

**PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI CÁC SẢN PHẨM
CỦA PHẢN ỨNG THỦY PHÂN GAMMA ORYZANOL
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG CAO ÁP**

Đến tòa soạn 20-3-2017

**Trương Thị Hoà, Đỗ Văn Mạnh, Huỳnh Đức Long,
Đỗ Tuấn Anh, Nguyễn Thị Linh**

*Trung tâm Công nghệ Môi trường tại Đà Nẵng, Viện Công nghệ Môi trường,
Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Vũ Đình Ngộ

Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì

SUMMARY

**SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PRODUCTS HYDROLYSIS
GAMMA ORYZANOL BY HIGHPERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY**

In this study, we investigated the preparation of ferulic acid, one of potential antioxidants which is widely used in the pharmaceutical industry, and cosmetics, from the hydrolysis of gamma oryzanol (γ -oryzanol), compounds containing by-product of rice bran oil processing. In alkaline solution using co-solvent, γ -oryzanol hydrolysis reaction has been studied and examined in terms of the different rates of alkaline catalysts, temperature, and ultrasonic (20 kHz). We investigated suitable analysis conditions to simultaneously analyze the product of the γ -oryzanol hydrolysis reaction, optimized hydrolysis conditions to obtain high efficiency. In heat treatment condition, with the initial concentration of γ -oryzanol of 6 mg/mL, and KOH/ γ -oryzanol ratio is 20:1 (wt/wt), the reaction at 75 °C got the efficiency of 83.3%. Meanwhile, at 60 °C using the ultrasonic assistance (20 kHz, 180 W), the efficiency was reached up to 93.3% in just 2.5 hours. The aim of this work is to make a basic data for the ferulic acid production research process from soapstock, a byproduct that has high γ -oryzanol concentration.

Keywords: *ferulic acid, γ -oryzanol, ultrasonic, hydrolysis reaction, co-solvent*

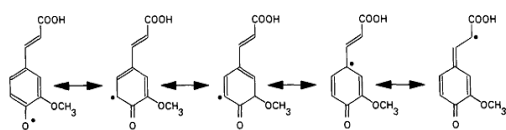
1. MỞ ĐẦU

Axit ferulic (FA) là một hợp chất phenolic phổ biến trong thành phần tế

bào thực vật, là một chất chống oxy hóa, chống ung thư; ngoài ra nó còn có khả năng hấp thụ tia UV, giảm cholesterol

trong máu. Ngày nay, FA được sử dụng phổ biến trong ngành công nghiệp mỹ phẩm, làm chất phụ gia thực phẩm và ngày càng được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực y tế. Như chúng ta đã biết, các hợp chất nitrit thường được sử dụng làm phụ gia trong thực phẩm để giữ màu và ngăn ngừa sự phát triển của các vi sinh vật, tuy nhiên trong môi trường axit của dạ dày, nitrit sẽ phản ứng với các hợp chất khác sinh ra nitrosamine, là một chất có khả năng gây ung thư. FA có thể khóa phản ứng hình thành nitrosamine, do đó ngăn ngừa nguy cơ gây ung thư [1]. Bên cạnh đó, FA còn có khả năng ngăn ngừa các bệnh về tim mạch (cardiovascular disease), bệnh đái đường (diabetes), bệnh Alzheimer, chống ung thư đại tràng (colon disease), giảm cholesterol trong huyết tương [2-9].

FA lần đầu tiên được tổng hợp vào năm 1925, tuy nhiên các hoạt tính sinh học của nó chỉ được nhận ra từ những thập kỷ 70 khi một nhà khoa học người Nhật khám phá ra tính chất chống oxy hóa của các este ferulat chiết ra từ dầu cám gạo. Khả năng chống oxy hóa của hợp chất này được giải thích do cấu tạo nhân thơm gắn với nối đôi liên hợp, do đó dễ dàng tạo ra gốc phenoxy tự do bền do hiệu ứng cộng hưởng.



Hình 1. Các dạng bền của gốc tự do axit ferulic

Khi gốc tự do tấn công axit ferulic, nó sẽ dễ dàng lấy đi một nguyên tử H và do đó hình thành nên gốc tự do bền của FA (Hình1). Gốc tự do này được làm bền do hiệu ứng cộng hưởng, cặp electron chưa phân chia không chỉ khu trú tại nguyên tử oxy mà nó được phân bố đều trên toàn bộ phân tử. Ngoài ra, gốc tự do này còn được làm bền bởi

hiệu ứng liên hợp gây ra bởi nhóm thế $\text{CH}=\text{C}-\text{COOH}$ ở vị trí đối xứng với nguyên tử oxy chứa cặp electron. Gốc tự do bền của FA rất kém hoạt động và không có khả năng khơi mào chuỗi phản ứng khác [10], do đó FA là một tác nhân chống oxy hóa rất hiệu quả.

Trong những thập kỷ đầu tiên của thế kỷ 20, FA được tổng hợp bằng phản ứng giữa vanillin với axit malonic với hiệu suất khá cao nhưng mất đến 3 tuần để phản ứng hoàn thành, hơn nữa, sản phẩm là một hỗn hợp giữa 2 dạng đồng phân trans- và cis- của FA trong khi đó chỉ có trans- tồn tại ở dạng tinh thể là dạng đồng phân được thương mại hóa.

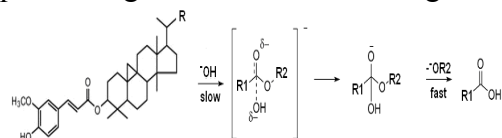
FA là một hợp chất phenolic tồn tại phổ biến trong thực phẩm, ví dụ như các loại hoa quả cam quýt, chuối, cà tím, cải bắp, củ cải đường, bông cải xanh, cà phê [10,11], cám ngô, cám gạo, cây lanh (flax shives), lúa mì (wheat) [12], rom [13], cây đương quy (*Radix Angelicae sinensis*) [14], cây xuyên khung (*ligusticum chuanxiong*) [3]. Trong các loại hạt ngũ cốc, FA thường nằm trong các lớp cám, bên cạnh đó, FA cũng xuất hiện phổ biến dưới dạng các este, một trong những dạng este phổ biến nhất của FA là steryl ferulat, được phát hiện đầu tiên vào năm 1954 trong dầu cám gạo. Do este này được phân lập từ dầu cám gạo (*Oryzae Sativa* L.) và có chứa nhóm hydroxyl trong cấu trúc nên nó thường được gọi là oryzanol, trong đó γ -oryzanol là loại đồng phân phổ biến nhất [10].

Rất nhiều phương pháp khác nhau được sử dụng để điều chế FA, trong đó phương pháp thủy phân trong môi trường kiềm với sự hỗ trợ của sóng siêu âm hoặc vi sóng được dùng khá phổ biến [2,3,6,12,15,16]. Phương pháp chiết FA và các hợp chất phenolic khác sử dụng phản ứng thủy phân kết hợp với áp suất cao cũng đã được nghiên cứu và đưa ra được những kết quả khá

khả quan [12]. Nhìn chung, các nghiên cứu về tách chiết, thu hồi FA từ các nguồn nguyên liệu đầu vào khác nhau đều có một điểm chung đó là sử dụng quá trình thủy phân trong môi trường kiềm, tùy từng nguyên liệu khác nhau mà điều kiện phản ứng sẽ khác nhau. Mục đích của quá trình này một phần chính là để phá vỡ ma trận hữu cơ có chứa các lipid và axit béo tự do trong các nguyên liệu đầu vào (các loại thực vật, ngũ cốc); mặt khác chính là tận dụng sự thủy phân của các hợp chất ferulat, este của axit ferulic có trong các nguyên liệu đầu vào để điều chế FA với hiệu suất cao. Mặc dù có nhiều nghiên cứu về quá trình tách chiết FA từ các nguồn nguyên liệu khác nhau, nhưng FA thu được sau các phản ứng thủy phân bao gồm cả FA tự do và FA liên kết. Bên cạnh đó, các nghiên cứu điều chế FA từ các sản phẩm phụ trong quy trình sản xuất công nghiệp cũng được quan tâm, điển hình là thu hồi FA và γ -oryzanol từ quy trình sản xuất dầu cám gạo [17,18] được trình bày dưới dạng patent. Tuy nhiên, bản chất và các yếu tố ảnh hưởng của phản ứng thủy phân γ -oryzanol trong sản phẩm phụ để tạo thành FA thì chưa có nghiên cứu nào đề cập một cách cụ thể. Trong khi đó, γ -oryzanol có thể nói là một thành phần đặc biệt trong cám gạo, mà hầu như không tìm thấy trong các loại ngũ cốc khác. Sự dồi dào của nguồn cám gạo tại Việt Nam, cũng như sự ra đời của nhà máy chế biến dầu cám gạo tại Cần Thơ (Công ty TNHH Wilmar Agro Việt Nam), với nguồn sản phẩm phụ soapstock rất lớn và chưa được khai thác triệt để. Theo các nghiên cứu trước [19], 96% γ -oryzanol trong cám gạo bị chuyển hóa vào soapstock, dẫn đến sự mất mát các hợp chất có giá trị trong dầu cám gạo. Việc tận dụng và tối ưu hóa sản phẩm phụ này là điều hết sức cần thiết, và có ý nghĩa thiết thực đối

với một đất nước xuất khẩu gạo như Việt Nam.

Nhằm thực hiện mục tiêu đó, trong bài báo này, chúng tôi trình bày phương pháp thủy phân γ -oryzanol trong hệ đồng dung môi, để thu được axit ferulic với hiệu suất cao, đồng thời nghiên cứu phương pháp phân tích định lượng các sản phẩm của phản ứng thủy phân γ -oryzanol. Nghiên cứu này sẽ làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về việc điều chế axit ferulic từ các sản phẩm phụ có chứa γ -oryzanol, ví dụ như dầu kiềm thải (soapstock) – một sản phẩm phụ của ngành chế biến dầu cám gạo.



Hình 2. Sơ đồ phản ứng thủy phân γ -oryzanol

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

Chất chuẩn axit ferulic, γ -oryzanol, ethyl ferulat (Sigma Aldrich, Mỹ) có độ tinh khiết trên 99%. Các dung môi hữu cơ: etanol (EtOH), Etyl axetat (EtOAc), Ethyl ete, axeton, tetrahydrofuran, isopropanol, n-hexan đều là hàng chuẩn phân tích được mua từ Merck, Đức. Các dung môi chuẩn HPLC để chạy sắc ký lỏng bao gồm: Acetonitrile, MeOH, và H₂O cũng được mua từ Merck, Đức.

Thiết bị siêu âm được sử dụng là máy siêu âm tần số 20 kHz, Branson Sonifier 450. Công suất của máy siêu âm Kaijo được cài đặt ở 50 W và 180 W. Nhiệt độ được điều khiển thiết bị điều nhiệt SANSYO SDT-04 P.

2.2. Phương pháp định lượng

Axit ferulic, γ -oryzanol và etyl ferulat được phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo HPLC Model GL-7480 (GL Science Inc., Tokyo, Japan), sử dụng detector PDA (GL-7452, GL Science Inc., Tokyo, Japan), bộ lấy mẫu tự động (GL-7420, GL Science Inc., Tokyo,

Japan), và sử dụng cột Inertsil ODS-3 C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, film thickness 5 µm) (GL Science, Tokyo, Japan). Hai phương pháp phân tích được sử dụng như sau:

Phương pháp A:

Phương pháp phân tích sử dụng chế độ gradient với hai pha động là dung dịch axit H₃PO₄ 0,283% (pha A) có pH nằm trong khoảng 3 - 4, và pha B là ACN. Chế độ gradient như sau: giữ cho tỉ lệ pha B/A là 25 : 75 tại thời điểm 0-10 phút, và gradient tới 100 : 0 trong thời gian là 5 phút; giữ tiếp trong 20 phút, rồi tiếp tục gradient về tỉ lệ 25 : 75 trong 5 phút; tốc độ dòng là 0,8 ml/phút. Tổng thời gian chạy mẫu là 40 phút.

Phương pháp B:

Phương pháp phân tích sử dụng chế độ gradient với hai pha động là dung dịch axit H₃PO₄ 0,283% (pha A) có pH nằm trong khoảng 3 - 4, và pha B là hỗn hợp MeOH : ACN (1:1). Chế độ gradient như sau: giữ cho tỉ lệ pha B/A là 30 : 70 tại thời điểm 0 phút, và gradient tới 100 : 0 trong thời gian là 15 phút; giữ tiếp trong 25 phút, rồi tiếp tục gradient về tỉ lệ 70 : 30 trong 5 phút, 30 : 70 trong 5 phút và giữ trong 5 phút; tốc độ dòng là 0,8 ml/phút. Tổng thời gian chạy mẫu là 55 phút.

Bước sóng hấp thụ cực đại của cả ba chất axit ferulic, ethyl ferulat và γ-oryzanol đều được đặt tại 325 nm. Nồng độ của các chất được tính dựa trên đường chuẩn tương ứng với hệ (R²) đều đạt trên 0,999. Hiệu suất hình thành axit ferulic được tính dựa trên phương trình sau:

$$H = \frac{\text{Nồng độ FA (ppm)} \times 3,1}{\text{Nồng độ FA (ppm)} \times 3,1 + \text{nồng độ } \gamma\text{-oryzanol (ppm)}} \times 100\%$$

2.3. Phương pháp thực hiện phản ứng thủy phân trong hệ đồng dung môi, kết hợp sử dụng sóng siêu âm

Cách tạo hỗn hợp phản ứng với các tỉ lệ

kiềm/ γ-oryzanol khác nhau bằng cách thay đổi nồng độ dung dịch KOH được thể hiện ở bảng 1, trong các bình Erlenmeyer 250 ml có nắp vặn kín, sau đó đặt các bình phản ứng vào bể điều nhiệt, cố định bình và khuấy trong khoảng thời gian 30, 60, 90, 120, 150, 180 phút, tại nhiệt độ từ 30 đến 75 °C (nhiệt độ khảo sát phải thấp hơn nhiệt độ sôi của các dung môi). Sau mỗi 30 phút phản ứng, 100 µl dung dịch phản ứng được lấy ra, thêm 100 µl axit axetic đặc (để dừng phản ứng thủy phân lại), 300 µl EtOH (để hòa tan ferulic nếu tạo thành), sau đó phân tích định lượng γ-oryzanol và FA bằng HPLC.

Bảng 1. Cách tạo hỗn hợp phản ứng đồng nhất với các tỉ lệ kiềm/oryzanol khác nhau

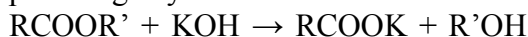
KOH/ γ-oryzanol (wt/wt)	V _{γ-oryzanol} (mL)	V _{EtOH} (mL)	V _{KOH} (mL)
20	4 (48 mg/mL)	20	8 (480 mg/mL)
16	4 (48 mg/mL)	20	8 (384 mg/mL)
10	4 (48 mg/mL)	20	8 (240 mg/mL)
8	4 (48 mg/mL)	20	8 (192 mg/mL)

Để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất tạo axit ferulic, chúng tôi chọn tỉ lệ kiềm/oryzanol cao nhất là 20:1 (wt/wt), nồng độ oryzanol trong hỗn hợp phản ứng là 6 mg/mL với các nhiệt độ khảo sát là: 30, 40, 50, 60, 75 °C.

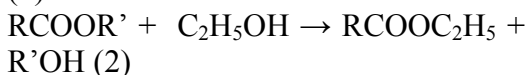
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phương pháp phân tích và phổ UV-VIS của các hợp chất tại bước sóng 325 nm

Trong quá trình thực hiện phản ứng thủy phân, ethyl ferulat là một hợp chất trung gian hình thành qua phản ứng trans-este hóa (*tranesterification*). Các phản ứng xảy ra như sau:



(1)



Trong đó:

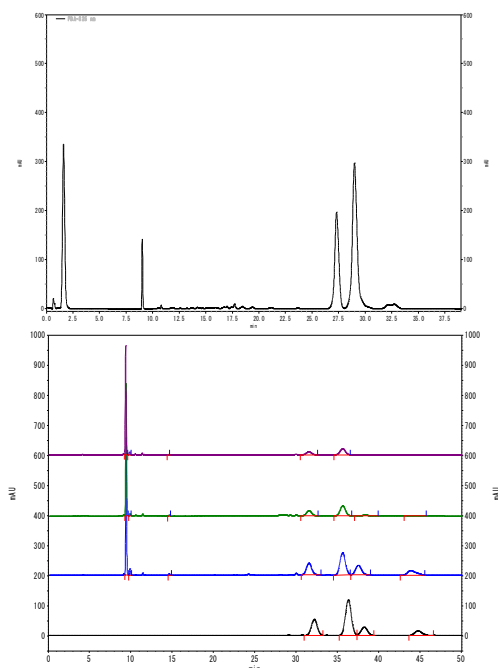
- RCOOR' là oryzanol
- RCOOK là Kali ferulat,
- R'OH gốc rượu của γ -oryzanol,
- RCOOC₂H₅ là etyl ferulat,
- RCOOH là axit ferulic.

Axit ferulic acid, etyl ferulat và γ -oryzanol đều có bước sóng hấp thụ cực đại tại 325 nm, và phổ của chúng được ghi nhận bằng detector PDA. Mẫu sau khi xử lý theo mục 2.3, được tiêm vào máy sắc ký lỏng cao áp (10 μ l), và áp dụng 02 phương pháp phân tích như trình bày tại mục 2.2.

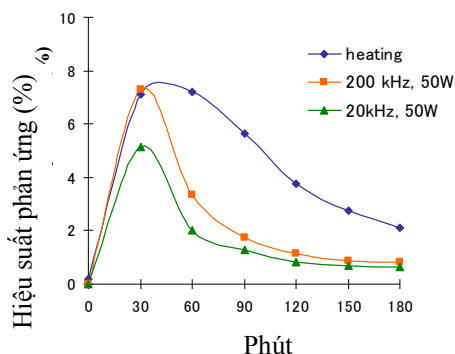
Đối với phương pháp phân tích A, axit ferulic acid, etyl ferulate lần lượt xuất hiện với thời gian lưu tương ứng là 2,5; 9,1 phút, trong khi đó γ -oryzanol là một nhóm các ester của axit ferulic xuất hiện là một nhóm các pic từ 27,5 đến 33 phút như Hình 1a. Trong khi đó, đối với phương pháp phân tích B, axit ferulic acid, etyl ferulate lần lượt xuất hiện với thời gian lưu chậm hơn là 9,2; 14,2 phút, và γ -oryzanol xuất hiện rõ ràng với bốn pic với độ phân tách rõ rệt từ 32 đến 45 phút như Hình 1b.

Với phương pháp A, việc giữ cho tỉ lệ pha B/A là 25 : 75 trong thời gian 10 phút nhằm rửa giải axit ferulic và etyl ferulate ra khỏi cột, sau đó gradient tới 100 : 0 để tăng pha động lên tỉ lệ 100% ACN với mục đích tiếp tục rửa giải γ -oryzanol, hợp chất kém phân cực và có khối lượng phân tử lớn hơn. Do γ -oryzanol là một nhóm các chất-các este của axit ferulic, nên việc xây dựng đường chuẩn hay tính toán hiệu suất đều dựa trên việc tính tổng diện tích pic của các chất. Tuy nhiên, nếu có thể tìm

được một phương pháp phân tích khác với pha động và chế độ gradient khác nhằm tách rõ ràng các chất trong γ -oryzanol thành các pic riêng biệt, thì chúng ta có thể khảo sát được quá trình thủy phân của từng ester trong hỗn hợp γ -oryzanol, trong điều kiện chúng ta có đầy đủ các chất chuẩn riêng biệt của các ester này. Trong một nghiên cứu trước của tác giả [20] đã chỉ ra các pic của oryzanol trong sắc ký lỏng pha đảo với điều kiện tương tự, có thứ tự như sau: cycloartenyl ferulate (Or₁), 24-methylene cycloartanyl ferulate (Or₂), campesteryl ferulate (Or₃) and sitosteryl ferulate (Or₄) như mô tả trong hình 1b. Trên thực tế, chưa có một nghiên cứu nào mô tả phương pháp phân tích HPLC cho hỗn hợp phản ứng thủy phân bao gồm axit ferulic, etyl ferulat và γ -oryzanol, tuy nhiên, phương pháp phân tích riêng rẽ γ -oryzanol và axit ferulic đã được báo cáo như trình bày tại Bảng 2.



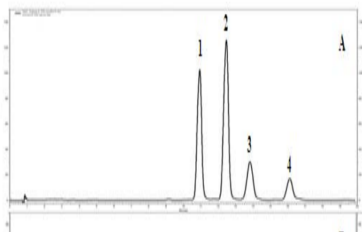
Hình 3. Phổ UV-VIS tại bước sóng 325 nm của phản ứng thủy phân
a) Phương pháp phân tích A
b) Phương pháp phân tích B

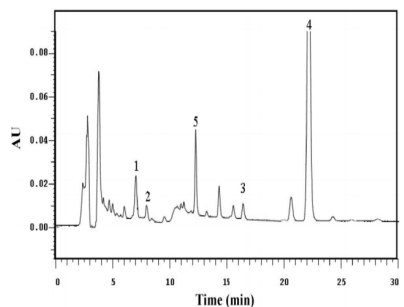
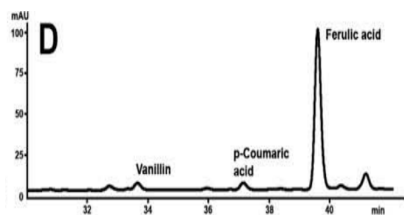


Hình 4. Sự hình thành ethyl ferulate trong quá trình phản ứng

Dựa vào kết quả trên Hình 4, chúng ta thấy sản phẩm trung gian ethyl ferulat hầu như ảnh hưởng không đáng kể đến hiệu suất của phản ứng thủy phân. Sau 3h phản ứng, hiệu suất tạo ethyl ferulat chỉ còn lại khoảng 2%. Hầu hết ethyl ferulat đã bị thủy phân thành axit ferulic như chúng ta thấy trên Hình 1b.

Bảng 2. Một số phương pháp phân tích đã nghiên cứu

TLTK	Điều kiện phân tích
[20]	Cột: Poroshell120 EC-C18, 3,0×150 mm, 2,7μm (Agilent Technologies, USA). Pha động: ACN: MeOH (60:40, v/v) trong 5 phút, gradient (65:35, v/v) trong 20 phút. Tốc độ dòng: 0,8 mL/phút. 
[21]	Cột: Cosmosil 5C18-AR-II (250 x 4.6 mm; 5μm). Pha động: H₂O (pH = 3) : ACN (75:25, v/v) trong 5 phút, gradient (65:35, v/v) trong 20 phút. Tốc độ dòng: 0,8 mL/phút.

TLTK	Điều kiện phân tích
	
[12]	Cột: Zorbax SB-C18 (5 μm, 3 x 250 mm) column. Pha động: H₃PO₄ (50 μM) : MeOH (95:5 đến 45:55, v/v) từ 0 đến 51 phút, gradient (45:55 đến 0:100 v/v) trong 20 phút tiếp theo, giữ 8 phút, gradient về 95:5 trong 5 phút tiếp theo, giữ 10 phút. Tốc độ dòng: 1 mL/phút. 

3.2. Phản ứng thủy phân trong hệ đồng dung môi

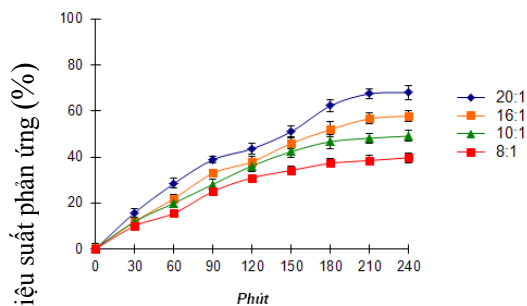
Để thực hiện phản ứng thủy phân γ -oryzanol sử dụng xúc tác kiềm KOH (kiềm trong dung môi H₂O), cần thiết phải chọn được dung môi để tạo thành hỗn hợp đồng nhất giữa γ -oryzanol/EtOAc và dung dịch kiềm. Vì kiềm KOH được hòa tan trong nước, do đó cần thiết phải sử dụng đồng dung môi để trộn lẫn dung dịch γ -oryzanol/EtOAc và KOH/H₂O. EtOH với nhiệt độ sôi 78 °C hoàn toàn phù hợp để thực hiện vai trò này, giúp tạo thành hỗn hợp phản ứng (γ -oryzanol + KOH) hoàn toàn đồng nhất, phản ứng có thể được tiến hành tại nhiệt độ cao nhất là 75 °C.

Xét về mặt cấu trúc thì γ -oryzanol là một hợp chất rất khó bị thủy phân do các nhóm thế dạng cholesterol là nhóm thế lớn (Hình 1.5), gây nên hiệu ứng

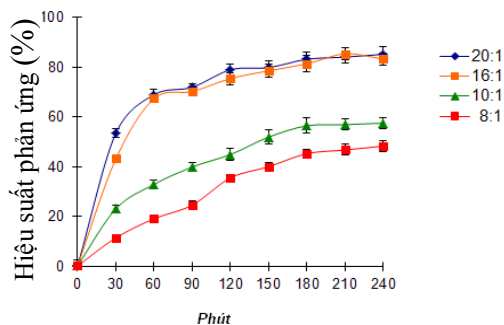
không gian, một mặt cản trở các tác nhân hóa học tấn công nhóm chức este, mặt khác hiệu ứng không gian sẽ làm mất tính phẳng trong hệ liên hợp, do đó phản ứng thủy phân γ -oryzanol không tuân theo tỷ lệ hợp thức trên lý thuyết. Do vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát phản ứng thủy phân với tỉ lệ KOH/ γ -oryzanol tương đối cao, từ 8:1 đến 20:1 (wt/wt).

3.2.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ kiềm/oryzanol tới hiệu suất thủy phân

Đây là một trong những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến hiệu suất của phản ứng thủy phân. Chọn nhiệt độ phản ứng cố định tại 60 °C; thay đổi tỉ lệ kiềm/ γ -oryzanol từ 8:1; 10:1; 16:1; 20:1 để nghiên cứu sự tạo thành của FA trong các khoảng thời gian khác nhau 30, 60, 90, 120, 150 và 180 phút.



Hình 5. Ảnh hưởng của tỉ lệ kiềm/oryzanol đến hiệu suất tạo FA tại 60 °C



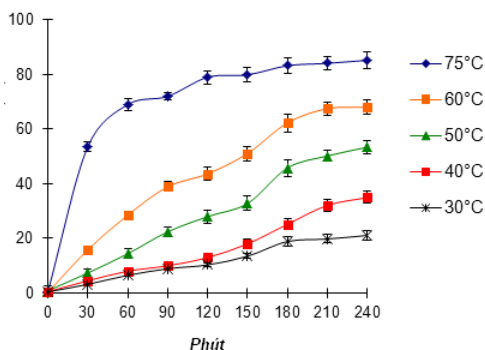
Hình 6. Ảnh hưởng của tỉ lệ kiềm/oryzanol đến hiệu suất tạo FA tại 75 °C

Dựa vào kết quả trên Hình 5 và 6 ta thấy, tỉ lệ kiềm/oryzanol càng cao thì hiệu suất tạo axit ferulic càng cao và thể

hiện rõ tại nhiệt độ 60 °C, với hiệu suất cao nhất là 62.3% với điều kiện tỉ lệ kiềm/oryzanol là 20:1 (wt/wt). Tuy nhiên, nếu tăng tỉ lệ này cao hơn 20:1, thì phản ứng sẽ không đồng nhất và xảy ra sự tách pha, do vậy, tỉ lệ kiềm/oryzanol cao nhất chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu là 20:1 (wt/wt). Tại nhiệt độ 75 °C, tỉ lệ 16:1 và tỉ lệ 20:1 đạt hiệu suất gần tương đương nhau, khoảng 83.2%. Điều này cho thấy cả nhiệt độ và tỉ lệ kiềm/oryzanol đều là các thông số quan trọng, bổ trợ cho nhau và quyết định hiệu suất của phản ứng. Đối với bài toán chi phí thực tế, nghiên cứu sẽ làm cơ sở cho việc lựa chọn tăng nhiệt độ phản ứng hay tăng tỉ lệ kiềm/oryzanol căn cứ vào chi phí điện năng hoặc chi phí hóa chất để đạt hiệu suất tương đương.

3.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu suất thủy phân

Chọn tỉ lệ kiềm/oryzanol là cao nhất là 20:1 (wt/wt), nồng độ oryzanol trong hỗn hợp phản ứng là 6 mg/ml, khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất tạo axit ferulic. Các nhiệt độ khảo sát là: 30, 40, 50, 60, 75 °C. Kết quả nghiên cứu được chỉ ra tại Hình 5. Nhiệt độ phản ứng càng cao thì hiệu suất phản ứng thủy phân càng lớn: 18,8% tại 30 °C, 25,2% tại 40 °C, 45,8% tại 50 °C, 62,3% tại 60 °C và 83,2% tại 75 °C sau 3 giờ phản ứng. Nhiệt độ cao nhất phản ứng có thể thực hiện được là tại 75 °C, nếu tiếp tục gia nhiệt đến 4 giờ sau phản ứng, hiệu suất sẽ đạt được là 84,1%. Kết quả này cũng chỉ ra, hiệu suất phản ứng bão hòa sau 4 giờ, và việc gia nhiệt thêm không làm tăng hiệu suất của phản ứng.

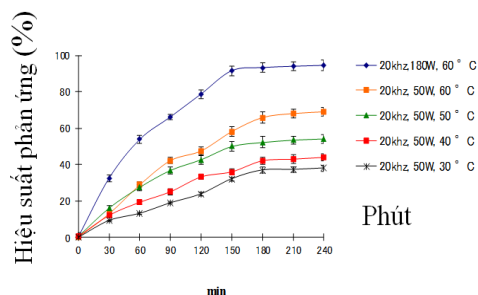


Hình 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng với hiệu suất tạo FA tại tỉ lệ kiềm/oryzanol là 20:1.

So sánh với kết quả nghiên cứu trước đó của công ty Tsuno (Nhật Bản), với hiệu suất đạt được là 86% tính theo γ -oryzanol có độ tinh khiết 80%, sử dụng isopropanol tại 90 °C, trong 8 giờ [32]; chúng tôi nhận thấy rằng phương pháp của chúng tôi mang lại hiệu quả gần như tương đương, ở nhiệt độ thấp hơn và thời gian chỉ bằng một nửa.

3.2.4. Ảnh hưởng của sóng siêu âm tới hiệu suất phản ứng thủy phân

Với sự hỗ trợ của sóng siêu âm tần số 20 kHz, phản ứng thủy phân được tiến hành tại các nhiệt độ từ 30 đến 60 °C. Phản ứng tại 75 °C, kết hợp thêm sóng siêu âm 20 kHz (Branson 450) sẽ làm cho quá trình mất dung môi diễn ra rất nhanh và do đó phá vỡ sự đồng nhất của phản ứng. Mặt khác, chúng tôi cũng tiến hành khảo sát 2 mức công suất khác nhau là 50 W và 180 W tại nhiệt độ 60 °C, các kết quả được thể hiện trên Hình 8.



Hình 8. Ảnh hưởng của sóng siêu âm 20 kHz tới hiệu suất phản ứng

Kết quả cho thấy, sử dụng sóng siêu âm 20 kHz với công suất 50 W tại 60 °C hầu như không hiệu quả để tăng hiệu suất phản ứng so với phương pháp gia nhiệt thông thường; tuy nhiên khi tăng công suất lên 180 W, hiệu suất của phản ứng thủy phân tăng lên gấp 1,5 lần. Như ta đã biết, sóng siêu âm với tần số thấp (20 kHz) hoạt động hiệu quả nhờ vào sự vỡ của các bong bóng (cavitation bubbles), qua đó tạo ra những điểm nóng có áp suất và nhiệt độ rất cao, và nhờ vậy mà thúc đẩy quá trình phản ứng [22]. Việc tăng công suất của sóng siêu âm từ 50 W lên 180W, đồng nghĩa với việc tăng số lượng các bong bóng siêu âm lên nhiều lần, và do đó, giúp tăng hiệu suất của phản ứng lên tới 93,3% trong khoảng thời gian ngắn hơn là 2,5 giờ. Đây là một kết quả rất khả quan so với các nghiên cứu trước đây đã được công bố của công ty Tsuno (Nhật Bản) như đã đề cập tới trong mục 3.2.3.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tìm ra được điều kiện phân tích phù hợp để phân tích đồng thời các sản phẩm của phản ứng thủy phân γ -oryzanol, tối ưu hóa tỉ lệ KOH/ γ -oryzanol (wt/wt) để thu được hiệu suất cao (tỉ lệ 20:1, đối với nồng độ đầu tương ứng của γ -oryzanol là 6 mg/ml). Hiệu suất của phản ứng bằng phương pháp đồng dung môi đạt 83,2 % tại 75 °C sau 3 giờ phản ứng; và nếu sử dụng sự hỗ trợ của sóng siêu âm 20 kHz, 180 W, hiệu suất phản ứng đạt 93,3% chỉ trong 2,5 giờ tại 60 °C. Việc ứng dụng sóng siêu âm trên quy mô lớn không phải là điều dễ dàng, cần phải được cân đối tính toán cụ thể giữa hiệu suất và lợi ích kinh tế. Phương pháp đồng dung môi mà chúng tôi đã nghiên cứu mang lại hướng đi khả thi, không cần sử dụng sóng siêu âm vẫn có thể đạt hiệu suất trên 80%

đối với phản ứng gia nhiệt tại 75 °C. Nghiên cứu này đưa ra một cái nhìn khả thi về việc sản xuất axit ferulic từ các sản phẩm phụ của ngành công nghiệp có chứa γ -oryzanol, đặc biệt là đối với ngành sản xuất dầu cám gạo.

Acknowledgements. “This research is funded by Vietnam National Foundation for Science and Technology Development (NAFOSTED) Ministry of Science and Technology under grant number 104.01-2014.57”. We would like to thank Prof. Yasuaki Maeda and Dr. Kiyoshi Imamura from Department of Research Organization for University – Community Collaborations, Osaka Prefecture University for precious advises and guidelines.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T., and Iseki, K. (2009) *In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors*, *Food Chemistry* 114, 466-471.
2. Mussatto, S. I., Dragone, G., and Roberto, I. C. (2007) *Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain*, *Industrial Crops and Products* 25, 231-237.
3. Sun, Y., and Wang, W. (2008) *Ultrasonic extraction of ferulic acid from Ligusticum chuanxiong*, *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 39, 653-656.
4. Prasad, N. R., Ramachandran, S., Pugalendi, K. V., and Menon, V. P. (2007) *Ferulic acid inhibits UV-B-induced oxidative stress in human lymphocytes*, *Nutrition Research* 27, 559-564.
5. Mancuso, C., and Santangelo, R. (2014) *Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects*, *Food and Chemical Toxicology* 65, 185-195.
6. Yan-Ying, Y., Wei, Z., and Shu-Wen, C. (2007) *Extraction of Ferulic Acid and Caffeic Acid with Ionic Liquids*, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 35, 1726-1730.
7. Srinivasan, M., Sudheer, A. R., Pillai, K. R., Kumar, P. R., Sudhakaran, P. R., and Menon, V. P. (2006) *Influence of ferulic acid on γ -radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes*, *Toxicology* 228, 249-258.
8. Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., De Pasquale, A., Uccella, N., Barbuzzi, T., Paolino, D., and Bonina, F. (2000) *In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents*, *International Journal of Pharmaceutics* 199, 39-47.
9. Woranuch, S., and Yoksan, R. (2013) *Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan*, *Carbohydrate Polymers* 96, 495-502.
10. Graf, E. (1992) *Antioxidant potential of ferulic acid*, *Free Radical Biology and Medicine* 13, 435-448.
11. Zhao, Z., and Moghadasian, M. H. (2008) *Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review*, *Food Chemistry* 109, 691-702.
12. Buranov, A. U., and Mazza, G. (2009) *Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents*, *Food Chemistry* 115, 1542-1548.

(xem tiếp tr. 118)