

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

NGÔ VĂN DŨNG

**NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH, XÁC ĐỊNH
THÀNH PHẦN ANCALOIT TRONG HẠT CÀU LÙN**

**Chuyên ngành: Hóa hữu cơ
Mã số: 60 44 27**

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Đà Nẵng - 2011

Công trình được hoàn thành tại
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS ĐÀO HÙNG CƯỜNG

Phản biện 1: PGS.TS Phạm Văn Hai

Phản biện 2: PGS.TS Lê Thị Liên Thanh

Luận văn được bảo vệ tại Hội đồng chấm Luận văn tốt nghiệp
thạc sĩ hóa học họp tại Đại học Đà Nẵng vào ngày 25 tháng 6
năm 2011

** Có thể tìm hiểu luận văn tại:*

- Trung tâm thông tin - Học liệu, Đại học Đà Nẵng
- Thư viện trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng.

MỞ ĐẦU

1. Lí do chọn đề tài

Với sự phát triển không ngừng của khoa học kỹ thuật, con người đã đạt được nhiều thành tựu to lớn trên mọi lĩnh vực của đời sống. Trong đó có ý nghĩa và quan trọng nhất vẫn là lĩnh vực y học. Xã hội ngày càng phát triển kéo theo nó là sự phát sinh của bệnh tật đe dọa đến tính mạng con người. Khoa học đã góp phần rất lớn trong việc ngăn chặn, hạn chế và thậm chí loại bỏ bệnh tật cho con người. Con người đã nghiên cứu, tổng hợp được rất nhiều hợp chất chữa bệnh, ức chế và tiêu diệt các loại vi khuẩn thâm nhập vào cơ thể, giúp cho việc điều chỉnh một số chức năng của tế bào. Tuy nhiên những hợp chất tổng hợp thường có tác dụng phụ như: gây dị ứng, gây buồn ngủ... Vì những hạn chế ấy mà làm cho chúng không hoàn toàn chiếm ưu thế trên thị trường. Ngày nay, con người đã ngày càng quan tâm nhiều đến các hợp chất có trong tự nhiên hơn, bởi những tính ưu việt của nó quy định như: không độc hại, được cơ thể hấp thụ không để lại tác dụng phụ, phổ biến trong tự nhiên... Do đó, việc nghiên cứu các hợp chất thiên nhiên có tính kháng khuẩn, kháng sinh, chất mang hoạt tính sinh học... đã và đang là vấn đề quan tâm của toàn xã hội.

Đã là người Việt Nam, chắc chắn rằng không ai là không biết đến cây cau. Cau được trồng nhiều ở khu vực nhiệt đới gió mùa như Việt Nam, Ấn Độ, Thái Lan, Đài Loan... Quả cau thường được kết hợp với lá trầu, vôi sử dụng làm món nhai vui miệng rất thân quen với người dân Việt. Nó là nét đẹp văn hóa của người Việt Nam. Miếng trầu còn có tác dụng gây hưng phấn, tăng thân nhiệt cơ thể và nhuộm màu đỏ cho môi rất đẹp, nó còn giúp ngăn ngừa các bệnh về răng miệng [17]. Trên thế giới cau đã được kết hợp một số nguyên liệu thiên nhiên khác tạo chất kháng oxi hóa dùng làm mỹ phẩm, làm thuốc chống bệnh trầm cảm, bệnh cao huyết áp...Cau còn được chế biến thành cháo trị các chứng bệnh ở trẻ em[16]. Các công năng này chủ yếu dựa vào tác dụng của các ancaloit có trong hạt cau.

Nhiều người trồng cau là để tạo cảnh quan cho khu vườn nhà, vừa có thêm thu nhập cho gia đình. Đặc biệt là cây cau lùn, cây cau lùn này rất đặc biệt, mỗi đốt chỉ 1cm, nên trồng 20 năm chỉ cao khoảng 2m, màu lá xanh mướt, hoa thơm lạ kì [28], loại cau này mà trồng trang trí trước nhà thì rất tốt vừa có giá trị kinh tế cao, vừa làm cây cảnh rất đẹp. Hơn nữa, thân cây cau lùn lại thấp khi thu hoạch rất tiện đỡ vất vả phải leo trèo như cây cau thông thường.

Cau lùn có nhiều ứng dụng quan trọng nhưng trong thực tế các công trình nghiên cứu trước đây về quá trình chiết, tách hay xác định thành phần hoá học, cấu trúc của các hợp chất chính trong hạt cau rất ít và chưa hệ thống.

Với mong muốn tìm hiểu về hạt cau lùn nhằm làm sáng tỏ công dụng của nó, chúng tôi đã chọn đề tài “*Nghiên cứu chiết tách, xác định thành phần Ancaloit trong hạt cau lùn*”.

2. Đối tượng nghiên cứu

Hạt cau lùn nghiên cứu được lấy từ cây cau lùn ở thôn Quan Nam, xã Hòa Liên, huyện Hòa Vang, thành phố Đà Nẵng.

3. Mục đích nghiên cứu

- Nghiên cứu quá trình chiết tách các hợp chất ancaloit từ hạt cau lùn.
- Xác định thành phần hóa học, công thức cấu tạo của một số ancaloit chính.

4. Phương pháp nghiên cứu

Để thực hiện đề tài này, tôi sử dụng các phương pháp nghiên cứu sau:

4.1. Nghiên cứu lý thuyết

- Thu thập, tổng hợp các tài liệu, tư liệu, sách báo trong và ngoài nước có liên quan đến đề tài.
- Hội thảo, trao đổi kinh nghiệm với các chuyên gia, thầy cô giáo và đồng nghiệp.

4.2. Phương pháp thực nghiệm

- Phương pháp lấy mẫu, thu hái và xử lý mẫu.
- Xác định độ ẩm bằng phương pháp trọng lượng
- Xác định hàm lượng hữu cơ bằng phương pháp tro hoá mẫu
- Xác định hàm lượng kim loại bằng phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử (AAS)
- Chiết bằng phương pháp Soxhlet
- Khảo sát các điều kiện chiết thích hợp

- Xác định thành phần các hợp chất chính trong dịch chiết từ hạt cau lùn trong dung môi chiết bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp ghép khối phổ (LC-MS)

- Phân lập dịch chiết, tách một số cấu tử bằng sắc ký cột (CC) lặp lại trên silicagel pha thường và pha đảo.

- Xác định cấu trúc bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân

- Các phương pháp thử nghiệm các hoạt tính sinh học

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

5.1. Ý nghĩa khoa học

- Cung cấp những thông tin khoa học về quy trình chiết tách, xác định thành phần hóa học của một số ancaloit trong hạt cau ở Đà Nẵng.

- Cung cấp những thông tin, tư liệu làm cơ sở cho việc nghiên cứu sau này.

5.2. Ý nghĩa thực tiễn

- Nhằm giúp cho việc ứng dụng hạt cau ở phạm vi rộng một cách khoa học hơn.

- Giải thích một cách khoa học một số kinh nghiệm dân gian về ứng dụng của hạt cau.

- Tổng hợp kiến thức về hợp chất thiên nhiên để giảng dạy bộ môn hóa trong nhà trường phổ thông được tốt hơn.

6. Cấu trúc của luận văn :

Ngoài phần mở đầu, kết luận, tài liệu tham khảo và phụ lục trong luận văn gồm các chương như sau :

Chương 1 : TỔNG QUAN ĐỀ TÀI

Chương 2 : NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chương 3 : KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN ĐỀ TÀI

1.1. GIỚI THIỆU CÂY CAU

1.1.1. Đặc tính sinh thái

1.1.1.1. Tên gọi [2]

Tên thường gọi : Cây Cau, Mạ làng (Tày), Pơ lạng (K'ho)...

Tên khác : Aréquier (Pháp), Arecanut (Anh), Tân lang hay
Binh lang (Trung Quốc), Pinang (Malaysia)

Tên khoa học : **Areca catechu L**

1.1.1.2. Phân loại khoa học [12]

Giới : Plantae

Ngành : Magnoliophyta

Lớp : Liliopsida

Bộ : Arecales

Họ : Areceae (cau) hay họ Palmae (Dừa)

Chi : Areca.L

Loài : A.catechu

1.1.1.3. Phân bố

- Cây cau được trồng ở nhiều nơi, khắp vùng Châu Á, phía đông bao trùm Thái Bình Dương đến các đảo cạnh Châu Úc, phía tây vượt quá Ấn Độ đến bờ biển Châu Phi, phía bắc lấn tràn Miến Điện và miền nam Trung Quốc, phía nam chiếm toàn Đông Nam Á với quần đảo Nam Dương. Cau trồng nhiều ở vùng nhiệt đới như Ấn Độ, Malaysia, Đài Loan, Việt Nam và nhiều nước châu Á khác [21].

- Cau trồng được ở khắp các tỉnh thành trên toàn quốc, trồng nhiều ở Thanh Hóa, Nghệ An, An Lão - Bình Định, Tiên Phước - Quảng Nam, Cao Nhân - Hải Phòng...

1.1.2. Đặc tính thực vật

Cây cau là cây sống lâu năm. Thân mọc thẳng, không chia cành, có nhiều đốt do vết lá cũ rụng. Lá tập trung ở ngọn, cuống phát triển thành bẹ to ôm lấy thân, phiến lá to, rộng, xẻ lông chim. Hoa tự mọc thành bông, ngoài có mo bao bọc, hoa đực ở trên, hoa cái ở dưới. Hoa đực nhỏ màu trắng, thơm, màu lục. Hoa cái to, bao hoa không phân hoá. Quả hạch hình trứng, lúc còn non có màu xanh, vỏ bóng nhẵn, khi già có màu vàng, vàng cam hoặc đỏ (hình 1.1). Hạt có nội nhũ xếp cuộn. Hạt hơi hình nón cụt, đầu tròn giữa đáy hơi lõm, màu nâu nhạt, vị chát [27].

Cau có hai loại chính: cau rừng và cau nhà.

Hiện nay, ở Việt Nam có trồng giống cau nhập từ Đài Loan đó là cau lùn, cao khoảng 2 ÷ 3m, ra trái quanh năm (cau tứ thời). Cau lùn cho năng suất cao, khi non có màu xanh và khi chín có màu đỏ (hình 1.2)

Đặc điểm của cau lùn:

Cau lùn là cây thân gỗ có đốt, đường kính cây từ 15cm đến 20cm, đốt lóng cao 30cm, gốc thân hơi phình rộng, mang nhiều rễ nổi. Lá mọc tập trung ở đầu cành, kép lông chim, có bẹ lớn ôm thân gọi là mo, lá phụ dạng dải màu xanh bóng (hình 1.3). Cây trồng từ bốn đến năm năm thì bắt đầu nở hoa, cụm hoa đơn tính cùng gốc. Hoa đực màu trắng nhỏ có mùi thơm, hoa cái lớn hơn ở dưới màu xanh và nở hoa quanh năm có khả năng đậu quả khá cao. Quả hình trứng thuôn hai đầu, non màu lục, chín màu vàng.

1.1.3. Thành phần hóa học của hạt cau

- Tannin catechin tỷ lệ hạt non khoảng 70% nhưng hạt già chỉ còn 15÷20%.

- Hoạt chất chính là 4 ancaloit tỉ lệ 2,38mg/g: chủ yếu là Arecolin: $C_8H_{13}NO_2$, Arecain : $C_7H_{11}NO_2$, một lượng nhỏ Guvacin: $C_6H_9NO_2$, Guvacolin: $C_7H_{11}NO_2$.

- Mỡ béo 14%: laurin, olein, myristin.

- Glucid 50%, Saccharin được xác định trong cau dưới dạng muối natri.

- Ngoài (lauric, myristic, palmitic, stearic, phtalic axit) hạt cau còn chứa đựng các amin axit: ít tryptophan, methinonin, hơn 15%pirolin, hơn 10% tyrosin, phenylalanin arginin, muối vô cơ 5%, các đường 2%, muối vô cơ và một số sắc tố đỏ. Axit Galic, tinh dầu gồm, một lượng nhỏ tinh dầu dễ bay hơi, li nhin (lignin).

1.2. ANCALOIT

1.2.1. Khái niệm

Theo Polonopski: "Ancaloit là những hợp chất hữu cơ, có chứa nitơ, đa số có nhân dị vòng, có phản ứng kiềm, thường gặp trong thực vật và đôi khi trong động vật, thường có hoạt tính sinh học mạnh và cho phản ứng hóa học với một số thuốc thử gọi là thuốc thử chung của ancaloit".

1.2.2. Danh pháp

Các ancaloit thường có cấu tạo phức tạp, người ta thường gọi tên theo danh pháp thông thường. Tên của các ancaloit luôn có đuôi in và xuất phát từ:

Tên chi hoặc tên loài của cây + in [6]

1.2.3. Phân bố ancaloit

1.2.4. Cấu trúc và phân loại ancaloit

Đến nay đã biết trên 16.000 ancaloit thiên nhiên với trên 300 dạng cấu trúc Việc phân loại chủ yếu dựa vào cấu trúc nhân cơ bản hoặc dựa vào nguồn gốc tạo ra ancaloit.

1.2.5. Một số ancaloit trong hạt cau [27]

Theo kết quả nghiên cứu trước đây, hoạt chất chính trong hạt cau gồm: arecolin, arecaidin, guvacolin, guvaxin (bảng 1.2). Đây là những ancaloit có nhân piridin và piperidin.

1.2.6. Tính chất chung của ancaloit

1.2.6.1. Lý tính

- Trạng thái tự nhiên: Phần lớn ancaloit trong công thức cấu tạo có oxi thường ở thể rắn ở nhiệt độ thường như morophin ($C_{17}H_{19}NO_3$), codein ($C_{18}H_{21}NO_3$)... Những ancaloit trong công thức cấu tạo không có oxi thường ở thể lỏng như coniin ($C_8H_{17}N$), nicotin ($C_{10}H_{14}N_2$)... Các ancaloit ở thể rắn thường kết tinh được và có điểm nóng chảy rõ ràng.

- Mùi vị: Đa số các ancaloit không có mùi, có vị đắng và một số ít có vị cay như capsaicin, piperin...

- Màu sắc: Hầu hết các ancaloit đều không màu trừ một vài ancaloit có màu vàng như berberin, palmatin, chelidonin.

- Độ tan: Hầu hết ancaloit ở dạng bazơ thường không tan trong nước nhưng tan trong dung môi hữu cơ như clorofom, ete, benzen và các ancol bậc 1 có số C nhỏ như CH_3OH , C_2H_5OH . Một số ancaloit do có thêm nhóm phân cực nên tan một phần trong nước hoặc kiềm. Ví dụ: mocphin, cephalin do có nhóm -OH phenol nên tan trong dung dịch kiềm và các bazơ của chúng thì gần như không tan trong ete.

1.2.6.2. Hóa tính

► Tính bazơ: Ancaloit là các bazơ yếu, do sự có mặt nguyên tử N. Nhưng độ kiềm của ancaloit không giống nhau do ảnh hưởng lớp điện tích nguyên tử N gây ra và ảnh hưởng các nhóm chức khác. Nói chung tính bazơ giảm dần theo thứ tự amoni bậc 4, amin bậc 1, amin bậc 2, amin bậc 3. Với các ancaloit có tính bazơ yếu cần môi trường axit mạnh hơn để tạo thành muối trong dung dịch nước. Vì vậy trong môi trường axit yếu một số ancaloit bazơ mạnh có thể chuyển thành muối trong khi các bazơ yếu vẫn tồn tại trong dung dịch dưới dạng bazơ. Đặc tính này được ứng dụng trong việc tách các nhóm ancaloit có trị số pK_b khác nhau khỏi hỗn hợp của chúng. (bảng 1.3)

Dựa vào pK_b người ta xếp độ kiềm của các ancaloit như sau:

- + Ancaloit có độ kiềm mạnh thì giá trị $pK_b < 3$
- + Ancaloit có độ kiềm trung bình thì $pK_b : 3 \div 7$
- + Ancaloit có độ kiềm yếu thì $pK_b : 7 \div 10$
- + Ancaloit có độ kiềm rất yếu thì $pK_b : 10 \div 12$

Ngoại lệ: Ancaloit không còn tính kiềm như ricinin, colchicin, hoặc có chất có phản ứng axit yếu như arecaidin, guvacin.

- Tác dụng với axit, các ancaloit tạo ra các muối tương ứng.
- Ancaloit kết hợp với kim loại nặng (Hg, Bi, Pb...) tạo ra muối phức.
- Các ancaloit có phản ứng với một số thuốc thử chung

1.2.6.3. Sinh tổng hợp ancaloit [3]

Sinh tổng hợp ancaloit đã được Vinterstein và Trier chứng minh vào năm 1931. Ông cho rằng, ancaloit là dẫn xuất của các axit amin. Sau này người ta sử dụng axit amin có gắn đồng vị phóng xạ (^{14}C , ^{15}N) đã chứng minh hầu hết các khung cơ bản của ancaloit đều do các ancaloit kết hợp với 1 số gốc như axetat, hemi hoặc monotecin tạo ra.

1.2.7. Chiết tách ancaloit

1.2.7.1. Nguyên tắc lựa chọn dung môi

Theo quy tắc chọn dung môi, dung môi chiết phải có độ phân cực phù hợp với tính bazơ của ancaloit. Cụ thể, ancaloit là các bazơ yếu, dùng dung môi có độ phân cực yếu, ancaloit là các bazơ trung bình, mạnh thì dùng dung môi có độ phân cực trung bình hay mạnh. Đối với các ancaloit chưa biết thì bắt đầu thăm dò từ dung môi kém phân cực đến dung môi phân cực mạnh. Để các vết ancaloit di chuyển cao hơn và tách phù hợp có thể thêm vào dung môi một chất kiềm.

Trong cây, ancaloit thường không tồn tại dạng tự do do nó có khả năng kết hợp với tanin (nhất là những cây có nhiều tanin) tạo thành muối. Vì vậy, đối với dược liệu có nhiều tanin, cần tẩm bột dược liệu bằng kiềm một thời gian để chuyển ancaloit thành dạng bazơ tự do trước khi chiết. Cần dùng dung môi có độ phân cực mạnh hơn hoặc chiết nóng để tách ancaloit ra khỏi tanin và hòa tan vào dung môi.

1.2.7.2. Chiết tách ancaloit

Việc chiết xuất ancaloit dựa vào tính chất của nó. Hầu hết ancaloit ở dạng bazơ tan được trong dung môi hữu cơ ít phân cực, không tan trong nước. Ngược lại, ở dạng muối, ancaloit tan trong nước etanol không tan trong dung môi hữu cơ ít phân cực. Mặt khác, tùy thuộc vào khả năng hóa hơi, khả năng chịu nhiệt của ancaloit mà dùng phương pháp chiết xuất cho thích hợp.

Có 2 cách để chiết xuất ancaloit: chiết bằng dung môi hữu cơ và chiết bằng dung dịch nước axit hoặc ancol .

Phương pháp 1: Chiết bằng dung môi hữu cơ

Để chiết ancaloit bằng dung môi hữu cơ, trước hết bột dược liệu phải được tẩm dung dịch bazơ để chuyển ancaloit muối trong dược liệu thành dạng bazơ. Bazơ thường dùng là dung dịch NH_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2CO_3 , NaOH .

Dung môi có thể dùng là clorofom, ete, benzen, etyl clorua. Clorofom là dung môi thích hợp nhất cho hầu hết ancaloit bazơ (trừ ancaloit N bậc 4 và N-oxit có cách xử lí riêng).

Phương pháp 2: Chiết bằng dung dịch axit hay axit loãng trong ancol

Khác với phương pháp trên, phương pháp này sử dụng dung dịch axit vô cơ hay hữu cơ kết hợp với rượu để chiết ancaloit dưới dạng muối hoà tan.

➤ *Chiết bằng axit*

Dịch chiết trung hòa axit, cô cạn, hòa tan cạn trong axit, loại tạp, kiềm hoá rồi chiết lại bằng dung môi hữu cơ, bốc hơi dung môi, hòa cạn trong clorofom để chấm sắc ký. Cách chiết này loại được nhiều tạp và nếu dùng natri hydrocarbonat để kiềm hoá có thể chiết được ancaloit có chứa phenol.

➤ *Chiết bằng dung dịch axit loãng trong ancol*

Thu dịch chiết dược liệu trong dung môi ancol - axit. Bốc hơi dung môi, lãc dịch chiết đậm đặc với dung môi hữu cơ (ete, clorofom) để loại tạp. Kiềm hoá dung dịch nước axit rồi chiết bằng dung môi hữu cơ, bốc hơi dung môi thu được cặn ancaloit thô. Với cách chiết này, ancaloit không bị mất nhưng dịch chiết lẫn nhiều tạp.

1.2.7.3. Thuốc thử phát hiện ancaloit

- Các thuốc thử thông thường tạo kết tủa với ancaloit :
 - + Thuốc thử Dragendorff tạo kết tủa vàng da cam đến đỏ với ancaloit
 - + Thuốc thử Mayer tạo kết tủa màu trắng hoặc vàng cam với ancaloit
 - + Thuốc thử Wagner (Bouchardat) tạo kết tủa vàng nâu với ancaloit
- Các thuốc thử thông thường tạo màu với ancaloit :
 - + Dung dịch H_2SO_4 đậm đặc (D = 1,84 g/ml)
 - + Dung dịch HNO_3 đậm đặc (D = 1,4 g/ml) [15]

CHƯƠNG 2

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU

Chúng tôi chọn quả cau từ cây cau lùn được lấy ở thôn Quan Nam, xã Hòa Liên, huyện Hòa Vang, thành phố Đà Nẵng.

Cây cau được hái cao 1 m, đường kính thân cây khoảng 14 cm, lá có bẹ to dài khoảng 1,5 m, hình lông chim. Hoa cau có mùi thơm ngọt, nhỏ, màu trắng ngà, nở rộ vào tháng 7 hằng năm. Quả hạch hình trứng, to gần bằng quả trứng gà, lúc non xanh, vỏ bóng nhẵn, khi già quả có màu vàng.

2.2. HOÁ CHẤT VÀ THIẾT BỊ THÍ NGHIỆM

2.2.1. Hoá chất

Để thực hiện đề tài chúng tôi sử dụng một số hoá chất sau: CHCl_3 , dung dịch $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 96%, dung dịch NH_3 27%, axit H_2SO_4 98%, ete-dầu, dung dịch HCl 36,5%. Thuốc thử Dragendorff, Mayer, Wagner (Bouchardat)...

2.2.2. Thiết bị thí nghiệm

Bộ chiết soxhlet, bộ chưng cất, máy quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS Perkin Elmer, máy đo sắc kí lỏng kết hợp với khối phổ LC-MS, máy đo sắc kí khí ghép phổ GC-MS. Tủ sấy, lò nung, cân phân tích, cốc thủy tinh, bình tam giác, ống nghiệm, bếp điện, cốc sứ, các loại pipet, bình định mức, bình hút ẩm...

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Lấy mẫu và xử lý mẫu

Cây cau được chọn, bẻ lấy 2 buồng, 1 buồng trái chín vàng và 1 buồng trái còn xanh (vừa ăn). Buồng cau sau khi bẻ, hái lấy trái, chẻ đôi, lấy hạt, phơi khô tự nhiên khoảng 3 nắng gắt, sấy đến 100°C , nghiền thành bột, bảo quản trong bình hút ẩm để nghiên cứu.

2.3.2. Phương pháp xác định hàm lượng khô của hạt cau

Để xác định hàm lượng mẫu khô của hạt cau, sử dụng phương pháp trọng lượng.

2.3.3. Thu và định lượng ancaloit trong hạt cau

Ancaloit được chiết kiệt bằng phương pháp chiết nóng soxhlet trong dung môi CHCl_3 và ngâm kiệt trong ancol - axit (phần bã sau khi chiết bằng CHCl_3)

Định lượng ancaloit thô bằng phương pháp trọng lượng

2.3.4. Xác định một số chỉ số vật lí

2.3.4.1. Độ ẩm, hàm lượng hữu cơ

2.3.4.2. Xác định hàm lượng kim loại

Dùng phương pháp quang phổ hấp phụ nguyên tử để xác định hàm lượng các kim loại: Pb, Cu, Zn, Fe, Hg, Cd, Cr, As trong hạt cau.

2.3.5. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết và điều kiện chiết tối ưu

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết như: dung môi chiết, tạp chất, tỉ lệ giữa thể tích dung môi và khối lượng nguyên liệu chiết, thời gian, pH. Sử dụng phương pháp so màu và phương pháp trọng lượng để tối ưu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết.

2.3.5.1. Chọn dung môi

2.3.5.2. Ảnh hưởng của tạp chất

2.3.5.3. Tối ưu các điều kiện chiết

Sau khi chọn được dung môi thích hợp, nghiên cứu ảnh hưởng của tạp chất, tiến hành chiết tách alcaloit từ hạt cau trong CHCl_3 bằng phương pháp chiết nóng soxhlet. Khảo sát thời gian chiết, thể tích dung môi, pH chiết để thu được hàm lượng alcaloit là cao nhất.

Điều kiện chiết tối ưu là điều kiện mà ở đó lượng sản phẩm chiết là nhiều nhất và kết tủa vàng nâu thu được đậm nhất.

- Khảo sát hàm lượng alcaloit theo thời gian chiết nóng soxhlet
- Khảo sát lượng sản phẩm chiết theo tỉ lệ dung môi và nguyên liệu
- Khảo sát ảnh hưởng của pH đến hiệu suất chiết alcaloit

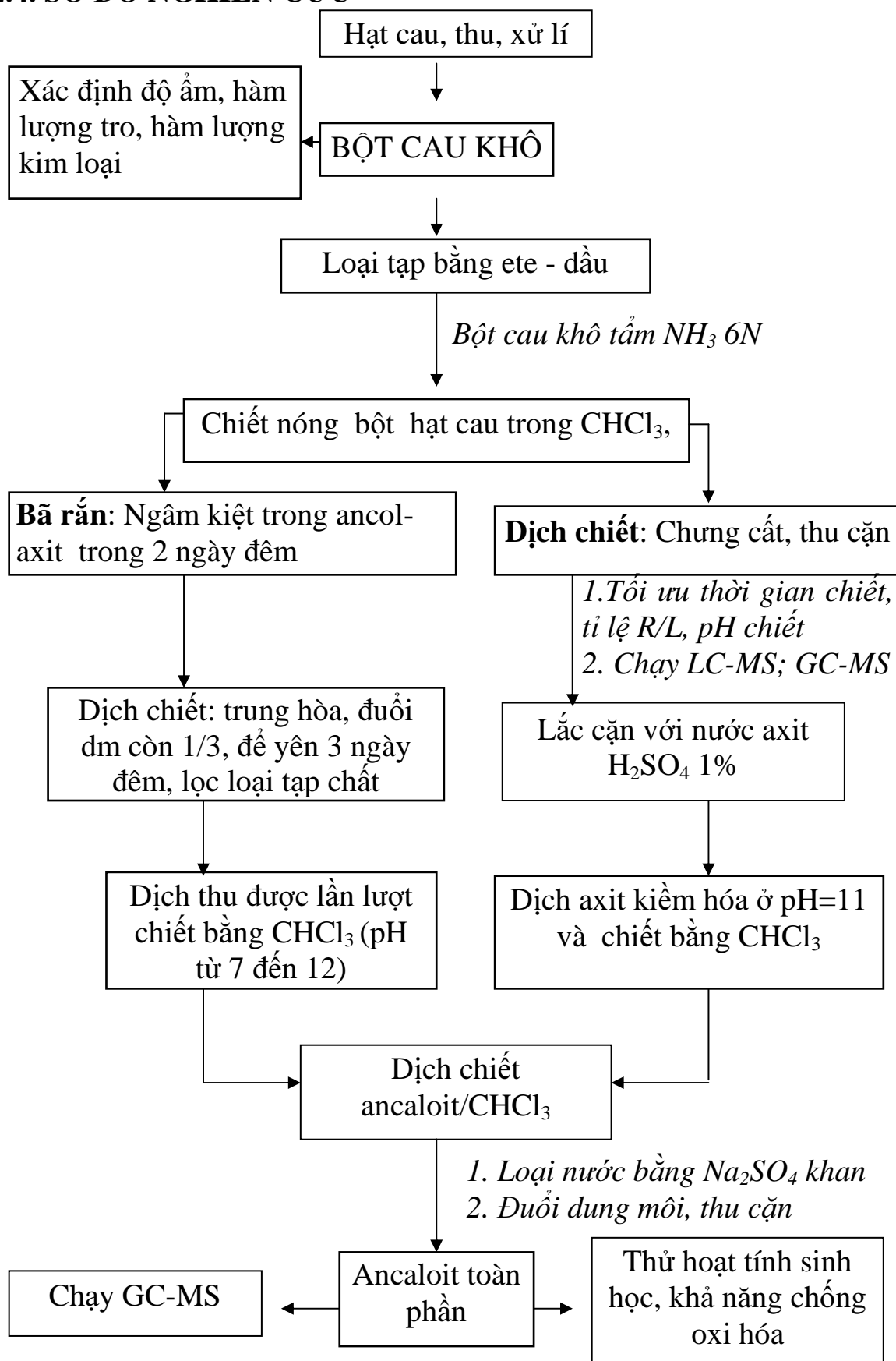
2.3.6. Các phương pháp quang phổ

Sử dụng phương pháp phân tích LC-MS và GC-MS để phân tách và xác định thành phần định tính, định lượng của dịch chiết hạt cau

2.3.7. Phương pháp thử hoạt tính sinh học và khả năng chống oxi hóa

Chúng tôi tiến hành thử hoạt tính sinh học và khả năng chống oxi hóa của alcaloit tại Viện Hóa học - Hà Nội.

2.4. SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. THU VÀ XỬ LÝ MẪU

Chúng tôi chọn cây cau có 2 buồng (1 buồng đã chín và 1 buồng còn xanh), lựa những trái to đều nhau, chẻ đôi, bóc lấy phần hạt ở trong, phơi khô tự nhiên, sấy, giã mịn thành bột để nghiên cứu.

3.2. XÁC ĐỊNH MỘT SỐ CHỈ SỐ VẬT LÝ

3.2.1 Độ ẩm: Kết quả khảo sát độ ẩm của hạt cau già và hạt cau xanh được trình bày qua bảng 3.1 và bảng 3.2

Bảng 3.1. Kết quả khảo sát độ ẩm trong hạt cau già

STT	$m_1(g)$	$m_2(g)$	$m_3(g)$	W (%)	$W_{tb} (%)$
1	30,015	5,005	32,063	59,080	57,067
2	32,356	5,020	34,416	58,964	
3	27,630	5,041	29,801	56,933	
4	29,974	5,089	32,201	56,238	
5	29,571	5,057	31,891	54,122	

Bảng 3.2. Kết quả khảo sát độ ẩm trong hạt cau xanh

↳ Kết quả: Độ ẩm hạt cau già là **57,067%**

❖ **Nhận xét:** Cau xanh và cau già đều có độ ẩm cao, trong đó độ ẩm cau xanh cao hơn nhiều so với cau già. Trong quá trình nghiên cứu, nếu không bảo quản cẩn thận, hạt cau dễ bị mốc ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Cần phơi (hoặc sấy) khô hạt cau và bảo quản trong bình hút ẩm.

3.2.2. Hàm lượng tro

Hàm lượng tro kết quả khảo sát hàm lượng tro của hạt cau già được trình bày qua bảng 3.3

Bảng 3.2. Kết quả khảo sát hàm lượng tro

STT	$m_1(g)$	$m_0(g)$	$m_2(g)$	Tro%	$tro_{TB} %$
1	30,015	5,005	30,157	2,84	2,38
2	32,356	5,020	32,483	2,53	
3	27,630	5,041	27,781	3,00	
4	29,974	5,089	30,018	2,65	
5	29,571	5,057	29,734	3,23	

➤ Vậy, hàm lượng tro trung bình của hạt cau khoảng **2,38%**.

Trong đó:

m_3 là khối lượng chén sứ và mẫu sau khi tro hóa (g)

m_2 là khối lượng chén sứ và mẫu cau sau khi xác định độ ẩm (g)

m là khối lượng hạt cau ban đầu (g)

❖ **Nhận xét:** Từ bảng 3.2 chúng tôi nhận thấy được rằng: ngoài nước thì trong hạt cau còn chứa chủ yếu là chất hữu cơ. Khi hạt càng già, hàm lượng nước trong hạt càng giảm và hàm lượng hữu cơ càng tăng lên.

3.3. XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG MỘT SỐ KIM LOẠI BẰNG MÁY QUANG PHỔ HẤP THỤ NGUYÊN TỬ AAS.

Mẫu cau già sau khi tro hoá được hoà tan bằng dung dịch HNO₃ loãng và định mức đến 50ml.

Lấy dung dịch đã định mức trên đem xác định hàm lượng một số kim loại tại trung tâm đo lường chất lượng kỹ thuật, số 2 – Ngô Quyền- Quận 3 - Đà Nẵng. Kết quả thu được trình bày ở bảng 3.4.

Bảng 3.3. Bảng hàm lượng một số kim loại trong hạt cau già

Kim loại	Hàm lượng (mg/kg)	TCVN (mg/kg)
As ²⁺	0,190	1
Pb ²⁺	0,719	2
Cu ²⁺	1,201	30
Zn ²⁺	2,150	40
Hg ²⁺	0,042	0,05
Cd ²⁺	0,040	1
Cr ³⁺	0,435	-

Căn cứ vào quyết định số 867/1998/ QĐ-BYT ngày 04 tháng 4 năm 1998 của Bộ y tế về việc ban hành danh mục “Tiêu chuẩn vệ sinh đối với lương thực thực phẩm”, đối chiếu với mục hàm lượng kim loại cho phép trong rau quả và bảng kết quả trên ta nhận thấy thành phần kim loại nặng trong hạt cau là hàm lượng cho phép sử dụng, an toàn, không ảnh hưởng đến sức khoẻ con người.

3.4. CHIẾT TÁCH ANCALOIT TRONG HẠT CAU

3.4.1. Lựa chọn thuốc thử

Bột cau già tẩm dung dịch NH₃ 6N, chiết nóng với clorofom, dịch chiết đuổi dung môi đến cạn

- Các thuốc thử tạo tủa với ancaloit: hòa cạn thu được vào axit H₂SO₄ 1%, lần lượt thử với các thuốc thử Dragendorff, Mayer, Wagner. Kết quả thu được như sau:

- + Thuốc thử Dragendorff: Tạo được kết tủa vàng cam rất rõ.
- + Thuốc thử Mayer: Tạo được kết tủa vàng cam
- + Thuốc thử Wagner : xuất hiện kết tủa vàng nâu rất rõ
- + Dung dịch axit picric: tạo được tinh thể hình kim không màu với dịch chiết rất rõ

- Các thuốc thử thông thường tạo màu với ancaloit:
 - + Dung dịch H_2SO_4 98%: tạo được chất lỏng màu đỏ máu
 - + Dung dịch HNO_3 đậm đặc ($D= 1,4 \text{ g/ml}$): Tạo được chất lỏng màu hồng và chuyển nhanh thành vàng
 - + Dung dịch AgNO_3 1% : tạo kết tủa nâu đến đen

Nhân xét: Nhìn chung các phản ứng của dịch chiết hạt cau với thuốc thử đều cho kết tủa hoặc hiện màu rõ nên có thể sử dụng để định tính ancaloit trong khi chiết hoặc hiện màu khi triển khai sắc ký lớp mỏng.

3.4.2. Lựa chọn dung môi chiết

- Tiến hành: Cân 4 mẫu hạt cau (10 gam/mẫu), tiến hành ngâm 4 mẫu trên lần lượt trong các dung môi có độ phân cực tăng dần: Hexan, clorofom, nước cất, dung dịch hỗn hợp $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 96⁰ và HCl 2% với tỉ lệ thể tích 4:1. Lắc, quan sát sự thay đổi màu sắc dịch chiết sau 5 ngày đêm, thu lấy dịch chiết, thử sự có mặt của tanin trong dịch chiết bằng dung dịch FeCl_3 ; axit hóa dịch chiết và thử với thuốc thử Wagner.

- Sau khi phân tích kết quả thực nghiệm chúng tôi chọn 2 dung môi chiết lấy ancaloit trong hạt cau là CHCl_3 và dung dịch hỗn hợp $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 96⁰ + HCl 2% (4:1).

+ CHCl_3 : Làm dung môi tốt. Do ancaloit kết hợp tanin và tồn tại dạng muối trong cau nên tầm kiềm để chuyển ancaloit về dạng bazơ tự do trước khi chiết nóng bằng CHCl_3 .

+ Dung dịch $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 96⁰ + HCl 2% (4:1) dùng làm dung môi tốt. Vì trong môi trường axit 2 ancaloit dạng este bị hủy ở nhiệt độ cao nên chiết bằng phương pháp ngấm kiệt là tốt nhất. Màu dịch chiết được có thể làm phẩm nhuộm.

3.4.3 Khảo sát ảnh hưởng của tạp chất

Chúng tôi tiến hành chiết lấy ancaloit trong 2 trường hợp: có loại tạp chất bằng ete-dầu và không loại tạp chất.

Kết quả: Khi kiềm hóa dịch chiết để tách lấy ancaloit thì mẫu chưa loại tạp cho kết tủa rất nhiều, kết tủa bám cạnh đen, vón cục. Mẫu đã loại tạp cho kết tủa ít hơn, dạng huyền phù

⇒ Hạt cau chứa nhiều chất béo, tinh dầu. Đây là những chất gây cản trở cho quá trình chiết, do đó cần loại chúng trước khi tiến hành chiết.

3.4.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết đến hiệu suất của quá trình chiết tách

Chúng tôi tiến hành chiết với các khoảng thời gian sau: 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 10 giờ, 12 giờ. Dịch chiết thu được, tiến hành đuổi dung môi đến còn 20 ml dịch chiết. Chia dịch chiết làm 2 phần, phần 1 thử bằng thuốc

thủ Wagner, phần 2 đuôi dung môi đến cạn, định lượng. Kết quả cảm quan cho thấy lượng kết tủa khi chiết từ 10 giờ trở đi là nhiều nhất. Kết quả định lượng được trình bày ở bảng 3.7

Bảng 3.4. Khối lượng sản phẩm chiết theo thời gian

Thời gian chiết (h)	m₁ (g)	m₂ (g)	Δm (g)
8	32,347	32,386	0,0390
10	30,253	30,307	0,0540
12	26,647	26,715	0,0681
14	33,397	33,465	0,0860
16	29,308	29,395	0,0870

Trong đó: m₁: khối lượng cốc ban đầu (g)

m₂: khối lượng cốc chứa cặn (g)

❖ **Nhận xét:** Với 20 gam bột hạt cau, chiết với 140 ml CHCl₃, từ 14 đến 16 giờ lượng cặn tăng chậm, không đáng kể nên thời gian chiết thích hợp là **14 giờ**.

3.4.5. Khảo sát ảnh hưởng của thể tích dung môi đến hiệu suất của quá trình chiết tách

Với 20 gam hạt cau/mẫu, chúng tôi tiến hành chiết với các thể tích dung môi CHCl₃ khác nhau: 100ml, 120 ml, 140 ml, 160 ml trong 10 giờ

Dịch chiết được xử lý như mục 3.4.4. Kết quả cảm quan cho thấy lượng kết tủa khi chiết với 140 ml CHCl₃ rõ và nhiều nhất. Kết quả định lượng được trình bày ở bảng 3.8

Bảng 3.5. Khối lượng sản phẩm chiết theo thể tích dung môi.

CHCl₃(ml)	m₁(g)	m₂(g)	Δm(g)
100	30,452	30,685	0,233
120	31,615	31,931	0,316
140	29,670	30,072	0,402
160	33,618	34,031	0,413

Trong đó: m₁ là khối lượng cốc ban đầu (g)

m₂ là khối lượng cốc chứa cặn (g)

Nhận xét: Với 20gam bột cau chiết với 140ml CHCl_3 trong 10 giờ sẽ cho lượng cặn là lớn nhất. Vì vậy trong quá trình nghiên cứu chúng tôi chọn tỉ lệ giữa thể tích dung môi (ml) và khối lượng bột cau là **140:20**.

3.4.6. Khảo sát ảnh hưởng của pH chiết đến hiệu suất tạo ancaloit

Lấy 5 mẫu hạt cau (20 gam/1 mẫu), loại tạp bằng ete-dầu, tẩm bằng 30 ml dung dịch NH_3 6N, để yên 30 phút rồi cho vào bình soxhlet. Tiến hành chiết nóng trong 140 ml CHCl_3 ở 65°C với thời gian 10 giờ. Dịch chiết thu được, tiến hành loại tạp bằng phương pháp axit - bazơ như sau: hòa cặn vào dung dịch H_2SO_4 1%. Lắc dịch chiết axit với dung dịch NH_3 10% ở các khoảng pH từ 7 ÷ 12 cho 5 mẫu (pH= 7, 8, 9, 10, 11, 12) đồng thời chiết lượng ancaloit thu được bằng dung môi CHCl_3 . Gộp dịch sản phẩm chiết, loại H_2O bằng Na_2SO_4 khan, đuổi dung môi còn 20 ml. Chia dịch chiết làm 2 phần, phần 1 thử bằng thuốc thử Wagner, phần 2 đuổi dung môi đến cặn, định lượng. Kết quả cảm quan cho thấy lượng kết tủa khi chiết ở pH = 11 là rõ và nhiều nhất. Kết quả định lượng ta được trình bày ở bảng 3.9

Bảng 3.9. Khối lượng sản phẩm tối ưu pH chiết.

pH	m_1 (g)	m_2 (g)	Δm (g)
7	31.328	31.332	0.004
8	32.815	32.843	0.028
9	33.173	33.210	0.037
10	30.765	30.804	0.039
11	28.793	28.835	0.042
12	29.480	29.521	0.041

Trong đó: m_1 là khối lượng cốc ban đầu (gam)

m_2 là khối lượng cốc chứa cặn (gam)

⇒ Ancaloit trong hạt cau có tính bazơ yếu. pH thích hợp để chiết được lượng ancaloit lớn nhất là 11

3.5. XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA DỊCH CHIẾT TRONG DUNG MÔI CHCl_3

3.5.1. Xác định thành phần hóa học của dịch chiết hạt cau già trong CHCl_3

Mẫu phân tích được chiết từ 20 gam bột hạt cau già, tiến hành như sơ đồ nghiên cứu 2.4

Để xác định thành phần hóa học của ancaloit thô, chúng tôi tiến hành phân tích bằng LC-MS, GC-MS.

3.5.1.1 Kết quả đo LC-MS dịch chiết ancaloit thô

- Kết quả phân tích LC cho thấy dịch chiết hạt cau già trong dung môi CHCl_3 có 19 cấu tử. Thành phần chính của sản phẩm chiết là arecolin chiếm 33,67%.

- Kết quả phân tích phổ khối MS cho thấy: Ở thời gian lưu 2,2 phút, với ion mảnh có khối lượng lớn nhất $M = 155,9$, dựa vào ion đồng vị cacbon (suy ra số nguyên tử C trong phân tử) và quy luật phân mảnh ta xác định được thành phần chính trong dịch chiết là Arecolin ($\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_2$) chiếm 38,17% khối lượng sản phẩm chiết. Ngoài arecolin, dịch chiết còn có một số ancaloit khác (bảng 3.12)

Bảng 3.12. Định tính và định lượng 1 số ancaloit trong dịch chiết ban đầu

Thời gian lưu		M thực nghiệm	M chuẩn	%m	Chất phân tích.	
Lần 1	2,2 phút	155,095	155,9	38,17	Arecolin	$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_2$
		141,079	141,9		Guvacolin	$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{NO}_2$
Lần 2	4,1 phút	169,110	167,8	2,012		$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_2$
		127,063	126,8		Guvacin	$\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_2$
		155,095	155,9		Arecolin	$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_2$
Lần 3	24,6 phút	141,079	140,8	22,75	Guvacolin	$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{NO}_2$
		127,063	126,8		Guvacin	$\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_2$

3.5.1.2. Kết quả phân tích GC-MS dịch chiết ancaloit thô trong CHCl_3

- Kết quả phân tích GC cho thấy dịch chiết hạt cau già trong dung môi CHCl_3 có 20 cấu tử. Thành phần chính của sản phẩm chiết là arecolin chiếm 33,67% (bảng 3.14)

Bảng 3.14. Thành phần hóa học của dịch chiết hạt cau

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH
MSM : 11043021-DUNG DỊCH TRÍCH LY HẠT CAU- ALCALOID

NO	SCAN	NAME	AREA	%
1	543	Nicotinic acid,1,2,5,6-tetrahydro-1-methyl,methyl ester	82760248	2,68
2	819	Butylated hydroxytoluene	9365573	0,30
3	981	Decane,5,6-bis(2,2-dimethylpropylidene)-	59656040	1,93
4	1078	Myristic acid	28441862	0,92
5	1240	Hexadecanoic acid	459835104	14,91
6	1374	9,12-Octadecadienoic acid	729636544	23,66
7	1389	Stearic acid	765848960	24,83
8	1661	Acetamide,n-methyl-n-4-4methoxy-1-hexahydropyridyl-	153830016	4,99
9	1703	Xem phổ	53419236	1,73
10	1718	Xem phổ	139575328	4,53
11	1813	Squalene	121672696	3,94
12	1910	Xem phổ	246351760	7,99
13	1974	Heptadecan,9-(2-cyclohexylethyl)-	122827400	3,98
14	2031	17-Pentatriacontene	111039696	3,60
			3084260463	100,00

- Số lượng các cấu tử qua 2 cách phân tích LC-MS và GC-MS gần bằng nhau (14 ÷ 20 cấu tử) và hàm lượng cấu tử chính arecolin là 38,17% (gần với hàm lượng arecolin phân tích bằng phương pháp LC-MS)

3.5.1.3. Kết quả chiết ancaloit toàn phần và đo GC-MS

a. Chiết tách ancaloit bằng dung môi CHCl₃

- Chuẩn bị mẫu chiết

+ Loại tạp sơ bộ: Lấy 20 gam hạt cau già, cho vào gói giấy và chiết nóng soxhlet với 100 ml ete- dầu hỏa ở 65⁰C trong 2 giờ

+ Chuyển ancaloit dạng muối thành dạng bazơ tự do

Cau sau khi đã loại tạp bằng ete dầu hỏa để khô tự nhiên và đem tẩm bằng 30 ml dung dịch NH₃ 6N để yên 2 giờ

- Chiết nóng soxhlet với dung môi CHCl₃ trong 10 giờ ở 65⁰C.

Dịch chiết thu được có màu vàng nhạt, bã rắn sẫm màu hơn so với nguyên liệu đầu

- Loại tạp ancaloit thô thu được từ dịch chiết

+ *Đuổi dung môi*: Tiến hành đuổi CHCl_3 trong bộ chưng cất áp suất thường ở 65°C ; loại khoảng 2/3 thể tích dịch chiết.

+ *Lắc dịch chiết với axit H_2SO_4 1%*

Lắc dịch chiết với axit H_2SO_4 1%

+ *Kết tủa dịch chiết bằng dung dịch NH_3 10% và chiết ancaloit vào CHCl_3*

Cho CHCl_3 vào bình gạn, cho dịch chiết axit vào, thêm từ từ dung dịch NH_3 10% vào dịch chiết axit, nâng dần pH môi trường đến pH = 11; tiến hành chiết 5 lần, mỗi lần 10 ml CHCl_3 . Do lượng ancaloit quá ít nên chúng tôi chỉ thu kết tủa toàn phần.

- Chiết kiệt ancaloit ở phần bã rắn

+ *Ngâm kiệt bã rắn với dung dịch rượu axit*

Mục đích: Chiết kiệt ancaloit còn lại trong xác cau sau khi chiết với CHCl_3 .

Tiến hành: Chia xác cau làm 4 phần bằng nhau, cho vào 4 bình. Ngâm kiệt với hỗn hợp dung môi $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 96⁰ + HCl 2% theo tỉ lệ thể tích 4:1 theo phương pháp chiết ngược dòng. Dịch chiết thu được có màu đỏ nâu

+ *Trung hòa dịch chiết và loại tạp*

Mục đích: Tuy đã được loại tạp sơ bộ ban đầu bằng ete- dầu nhưng khi ngâm kiệt với $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 96⁰ + HCl 2% (4:1) thì chiết thêm nhiều tạp như béo, màu, tannin.... Khi kết tủa bằng dd NH_3 10% vẫn có kết tủa của tạp chất có thể ảnh hưởng lớn đến quá trình chiết ancaloit sau này.

Tiến hành: cho từ từ dung dịch NH_3 10% vào dịch chiết đến pH = 7 để yên 3 ngày đêm. Lọc bỏ chất rắn, thu phần dịch lỏng.

Kết quả cho thấy lượng cặn tăng dần theo thời gian; dịch chiết vẫn nguyên màu nhưng ít sánh hơn so với dịch chiết ban đầu

+ *Chiết kết tủa trong CHCl_3*

Tiến hành: Cho CHCl_3 vào bình gạn, cho dịch chiết vào, thêm từ từ dung dịch NH_3 10% và nâng dần pH môi trường (7÷12) để thu ancaloit toàn phần. Tiến hành chiết 4 lần, mỗi lần 10 ml CHCl_3 . Gộp dịch chiết cả 2 phần lại ta được 100ml dịch chiết ancaloit trong CHCl_3 .

- Loại H₂O, định lượng, hòa cạn vào CHCl₃ và định mức trong trong 10 ml

+ Loại H₂O bằng Na₂SO₄

+ Cô cạn dịch chiết, cân và định mức cạn trong 10ml CHCl₃ và đo GC-MS.


b. Đo phổ GC-MS; định tính, bán định lượng ancaloit thu được

- Dựa vào kết quả phân tích sắc kí đồ GC và phổ khối MS chúng tôi nhận thấy, sản phẩm chiết có 5 cấu tử; trong đó cấu tử chính có hàm lượng 95,62%.

Bảng 3.15. Thành phần hóa học của dịch chiết hạt cau già sau khi loại tạp chất

KET QUẢ MAU 08084115

Ancaloit - Hat Cau



No Scan	Name	Area	%
1 358	3-Buten-2-one 3,4-Bis(Dimethylamino)-	16120820	1.02
2 426	Ethyl-1-methylinpecotate	13386000	0.85
3 443	Nicotinic acid, 1,2,5,6-tetrahydro-1-methyl-, methyl ester	1512884352	95.62
4 1510	Bis(2-ethylhexyl)phthalate	13184882	0.83
5 1666	Squalene	26541660	1.68
		1582117714	100

Theo bảng 3.15, arecolin là sản phẩm chính chiếm 95,62% về khối lượng, các chất còn lại chiếm tỉ lệ thấp, không đáng kể.

Như vậy, loại tạp bằng phương pháp axit – bazơ thu được arecolin khá tinh khiết nên có thể dùng phương pháp này để tách arecolin ra khỏi hỗn hợp các hợp chất tự nhiên

3.6. THỬ HOẠT TÍNH SINH HỌC, HOẠT TÍNH CHỐNG OXI HÓA CỦA ANCALOIT THU ĐƯỢC

Ancaloit trong hạt cau có khả năng kìm hãm hoạt động của enzymn peoxydaza; khả năng này phụ thuộc vào nồng độ ancaloit trong hạt cau

Bảng 3.19. Khả năng kìm hãm hoạt động enzym peoxydaza

Nồng độ chất thử ($\mu\text{g/ml}$)	% và khả năng kìm hãm hoạt động enzym peoxydaza
256	$41 \pm 2,5$
64	$28 \pm 1,2$
16	$19 \pm 0,9$
4	$2 \pm 0,5$
1	0

Nhận xét: Ancaloit trong hạt cau có hoạt tính kháng các chủng vi sinh vật kiểm định: E.coli, P.aeruginasa, S.aureus, B.subtilis ở nồng độ ≥ 256 $\mu\text{g/m}$

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

- * Qua quá trình nghiên cứu chúng tôi đã thu được một số kết quả sau:
1. Kết quả xác định độ ẩm, hàm lượng hữu cơ, hàm lượng tro, hàm lượng kim loại trong hạt cau cho thấy:
 - a. Độ ẩm trung bình của cau già chiếm **57,067%**.
 - b. Hàm lượng tro trung bình của hạt cau già là **2,38%**.
 - c. Hàm lượng kim loại nặng As, Zn, Pb, Cu, Hg, Cd, Cr trong hạt cau nằm trong giới hạn cho phép sử dụng của Bộ y tế.
 2. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết
 - a. Qua nghiên cứu cho thấy, để bớt khó khăn trong quá trình chiết tách cần thiết phải loại tạp bằng ete – dầu trước khi chiết. Phần bã nên loại tạp bằng cách để yên trong khoảng 3 ngày đêm.
 - b. Để chiết ancaloit trong hạt cau nên dùng dung môi CHCl_3 và phần xác sẽ ngâm kiệt với hỗn hợp dung môi $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 96% + HCl 2% theo tỉ lệ thể tích 4:1.
 - c. Với 20 g cau già, điều kiện chiết tối ưu (lượng ancaloit thu được nhiều nhất) là:
 - Thể tích dung môi: **140 ml CHCl_3**
 - Thời gian : khoảng **12 giờ**
 - pH chiết : **11**
 3. Kết quả phân tích thành phần hóa học của dịch chiết bằng các phương pháp phổ LC-MS và GC-MS cho thấy:
 - Dịch chiết hạt cau già trong CHCl_3 thu được có 14 ÷ 20 cấu tử trong đó có các ancaloit: arecolin, guvacolin, guvacin,...Thành phần chính là arecolin ($\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_2$) chiếm khoảng 33,67 ÷ 38,17%
⇒ Dùng làm dược liệu như điều chế thuốc trị giun, sán nên sử dụng cau già vì ở đó hàm lượng arecolin cao
 4. So sánh 2 lần chạy phổ dịch chiết trước và sau khi tinh khiết, chúng tôi nhận thấy: dịch chiết sau khi qua loại tạp bằng phương pháp axit- bazo tinh khiết hơn dịch chiết nguyên ban đầu (arecolin chiếm 95,62%).
 5. Ancaloit thu được có hoạt tính kháng các chủng vi sinh vật kiểm định: E.coli, P.aeruginasa, S.aureus, B.subtilis.
Ancaloit thu được có hoạt tính kháng oxi hóa. Nó có khả năng kìm hãm hoạt động của enzym peoxydaza.

*** Kiến nghị:**

Từ những nghiên cứu trên đây, chúng tôi kiến nghị những nghiên cứu tiếp theo:

1. Nghiên cứu phân tách arecolin, guvaxin bằng sắc kí cột.
Tuy rằng loại tạp theo phương pháp axit – bazơ như chúng tôi đã nghiên cứu thu được arecolin khá tinh khiết nhưng trong quá trình phản ứng sẽ không tránh khỏi những sản phẩm phụ không mong muốn.
2. Nghiên cứu các phản ứng hoá học và khả năng chống oxy hoá của arecolin, guvaxin cũng như những sản phẩm được điều chế từ chúng để có thể mở rộng ứng dụng của nó trong sản xuất dược liệu.
3. Nghiên cứu hợp chất màu trong hạt cau lùn và ứng dụng của nó.