

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

PHAN HIỀN LƯƠNG

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC
CÂY CỎ MỤC (*ECLIPTA PROSTRATA* (L.)L.)
Ở THÀNH PHỐ ĐÀ NẴNG**

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

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Đà Nẵng - Năm 2012

**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. Lê Tự Hải

Phản biện 2: PGS.TS. Lê Thị Liên Thanh

Luận văn được bảo vệ tại Hội đồng bảo vệ chấm Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ Khoa học họp tại Đại học Đà Nẵng vào ngày 30 tháng 6 năm 2012.

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 nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới quanh năm nên thích hợp cho việc trồng trọt và phát triển của nhiều loại cây cỏ thuốc quý. Cha ông ta hay dùng những cây cỏ để chữa những bệnh thông thường mà chúng ta hay mắc phải như: nóng, sốt, ho, cảm cúm, đau bụng, đau răng, chảy máu,... Và được lưu truyền từ đời này sang đời khác trở thành những bài thuốc cổ truyền của dân tộc.

Ngày nay với sự phát triển của khoa học, y học hiện đại, con người đã đi sâu vào nghiên cứu các loài cây cỏ chữa bệnh cổ truyền để tìm ra các chất có ích phục vụ cho nhiều lĩnh vực khoa học mà đặc biệt là y học.

Một số loài cây được sử dụng nhiều trong dân gian trong đó có cây cỏ mực. Cỏ mực, một cây thuốc nam rất thông thường mọc hoang hầu như khắp nơi, hiện là một dược liệu đang được nghiên cứu về khả năng bảo vệ gan và trừ được nọc độc của một số loài rắn nguy hiểm. Cỏ mực được dùng trị xuất huyết nội tạng như: ho ra máu, xuất huyết ruột, chảy máu răng, nước, lợi, trị sung gan, sung bàng quang, sung đường tiêu, trị mụn nhọt đầu đinh, bó ngoài giúp liền xương.

Đã có nhiều công trình nghiên cứu về cây cỏ mực ở các nước như: Ấn Độ, Trung Quốc, Pakistan, Thái Lan, Banglades,... Còn ở Việt Nam hiện có rất ít công trình nghiên cứu. Tại Đà Nẵng hiện chưa có công trình nghiên cứu về cỏ mực.

Hiện nay công ty cổ phần Dược Danapha đang sử dụng cỏ mực là một trong những nguyên liệu sản xuất thuốc VG5 (thuốc có tác dụng hỗ trợ điều trị viêm gan, giải độc gan). Rất cần có chất chuẩn hoặc chất đánh dấu nhằm kiểm soát chất lượng nguyên liệu và tiến tới kiểm soát chất lượng trong sản phẩm VG5.

Để tiêu chuẩn hóa nguyên liệu cỏ mực và góp phần thêm cho những nghiên cứu về cây cỏ mực ở Đà Nẵng và Việt Nam cũng như trên thế giới, chúng tôi chọn đề tài "**Nghiên cứu thành phần hóa học cây cỏ mực (*Eclipta prostrata*(L.)L.) ở thành phố Đà Nẵng**".

2. Mục đích nghiên cứu

- Xác định một số chỉ tiêu vật lý, hóa học cây cỏ mực.
- Khảo sát điều kiện chiết tách, cô lập, tinh chế và định danh cấu trúc một số hợp chất tinh khiết cây cỏ mực thu hái ở Đà Nẵng.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

- Cây cỏ mực được thu hái ở Đà Nẵng.

4. Phương pháp nghiên cứu

Để thực hiện đề tài này chúng tôi sử dụng các phương pháp sau:

4.1. Nghiên cứu lý thuyết

Thu tập, tổng hợp các tài liệu, tư liệu, sách báo trong nước và nước ngoài có liên quan đến đề tài.

4.2. Phương pháp thực hành

- + Lấy mẫu, xử lý, sơ chế mẫu.
- + Xác định một số chỉ tiêu hóa lý.
- Xác định độ ẩm, hàm lượng tro bằng phương pháp trọng lượng.
- Xác định kim loại nặng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS.
- Tìm điều kiện chiết tách, phân lập, tinh chế các chất trong cây cỏ mực bằng phương pháp chiết với các dung môi và sắc ký cột.
- Xác định cấu trúc hóa học của chất tinh chế được bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân(NMR), quang phổ hồng ngoại(IR), sắc ký khối phổ LC-MS.

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 qui trình chiết tách, phân lập, thành phần các chất trong cây cỏ mực.

Cung cấp các số liệu thực nghiệm cho các nghiên cứu sâu hơn về cây cỏ mực trong các đề tài tiếp theo.

5.1. Ý nghĩa thực tiễn

Tim được qui trình chiết tách, phân lập, tinh chế các chất có trong cây cỏ mực từ đó định danh, xác định cấu trúc hóa học chất chiết được làm chất chuẩn hoặc chất đánh dấu từ đó làm nền tảng cho việc xây dựng tiêu chuẩn đánh giá định tính, định lượng về chất lượng cho cây cỏ mực đang được sử dụng trong ngành dược và đông y.

Sử dụng chất đã được xác định cấu trúc để tiêu chuẩn hóa chất lượng định tính, định lượng đối với các nguyên liệu cỏ mực được dùng trong sản xuất của công ty cổ phần Dược Danapha.

7. Cấu trúc luận văn

Ngoài phần mở đầu, danh mục các bảng, hình, đồ thị, sơ đồ, kết luận và kiến nghị, tài liệu tham khảo, phụ lục. Trong luận được chia làm các chương như sau :

Chương 1 : Tổng quan (23 trang)

Chương 2 : Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu (10 trang)

Chương 3 : Kết quả và thảo luận (40 trang)

Chương 1 TỔNG QUAN

1.1 ĐẠI CƯƠNG VỀ CỎ MỰC

1.1.1 Đặc điểm cây cỏ mực

1.1.2 Phân bố và sinh thái

1.1.3. Tác dụng dược lý của cỏ mực

1.2. MỘT SỐ CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU VỀ CÂY CỎ MỰC

1.2.1. Các công trình nghiên cứu tại Việt Nam

1.2.2. Các công trình nghiên cứu trên thế giới

1.2.2.1. Thành phần hóa học của Cỏ mực

Cỏ mực có các chất flavonoid, glycoside triterpene saponin, alkaloid.

1.2.2.2. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học

Hildebert Wagner và cộng sự đã khảo sát hoạt tính bảo vệ gan trên mô hình gây độc bởi CCl_4 của Wedelolactone và Demethylwedelolactone cho thấy cả hai chất đều có hoạt tính tốt. IC_{50} của Wedelolactone là $2.5 \mu\text{M}$. Ngoài ra, các chất trên còn có tác dụng kích thích tái sinh tế bào gan. Echinocystic acid và Eclalbasaponin II ngăn chặn sự sinh trưởng của các tế bào hình sao của bệnh xơ gan .

Các dẫn xuất tự nhiên và tổng hợp của Wedelolactone có khả năng chống lại độc tố từ nọc rắn lục. Nghiên cứu *in vivo* mới đây của Paulo A. Melo và cộng sự cho thấy, hiệu quả kháng độc tố và chống phù của 8-metoxycoumestrol rất cao với ID_{50} lần lượt là 0.17 mg/kg và 0.14 mg/kg . Tác dụng của Wedelolactone cũng tương đương với hợp chất này .

1.2.2.3. Các hợp chất tiêu biểu đã được phân lập từ cỏ mực

Wedelolactone, Demethylwedelolactone, Luteolin, Oleanolic acid, Kaempferol, Eclalbasaponin I-IV, Apigenin

Chương 2

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU

2.1.1. Thu hái nguyên liệu

Cây Cỏ mực được thu hái tại xã Hòa phong, huyện Hòa vang, thành phố Đà Nẵng. Cây Cỏ mực được khoảng ba tháng tuổi.

2.1.2. Xử lý mẫu nguyên liệu

Cây Cỏ mực được sử dụng toàn bộ phần trên mặt đất, bao gồm thân, lá, hoa và quả. Mẫu nguyên liệu được xử lý loại cỏ dại và rửa sạch phơi khô. Xay nghiền nhỏ.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Xác định độ ẩm : Phương pháp mất khối lượng do làm khô

2.2.2. Xác định hàm lượng tro của nguyên liệu : Phương pháp tro hóa hoàn toàn trong lò nung nhiệt độ $600^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ cho đến trọng lượng không đổi.

2.2.3. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Phương pháp HPLC được sử dụng để định tính, định lượng, kiểm tra thành phần các chất có mặt trong các phân đoạn chiết trong dung môi khác nhau và các phân đoạn điều chế sắc ký cột mẫu cỏ mực..

2.2.4. Phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử (AAS)

Dùng phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử để xác định hàm lượng các kim loại Pb, Cu, Cd, As, Hg trong mẫu cỏ mực.

2.2.5. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học bằng quang phổ hồng ngoại (IR): sử dụng để xác định nhóm chức trong các chất.

2.2.6. Phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phương pháp NMR đo phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR , phổ Cosy,DEP, HMBC, HMQC để xác định công thức cấu tạo của các chất..

2.2.7. Khảo sát thành phần các chất chiết được trong một số loại

dung môi, điều chế cao thô và phân lập, tinh chế các chất từ cao thô, xác định thành phần và cấu tạo chất tinh chế.

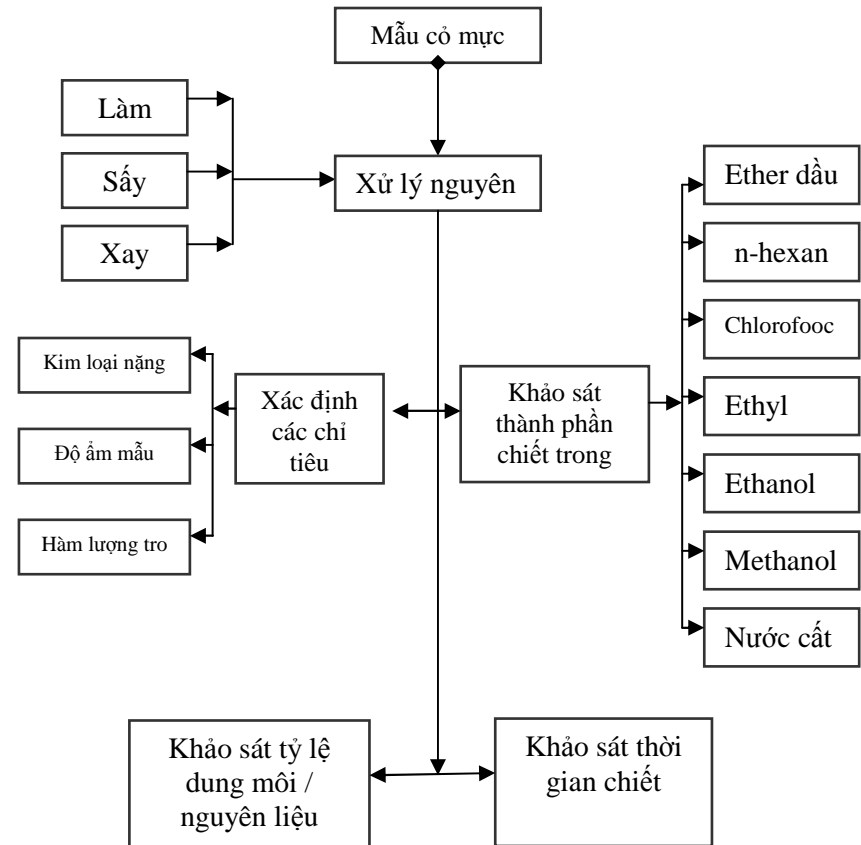
2.3. THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT

Chương 3

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU

Sơ đồ khảo sát chỉ tiêu hóa lý và điều kiện chiết xuất



Sơ đồ 3.1: Sơ đồ khảo sát điều kiện chiết xuất

3.2. XỬ LÝ NGUYÊN LIỆU

3.2.1. Thu hái nguyên liệu

Cây cỏ mực được thu hái tại xã Hòa phong, huyện Hòa vang, thành phố Đà Nẵng. cây cỏ mực được khoảng ba tháng tuổi, khối lượng mẫu 6,5 kg.

3.2.2. Xử lý mẫu nguyên liệu

Cây cỏ mực được sử dụng toàn bộ phần trên mặt đất, bao gồm thân, lá, hoa và quả. Mẫu nguyên liệu được xử lý loại cỏ dại và rửa sạch sấy khô trong tủ sấy nhiệt độ sấy 50°C. Nguyên liệu sau khi sấy được bảo quản trong bao nylon có chứa chất hút ẩm silicagel. Nguyên liệu được nghiền nhỏ trong máy xay được dùng làm mẫu nghiên cứu.

3.3. XÁC ĐỊNH CÁC CHỈ TIÊU

3.3.1. Xác định độ ẩm nguyên liệu

Kết quả xác định độ ẩm của mẫu nguyên cứu được thể hiện trong bảng 3.1

Bảng 3.1: Kết quả xác định độ ẩm trong cỏ mực

| Stt | KL mẫu trước | Khối lượng mẫu | Khối lượng nước | Độ ẩm |
|------------------------|--------------|----------------|-----------------|-------------|
| 1 | 2,0083 | 1,9028 | 0,1055 | 5,25 |
| 2 | 2,0045 | 1,9014 | 0,1031 | 5,14 |
| 3 | 2,0049 | 1,9267 | 0,0801 | 4,00 |
| 4 | 2,0058 | 1,9248 | 0,0810 | 4,04 |
| 5 | 2,0035 | 1,9242 | 0,0793 | 3,96 |
| Độ ẩm bình quân | | | | 4,48 |

Nhận xét: Độ ẩm trong mẫu nguyên liệu cỏ mực khô, sau khi sấy 105°C độ ẩm trung bình mẫu là 4,48 %. Với độ ẩm thấp nguyên liệu

sẽ lâu bị hư hỏng, giữ được chất lượng trong quá trình làm thử nghiệm. Đạt tiêu chuẩn dược điển Việt nam qui định không quá 12%.

3.3.2. Xác định hàm lượng tro

Kết quả xác định hàm lượng tro trong mẫu cỏ mực nghiên cứu cỏ mực thể hiện trong bảng (3.2)

Bảng 3.2: Kết quả xác định tỉ lệ tro trong mẫu cỏ mực

| Stt | Khối lượng mẫu (g) | Khối lượng tro (g) | Tỉ lệ tro |
|-------------------|--------------------|--------------------|---------------|
| 1 | 2,006 | 0,249 | 12,413 |
| 2 | 2,003 | 0,245 | 12,232 |
| 3 | 2,002 | 0,244 | 12,187 |
| Trung bình | | | 12,187 |

Kết quả : Hàm lượng tro trong mẫu trung bình 12,187%,

Đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt nam qui định; tro toàn phần không vượt quá 20%.

3.3.3 Xác định hàm lượng kim loại nặng

3.3.3.3. Kết quả xác định hàm lượng kim loại trong mẫu cỏ mực

Kết quả xác định hàm lượng kim loại nặng mẫu cỏ mực được thể hiện trong bảng 3.5.

Bảng 3.5: Kết quả PT hàm lượng kim loại nặng và QCKT quốc gia

| Stt | Khối lượng mẫu (gam) | Hàm lượng (mg/kg) | | | | |
|-------------------|----------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | Cd | As | Hg | Pb | Cu |
| 1 | 0,8916 | 1,2057 | 0,0447 | 0,0252 | 1,4917 | 8,3558 |
| 2 | 0,8430 | 1,5925 | 0,0563 | 0,0326 | 0,7384 | 8,7960 |
| 3 | 0,9899 | 1,4143 | 0,0556 | 0,0354 | 3,4549 | 8,7105 |
| Trung bình | | 1,4042 | 0,0532 | 0,0323 | 1,8950 | 8,6208 |
| QCKT quốc gia | | 1,0000 | 1,0000 | 0,0500 | 2,0000 | 30,0000 |
| Đánh giá | | Không đạt | Đạt | Đạt | Đạt | Đạt |

3.4. KHẢO SÁT THÀNH PHẦN CÁC CHẤT CHIẾT ĐƯỢC TRONG CÁC DUNG MÔI.

3.4.1. Mục tiêu

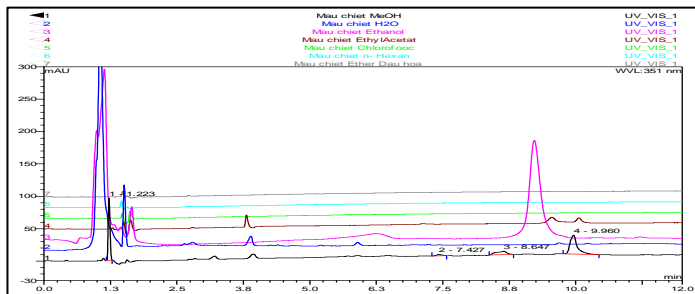
Khảo sát này nhằm tìm được dung môi chiết xuất mẫu cỏ mực có tính chọn lọc thành phần hoạt chất có hàm lượng lớn, khá sạch để có thể lấy phân đoạn chiết xuất này tiếp tục dùng sắc kí cột để phân lập, tinh chế và tiếp tục khảo sát thành phần, cấu trúc hóa học của chất, phân lập, tinh chế được.

3.4.2. Phương pháp chiết

Dùng các dung môi có độ phân cực khác nhau để chiết mẫu là ether dầu hỏa, n-hexan, trichloromethan, ethyl acetat, ethanol, methanol và nước. Chiết mẫu trong bể lắc siêu âm Elmasonic S100H tần số 35 KHz.

3.4.3. Tiến hành

3.4.4. Kết quả Sau thời gian chiết mẫu lọc mẫu và quan sát bằng mắt thường nhận thấy các mẫu chiết có màu sắc khác nhau tùy theo mỗi loại dung môi chiết. Tiến hành chạy sắc kí các mẫu thu được trên máy HPLC theo điều kiện trên thu nhận được sắc kí đồ của mỗi dung dịch chiết.



Hình 3.1: Phổ đồ chất chiết được trong các dung môi

Nhận xét: Dựa trên màu sắc của mẫu chiết được và phổ đồ HPLC ghi lại sau quá trình phân tích chúng tôi nhận thấy với các dung môi chiết bằng ether dầu hỏa, n-hexan, Trichloromethan chủ yếu là các chất màu, hoặc các chất có độ phân cực kém hòa tan trong mẫu, trong khi đó các chất có độ hấp thụ trong vùng bước sóng 351nm không thấy xuất hiện, hoặc xuất hiện với nồng độ rất nhỏ. Các mẫu phân tích trong nước thành phần tan chủ yếu và có nồng độ cao là các chất có độ phân cực cao và khá cao, các chất có độ phân cực trung bình và kém, tan ít trong môi trường nước có nồng độ khá thấp. Các mẫu được chiết trong môi trường methanol và ethanol có màu xanh đậm và trong thành phần hòa tan có rất nhiều các chất có độ phân cực mạnh đến trung bình. Nồng độ, thành phần các chất hòa tan có độ hấp thụ ở bước sóng 351nm khá lớn khả năng chiết tách qua cột sẽ gặp nhiều khó khăn để chia tách các chất. Phân đoạn chiết ethyl acetat được khảo sát có màu xanh, trên sắc kí đồ nhìn thấy có khoảng 04 chất chiết được dự đoán có độ phân cực trung bình và có độ hấp thụ tại bước sóng 351nm khá lớn do đó phân đoạn chiết này có thể cho phép chạy sắc kí cột để phân lập và tinh chế một số chất tinh khiết, xác định thành phần nhóm chức và cấu tạo của các chất.

Trong nghiên cứu này chúng tôi đề nghị sử dụng chọn phương pháp chiết xuất bằng bể lắc siêu âm Elmasonic S100H: Chiết các chất béo, chất màu trong ether dầu hỏa (nhiệt độ sôi ether dầu hỏa nằm trong khoảng 60-90°C), thu hồi dung môi phân đoạn ether dầu hỏa trong máy cất cô quay, mẫu tiếp tục chiết bằng ethyl acetat. Gom dung dịch cỏ mực chiết được trong phân đoạn ethyl acetat, cất thu hồi dung môi trên máy cất cô quay Buchi ở áp suất 400 mHg, nhiệt độ 65°C, thu được cao phân đoạn ethyl acetat. Tiến hành khảo sát tỷ lệ dung môi và nguyên liệu chiết, thời gian chiết hợp lý để thu được

khối lượng cao của chất chiết được. Từ cao phân đoạn này sẽ được sử dụng để chạy sắc kí cột, chia tách các phân đoạn và tinh chế các chất tinh khiết.

3.5. KHẢO SÁT TỶ LỆ DUNG MÔI VÀ KHỐI LƯỢNG MẪU CHIẾT XUẤT

3.5.1. Mục tiêu

Khảo sát tỷ lệ dung môi ethyl acetat và khối lượng nguyên liệu mẫu để có thể chiết được hàm lượng tối ưu các chất có trong mẫu.

3.5.2. Tiến hành

3.5.3. Kết quả. Kết quả khảo sát tỷ lệ dung môi và khối lượng mẫu chiết được trình bày trong bảng 3.7

Bảng 3.7: Kết quả khảo sát tỷ lệ dung môi và khối lượng mẫu

| sst | Khối lượng mẫu(gam) | Diện tích peak chính |
|-----|---------------------|----------------------|
| 1 | 0,50045 | 3,2192 |
| 2 | 1,00043 | 4,7308 |
| 3 | 1,50081 | 8,6553 |
| 4 | 2,00102 | 9,3721 |
| 5 | 2,50071 | 13,0489 |
| 6 | 3,00024 | 16,3235 |
| 7 | 5,50104 | 46,9498 |
| 8 | 10,01400 | 83,0671 |
| 9 | 14,01640 | 109,0231 |
| 10 | 15,17420 | 125,1621 |
| 11 | 17,92310 | 126,1621 |

Nhận xét : Với tỷ lệ dung môi càng lớn thì chất chiết được có hàm lượng càng cao. Khi tỷ lệ dung môi và mẫu nguyên liệu >15g/50 ml thì nồng độ tăng lên không đáng kể. Để tiết kiệm dung môi chọn tỷ lệ dung môi và nguyên liệu chiết tương ứng ethyl acetat/mẫu:3/1.(v/m)

3.6. KHẢO SÁT THỜI GIAN CHIẾT

3.6.1. Mục tiêu

Khảo sát khoảng thời gian tối ưu chiết mẫu đạt hàm lượng cao của chất có trong mẫu. thời gian 10-210 phút

3.6.2. Tiến hành

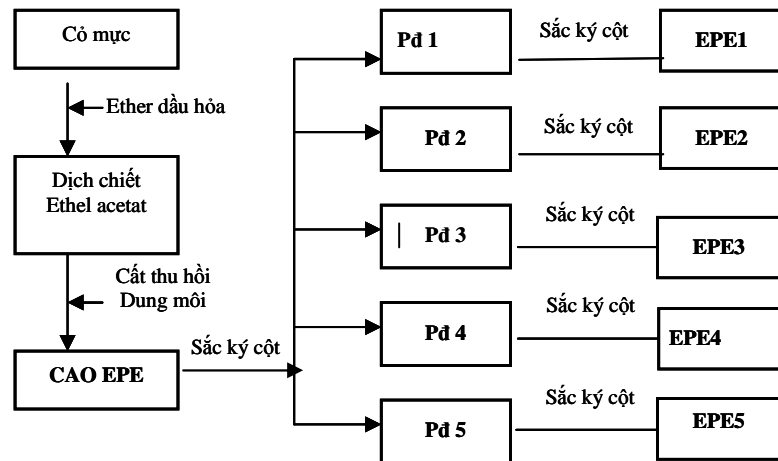
3.6.3. Kết quả : Kết quả khảo sát chiết mẫu theo thời gian được trình bày trong bảng 3.8

Bảng 3.8: Chất chiết được theo thời gian

| Stt | Khối lượng mẫu(gam) | Thời gian (phút) | Diện tích peak |
|-----|---------------------|------------------|----------------|
| 1 | 5,0023 | 10 | 1,4999 |
| 2 | 5,0023 | 20 | 2,1338 |
| 3 | 5,0023 | 30 | 2,1714 |
| 4 | 5,0023 | 40 | 2,4578 |
| 5 | 5,0023 | 50 | 2,5722 |
| 6 | 5,0023 | 60 | 2,6859 |
| 7 | 5,0023 | 70 | 2,7773 |
| 8 | 5,0023 | 80 | 3,0063 |
| 9 | 5,0023 | 90 | 3,5240 |
| 10 | 5,0023 | 100 | 4,4229 |
| 11 | 5,0023 | 110 | 4,9193 |
| 12 | 5,0023 | 120 | 5,8731 |
| 13 | 5,0023 | 150 | 6,6677 |
| 14 | 5,0023 | 180 | 7,0503 |
| 15 | 5,0023 | 210 | 7,1210 |

Nhận xét : Kết quả phân tích được theo diện tích peak chất có thời gian lưu 4,04 phút tăng dần theo thời gian chiết. Đến khoảng thời gian 150 phút , 180 phút và 210 phút hàm lượng chất tăng lên nhưng không đáng kể. Khoảng thời gian chiết tối ưu là 150 phút trong bể siêu âm Elmasonic S100H.

Căn cứ trên kết quả khảo sát các điều kiện về dung môi chiết, tỷ lệ dung môi và mẫu, thời gian chiết ta tìm được các thông số hợp lý quá trình chiết dựa trên khảo sát chất có thời gian lưu 4,04 phút trong mẫu cây cỏ mực trong bể siêu âm Elmasonic S100H tần số 35 chúng tôi đề nghị thực hiện qui trình chiết theo sơ đồ 3.2 để chiết cao ethyl acetat chuẩn bị cho công đoạn tiếp theo: Điều chế cao, chia tách, phân lập và tinh chế: Chiết mẫu cỏ mực trong ether dầu hỏa (khoảng nhiệt độ sôi 60-90°C) để loại các chất béo, chất màu, tiếp theo dùng dung môi chiết là ethyl acetat để chiết tiếp mẫu, tỷ lệ dung môi/ mẫu(v/m): 3/1 thời gian chiết: 150 phút. Sau khi chiết được dịch phân đoạn ethyl acetat, cất thu hồi dung môi thu trên máy cất cô quay áp suất giảm được cao dịch chiết phân đoạn ethyl acetat. Dùng cao phân đoạn này thực hiện sắc ký cột pha thuận phân lập, tinh chế các chất tinh khiết theo sơ đồ 3.2.



Sơ đồ 3.2: Sơ đồ chiết, phân lập, tinh chế các chất tinh khiết

3.7. CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP, TINH CHẾ CÁC CHẤT TINH KHIẾT

3.7.1. Mục tiêu

Chiết xuất được các chất có trong phân đoạn dung môi Ethyl acetat, phân lập và tinh chế được các chất tinh khiết có trong phân đoạn cao ethyl acetat từ đó xác định độ tinh khiết bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, sắc ký lỏng hiệu năng cao, khi độ tinh khiết đạt lớn hơn 95%, mẫu sẽ được xác định thành phần các nhóm chức và công thức cấu tạo dựa trên phổ hồng ngoại, phổ khối, phổ cộng hưởng từ hạt nhân...

3.7.2. Thiết bị, dụng cụ, máy, hóa chất

Để thực hiện việc chiết xuất phân lập được các chất tinh khiết trong đề tài sử dụng phương pháp chiết bằng bể siêu âm Elmasonic S100H tần số 35 KHz, sắc ký điều chế cột pha thuận (cột silicagel) và cột pha đảo C18. Cột pha thuận sử dụng cột sắc ký điều chế pha thuận Inox 25 x 300 mm, cột sắc ký điều chế pha thuận thủy tinh 15 x 450 mm. Hạt nhồi pha thuận silicagel cỡ hạt 0.040 – 0.063 mm Merck. Cột sắc ký điều chế pha đảo Natpro C18 10 µm, 25 x300mm Cruse sep 141110. Bơm sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC10A, Japan, tốc độ dòng max 10 ml/phút để bơm các dung môi vào các cột điều chế. Bay hơi dung môi các phân đoạn có thành phần các chất giống nhau được sử dụng hệ thống cất cô quay áp suất giảm Buchi. Việc dò tìm các phân đoạn trong quá trình điều chế bằng phương pháp HPLC.

3.7.3. Chiết xuất cao phân đoạn ethyl acetat

Kết quả : Trong cao dịch chiết phân đoạn ethyl acetat nhận thấy thành phần tập trung chủ yếu là các chất có độ phân cực trung bình, có độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 350- 351nm

3.7.4. Phân lập, tinh chế chất tinh khiết trong phân đoạn cao ethyl Acetat

3.7.4.1. Phân lập trên cột sắc kí điều chế pha thuận

Điều kiện sắc kí

Cao EPE tiến hành sắc kí cột trên cột sắc kí điều chế pha thuận Inox 25 x 300 mm, cột sắc kí điều chế thủy tinh 15 x 450 mm, silicagel pha thuận cỡ hạt 0.040 - 0.063 mm.

Khối lượng Silicagel : 60g và 36g

Khối lượng mẫu : 5 gam

Dung môi ổn định cột : Dichloromethan

Mỗi phân đoạn : 30 ml

Tiến hành : Nạp silicagel vào các cột, cột Inox được nối tiếp với cột thủy tinh, ổn định cột bằng dung môi dichloromethan trong vòng 60 phút với tốc độ dòng bơm 3ml/phút. Nạp 05 gam mẫu vào bộ nạp mẫu, bắt đầu rửa giải bằng hệ pha động dichloromethan sau đó tăng dần độ phân cực của dung môi rửa giải bằng hệ dung môi dichloromethan : methanol. Thu hồi dung dịch rửa giải vào các ống nghiệm, mỗi ống nghiệm 30 ml (một phân đoạn). Tổng cộng 120 phân đoạn. Kiểm tra các phân đoạn rửa giải bằng quan sát trực tiếp theo màu sắc và HPLC, gom các phân đoạn có các chất có thời gian lưu giống nhau vào cùng 1 phân đoạn lớn.

Bảng 3.9: Kết quả các phân đoạn sau khi phân lập pha thuận

| Phân đoạn | Hệ dung môi | Khối lượng (gam) | Số peak HPLC |
|-----------|--|------------------|--------------|
| 1 | CH ₂ Cl ₂ = 100 | 0,110 | 1 |
| 2 | CH ₂ Cl ₂ = 100 | 0,062 | 1 |
| 3 | CH ₂ Cl ₂ : MeOH = 98 : 2 | 0,180 | 1 |
| 4 | CH ₂ Cl ₂ : MeOH = 95 : 5 | 2,860 | 3 |
| 5 | CH ₂ Cl ₂ : MeOH = 90 : 10 | 1,120 | 3 |

Nhận xét : Với phân đoạn 1 và 2 là các chất có màu xanh đậm và xanh nhạt được tách hoàn toàn rõ ràng trên cột được gom thành các phân đoạn riêng biệt. gom các phân đoạn có cùng màu sắc vào 1 phân đoạn, cất cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, thu được cao lần lượt các phân đoạn 1: 0,110 gam, phân đoạn 2: 0,062 gam. Phân đoạn 3 sau khi kiểm tra chỉ có 01 peak có thời gian lưu giống nhau được gom lại 1 phân đoạn, cất cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao phân đoạn 3 : 0,180 gam trên sắc kí đồ nhận thấy chất này khá tinh khiết tuy còn lẫn màu xanh, hòa tan lại mẫu trong 2 ml Dichloromethan, để yên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm được kết tinh màu trắng ngà, gạn bỏ dung môi có màu, sấy khô cần thu được bằng không khí nóng. Kiểm tra lại độ tinh khiết của chất kết tinh ta được chất EPE1. Chất EPE1 được xác định quang phổ hồng ngoại và cộng hưởng từ hạt nhân MNR để xác định nhóm chức và công thức cấu tạo của chất

Phân đoạn 4,5 thu được còn có nhiều chất khác nhau nằm trong cùng 1 phân đoạn. được tiếp tục sắc kí điều chế pha đảo

3.7.4.2 Phân lập trên cột sắc kí điều chế pha đảo

Phân đoạn 4 có khối lượng 2,860 gam được tiếp tục sắc kí cột pha đảo Natpro C18, 10 µm, 25 x 300mm Cruse sep 141110, rửa giải với hệ pha động Acetonitrin : Nước với độ phân cực giảm dần (tăng dần Acetonitrin) với tín hiệu thu các phân đoạn sử dụng detector DAD bước sóng 351 nm. Dựa trên kết quả tách của các chất trên sắc kí đồ thu được 04 phân đoạn riêng biệt.

Kiểm tra các phân đoạn bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao, gom các phân đoạn có cùng peak hình 3.12, cất cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được các phân đoạn, kết quả trình bày trong bảng 3.10

Bảng 3.10: Kết quả phân đoạn sắc kí điều chế pha đảo

| Phân đoạn | Hệ dung môi | Khối lượng (mg) | Số peak HPLC |
|-----------|--------------------------------|-----------------|--------------|
| 1 | ACN : H ₂ O = 10:90 | 5 | 1 |
| 2 | ACN : H ₂ O = 10:90 | 22 | 1 |
| 3 | ACN : H ₂ O = 20:90 | 10 | 1 |
| 4 | ACN : H ₂ O = 20:90 | 60 | 2 |

Nhận xét: Kết quả thu được của các phân đoạn 1,3 có độ tinh khiết là 98,01% ,98,23% nhưng có khối lượng nhỏ không đủ mẫu để thực hiện việc xác định cấu trúc, Phân đoạn 4 có 02 thành phần không được khảo sát, Phân đoạn 2 có độ tinh khiết là 97,93% ta được chất EPE2, Chất EPE2 thu được khi cất thu hồi dung môi có màu vàng xanh nhạt. chất EPE2 được xác định quang phổ hồng ngoại và cộng hưởng từ hạt nhân để xác định nhóm chức và công thức cấu tạo của chất.

Như vậy ta đã thực hiện qui trình chiết xuất và phân lập các chất EPE1 và EPE2 theo sơ đồ 3.3

3.8 XÁC ĐỊNH CÁC ĐẶC TRƯNG VẬT LÝ, ĐỊNH DANH CẤU TRÚC HÓA HỌC CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC.

3.8.1 Chất EPE1

3.8.1.1 Các đặc tính của EPPE1

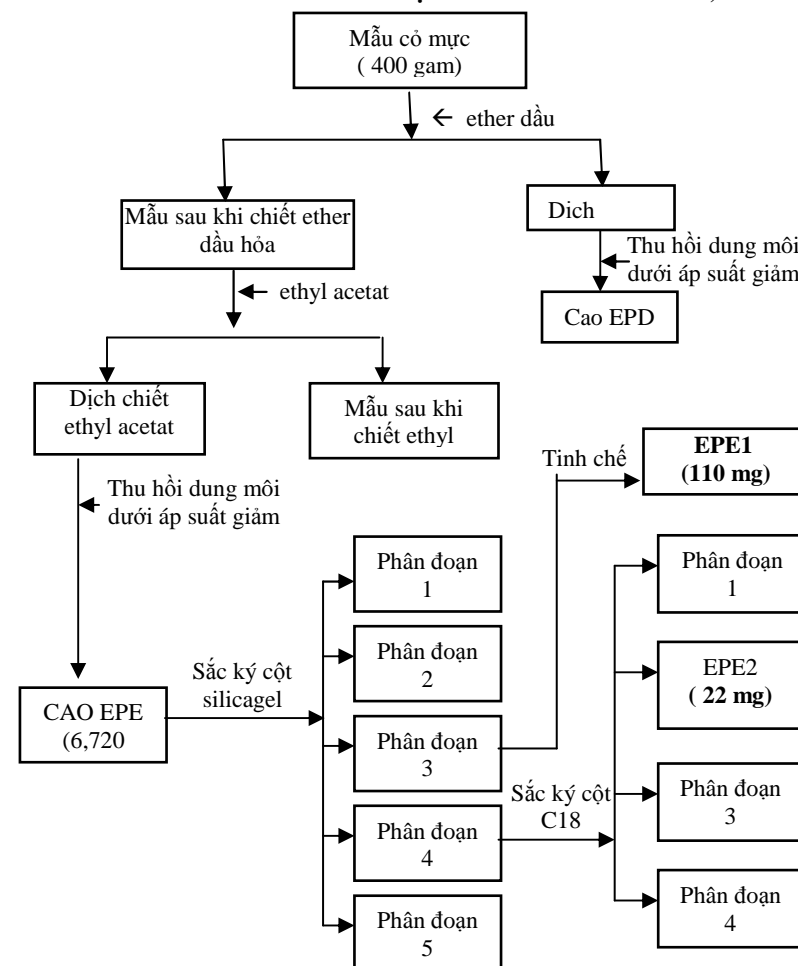
– Là chất rắn kết tinh trong MeOH cho dạng bột màu xám trắng, tan trong hỗn hợp EtOAc/MeOH .

– Điểm chảy: mp = 318 – 320°C.

– Sắc kí bản mỏng (TLC) hiện màu tự nhiên

• Giải ly bằng hệ CHCl₃: MeOH: Acid Acetic = 9:1:0.05 cho vết tròn màu xanh nhạt có R_f= 0,6.

- Sắc kí lỏng hiệu năng cao sắc kí đồ chất EPE1 có thời gian lưu 4,5

SƠ ĐỒ CHIẾT XUẤT VÀ PHÂN LẬP TINH CHẾ CHẤT EPE1, EPE2**Sơ đồ 3.3: Sơ đồ chiết xuất và phân lập tinh chế chất EPE1, EPE2**

Độ tinh khiết peak theo diện tích đạt 95,4%, sắc kí đồ UV – VIS có các đỉnh hấp thụ cực đại là 208,0 nm, 248,9 nm, 351,1nm

3.8.1.2 Nhận danh cấu trúc EPE1

– Phổ MS cho mũi chính m/z [M-H]⁻ = 313. Suy ra phân tử khối của EPE1 là 314 đvC ứng với công thức phân tử C₁₆H₁₀O₇.

- Phổ hồng ngoại (IR) chất EPE1, 3303 cm^{-1} (OH), 1713 cm^{-1} (δ -lactone carbonyl $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$), vòng thơm (1614 cm^{-1} , 1473 cm^{-1}), 1281 cm^{-1} (C-O).

- Phổ ^{13}C -NMR (DMSO, δ ppm) xuất hiện tín hiệu của 16 carbon kết hợp phổ DEPT cho thấy EPE1 có 1 nhóm $>\text{C}=\text{O}$; 4 carbon $=\text{CH}-$; 3 carbon $>\text{C}=\text{}$; 7 carbon $=\text{C}-\text{O}-$; 1 carbon $-\text{CH}_3$ (bảng 3.11), phổ ^{13}C -NMR chất EPE1

- Phổ ^1H -NMR (DMSO, δ ppm, 500 MHz) cho thấy có:

+ 1 mũi đơn tại 3,82 là 3 proton của 1 nhóm OCH_3 .

+ 2 mũi ở 7,16 (s); 7,24 (s) là tín hiệu các proton vòng thơm ở vị trí para.

+ 2 mũi ở 6,45 (d, $J = 2,5\text{ Hz}$) và 6,61 (d, $J = 2\text{ Hz}$) là tín hiệu proton vòng thơm

ở vị trí meta.

- Phổ ^{13}C -NMR (DMSO, δ ppm) cho thấy chất EPE1 có 16 mũi tín hiệu carbon, trong đó:

+ 1 mũi ở 158,85 là của nhóm δ lacton.

+ 4 mũi ở 98,08; 93,09; 98,77 và 104,45 là tín hiệu của 4 nhóm CH kề nối đôi (CH=).

+ 10 mũi ở 101,55; 157,65; 96,65; 162,16; 148,77; 145,31; 155,19; 144,22 và 113,63 là tín hiệu của 10 carbon tứ cấp kề nối đôi.

+ 1 mũi ở 55,63 là carbon của nhóm OCH_3 gắn vào vòng benzene.

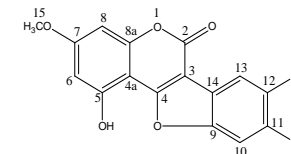
Phổ HMBC cho thấy nhóm OCH_3 này tương tác với C7 ($\delta = 162,16$).

- Phổ HMBC (bảng 3.12) cho thấy sự tương tác giữa H với C tại các vị trí C mà H có thể tương tác: $\text{H}_6 \rightarrow \text{C}_{4a}$, 7, 8, 8a; $\text{H}_8 \rightarrow \text{C}_{4a}$, 6, 7, 8a; $\text{H}_{10} \rightarrow \text{C}_9$, 11, 12, 14; $\text{H}_{13} \rightarrow \text{C}_3$, 9, 11, 12; $\text{H}_{15} \rightarrow \text{C}_7$.

Tóm lại, dựa vào các kết quả phổ cộng hưởng từ hạt nhân, các đặc trưng vật lý và so sánh với các tài liệu đã công bố chúng tôi nhận danh chất EPE1 là 5,11,12-Trihydroxy-7-methoxycoumestan (Wedelolactone).

Cấu trúc hóa học của EPE1:

5, 11, 12-Trihydroxy-7-methoxycoumestan
(1, 8, 9-Trihydroxy-3-methoxycoumestan)



3.8.2. Chất EPE2

3.8.2.1. Các đặc tính của EPE2

- Là chất rắn dạng bột màu vàng xanh nhạt, tan trong hỗn hợp EtOAc/MeOH.

- Mp = $355-357^\circ\text{C}$.

- Giải ly bằng hệ CHCl_3 : MeOH: Acid Acetic = 9:15:0.05 cho vết tròn màu xanh nhạt có $R_f = 0,62$

- Sắc kí lỏng hiệu năng cao chất EPE2

Trên sắc kí đồ cho peak có thời gian lưu 2.16 phút. Độ tinh khiết peak theo diện tích đạt 97,93%

3.8.2.2. Nhận danh cấu trúc EPE2

- Phổ IR: 3276 cm^{-1} (OH), 1710 cm^{-1} (δ -lactone carbonyl $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$), vòng thơm (1614 cm^{-1} , 1490 cm^{-1}), 1286 cm^{-1} (C-O)

- Phổ MS cho mũi chính m/z $[\text{M}-\text{H}]^- = 298,9$. Suy ra phân tử khối của EPE2 là 300 đvC ứng với công thức phân tử $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_7$

- Phổ ^{13}C -NMR (DMSO, δ ppm) xuất hiện tín hiệu của 15 carbon. Kết hợp phổ DEPT cho thấy EPE2 có 1 nhóm $>\text{C}=\text{O}$; 4 carbon $=\text{CH}-$; 3 carbon $>\text{C}=\text{}$; 7 carbon $=\text{C}-\text{O}-$.

- Phổ ^1H -NMR (DMSO, δ ppm, 500 MHz) cho thấy có:

– 4 mũi đơn ở δ_H 9,37; 9,41; 10,44 và 10,85 là tín hiệu proton của 4 nhóm OH.

– 2 mũi đơn ở δ_H 7,14 (s); 7,22 (s) là tín hiệu các proton vòng thơm ở vị trí *para*.

– 2 mũi đơn ở δ_H 6,36 và 6,39 là tín hiệu proton vòng thơm ở vị trí *meta*.

- Phổ ^{13}C -NMR và DEPT (DMSO, δ ppm) cho thấy chất EPE2 có 15 mũi tín hiệu carbon, trong đó:

– 1 mũi ở δ_C 159,32 là nhóm carbonyl của δ -lacton.

– 4 mũi ở δ_C 98,82; 94,54; 99,06 và 104,51 là tín hiệu của 4 nhóm CH kề nối đôi (CH=).

– 10 mũi ở δ_C 100,85; 157,79; 95,38; 155,31; 161,01; 154,99; 148,64; 145,10; 144,15 và 113,81 là tín hiệu của 10 carbon tứ cấp kề nối đôi. Trong đó có 7 carbon tứ cấp kề nối đôi quanh oxygen ở δ_C 144,15 (C_{12}), δ_C 145,10 (C_{11}), δ_C 148,64 (C_9), δ_C 154,99 (C_{8a}), δ_C 155,31 (C_5), δ_C 157,79 (C_4), δ_C 161,01 (C_7).

- Phổ HMBC cho thấy sự tương tác xa:

- Proton ở δ_H 6,39 (H_6) tương tác với δ_C 95,38 (C_{4a}) và δ_C 155,31; 161,01 nên 2 carbon này phải ở vị trí C_5 và C_7 .

- Proton ở δ_H 6,36 (H_8) tương tác với δ_C 95,38; 98,82; 154,99 và δ_C 161,01 nên các carbon này lần lượt là C_{4a} , C_6 , C_{8a} và C_7 . Từ đây suy ra carbon có δ_C 155,31 là ở vị trí C_5 .

- Proton ở δ_H 7,14 (H_{10}) tương tác với δ_C 113,81; 144,15; 145,10 và 148,64 nên các carbon này lần lượt là C_{14} , C_{12} , C_{11} và C_9 .

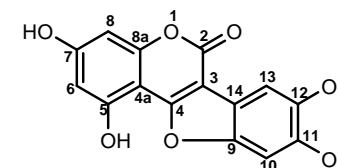
- Proton ở δ_H 7,22 (H_{13}) tương tác với δ_C 100,85; 148,64 và δ_C 144,15 nên các carbon này lần lượt là C_3 , C_9 và C_{12} . Từ đây suy ra carbon có δ_C 113,81 là ở vị trí C_{14} .

- Proton ở δ_H 9,37 (H_{11}) tương tác với δ_C 104,51; 145,10 (C_{11}) nên carbon có δ_C 144,15 ở vị trí C_{12} .

Tóm lại, dựa vào các kết quả phổ cộng hưởng từ hạt nhân, các đặc trưng vật lý và so sánh với các tài liệu đã công bố [15], [19], [34] chúng tôi nhận danh chất EPE2 là 5,7,11,12-tetrahydroxycoumestan (Demethylwedelolactone).

Cấu trúc hóa học của EPE2:

Demethylwedelolactone



3.9. ỨNG DỤNG THỰC TIỄN CỦA LUẬN VĂN

Sau khi tinh chế được chất EPE1 có độ tinh khiết cao, đã xác định nó là 5,11,12-Trihydroxy-7-methoxycoumestan (Wedelolactone).

Với chất đã tinh chế được xây dựng qui trình định tính, định lượng chất wedelolactone trong nguyên liệu cây cỏ mực bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. Sử dụng cho kiểm tra nguyên liệu đầu vào của công ty CP Dược Danapha.

Điều kiện sắc kí:

| | |
|---------------|--|
| Cột sắc kí | : Acclaim ®120 C18, 3 μ 4,6x100 mm |
| Detector DAD | : 351 nm |
| Thể tích tiêm | : 20 μ l |
| Nhiệt độ | : Nhiệt độ phòng thí nghiệm |
| Tốc độ dòng | : 1.0 ml/phút |
| Pha động | : Acetonitrin - nước cất (25:75) |

Chuẩn bị mẫu:

Cân chính xác 03 gam mẫu cỏ mực nguyên liệu đã xay nhỏ có kích thước 1-2 mm vào bình định mức 50 ml, bổ sung methanol đầy đến vạch, lắc siêu âm trong bể siêu âm trong vòng 30 phút, để nguội cho dung môi hạ xuống đế vạch, lọc qua giấy lọc, lọc qua màng lọc 0.45 μ m, được dung dịch thử.

Chuẩn bị mẫu chuẩn:

Cân chính xác 02 mg chất chuẩn wedelolactone vào bình định mức 50 ml, bổ sung methanol đầy đến vạch, lắc siêu âm trong bể siêu âm trong vòng 30 phút, để nguội cho dung môi hạ xuống đế vạch, lọc qua màng lọc 0.45 μ m, được dung dịch chuẩn

Tiến hành sắc kí:

Lần lượt tiêm 20 μ l các mẫu chuẩn và mẫu thử vào hệ thống sắc kí. Ghi lại sắc kí đồ, căn cứ vào thời gian lưu của peak chất wedelolactone để định tính. Nguyên liệu cỏ mực. Định lượng, căn cứ vào diện tích peak của mẫu chuẩn và mẫu thử, hàm lượng chất chuẩn, khối lượng chất chuẩn và mẫu thử tính ra nồng độ wedelolactone có trong mẫu.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

a) Kết luận

Sau nhiều tháng nghiên cứu về cây Cỏ mực có nguồn gốc ở Hòa vang Thành phố Đà Nẵng, chúng tôi đã đạt được một số kết quả như sau:

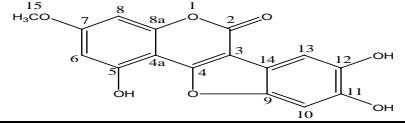
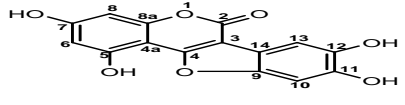
1- Đã tiến hành thực hiện các mô tả, vi phẫu, soi bột và các phản ứng hóa học, định danh đúng cây cỏ mực có tên khoa học: *Eclipta prostrata* (L.)L., Họ: Cúc (Asteraceae).

2- Đã tiến hành khảo sát chiết xuất cây cỏ mực trong các dung môi ether dầu hỏa (nhiệt độ sôi 60-90°C), n-hexan, chlorofooc, ethyl acetat, ethanol, methanol, nước. Đã tìm được phân đoạn chiết ethyl

acetat có nhóm các hoạt chất có hàm lượng các chất có độ phân cực trung bình và độ hấp thụ cực đại tại bước sóng khoảng 351nm.

3- Đã khảo sát được tỷ lệ dung môi - nguyên liệu và thời gian chiết xuất phù hợp để thực hiện chiết xuất.

4-Từ cao ethyl acetat đã phân lập và nhận danh được 2 chất

| Tên chất | CTPT | Cấu trúc |
|----------------------------------|--|---|
| Wedolelactone (EPE1) | C ₁₆ H ₁₀ O ₇ |  |
| Demethyl-wedolelactone (EPE2) | C ₁₅ H ₈ O ₇ |  |

5- Đã bước đầu xây dựng được qui trình phân tích định tính và định lượng bằng phương pháp HPLC cho thành phần wedelolactone có trong nguyên liệu cây cỏ mực.

b) Kiến nghị

1- Tiếp tục phân lập, tinh chế các chất có trong cây cỏ mực trong các phân đoạn dung môi chiết Ethanol, Methnol và trong nước. Xác định cấu trúc các chất tinh chế được.

2- Tiến hành phân lập khối lượng lớn hơn các chất wedelolactone và Demethylwedolelactone đủ để thử hoạt tính kháng oxy hóa, kháng sinh của wedolelactone, Demethylwedolelactone. Xác định được hoạt tính sinh học của các chất trên nhằm ứng dụng vào sản xuất thuốc uống dùng cho người.

3- Thẩm định qui trình phân tích định tính và định lượng hàm lượng Wedelolactone, Demethylwedolelactone có trong cây cỏ mực theo thời gian và theo vùng, xây dựng được tiêu chuẩn cho dược liệu cỏ mực làm cơ sở đánh giá chất lượng dược liệu.