BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

NGUYỄN THỊ THANH HUYỀN

NGHIÊN CỨU, XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN HÓA HỌC TRONG VỎ CÂY HOA SỮA

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 khoa 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. Lý do chọn đề tài

Việt Nam ta là một nước nhiệt đới, nóng, ẩm và mưa nhiều, có nguồn dược liệu rất phong phú, đa dạng và một nền y học dân tộc phát triển lâu đời. Từ xa xưa, ông cha ta đã biết cách sử dụng nhiều loại thảo dược trong việc dưỡng thương, trị bệnh và bồi bổ cơ thể. Như vậy, những cây thuốc dân gian đóng vai trò hết sức quan trọng trong đời sống hằng ngày của con người.

Ngày nay, khi thuốc biệt dược của nền y học hiên đại được sử dụng rộng rãi, nhiều loài cây cỏ trong tự nhiên vẫn được sử dụng trong dân gian để chữa bệnh rất có hiệu quả. Rất nhiều loại bệnh tật đã được chữa khỏi nhờ thảo dược, rất nhiều thực vật được dùng để chế biến thành thực phẩm chức năng quý giá. Trong thời gian qua, những hợp chất tự nhiên được phân lập từ cây cỏ đã được ứng dụng rộng rãi trong rất nhiều ngành công nghiệp, nông nghiệp, chúng được dùng để sản xuất thuốc chữa bệnh, thuốc bảo vệ thực vật, làm nguyên liệu cho ngành công nghiệp thực phẩm và mỹ phẩm v.v... Mặc dù công nghệ tổng hợp hoá dược ngày nay đã phát triển mạnh mẽ, tạo ra các biệt dược khác nhau sử dụng trong công tác phòng, chữa bệnh, song nhu cầu sử dụng cây cỏ xung quanh để làm thuốc cũng ngày càng tăng lên, vì khoa học hiên đại đã chứng minh được trong chúng có chứa những biệt dược rất khó tổng hợp, và hầu như rất ít khi có tác dụng phụ. Có nhiều bộ môn khoa học nghiên cứu về cây thuốc ra đời. Việc nghiên cứu cây thuốc đã giúp cho chúng ta hiểu rõ về thành phần và cấu trúc hóa học, hoạt tính sinh học, tác dụng dược lí của cây thuốc. Trên cơ sở các nghiên cứu đó

có thể tạo ra chất mới có hoạt tính sinh học cao như mong muốn để làm thuốc chữa bệnh.

Hoa sữa, hay còn gọi là mò cua, mù cua (danh pháp khoa học: *Alstonia scholaris* L. R. Br.; đồng nghĩa: *Echites scholaris* L. Mant., *Pala scholaris* L. Roberty) là một loài thực vật nhiệt đới thuộc chi Hoa sữa, họ La bố ma (*Apocynaceae*).Vỏ cây hoa sữa được nhân dân một số nước Đông Nam Á sử dụng làm thuốc. Thường vỏ cây sữa được dùng làm thuốc bổ, chữa sốt, điều kinh và chữa lỵ hoặc tiêu chảy.

Với mục đích nghiên cứu và tìm hiểu thành phần hóa học, các hợp chất có hoạt tính sinh học của cây hoa sữa, góp phần làm tăng thêm sự hiểu biết về thành phần hoá học của nguồn thực vật làm thuốc phong phú và quý giá của Việt Nam. Chúng tôi chọn cây hoa sữa làm đối tượng nghiên cứu cho công trình này. Tên đề tài là***: "Nghiên cứu, xác định thành phần hóa học trong vỏ cây hoa sữa".***

2. Mục đích nghiên cứu

- Xác định thành phần hoá học các hợp chất trong vỏ cây hoa sữa.

- Xây dựng qui trình chiết tách indol ankaloit trong vỏ cây hoa sữa.

- Xác định cấu trúc các hợp chất alkaloid có trong vỏ cây hoa sữa

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Vỏ cây hoa sữa, được lựa chọn một cách ngẫu nhiên trên địa bàn Đà Nẵng

4. Các phương pháp nghiên cứu

+ Nghiên cứu lý thuyết:

***+ Các phương pháp nghiên cứu thực nghiệm*:**

- Phương pháp chọn 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 axit béo trong dịch chiết từ vỏ cây hoa sữa trong dung môi chiết bằng phương pháp sắc kí khí ghép khối phổ GC-MS
- Dùng phương pháp sắc ký lỏng cao áp - phổ khối liên hợp (LC-MS), với sự hỗ trợ của phần mềm ChemSketch để xác định thành phần, công thức cấu tạo các hợp chất alkaloid có trong dịch chiết.

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

- Ý nghĩa thực tiễn: Giải thích một cách khoa học các kinh nghiệm dân gian, thuận tiện cho việc ứng dụng cây thuốc và chữa bệnh

- Ý nghĩa khoa học: Cung cấp thêm thông tin về cây hoa sữa như một số chỉ tiêu hóa lý, khảo sát thành phần hóa học và cấu tạo của một số hợp chất chính có trong cây.

6. Bố cục luận văn

Ngoài phần mở đầu kết luận, tài liệu tham khảo và phụ lục trong luận văn chia làm 3 chương như sau :

Chương 1- Tổng quan

Chương 2- Những nghiên cứu thực nghiệm

Chương 3- Kết quả và bàn luận.

CHƯƠNG 1 - TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về cây hoa sữa

1.1.1. Sơ lược về nguồn gốc của cây hoa sữa trong giới thực vật

1.1.2. Cây hoa sữa

1.2. Một số nghiên cứu về thành phần hoá học của cây yên hoa sữa

Những nghiên cứu cho thấy cây hoa sữa chứa nhiều alkaloid, Iridoids, tanin (thuộc nhóm tanin pyrogalic), flavonoid, coumarin, ankaloit (có nhiều ở rễ), antraquinon, glucoxit, saponin, axit béo, nhựa cây

1.2.1. Thành phần hóa học của cây hoa sữa

Từ các bộ phận của cây hoa sữa Alstonia scholaris, các nhà khoa học ở nhiều nước khác nhau trên thế giới đã phân lập các chất alkaloid như sau: picirinin, vallesamin và scholaricin, 19-E-picrinine (1), 19-E-akuammidine (2), 19-E-vallesamine (3), 19-S-scholaricine, akuammiginone (1), và glycosidici idole alkaloid, echitamidine-N-oxide19-O-β-D-glucopyranoside (2), cùng với 5 alkaloid đã biết, echitaminicacid (3), echitamidine N-oxide (4), N^b-demethylal-stogustine N-oxide (5), akuammicine N-oxide(6), và N^b-demethylal-stogustine, Alstonoside, a secoiridoid glucoside, isoboonein (5), alyxialactone (6), and loganin

1.2.2. Thành phần hóa học của vỏ cây hoa sữa

Thành phần hóa học trong vỏ cây hoa sữa gồm: các chất alkaloid, alkaloid toàn phần trong vỏ là 0,16-0,27%. Các chất alkaloid chính là echitenine, ditamine, echitamine, echitamidine và một số ít các alkaloid khác như alstonidine, alstonine, ellipatamine,

alstovenine, echicaoutchin, echicerin, echiretin, O-methyl-macralstonine, macralstonine *O*-acetylmacralstonine, villalstonine, macrocarpamine, corialstonine and corialstonidine.

Ngoài ra còn có một số chất khác như steroids, triterpenoid: lupeol linoleate, lupeol palmitate and alpha-amyrin linoleate, một ít flavonoids và các acid phenolic, các axit béo khác.

1.3. Giá trị sử dụng của cây hoa sữa

1.4. Tình hình nghiên cứu

1.5. Hợp chất alkaloid

1.5.1. Khái niệm

1.5.2. Danh pháp

1.5.3. Phân bố alkaloid

1.5.4. Sự phân bố alkaloid trong tổ chức cây

1.5.5. Sinh tổng hợp alkaloid

1.5.6. Cấu trúc và phân loại alkaloid

1.5.7. Một số alkaloid trong vỏ cây hoa sữa

1.5.8. Tính chất chung của alkaloid

1.5.9. Chiết tách alkaloid

1.5.10. Thuốc thử phát hiện alkaloid

1.6. Flavonoid và một số chất khác

Có 8 loại flavonoid trong cây hoa sữa gồm: kaempferol, quercetin, isorhamnetin, kaempferol-3-0-beta-D-galactopyranoside, quercetin-3-0-beta-D-galactopyranoside, isorhamnetin-3-0-beta-D-galactopy-ranoside,kaempferol-3-0-beta-D-xylopyranosyl-(2-1)-0-beta-D-galac-topyranoside, quercetin-3-0-beta -D-xylopyranosyl -(2-1)-0-beta-D-galac-topyranoside.

Ngoài ra trong vỏ cây hóa sữa còn có một số axit béo như: octanoic acid, decanoic acid, dodecanoic acid, tetradecanoic acid, hexanethioic acid, adipic acid, phthalic acid, palmitic acid, canxi oxalat, axít crystallizable, và một vài loại chất béo nhựa gọi là: Echicaoutchin ($C_{25}H_{40}O_2$), echicerin ($C_{30}H_{48}O_2$), echitin ($C_{32}H_{52}O_2$), echitein ($C_{42}H_{70}O_2$), echiretin ($C_{35}H_{56}O_2$)..

CHƯƠNG 2 – NHỮNG NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu, dụng cụ, hoá chất

2.1.1. Nguyên liệu chính

Vỏ thân cây hoa sữa (cây mù cua, mò cua) được thu ở địa bàn thành phố Đà Nẵng.

Họ : họ La bố ma (*Apocynaceae*).

2.1.2. Thu mẫu cây và phương pháp xử lí

Vỏ thân cây hoa sữa được thu vào tháng 10-11 năm 2010 tại đường 2-9, thành phố Đà Nẵng.

Mẫu vỏ cây tươi đem phơi khô và bảo quản trong 1 ngày, sau đó sấy ở nhiệt độ 50-60^{0}C tới khi độ ẩm dưới 10%. Mẫu cây được say nhuyễn thành bột mịn

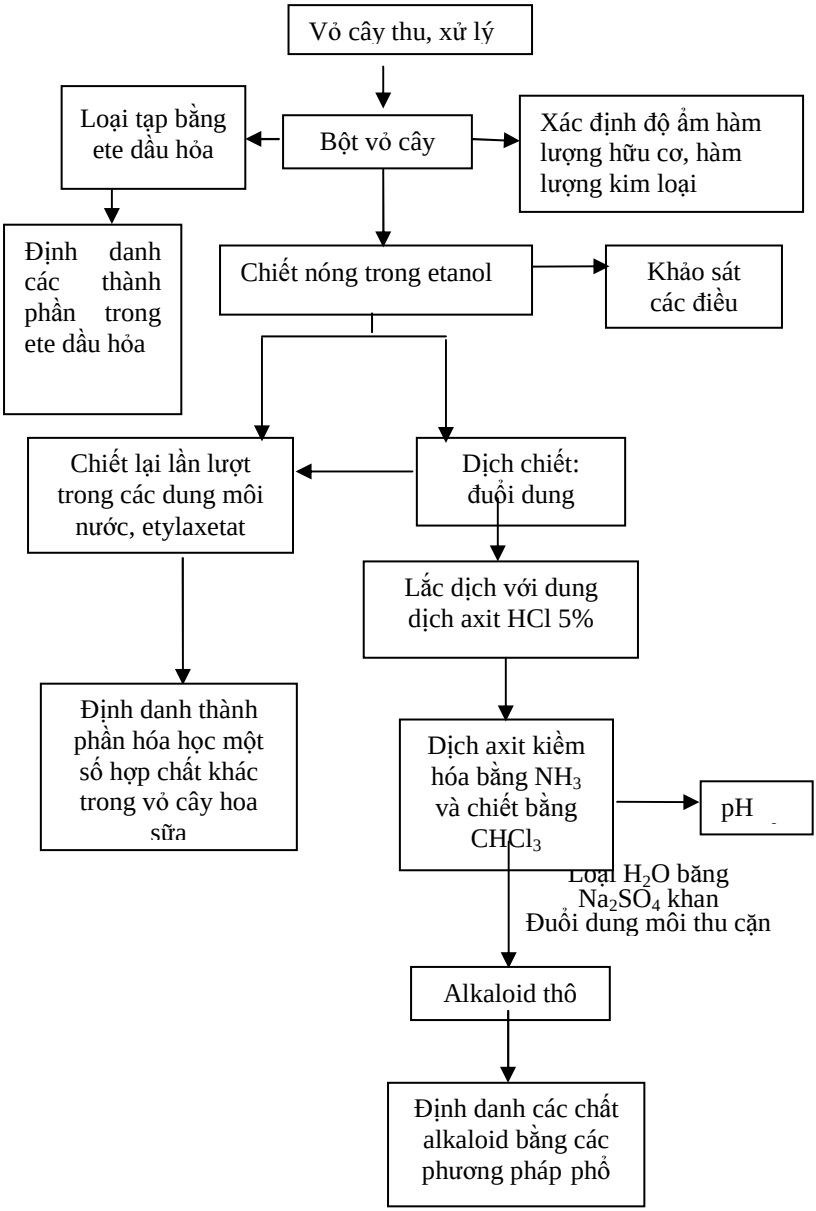
2.1.3. Thiết bị - dụng cụ và hóa chất

2.1.3.1 Thiết bị - dụng cụ

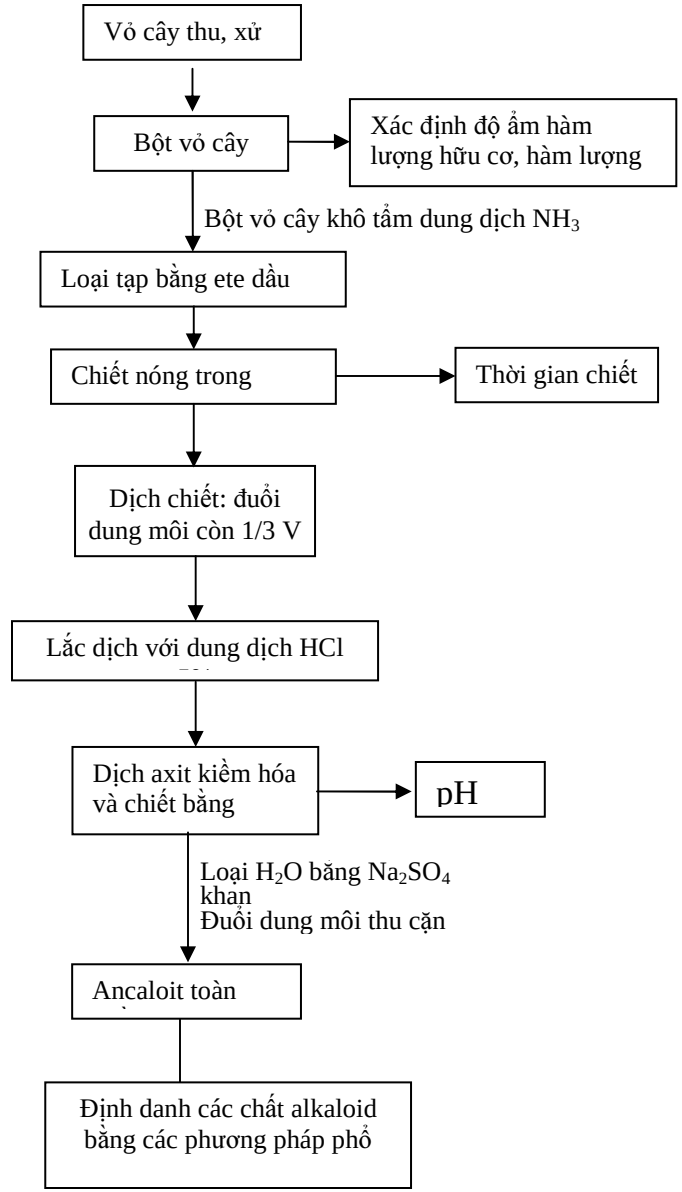
2.1.3.2. Hóa chất

2.2. Sơ đồ nghiên cứu

Chiết alkaloid dươi dạng muối



Chiết alkaloid dươi dạng bazơ



2.3. Các phương pháp xác định chỉ tiêu hóa lí

2.3.1. Xác định độ ẩm của vỏ cây khô

2.3.2. Xác định hàm lượng tro bằng phương pháp tro hóa mẫu

2.3.3. Xác định hàm lượng một số kim loại trong vỏ cây hoa sữa bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử

2.4. Xác định thành phần, hàm lượng và CTCT Xác định thành phần, hàm lượng và công thức cấu tạo một số axit béo có trong vỏ cây hoa sữa bằng phương pháp GC-MS

2.5. Phương pháp chiết và khảo sát các điều kiện chiết alkaloid từ vỏ cây hoa sữa

2.5.1. Phương pháp chiết

2.5.2. Khảo sát điều kiện chiết

2.6. Khảo sát định tính các dịch chiết

2.7. Chưng cất dung môi bằng phương pháp cất quay chân không

2.8. Xác định thành phần dịch chiết từ vỏ cây hoa sữa bằng phương pháp LC-MS và kết hợp GC-MS

CHƯƠNG 3 – KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả xác định một số chỉ tiêu hóa lí của vỏ cây hoa sữa

3.1.1. Độ ẩm

Độ ẩm trung bình của vỏ cây hoa sữa khô sau khi đã sấy là 9,979 %. Giá trị này có thể khác nhau khi khảo sát các mẫu vỏ cây lấy vào các thời điểm khác nhau. Do nguyên liệu nghiên cứu là các mẫu vỏ cây lấy một cách ngẫu nhiên (ở các cây khác nhau trên những phần thân cây khác nhau) vào các thời điểm khác nhau. Vì vậy độ ẩm của mẫu chỉ có thể tính tương đối theo khối lượng mẫu vỏ cây đã xác định.

3.1.2. Hàm lượng tro

Vậy hàm lượng tro trung bình là: 13,685%. Trong thành phần của tro vô cơ có thể có mặt của các muối của một số kim loại như K, Na, Ca, Fe, Cu, Pb, Zn… Sự có mặt của các kim loại này có thể ảnh hưởng đến tính chất của các dịch chiết từ vỏ cây hoa sữa với các phương pháp chiết khác nhau.

3.1.3. Hàm lượng một số kim loại

Bảng 3.3. Bảng hàm lượng một số kim loại trong vỏ cây hoa sữa

Kim loại	**Zn^{2+}**	**Cu^{2+}**	**Pb^{2+}**	**As^{2+}**
Hàm lượng (mg/l)	0,3721	0,1052	0,1900	0,1364
TCVN (mg/l)	3,102	3,102	3,102	3,313

Qua bảng 3.3 cho thấy trong cây hoa sữa có một số kim loại nặng như Zn^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, As^{2+} nhưng hàm lượng tương đối nhỏ.

Căn cứ vào tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN) cho vệ sinh thực phẩm (theo quyết định của bộ y tế số 505/BYT-QĐ ngày 13 tháng 4 năm 1992) về hàm lượng kim loại nặng tối đa cho phép trong rau quả sấy khô là Pb: 3,102 mg/kg, Zn: 3,102mg/kg, Cu: 3,102mg /kg, As: 3,313mg/kg thì hàm lượng kim loại nặng có trong vỏ cây hoa sữa ít hơn nhiều so với hàm lượng tối đa cho phép.

3.2. Xác định thành phần, hàm lượng và công thức cấu tạo một số axit béo trong vỏ cây hoa sữa

Bột vỏ cây hoa sữa loại tạp bằng ete dầu hỏa. Dịch chiết trong ete dầu hỏa đem xác định thành phần và hàm lượng chất béo trong vỏ cây hoa sữa

Từ kết quả của bảng 3.4 cho thấy trong vỏ cây hoa sữa chứa nhiều thành phần của axit béo. Vì vậy, trong vỏ cây hoa sữa có nhiều

axit béo sẽ cản trở đến việc chiết tách alkaloid nên việc loại tạp trước khi tiến hành chiết trong dung môi là việc làm cần thiết.

Trong các axit béo đó có một số axit béo có hàm lượng lớn như axit tetradecanoic acid (30,92%), hexadecanoic acid (12,44%), octadecenoic acid (918,03%), octadecadienoic acid (23,51%).

Bảng 3.4. Kết quả thành phần và hàm lượng một số axit béo trong vỏ cây hoa sữa

Tên mẫu: Dịch chiết từ vỏ cây hoa sữa

Tình trạng mẫu: Dung dịch lỏng màu vàng xanh

TT	CHỈ TIÊU	ĐƠN VỊ	PHƯƠNG PHÁP THỬ	KẾT QUẢ
01	Thành phần acid béo			
	Octanoic acid, methyl ester (C8:0)	%	AOAC 996.06 for Food AOAC 969.33 for Oil	0,12
	Decanoic acid, methyl ester (C10:0)	%	AOAC 996.06 for Food AOAC 969.33 for Oil	0,13
	Dodecanoic acid, methyl ester (C12:0)	%	AOAC 996.06 for Food AOAC 969.33 for Oil	11,53
	Tetradecanoic acid, methyl ester (C14:0)	%	AOAC 996.06 for Food AOAC 969.33 for Oil	30,92
	Hexadecanoic acid, methyl ester (C16:0)	%	AOAC 996.06 for Food AOAC 969.33 for Oil	12,44
	Hexadecenoic acid, methyl ester (C16:1)	%	AOAC 996.06 for Food AOAC 969.33 for Oil	0,39
	Octadecanoic acid, methyl ester (C18:0)	%	AOAC 996.06 for Food AOAC 969.33 for Oil	1,89
	Octadecenoic acid, methyl ester (C18:1)	%	AOAC 996.06 for Food AOAC 969.33 for Oil	18,03
	Octadecadienoic acid, methyl ester (C18:2)	%	AOAC 996.06 for Food AOAC 969.33 for Oil	23,51
	Octadecatrienoic acid , methyl ester (C18:3)	%	AOAC 996.06 for Food AOAC 969.33 for Oil	1,07

Ghi chú: *Kết quả chỉ có giá trị trên mẫu thử. Ký hiệu mẫu theo khách hàng gửi.*
Thời gian lưu mẫu: 5 ngày kể từ ngày trả kết quả.

Phụ trách chất lượng

TỔNG GIÁM ĐỐC

Đặc biệt là axit Octadecadienoic acid (Linoleic acid) là một tiền chất tổng hợp prostaglandin động vật. Việc thiếu acid linolenic, acid linoleic và axít béo khác, các loài động vật sẽ hoại da và tổn thương thận, vô sinh. Linoleic acid có thể kết hợp với ester cholesterol, có thể biến đổi, suy thoái cholesterol của acid và sau đó bài tiết ra cũng

giảm vai trò của chất béo trung tính. Trong y học để phòng ngừa và điều trị của thuốc xơ vữa động mạch có sử dụng nguyên liệu axit béo này. Trong công nghiệp, linoleic acid được sử dụng trong sơn, mực và hệ thống sản xuất từ sợi tổng hợp, amide, polyurea. Linoleic acid không độc. Còn axit Tetradecanoic acid được sử dụng cho tổng hợp hữu cơ, sắc ký khí và nghiên cứu sinh hóa.

3.3. Định tính flavonoid trong dịch chiết vỏ cây hoa sữa

Trong dịch chiết với nước có sự đổi màu với thuốc thử, chứng tỏ trong cây hoa sữa có một ít cấu tử flavonoid nhưng chưa xác định được cấu trúc

Vì hàm lượng của flavonoid trong cây hoa sữa là rất thấp nên việc chiết tách để phân lập flavonoid gặp nhiều khó khăn. Mặc khác flavonoid trong vỏ cây hoa sữa không có ý nghĩa quan trọng trong vấn đề chữa bệnh nên chưa được nghiên cứu kĩ

3.4. Kết quả khảo sát điều kiện chiết alkaloid từ vỏ cây hoa sữa

3.4.1. Kết quả lựa chọn thuốc thử

Hiện tượng thu được khi thử sản phẩm chiết với thuốc thử alkaloid được trình bày ở bảng 3.5

Bảng 3.5. Hiện tượng quan sát được với thuốc thử alkaloid

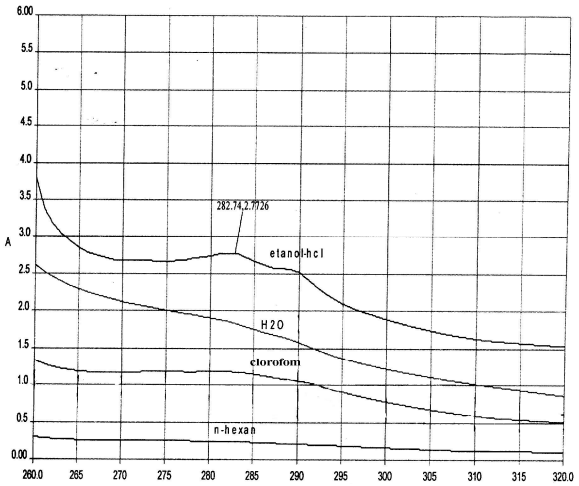
Thuốc thử	**Hiện tượng**
Thuốc thử Mayer	Kết tủa trắng
Thuốc thử Wagner	Kết tủa nâu rất rõ
Dung dịch HNO_3 đậm đặc (D= 1,4 g/ml)	Tạo chất lỏng màu vàng
Dung dịch H_2SO_4 98%	Tạo chất lỏng màu đỏ

3.4.2. Kết quả lựa chọn dung môi chiết

Từ bảng 3.6 cho thấy

- Dung môi khác nhau cho kết quả mật độ quang khác nhau. Trong dịch chiết của vỏ cây hoa sữa, dung môi càng phân cực thì mật độ quang càng tăng

- Mật độ quang đạt giá trị cực đại tại dung môi etanol 96^0 + HCl 5%



Hình 3.7. Phổ hấp thụ phân tử của dịch chiết với dung môi khác nhau

Bảng 3.6. Mật độ quang của các dung môi chiết khác nhau

Mẫu	Thể tích dung môi (ml)	Khối lượng vỏ cây (g)	Dung môi	Mật độ quang
1	300	20,011	Hexan	0,33
2	300	20,013	Clorofom	1,32
3	300	20,010	H_2O	2,01
4	**300**	**20,002**	**Etanol 96^0-HCl**	**2,59**

Từ những kết quả phân tích trên, chúng tôi sử dụng 2 dung môi chiết lấy alkaloid trong vỏ cây hoa sữa là $CHCl_3$ và dung dịch hỗn hợp C_2H_5OH 96^0 + HCl 5% (4:1)

3.4.3. Khảo sát thời gian chiết

Bảng 3.7. Mật độ quang dịch chiết ở các thời gian chiết khác nhau

Mẫu	Thể tích dung môi (ml)	Khối lượng vỏ cây (g)	Thời gian (h)	Mật độ quang
1	300	20,011	4	1,61
2	300	20,013	6	2,00
3	**300**	**20,010**	**8**	**3,27**
4	300	20,002	10	2,59

Từ bảng 3.7 cho thấy:

- Khi thời gian chiết tăng thì mật độ quang tăng (mẫu 1, 2, 3, 4).
- Mật độ quang đạt giá trị cực đại ở mẫu 3 (chiết trong 8h)
- Tăng thời gian chiết ta thấy mật độ quang giảm xuống là do thời gian gia nhiệt quá lâu các hợp chất màu có thể bị biến đổi cấu trúc làm ảnh hưởng đến quá trình chiết.

3.4.4. Khảo sát ảnh hưởng của pH chiết đến hiệu suất tạo alkaloid

Bảng 3.8. Khối lượng sản phẩm tối ưu pH chiết.

pH	m_1 (g)	m_2 (g)	Δm (g)
7 ÷ 8	30,352	30,364	0,013
8 ÷ 9	32,801	32,828	0,017
9 ÷ 10	33,143	33,177	0,024
10 ÷ 11	28,758	28,807	**0,029**
11 ÷ 12	28,796	28,843	0,021

Qua kết quả khảo sát ở bảng 3.8 cho thấy alkaloid trong vỏ cây hoa sữa có tính bazơ yếu, pH thích hợp để chiết được lượng alkaloid lớn nhất là trong khoảng **10 ÷ 11.**

3.5. Định danh thành phần hóa học dịch chiết alkaloid vỏ cây hoa sữa bằng GC – MS

Bảng 3.9. Thành phần hóa học của dịch chiết hoa sữa Đà Nẵng

NO	SCAN	NAME	AREA	%
1	339	3,6-Dimethyldecane	20837572	0.46
2	382	4-Methylundecane	15427042	0.34
3	542	Dodecane,2,7,10-trimethyl-	51562280	1.13
4	555	Farnesan	11845631	0.26
5	586	Pentadecane	58100704	1.28
6	744	Hexadecane	78559160	1.73
7	753	4-Ethyltetradecane	27367734	0.60
8	789	Heptadecane	177274032	3.90
9	800	Octyl ether	72622136	1.60
10	821	Xem phổ	70793136	1.56
11	899	Xem phổ	51209756	1.13
12	904	Xem phổ	54622712	1.20
13	930	1R,3-Cis-Diethoxy-5-cis-methylcyclohexane	137910672	3.03
14	951	3-Octadecanone	390164160	8.59
15	992	Heptadecane,2,6,10,15-tetramethyl-	105288904	2.32
16	1002	Heptadecane,2,6,10,14-tetramethyl-	35991652	0.79
17	1012	Heneicosane	55416928	1.22

18	1055	Docosane	39750592	0.87
19	1143	Tricosane	97915000	2.15
20	1148	Hexanethioic acid,s-decyl ester	264547856	5.82
21	1183	Docosane,2,21-dimethyl-	76367888	1.68
22	1199	Xem phổ	52347756	1.15
23	1238	Palmitic acid,ethyl ester	388144512	8.54
24	1241	Hexadecanoic acid	236881072	5.21
25	1323	Heptadecane,9-octyl-	57055616	1.26
26	1359	Pentacosane	61165552	1.35
27	1383	Ethyl linoleate	363426752	8.00
28	1386	Ethyl oleate	645090816	14.20
29	1410	Stearic acid	575381952	12.66
30	1559	Adipic acid,dioctyl ester	159762736	3.52
31	1672	Phthalic acid,diisooctyl ester	55610884	1.22
32	1702	Cetylpyridinium chloride	55735396	1.23
			4544178591	100.00

3.6. So sánh 2 phương pháp chiết xuất alkaloid dưới dạng bazơ và dưới dạng muối

3.6.1. Chiết alkaloid dưới dạng bazơ

Bảng 3.10. Thành phần hoá học của dịch chiết L_1

TT	Thời gian lưu (phút)	Công thức phân tử	Tên gọi	Tỉ lệ %
1	**3,21**	**M=384 $C_{22}H_{28}N_2O_4$**	**Ditaine (Echitamine)**	**10,87**
2	**3,66**	**M=426 $C_{24}H_{30}N_2O_5$**	**16-demethoxyvindoline (Vindorosine) Hoặc Elipatamine**	**27,12**
3	**5,04**	**M= 310**	**chưa định danh**	**26,78**
4	4,27	M=356	chưa định danh	19,05
4	6,59	M=258	chưa định danh	8,06
5	9,27	M=518	Chưa định danh	6,78
6	12,07	M= 366	Chưa định danh	1,34

3.6.2. Chiết alkaloid dưới dạng muối

Bảng 3.11. Thành phần hoá học của dịch chiết L_2

TT	Thời gian lưu (phút)	Công thức phân tử	Tên gọi	Tỉ lệ %
1	**2,93**	**M=384 $C_{22}H_{28}N_2O_4$**	**Ditaine (Echitamine)**	**21,52**
2	**3,76**	**M= 426 $C_{24}H_{30}N_2O_5$**	**16-demethoxyvindoline (Vindorosine)**	**36,36**

			Hoặc Elipatamine	
3	**5,06**	**M=310**	**chưa định danh**	**33,77**
4	6,54	M = 486	chưa định danh	3,59
5	10.69	M=350	Chưa định danh	4,76

So sánh kết quả trong bảng 3.10 và 3.11, hình 3.14 và 3.15 cho thấy

- Lượng chất rắn thu được trong L_2 (0,089g) nhiều hơn trong L_1 (0,057g)

- Thành phần dịch chiết trong mẫu L_1 so với mẫu L_2 có sự khác nhau, hầu hết các hợp chất trong L_1 chưa được định danh, tuy nhiên các hợp chất chính đều có mặt trong cả 2 dịch chiết chỉ khác nhau về hàm lượng. Hàm lượng các chất như Echitamine trong mẫu L_2 (21,52%) cao hơn trong mẫu L_1 (10,87%), chất 16-demethoxyvindoline (Vindorosine) Hoặc Elipatamine trong L_2 (36,36%) cũng có hàm lượng cao hơn trong L_1 (27,12%). Hàm lượng chất có thời gian lưu khoảng 2,38 (M= 310) chưa định danh được ở trong mẫu L_2 (33,37%) cao hơn hẵn trong mẫu L_1 (26,78%)

Sở dĩ có sự khác biệt như vậy có thể là do phương pháp chiết khác nhau, mẫu L_1 được chiết bằng phương pháp bazơ, mẫu L_2 được chiết bằng phương pháp muối. Đồng thời nhìn vào hình 3.13 so với hình 3.14 ta thấy hình 3.13 số lượng pic nhiều, các pic không cân đối, chân pic không rõ và hầu như các pic chồng lên nhau, cho thấy trong dịch chiết L_1 có rất nhiều cấu tử. Chính vì vậy mà mẫu L_1 thành phần có nhiều cấu tử chưa được định danh và hàm lượng các chất chính giảm xuống so với mẫu L_2.

Như vậy đối với alkaloid trong vỏ cây hoa sữa ta không nên dùng phương pháp chiết dưới dạng bazơ, vì sẽ khó tách ra trong quá trình phân lập và thu được hàm lượng ít

Như vậy có thể nhận xét: trong cùng điều kiện thực nghiệm ở phòng thí nghiệm với các phương pháp chiết khác nhau, nhưng các hợp chất chính thì có mặt trong cả 2 dịch chiết. Khả năng tách riêng các cấu tử trong dịch chiết L_2 cao hơn so với L_1, nên trong điều kiện này ta sử dụng dịch chiết L_2 để tiến hành xác định công thức cấu tạo của một số cấu tử chính.

Các sắc ký đồ khối phổ của các hợp chất trên được trình bày trong phụ lục.

3.7. Xác định công thức cấu tạo một số cấu tử chính trong dịch chiết L_2

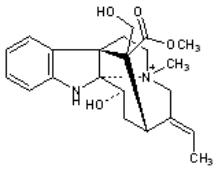
3.7.1. Kết quả phân tích tại thời gian lưu 2,97

Phân tích phổ trên sắc kí đồ hình 3.16 sau khi qua hệ thống LC-MS trong khoảng khối lượng từ 100 – 500, với thời gian lưu (RT) từ 2,12 – 3,56 tương ứng với pic có m/z = 385,2

Cho kết quả xuất hiện các pic tương đối lớn có khối lượng 385,2; 367,1; 310,2; 280; 220,1, 110.

Trong đó pic 385,2 chính là ion phân tử hay pic gốc $[M+H]^+$ được nhận diện có thể là:

Ditaine (Echitamine), $C_{22}H_{28}N_2O_4$. Ditaine có cấu trúc phân tử như sau. Đây là loại ankaloid có khung Indol



Các pic còn lại đáng lưu ý nhất là 367,1 và 310,1 đó chính là các ion mảnh chủ yếu do sự bắn phá của ion phân tử được máy ghi lại.

Với phổ khối hình 3.16 và sơ đồ phân mảnh hình 3.17 cho thấy sự phân mảnh của $[M+H]^+$ m/z = 385,2 có thể theo 2 hướng:

- Hướng 1: $[M+H]^+$ (385,2) → $[B]^+$
- Hướng 2: $[M+H]^+$ (385,2) → $[D]^+$

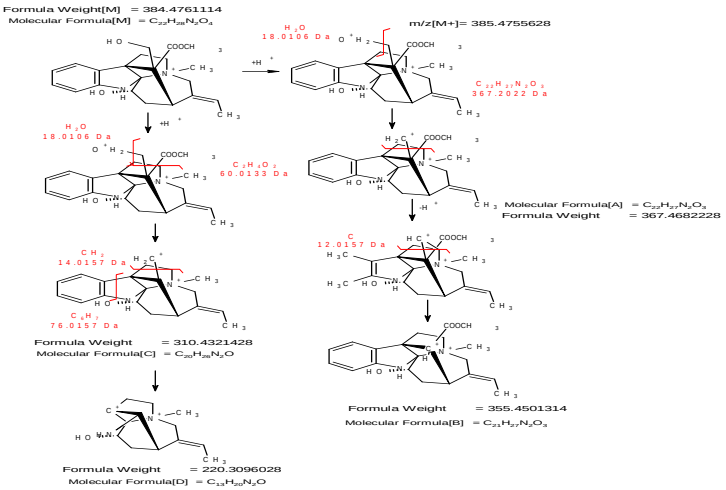
Cơ chế cắt mảnh này chúng tôi đã nghiên cứu và dựa vào tài liệu tham khảo từ các nguồn sách khác nhau. Chúng tôi đã đưa ra sơ đồ phân mảnh như sau:

+ Hướng 1: Cấu tử M nhận H^+ thành $[M+H]^+$ = 385, H^+ tấn công vào OH của M thành $[OH_2]^+$ không bền bị cắt thành mảnh $[A]^+$, ở đây các khung indol hay có sự chuyển vị của H^+, CH_2^+ bị mất H và chuyển vị vào trong vòng và bị cắt đi một C thành mảnh $[B]^+$ có khối lượng phân tử như trong phổ khối của hình 3.17

+ Hướng 2: : Cấu tử M nhận H^+ thành $[M+H]^+$ = 385, H^+ tấn công vào OH của M thành $[OH_2]^+$ không bền và một phần $COOCH_3$ liên kết gần $[OH_2]^+$ bị cắt thành mảnh $[C]^+$, tiếp tục vòng benzen bên cạnh nguyên tử N^+ và phần ion dương của mảnh $[C]^+$ bị cắt thành $[D]^+$

- Từ những lập luận trên và kết quả nhận được trên phổ đồ chúng tôi đã bước đầu xác định được hợp chất có thời gian lưu 2,97 có $[M+H]^+$ = 385 là Echitamine có công thức phân tử $C_{22}H_{28}N_2O_4$, có cấu trúc khung indol, là một loại indol alkaloid phổ biến trong cây hoa sữa

- Theo các tài liệu tham khảo thì alkaloid này đã được sử dụng thay thế cho quinine, chất có tác dụng hạ sốt.



Hình 3.17. Sơ đồ phân mảnh của ion phân tử $[M+H]^+$ có m/z = 385

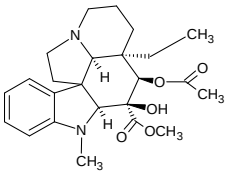
3.7.2. Kết quả phân tích tại thời gian lưu 3,79

Phân tích phổ trên sắc kí đồ hình 3.18 sau khi qua hệ thống LC-MS trong khoảng khối lượng từ 100 – 500, với thời gian lưu (RT) từ 2,88-4,99 tương ứng với pic có m/z = 427,1.

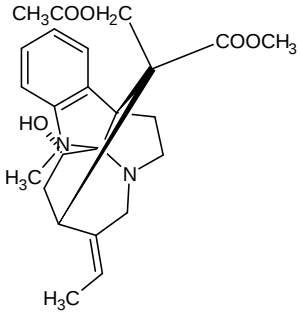
Cho kết quả xuất hiện các pic tương đối lớn có khối lượng 427,1; 409,1; 384,1; 352,0; 292,1. Dựa vào các pic lớn này cùng với cơ chế phân cắt mảnh, chúng tôi bước đầu đưa ra sơ đồ phân cắt mảnh của hợp chất alkaloid có thời gian lưu 3,79 và có M=426 (hình 3.18)

Trong đó pic 427 chính là ion phân tử hay pic gốc $[M+H]^+$ được nhận diện có thể là:

- 16-demethoxyvindoline(Vindorosine), $C_{24}H_{30}N_2O_5$,



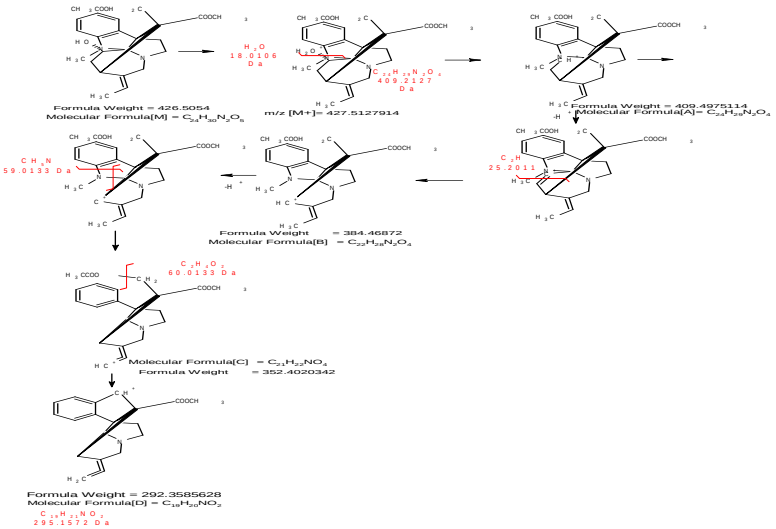
- Ellipatamine có công thức phân tử $C_{24}H_{30}N_2O_5$



Các pic còn lại đáng lưu ý nhất là 427 chính là các đồng vị $[M+H]^+$; 409,1; 384,1; 352,0 và 292,1 đó chính là các ion mảnh chủ yếu do sự bắn phá của ion phân tử được máy ghi lại.

Với phổ khối hình 3.18 và sơ đồ phân mảnh hình 3.19 cho phép nhận định: đầu tiên sự phân cắt $[M+H]^+$ có m/z = 427 xảy ra tại liên kết OH trong vòng 7 cạnh, mảnh OH_2^+ bi phân cắt thành ion phân tử $[A]^+$, có sự chuyển vị của H^+ làm xuất hiện nối đôi trong vòng 7 cạnh, sau đó ion phân tử này tiếp tục bị bắn phá tạo ra $[B]^+$, lại tiếp tục có sự chuyển vị của H^+ trong vòng và sau đó ion phân tử này lại bị bắn phá tiếp ở chỗ liên kết của N trong vòng tạo ion$[C]^+$. Cuối cùng ion phân tử $[C]^+$ bị phân cắt nhóm H_3CCOO để tạo thành $[D]^+$

Như vậy với cơ chế phân mảnh hình 3.19 và dựa vào các tài liệu tham khảo cùng với các công thức cấu tạo được dự đoán như trên, bước đầu chúng tôi khẳng định hợp chất có thời gian lưu 3,79 và có $[M+H]^+$ = 427 là: ellipatamine có công thức phân tử $C_{24}H_{30}N_2O_5$ với M = 426



Hình 3.19. Sơ đồ phân mảnh của ion phân tử $[M+H]^+$ có m/z = 426

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu thực nghiệm, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1. Hàm lượng kim loại nặng (Zn^{2+}: 0,3721mg/kg; Cu^{2+}: 0,1052mg/kg; Pb^{2+}: 0,1900mg/kg; As^{2+}: 0,1364), không vượt quá tiêu chuẩn Việt Nam cho vệ sinh thực phẩm (theo quyết định của bộ y tế số 505/BYT-QĐ ngày 13 tháng 4 năm 1992)

2. Xác định được thành phần chính với hàm lượng một số axit béo có trong vỏ cây hoa sữa tại Đà Nẵng gồm Octannoic acid (0,12%); Decanoic acid (0,13%); Đoecanoic acid (11,53%); Tetradecanoic acid (30,92%); Hexadecanoic acid (12,44%); Hexadecenoic acid (0,39%); Octadecanoic acid (1,89%); Octadecenoic acid (18,03%); Octadecadienoic acid (23,51%); Octadecatrienoic acid (1,07%)

3. Đã khảo sát và tìm được điều kiện thích hợp để chiết các hợp chất alkaloid bằng phương pháp soxhlet với dung môi C_2H_5OH 96^0 + HCl 5% (4:1), ở nhiệt độ 76^0C với thời gian chiết là 8 giờ, khoảng pH chiết alkaloid là 10 ÷ 11

4. Bằng phương pháp LC-MS đã xác định được thành phần và hàm lượng các chất alkaloid trong dịch chiết vỏ cây hoa sữa bằng phương pháp chiết soxhlet dưới dạng muối và bazơ. Kết quả cho thấy trong dịch chiết vỏ cây hoa sữa bằng phương pháp chiết soxhlet dưới dạng muối thu được hàm lượng các hợp chất alkaloid nhiều nhất.

5. Bước đầu dự đoán được công thức cấu tạo của 2 hợp chất: Ditaine(Echitamine) và Ellipatamine và xác định được cấu trúc của 1 alkaloid Cetylpyridinium chloride bằng phương pháp GC-MS

2. KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục nghiên cứu theo hướng sâu hơn: chạy sắc kí cột để tách được các cấu tử tinh khiết từ vỏ cây hoa sữa, đo cộng hưởng từ để xác định cấu trúc các hợp chất chính. Làm giàu các cấu tử chính thử hoạt tính sinh học và nghiên cứu các phản ứng chuyển hóa chúng.

2. Có thể nghiên cứu mở rộng xác định thành phần các chất có trong lá, rễ và hoa của cây hoa sữa so sánh với thành phần các chất có trong vỏ cây hoa sữa. Từ đó, sẽ lựa chọn được nguồn nguyên liệu tối ưu để tiếp tục nghiên cứu các hoạt tính sinh học phục vụ cho y học.