

NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT PHYTOSTEROL TỪ PHỤ THẢI CÔNG NGHIỆP DẦU ĐẬU TƯƠNG

Đến Tòa soạn 12-3-2009

LUU ĐỨC HUY¹, NGUYỄN THỊ DIỆP¹, SAVINOVA² T. S. LUKASEV² N. V.,
BELETSKAYA² I. P.

¹Viện Hoá học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Khoa Hóa học, Đại học Tổng hợp quốc gia Matxcova Lomonosov Liên bang Nga

ABSTRACT

In this article we present a technical method for the isolation of a phytosterol mixture from the by-product of soybean oil production with about 4 - 5% yield and more than 90% purity. The phytosterol mixture product is examined by physical methods such as IR and HPLC-MS.

Keywords: *phytosterol, by-product of soybean oil industry.*

I - MỞ ĐẦU

Cho đến nay, hàng năm Việt Nam phải nhập khẩu 90-95% các hoạt chất làm thuốc, 100% các loại thuốc có gốc steroid với những khoản ngoại tệ rất lớn. Trước tình hình đó chính phủ vừa mới phê duyệt Chương trình trọng điểm quốc gia về hóa - dược từ 2007 đến 2015 có tính đến 2020, nhằm thúc đẩy và tạo ra cú huych cho công nghiệp hoá - dược nước nhà phát triển, trong đó có nội dung chiết xuất phytosterol đậu tương và bán tổng hợp thuốc có gốc steroid từ sterol đậu tương. Sự chuyển hóa phytosterol đến các sản phẩm dùng làm thuốc đã được chúng tôi nghiên cứu từ 1988 cho đến nay.

Năm 2003 L. Đ. Huy và cộng sự Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam bắt đầu nghiên cứu chiết xuất phytosterol từ phế phụ thải công nghiệp và đã nhận được 100 g mẫu phytosterol đầu tiên từ phụ thải công nghiệp đậu tương.

Sterol trở thành nguyên liệu bán tổng hợp các thuốc có gốc steroid là nhờ hai nguyên nhân: thứ nhất sterol có trữ lượng rất lớn được thu hồi từ phế phụ thải công nghiệp giấy, công

ng nghiệp mía đường và công nghiệp đậu tương do vậy giá thành rẻ; thứ hai là nhờ phát minh một số chủng vi sinh phân cắt chọn lọc mạch bên các sterol đến 17-cetosteroid [1 - 22].

Đối với Việt Nam, trước hết phytosterol có thể thu hồi từ phụ thải công nghiệp đậu tương, vì đậu tương là nông sản quan trọng thứ 3 với sản lượng hàng trăm ngàn tấn/năm đang được chính phủ khuyến khích phát triển, có thể nói đây là nguồn nguyên liệu thế mạnh ở nước ta và không bao giờ cạn kiệt.

Năm 2006, lần đầu tiên chúng tôi đã công bố kết quả nghiên cứu chuyển hóa vi sinh rất hiệu quả phytosterol Việt Nam đến 17-cetosteroid [1].

Năm 2008, chúng tôi đã tiếp nhận, nghiên cứu hoàn thiện và đang triển khai phát triển công nghệ vi sinh của Nga sản xuất các 17-cetosteroid Androstendion (AD) và 9 α -hydroxy AD từ phytosterol do Phòng Hóa học Steroid & Alkaloid- Viện Hóa học- Viện Khoa học & Công nghệ Việt Nam tự điều chế [23, 24]. Điều này cho phép chúng ta tin tưởng rằng phytosterol sẽ là nguồn nguyên liệu trong nước

thể mạnh để bán tổng hợp các loại thuốc có gốc steroid.

Trong bài báo này, lần đầu tiên chúng tôi thông báo chính thức những kết quả nghiên cứu chiết xuất tinh chế phytosterol từ phụ thải công nghiệp chế biến dầu đậu tương [25].

II - THỰC NGHIỆM

Điểm chảy được đo trên máy Boetius (CHDC Đức). Phổ hồng ngoại (IR) ghi trên máy FT-IR-IMPACT-410 dạng viên nén trong KBr. Phổ HPLC-MS được ghi trên thiết bị của Mỹ Agilent với các điều kiện sau: dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$, detector MS- Injector 6890n, nhiệt độ của mẫu bơm vào 250°C, nhiệt độ của Injector 28°C, tốc độ khí Heli 1ml/ph., lượng mẫu 1 mg/l, nhiệt độ ban đầu 60°C.

Tất cả các loại dung môi, hoá chất mua loại của Trung Quốc.

Kiểm tra định tính dùng bản mỏng để nhôm tráng sẵn Merck 60F₂₅₄.

Các loại dung môi đều được tinh chế lại trước khi sử dụng.

Quy trình chiết xuất tinh chế phytosterol từ phụ thải công nghiệp dầu đậu tương:

Giai đoạn 1: Quá trình thủy phân bằng dung dịch kiềm nước

Lấy 200g nguyên liệu phụ thải công nghiệp dầu đậu tương, thêm vào đó 18,25 g NaOH và 18,25 ml H₂O nạp hỗn hợp vào bình cầu đáy tròn 1 lít, 3 cổ có sinh hàn hồi lưu.

Tiến hành khuấy đảo và gia nhiệt đến nhiệt độ khoảng 160 ÷ 190°C.

Đun hỗn hợp phản ứng trong khoảng thời gian từ 1 ÷ 1,5 giờ thì quá trình thủy phân kết thúc.

Giai đoạn 2: Quá trình trung hòa bằng dung dịch nước axit sulfuric

Khi thủy phân xong, trung hòa hỗn hợp phản ứng bằng 98 ml H₂SO₄ 25%. Sau đó chiết lấy sản phẩm phytosterol.

Giai đoạn 3: Tinh chế sản phẩm

Rửa 3 lần bằng H₂O, mỗi lần khoảng 100 ml H₂O, khuấy đảo trong khoảng 1 ÷ 2 phút.

Quá trình tinh chế sản phẩm: Kết tinh bằng hỗn hợp dung môi chọn lọc như đã dẫn ra ở phần "Kết quả & Thảo luận" ở nhiệt độ +5°C. Sau đó tiến hành lọc lấy sản phẩm, sản phẩm thu được là sterol thô. Kết tinh lại sterol thô. Kết quả phân tích bằng sắc ký HPLC-MS và phổ IR đã chỉ ra sterol thu được có độ tinh khiết cao và hàm lượng sterol tổng số của 3 thành phần chủ yếu đạt tới 93,74%, khoảng 3-5% là các sterol vi lượng khác. Hiệu suất thu được 4,5-5% từ nguồn nguyên liệu phụ thải công ty dầu thực vật Cái Lân- Quảng Ninh.

- Theo đúng quy trình trên, sử dụng nguyên liệu do Công ty Dầu thực vật Tường An- Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp chỉ nhận được phytosterol với hiệu suất 2,5-3,0%, Điểm chảy : 127-133°C.

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Quá trình phân lập phytosterol từ phụ thải công nghiệp chế biến dầu đậu tương có thể chia ra làm 3 giai đoạn chính:

Giai đoạn 1: Thủy phân kiềm nguyên liệu

Giai đoạn 2: Trung hòa dịch thủy phân bằng dung dịch nước axit

Giai đoạn 3: Phân ly thu nhận sản phẩm phytosterol thô, tinh chế bằng phương pháp kết tinh chọn lọc từ hỗn hợp dung môi.

Trước hết, nghiên cứu được triển khai ở quy mô phòng thí nghiệm 1 lít:

Nghiên cứu tối ưu hóa phản ứng thủy phân (nhiệt độ, thời gian và độ kiềm):

+ Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân lên hiệu suất thu hồi phytosterol được trình bày trong bảng 1.

Như vậy, qua quá trình khảo sát ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ giai đoạn thủy phân nguyên liệu lên hiệu quả toàn bộ quá trình, chúng tôi nhận thấy rằng: Nhiệt độ thích hợp nhất để đạt được hiệu suất cao nhất phụ thuộc vào bản chất của nguyên liệu phụ thải được sử dụng, và đối với mẫu Cái Lân - Quảng Ninh thu tháng 12/2007 nhiệt độ thích hợp nhất là 165 - 170°C, dưới 150°C quá trình thủy phân không thể kết

thức dù kéo dài thời gian.
+ Ảnh hưởng của thời gian

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian thủy phân lên hiệu suất thu hồi phytosterol được tóm tắt vào bảng 2.

Bảng 1: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất thu hồi phytosterol

STT	Độ kiềm Tỷ lệ nguyên liệu/kiềm/nước, g	Nhiệt độ thủy phân, °C	Thời gian thủy phân, h	Hiệu suất, %	Điểm chảy, °C
1	200/18,25/18,25	<150	1-3	-	-
2	200/18,25/18,25	150	1,5	4,12	127-133
3	200/18,25/18,25	155	1,5	4,10	128-132
4	200/18,25/18,25	160	1,5	5,11	128-133
5	200/18,25/18,25	165	1,5	5,01	128-134
6	200/18,25/18,25	170	1,5	5,00	127-132
7	200/18,25/18,25	175	1,5	4,71	127-133
8	200/18,25/18,25	180	1,5	4,65	128-134
9	200/18,25/18,25	185	1,5	4,75	127-132
10	200/18,25/18,25	190	1,5	4,59	127-133
11	200/18,25/18,25	195	1,5	4,58	128-131

Bảng 2: Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất thu hồi phytosterol

STT	Độ kiềm (g) Tỷ lệ nguyên liệu/kiềm/nước)	Nhiệt độ thủy phân, °C	Thời gian thủy phân, h	Hiệu suất, %	Điểm chảy, °C
1	200/18,25/18,25	165-170	<1,0	-	-
2	200/18,25/18,25	165-170	1,0	4,15	127-133
3	200/18,25/18,25	165-170	1,0	4,11	128-133
4	200/18,25/18,25	165-170	1,5	5,00	128-133
5	200/18,25/18,25	165-170	1,5	5,10	127-132
6	200/18,25/18,25	165-170	1,5	5,05	128-132
7	200/18,25/18,25	165-170	2,0	4,75	126-133
8	200/18,25/18,25	165-170	2,0	5,04	128-133
9	200/18,25/18,25	165-170	2,0	4,41	128-133
10	200/18,25/18,25	165-170	2,5	5,08	127-132
11	200/18,25/18,25	165-170	2,5	4,45	126-133
12	200/18,25/18,25	165-170	3,0	5,06	128-133
13	200/18,25/18,25	165-170	3,0	4,34	128-132
14	200/18,25/18,25	165-170	3,0	4,72	127-133

Như vậy, thời gian tối thiểu để thực hiện quá trình thủy phân là 1 giờ, tuy nhiên tùy thuộc đầu nguyên liệu có nhiệt độ sôi cao hơn thì có thể phải duy trì đến 1,5 giờ. Tăng thời gian không

làm tăng hiệu quả toàn bộ quá trình.

Về độ kiềm (tỷ lệ lượng kiềm được sử dụng/nguyên liệu/nước):

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của độ kiềm lên hiệu suất thu hồi phytosterol được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3: Ảnh hưởng của độ kiềm đến hiệu suất thu hồi phytosterol

STT	Độ kiềm Tỷ lệ nguyên liệu/kiềm/ nước, g	Nhiệt độ thủy phân, °C	Thời gian thủy phân, h	Hiệu suất, %	Điểm chảy, °C
1	200/18,25/18,25	165-170	1,5	5,12	126-132
2	200/18,20/18,25	165-170	1,5	5,07	128-133
3	200/18,00/18,25	165-170	1,5	4,02	128-134
4	200/17,75/18,25	165-170	1,5	4,13	127-132
5	200/17,50/18,25	165-170	1,5	4,11	128-132
6	200/17,25/18,25	165-170	1,5	4,76	128-133
7	200/17,00/18,25	165-170	1,5	3,12	128-133
8	200/16,75/18,25	165-170	1,5	3,35	126-132
9	200/18,50/18,25	165-170	1,5	4,13	127-132
10	200/18,75/18,25	165-170	1,5	5,02	128-133
11	200/19,00/18,25	165-170	1,5	5,23	126-133
12	200/19,25/18,25	165-170	1,5	4,93	126-133
13	200/19,50/18,25	165-170	1,5	5,12	127-132
14	200/19,75/18,25	165-170	1,5	4,93	128-134

Từ các kết quả nhận được chúng tôi nhận thấy có thể dùng độ kiềm tương tự theo tỉ lệ sau đây sẽ cho hiệu suất cao nhất: 200 g nguyên liệu phụ thải công nghiệp dầu đậu tương/18,20 - 18,25 g NaOH /8,25 ml H₂O; không cần thiết sử dụng độ kiềm cao hơn.

Tối ưu hoá quá trình phân lập và tinh chế sản phẩm phytosterol:

Chúng tôi cho rằng giai đoạn trung hòa hỗn hợp phản ứng thủy phân không quan trọng, do vậy chúng tôi đã tập trung hơn vào việc lựa chọn điều kiện tối ưu phân lập tinh chế sản phẩm.

Kết quả khảo sát thăm dò ảnh hưởng nhiệt độ, dung môi kết tinh lên hiệu suất kết tinh thu hồi phytosterol được trình bày ở bảng 4.

Từ kết quả nhận được chỉ ra rằng, điều kiện kết tinh thích hợp nhất để nhận được hiệu suất thu hồi sản phẩm cao, độ tinh khiết cao là: Hệ dung môi (CH₃)₂CO: 50/MeOH 96%: 40 /H₂O :10 (v/v/v) ở nhiệt độ 5°C.

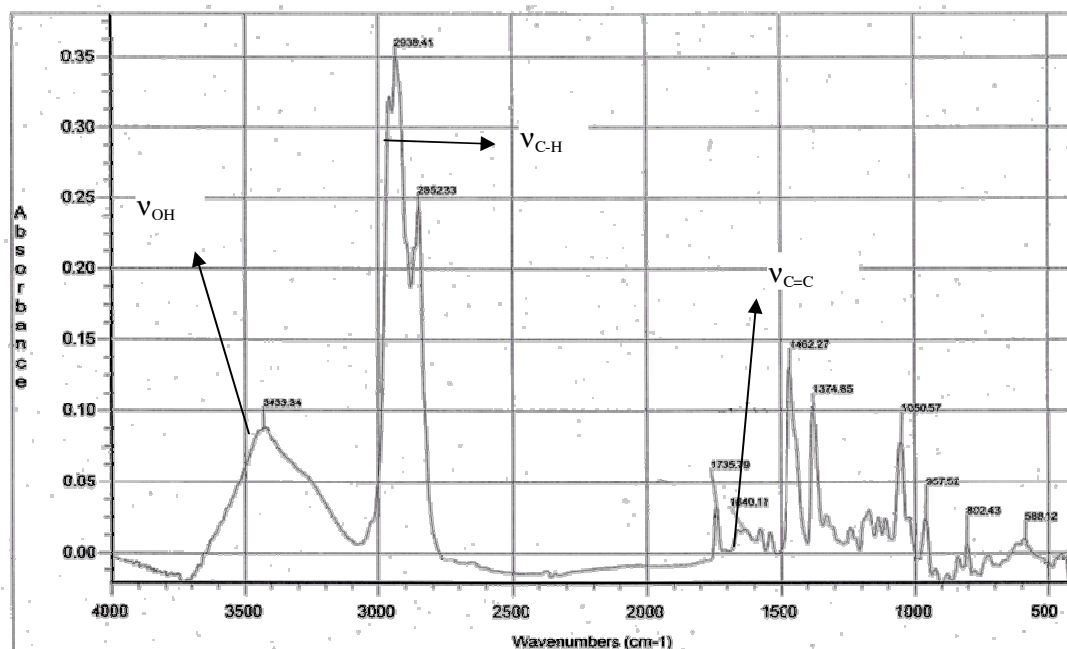
Một số phương pháp khác đã biết chiết xuất sterol từ phụ thải có nhiều giai đoạn [26], phải dùng dung môi đắt tiền để chiết, thậm trí dùng dung môi độc hại [26 - 31]. Phương pháp này ít giai đoạn, chỉ dùng các hóa chất dung môi thông dụng ít độc hại và chỉ cần loại tinh khiết kỹ thuật.

Phổ IR (hình 1) cho các pic đặc trưng ở 3433 cm⁻¹ (ν_{OH}), 1640 cm⁻¹ (ν_{C=C}) và các pic đặc trưng ở 2938 cm⁻¹ cho các dao động ν_{C-H} (của hệ thống vòng no của phân tử sterol).

Kết quả phân tích sterol rõ ràng nhất nhờ phổ LC- MS. Các sắc đồ khối phổ hình 2, 3, 4 và 5 đã chỉ ra điều này, trên sắc kí đồ hình 2 có 3 pic đặc trưng cho 3 sterol điển hình là β-Sitosterol (39,5%), thời gian lưu: 39,257; Stigmasterol (29,56%), thời gian lưu: 36,145; Campesterol (24,68%), thời gian lưu: 34,499. Như vậy hàm lượng sterol tổng số của 3 thành phần chính đạt: 93,74%

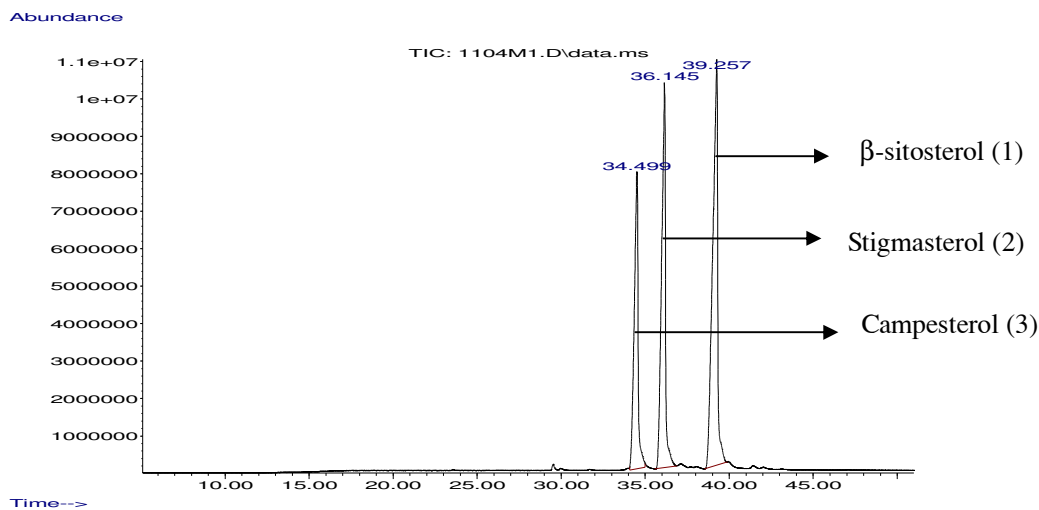
Bảng 4: Ảnh hưởng nhiệt độ, dung môi kết tinh lên hiệu suất kết tinh thu hồi phytosterol

STT	Dung môi kết tinh	Nhiệt độ kết tinh, °C	Hiệu suất Phytosterol, %	Điểm chảy, °C
1a	EtOH 96%	+5°C	76	127-132
1b	EtOH 96%	t ^o ptn	72	128-133
2a	EtOH 90%	+5°C	79	127-133
2b	EtOH 90%	t ^o ptn	70	127-132
3a	MeOH 96%	+5°C	82	128-133
3b	MeOH 96%	t ^o ptn	72	128-132
4a	(CH ₃) ₂ CO	+5°C	85	126-133
4b	(CH ₃) ₂ CO	t ^o ptn	73	128-132
5a	(CH ₃) ₂ CO: 50/MeOH 96%:50	+5°C	82	127-133
5b	(CH ₃) ₂ CO: 70/MeOH 96%: 30	t ^o ptn	93	127-132
6a	(CH ₃) ₂ CO: 50/MeOH 96%:30 H ₂ O: 20	+5°C	90	127-133
6b	(CH ₃) ₂ CO: 50/MeOH 96%: 40 H ₂ O:10	+5°C	97	128-133
6c	(CH ₃) ₂ CO: 50 /MeOH 96%:45 H ₂ O:5	t ^o ptn	90	127-133

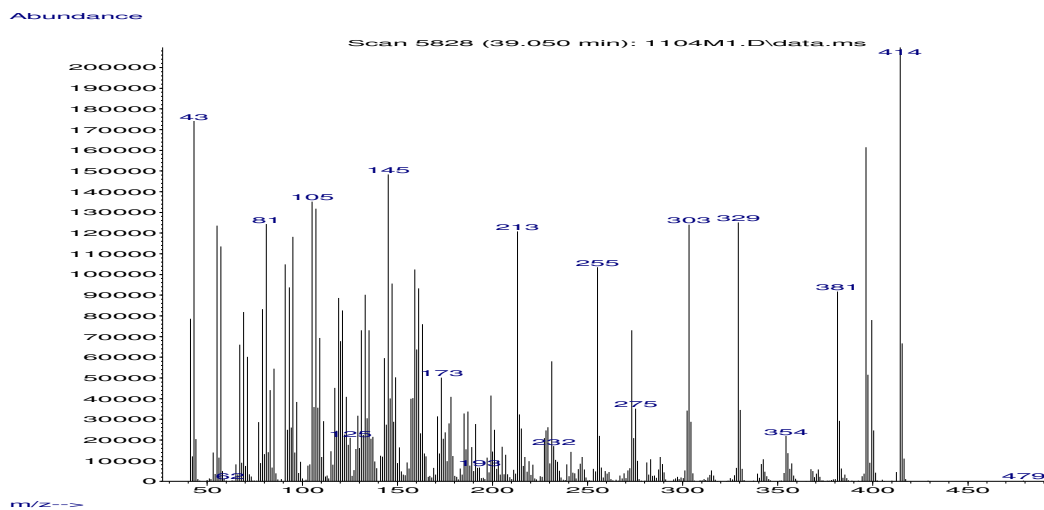


Hình 1: Phổ IR của hỗn hợp sterol phân lập từ phụ thải công nghiệp dầu đậu tương

Sắc ký đồ hình 2 hoàn toàn phù hợp với tài liệu tham khảo [1]. Phổ MS cũng cho những thông tin bổ sung và cụ thể cho từng sterol riêng biệt: phổ MS của pic (1) cho pic ion phân tử $M^+ = 414$ tương ứng với β -sitosterol, phổ MS của pic (2) cho pic ion phân tử $M^+ = 412$ tương ứng với stigmasterol, còn phổ MS của pic (3) cho pic ion phân tử $M^+ = 400$ hoàn toàn trùng hợp với trọng lượng phân tử của campesterol.



Hình 2: Phổ LC-MS của hỗn hợp sterol phân lập từ phụ thải công nghiệp dầu đậu tương



Hình 3: Phổ MS của thành phần β -Sitosterol

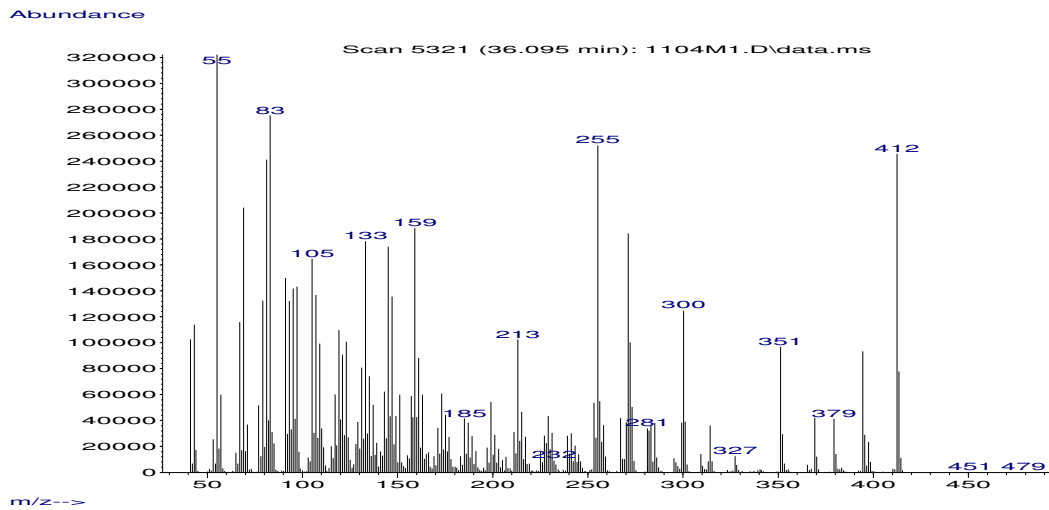
IV - KẾT LUẬN

1. Đã nghiên cứu và hoàn thiện quy trình phòng thí nghiệm chiết xuất tinh chế phytosterol từ phụ thải công nghiệp chế biến dầu đậu tương của Công ty Dầu thực vật Cái Lân - Quảng Ninh với hiệu suất phytosterol thu được đạt 4,5 - 5,0% và Công ty Dầu thực vật Tường an TP Hồ Chí Minh với hiệu suất 2,5 - 3,0%.

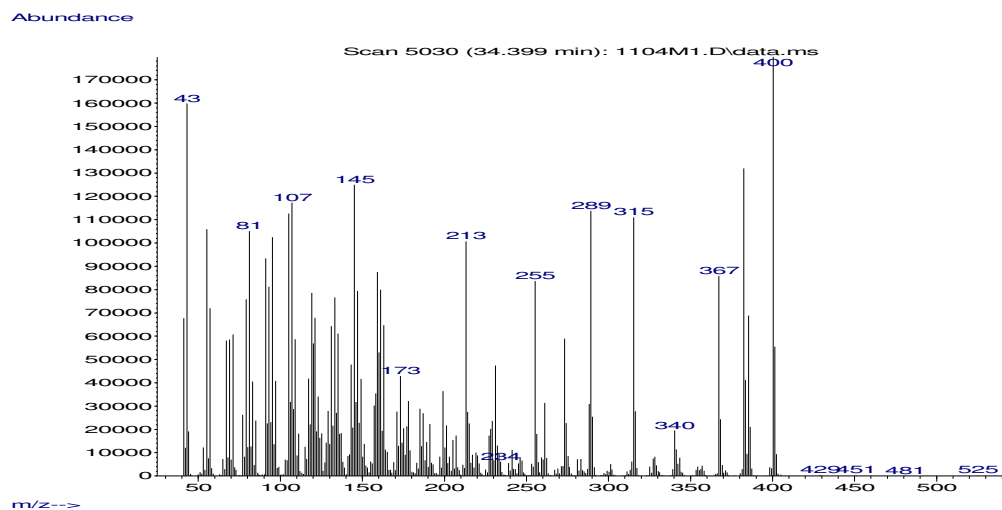
2. Sản phẩm được nhận dạng bằng điểm chảy và các phổ IR, HPLC-MS.

3. Hàm lượng phytosterol tổng số của 3 sterol chính là 93,74%: trong đó β -sitosterol (39,5%), stigmasterol (29,56%), campesterol (24,68%), các sterol khác còn lại chiếm từ 3-5%.

4. Quy trình khả thi để triển khai lên quy mô lớn.



Hình 4: Phổ MS của thành phần Stigmasterol



Hình 5: Phổ MS của thành phần Campesterol

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. C. Perez. A. Falero, Huy Luu Duc, Y. Balcinde. B. R. Hung. J. Ind. Microbiol Biotechnol (2006) 148: 719-723 (Published online: 07/06/ 2006).
2. N. E. Voyshvillo, V. A. Andryushina, T. S. Savinova and T. S. Stytsenko. App Biochem and Microbiology, Vol. 40(5), 463-9 (2004). Translated from Prikladnaya Biokhimiya i Microbiologiya, (2004) Vol. 40, No. 5, pp. 536-543.
3. Bruce Allen Pearlman, Michael J. White, Ivan G. Gilbert. Patent No.: US 2003/0044885 A1. Process to prepare 11beta, 17alpha,21-trihydroxy-6alpha-methylpregna-1,4-diene-3,20-dione 21-acetate (06/03/2003).
4. P. Fernandes, A. Cruz, B. Angelova, H. M. Pinheiro, J. M. S. Cabral. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. Enzyme and Microbial Technology, (01/2003), 32, 688 - 705.

5. Kutney James P., Patent No. WO 03/064674 A2. Microbial Transformation of Phytosterols to AD and ADD (7/08/2003).
6. Seung-Kwon et al., Patent No. WO 02/092830 A1. A method for preparation of androst-4-en-3,17-dione and androsta-1,4-diene-3,17-dione (21.11.2002).
7. Egorova O. V. et al. J. Chem. Technol Biotechnol, 77, pp. 141-7 (2002).
8. Kumar R. et al. Bioresource Technol, 78, 209-11 (2001).
9. Berrie J. R. et al. J. Steroid Biochem Mol Biol, 77, 87 - 96 (2001).
10. Yan J. L. et al. Steroids, 65, 863 - 70 (2000).
11. Kutney J. et al. Patent No WO 9949075. Process for the microbial conversion of phytosterols to androstenedione and androstadienedione (1999).
12. Manosroi J. et al. Bioresource Technol, 69, 67 - 73 (1999).
13. F. J. Dray, A. C. Cotillon. Patent No Fr 2771105. 7alpha-hydroxylation of dehydroepiandrosterone and pregnelone by bioconversion using *Fusarium moniliforme*. (1999).
14. Berrie J. R. et al. J. Steroid Biochem Mol Biol., 71, 153 - 65 (1999).
15. Komel R. et al. J. Biotechnol, 60, 207 - 16 (1998).
16. Sideso O. et al. J. Steroid Biochem mol Biol, 67, 163-9 (1998).
17. Kutney James P., Patent No. WO 99/49075. Process for the microbial conversion of phytosterols to androstenedione and androstadienedione, (26.03.1998).
18. Znidarsic P. et al. J. Biotechnol., 60, 207-16 (1998).
19. Chung S. K., Ryoo C. H. et al. Tetrahedron, 54, pp. 15899-914 (1998).
20. Wiersma M. et al. Patent No. WO 97/21830. Microbial 11alpha-hydroxylation of steroids (19/06/1997).
21. Wiersma M. et al. Patent No. US 6,046,023. Microbial 11alpha-hydroxylation of steroids (1997).
22. S. B. Mahato, S. Garai. Steroids, 28, 7 - 40 (1997).
23. V.A. Andryushina, Luu Duc Huy, N. V. Rodina, Truong N. Hai et al. International Scientific Conference on Chemistry for Development and Integration, (Hanoi) Full Sc. Report. 485 - 490 (2008).
24. Luu Duc Huy, Andryushina V. A., Truong N Hai Nguyen T. Diệp et al. 1st National Conference on Pharma-Chemistry. Full Sc. Report, PP.65-69 Ha Noi (2008)
25. Luu Duc Huy, Nguyen Thi Diep, Mai H. T. Tung et al. Inter. Sci. Conference on Chem for Development and Integration, Full Sc. Report, 485 - 490 Hanoi (2008).
26. Nguyễn Văn Đán, Nguyễn Viết Tựu. Phương pháp nghiên cứu Hoá học cây thuốc. Nxb. Y học, Hà Nội, Tr. 348 - 355 (2000).
27. I. Raphael. Natural Products. 2-nd Edition, Academic Press, INC Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 136 (1991).
28. Raphael I. Nature products, 2nd edition, Academic Press, Inc., pp.137.
29. Härting, Thomas Francis, Las Condes, Santiago, EP 1 081 156 A2 (2001).
30. Ivars Cintins, Thomas K. McBride, John F. Spears, Jack H. Hall, US 4,882,065 (1989).
31. Herbert S. Cockeram, Schiller, Pandiscio, US 4,524,024 (1985).