

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

VÕ DOÃN HÙNG

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC MỘT SỐ
HỢP CHẤT HÓA HỌC TRONG MỘT SỐ DUNG MÔI CỦA
QUẢ CÂY CAU CHUỘT NÚI (PINANGA DUERREANA) THUỘC
HỌ CAU (ARECACEAE) Ở TỈNH HÒA BÌNH CỦA VIỆT NAM**

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

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Đà Nẵng – 2012

Công trình được hoàn thành tại
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

Người hướng dẫn khoa học: GS.TSKH. TRẦN VĂN SUNG

Phản biện 1: GS.TS. Đào Hùng Cường

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

Luận văn đã được bảo vệ trước hội đồng chấm Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ Khoa học họp tại Đại học Đà Nẵng vào ngày 13 tháng 11 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. Tính cấp thiết của đề tài

Ngày nay trong thế giới hiện đại, ngành công nghiệp phát triển kéo theo nhiều vấn đề về môi trường, sinh thái và sức khỏe con người. Mô hình bệnh tật vì thế cũng ngày càng phức tạp hơn. Những năm gần đây thế giới luôn phải đối mặt với những dịch bệnh nguy hiểm và có khả năng lan rộng thành đại dịch ở quy mô toàn cầu. Có thể lấy một số ví dụ điển hình như bệnh HIV/AIDS, ung thư, viêm đường hô hấp cấp SARS, cúm gia cầm H₅N₁, cúm lợn H₁N₁, bệnh tim mạch v.v... Thực tế đó đã thúc đẩy chúng ta luôn luôn phải tìm ra các loại thuốc chữa bệnh mới, có hiệu quả cao, tác dụng chọn lọc hơn và giá thành rẻ hơn để điều trị các bệnh hiểm nghèo.

Hóa học các hợp chất thiên nhiên nói chung và các hợp chất có hoạt tính sinh học nói riêng là một trong những lĩnh vực nghiên cứu đã và đang được nhiều nhà khoa học quan tâm. Từ xa xưa, con người đã khám phá sức mạnh của thiên nhiên và biết sử dụng nhiều loại thực vật nhằm mục đích chữa bệnh, đồng thời tránh được một số tác nhân có hại cho sức khỏe con người và được đặt lên hàng đầu. Do vậy, việc nghiên cứu các chất mang hoạt tính sinh học cao có trong các loài cây, cỏ có tác dụng thiết thực trong đời sống hàng ngày là vấn đề quan tâm của toàn xã hội.

Việt Nam là một nước có nguồn thực vật phong phú với khoảng 12000 loài, trong đó đã điều tra được 3850 loài được sử dụng làm thuốc thuộc 309 họ. Đa phần các cây mọc tự nhiên và chưa được nghiên cứu một cách đầy đủ, có hệ thống về mặt khoa học cũng như hoạt tính sinh học.

Họ cau (Arecaceae Schultz - Sch.) là một họ thực vật lớn. Trên thế giới họ này có khoảng 202 chi và 2600 loài [2]. Ở Việt Nam họ Cau cũng là một họ lớn, các loài trong họ này mọc hoang hoặc được trồng khắp nơi trong cả nước. Các loài trong họ cau ở Việt Nam có nhiều công dụng khác nhau. Đại đa số các loài của họ cau dùng để làm nhà, làm đồ mỹ nghệ, làm thực phẩm và thuốc. Có nhiều loài mới được phát hiện cho khoa học và là loài đặc hữu của Việt Nam. Chi Cau Chuột

(danh pháp khoa học: Pinanga) là một chi thực vật quan trọng và mọc phổ biến trong họ Cau. Chi này có nhiều loài đặc hữu của Việt Nam và nhiều loài được ứng dụng trong y học cổ truyền để điều trị ung thư, chữa các bệnh về máu, làm thuốc trừ giun sán ... Tuy nhiên, cho đến nay hầu như chưa có công trình nghiên cứu nào về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của các cây trong chi Cau Chuột của Việt Nam được công bố.

2. Mục đích nghiên cứu

- Xác định thành phần hóa học trong quả cau chuột núi
- Phân lập và xác định cấu trúc của một số cấu tử chính có trong quả cau chuột núi
- Thử hoạt tính sinh học của dịch chiết và từ các cấu tử đã tách được từ quả cau chuột núi.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

- Đối tượng: quả Cau Chuột Núi ở tỉnh Hòa Bình
- Phạm vi: nghiên cứu chiết tách, xác định thành phần hóa học và phân lập một số cấu tử chính có trong quả Cau Chuột Núi và dịch chiết từ quả cau chuột núi bằng các dung môi có độ phân cực khác nhau.

4. Phương pháp nghiên cứu

4.1. Nghiên cứu lý thuyết

Phương pháp nghiên cứu các hợp chất thiên nhiên, tổng quan các tài liệu về đặc điểm thực vật, thành phần hóa học, tác dụng sinh học của các thành phần thuộc cây cau, các phương pháp chiết tách và xác định thành phần hóa học của các hợp chất thiên nhiên và hoạt tính sinh học của chúng.

4.2. Phương pháp thực nghiệm

- Phương pháp chiết: ngâm, chiết, chưng cất, chiết Soxhlet bằng các dung môi có độ phân cực khác nhau.
- Phương pháp xác định các chỉ số vật lý và hóa học: xác định độ ẩm bằng phương pháp trọng lượng, xác định hàm lượng hữu cơ bằng phương pháp tro hóa mẫu, xác định hàm lượng kim loại bằng phương pháp

pháp AAS, các phương pháp xác định chỉ số vật lý tỷ trọng, chỉ số khúc xạ, các phương pháp xác định chỉ số axit, este, xà phòng hóa...

- Phương pháp xác định thành phần hóa học, định danh, tách và phân lập, xác định cấu trúc các cấu tử chính bằng các phương pháp, sắc ký cột (SKC), sắc ký bản mỏng (SKBM) sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS), ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, COSY, HMBC, HSQC, IR, MS.

5. Nội dung nghiên cứu

5.1. Nghiên cứu lý thuyết

- Từ các nguồn tài liệu khác nhau tìm hiểu về hợp chất thiên nhiên, các phương pháp chiết tách và xác định thành phần hóa học của các hợp chất thiên nhiên và hoạt tính sinh học của chúng.

- Sơ lược họ Cau và tác dụng của một số cây thuộc họ Cau.

- Sơ lược cây cau chuột núi, thành phần hóa học và ứng dụng của các bộ phận của cây cau chuột núi:

+ Đặc điểm, phân bố

+ Công dụng của cây cau chuột núi đối với đời sống

- Đặc điểm cây cau chuột núi.

5.2. Nghiên cứu thực nghiệm:

1. Nghiên cứu và xử lý nguyên liệu: Xử lý nguyên liệu: Sấy khô ở 60°C trong tủ sấy hoặc phơi trong bóng râm.

2. Thăm dò khả năng chiết các cấu tử trong quả cau chuột núi bằng các dung môi có độ phân cực khác nhau (n-Hexan, EtOAc, MeOH)

3. Xác định thành phần hóa học của các dịch chiết bằng phương pháp sắc ký bản mỏng từ đó chọn dung môi chiết tối ưu để nghiên cứu tiếp.

4. Tách và phân lập các cấu tử chính trong quả cau chuột núi bằng phương pháp vật lý: chạy sắc ký cột nhờ silicagen, sắc ký bản mỏng, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, COSY, HMBC, HSQC, IR, MS.

5. Thử hoạt tính sinh học của quả cau chuột núi: Các mẫu dịch chiết, cấu tử tách được đem thử khả năng kháng vi sinh vật kiểm định, hoạt tính gây độc tế bào.

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

Cung cấp thông tin khoa học về thành phần, cấu tạo một số hợp

chất chính và hoạt tính sinh học có trong dịch chiết quả cau chuột núi góp phần nâng cao giá trị sử dụng của cây cau.

7. Cấu trúc luận văn

Chương 1 – TỔNG QUAN

Chương 2 – CÁC NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM

Chương 3 – KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

1.1. KHÁT QUÁT VỀ HỌ CAU

1.1.1. Đặc điểm chung về hình thái của họ Cau (Areaceae)

1.1.2. Phân loại họ Cau

1.1.3. Một số chi trong họ Cau

1.1.4. Phân bố của họ Cau

1.1.5. Quá trình tiến hóa của họ Cau

1.1.6. Đặc tính thực vật

1.2. ĐẶC ĐIỂM CỦA MỘT SỐ CHI TRONG HỌ CAU (AREACEAE)

1.2.1. Chi Cọ (*Livistona* R.Br.)

a. Cây Cọ Xẻ (*Livistona chinensis*)

b. Cây Cọ, còn gọi là Kè Nam, cây Lá Gỏi, cây Lá Nón (*Livistona saribus*; *L. cochinchinensis* Mart.)

c. Cây Cọ Bắc Bộ (*L. tonkinensis*)

d. Cây Cọ Hạ Long (*L. halongensis*)

e. Ứng dụng của các loài cây thuộc chi Cọ (*Livistona*) trong y học dân gian

f. Tình hình nghiên cứu về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học các cây trong chi Cọ (*Livistona*) tại Việt Nam và trên thế giới

1.2.2. Chi Cọ Dầu (*Elaeis* Jacq. Select. Strip. Amer. Hist.)

Cây Cọ Dầu (*Elaeis guineensis* Jacq.)

1.2.3. Chi Dừa (*Cocos* L.)

Cây Dừa (*Cocos nucifera* L.)

1.2.4. Chi Thốt Nốt (*Borassus* L.)*Cây Thốt Nốt (*Borassus flabellifer* L.)***1.2.5. Chi Mây (*Calamus*)***a. Cây Mây Đồng Nai (*Calamus dongnaiensis* Pierre ex Becc.)**b. Cây Song Mật (*Calamus platyacanthus* Warb. ex Becc.)**c. Cây Mây Nambarien (*Calamus nambariensis* Becc.)***1.2.6. Chi Cau (*Areca* L.)***a. Cây Cau (*Areca catechu* L.)**b. Cây Cau Lào (*Areca laosensis* Becc L.)**c. Cây Cau Rừng (*Areca triandra* Roxb. ex Buch-Ham.) (Còn gọi là Cau Tam Hùng)***1.2.7. Chi Cau Chuột (*Pinanga* Blume)***a. Cây Cau Chuột Trung Bộ (*Pinanga annamensis* Magalon)**b. Cây Cau Chuột Ba Vì (*Pinanga baviensis* Becc.)**c. Cây Cau Chuột Nam Bộ (*Pinanga cochinchinensis* Blume)**d. Cây Cau Chuột Bà Na (*Pinanga banaensis* Magalon)**e. Cây Cau Chuột Núi (*Pinanga duperrana*)**f. Cây Cau Chuột Ngược (*Pinanga paradoxa* Scheff.)**g. Cây Cau Chuột bốn nhánh (*Pinanga quadrijugata* Gagn.)**h. Tình hình nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học các cây trong chi Cau Chuột (*Pinanga* Blume) tại Việt Nam và trên thế giới.***CHƯƠNG 2****CÁC NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM****2.1. NGUYÊN LIỆU. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU****2.1.1. Nguyên liệu**

Mẫu cây *Pinanga duperreana* được thu hái tại Hòa Bình vào tháng 8 năm 2009 và do CN. Ngô Văn Trại, Viện Dược liệu, Bộ Y tế xác định tên khoa học.

Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại phòng tổng hợp hữu cơ, Viện Hoá học – Viện KHCN Việt Nam số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội.

Thân cây sau khi thu hái được rửa sạch, phơi, sấy khô rồi xay thành bột để chiết lần lượt với các dung môi n-hexan, EtOAc và MeOH.

2.1.2. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu**a. Hóa chất**

Sắc kí lớp mỏng sử dụng bản mỏng nhôm tráng sẵn silicagel Merck 60GF₂₅₄, độ dày 0,2mm và bản mỏng ngược pha RP-18. Sắc ký cột thường: silicagel cỡ hạt 197 – 400 mesh (0,040 – 0,063mm) cho cột đầu. Sắc ký cột nhanh: silicagel cỡ hạt 70 – 200 mesh cho cột tiếp theo. Sắc ký cột pha đảo: RP – 18. Sắc ký lọc gel: Sephadex LH – 20 Merck. Dung môi được cất lại qua cột Vigreux trước khi sử dụng.

Phân lập các chất bằng phương pháp sắc kí cột với chất hấp phụ là silicagel cỡ hạt 0,040 – 0,063mm Merck và Sephadex LH-20.

Thuốc thử phun lên bản mỏng chủ yếu sử dụng Vanilin 1% trong dung dịch metanol – H₂SO₄ đặc, sau đó sấy ở nhiệt độ khoảng 110⁰C.

Dung môi dùng chạy cột và triển khai sắc kí lớp mỏng bao gồm n-hexan, CH₂Cl₂, EtOAc và MeOH loại tinh khiết đã được cất lại qua cột Vigreux trước khi sử dụng để loại bỏ tạp chất, chất làm mềm.

Một số hoá chất khác cũng được sử dụng như CH₃COOH, HCl, pyridin, anhydrit acetic ...

b. Thiết bị

Các thiết bị xác định cấu trúc chất:

- Phổ khối HP 5989B MS Engine, LC/MSD Agilent của Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR, ¹³C-NMR đo trên máy Bruker Avance-500 MHz, chất nội chuẩn là TMS cho ¹H-NMR và tín hiệu dung môi (DMSO) cho ¹³C-NMR của Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Phổ hồng ngoại (FT-IR) đo dưới dạng viên nén KBr trên trên máy quang phổ IMPACT 410 của hãng Nicolet, Hoa Kỳ tại Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Đèn tử ngoại (UV BIOBLOCK) bước sóng λ = 254nm và 365nm dùng để soi bản mỏng đặt tại phòng tổng hợp hữu cơ, Viện Hóa

học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Phổ khối phân giải cao HR – ESI – MS được đo trên máy FT – ICR – MS của hãng Varian (Hoa Kỳ) tại Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Ngoài ra còn dùng một số trang thiết bị khác như máy quay cắt chân không của hãng Buchi Thụy Sĩ, máy sấy, máy siêu âm, các dụng cụ thủy tinh, v.v... của CHLB Đức.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp chiết mẫu thực vật

Mẫu thực vật thường được chiết theo hai cách:

- *Cách thứ nhất:* Chiết mẫu với dung môi là MeOH (thường sử dụng máy siêu âm và áp dụng cho lượng mẫu không quá 500g trong mỗi lần chiết) ở nhiệt độ thường hoặc có thể tăng nhiệt độ. Thực hiện chiết mẫu từ 3 đến 4 lần. Dịch chiết thu được cất loại dung môi bằng máy quay cắt chân không dưới áp suất giảm thu được cao chiết MeOH tổng. Cao chiết tổng này được chế thêm nước và chiết phân lớp lần lượt với n-hexan, EtOAc và n-Metanol (MeOH) bằng phễu chiết. Với mỗi loại dung môi ta cũng thực hiện chiết 3 đến 4 lần. Các dịch chiết được cất loại dung môi sẽ thu được các cao chiết tương ứng cao n-hexan, cao EtOAc, cao n-Metanol (MeOH) để tiếp tục nghiên cứu.

- *Cách thứ hai:* Mẫu thực vật khô được chiết lần lượt với từng loại dung môi n-hexan, EtOAc và MeOH. Với mỗi loại dung môi được chiết từ 3 đến 4 lần. Cất loại dung môi bằng máy quay cắt chân không dưới áp suất giảm sẽ thu được các cao chiết tương ứng để tiếp tục nghiên cứu.

Trong khuôn khổ đề tài này chúng tôi thực hiện việc chiết mẫu theo cách thứ hai.

2.2.2. Phương pháp tách và tinh chế chất

Các cao chiết trong các dung môi khác nhau thu được được tách và tinh chế bằng phương pháp sắc kí cột kết hợp với sắc kí lớp mỏng với các hệ dung môi thích hợp. Sắc kí cột gồm sắc kí cột thường và sắc kí cột nhanh (flash chromatography) sử dụng silicagel. Đối với các chất

phân cực có thể sử dụng Sephadex LH-20 hoặc ngược pha RP-18. Trường hợp cần thiết có thể chạy cột lặp lại nhiều lần hoặc dùng phương pháp kết tinh phân đoạn, kết tinh lại để tinh chế chất. Kiểm tra độ sạch của các chất cũng như theo dõi quá trình tách chất trên cột bằng sắc kí lớp mỏng với hệ dung môi thích hợp.

2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các chất

Việc xác định cấu trúc hóa học của các chất sạch được thực hiện thông qua việc kết hợp các phương pháp phổ hiện đại như phổ hồng ngoại (FT-IR), phổ khối (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều (1D và 2D NMR) như $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, COSY, HSQC, HMBC. Các loại phổ được đo tại Viện Hoá học – Viện KHCN Việt Nam.

2.2.4. Phương pháp thăm dò hoạt tính sinh học

a. *Hoạt tính gây độc tế bào*

b. *Phương pháp thử hoạt tính kháng oxy hóa*

2.2.5. Phương pháp lựa chọn chất hấp phụ và dung môi chạy cột sắc kí

a. *Chọn chất hấp phụ*

b. *Lựa chọn dung môi chạy cột sắc kí*

2.2.6. Tỷ lệ giữa lượng mẫu chất cần tách với kích thước cột

a. *Tỷ lệ giữa lượng mẫu chất cần tách với lượng silicagel sử dụng*

b. *Tỷ lệ giữa chiều cao lượng silicagel và đường kính trong của cột sắc kí*

2.2.7. Cách nạp silicagel vào cột

a. *Nạp silicagel ở dạng sệt*

b. *Nạp silicagel ở dạng khô*

2.2.8. Cách nạp mẫu vào cột

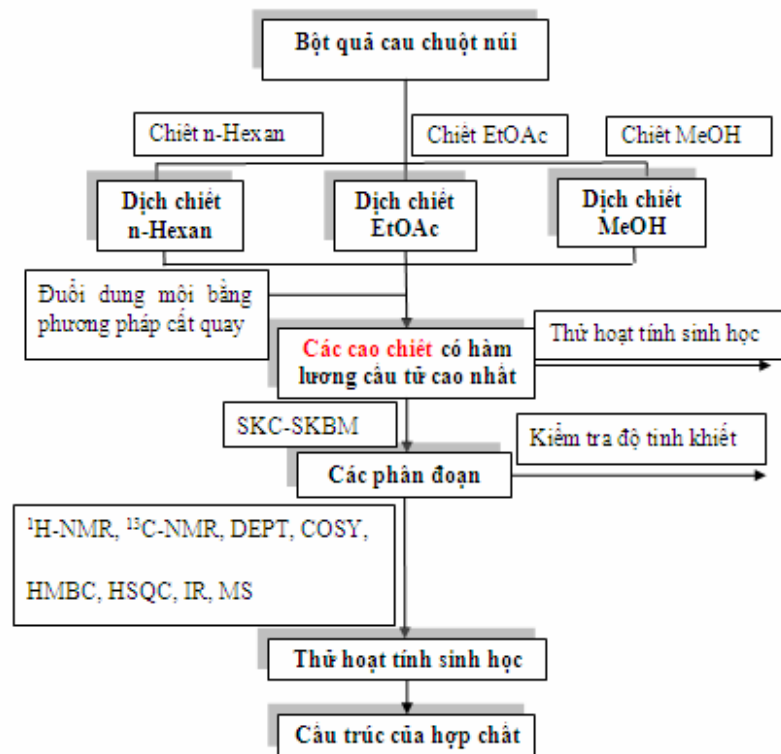
a. *Phương pháp khô*

b. *Phương pháp ướt*

2.3. CÁC NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM

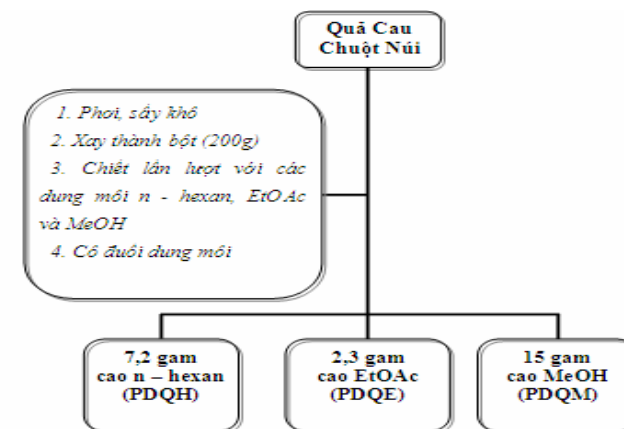
2.3.1. Sơ đồ thực nghiệm

Quá trình thực nghiệm được mô tả theo hình 2.4



Hình 2.4. Sơ đồ thực nghiệm

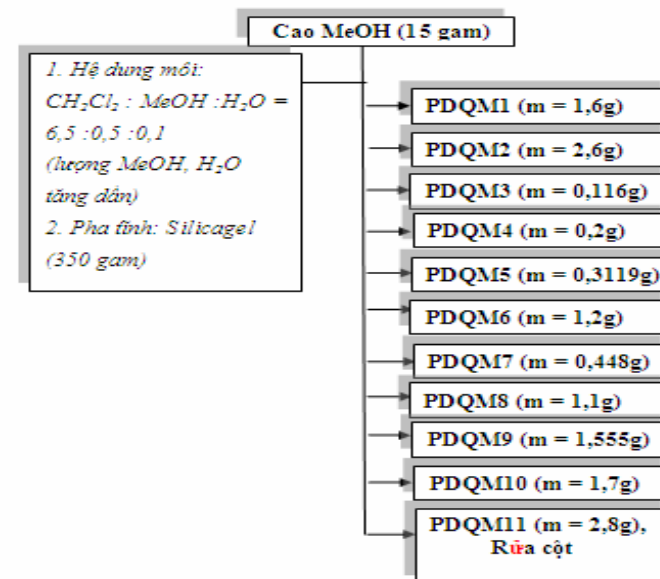
Nguyên liệu là quả Cau Chuột Núi được rửa sạch, sấy khô rồi đem xay thu được 200 gam bột. Nguyên liệu được chiết ngâm lần lượt với các dung môi n-hexan, EtOAc và MeOH. Mỗi loại dung môi được chiết ngâm 3 đến 4 lần trong thời gian 2 ngày, thu được dịch chiết và phân cận. Phần dịch chiết được cất quay dưới áp suất thấp để đuổi dung môi. Phần dung môi thu được khi cô quay ở lần chiết trước được tận dụng để chiết tiếp lần sau. Phần cao chiết thu được bao gồm: 7,2 gam cao n-hexan, 2,3 gam cao EtOAc và 15 gam cao MeOH.



Hình 2.5. Sơ đồ chiết mẫu quả Cau Chuột Núi

Phần cao n-hexan (lông) dạng dầu béo sánh, màu vàng da cam đang được tiếp tục chạy cột sắc kí đồng thời kết hợp với chạy GC – MS để xác định và định danh thành phần hoá học

2.3.2. Chạy cột sắc kí phần cao MeOH



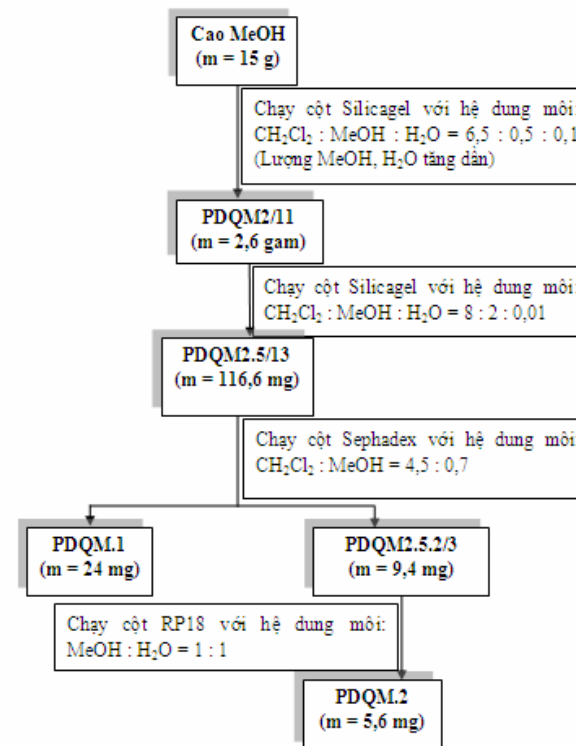
Hình 2.6. Sơ đồ phân lập và tinh chế chất từ cao MeOH

Phần cao MeOH lấy ra 15 gam được hoà tan hoàn toàn vào dung môi MeOH trong bình cầu, sau khi châm bản mỏng để tìm hệ dung môi thích hợp để chạy cột được thêm silicagel (khoảng 10 gam) vào quay cát dưới áp suất thấp đến khô hoàn toàn để chất gắn đều lên silicagel. Làm toại mịn phần silicagel đã gắn mẫu bằng cối và chày sứ để nạp vào cột sắc kí.

Chạy cột Silicagel với hệ dung môi EtOAc : MeOH : H₂O = 6,5 : 0,5 : 0,1 lượng MeOH và H₂O tăng dần, thu được 11 phân đoạn, kí hiệu từ PDQM1 đến PDQM11 với tổng lượng chất 13,6389 gam.

Dựa vào sắc kí bản mỏng các phân đoạn khác, chúng tôi đã chọn phân đoạn PDQM2 để chạy cột. Tiến hành chạy cột Silicagel đối với phân đoạn PDQM2 (được cất quay dưới áp suất thấp để loại bỏ dung môi thu được khối lượng chất là 2,6 gam): Với hệ dung môi CH₂Cl₂: MeOH : H₂O = 8 : 2 : 0,01 (lựa chọn hệ dung môi dựa vào sắc kí bản mỏng) và pha tĩnh là Silicagel (Merck, 0,04 – 0,063 mm) có khối lượng 40 gam. Thu được 13 phân đoạn, kí hiệu PDQM2.1 đến PDQM2.13 với tổng lượng chất là 2,1555 gam.

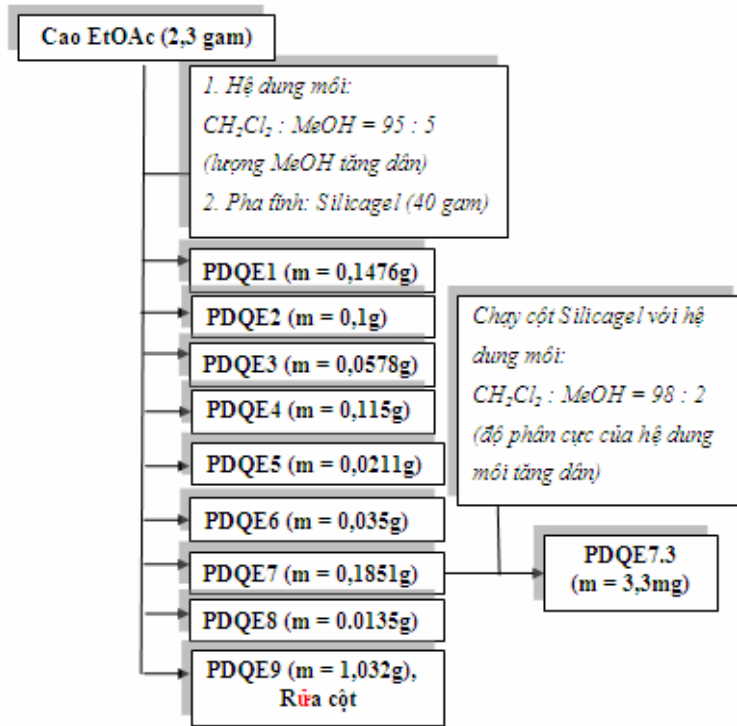
Chạy cột Sephadex đối với phân đoạn PQDM2.5 (được chọn dựa vào sắc kí bản mỏng, cất quay dưới áp suất thấp để loại bỏ dung môi thu được khối lượng chất là 116,6mg) với hệ dung môi CH₂Cl₂: MeOH = 4,5 : 0,7 (lựa chọn hệ dung môi dựa vào sắc kí lớp mỏng), thu được ba phân đoạn kí hiệu PDQM2.5.1 đến PDQM2.5.3. Kiểm tra sắc kí bản mỏng ta chọn được hai phân đoạn PDQM2.5.1 và PDQM2.5.2 để tiến hành chạy cột phân lập chất : Đối với phân đoạn PDQM2.5.1 được cất quay dưới áp suất thấp thu được khối lượng 24mg chất bột vô định hình, màu xám. Kiểm tra bằng bản mỏng ngược pha với hệ dung môi MeOH : H₂O = 1 : 1; soi đèn UV có màu tím, phun thuốc thử Vanilin/H₂SO₄ và hơi nóng cho một vết tròn (R_f = 0,4) có màu da cam. Kí hiệu chất là **PDQM.1**. Chất **PDQM.1** được đo phổ IR (trong KBr), phổ NMR (dung môi MeOD) và phổ MS để xác định cấu trúc.



Hình 2.7. Sơ đồ phân lập và tinh chế chất sạch của phân đoạn PDQM2 của cao MeOH

2.3.3. Chạy cột sắc kí phần cao EtOAc

- Khối lượng mẫu: 2,3 gam
- Khối lượng silicagel cho vào cột sắc kí: 40 gam
- Hệ dung môi ban đầu: CH₂Cl₂ : MeOH = 95:5
- Nạp mẫu bằng phương pháp khô.



Hình 2.8. Sơ đồ phân lập và tinh chế chất sạch từ cao EtOAc

- Chạy cột sắc kí với hệ dung môi $CH_2Cl_2 : MeOH = 95 : 5$, độ phân cực của hệ dung môi tăng dần và pha tĩnh là Silicagel thu được 9 phân đoạn, kí hiệu PDQE1 đến PDQE9 với tổng lượng chất là 1,7071g.

- Phân đoạn PDQE7 (m = 185,1mg): Tiến hành chạy cột Silicagel với hệ dung môi ban đầu $CH_2Cl_2 : MeOH = 98 : 2$ (khoảng 200ml), tiếp theo là tỷ lệ $CH_2Cl_2 : MeOH = 95 : 5$ (khoảng 200ml), sau đó là tỷ lệ $CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1$ (khoảng 200ml) và cuối cùng là tỷ lệ $CH_2Cl_2 : MeOH = 1 : 1$ (rửa cột). Thu được phân đoạn PDQE7.3 cất quay dưới áp suất thấp thu được 3,3 mg tinh thể hình kim, màu trắng, chất này tan tốt trong hệ dung môi MeOH/ $CHCl_3$. Kiểm tra bằng bản mỏng ngược pha với hệ dung môi MeOH : $H_2O = 1 : 1$, soi đèn UV (không hiện UV) và phun thuốc thử Vanilin/ H_2SO_4 thấy một vết tròn

($R_f = 0,4$) có màu tím. Kí hiệu chất là **PDQE7.3**. Chất **PDQE7.3** đem đi đo phổ IR (trong KBr), phổ NMR (dung môi $CDCl_3$ & MeOD) và phổ MS để xác định cấu trúc.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ THỬ HOẠT TÍNH SINH HỌC

3.1.1. Hoạt tính chống oxy hoá

Dịch chiết trong n-Hexan (PDQN) và dịch chiết trong methanol (PDQM) của quả cau chuột núi được thăm dò hoạt tính chống oxy hóa. Vì theo tài liệu tham khảo thì quả của các loài cau thường chứa nhóm chất flavonoid là những chất có khả năng chống oxy hóa cao. Kết quả thử hoạt tính chống oxy hoá được đưa ra ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả thử hoạt tính chống oxy hoá.

Nồng độ chất thử ($\mu g/ml$)	% ức chế hoạt động của enzym	
	PDQN	PDQM
128	28	100
32	26	44
8	19	19
2	6	0
0,5	1	0
IC_{50} ($\mu g/ml$)	> 128	42,29

Theo kết quả ở bảng 3.1 ta thấy rằng dịch chiết quả Cau Chuột núi trong MeOH (PDQM) có hoạt tính ức chế hoạt động của enzym *peroxydaza* với nồng độ ức chế 50% IC_{50} là 42,29 $\mu g/ml$. Các dịch chiết khác không có hoạt tính. Các chất có $IC_{50} > 128 \mu g/ml$ được coi là không có hoạt tính. Đây cũng là hoạt tính vào loại khá đối với một dịch chiết thực vật.

3.1.2. Hoạt tính gây độc tế bào

Để có kết quả về hoạt tính của quả cau chuột núi, chính tôi tiến hành thử hoạt tính gây độc tế bào, tức là hoạt tính ức chế sự sinh trưởng của bốn dòng tế bào ung thư người của hai dịch chiết trên.

Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của các dịch chiết từ quả Cau Chuột núi được đưa ra ở bảng 3.2.

Theo kết quả ở bảng 3.2 ta thấy, dịch chiết quả Cau Chuột núi trong MeOH có hoạt tính với 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm là: KB (ung thư biểu mô), LU (ung thư phổi), MCF-7 (ung thư vú) và Hep.G2 (ung thư gan) với giá trị IC₅₀ lần lượt là: 70,42; 114,66; 79,9; 48,92 $\mu\text{g/ml}$ tương ứng. Các dịch chiết khác không có hoạt tính ức chế các dòng tế bào ung thư thử nghiệm.

Bảng 3.2. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào

Số TT	Tên mẫu	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)			
		KB	LU	MCF-7	Hep. G2
1	PDQN	> 128	> 128	> 128	> 128
2	PDQM	70,42	114,66	79,9	44,92

Qua các thử nghiệm hoạt tính sinh học ta thấy dịch chiết MeOH từ quả Cau Chuột núi có hoạt tính gây độc tế bào tương đối tốt. Đồng thời, nó cũng có hoạt tính kháng oxi hoá và kháng khuẩn. Bởi vậy rất đáng quan tâm nghiên cứu kỹ dịch chiết này. Chúng tôi tiến hành tách các thành phần hóa học từ dịch chiết MeOH và xác định cấu trúc của chúng.

3.2. XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CHẤT TÁCH ĐƯỢC

3.2.1. Số liệu phổ của các chất tách được

15 gam cặn chiết MeOH được tách qua cột silicagel với hệ dung môi rửa giải ban đầu là CH₂Cl₂ : MeOH : H₂O = 65 : 0,5 : 0,1 sau đó tăng dần lượng MeOH và H₂O đã thu được phân đoạn chứa chất **PDQM.1** với lượng 1,6 gam. Qua nhiều lần tinh chế lại qua cột silicagel và cột sephadex LH20 (sắc kí lọc gel) và kết tinh đã thu được 24 mg chất **PDQM.1**. Các số liệu phổ của chất này được đưa dưới đây.

a. Chất **PDQM.1**

Chất **PDQM.1** là chất bột vô định hình, màu xám, có R_f = 0,4 (hệ dung môi: EtOAc : MeOH : H₂O = 6,5 : 0,5 : 0,1), hàm lượng 0,012% (so với mẫu khô).

- Phổ FT-IR (KBr) ν^* (cm⁻¹): 3407 (OH), 2924, 1612, 1518, 1463, 1287, 1141.
- Phổ EI-MS: m/z = 290 (42) [M]⁺, 152 (40), 138 (100), 123,110, 97, 83.
- Phổ ¹H – NMR (500 Hz, MeOD): 6,74, dd (8,1; 1,9); 6,79, d (8,1); 6,86, dd (1,9); 5,88, d (2,3); 5,95, d (2,3); 2,87, dd (16,1; 5,4); 2,53, dd (16,1; 8,1); 3,99, m; 4,59, d (7,5).
- Phổ ¹³C – NMR (125 Hz, MeOD) 82,79 (CH); 68,8 (CH); 28,5 (CH₂); 157,6 (C); 96,3 (CH) 157,8 (C); 132,2 (C); 156,9 (C); 100,9 (C); 95,5 (CH); 115,3 (CH); 146,2 (C); 116,1 (CH); 146,2 (C); 120,1 (CH).

b. Chất **PDQE7.3**

Chất **PDQE7.3** thu được từ dịch chiết etyl axetat của quả cau chuột núi qua sắc kí cột trên silicagel lặp lại hai lần với hệ dung môi là CH₂Cl₂ : MeOH với lượng MeOH tăng dần. Dưới đây là số liệu phổ của chất **PDQE7.3**.

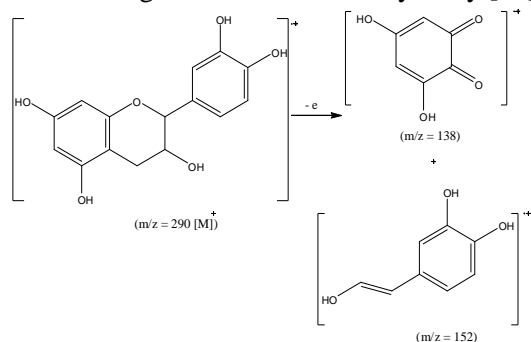
- Phổ MS (EI): Cho m/z = 576 [M]⁺
- Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃ & MeOD) δ (ppm): 0,65 (3H, s); 0,80 (3H, d, J = 6,9); 0,81 (3H, d, J = 6,8); 0,90 (3H, d, J = 6,5); 0,96 (6H, brs); 1,00 (3H, d, J = 6,7); 1,23 (3H, s, H-19); 1,38-1,41 (m, 5H); 1,43-1,49 (m, 4H); 1,62-1,49 (m, 1H); 1,90-1,97 (3H); 2,10-2,17 (1H, m); 2,34-2,38 (1H, m), 2,87-2,91 (1H, m), 3,05-3,08 (2H, m); 3,10-3,14 (2H, m); 3,38-3,48 (2H, m); 3,64 (1H, dd, J = 5,5; 10,1); 4,22 (1H, d, J = 7,8); 4,39 (1H, t, J = 5,7); 4,83 (3H, m); 5,32 (1H, brs).
- Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃ & MeOD) δ (ppm): 11,62; 11,73; 18,56; 18,90; 19,04; 19,65; 20,54; 22,58; 23,80; 25,45; 27,72; 29,06; 29,49; 31,32; 31,38; 33,31; 35,42; 36,17; 36,78; 38,27; 39,64; 41,81; 45,11; 49,57; 55,40; 56,13; 61,07; 70,09; 73,43; 76,69; 76,74; 76,90; 100,75; 121,13; 140,42.

3.2.2. Xác định cấu trúc của các chất tách được [13], [20]

a. Chất PDQM.1

Chất **PDQM.1** là hợp chất phát quang dưới đèn tử ngoại có bước sóng $\lambda = 254$ và 366 nm, gợi ý đây là một flavonoid chất này thu được dưới dạng bột vô định hình, màu xám. Phổ hồng ngoại của chất **PDQM.1** cho thấy sự có mặt của nhóm hydroxyl qua dải hấp thụ ở 3407 cm^{-1} ; pic của vòng thơm qua các dải hấp thụ ở 3079 cm^{-1} , 1634 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} và 1509 cm^{-1} ; pic của liên kết C-O ở 1256 cm^{-1} .

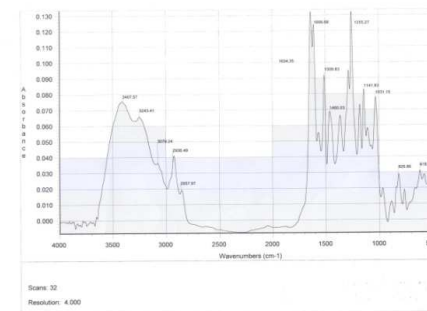
Công thức phân tử của hợp chất **PDQM.1** được xác định là $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ dựa vào pic ion phân tử ở $m/z: 290$ $[\text{M}]^+$ trên phổ ESI – MS và các dữ kiện phổ ^1H – NMR, ^{13}C – NMR (bảng 3.3). Phổ EI – MS của **PDQM.1** có các pic cơ bản ở $m/z = 138$ và $m/z = 152$ tương ứng các mảnh của vòng A và vòng B được hình thành từ phản ứng Retro – Diels – Alder (hình 3.1), đây là sự phân mảnh đặc trưng của các hợp chất flavan – 3 – ol mà ở mỗi vòng A và B có 2 nhóm hydroxy [26].



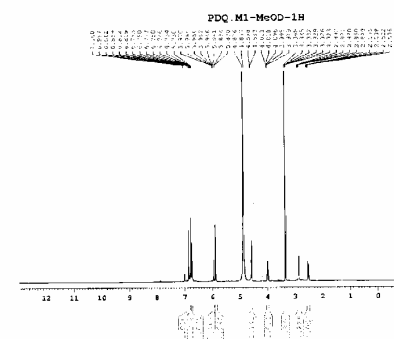
Hình 3.1. Sơ đồ phân mảnh của hợp chất **PDQM.1** bởi phản ứng Retro – Diels – Alder

Khung flavan – 3 – ol của hợp chất **PDQM.1** còn được thấy rõ qua các tín hiệu trên phổ ^1H – NMR gồm một d ở $\delta_{\text{H}} 4,60$ ($J = 7,5$ Hz; H – 2), hai dd ở $\delta_{\text{H}} 2,53$ ($J = 16,1; 7,1$ Hz; H – $4ax$), và $\delta_{\text{H}} 2,87$ ($J = 16,1; 5,4$ Hz; H – $4eq$), một m ở $\delta_{\text{H}} 3,99$ (H – 3) và 5 proton thơm gồm: Cặp d ở $\delta_{\text{H}} 5,96$ (1H) và $5,88$ (1H) có cùng hằng số tương tác ($J = 2,3$ Hz) cho thấy hai proton này ở vị trí *meta* với nhau (H – 6 và H – 8). Như vậy vòng A có hai nhóm thế ở C – 5 và C – 7. Các tín hiệu d ở

$\delta_{\text{H}} 6,79$ ($J = 8,1$ Hz; H – 5'), d ở $\delta_{\text{H}} 6,86$ ($J = 1,9$ Hz; H – 2') và dd ở $\delta_{\text{H}} 6,74$ ($J = 8,1; 1,9$ Hz, H – 6') cho thấy vòng B có hai nhóm thế ở C – 3' và C – 4'.



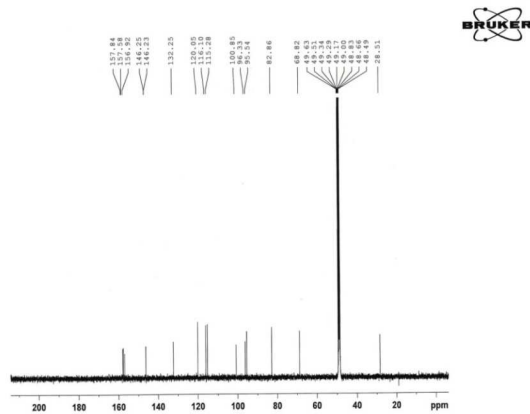
Hình 3.2. Phổ IR của catechin ghi trong phổ KBr



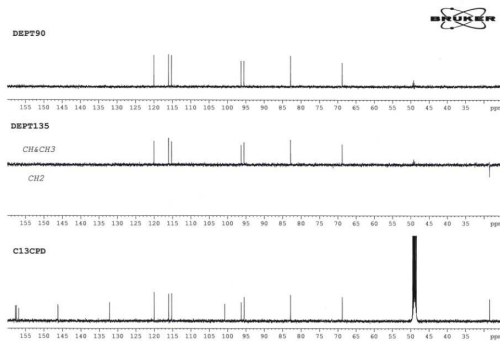
Hình 3.3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H -NMR của catechin

Phổ ^{13}C – NMR của chất **PDQM.1** có tín hiệu của 15 nguyên tử cacbon với những đặc trưng của khung flavan – 3 – ol gồm: 7 tín hiệu của cacbon bậc 4 ở $\delta_{\text{C}} 132,2 – 157,8$; 7 tín hiệu của nhóm methin trong đó có 5 tín hiệu của 5 methin nhân thơm ở $\delta_{\text{C}} 95,5 – 120,0$ và 2 tín hiệu của 2 nhóm oxymethin (C – 2, C – 3) ở $\delta_{\text{C}} 68,8$ và $82,6$; 1 tín hiệu của nhóm metylen (C – 4) ở $\delta_{\text{C}} 28,5$.

21



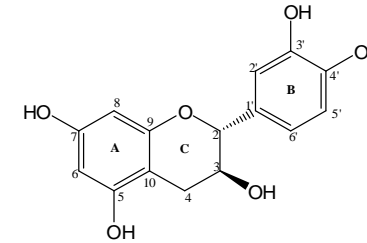
Hình 3.4. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C -NMR của catechin



Hình 3.5. Phổ ^{13}C -NMR – DEPT của của catechin

Các số liệu phổ của chất **PDQM.1** được chỉ ra ở bảng 3.3. Qua phân tích các dữ kiện phổ và so sánh với số liệu đã công bố cho catechin [30], cấu trúc của chất **PDQM.1** được xác định là Catechin.

22



Catechin là thành phần cơ bản tạo nên một loạt các oligome và polime thiên nhiên trong nhóm tannin. Catechin có nhiều trong chè xanh và trong các loại hoa quả cùng với các hợp chất polyphenol khác. Catechin tồn tại phổ biến trong tự nhiên và có nhiều trong các loại nhựa cây. Catechin có nhiều hoạt tính sinh học quý, đặc biệt là dẫn suất epigallo catechin gallat (EGCG) của nó có tác dụng kháng ung thư rất mạnh. Người ta tách EGCG từ chè xanh để làm thuốc.

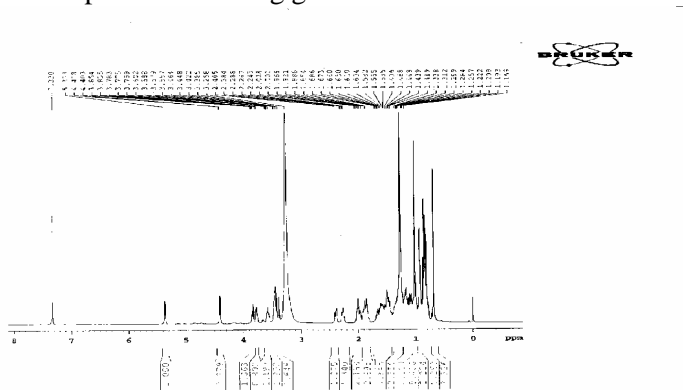
Bảng 3.3. Số liệu phổ ^1H – NMR, ^{13}C – NMR của chất **PDQM.1** và chất so sánh [30]

Vị trí của C	Chất PDQM.1		Chất so sánh Catechin [30]	
	δC	δH	δC	δH
2	82,79 (CH)	4,59; d (7,5)	82.79	4.60; d (7.5)
3	68,8 (CH)	3,99; m	68.77	4.00; m
4	28,5 (CH ₂)	<i>ax</i> 2,53; dd (16,1; 8,1) <i>eq</i> 2,87; dd (16,1; 5,4)	28.45	2.53; dd (16.1, 8.1) 2.87; dd (16.1, 5.4)
5	157,6 (C)	-	156.87	-
6	96,3 (CH)	5,95; d (2,3)	95.52	5.88; d (2.3)
7	157,8 (C)	-	157.52	-
8	95,5 (CH)	5,88; d (2,3)	96.31	5.96; d (2.3)
9	156,9 (C)	-	157.77	-
10	100,9 (C)	-	100.83	-
1'	132,2 (C)	-	132.19	-
2'	115,3 (CH)	6,86; dd (1,9)	115.25	6.86; d (1.9)
3'	146,2 (C)	-	146.19	-
4'	146,2 (C)	-	146.17	-
5'	116,1 (CH)	6,79; d (8,1)	116.10	6.79; d (8.1)
6'	120,1 (CH)	6,74; dd (8,1; 1,9)	120.04	6.74; dd (8.1, 1.9)

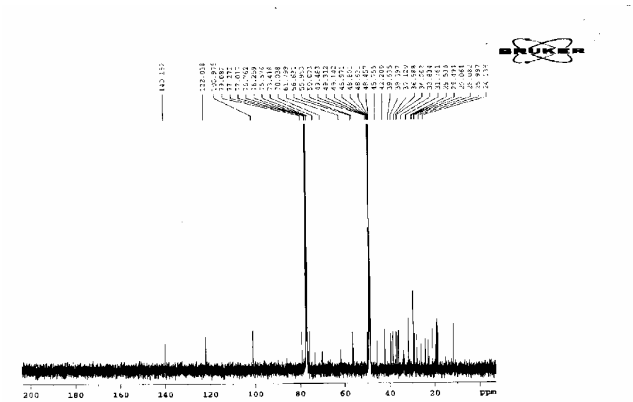
b. Chất PDQE7.3: β -sitosterol-3-O- β -glucopyranoside (β -Sitosterolglucoside)

Chất (3) thu được ở dạng bột mịn, màu trắng, kết tinh trong methanol. Nhiệt độ nóng chảy 269-270°C. Sắc ký lớp mỏng cho 1 vết có $R_f = 0,41$ khi triển khi bản mỏng trong hệ dung môi ethyl acetate: methanol (9:1).

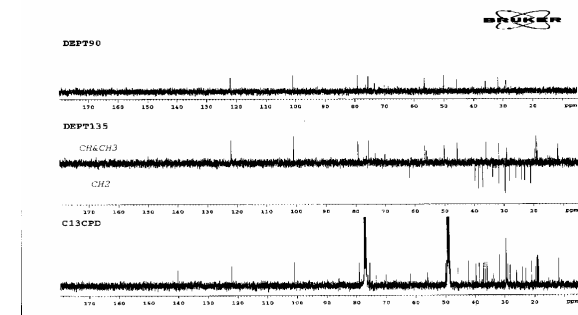
Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO), δ (ppm): 1,0 (3H, s, H19); 5,32 (1H, m, H6); 3,56 (1H, m, H3). Phổ $^1\text{H-NMR}$ xác nhận sự có mặt của một proton liên kết đôi ở 5,32 ppm; nhóm proton của đường ở vùng 3,02 - 4,43 ppm; 6 tín hiệu proton của methyl đặc trưng của hợp chất sterol trong vùng 0,86-1,08 ppm. Trong phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ DEP cho thấy có 35 tín hiệu của nguyên tử carbon, trong đó có 6 tín hiệu dạng carbon gắn với nhóm hydroxy (vùng từ 61,08- 76,89 ppm) bao gồm 5 nhóm hydroxyl methin và 1 nhóm hydroxyl methylen; có 2 tín hiệu ở $\delta = 140,17$ và 121,82 ppm thuộc về liên kết đôi tại vị trí C5 và C6; có 6 nhóm methyl, 12 nhóm methylen, 14 nhóm methin, 3 nhóm C tứ cấp. Tại vị trí $\delta = 100,77$ ppm là carbon anomeric của phân tử đường glucosid.



Hình 3.6. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ của β -Sitosterolglucoside

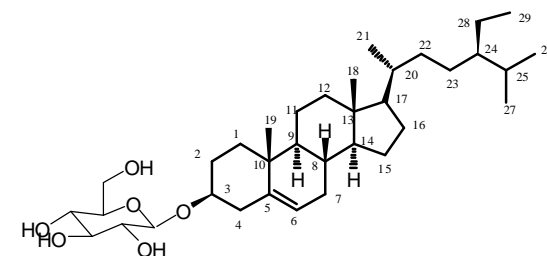


Hình 3.7. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^{13}\text{C-NMR}$ của β -Sitosterolglucoside



Hình 3.8. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ – DEPT của β -Sitosterolglucoside

Các số liệu phổ của chất PDQE7.3 được chỉ ra ở bảng 3.4. Qua phân tích các dữ kiện phổ và so sánh với số liệu đã công bố cho β -Sitosterolglucoside [7], cấu trúc của chất PDQE7.3 được xác định là β -sitosterol-3-O- β -glucopyranoside.



β - Sterol và β - Sitosterol glucosid là những phytosterol (sterol thực vật) tồn tại khá phổ biến trong giới thực vật. Chúng được dùng làm nguyên liệu để sản xuất thuốc đặc biệt là thuốc gốc steroid. Bản thân chúng cũng có những hoạt tính kháng viêm và ức chế khối u.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

Trong khuôn khổ đề tài luận văn thạc sĩ, chúng tôi mới chỉ nghiên cứu được thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của cây *Pinanga duperrana* với các kết quả đạt được như sau:

1.1. Thăm dò hoạt tính sinh học

Các dịch chiết n-hexan (PDQN), EtOAc (PDQE) và MeOH (PDQM) từ quả Cau Chuột Núi (*Pinanga duperrana*) đã được thử hoạt tính sinh học.

Ở hoạt tính chống oxi hoá thì chỉ có dịch chiết từ MeOH (PDQM) có hoạt tính ức chế hoạt động của enzym *peroxydaza* với nồng độ ức chế 50% và với IC_{50} là 42,29 $\mu g/ml$. Các dịch chiết khác không có hoạt tính (Các chất có $IC_{50} > 128 \mu g/ml$ được coi là không có hoạt tính).

Ở hoạt tính gây độc tế bào, chỉ có dịch chiết MeOH từ quả Cau Chuột núi có hoạt tính gây độc tế bào tương đối tốt. Đồng thời, nó cũng có hoạt tính kháng oxi hoá và kháng khuẩn. Có hoạt tính đối với 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm là: KB (ung thư biểu mô), LU (ung thư phổi), MCF-7 (ung thư vú) và Hep.G2 (ung thư gan) với giá trị IC_{50} lần lượt là: 70,42; 114,66; 79,9; 48,92 $\mu g/ml$ tương ứng. Bởi vậy rất đáng quan tâm nghiên cứu kĩ dịch chiết này. Các dịch chiết khác không có hoạt tính ức chế các dòng tế bào ung thư thử nghiệm.

Đây là lần đầu tiên ở Việt Nam và thế giới các hoạt tính kháng oxy hóa và gây độc tế bào của các dịch chiết n - hexan, EtOAc và MeOH từ quả Cau Chuột Núi (*Pinanga duperrana*) được nghiên cứu.

1.2. Thành phần hoá học

Từ dịch chiết EtOAc và dịch chiết MeOH của quả Cau Chuột Núi (*Pinanga duperrana*), bằng các phương pháp sắc kí cột silicagel,

sắc kí cột sephadex LH – 20 kết hợp với sắc kí lớp mỏng, các phương pháp kết tinh và các phương pháp phổ hiện đại như IR, MS, NMR, chúng tôi đã tách và xác định được cấu của 2 hợp chất, bao gồm:

Chất **PDQM.1:** (2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol còn gọi là Catechin.

Chất **PDQE7.3:** β -sitosterol-3-O- β -glucopyranoside (β -Sitosterolglucoside)

Chất β -Sitosterolglucoside đã được phân lập trước đây từ thân cây cỏ xước (*Achyranthes aspera*. L) ở Trà Vinh [7].

Đây là lần đầu tiên các chất này được phân lập từ quả Cau Chuột Núi (*Pinanga duperrana*) thuộc họ Cau ở Việt Nam.

2. KIẾN NGHỊ

Tiếp tục phân lập các phân đoạn còn lại của dịch chiết MeOH và chạy cột sắc kí kết hợp với GC/MS phân cao n-hexan để xác định thành phần hoá học. Đồng thời thử hoạt tính sinh học của các chất tách được để có cái nhìn tổng thể về hoá thực vật cũng như hoạt tính sinh học của quả Cau Chuột Núi.

Nghiên cứu thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của cây *Pinanga duperrana*, vì đây là loài cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu.