

ETHYLENE GLYCOL/2-PENTYLBENZIMIDAZOLE LÀM DUNG MÔI SÂU ĐỂ LÀM GIÀU OMEGA-3 TỪ METHYLESTER CỦA ACID BÉO TRONG MỠ PHẾ PHỤ CÁ BASA

Đến tòa soạn 23-12-2022

Lê Thị Thanh Xuân

Trường Đại học Đồng Tháp

*Email: lttxuan067@gmail.com

SUMMARY

ETHYLENE GLYCOL/2-PENTYLBENZIMIDAZOLE NEW DEEP EUTECTIC SOLVENT FOR ENRICHMENT OF OMEGA-3 FROM METHYLESTER OF FATTY ACIDS ON BASA FISH WASTE

In this study, we synthesized 2-pentylbenzimidazole and applied for ethylene glycol/2-pentyl benzimidazole solvent system. This solvent system was used in the process of separating and enriching omega from methyl ester in basa fish fat. After separation products were analyzed by GC/FID method, the omega-3 content increased from 1.66% to 27.66% compared to the starting material, in which the content of α -linolenic acid (ALA) compounds 18:3 (n-3) 55 time.

Keywords: Deep eutectic solvents, 2-pentylbenzimidazole, ethylene glycol, omega-3

1. MỞ ĐẦU

Việc tách omega-3,6,9 khỏi hỗn hợp acid béo cũng như tách riêng từng dạng omega với một hệ dung môi xanh và có chi phí thấp là một vấn đề đang được các nhà nghiên cứu và sản xuất quan tâm. Căn cứ vào nhu cầu thực tế về omega-3,6,9 tại Việt Nam, cũng như việc phải nâng cao hiệu quả kinh tế của cá da trơn Việt Nam, đáp ứng yêu cầu tính khoa học cao của việc tách và làm giàu omega-3,6,9 bằng những hệ dung môi xanh và rẻ tiền, các hệ dung môi sinh học có thể thay thế hệ dung môi truyền thống có nguồn gốc dầu mỏ như petroleum ether, *n*-hexane...nhưng có giá thành cao và khả năng tương thích với chất bị chiết cao nên việc tách sản phẩm cuối rất khó khăn [7,9,10]. Trong những năm đầu của thế kỷ 20, một hệ chất lỏng ion mới được chế tạo dựa trên hỗn hợp của muối amonium bậc bốn với một số chất tạo liên kết hydrogen như amide, glycol hoặc carboxylic acid, để tạo thành một dung môi có khả năng hòa tan, giá thành thấp và dễ tái chế hoặc tự phân hủy mà không gây ô nhiễm. Chất lỏng ion đầu tiên được công bố từ do S Gabrien và J.Weiner [5]

là ethanolanonium nitrate có điểm nóng chảy là 52-55 °C. Mãi đến 1914, Paul Wanden [11] mới tổng hợp được một chất lỏng ion ở nhiệt độ phòng. Chất lỏng ion mới này được gọi là DES (deep eutectic solvent). Những công bố đầu tiên về hệ chất lỏng ion này là của Abbott và cộng sự từ những năm 2001 đến nay [1,2]. Để làm nổi bật sự quan tâm ngày càng tăng của DES là dung môi xanh, C. Andrew và các cộng sự đã nghiên cứu theo hướng sử dụng các dung môi bền vững, an toàn và lành tính thay thế cho các dung môi hữu cơ dễ bay hơi đang độc hại và có thể nguy hiểm [3]. Khi các hợp chất cấu thành DES là các chất chính, như aminoacid, acid hữu cơ, đường, ethyleneglycol hoặc dẫn xuất choline, thì DES được gọi là dung môi eutectic sâu tự nhiên (NADES) [8]. NADES chủ yếu phụ thuộc vào các tương tác liên phân tử (liên kết hydro) giữa các thành phần của chúng để tạo thành hỗn hợp eutectic có điểm nóng chảy cuối cùng thấp hơn nhiều so với các thành phần riêng lẻ của nó [12]. Một trong những ứng dụng của NADES là chiết xuất các hợp chất hoạt tính sinh học từ nguyên

liệu thực vật. Một vài nghiên cứu trong đó NADES đã được áp dụng để chiết xuất các hợp chất hoạt tính sinh học cho thấy nhiều hợp chất được hòa tan tốt hơn trong nước hoặc lipid. Là môi trường chất lỏng chức năng, các loại dung môi eutectic sâu tự nhiên (NADES) có thể hòa tan các hóa chất tự nhiên hoặc tổng hợp có độ hòa tan trong nước thấp. Hơn nữa, các tính chất đặc biệt của NADES, như khả năng phân hủy sinh học và khả năng tương thích sinh học, cho thấy chúng là ứng cử viên thay thế cho các khái niệm và ứng dụng liên quan đến dung môi hữu cơ và chất lỏng ion.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất: Các hóa chất cơ bản như *o*-phenyldiamine với hexanoic acid, ethylene glycol,...

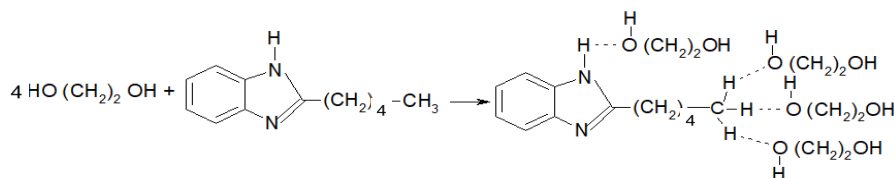
2.2. Tổng hợp hệ dung môi sâu ethylene glycol/2-pentylbenzimidazole và ứng dụng làm giàu omega-3

Tổng hợp 2-pentylbenzimidazole: Tỷ lệ mol *o*-phenyldiamine với hexanoic acid lần lượt là 1:1. Lượng xúc tác đưa vào là 10% khối lượng các chất tham gia phản ứng. Phản ứng được

thực hiện 10 giờ ở 180 °C và khuấy liên tục (vận tốc khuấy từ 600 vòng/phút). Sau 10 giờ, bình phản ứng được để nguội tự nhiên, sản phẩm được làm sạch bằng phương pháp kết tinh nhiều lần thu được tinh thể dạng bột màu trắng xám sấy khô và tiến hành phân tích.

Dung dịch hệ ethylene glycol/2-pentylbenzimidazole:

Các hệ NADES được điều chế đơn giản bằng cách trộn lẫn 2 thành phần lại với nhau, NADES được tạo thành thông qua liên kết hydrogen [4]. Sự hình thành liên kết hydrogen trong phân tử ethylene glycol/ 2-pentylbenzimidazole là do độ âm điện mạnh của oxygen trong nhóm OH của ethylene glycol có xu hướng liên kết với hydrogen của N và các hydrogen của nhóm CH₃ ngoài cùng của dãy alkyl. Để 1 mol 2-pentylbenzimidazole tan hết vào ethylene glycol và không tái kết tinh, tối thiểu phải có 4 mol ethylene glycol. Đây cũng là ngưỡng bão hòa của dung dịch này. Trong đó tỷ lệ ethylene glycol/2-pentylbenzimidazole 10g:1,5g là tốt nhất về tính chất vật lý của hệ cũng như khả năng chiết, khả năng thu hồi DES nên tỷ lệ này đã được chọn.



Tách và làm giàu omega-3 bằng hệ ethylene glycol/2-pentylbenzimidazole: 20 gam methyl ester và 15 gam hệ ethylene glycol/2-pentylbenzimidazole thêm 200 ml methanol. Hỗn hợp cho vào bình cầu 500 ml có gắn sinh hàn được đặt trên máy khuấy từ (120 vòng/phút) có gia nhiệt. Bình phản ứng được đun nóng ở nhiệt độ 45 °C và khuấy liên tục. Cho đến khi hỗn hợp đồng nhất, để nguội ở nhiệt độ phòng và được làm lạnh ở 4 °C trong 8 giờ. Sau 8 giờ hỗn hợp tách thành hai lớp: lớp trên là phần lỏng, lớp dưới là phần rắn, tách phần chất lỏng và phần rắn ra khỏi nhau. Phần rắn được rửa bằng methanol lạnh và kết hợp dung dịch rửa này với phần lỏng, làm bay hơi methanol trong thiết bị bay hơi chân không. Sau đó làm khan bằng Na₂SO₄ và tiến hành phân tích xác định thành phần hóa học các acid béo.

2.3. Phân tích sản phẩm

Trong công trình này chúng tôi sử dụng một số phương pháp phân tích: Phổ FTIR được đo trên

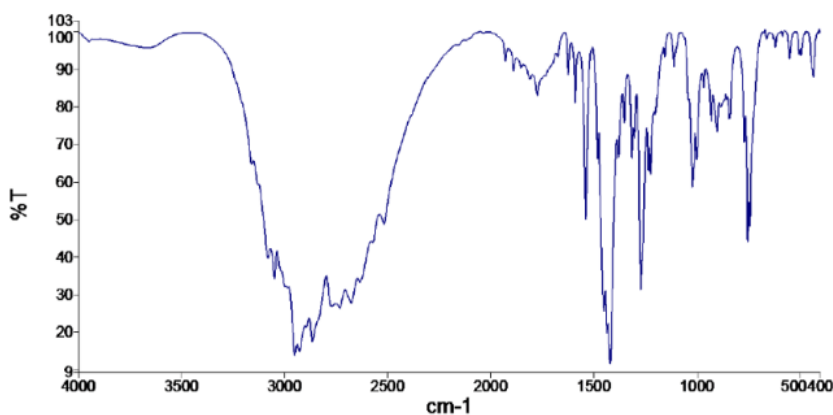
máy PerkinElmer MIR/NIR Frontier, ép viên với KBr, dãy sóng từ 4000-400 cm⁻¹. Phổ NMR đo trên máy hiệu Bruker AC 500. Giảm đồ TGA được đo trên máy TGA TA-Q200, phân tích từ nhiệt độ phòng đến 800 °C, gia nhiệt với tốc độ 10 °C /phút và môi trường khí Nitrogen. GC/FID gồm hệ thống sắc ký khí GC - Agilent 6890N có cấu tạo bao gồm: buồng tiêm mẫu bằng tay, lò cột, đầu dò ion hóa ngọn lửa FID, cột mao quản HP-INOWAX (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) thành phần polyetyleneglycol. Phương pháp GC/MS được đo trên máy GC Agilent 6890N, MS 5973 inert, cột HP5-MS, áp suất He đầu cột 9.3 psi. Chương trình nhiệt cho mẫu 50 °C tăng 5 °C/phút đến 150 °C tiếp tục tăng 10 °C/phút đến 200 °C, tăng 20 °C/phút đến 300 °C giữ trong 10 phút. Các mẫu được phân tích tại phòng phân tích của Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

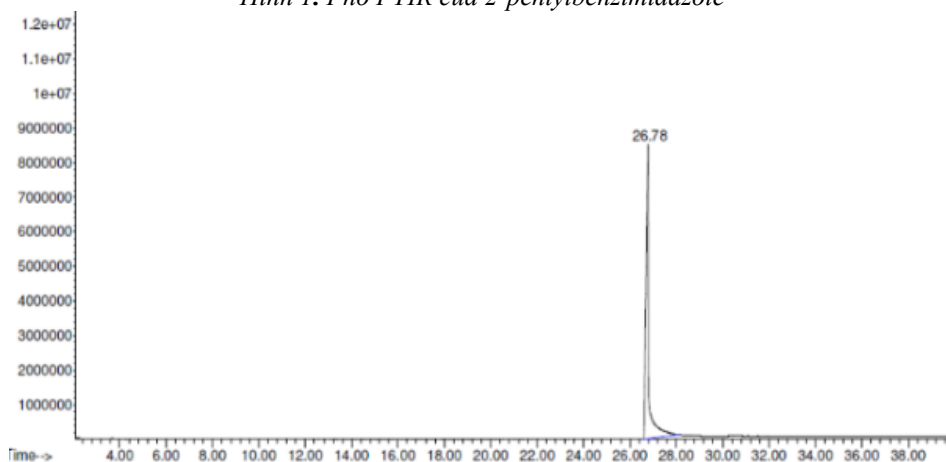
3.1. Kết quả tổng hợp 2-pentylbenzimidazole

Hợp chất 2-pentylbenzimidazole cho biết trên giản đồ DSC có xuất hiện peak tại vùng nhiệt 167 mà trên giản đồ TGA không có sự giảm khối lượng vì vậy nhiệt độ nóng chảy của 2-pentylbenzimidazole được xác định là 167 °C. Phương pháp GC/MS cho thấy trên giản đồ GC chỉ có 1 peak, kết quả MS có sự hiện diện các ion sau: 188 là của phân tử $C_{12}H_{16}N_2$, mất đi 1 nhóm CH_3 là ion $C_{11}H_{13}N_2$

thể hiện peak 173, tương ứng peak 132 (100%) là phân tử $C_5H_8N_2$, 131 là của ion 2- $C_5H_7N_2$, 118 là ion $C_7H_5N_2$ thể hiện peak,. So với phổ dữ liệu NIST với các pic lớn đặc trưng: 132, 188, 173, 118 phù hợp với cấu trúc của hợp chất cần tìm. FTIR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3082 (N-H), 2953 (C-H), 2774, 2734, 1539 (C=N), 1420, 1272(C-N), 1021, 751.



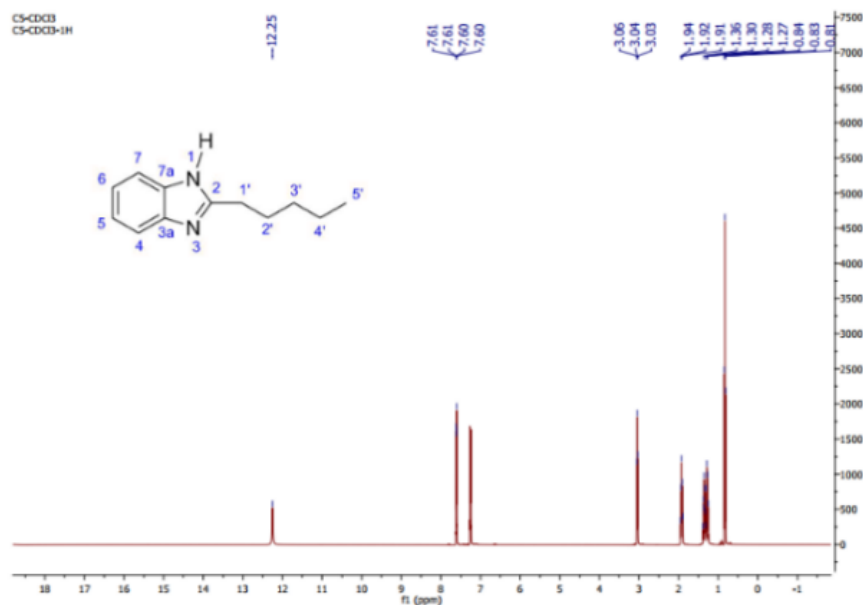
Hình 1. Phổ FTIR của 2-pentylbenzimidazole



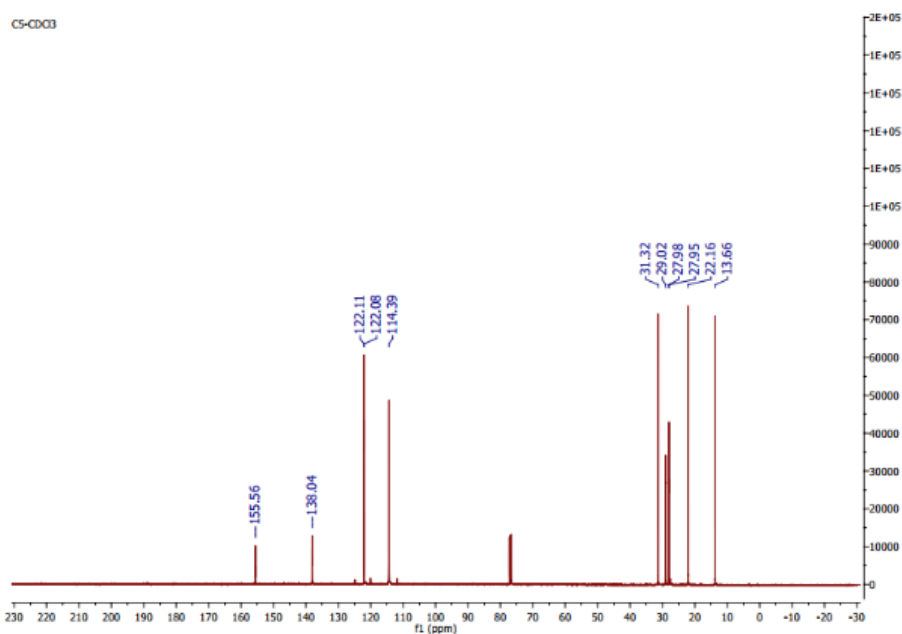
Hình 2. Sắc ký đồ của 2-pentylbenzimidazole

Cấu trúc của 2-pentylbenzimidazole cũng được xác định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, δ , ppm) cho các tín hiệu cộng hưởng của proton δ_H 12,25 (1H, brs, N-H) và các mũi cộng hưởng tín hiệu proton của hydrocarbon thơm δ_H 7,60 (2H, dd, $J_1 = 6,0$ Hz, $J_2 = 3,0$ Hz, H-4, 7); 7,24 (2H, dd, $J_1 = 6,0$ Hz, $J_2 = 3,2$ Hz, H-5, 6). Đồng thời phổ 1H -NMR cho các mũi cộng hưởng với sự hiện diện proton của 4 nhóm methylene δ_H 3,03 (2H, t, $J = 8,0$ Hz, H-1'); 1,91 (2H, m, H-2'); 1,36 (2H, dt, $J_1 = 6,5$ Hz, $J_2 = 3,0$ Hz, H-3'); 1,27 (2H, dt, $J_1 = 7,0$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, H-

4') và 1 nhóm methyl δ_H 0,82 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-5'). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, δ , ppm) xuất hiện các tín hiệu cho thấy sự hiện diện của 5C dây alkyl béo $\delta_C = 31,4$ (C-1'), 29,1 (C-2'), 28,0 (C-3'), 22,3 (C-4'), 13,8 (C-5'); các carbon của vòng hydrocarbon thơm $\delta_C = 138,1$ (C-3a,7a), 122,2 (C-5, 6), 114,5 (C-4, 7). Bên cạnh đó có tín hiệu của C mang nối đôi $\delta_C = 155,7$ (C-2). Các kết quả MS, NMR được so sánh với các công trình nghiên cứu trước, cho thấy phù hợp với sản phẩm mong muốn [6]. Điều đó chứng tỏ sản phẩm tạo thành có cấu trúc phù hợp với dự kiến.



Hình 3. Phổ ^1H -NMR của 2-pentylbenzimidazole



Hình 4. Phổ ^{13}C -NMR của 2-pentylbenzimidazole

3.2. Kết quả tách omega-3 từ methylester của acid béo bằng hệ dung môi ethylene glycol/ 2-pentylbenzimidazole

Để xác định ảnh hưởng của dung môi, sau khi khuấy trộn và thu được dung dịch đồng nhất, chúng tôi đã lấy mẫu để phân tích thành phần hóa học của dung dịch trước khi thực hiện quá trình làm lạnh để tạo tủa. Kết quả phân tích cho thấy acid béo bão hòa và acid béo chưa bão hòa giảm 2,31 gam, omega-6 giảm 1,37 gam, omega-9 giảm 1,13 gam, tổng giảm 4,81 gam.

Trong khi đó omega-3 tăng 4,39 gam (chênh lệch 0,42 gam). Sự chênh lệch giữa số lượng mất đi và tăng thêm nằm trong khoảng dưới 0,5 gam tương ứng 2,5%. Trong khi đó phần không xác định được và thất thoát cũng tương ứng 2,5%. Điều này cho thấy các số liệu phân tích hợp lý. Các số liệu khảo sát trên cho thấy, hệ ethylene glycol/2-pentylbenzimidazole đã làm giàu omega-3 đáng kể. Hàm lượng omega-3,6,9 trong dung dịch tách ra đạt 66%, trong đó hàm lượng omega-3 chiếm trên 23%.

Bảng 1. Khối lượng sản phẩm sau khi phối trộn và phân lỏng sau chiết tách

Dạng acid	Methylester		Sản phẩm sau phối trộn		Sản phẩm lỏng sau chiết tách	
	gam	%	gam	%	gam	%
Acid bão hòa	7,12	35,58	4,93	24,65	0,23	7,56
Acid chưa bão hòa	0,67	3,35	0,55	2,75	0,11	3,65
Omega-3	0,37	1,66	4,76	23,8	0,82	27,66
Omega-6	2,89	14,67	1,52	7,60	0,08	2,82
Omega-9	8,13	40,63	7,00	35,00	1,69	56,59
KXD và TT	0,82	4,11	1,24	6,20	0,05	1,72
Tổng ME	20	100	20	100	2,98	100
Tổng Omega-3,6,9	11,39	56,96	13,28	66,40	2,59	87,07

Sau khi làm lạnh trong phần lỏng cho kết quả omega-3 tăng 27% so với nguyên liệu đầu 1,66%, hợp chất α -linolenic acid (ALA) 18:3 (*n*-3) tăng

từ 0,4% nguyên liệu lên 25%. Có khả năng do linoleic acid (LA) 18:2 (*n*-6) đã tham gia vào quá trình đề hydrogen hóa.

Bảng 2. Thành phần và hàm lượng các chất sau khi phối trộn và trong phần lỏng

Dạng acid	Tên của các dạng acid béo	Methylester %	Sản phẩm sau phối trộn %	Sản phẩm lỏng sau tách %
Tổng acid béo bão hòa		35,58	24,65	7,56
Tổng acid béo chưa bão hòa		3,35	2,75	3,65
Omega-3	α -Linolenic acid (ALA) 18:3 (<i>n</i> -3)	0,46	23,4	25,62
	Eicosatrienoic acid 20:3 (<i>n</i> -3)	0,15	0,20	1,46
	Eicosapentaenoic acid (EPA) 20:5 (<i>n</i> -3)	0,42	0,10	0,46
	Docosahexaenoic acid (DHA) 22:6 (<i>n</i> -3)	0,63	0,10	0,12
	Tổng Omega-3	1,66	23,8	27,66
Omega-6	Linoleic acid (LA) 18:2 (<i>n</i> -6)	12,41	7,10	1,03
	γ -Linolenic acid (GLA) 18:3 (<i>n</i> -6)	1,05	0	0
	Eicosadienoic acid 20:2 (<i>n</i> -6)	0,55	0,40	0,91
	Eicosatrienoic acid 20:3 (<i>n</i> -6)	0,18	0	0
	Arachidonic acid (AA) 20:4 (<i>n</i> -6)	0,48	0,10	0,88
	Tổng Omega-6	14,67	7,60	2,82
Omega-9	Oleic acid 18:1 (<i>n</i> -9)	40,21	34,85	56,59
	Eicosenoic acid 20:1(<i>n</i> -9)	0,42	0,15	0
	Erucic acid 22:1 (<i>n</i> -9)	0	0	1,07
	Tổng Omega-9	40,63	35,00	56,59
Tổng Omega-3,6,9		56,69	66,4	87,07
Không xác định và thất thoát		4,11	6,20	1,72
Tổng		100	100	100

Các hợp chất omega trong phần lỏng tăng 87% so với nguyên liệu đầu 56%. Hàm lượng omega-3 tăng từ 1,66% nguyên liệu đầu lên 27,66% sau khi tách. Đặc biệt hợp chất α -

linolenic acid (ALA) tăng từ 0,46% lên 25,6%. Các hợp chất của omega-3 hiện diện trong phần lỏng chủ yếu là: α -Linolenic acid (ALA) 18:3 (*n*-3), Eicosatrienoic acid 20:3 (*n*-3),

Eicosapentaenoic acid (EPA) 20:5 (*n*-3), Docosahexaenoic acid (DHA) 22:6 (*n*-3), kết quả được thể hiện trong bảng 3.3. So với tách bằng hệ dung môi choline chloride và methylurea tổng omega 3 là 5,37% [13].

Bảng 3. Thành phần omega-3 trong phần lỏng

Omega-3	ALA (%)	ETA (%)	EPA (%)	DHA (%)	Tổng (%)
Methylester	0,46	0,15	0,42	0,63	1,66
NADES	25,62	0,46	1,46	0,12	27,66

4. KẾT LUẬN

Đã tổng hợp hợp chất 2-pentylbenzimidazole và xác định được tính chất và cấu trúc của hợp chất bằng phương pháp phân tích hóa lý: FTIR, TGA, GC/MS, NMR. Đã tạo hệ dung môi sâu dạng ethylene glycol/2-pentylbenzimidazole ứng dụng vào quá trình tách làm giàu omega-3 từ methylester của acid béo trong mỡ cá basa. Sản phẩm sau khi tách được xác định thành phần và hàm lượng các acid béo bằng phương pháp GC/FID, kết quả cho thấy hàm lượng omega 3 tăng đáng kể từ 1,66% nguyên liệu lên đến 27,66%. Trong đó hàm lượng hợp chất α -linolenic acid (ALA) 18:3 (*n*-3) tăng gấp 55 lần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A.P. Abbott, J.C. Barron, K.S. Ryder, et al., (2011). The effect of additives on zinc electrodeposition from deep eutectic solvents. *Electrochim. Acta*, **56** (14), 5272–5279. Vol. 82, No. 2, 2005 209
Quality Comparison of Rice Bran Oil Extracted with d-Limonene and Hexane
[2] A.P. Abbott, G. Frish, K.S. Ryder, et al., (2012). The electrodeposition of silver composites using deep eutectic solvents. *J. Phys. Chem. Chem. Phys*, **14**, 2443-2449.
[3] C. Andrew, E.E. Etiml, O.A. Ushie, et al., (2017). Deep Eutectic Solvents: An Overview of its application as a “Green” Extractant. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*, **4**, 23-30.
[4] Y. Dai, G.J. Witkamp, Y.H. Choi, et al., (2013). Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research mixtures of solids as extraction solvents. *Journal of Natural Products*, **76** (11), 2162-2173.

[5] S. Gabriel and J. Weiner, (1888). Ueber einige Abkömmlinge des Propylamins. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **21**(2), 2669–2679.
[6] A. Kumar, R.A. Maurya, D. Saxena, Mol. Divers, (2010). Diversity-oriented synthesis of benzimidazole, benzoxazole, benzothiazole and quinazolin-4(3H)-one libraries via potassium persulfate–CuSO₄-mediated oxidative coupling reactions of aldehydes in aqueous micelles, **14**, 331-341.
[7] S.X. Liu, P.K. Mamidipally, (2005). Quality comparison of rice bran oil extracted with d-limonene and hexane. *American Association of Cereal Chemists*, **82**, 209–215.
[8] Alexandre Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, et al., (2014). Eng, Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chem*, **2**, 5. 9-11
[9] C.D. Tanzi, M.A. Vian, C. Ginies, et al., (2012). Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. *Molecules*, **17**, 8196–8205.
[10] M. Viro, V. Tomaoa, C. Ginies, et al., (2008). Green procedure with a green solvent for fats and oils’ determination microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *Journal Chromatogr A* 1196–1197.
[11] P. Walden, Bull, (1914). Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. *Russian Acad. Sci.*, 405-422.
[12] Zhen Yang, (2019). Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **168**, 31-59.
[13] Lê Thị Thanh Xuân, (2021). Tổng hợp dung môi sâu trên cơ sở choline chloride và methylurea. *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, **26**,1.