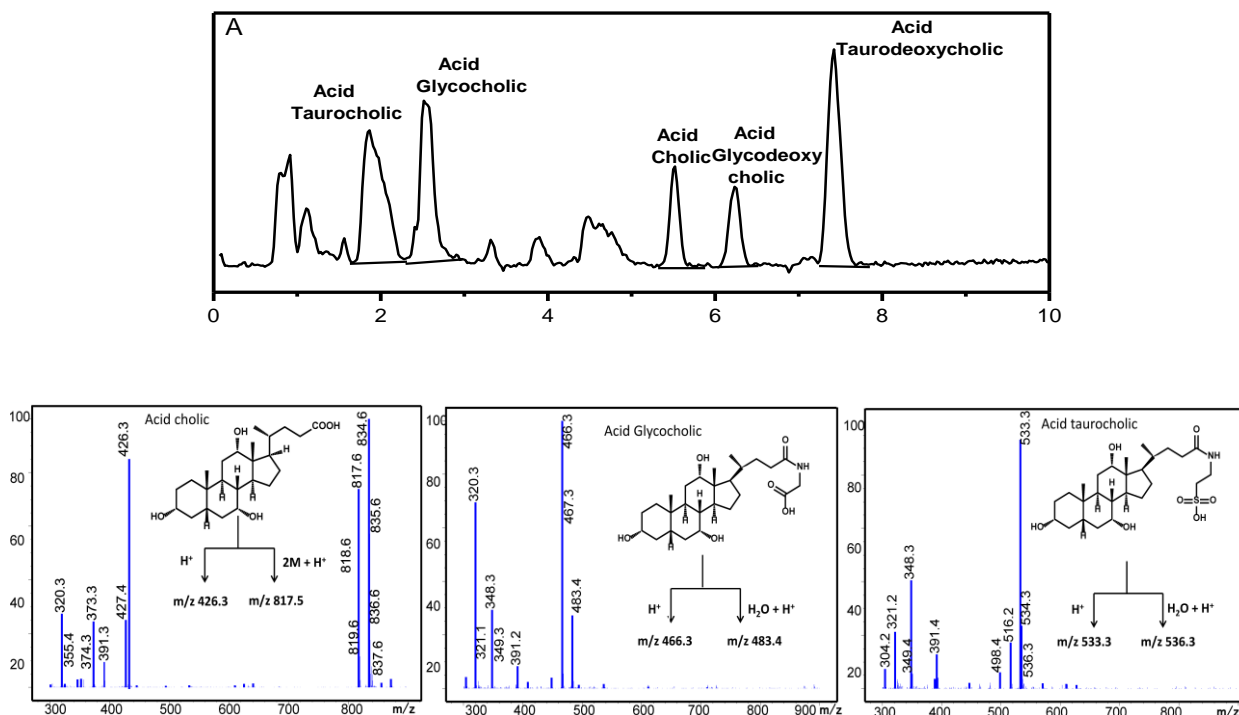
gia súc Vissan – Thành phố Hồ Chí Minh. Axit cholic chuẩn - Sigma Aldrich (Mỹ), dung môi sử dụng bao gồm metanol, etyl axetat, *n*-hexan là dung môi tinh khiết của hãng Labscan (Thái Lan). Các hóa chất sử dụng cho quá trình thủy phân NaOH, HCl tinh khiết của hãng Xilong, Trung Quốc.

2.2. Phản ứng thủy phân mật bò

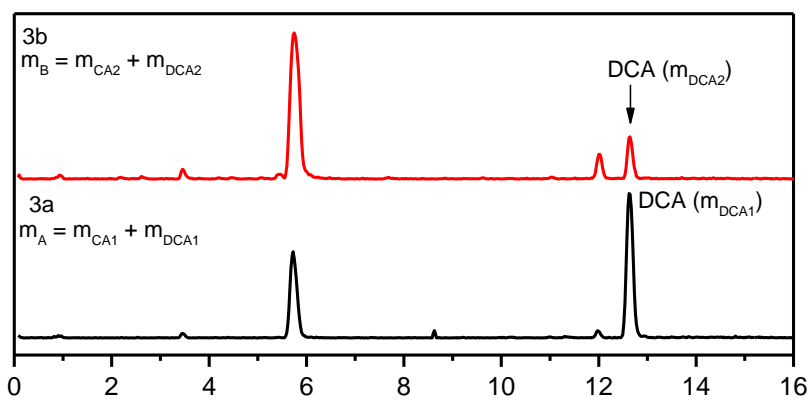
500 mL dịch mật bò được hòa tan trong cồn 90 độ ở 60 °C, sau đó lọc qua giấy lọc để loại bỏ các thành phần mỡ, màu mật và cặn không tan. Dịch mật sau khi loại cồn và nước được sấy chân không thu được 90 g bột rắn (mật thô).

5 g mật thô được hòa tan lại trong 20 mL nước cất, thu được dung dịch pH = 9, dung dịch này được axit hóa đến pH = 6,5, không có kết tủa được tạo ra. Dung dịch tiếp tục được axit hóa đến pH 1,5 kết tủa axit mật tự do. Kết tủa được lọc và sấy thu được 4,6 g axit mật thô. Thành phần axit mật thô được xác định trên HPLC-MS, kết quả được thể hiện trong hình 1. Các axit mật được xác định tại các khoảng thời gian lưu với các tín hiệu m/z như sau: axit cholic (CA, t = 5,527; m/z = 426,4), axit glycocholic (GCA, t = 2,571; m/z = 466,4), axit taurocholic (TCA, t = 1,895; m/z = 533,3). Trên phổ đồ HPLC-MS không có sự xuất hiện pic của axit deoxycholic (DCA), điều này cho thấy DCA không tồn tại ở dạng axit tự do (có pKa 6,5 và tạo tủa tại pH 6-6,2) trong axit mật thô mà thay vào đó thu được DCA ở dạng liên hợp là axit glycodeoxycholic (GDCA, t = 6,247;

m/z = 450,1), acid taurodeoxycholic (TDCA, t = 7,420; m/z = 517,2) [7].



Hình 1: (A) Sắc kí đồ HPLC-MS của axit mật thô; (B) Phổ MS của axit cholic, glycocholic và taurocholic



Hình 2: Sắc kí đồ HPLC của kết tủa I (a) và kết tủa II (b)

Bảng 1: Thành phần axit tự do và axit liên hợp trong 4,6 g axit mật thô

Thành phần trong axit mật thô		Thành phần DCA tự do và DCA trong axit liên hợp		Thành phần CA tự do và CA trong axit liên hợp		Hàm lượng trong CA tổng (%)	Ký hiệu
Khối lượng (g)	Hàm lượng (%)	Khối lượng trong axit mật thô (g)	Hàm lượng (%)	Khối lượng trong axit mật thô (g)	Hàm lượng (%)		
CA	0,43	9,49	DCA	0	0	29,14	m ₁
GCA	0,32	7,12	DCA từ GDCA	0,68	14,33	19,18	m ₃ *
TCA	0,97	21,26	DCA từ TDCA	0,75	15,83	51,68	m ₄ *
DCA	0	0	DCA tổng	1,44	30,16	100,00	m ₂
GDCA	0,75	16,47					
TDCA	0,93	20,23					

* m₃ và m₄ là khối lượng axit cholic tách từ axit liên hợp tương ứng GCA và TCA: m₂ = m₁ + m₃ + m₄

Điều này hoàn toàn hợp lý với thực nghiệm khi tại pH 6 không xuất hiện kết tủa của DCA tự do. Thành phần axit tự do và axit liên hợp trong axit mật thô được thể hiện trong bảng 1.

Phản ứng thủy phân nhằm mục đích sử dụng nhiệt độ để cắt đứt liên kết giữa các axit mật với các nhóm tauro- và glyco-, ở môi trường kiềm phản ứng này sẽ tạo muối kiềm của các axit mật (CA và DCA), các muối này tan trong nước [8]. Sau đó, axit hóa đến pH thích hợp để tách loại các axit DCA pKa = 6,5 được tách ở pH 6-6,2 và CA pKa = 5,2 ở pH 3 [10].

5 g acid mật thô được hòa tan trong 20 mL dung dịch NaOH 1 N, gia nhiệt đến điều kiện khảo sát và thực hiện phản ứng thủy phân trong bình cầu có gắn sinh hàn hồi lưu, và theo dõi phản ứng theo thời gian. Làm nguội dung dịch phản ứng đến 60 °C, axit hóa đến pH 8,5 thu được 0,4 g kết tủa acid béo. Dung dịch sau lọc được làm nguội đến nhiệt độ phòng, axit hóa đến pH 6 tạo kết tủa I, lọc, sấy thu được bột rắn m_A (g) được xác định trên phổ đồ HPLC-MS là hỗn hợp DCA và CA (hình 3a). Tiếp tục acid hóa dung dịch sau lọc đến pH 3 thu được kết tủa II, lọc sấy và thu được m_B (g) bột rắn xác định trên phổ HPLC-MS thành phần chủ yếu là CA (hình 3b).

Các axit liên hợp có pKa thấp, không bị tủa ra trong môi trường pH 3 nên còn lại ở dạng hòa tan trong dung dịch qua lọc [10]. Khối lượng CA (m_{CA}) và DCA (m_{DCA}) trong axit mật thô được xác định như sau:

$$\begin{aligned} m_{CA} = m_2' &= m_{CA1} + m_{CA2} & (\text{g}) & ; \\ m_{DCA} &= m_{DCA1} + m_{DCA2} & (\text{g}) & \end{aligned}$$

Kết quả nghiên cứu này là khảo sát các điều kiện phản ứng thủy phân mật bò để thu được lượng CA tối ưu. Do đó hiệu suất (y) của phản ứng thủy phân được xác định trên lượng CA tự do thu được sau phản ứng thủy phân (m_2') so với lượng CA tổng có trong axit mật thô (m_2), hiệu suất phản ứng được tính theo công thức sau:

$$H = \left(\frac{m_2'}{m_2} \right) \times 100 \quad (\%) \quad (1)$$

2.3. Phương pháp phân tích

Thành phần axit mật thô được xác định bằng sắc ký lỏng cao áp kèm đầu dò khối phổ HPLC-ESI-MS Agilent 1260-6120B, cột Zorbax Eclipse Plus C18 4,6x150, 1,8 μm , hệ pha động axetonitril: axit formic 0,1 % (40:60), tốc độ dòng pha động 0,5 ml/phút.

Hàm lượng axit cholic trong axit mật thô được xác định theo đường chuẩn axit cholic xây dựng trên

thiết bị sắc ký lỏng cao áp Agilent 1260 HPLC-ELSD, cột Zorbax Eclipse Plus C18 4,6x250,5 μm , hệ pha động axetonitril: amonium axetat 50 mM, pH 3 (40:60), tốc độ dòng pha động 1 ml/phút, nhiệt độ hóa hơi dung môi 60 °C, tốc độ dòng khí N_2 1,6 mL/phút.

2.4. Phương pháp thống kê

2.4.1. Lựa chọn nhân tố độc lập ảnh hưởng đến hàm mục tiêu y (hiệu suất thủy phân)

Trong nghiên cứu này sử dụng phần mềm Design-Expert 7.0 để phân tích, xây dựng phương trình hồi quy và giải bài toán tối ưu. Bài toán tối ưu được lập dựa trên phương trình hồi quy xác định bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm là hàm mô tả sự phụ thuộc của hiệu suất thủy phân vào các nhân tố: nhiệt độ thủy phân (73,18-106,82), nồng độ NaOH (1,59-18,41) và thời gian thủy phân (3,64-10,36).

2.4.2. Phân tích thống kê

Mô hình toán học được chọn biểu diễn sự phụ thuộc của hiệu suất thủy phân vào các nhân tố được mã hóa là phương trình đa thức bậc hai có dạng:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

Trong đó y là hiệu suất của quá trình thủy phân được xác định theo công thức (1):

$$y = H = \left(\frac{m_2'}{m_2} \right) \times 100$$

X_i lần lượt là nhiệt độ thủy phân, nồng độ NaOH và thời gian phản ứng thủy phân; b_i là các hệ số bậc 1; b_{ij} là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; b_{ii} là các hệ số bậc 2; X_i, X_{ij}, X_{ii} là các biến độc lập. Kiểm định sự tương thích của dữ liệu theo mô hình và dữ liệu thực nghiệm được thực hiện.

2.4.3. Số thí nghiệm

Số thí nghiệm $N = 2^k + 2k + 6$ ($N = 20$ với $k = 3$). Trong đó, k là số biến số độc lập và $2k$ là số thí nghiệm bổ sung tại điểm sao. Khoảng cách từ tâm đến điểm sao $\alpha = 2^{k/4}$ ($\alpha = 1,68$ với $k = 3$). Các thí nghiệm được thực hiện ở năm mức ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các điều kiện thủy phân đến hiệu suất

3.1.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân

Hình 3 là các đường đồng mức thể hiện sự ảnh hưởng của các yếu tố khảo sát đến hiệu suất thủy phân. Thực hiện phản ứng tại 80 °C hiệu suất phản ứng chỉ đạt 50,11 %, tiếp tục khảo sát tăng dần nhiệt độ phản ứng, thì hiệu suất thủy phân đạt cao nhất ở 90 °C đạt 96,97 %. Khi tăng nhiệt độ cao hơn, hiệu suất giảm, do ở nhiệt độ cao, phản ứng thủy phân xảy ra mạnh hơn, không chỉ phá vỡ liên kết của nhóm tauro- và glyco- trên cấu trúc phân tử axit cholic và axit deoxycholic mà phản ứng thủy phân còn xảy ra trên một số các thành phần khác và cả các axit mật tự do, làm thay đổi cấu trúc axit mật, kết quả làm giảm hiệu suất thu được axit cholic tự do.

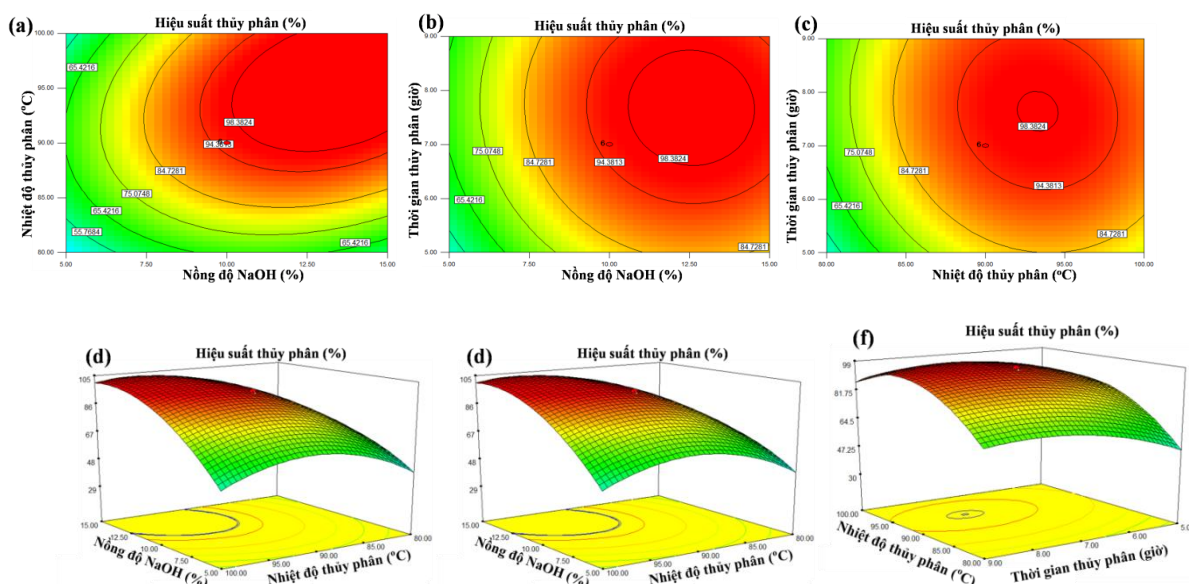
3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH

Nồng độ NaOH có ảnh hưởng quan trọng đến hiệu suất thủy phân. Tăng nồng độ NaOH làm tăng đáng kể hiệu quả thủy phân, tuy nhiên khi nồng độ NaOH tăng vượt mức giới hạn sẽ có tác dụng ngược và làm giảm hiệu suất thủy phân.

3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân

Hiệu suất thủy phân tăng khi tăng thời gian phản ứng, và phản ứng thủy phân đạt bão hòa sau 9 giờ. Tăng thời gian phản ứng không làm tăng hiệu suất thủy phân.

2.5. Xác định điều kiện tối ưu của phản ứng thủy phân mật bò bằng quy hoạch thực nghiệm theo phương pháp RSM kết hợp với mô hình CCD



Hình 3: Các đường đồng mức (a), (b), (c) và đồ thị 3D (d), (e), (f) (3D response surface) cho biết ảnh hưởng của các cặp yếu tố đến hiệu suất thủy phân mật bò; (a) và (d): nhiệt độ thủy phân – nồng độ NaOH; (b) và (e): thời gian – nồng độ NaOH; (c) và (f): thời gian – nhiệt độ thủy phân

Bảng 2: Các điểm tối ưu được dò tìm (khi cố định một nhân tố)

Các cặp nhân tố tương tác	Nhân tố cố định	Hiệu suất thủy phân (%)	Giá trị nhân tố tương tác
Nhiệt độ thủy phân – Nồng độ NaOH	Thời gian thủy phân (7 giờ)	98,86	Nhiệt độ: 92,35 °C Nồng độ NaOH: 10,38 %
Nhiệt độ thủy phân – Thời gian thủy phân	Nồng độ NaOH (10 %)	98,66	Nhiệt độ: 93,09 °C Thời gian: 7,63 giờ
Nồng độ NaOH – Thời gian thủy phân	Nhiệt độ thủy phân (90 °C)	98,91	Nồng độ: 11,04 % Thời gian: 7,25 giờ

Phản ứng thủy phân chịu ảnh hưởng từ ba nhân tố nhiệt độ, nồng độ NaOH và thời gian thủy phân. Hiệu suất thủy phân thể hiện mức độ chuyển hóa axit mật liên hợp về dạng axit tự do (axit cholic, axit

deoxycholic), có ý nghĩa quan trọng trong quá trình thu hồi các axit tự do. Do đó, tối ưu hóa phản ứng thủy phân với các thông số nhiệt độ, nồng độ NaOH và thời gian thủy phân nhằm chọn được các điều

kiện kỹ thuật phù hợp cho quá trình thủy phân mật bò với hiệu quả cao nhất. Mô hình toán học mô tả mối quan hệ giữa hiệu suất phản ứng thủy phân với các biến mã hóa như sau:

$$Y = 95,80 + 15,23X_1 + 11,75X_2 + 5,75X_3 + 8,90X_1X_2 - 14,69X_1^2 - 16,92X_2^2 - 7,99X_3^2 \quad (2)$$

Phân tích thống kê cho thấy các giá trị P của biến độc lập bậc 1 và biến độc lập bậc 2 X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 đều nhỏ hơn 0,05 cho thấy mức độ ý nghĩa cao của các thành phần này tham gia vào phương trình. Hệ số xác định $R^2 = 0,9436$ cho biết 94,36 % sự biến đổi của hiệu suất thủy phân là do ảnh hưởng của các biến độc lập như nhiệt độ thủy phân, nồng độ NaOH và thời gian thủy phân, chỉ có 5,64 % sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được gây ra (sai số ngẫu nhiên). Đồ thị các đường đồng mức (contour) ở hình 3 a,c,e được xây dựng trên cơ sở giữ cố định thời gian, nhiệt độ và nồng độ NaOH tương ứng. Đồ thị hình a và b cho thấy khi tăng nồng độ NaOH, hiệu suất thủy phân có xu hướng giảm. Điều này là do ở môi trường kiềm cao, phản ứng thủy phân xảy ra không chỉ ở các liên kết tauro- và glyco- để chuyển hóa acid mật liên hợp về dạng tự do mà phản ứng thủy phân còn xảy ra trên cấu trúc các axit mật làm thay đổi cấu trúc của axit cholic và axit deoxycholic. Từ các mô hình bề mặt đáp ứng được xây dựng thực hiện dò tìm các điểm tối ưu từ các đồ thị. Các điểm tối ưu được dò tìm từ các đồ thị bề mặt đáp ứng (khi cố định một nhân tố và chọn cặp nhân tố tương tác) được trình bày ở bảng 2. Kết quả cho thấy hiệu suất thủy phân tối ưu đạt được trong khoảng 98,66-98,91 %, khi thực hiện ở các điều kiện nhiệt độ 92,35 °C, nồng độ NaOH 10,38 % trong thời gian 7,25 giờ.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể thiết lập được tương quan tốt giữa hàm lượng axit cholic tự do chuyển hóa từ các axit liên hợp trong quá trình thủy phân với nhiệt độ, nồng độ NaOH và thời gian

thủy phân. Mô hình bề mặt đáp ứng được sử dụng để tối ưu hóa các điều kiện thủy phân mật bò bằng dung dịch NaOH. Hiệu quả thủy phân cao nhất đạt được ở các điều kiện nồng độ NaOH 10,38 %, nhiệt độ 92,35 °C và thời gian 7,25 giờ. Với các điều kiện được chọn, hàm lượng axit cholic tự do được chuyển hóa đạt được là cao nhất (98,66-98,91 %) sau phản ứng thủy phân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kandrac J., Kevresan S., Gu J.K., Mikov M., Fawcett J. P., Kuhakda K. *Isolation and determination of bile acids*, European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, **31**, 157-177 (2006).
2. Charlotte Murphy, Paolo Parini, Jin Wang, Ingemar Bjorkhem, Gosta Eggertsen Mát Gafvels. *Cholic acid as key regulator of cholesterol synthesis, intestinal absorption and hepatic storage in mice*, Biochimica et Biophysica Acta, **1735**, 167-175 (2005).
3. Prasad S. Dangate, Chetan L. Salunke, Krishnacharya G. Akamachi, *Regioselective oxidation of cholic acid and its 7β epimer by using o-iodoxybenzoic acid*, Steroids, **76**, 1397-1399 (2011).
4. Malika Ibrahim-Ouali, Luc Rocheblave. *First synthesis of thia steroids from cholic acid*, Steroids, **75**, 701-709 (2010).
5. Antonio Bonaldi, Chiuduno; Egidio Molinari, Longone al Serrino. *Process for preparing high purity ursodeoxycholic acid*, United States Patent No.4379093 (1983).
6. Ashok K. Batta, Suresht K. Aggarwal, Gerald Salen, Sarah Shefer. *Selective reduction of oxo bile acids: synthesis of 3β-, 7β-, and 12β-hydroxy bile acid*, Journal of Lipid Research, **32**, 977-983 (1991).
7. Sifferd Robert H., *Preparation of cholic acid*, Patent CA 496445 (1953).
8. Trương Phương, Trần Thị Mai Hương, Nguyễn Thị Tuyết Trinh. *Chiết xuất axit cholic từ mật động vật và bán tổng hợp axit chenodeoxycholic*, Tạp chí Dược học, **1**, 11-13 (2004).
9. Phạm Hồng Hải, Ngô Kim Chi. *Xử lý số liệu và quy hoạch thực nghiệm trong nghiên cứu hóa học*, Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội (2007).
10. Jenkins G. J., Hardie L. *Bile Acid: Toxicology and Bioactivity*, RSC, ISBN: 978-0-85404-846-5 (2009).

Liên hệ: **Phan Thanh Thảo**

Viện Công nghệ Hóa học

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Số 1, Mạc Đĩnh Chi, Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh

E-mail: phanthao60@gmail.com; Điện thoại: 0903884577.