Le Tat Thanh et al., 2013, p. 512-519
Proceedings of the International Conference on "Bien Dong 2012

NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA CÁC ĐIỀU KIỆN CỦA PHẢN ỨNG ĐIỀU CHẾ GLUCOSAMIN SUNFAT TỪ PHẾ PHẨM THỦY SẢN

Lê Tất Thành[1], Nguyễn Tiến Dũng[1], Chu Quang Truyền[1], Hoàng Thanh Hương[1], Nguyễn Văn Sơn[1], Phạm Minh Quân[1], Vũ Đình Hoàng[2], Phạm Quốc Long[1]

[1]Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên - Viện KH&CN Việt Nam
[2]Bộ môn Hoá dược - Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

Tóm tắt: Glucosamin là một chất được tổng hợp tự nhiên trong cơ thể người, có nhiều trong thành phần của sụn khớp. Các muối của glucosamin tan tốt trong nước, xâm nhập vào khớp rất nhanh chóng nên có hiệu quả cao trong việc phục hồi các cấu trúc khớp bị viêm. Ở Việt Nam, hợp chất glucosamin sunfat được sản xuất từ nguyên liệu là phế phẩm thủy sản. Hiệu suất quá trình điều chế phụ thuộc vào các điều kiện phản ứng như nhiệt độ, thời gian và nồng độ chất tham gia phản ứng. Báo cáo này trình bày những kết quả đạt được khi tiến hành tối ưu hóa các điều kiện ảnh hưởng trên. Các điều kiện tối ưu cho phản ứng điều chế glucosamin sunfat từ phế phẩm thủy sản là: nhiệt độ phản ứng: 86^0C; thời gian phản ứng: 3 giờ; nồng độ axit sunfuric: 45%. Ở điều kiện trên, hiệu suất điều chế glucosamin sunfat đạt 26,8%.

Từ khoá: *Glucosamin sunfat, Phế phẩm thuỷ sản, Tối ưu hoá*

RESEARCH FOR OPTIMIZING REACTIVITY CONDITION FOR PREPARATION OF GLUCOSAMINE SUNFATE FROM FISHERIES SCRAPS

Le Tat Thanh[1] , Nguyen Tien Dung[1] , Chu Quang Truyen[1], Hoang Thanh Huong[1], Nguyen Van Son[1], Pham Minh Quan[1], Vu Đinh Hoang[2], Pham Quoc Long[1]

[1]Institute of natural Products Chemistry - VAST
[2]Derpartement of Phamarceutical Chemistry - Hà Nội University of Sciences and Technology

Abstract: Glucosamin is a synthesized compound in human body, presents a lot in the composition of cartilage. Glucosamon salts dissolve in water, penetrate quickly into arthrosis, thus it is highly effective in restoring inflamed arthrosis. In Vietnam, glucosamine sulfat is produced from fisheries scraps. The productivity of this process depends on reaction conditions such as temperature, time, concentration of compounds involved. In this paper, we report obtained results when optimizing above conditions. The optimal conditions for the preparation of glucosamine sulfat from fisheries scraps are: reaction temperature 86^oC; duration 3 hours; sulfuric acid concentration 45%. At this condition, the productivity of preparative reaction reaches 26.8%.

Key words: *Glucosamine sulfate, Fisheries scraps, Optimization.*

I. MỞ ĐẦU

Việt Nam là một nước có khí hậu nhiệt đới gió mùa, có hệ động thực vật vô cùng phong phú và đa dạng. Với lợi thế đường bờ biển dài, diện tích mặt biển lớn cộng với hệ thống sông ngòi dày đặc. Việt Nam hiện đang là một nước có nghề khai thác, nuôi trồng và chế biến thủy sản phát triển mạnh. Theo số liệu của Tổng cục thống kê, chỉ riêng năm 2011, nước ta đã xuất khẩu hơn 1 triệu tấn sản phẩm thủy sản các loại thu về gần 6 tỷ USD. Nguyên liệu dùng để chế biến thủy hải sản xuất khẩu chủ yếu là tôm, mực và các thủy sản khác. Đi đôi với đó thì việc sản xuất chế biến thủy hải sản cũng đã loại ra một lượng không nhỏ những phế phẩm thủy sản. Phế phẩm thủy sản có chứa hàm lượng protein, lipit có hoạt tính sinh học cao, các axít béo thiết yếu, vitamin và khoáng chất. Các phế phụ phẩm này không thể trực tiếp dùng làm thực phẩm cho con người nhưng lại có tiềm năng to lớn dùng làm nguyên liệu sản xuất các sản phẩm thực phẩm và phi thực phẩm khác trong công nghiệp như: chất bổ sung dinh dưỡng, sản phẩm thực phẩm chức năng, thức ăn chăn nuôi, sản phẩm dược liệu, sản phẩm mỹ phẩm và nhiều ứng dụng công nghiệp khác (Trần Thị Luyến và cs. 2000).

Glucosamin là một trong những sản phẩm tiêu biểu thu được từ nguyên liệu phế phẩm thủy sản. Các nghiên cứu cho thấy glucosamin là một chất được tổng hợp tự nhiên trong cơ thể và tham gia vào quá trình hình thành sụn khớp. Chúng kích thích quá trình tổng hợp nên các proteoglycan, làm tăng cường sản sinh chất nhầy dịch khớp, giảm quá trình mất canxi của xương (Houpt 1999; Bassleer 1998).

Việc tận dụng lượng phế phẩm thuỷ sản vào mục đích sản xuất ra glucosamine làm thuốc điều trị bệnh viêm khớp, thoái hoá khớp đã được rất nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Đây là loại thuốc có nguồn gốc tự nhiên có ưu điểm vượt trội so với các thuốc được tổng hợp hoá học (Nguyễn Văn Đàn & Ngô Ngọc Khuyến, 1999).

Trong báo cáo này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng điều chế glucosamin từ phế phẩm thủy sản.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Phế phẩm thủy hải sản thu được từ các nhà máy chế biến thủy hải sản ở Hải Phòng và được bảo quản ở nhiệt độ lạnh âm sâu (-20 độ C).

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Xử lý sơ chế nguyên liệu

Nguyên liệu sau khi được xử lý bằng nước sôi, sấy và nghiền nhỏ thu được dưới dạng bột có màu nâu nhạt và có mùi đặc trưng của sinh vật biển.

Nguyên liệu dạng bột này sau đó được khử khoáng bằng dung dịch HCl 10%; loại bỏ protein bằng dung dịch NaOH 5%; và tẩy mầu sản phẩm bằng dung dịch H_2O_2 với nồng độ thấp chúng tôi thu được nguyên liệu sạch để sử dụng cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

2.2. Phương pháp xác định các vùng ảnh hưởng của các yếu tố trong quá trình điều chế glucosamin sunfat

Các thí nghiệm được tiến hành nhằm mục đích xác định vùng quy hoạch của từng yếu tố ảnh hưởng đến quá trình điều chế glucosamin sunfat: nhiệt độ phản ứng, thời gian phản ứng, nồng độ axit tham gia phản ứng.

Thực nghiệm chung*:* Cân nguyên liệu sau xử lí và cho ra cốc, thêm từ từ dung dịch H_2SO_4 45% vào, đun nóng và khuấy đều, duy trì ở nhiệt độ và thời gian tiến hành phản ứng ở một mức nhất định, dung dịch phản ứng sau đó được lọc để loại bỏ các tạp chất không tan. Dịch thu được được tẩy màu bằng than hoạt tính. Sau đó lọc và loại nước bằng máy đông khô. Khi thể tích dịch giảm một nửa thì cho vào tủ lạnh ở nhiệt độ 0-4^{0}C. Ở nhiệt độ thấp, glucosamin sunfat kết tinh dạng tinh thể màu trắng. Chúng tôi tiến hành lọc thu lấy những tinh thể đó, rửa qua bằng cồn và để khô tự nhiên.

2.3. Phương pháp quy hoạch thực nghiệm bậc 2 tâm trực giao 3 nhân tố để tối ưu hoá phản ứng điều chế glucosamin sunfat

Để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố cũng như ảnh hưởng đồng thời của chúng lên hiệu suất phản ứng điều chế glucosamin sunfat, sử dụng phương pháp tính toán lý thuyết các điều kiện tối ưu theo mô hình toán học bậc hai tâm trực giao ba yếu tố. Phần mềm phân tích dữ liệu được lưu trữ tại Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên (Phạm Hồng Hải & Ngô Kim Chi, 2007).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Sơ chế nguyên liệu

Hợp chất glucosamine tồn tại chủ yếu trong sụn vây cá và trong vỏ của những động vật giáp xác. Trong khi đó, nguyên liệu phế phẩm thủy hải sản thường có chứa hỗn tạp nhiều loại. Chính vì thế, việc xử lý nguyên liệu để loại bỏ lipit, khoáng chất và những thứ không cần thiết nhằm mục đích tạo điều kiện thuận lợi khi tiến hành khảo sát xác định vùng quy hoạch thực nghiệm là cần thiết. Nguyên liệu sau khi xử lí có màu trắng nhạt, có mùi nhẹ đặc trưng của sinh vật biển, hiệu suất thu hồi nguyên liệu sau khi xử lý sơ chế đạt từ 52-57%. Kết quả sơ chế nguyên liệu thu được trình bầy ở bảng 1 như sau:

Bảng 1: Khối lượng nguyên liệu trước và sau khi xử lí

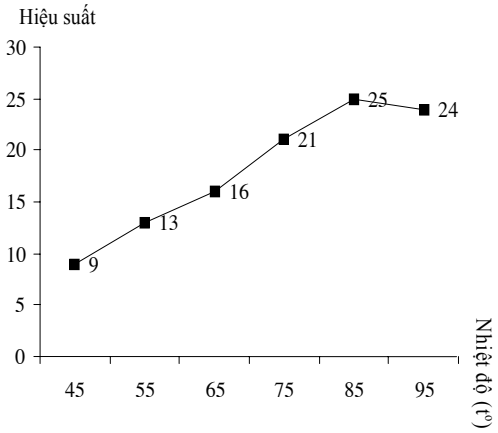
STT	Nguyên liệu thô (g)	Nguyên liệu sau xử lí (g)	Hiệu suất (%)
1	50	26,5	53
2	50	25,8	52
3	50	27,7	55
4	50	27,3	54
5	50	28,4	57

2. Mô hình hoá và tối ưu hoá phản ứng điều chế glucosamin sunfat

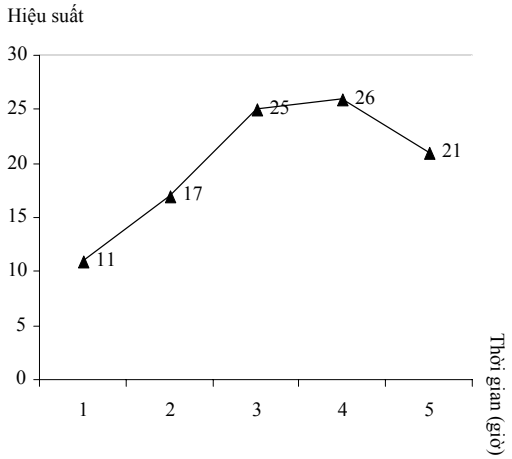
2.1. Khảo sát sơ bộ các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng điều chế glucosamin sunfat

Nhiệt độ

Tiến hành 6 thí nghiệm với cùng khối lượng nguyên liệu (20 g), thể tích axit sunfuric 45% (45 ml) và thời gian phản ứng (2 giờ) thực hiện ở các mức nhiệt độ khác nhau, kết quả thu được ở hình 1. Dựa vào các kết quả trên ta thấy, khi tăng nhiệt độ thì hiệu suất phản ứng cũng tăng lên. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ đến khoảng 85^0C thì hiệu suất không thấy tăng nữa. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn nhiệt độ cơ bản để tiến hành quy hoạch hoá thực nghiệm là 85^0C với khoảng biến thiên $\Delta = 10^0$C.



Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất của phản ứng



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất của phản ứng

Thời gian

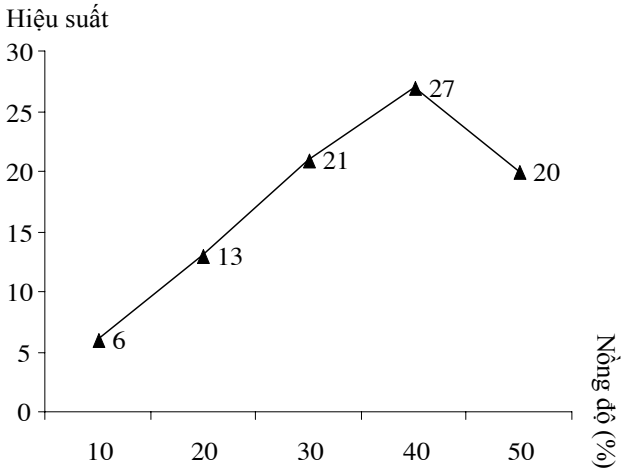
Sau khi đã tiến hành và lựa chọn được mức nhiệt độ là 85^0C, chúng tôi tiếp tục tiến hành 5 thí nghiệm với cùng khối lượng nguyên liệu (20g), thể tích axit sunfuric 45% (45ml) và nhiệt độ phản ứng 85^0C, thực hiện ở các mức thời gian khác nhau, kết quả thu được ở Hình 2.

Từ các kết quả trên cho thấy khi tăng thời gian phản ứng thì hiệu suất phản ứng cũng tăng đáng kể. Với hiệu suất điều chế glucosamin sunfat như trên, thời gian phản ứng 3 giờ là đủ để có được hiệu suất tốt. Do vậy, chúng tôi chọn thời gian phản ứng với mức thấp là 2 giờ và mức cao là 4 giờ để tiến hành quy hoạch hoá thực nghiệm phản ứng điều chế glucosamin sunfat.

Nồng độ axit sunfuric

Cũng tương tự, chúng tôi đã tiến hành 5 thí nghiệm với cùng khối lượng nguyên liệu (20g), nhiệt độ 85^0C thời gian phản ứng (3 giờ), 45 ml dung dịch axit H_2SO_4 với các nồng độ dung dịch khác nhau, kết quả thu được ở Hình 3.

Các kết quả cho thấy, khi tăng thể tích axit thì hiệu suất phản ứng tăng lên nhiều và nồng độ dung dịch axit sunfuric H_2SO_4 45% là cho hiệu suất cao nhất. Từ đây, chúng tôi lựa chọn nồng độ dung dịch H_2SO_4 với mức cơ bản là 45% và khoảng biến thiên nồng độ Δ=10%.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ axit đến hiệu suất của phản ứng

2.2. Qui hoạch thực nghiệm bậc hai tâm trực giao ba nhân tố

Từ những thí nghiệm khảo sát sơ bộ các yếu tố ảnh hưởng, chúng tôi lựa chọn mô hình thực nghiệm bậc hai tâm trực giao ba nhân tố để tiến hành qui hoạch hoá và tối ưu hoá thực nghiệm phản ứng điều chế glucosamin sunfat với 15 thí nghiệm (N=15), α=1,215. Cũng từ các kết quả này chúng tôi lựa chọn các yếu tố ảnh hưởng là nồng độ axit sunfuric, nhiệt độ và thời gian phản ứng với các mức cơ bản và khoảng biến thiên được cho như sau:

Bảng 2. Các mức tiến hành phản ứng

	Z_1	Z_2	Z_3
Mức cao (+)	100	4	55
Mức thấp (-)	70	2	35
Mức gốc (0)	85	3	45
Khoảng biến thiên (Δ)	15	1	10

Trong đó: Biến nhiệt độ: Z_1 (t^0); Biến thời gian: Z_2 (giờ); Biến nồng độ axit: Z_3 (%)

Bảng ma trận thực nghiệm

Dựa theo kế hoạch thực nghiệm chúng tôi đã bố trí 15 thí nghiệm và thiết lập được ma trận thực nghiệm cho trong Bảng 3.

Bảng 3. Ma trực thực nghiệm phản ứng điều chế glucosamin sunfat

N	x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	x'_1	x'_2	x'_3	y (%)
1	+	-	-	-	+	+	+	0,2	0,27	0,27	**11,8**
2	+	+	-	-	-	-	+	0,2	0,27	0,27	**16,9**
3	+	-	+	-	-	+	-	0,2	0,27	0,27	**12,1**
4	+	+	+	-	+	-	-	0,2	0,27	0,27	**17,2**
5	+	-	-	+	+	-	-	0,2	0,27	0,27	**10,9**
6	+	+	-	+	-	+	-	0,2	0,27	0,27	**16**
7	+	-	+	+	-	-	+	0,2	0,27	0,27	**12,3**
8	+	+	+	+	+	+	+	0,2	0,27	0,27	**16**
9	+	1,2	0	0	0	0	0	0,7	-0,73	-0,73	**22,7**
10	+	-	0	0	0	0	0	0,7	-0,73	-0,73	**21,1**
11	+	0	1,2	0	0	0	0	-	0,746	-0,73	**25,9**
12	+	0	-	0	0	0	0	-	0,746	-0,73	**23,5**
13	+	0	0	1,215	0	0	0	-	-0,73	0,746	**24,2**
14	+	0	0	-1,215	0	0	0	-	-0,73	0,746	**20,8**
15	+	0	0	0	0	0	0	-	-0,73	-0,73	**25,2**

Chú thích: x_1, x_2, x_3 là các yếu tố mã hoá trong phản ứng, y là hiệu suất phản ứng thu được thực tế dựa theo các bố trí thí nghiệm. Ở đây đã sử dụng các giá trị và d được tính sẵn cho mô hình kế hoạch hóa thực nghiệm bậc 2 tâm trực giao với n =3, = 0,73; d = 1,215.

Tính các hệ số của phương trình hồi quy

Sau khi sử dụng các phần mềm trong phương pháp tin học để tính toán chúng tôi thu được các hệ số của phương trình hồi quy như sau:

b_o	b_1	b_2	b_3	b_{12}	b_{13}	b_{23}	b_{11}	b_{22}	b_{33}
18,44	1,91	0,45	0,12	-0,18	-0,18	0,1	-5,54	-3,64	-5,13

Đánh giá tính có nghĩa của các hệ số của phương trình hồi quy

- Xác định các giá trị $t_{tính}$ Sử dụng các phần mềm trong phương pháp tin học để tính toán chúng tôi thu được các giá trị $t_{tính}$ như sau:

t_o	t_1	t_2	t_3	t_{12}	t_{13}	t_{23}	t_{11}	t_{22}	t_{33}
18,44	15,06	3,53	0,96	1,18	1,18	0,67	27,5	18,09	25,49

- Đánh giá tính phù hợp của các hệ số hồi quy

Tra bảng số liệu các giá trị ta có: $t_{bảng}$ = 3,18. So sánh các giá trị $t_{tính}$ với giá trị $t_{bảng}$ ta có các giá trị t_3, t_{12}, t_{13}, và t_{23} nhỏ hơn giá trị $t_{bảng}$ tra bảng do đó các hệ số b_3, b_{12}, b_{23} và b_{33} là các hệ số không có ý nghĩa (nhỏ hơn sai số thí nghiệm ngẫu nhiên) và bị loại ra khỏi phương trình hồi quy.

Sau khi loại bỏ các hệ số không có ý nghĩa ta thu được phương trình hồi quy như sau:

$$y = 28.886 + 1.912x_1 + 0.449x_2 - 5.535x_1^2 - 3.64x_2^2 - 5.129x_3^2$$

- Đánh giá sự phù hợp của phương trình hồi quy

Để đánh giá sự phù hợp của phương trình hồi quy tìm được ta phải xác định giá trị $F_{tính}$ sau đó so sánh với giá trị $F_{bảng}$ (tra bảng). Để tính được giá trị $F_{tính}$ chúng tôi đã thực hiện thêm 4 thí nghiệm ở tâm (25,1; 24,3; 26,3; 24,8) để xác định giá trị S_0^2. S_{tinh} được tính theo các công thức sau:

$$S^2_{phuhop} = \frac{1}{15-6}\Sigma_1^N (y_u - \hat{y_u}) = \frac{1}{15-6}38,62 = 4,92$$

$$F_{tinh} = \frac{S^2_{phuhop}}{S_0^2} = \frac{4,92}{0,72} = 5,96$$

Trang bảng giá trị F với f_1=6, f_2=3 ta được $F_{bảng}$ = 8,9. So sánh với giá trị $F_{tính}$, ta có $F_{tinh} < F_{bảng}$, chứng tỏ rằng phương trình hồi quy mô tả đúng thực nghiệm.

Sử dụng phép biến đổi $x_j = \frac{Z_j - Z_j^0}{\Delta Z_j}$ ta có thể đưa phương trình biến mã hoá về dạng biến thực:

$$Y = -296,306 + 4,309Z_1 + 21,84Z_2 + 4,616Z_3 - 0,0246Z_1^2 - 3,64Z_2^2 - 0,0513Z_3^2$$

với Z_1: biến nhiệt độ (70-100^{0}C); Z_2: biến thời gian (2-4 giờ);

Z_3: biến nồng độ axit sunfuric (35-55%).

Xác định cực đại của phương trình hồi quy

Sau khi tiến hành kế hoạch hóa thí nghiệm theo phương pháp ma trận bậc 2 tâm trực giao với 3 yếu tố: Z_1, Z_2 và Z_3 ta thu được phương trình hồi quy như sau:

$$y = -296,31 + 4,31Z_1 + 21,84Z_2 + 4,62Z_3 - 0,025Z_1^2 - 3,64Z_2^2 - 0,051Z_3^2$$

Giá trị cực đại của hàm mục tiêu cũng chính là điều kiện tối ưu cho phản ứng điều chế glucosamin sunfat theo lý thuyết. Tìm cực trị của phương trình hồi quy trên theo thuật toán FLEXIPLEX (viết bằng ngôn ngữ lập trình Pascal) ta thu được giá trị Y_{Max}=26,9 % tại Z_1 = 86,2 (^{0}C); Z_2 = 3 (giờ); và Z_3 = 45,3 (%).

2.3. Điều chế glucosamin sunfat theo điều kiện tối ưu

Để kiểm tra lại các kết quả tính toán lý thuyết tôi đã làm lại 5 thí nghiệm điều chế glucosamin sunfat tại điều kiện tối ưu. Kết quả thu được như Bảng 4.

Bảng 4. Điều chế glucosamin sunfat ở điều kiện tối ưu

STT	Nguyên liệu sau xử lí (g)	Glucosamin sunfat (g)	Hiệu suất phản ứng (%)
1	20	5,36	26,8
2	20	5,18	25,9
3	20	5,26	26,3
4	20	5,34	26,7
5	20	5,3	26,5

Kết quả tốt nhất khi tiến hành kiểm chứng là 26,8%. Các kết quả khác cũng đã cho thấy rằng việc sử dụng mô hình qui hoạch hoá thực nghiệm trên là tương đối phù hợp, các kết quả thu được khá gần với kết quả tối ưu hoá tính theo lí thuyết là 26,9%.

IV. KẾT LUẬN

Các điều kiện tối ưu cho phản ứng điều chế glucosamine sunfat từ phế liệu thủy sản là: nhiệt độ phản ứng: 86^0C; thời gian phản ứng: 3 giờ; nồng độ axit sunfuric: 45%. Hiệu suất theo tính toán lý thuyết đạt 26,9%. Hiệu suất thực nghiệm lớn nhất đạt được 26,8%.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự tài trợ của Chương trình Hóa dược quốc gia, đề tài "*Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất thuốc chữa bệnh viêm khớp dạng thấp và một số thực phẩm chức năng từ nguyên liệu sinh vật biển*", mã số CNHD.ĐT.012/09-11.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Đàn & Ngô Ngọc Khuyến, 1999. *Hợp chất thiên nhiên dùng làm thuốc,* NXB Y học Hà Nội.
2. Phạm Hồng Hải & Ngô Kim Chi, 2007. *Xử lý số liệu và quy hoạch thực nghiệm trong nghiên cứu hoá học,* NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ.
3. Trần Thị Luyến, Huỳnh Nguyễn Duy Bảo và cộng sự, 2000. *Hoàn thiện quy trình sản xuất Chitin-Chitosan và chế biến một số sản phẩm công nghiệp từ phế liệu vỏ tôm, cua,* Báo cáo khoa học đề tài cấp Bộ.
4. Houpt J.B., R. McMillan, C. Wein, S.D. Paget-Dellio, 1999. *Effect of glucosamin sulfate in the treatment of pain of osteoarthritis of the knee*, 26:24, 23-30.
5. Bassleer C., L.C. Rovati, P. Franchimont, 1998.*Glucosamin sulfate stimulates proteoglycan production in human chondrocytes in vitro*. Osteoarthritis Cartilage, 6: 4, 27-34.