

Chương 1:

PHƯƠNG PHÁP

CHIẾT TÁCH

HỢP CHẤT TỰ NHIÊN

ĐẠI CƯƠNG

1. Khái niệm về HCTN:

- **Chất biến dưỡng thứ cấp**
- **Có trọng lượng phân tử nhỏ**
- **Có thể cần thiết hay không cần thiết cho sự sống của SV**
- **Gồm nhiều hợp chất và được sắp xếp thành những nhóm khác nhau**

Các nhóm chất trao đổi thứ cấp:

 **Alkaloid**

 **Quinonoid**

 **Steroid**

 **Terpenoid**

 **Flavonoid**

 **Glycosid...**

Alkaloid

- **Alkaloid thật:** có tính base, chứa N trong vòng dị hoàn, thường được sinh tổng hợp từ Aa
- **Protoalkaloid:** là những amin đơn giản, nguyên tử N không có trong vòng dị hoàn, được tổng hợp từ các Aa
- **Giả-alkaloid:** không bắt nguồn từ Aa, bao gồm hai nhóm hc lớn là *alkaloid steroid* và *alkaloid terpenoid*

Terpenoid

- Là dẫn xuất của isopren
- Công thức tổng quát $(C_5H_8)_n$ với $n \geq 2$
- Dựa vào số đơn vị isopren:
 - Monoterpen
 - Sesquiterpen
 - Diterpen
 - Triterpen
 - Polyterpen...

Flavonoid

- Hợp chất màu phenol TV
- Phần lớn có màu vàng
- Có cấu trúc cơ bản 1,3-diphenylpropan

Glycosid

- **Cấu trúc hóa học gồm 2 phần:**
 - **Phần đường:** D-Glucose, D-Galactose, D-Xylose, L- Arabinose, acid glucuronic...
 - **Phần aglycon:** monoterpen, polyphenol, flavonoid, alkaloid....

Hợp chất phenol

- Cấu trúc có vòng benzen mang một hay nhiều nhóm chức – OH
- Tannin

2. Khái niệm về phương pháp tách – chiết:

- **Các phương pháp tách:**

- **Tách hỗn hợp không đồng nhất:**

- Phương pháp lọc, ly tâm (hỗn dịch)
- Phương pháp thay đổi t° C hay pH, ly tâm lắng gạn (nhũ tương)

- **Tách hỗn hợp đồng nhất:**

- Phương pháp chia cắt pha
- Phương pháp chuyển pha
- Phương pháp biến đổi trạng thái

Phương pháp lọc

- **Chất liệu dùng để lọc:**
 - Chất vô cơ: SiO_2 , amiang, thủy tinh
 - Chất hữu cơ: cellulose, màng polymer
- **Kỹ thuật lọc:**
 - Lọc ở áp suất thường
 - Lọc ở áp suất giảm

Phương pháp ly tâm

- Tốc độ lắng phụ thuộc vào lực ly tâm **F**

$$F = 4\pi^2 n^2 mR$$

n : số vòng quay trong 1 phút

m : khối lượng tiểu phân chất kết tủa

R : bán kính vòng quay

Phương pháp chia cắt pha

- **Tách hỗn hợp rắn:**
 - Lắng đãi
 - Chọn lọc cơ học
- **Tách hỗn hợp lỏng:**
 - Loại bớt dung môi bằng cách cô đặc, bay hơi
 - Giảm khả năng hòa tan của dung môi
 - Thay đổi nhiệt độ
 - Thêm chất lỏng vào dung dịch
 - Thêm chất rắn

Phương pháp chuyển pha

- **Phương pháp thẩm thấu:** chất tan chuyển từ pha A sang pha B, nhưng pha A và pha B có thể hòa tan vào nhau nên cần có một màng ngăn cách giữa 2 pha – màng thẩm thấu
- **Phương pháp thẩm tích:** là sự thẩm thấu đặc biệt trong trường hợp màng phân cách cho các phân tử nhỏ và trung bình đi qua, chỉ giữ lại các phân tử lớn

- **Phương pháp chiết:**

- **Chiết lỏng – lỏng:**

- Chiết đơn
- Chiết lặp
- Chiết ngược dòng

- **Chiết lỏng – rắn:**

- Dùng pha rắn để chiết lấy các chất từ 1 pha lỏng
- Dùng pha lỏng để chiết lấy các chất từ mẫu phân tích là pha rắn

- **Chiết pha rắn**

- **Các kỹ thuật chiết mới:** chiết màng và chiết pha rắn in dấu phân tử

3. Mục đích của việc chiết tách HCTN:

- **Khảo sát thành phần hóa học của 1 loại thực vật và nghiên cứu hoạt tính sinh học của chúng**
- **Khảo sát sâu hơn về hoạt tính sinh học của 1 HCTN đã biết rõ cấu trúc hóa học**
- **Tìm hiểu sự sinh tổng hợp của HCTN cần nghiên cứu**
- **Tìm hiểu sự khác biệt của các chất trao đổi thứ cấp được sản sinh ra từ cùng 1 nguồn tự nhiên nhưng không cùng điều kiện sinh thái**

4. Quá trình khảo sát hóa - thực vật của một loại cây:

- **Lựa chọn mẫu cây cần khảo sát**
- **Xác định tên khoa học của mẫu cây**
- **Xử lý mẫu sau khi thu hái**
- **Dung môi để chiết tách hợp chất ra khỏi mẫu cây**
- **Lựa chọn quy trình để chiết tách hợp chất ra khỏi mẫu cây**

1.1 / Lựa chọn mẫu cây cần khảo sát:

- Lựa chọn nghiên cứu trên 1 loài cây của 1 họ cây tùy vào mục đích cần nghiên cứu
- Chú ý thông tin về hóa –thực vật, đặc điểm thực vật, hoạt tính sinh học của hợp chất cụ thể ...
- Thông tin từ Chemical Abstracts, từ các vùng địa phương, các quốc gia...
- Thu thập mẫu cây

1.2 / Xác định tên khoa học của mẫu cây

- Dựa vào phương pháp phân loại TV
- Tên khoa học :

***Cocos nucifera* L.,(Aracaceae)**

1.3 / Xử lý mẫu sau khi thu hái

- Rửa sạch với nước, để ráo, làm khô tự nhiên
- Trường hợp khảo sát mẫu khô: nên sắc nhuyễn khi cây còn tươi, rải ra phơi khô ở nhiệt độ phòng hay sấy trong lò sấy ở 60 – 80⁰ C, sau đó xay nghiền thành bột.
- ✚ *Cần chú ý xem mẫu có chứa những hợp chất có tính thăng hoa (hợp chất quinon) hay không vì có thể khiến cho việc khảo sát thành phần hóa học của mẫu cây không chính xác*

■ Trường hợp khảo sát mẫu tươi: cắt nhuyễn cây và ngâm vào dung môi chiết tách để tránh quá trình lên men hoặc phản ứng hóa học

■ Muốn khảo sát tinh dầu của cây: nên tiến hành việc lôi cuốn hơi nước trên mẫu cây tươi để tránh thất thoát tinh dầu

- Trường hợp một số loài cây trong quá trình tồn trữ có mất đi một số cấu phần: lấy một lượng nhỏ mẫu cây tươi, tận chiết với dung môi phù hợp thu dung dịch.

Dung dịch này được **sắc ký lớp mỏng** và lưu giữ kết quả để làm tài liệu đối chứng cho những nghiên cứu sau này trên cây

1.4./ Dung môi để chiết tách hợp chất ra khỏi mẫu cây:

- Nguyên tắc tổng quát: lựa chọn dung môi và quy trình phù hợp để chiết tách hợp chất ra khỏi mẫu cây, điều này phụ thuộc vào đặc tính của chất trao đổi thứ cấp có trong mẫu cây khảo sát cần chiết tách

- Chiết các hợp chất **lần lượt** bằng các dung môi có **tính phân cực tăng dần** (dựa vào E^0 , độ nhớt hay hằng số điện môi...)
- Chiết **một lần** lấy tất cả các hợp chất bằng cách sử dụng dung môi **methanol**.

- Chọn dung môi phải có **tính trung tính**, **không độc**, **không quá dễ cháy**, hòa tan được hợp chất cần khảo sát và sau khi chiết tách xong, dung môi đó có thể được loại bỏ dễ dàng

- Thường sử dụng các dung môi không hòa tan trong nước như các **hydrocarbon** (hexan, toluen), **alcol** (butanol), **ceton** (metyl etyl ceton), **acetat** (butyl, etyl), **cloroform**, **clorua metylen**.
- Sau khi chiết, dung môi được thu hồi bằng máy cô chân không ở **$t^{\circ}\text{C} = 30 - 40^{\circ}\text{C}$**

Độ phân cực của dung môi

- **Dung môi không phân cực:** ether dầu hỏa, xăng, hexan, heptan, benzen, toluen...
- **Dung môi phân cực yếu và vừa:** chloroform, aceton, ethylacetat...
- **Dung môi phân cực mạnh:** nước, glycerin, methanol, ethanol, isopropanol,...

Độ nhớt và sức căng bề mặt của dung môi

Dung môi	η
Hexan	0,31
Aceton	0,32
Chloroform	0,57
Methanol	0,60
Benzen	0,65
Dicloethan	0,89
Nước	1,00
Ethanol	1,20
Propanol	2,23

Dung môi	δ
Hexan	1,11
Ethanol	22,03
Propanol	22,90
Methanol	22,99
Aceton	23,70
Chloroform	27,70
Benzen	28,87
Dicloethan	32,20
Nước	72,75

- Thu hồi dung môi cho cao chiết thô, cao này có thể ở dạng khô, dạng dẻo sệt hay dạng dầu sệt... tùy thuộc vào các cấu tử có trong cao.**
- Cao cần loại bỏ hết dung môi còn sót lại để tránh các phản ứng phụ có thể có**

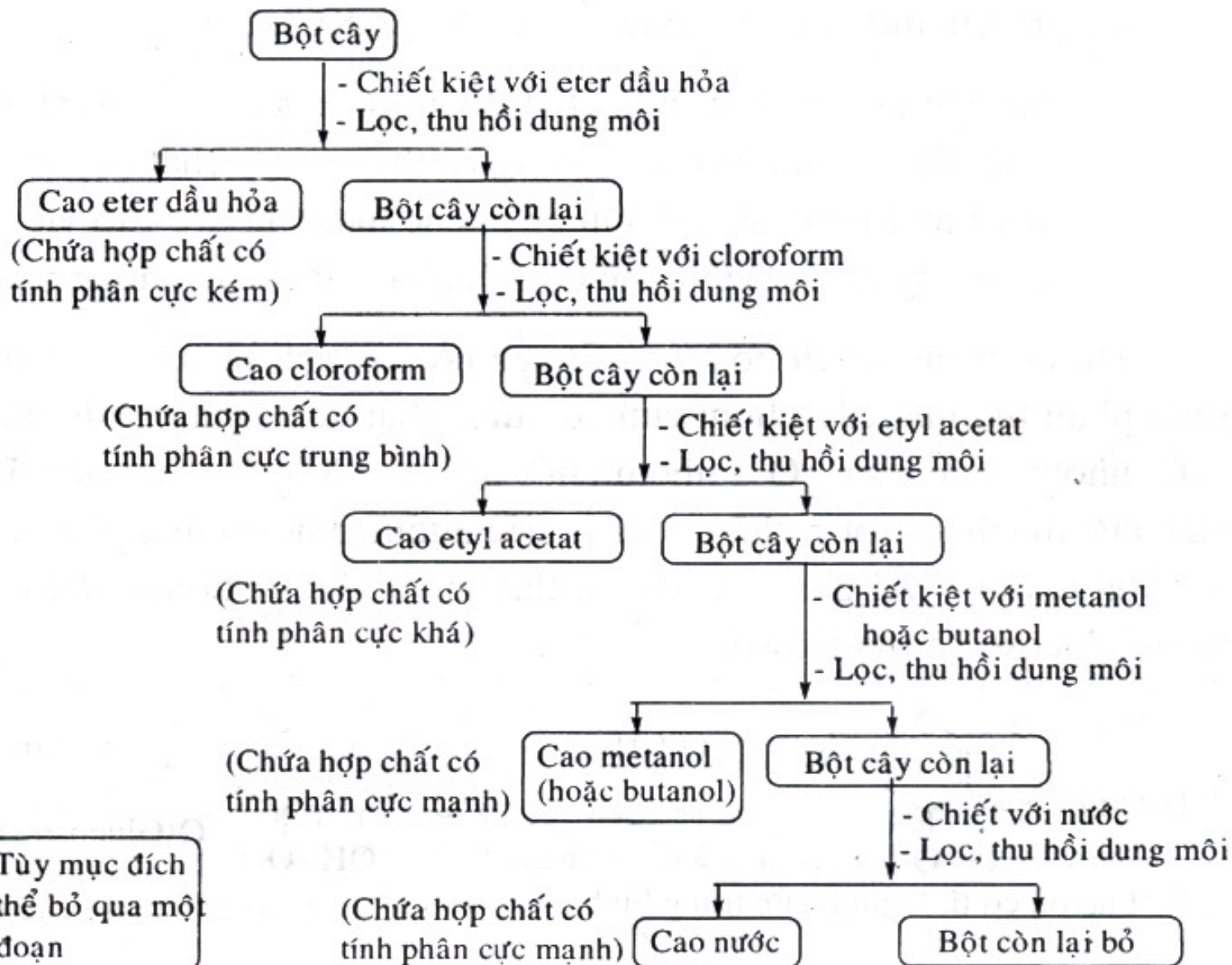
1.5 /Lựa chọn quy trình để chiết tách hợp chất ra khỏi mẫu cây

a/ Chiết hợp chất hữu cơ có trọng lượng phân tử nhỏ, có tính thân dầu (lyophilic): **sơ đồ 1**

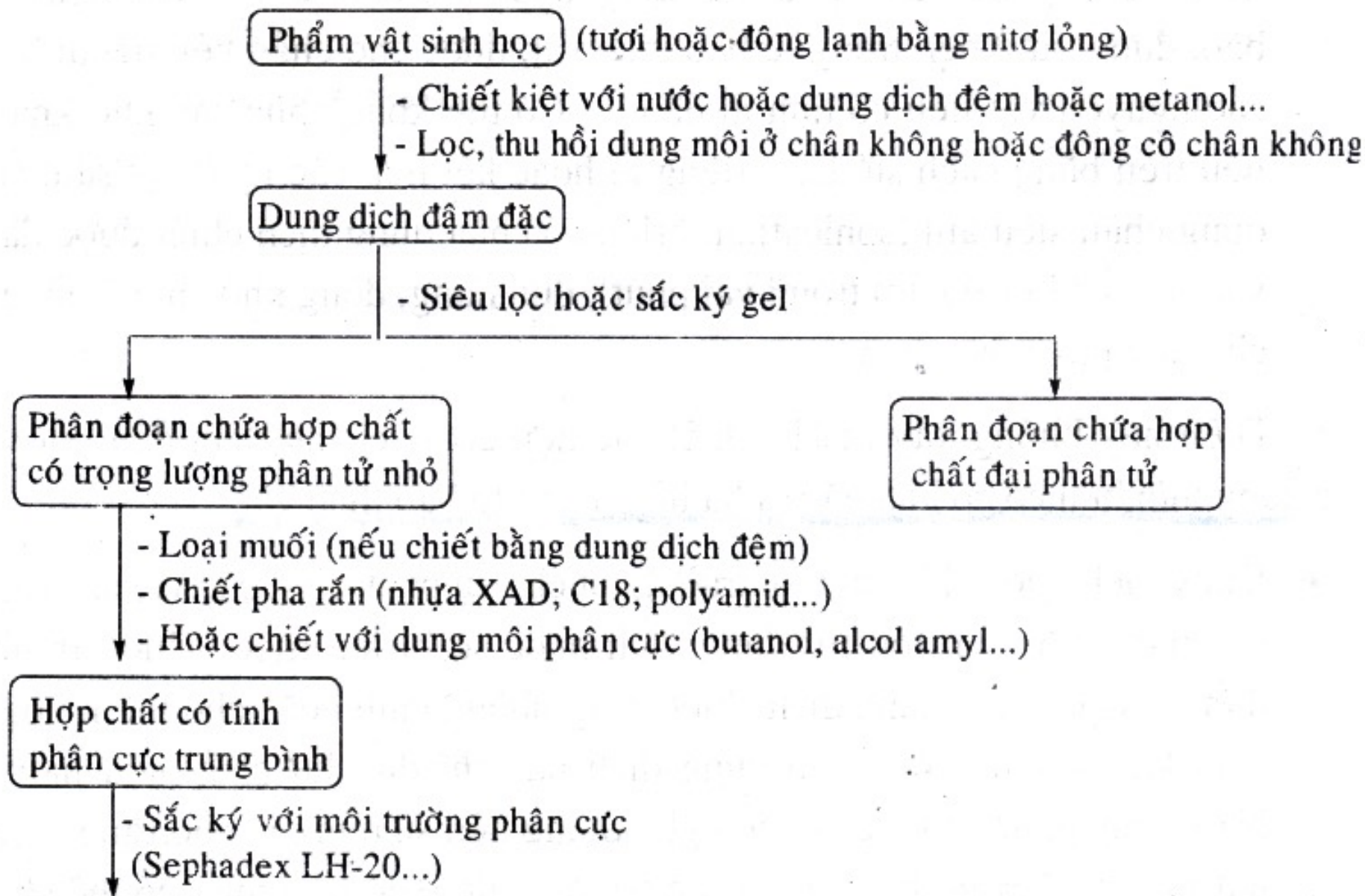
b/ Chiết hợp chất hữu cơ trọng lượng phân tử nhỏ, có tính ái nước (hydrophilic): **sơ đồ 2**

Nguyên tắc chung: “ ***các chất giống nhau sẽ hòa tan nhau*** ”

Sơ đồ 1: Sơ đồ tổng quát điều chế các loại cao có độ phân cực khác nhau từ nguyên liệu cây ban đầu, với mục đích cô lập các hợp chất có tính ái dầu



Sơ đồ 2: Sơ đồ tổng quát cô lập các hợp chất có tính thân nước – trọng lượng phân tử nhỏ



CÁC KỸ THUẬT CHIẾT TÁCH

- 1. Kỹ thuật chiết lỏng – lỏng**
- 2. Kỹ thuật chiết rắn – lỏng**
- 3. Kỹ thuật chiết pha rắn**
- 4. Một số thủ thuật khi chiết tách**

KỸ THUẬT CHIẾT LỎNG – LỎNG

- Nguyên tắc căn bản của sự chiết lỏng - lỏng là sự phân bố của một chất tan vào hai pha lỏng và hai pha lỏng này không hòa tan vào nhau
- Hệ số phân bố K: cho biết khả năng hòa tan của chất tan đối với hai pha lỏng tại thời điểm cân bằng

$$K = \frac{C_B}{C_A}$$

(C_B, C_A lần lượt là nồng độ chất tan trong pha B và A)

K

- **K** là một hằng số ở một nhiệt độ nhất định và trong những điều kiện lý tưởng
- **K** đặc trưng cho một chất tan và một cặp dung môi xác định
- **K** phụ thuộc vào nhiệt độ, áp suất, tính chất của chất tan và dung môi
- **K** càng lớn, quá trình chiết càng hiệu quả

➤ Hệ số phân bố biểu kiến K_D (hệ số phân chia D)

$$K_D = \Sigma C_B / \Sigma C_A$$

$\Sigma C_B, \Sigma C_A$ là tổng nồng độ các dạng khác nhau của chất tan trong dung môi B và A

K_D không bắt buộc phải là hằng số

K_D phụ thuộc vào pH

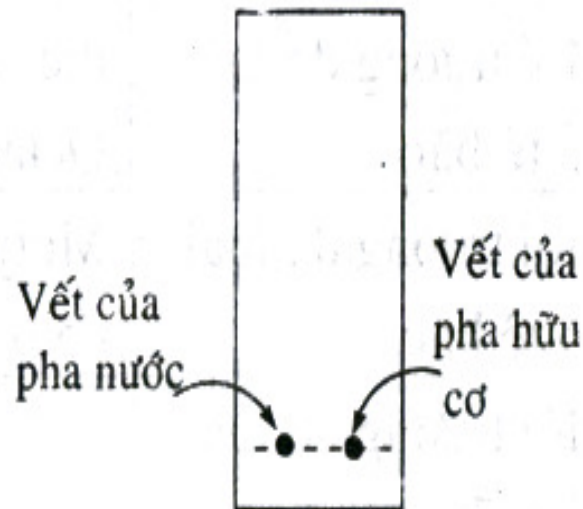
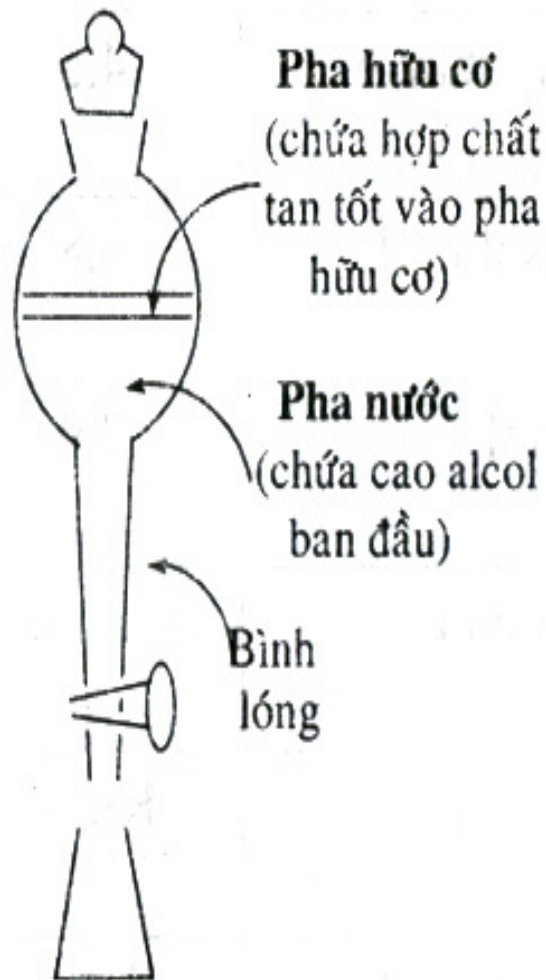
➤ Các tiêu chuẩn để lựa chọn dung môi:

- Hiệu quả phân bố lớn
- Hệ số phân tách lớn
- Tỷ trọng và độ nhớt tốt để bảo đảm sự phân lớp và cân bằng pha xảy ra nhanh
- Khả năng hòa tan chất bị chiết lớn nhưng hòa tan môi trường bé

- **Sức căng bề mặt thấp**
- **Không độc và khó cháy**
- **Bền khi sử dụng**
- **Không ăn mòn trang thiết bị**
- **Dễ kiểm và rẻ tiền**

➤ Áp dụng:

- Chiết hợp chất cần quan tâm ra khỏi dung dịch ban đầu
- Phân chia **cao alcol thô** ban đầu có chứa nhiều loại hợp chất từ không phân cực đến rất phân cực thành những phân đoạn có tính phân cực khác nhau



Sử dụng sắc ký lớp mỏng để theo dõi quá trình chiết



Sau khi giải li bản mỏng, biết dung môi đã chiết được hai chất

Kỹ thuật chiết lỏng-lỏng (Partition)

– Các phương pháp chiết lỏng-lỏng:

- Chiết đơn : chiết bằng bình chiết một lần từ một mẫu, thường cho hiệu suất chiết thấp

- **Chiết lặp** : dung môi liên tục đi qua mẫu chiết hay chiết nhiều lần.

Hiệu suất chiết cao hơn chiết đơn nhưng tốn dung môi, thời gian và công sức

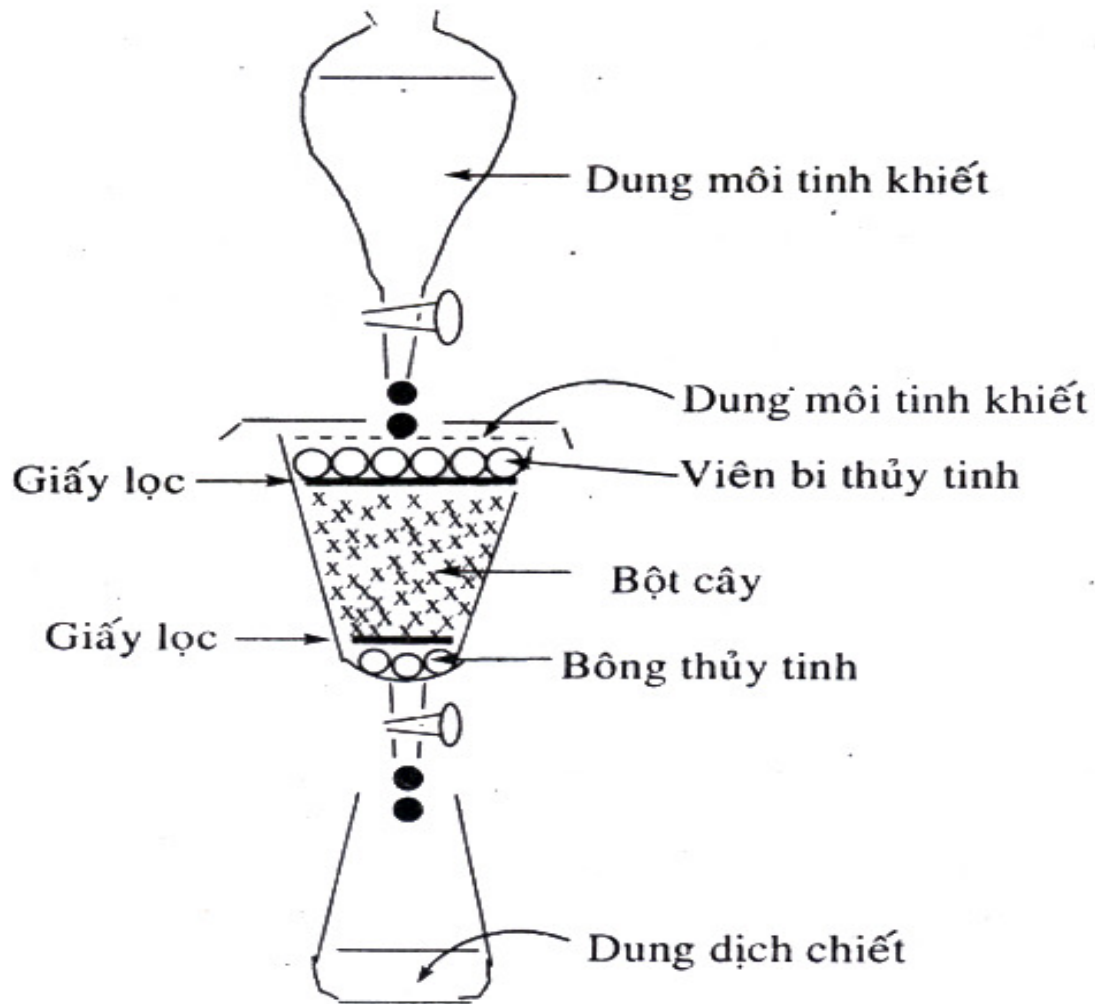
- **Chiết ngược dòng:** dung môi chiết và mẫu chiết đi ngược chiều nhau. Đây là quá trình hai pha liên tục tiếp xúc nhau, pha trộn vào nhau và di chuyển ngược chiều nhau.

Hiệu suất chiết rất cao.

KỸ THUẬT CHIẾT RẮN – LỎNG

- **KT chiết ngấm kiệt**
- **KT chiết ngấm dầm**
- **KT chiết bằng máy Soxhlet**
- **KT chiết bằng máy chiết Kumagawa**
- **KT chiết bằng lô cuốn hơi nước**
- **Chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn**

KT chiết ngấm kiệt (percolation)

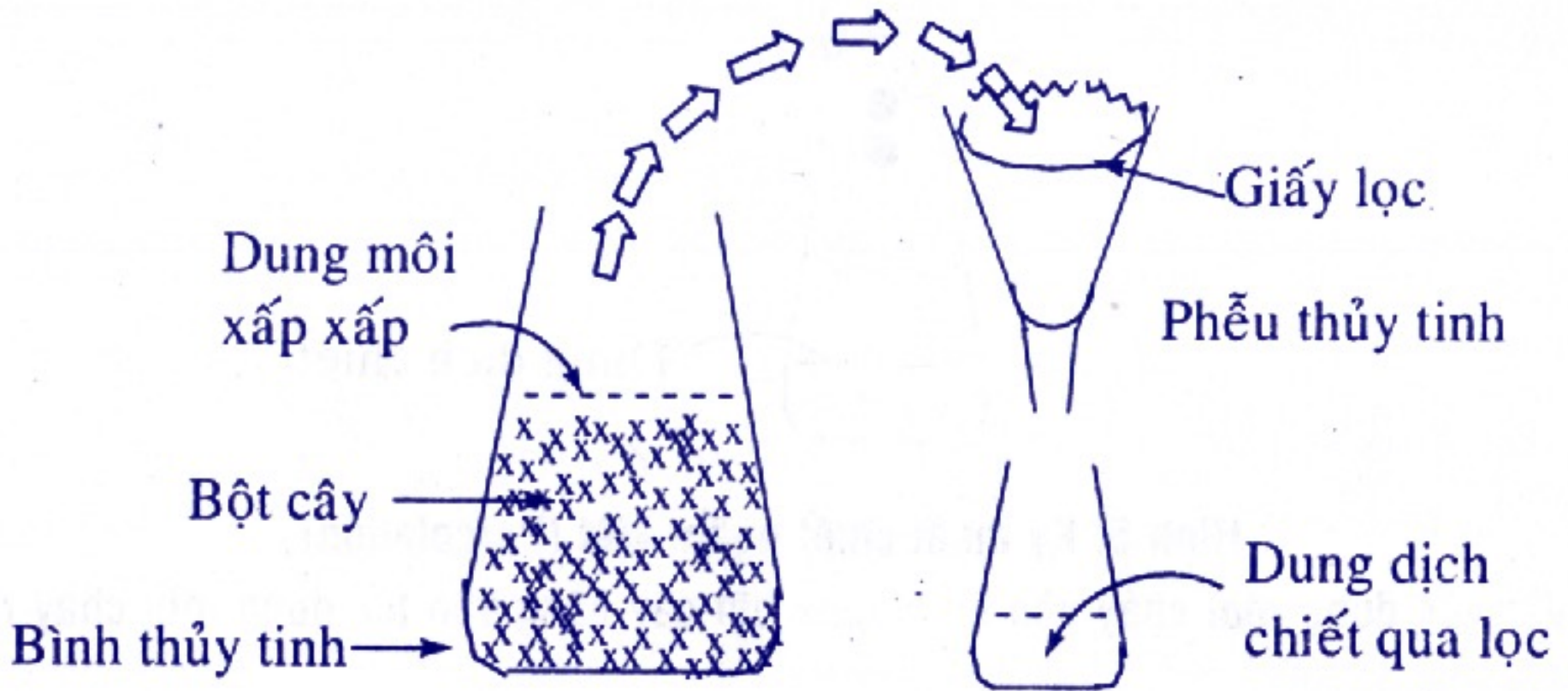


Hình 5: Kỹ thuật chiết ngấm kiệt (Percolation)

(Vận tốc dung môi chảy vào bình chứa bột cây bằng vận tốc dung môi chảy ra)

- **Thiết bị hơi phức tạp nhưng hiệu quả lại cao và ít tốn công hơn so với KT chiết ngâm dầu vì đây là quá trình chiết liên tục, dung môi trong bình ngưng kiệt đã bão hòa mẫu chất sẽ được liên tục thay thế bằng dung môi tinh khiết**
- **Kiểm tra việc chiết kiệt mẫu bột cây bằng sắc ký lớp mỏng hoặc nhỏ một giọt dung dịch chiết lên tấm kính sạch, để bốc hơi và xem có còn vết gì trên mặt kính hay không, nếu không còn vết là đã chiết kiệt.**

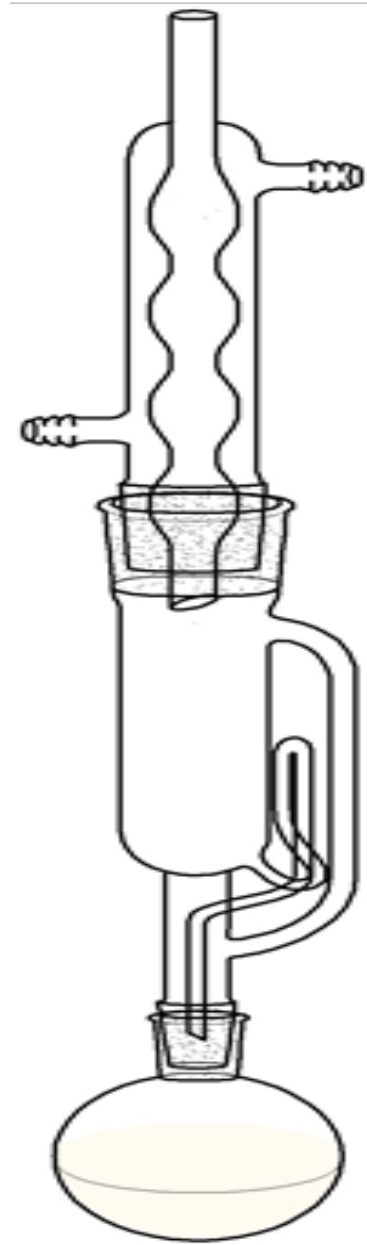
KT chiết ngâm dầm (maceration)



Hình 6: Kỹ thuật chiết ngâm dầm (Maceration)

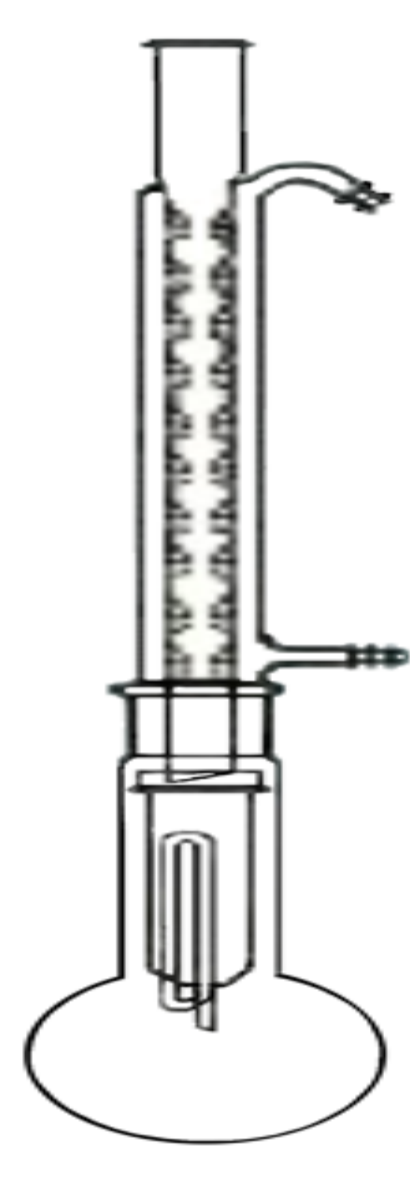
- Tương tự kỹ thuật chiết ngấm kiệt nhưng không đòi hỏi thiết bị phức tạp
- Có thể dễ dàng thao tác với một lượng lớn mẫu cây
- Quy tắc chiết là chiết nhiều lần, mỗi lần một ít lượng dung môi

KT chiết bằng máy Soxhlet



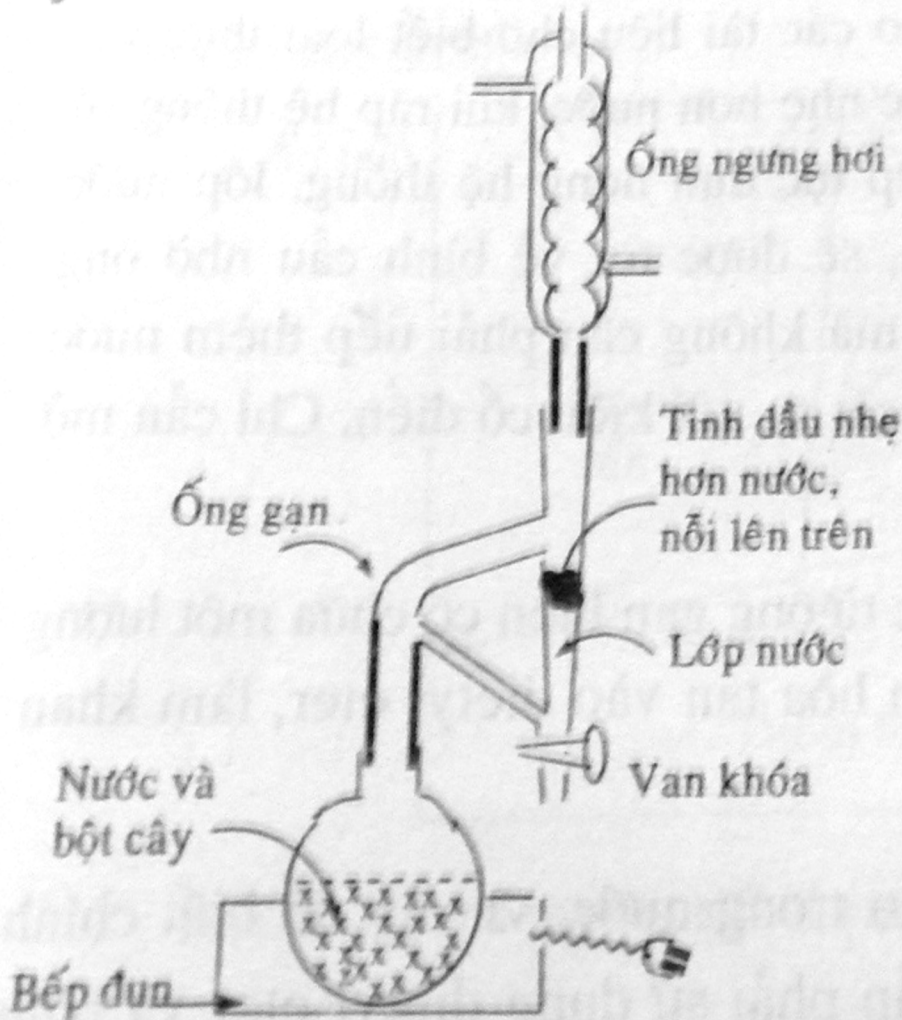
- **Tiết kiệm dung môi, không tốn công lọc và châm dung môi mới như các KT khác, hợp chất được chiết kiệt.**
- **Lượng bột cây cần chiết thường ít do kích thước của máy Soxhlet và trong quá trình chiết, các hợp chất chiết ra từ bột cây được trữ lại trong bình cầu A nên luôn bị đun nóng ở nhiệt độ sôi của dung môi, vì thế các hợp chất kém bền nhiệt có thể bị hư hại.**

KT chiết bằng máy chiết Kumagawa

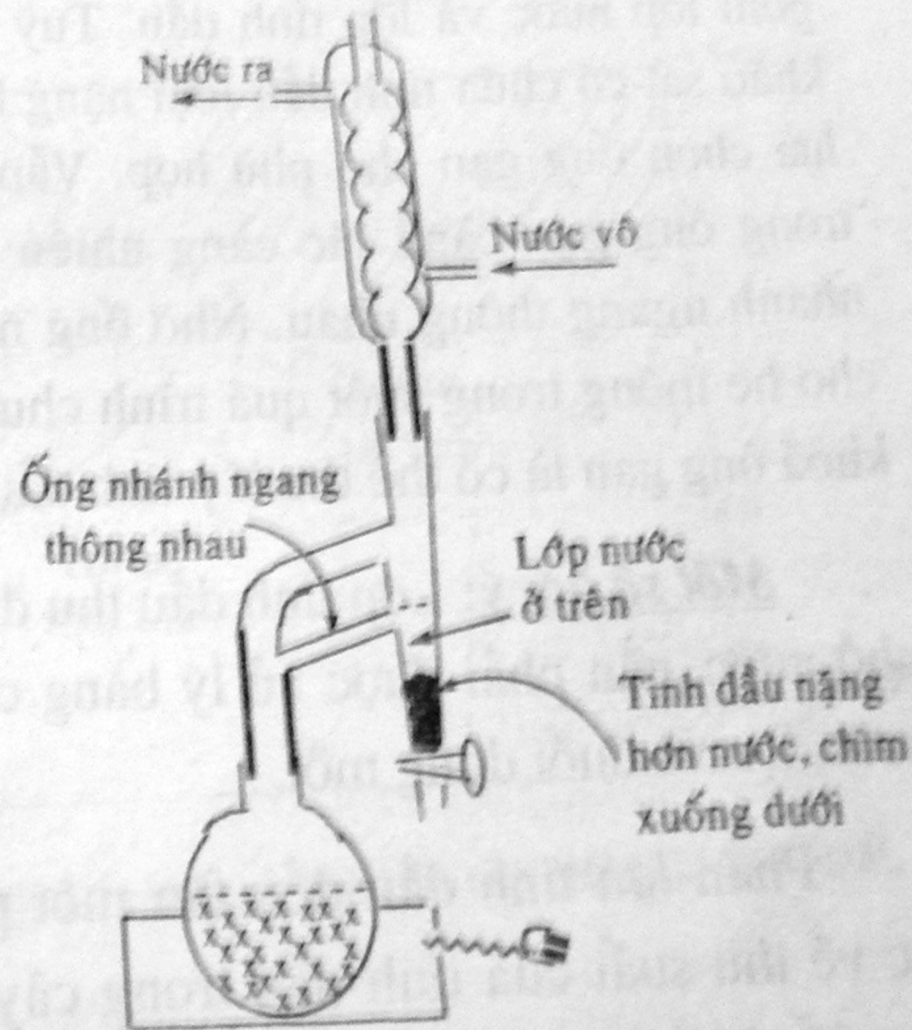


- Sử dụng máy chiết Kumagawa với thiết bị, nguyên tắc giống như máy chiết Soxhlet, chỉ khác ở túi đựng bột cây được đặt gần nguồn nhiệt hơn.
- Do chiết nóng nên khả năng hòa tan của dung môi được gia tăng, có thể hòa tan tốt những hợp chất rất phân cực. Tuy nhiên bột cây luôn được ngâm trong dung môi nóng nên các hợp chất kém bền nhiệt có thể bị hư hại.

KT chiết bằng lôi cuốn hơi nước




(9 a): Kiểu ống gạn sử dụng khi tinh dầu nhẹ hơn nước



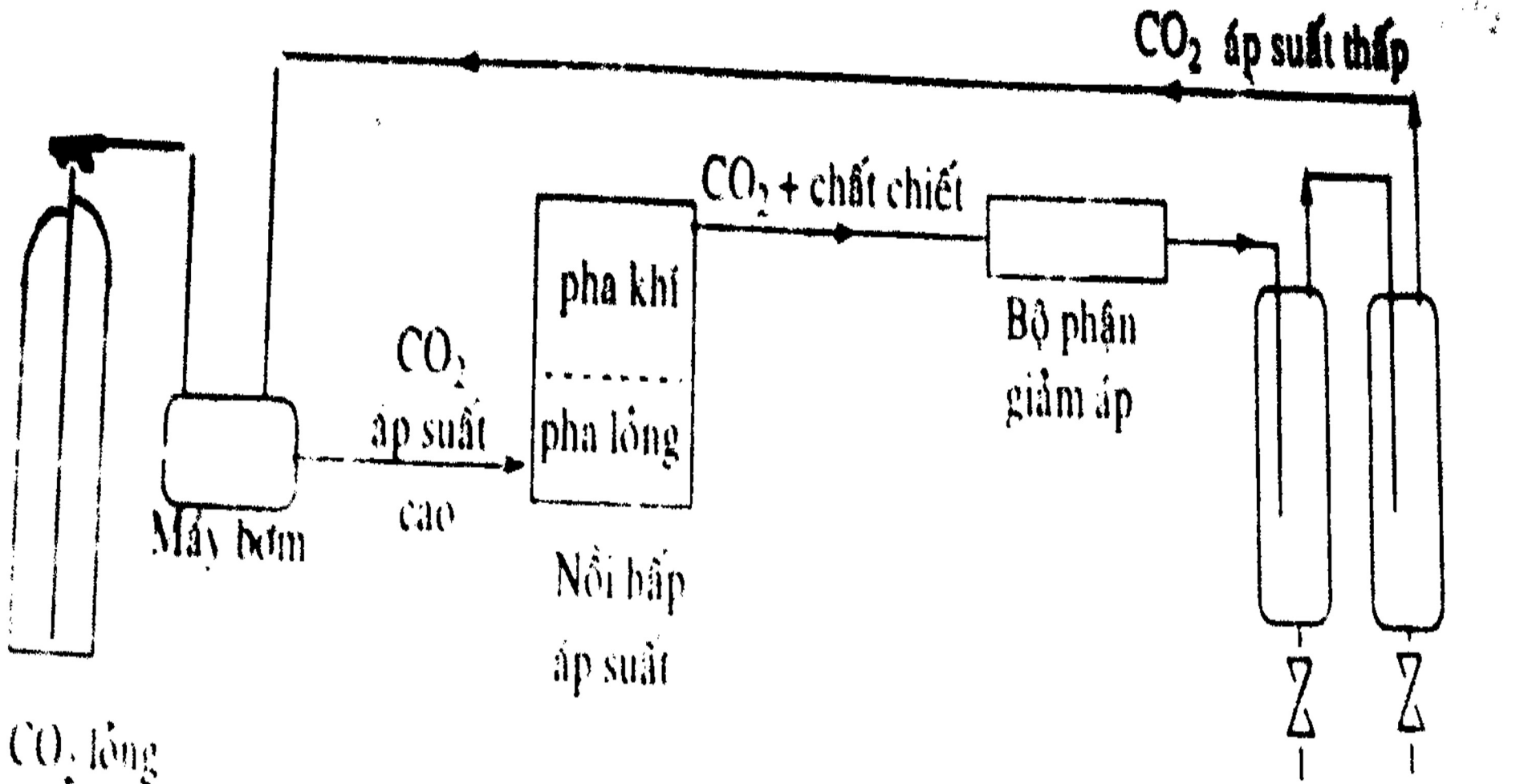
(9 b): Kiểu ống gạn sử dụng khi tinh dầu nặng hơn nước

 Kỹ thuật đặc trưng để chiết các loại hợp chất có tính chất bay hơi được như tinh dầu

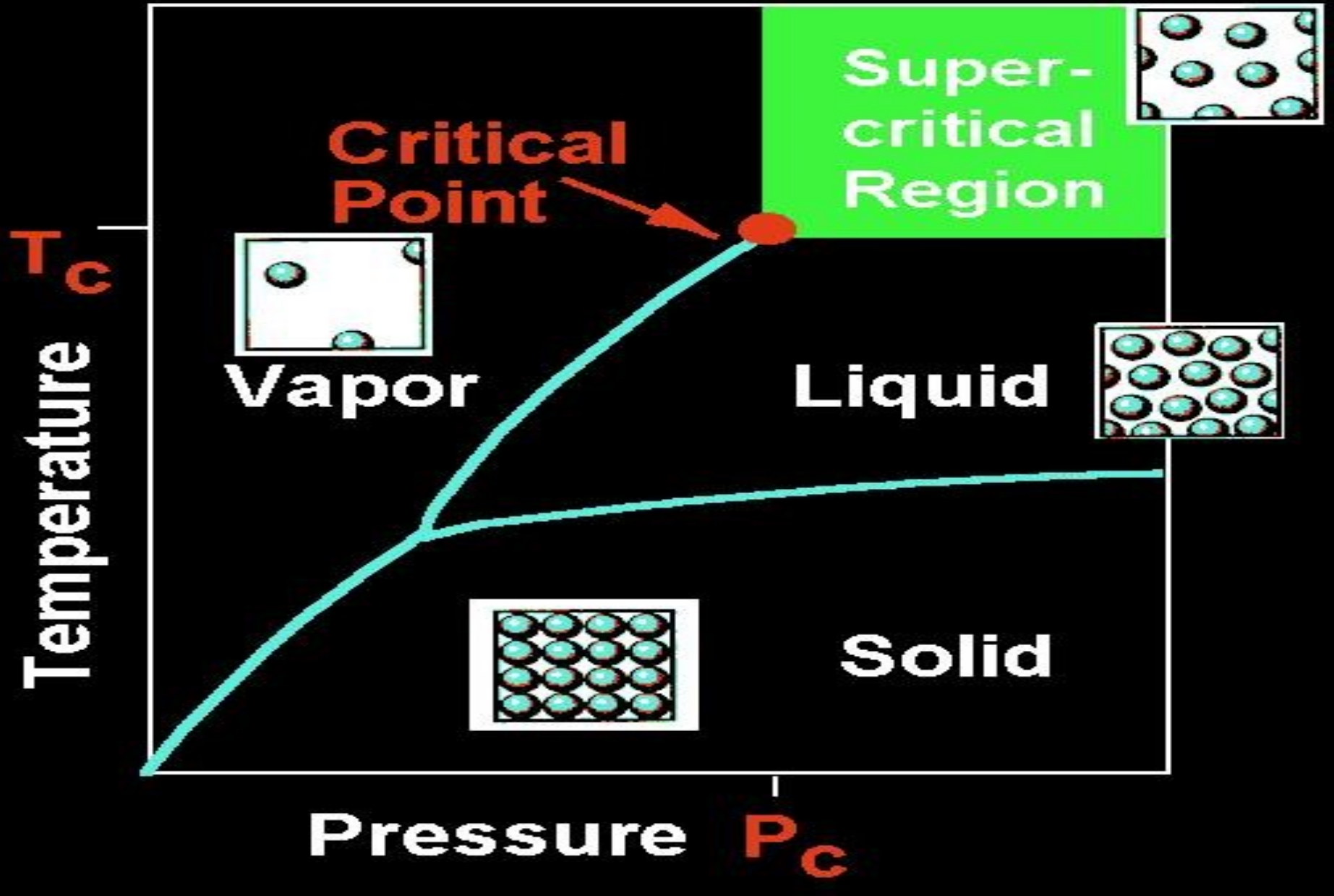
 Thường được thực hiện trên mẫu cây tươi mới thu hái về

 Tinh dầu được khảo sát bằng phương pháp sắc ký ghép khối phổ (GC-MS) để biết được tinh dầu chứa bao nhiêu cấu tử, mỗi cấu tử chiếm tỉ lệ phần trăm là bao nhiêu so với toàn thể tinh dầu và cấu trúc hóa học của mỗi cấu tử

Chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn



Bộ phận thu nhận
thành phẩm đã chiết được



Giản đồ chất lỏng siêu tới hạn

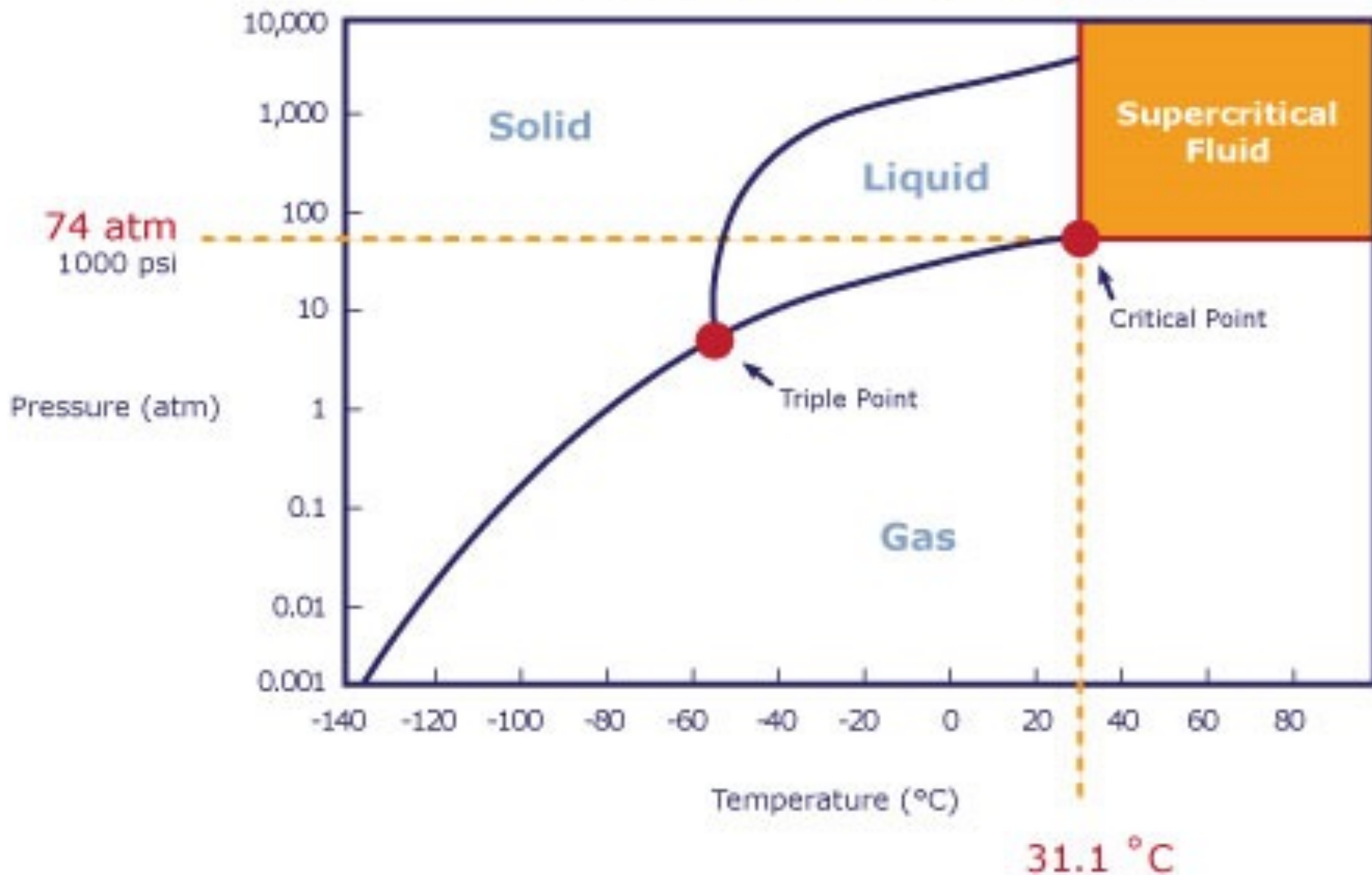
Điểm tới hạn của một số hợp chất thông thường

Fluid	Critical Temperature (K)	Critical Pressure (bar)
Carbon dioxide	304.1	73.8
Ethane	305.4	48.8
Ethylene	282.4	50.4
Propane	369.8	42.5
Propylene	364.9	46.0
Trimethoflurane	299.3	48.6
Chlorotrifluoromethane	302.0	38.7
Trichloromethane	471.2	44.1
Ammonia	405.5	113.5
Water	647.3	221.2
Cyclohexane	553.5	40.7
n-Pentane	469.7	33.7
Toluene	591.8	41.0

- **Sử dụng ít dung môi, có tính chọn lọc cao các loại hợp chất cần chiết tách, thu được chất chiết tương đối sạch, ít làm hư hại chất cần chiết cũng như ít lẫn các loại hợp chất khác mà phần nghiên cứu không quan tâm đến.**
- **Phương pháp thân thiện với môi trường.**
- **Phương pháp phù hợp với loại hợp chất nhạy với nhiệt độ**

- **Thiết bị chuyên dùng đắt tiền**
- **Phương pháp này không thích hợp với mẫu chiết ở dạng lỏng.**
- **Nếu mẫu là dạng gel cần cố định mẫu này trên một chất mang rắn hay tẩm mẫu lên tờ giấy lọc**
- **Khó lường được việc chiết trên một loại mẫu mới, cần phải có nhiều nghiên cứu mới có thể tìm được các thông số tối ưu để chiết thành công**

Phase Diagram of Carbon Dioxide



Giản đồ pha của CO₂ siêu tới hạn

➤ Chất lượng sản phẩm chiết bằng CO₂ lỏng:

- Không bị biến chất vì nhiệt hay bị thủy phân
- Không bị mất các thành phần dễ bay hơi
- Chứa đầy đủ các thành phần dễ bay hơi
- Độ cô đặc rất cao. Thành phần của cặn chiết biểu lộ đầy đủ phổ thành phần của nguyên liệu ban đầu

- **Không có cặn dung môi**
- **Không có muối vô cơ và các kim loại nặng**
- **Sản phẩm sạch không có vi khuẩn hoạt động**
- **Phù hợp với mong muốn của người tiêu dùng**
- **Quá trình thực hiện chiết không bị cháy nổ và an toàn**

➤ Áp dụng chung của chiết bằng CO₂ lỏng:

- **Chiết các nguyên liệu rắn:** các dịch chiết gia vị và pha chế đồ uống
- **Làm sạch để hoàn thiện sản phẩm:** dùng CO₂ lỏng để chiết bỏ cafein trong hạt café vối và trong chè đen để nâng cao chất lượng của sản phẩm này, loại bỏ mỡ trong bột cacao, tách bỏ thuốc trừ sâu trong một số thực phẩm rau quả
- **Chiết các chất lỏng:** dùng CO₂ lỏng để loại bỏ các chất dầu từ các dịch chiết trực tiếp đầu tiên.

Thông đỏ *Taxus wallichiana*
ZUCC



KT chiết pha rắn (SPE)

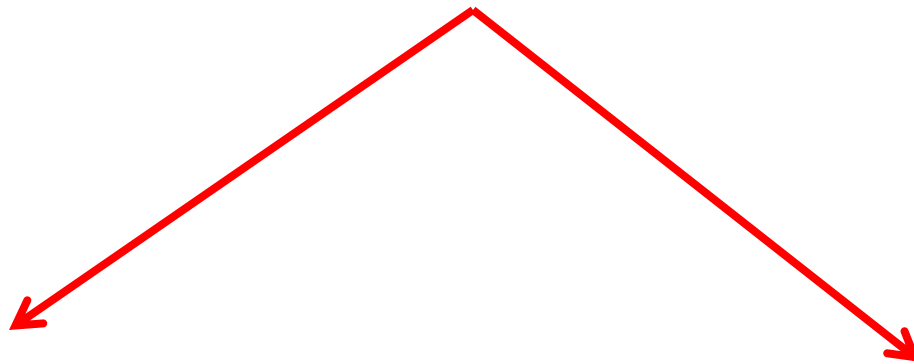
- **Nguyên tắc:** cơ bản như sắc ký cột.

Đây là quá trình tách chất phân tích từ mẫu bằng một chất rắn, sau đó rửa giải bằng dung môi thích hợp.

- **Áp dụng:**

- **Xác định mức độ phân cực của 1 hợp chất chưa biết**
- **Làm đậm đặc 1 hợp chất đang ở trong 1 dd rất loãng và lượng thể tích lớn**
- **Cô lập 1 mẫu HCTN cần khảo sát ra khỏi cao thô ban đầu hay giai đoạn cuối cần tinh chế mẫu hợp chất**
- **Để phân chia cao thô ban đầu thành các phân đoạn có tính phân cực khác nhau**

Đề xây dựng quy trình chiết pha rắn cho chất phân tích trong mẫu cần thực hiện hai nội dung

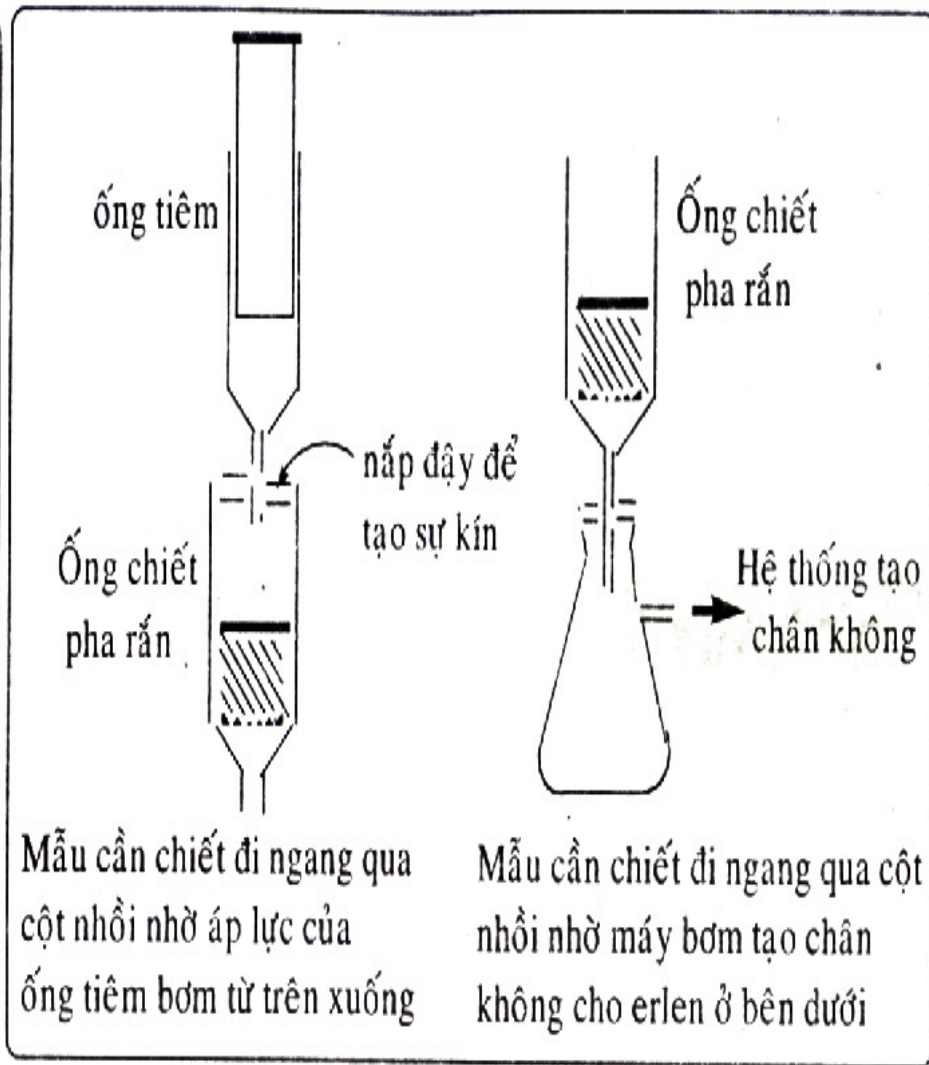
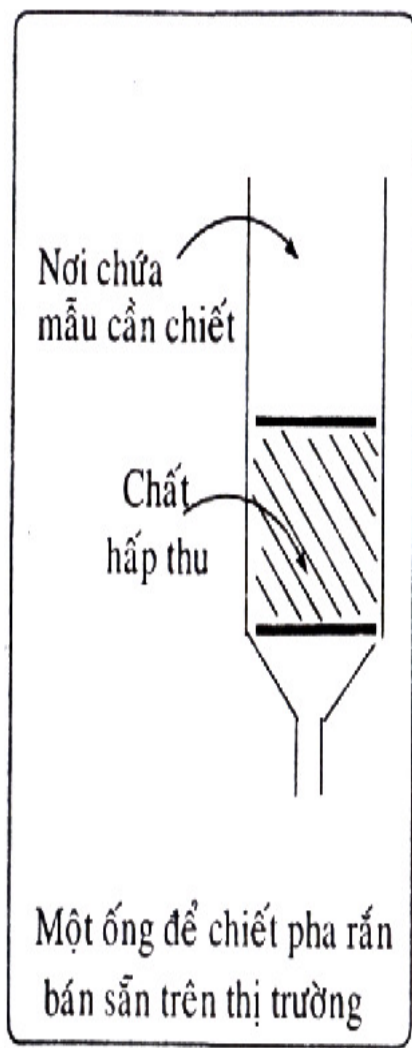


Chọn pha rắn

Quy trình chiết

1. Chọn pha rắn:

- Tùy thuộc vào lượng chất phân tích để chọn ống có lượng pha rắn và thể tích rửa giải khác nhau
- Lượng pha rắn dao động từ **50mg đến 10g** ứng với thể tích nền từ **125 μ L đến 20mL**



2. Quy trình chiết:

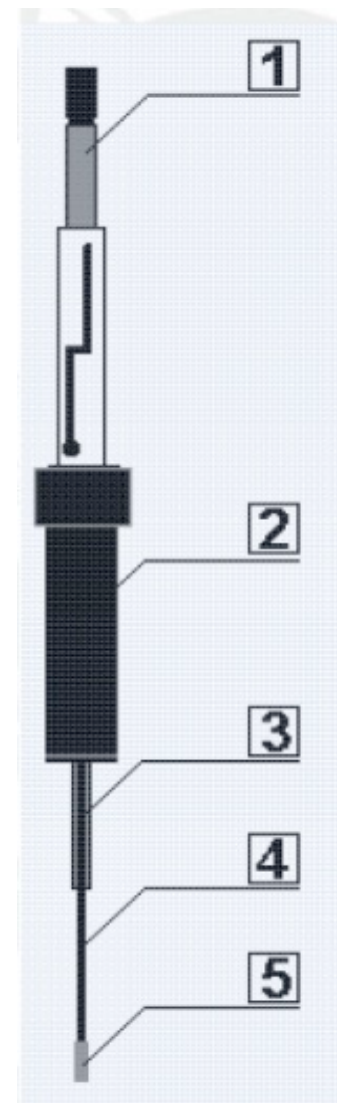
- ***Xử lý cột:*** bằng các dung môi hoặc dung dịch đệm thích hợp để chuyển pha rắn sang trạng thái có thể lưu giữ chất phân tích trong mẫu
- ***Tách chất phân tích:*** mẫu được hòa tan trong dung môi và cho qua cột. Pha rắn sẽ lưu giữ chất phân tích và một số tạp chất

- ***Loại tạp:*** dùng dung môi hoặc dung dịch đậm cho qua cột để loại một số tạp chất đã được giữ lại trên pha rắn
- ***Rửa giải:*** dùng dung môi thích hợp đẩy chất phân tích khỏi pha rắn. Lát dịch chiết xác định bằng phương pháp thích hợp

Các kiểu cải tiến của SPE:

- **Vi chiết pha rắn: (SPME)**

– **Nguyên tắc**: chất phân tích ít phân cực từ môi trường nước, tùy thuộc vào ái lực với pha rắn giữ cân bằng với một màng bao kỵ nước trên sợi silica nung chảy. Chất tạo màng phổ biến nhất là poly dimethylsiloxan PDMS.



1. Đầu trên
2. Ống rỗng
3. Bao kim
4. Kim trong
5. Dây silica phủ nóng

- **Áp dụng:** dùng tách và định lượng các chất ô nhiễm môi trường nước, chủ yếu là dẫn chất halogen của hydrocarbon mạch thẳng và vòng thơm.
- Kỹ thuật này đang được ứng dụng cho nhiều ngành: phân tích dược, giám định pháp y, an toàn thực phẩm.

- **Tạo hệ phân tán pha rắn – mẫu thử: (MSPD)**

- **Nguyên tắc**: trộn cơ học mẫu thử với pha rắn C18. Dùng dung môi chiết chất phân tích từ hỗn hợp tạo thành.

- **Áp dụng**: dùng MSPD để tách chiết thuốc thú y từ mẫu thực phẩm như thịt, sữa. Rửa giải bằng acetonitril. Định lượng chất phân tích bằng GC hoặc HPLC

MỘT SỐ THỦ THUẬT KHI CHIẾT TÁCH





- **Làm khô mẫu chất:**
 - Sấy khô bằng khí trơ trong máy cô quay chân không
 - Sấy khô nhờ bình hút ẩm
 - Đông khô chân không

- **Sự kết tinh lại**
- **Sự kết tinh phân đoạn**
- **Sự kết tinh nhờ nhiệt độ lạnh**

ỨNG DỤNG TRONG CHIẾT TÁCH MỘT SỐ HCTN

- 1. Phương pháp chiết tách ALKALOID**
- 2. Phương pháp chiết tách FLAVONOID**
- 3. Phương pháp chiết tách GLYCOSID**

Phương pháp chiết tách Alkaloid

-  Phương pháp định tính sự hiện diện của Alkaloid trong mẫu cây
-  Các thuốc thử để định tính Alkaloid
-  Phương pháp chiết tách Alkaloid bằng dung môi hữu cơ
-  Phương pháp chiết tách Alkaloid bằng dung dịch nước acide


Phương pháp định tính sự hiện diện của Alkaloid trong mẫu cây

- Thường áp dụng nguyên tắc thử của Webb
- Gồm 2 phần thực nghiệm:
 - **TN1**: bột cây được chiết với dd nước – acid
 - **TN2**: bột cây được chiết với dung môi hữu cơ – kiềm

Bột cây được chiết với dd nước – acid
(dung dịch nước 1% H₂SO₄)

 **Dung dịch này chiết các Alkaloid ở :**

- Dạng base tự do có tính phân cực mạnh**
- Dạng tứ cấp N⁺**
- Dạng N-oxid**
- Dạng glycosid**

 **Dung dịch này cũng chiết các hợp chất:**
coumarin, polyphenol, purine, Aa, protein, các
hợp chất có chứa Nitơ...

Bột cây được chiết với dung môi hữu cơ – kiềm

(dung dịch Prollius: cloroform:etanol:NH₄OH_{đđ} = 8:8:1)

- **Dung dịch này chiết tốt các Alkaloid:**
 - **dạng base tự do có tính phân cực kém và tính base yếu**
 - **các Alkaloid có cấu trúc đặc thù –C=C-N-**

Ghi nhận kết quả

- Kết quả dương tính trên bột cây được trình bày bằng ký hiệu:

(-), (+), (++) , (++++)

- Nếu có thể định lượng thì hàm lượng Alkaloid thô tính trên bột cây khô:

– Thấp: < 0,01%

– Trung bình: 0,01 – 0,1%

– Cao: > 0,1%

Các thuốc thử định tính Alkaloid

1. Thuốc thử Mayer: nhỏ vài giọt thuốc thử vào dd acid loãng có chứa alkaloid, nếu có alkaloid sẽ xuất hiện **kết tủa màu trắng hay vàng nhạt**
2. Thuốc thử Wagner: nhỏ vài giọt thuốc thử vào dd acid loãng có chứa alkaloid, nếu có alkaloid sẽ xuất hiện **kết tủa màu nâu**

3. Thuốc thử Dragendorff:

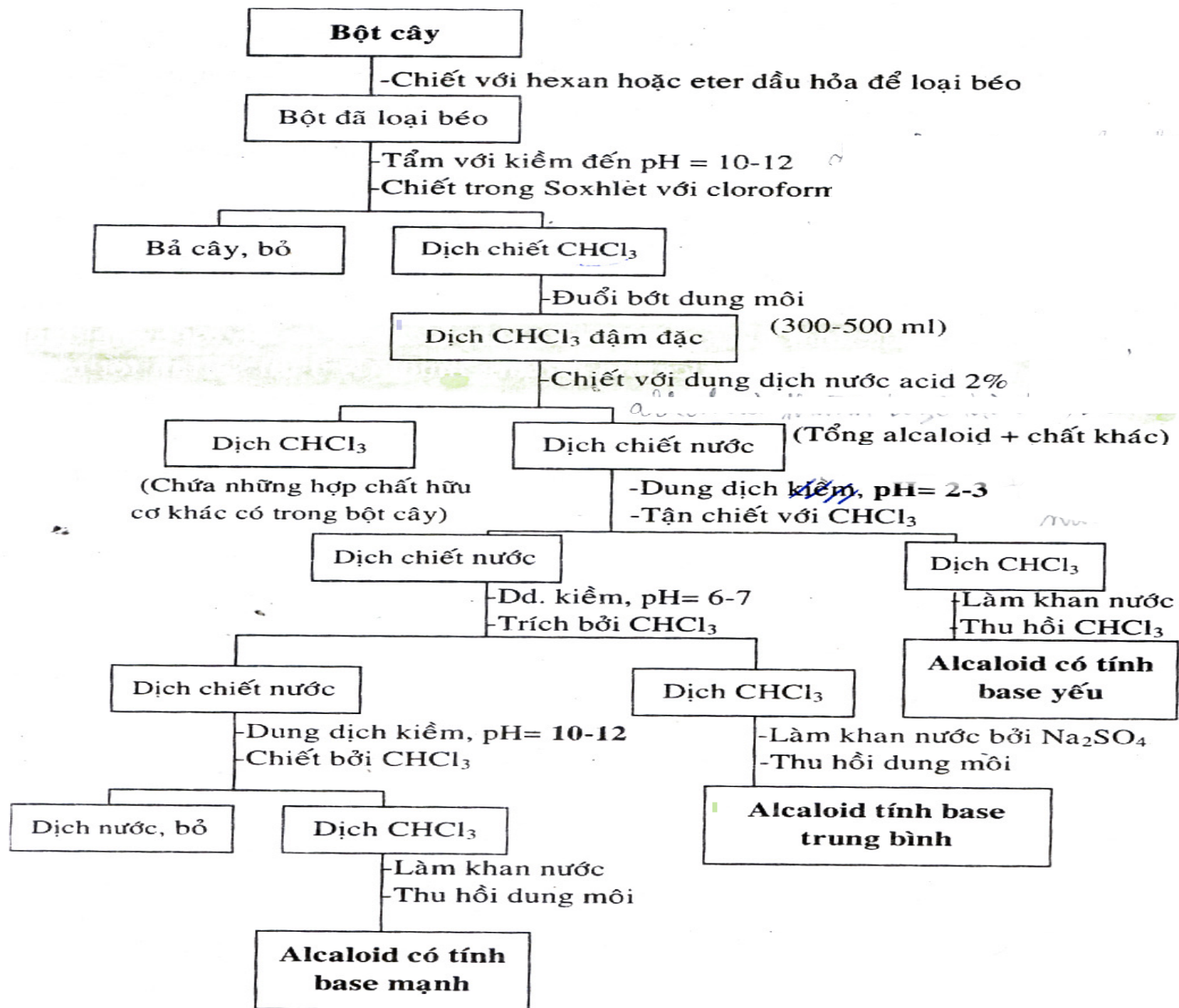
- Để định tính bằng ống nghiệm: nếu có alkaloid sẽ xuất hiện **kết tủa màu cam-nâu**
- Để phun xịt lên tấm bản mỏng: nếu có alkaloid sẽ cho **vết màu cam-đỏ**

Phương pháp chiết tách Alkaloid bằng dung môi hữu cơ

- Nguyên tắc tổng quát:

Bột cây được tẩm với **dung dịch kiềm** để chuyển đổi các alkaloid ở dạng muối trở thành dạng base tự do; kế tiếp bột cây tẩm này được chiết với một trong các loại dung môi hữu cơ như **benzen, dietyl eter, cloroform, etyl acetat...**

- **Ưu nhược điểm của phương pháp:**
 - Do bột cây được tẩm với dd kiềm để chuyển đổi các Alkaloid ở dạng muối trở thành dạng base tự do rồi chiết với cloroform nên pp này không chiết được các alkaloid ở dạng **N- oxid, dạng N tứ cấp, các alkaloid glycosid và các alkaloid loại phân cực mạnh**



Phương pháp chiết tách Alkaloid bằng dung dịch nước acid

- **Nguyên tắc tổng quát:**
 - Bột cây được tận chiết với metanol và chiết hết các alkaloid ở dạng base tự do, dạng glycosid, dạng tứ cấp N^+ dạng N-oxid ...

- **Ưu nhược điểm của phương pháp:**

- Sử dụng dung môi MeOH sẽ chiết hết các alkaloid và cả những HCHC khác nên sẽ khó khăn trong quá trình tách riêng các alkaloid và các HCHC

Bột cây

- Chiết với eter dầu hỏa để loại béo
- Bã còn lại chiết với metanol
- Thu hồi dung môi

Bã cây, bã

Cao metanol (Chứa các alcaloid + chất hữu cơ khác)

- Hòa vào acid acetic băng, đun ấm
- Thêm nước cất. Lọc
- Chiết với cloroform

Dịch cloroform

Dịch nước (Chứa muối alcaloid)

(Chứa những hợp chất hữu cơ khác)

- Cô quay, đuổi nước

**Cao alcaloid thô,
ở dạng acetat**

Các phương pháp tách Alcaloid dưới dạng tinh khiết

- 1. Thăng hoa**
- 2. Cắt phân đoạn**
- 3. Giải phóng phân đoạn**
- 4. Kết tinh phân đoạn**
- 5. Sắc ký hấp phụ**

Chiết xuất vinblastin từ cây

Dừa cạn (*Catharanthus*)

- Cây thảo
- Phú Yên (Việt Nam)
- Trồng : 12, thu hoạch : 5, 6, 7
- Chứa khoảng 70 alcaloid, chia thành 2 nhóm: monomer và dimer
- Lá ch 0,7% alcaloid toàn phần
- Đối tượng chiết xuất : thân & lá



- **Năm 1958, Noble và cộng sự đã chiết được một alkaloid từ lá dừa cạn là Vincalucoblastine (còn gọi là Vinblastin). Sau đó 4 năm, Svoboda và cộng sự cũng tìm thêm một alkaloid nữa là Vincalucocristin (còn gọi là vincristin).**
- **Hàm lượng các alkaloid này trong dừa cạn rất nhỏ (khoảng 1 phần vạn trong lá dừa cạn khô đối với Vinblastin còn đối với Vincristin thì ít hơn 10 lần nữa).**
- **Người ta thường dùng hai alkaloid này làm thuốc chữa ung thư dưới dạng muối sulfat.**

- Nhân dân ta đã có bài thuốc chữa bạch cầu cấp (bệnh máu trắng) bằng cách sắc uống thân và lá cây dứa cạn (khoảng 15 gam thân lá khô/ngày).
- Trên thị trường, thuốc Vinblastin (còn có tên Velban) là thành phẩm độc bảng A thường đóng ống 5-10 mg chế phẩm đông khô kèm theo 1 ống dung môi.
- Vinblastin có tác dụng ức chế sự sinh sản của các tế bào ung thư, ít ảnh hưởng đến hồng cầu và tiểu cầu.

Quy trình chiết xuất alkaloid từ cây vàng đắng *Coscinium fenestratum*

- Vàng đắng, Loong t'ron, Kơ trơng - *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr., thuộc họ Tiết dê - *Menispermaceae*.
- **Mô tả:** Dây leo to, thân rộng 5-7cm. Lá mọc so le, phiến to đến 25cm, gân gốc 5; màu trắng mốc ở mặt dưới; cuống phình và cong ở gốc, hơi dính vào trong phiến lá. Hoa nhỏ mọc thành chụm tán trên thân già. Quả hạch tròn, đường kính cỡ 2,5cm.
- Mùa hoa tháng 12-3, quả tháng 5.



- **Bộ phận dùng:** Thân và rễ - *Caulis et Radix Coscinii Fenestrati*.
- **Nơi sống và thu hái:** Loài của miền Ấn Độ, Malaixia, phân bố ở Gia Lai, Kon Tum, Lâm Đồng và các tỉnh phía Nam nước ta. Có thể thu hái thân, rễ quanh năm, thái nhỏ phơi hoặc sấy khô.
- **Thành phần hóa học:** Chủ yếu là berberin, saponin, thân chứa berberin có tỷ lệ tới 3,5%, ceryl alcohol, hentriacontane, sitosterol, acid palmitic và oleic, glucosid sitosterol, saponin và vài chất nhựa.
- Ở nước ta trong thân và rễ cây có alcaloid berberin với tỷ lệ 1.5- 3%.

Thân rễ vàng đắng

Xay

Bột thô vàng đắng

Dd H₂SO₄
0,4% (5:1)

Bã dược liệu

Ngâm 24h

Dịch chiết

NaCl

Nước cái

Khuấy tan, để 24h, vẩy

Berberin clorid thô

Dd HCl
0,4%

Rửa, vẩy

Berberin clorid thô

Cồn 96^o,
than hoạt

Bã than hoạt

Hòa tan nóng, tẩy màu, lọc

Dịch lọc còn

Nước cái

Kết tinh, vẩy

Berberin clorid

Sấy, đóng gói

Berberin clorid dược dụng

Phương pháp chiết tách Flavonoid

 Các thuốc thử định tính sự hiện diện của
Flavonoid

 Phương pháp tách chiết Flavonoid ra khỏi cây

 Phương pháp chiết tách Flavonoid bằng dung dịch acetat chì

 Phương pháp chiết tách Flavonoid bằng dung dịch kiềm

Các thuốc thử định tính sự hiện diện của Flavonoid

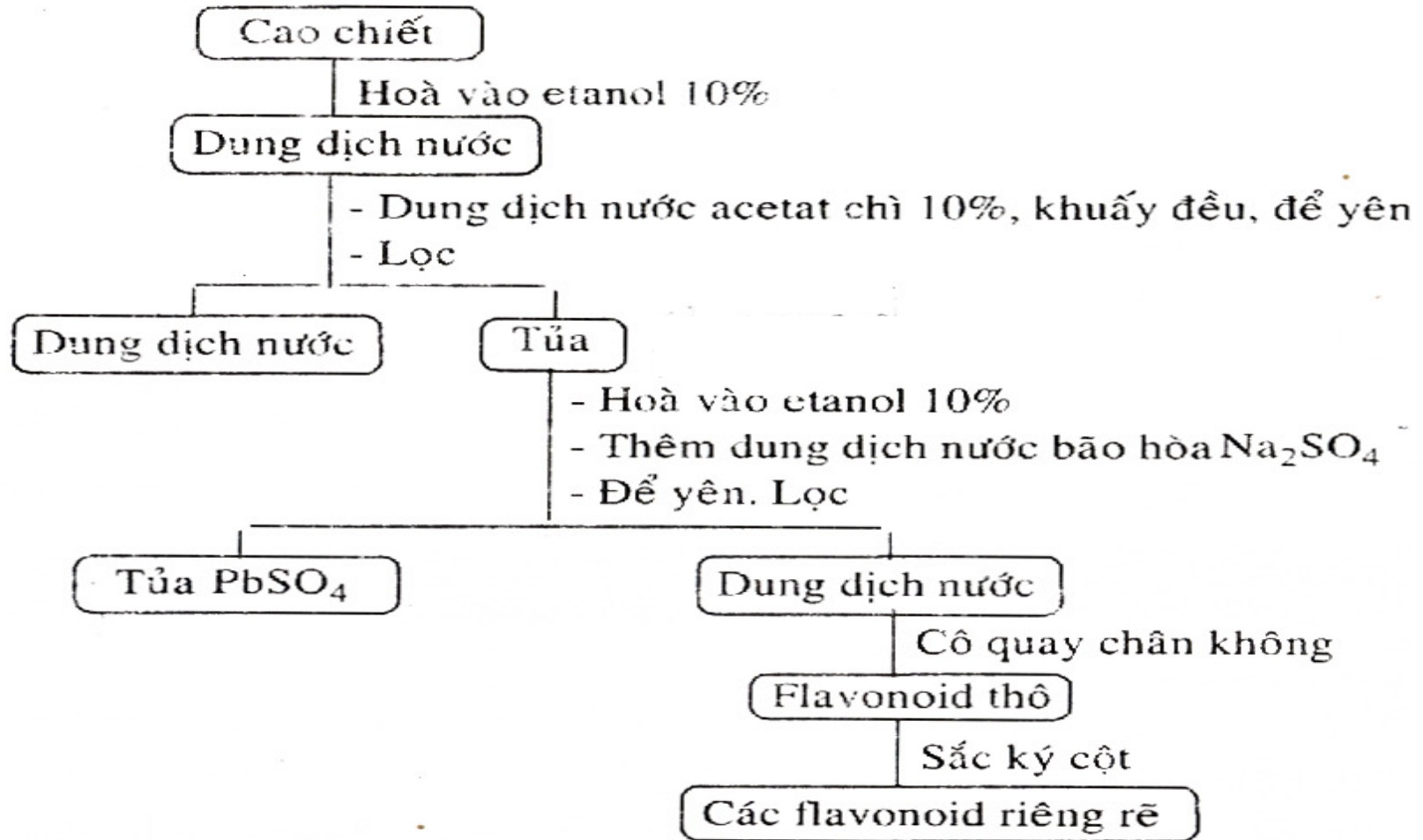
- **Phân biệt sơ bộ bằng hơi amoniac:** dưới ánh đèn tử ngoại UV_{365} và sự hiện diện của hơi amoniac, các flavonoid sẽ thay đổi màu sắc
- **Tác dụng với H_2SO_4 đđ :** cho màu từ vàng đậm đến cam đến đỏ
- **Tác dụng với dd1%NaOH/etanol:** cho màu từ vàng đến cam –đỏ

Phương pháp tách chiết flavonoid ra khỏi cây

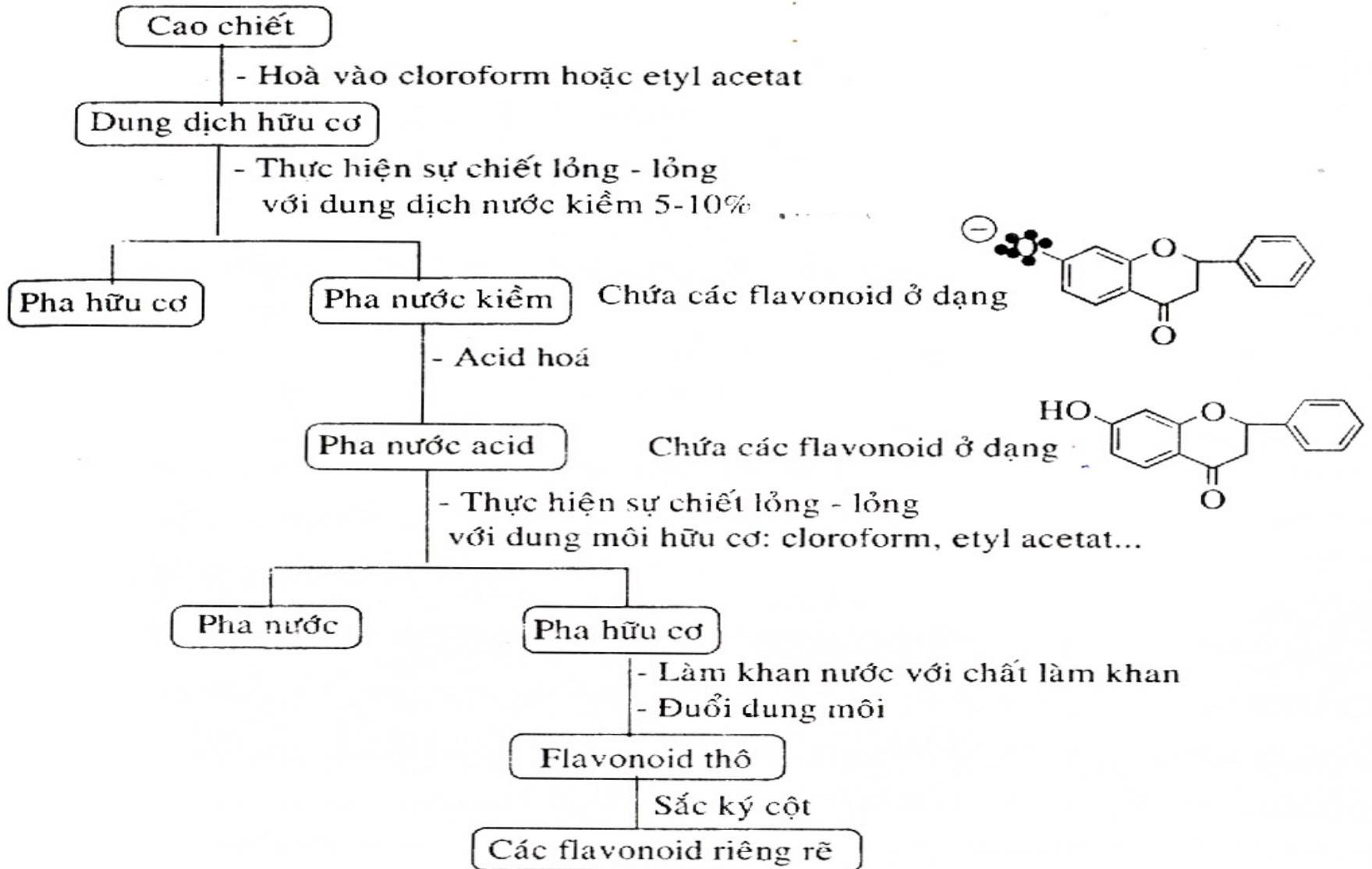
- Flavonoid nào mang nhiều nhóm metoxy $-OCH_3$ và ít nhóm hydroxy $-OH$, có tính phân cực yếu, tan tốt trong dung môi ít phân cực như: benzen, cloroform, etyl acetat

- Flavonoid mang nhiều nhóm hydroxy, có tính phân cực mạnh sẽ hòa tan tốt trong dung môi có tính phân cực như acetone, ethanol, metanol, butanol, nước...

Phương pháp chiết tách Flavonoid bằng dung dịch acetat chì



Phương pháp chiết tách Flavonoid bằng dung dịch kiềm



Hấp thu flavonoid bằng than hoạt tính

✚ Cho than hoạt tính vào cao chiết nhằm hấp thu flavonoid.

✚ Lọc lấy than

✚ Sử dụng lần lượt các dung môi hữu cơ từ phân cực yếu đến phân cực mạnh để chiết các flavonoid có tính phân cực khác nhau.

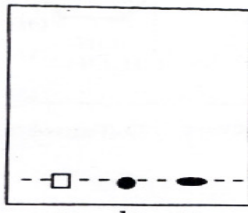
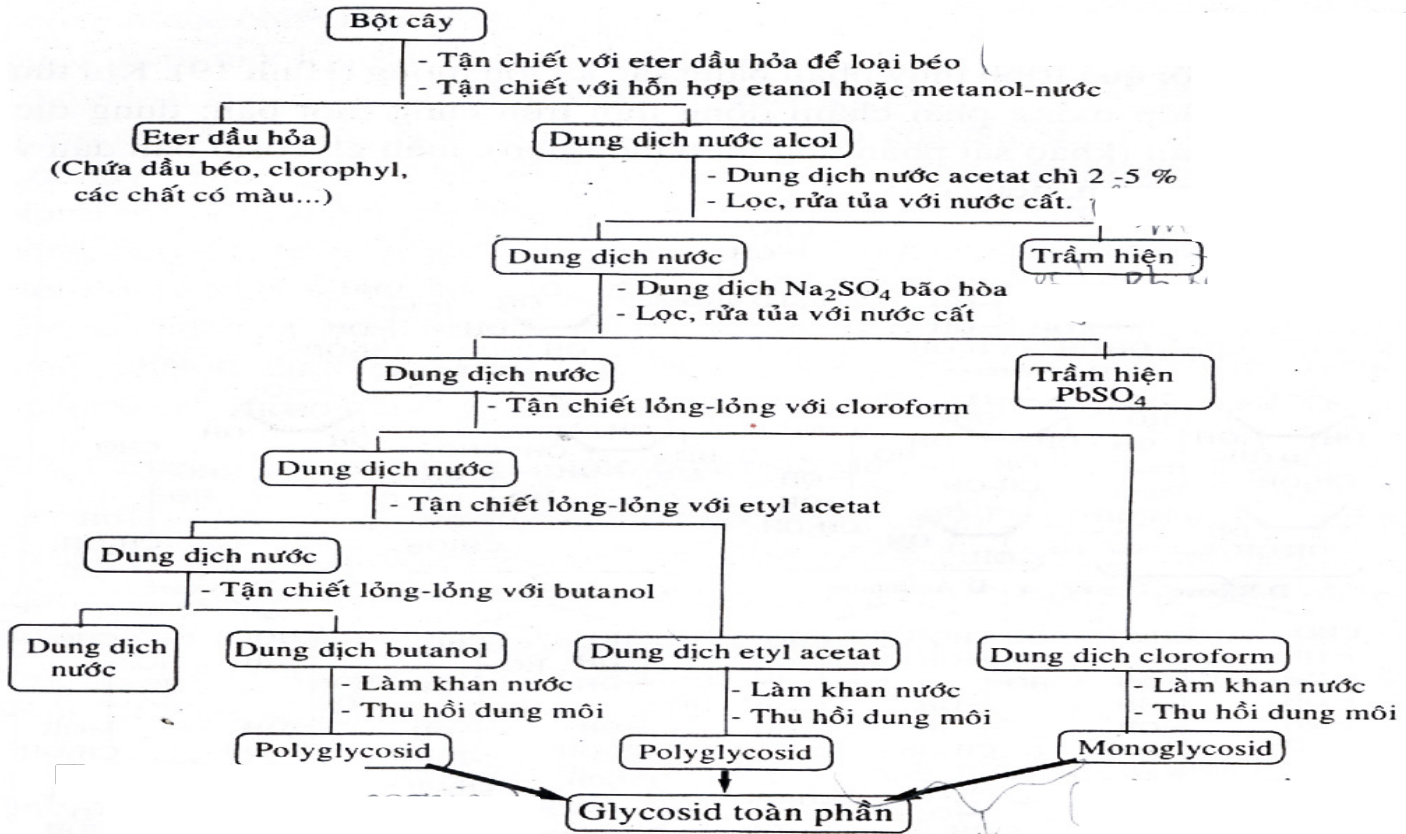
Phương pháp chiết tách Glycosid

 Phương pháp chiết tách Glycosid

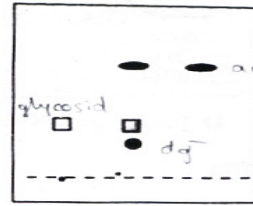
 Phương pháp thủy giải các Glycosid:

- Thủy phân bằng enzyme
- Thủy phân bằng dung dịch acid
- Thủy phân bằng dung dịch kiềm

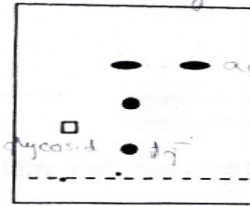
Phương pháp chiết tách Glycosid



Ban đầu



Trong quá trình thủy phân



Sự thủy phân hoàn tất

- a: Hợp chất glycosid ban đầu
- b: Dung dịch đang trong quá trình thủy phân
- c: Aglycon chuẩn (nếu có)

Phương pháp thủy giải các Glycosid:

- Thủy phân bằng enzyme:
 - Thường sử dụng enzyme β – glucosidase
 - Theo dõi quá trình thủy phân bằng sắc ký lớp mỏng
 - Chiết lỏng – lỏng với diethyl eter
 - Thu aglycon

- **Thủy phân bằng dung dịch acid:**

- Dùng dd HCl, H₂SO₄ ... để cắt đứt phần đường gắn vào aglycon qua nhóm chức của aglycon

- **Thủy phân bằng dung dịch kiềm:**

- Để cắt đứt các nối ester hoặc nối của đường gắn vào aglycon ngang qua nhóm chức

Chiết xuất rutin từ Hoa hòe (*Sophora japonica*)

- Hòe mễ, hòe hoa, hòe hoa mễ.
- Tên khoa học: *Sophora japonica*
L. thuộc họ cánh bướm
Papilionaceae
- Mô tả: Cây hoa hòe là một cây to cao 5-6m. Lá kép lông chim lẻ, mọc so le. Hoa mọc thành bông, cánh bướm màu vàng trắng Quả là một giáp đài hơi cong. Giữa các hạt quả hơi thắt lại.
- Mùa hoa: các tháng 7,8,9.



- **Thành phần hóa học:** Trong hoa hòe có từ 6-30% rutin (rutozit). Trong quả cũng có rutin.
- Rutin là một glycoside, thủy phân sẽ cho quexitin hay quexetola, glucose và rhamnose.
- Rutin có màu vàng hay trắng vàng, tan trong nước, rượu, tan nhiều trong rượu methylic và dd kiềm.



- **Tác dụng dược lý:** Rutin là một loại vitamin P có tác dụng bảo vệ chức năng bình thường của thành mao mạch.
- Thiếu chất vitamin này tính chất chịu đựng của thành mao mạch có thể bị giảm, mao mạch dễ bị đứt, vỡ. Hiện tượng này trước đây người ta cho rằng do thiếu vitamin C mà có, gần đây phát hiện do thiếu vitamin P

- Rutin thường dùng cho người bệnh bị tăng huyết áp mà mao mạch dễ vỡ, để đề phòng đứt mạch máu não, xuất huyết cấp tính do viêm thận, xuất huyết ở phổi mà không rõ nguyên nhân, còn có tác dụng đối với bệnh tăng huyết áp

Các phương pháp chiết rút Rutin

1. Chiết bằng dd kiềm:

- Hoa hòe giã dập, rửa bằng HCl 0,5% rồi rửa bằng nước
- Chiết bằng dd Na_2CO_3 1% hay natri borat 1 – 3% (rutin sẽ tan nhiều do có chức phenol trong phân tử) và chiết khoảng 3 – 4 lần.
- Gộp các dịch chiết và dùng HCl điều chỉnh đến pH = 2 sẽ thu được Rutin kết tủa.
- Lọc. Rửa tủa bằng nước đến pH = 4-5.
- Hòa tan, kết tinh lại trong cồn

2. Chiết bằng nước:

- Hòa tan 5g rutin trong 1lít nước sôi
- Nước ở 20⁰C : 1 lít hòa tan 0,13g rutin
- Chiết rutin từ hoa hòe bằng nước nóng sau đó để nguội rutin sẽ tủa
- Phương pháp này hiệu suất thấp

3. Chiết bằng cồn:

- Đun sôi cồn 90^0 với hoa hòe trong 2 giờ
- Rút dịch chiết, cất thu hồi cồn, thu tủa rutin (thực hiện vài lần)
- Kết tinh lại trong cồn, tẩy màu bằng than hoạt thu rutin tinh khiết
- Phương pháp này cho hiệu suất cao, tỷ lệ rutin trong hoa hòe có thể lên đến 20 – 30%