TÁCH TINH DẦU VÀ ALKALOID TỪ QUẢ QUẤT (*Citrus japonica* Thumb.)

EXTRACTING ESSENTIAL OIL AND ALKALOIDES FROM *Citrus japonica* Thumb. (Rutaceae)

Nguyễn Thị Lý, Lê Thị Đề Oanh, Phan Thị Bảo Vy, Huỳnh Mai Thảo

Khoa Công nghệ Hoá học, Đại học Bách Khoa, Tp Hồ Chí Minh, Việt Nam

TÓM TẮT

Nguyên liệu được sử dụng trong nghiên cứu là quả quất. Từ vỏ quả, tách tinh dầu ra bằng phương pháp chưng cất theo hơi nước. Nếu cải thiện chế độ đun nóng bằng vi song, tinh dầu thu được đã gia tăng đáng kể về phẩm chất và hàm lượng. Từ nước quả, tách chiết được một alkaloid, với nhiều khả năng là codein. Đây là một thành phần khá phổ biến trong nhiều loại dược phẩm thông dụng như efferagan codein, terpin codein.

ABSTRACT

The research project aims at building up a cycle using "the Quat fruit" as the raw material to separate the maximun essential oil from the peel and at the same time isolate and identify an alkaloid contained of high pharmaceutical property that is codein in its juice.

I.GIỚI THIỆU:

Vỏ các loài cây loài Citrus như cam, chanh đã dược sử dụng từ lâu để sản xuất tinh dầu ở nhiều nước công nghiệp trên thế giới như Ý, Mỹ. Tinh dầu Citrus có mùi thơm dễ chịu, hàm lượng Limonene cao được sử dụng rộng rãi trong thực phẩm và mỹ phẩm. Các kết quả khoa học gần đây cho thấy Limonene còn có tác dụng tán sỏi, phá khối u…

Ơ nước ta một loài cây thuộc loài Citrus, họ Rutaceae (họ Cam) khác là cây Quất, phổ biến là loại *Citrus japonica* Thumb. (*Fortunella jabonica Swing)* được trồng khắp nơi. Quả Quất được thu hái quanh năm, vỏ có thể ở dạng vỏ khô, tươi hoặc vỏ đông lạnh để tách lấy tinh dầu là một thuận lợi lớn trong nghiên cứu và trong sản xuất đại trà thu tinh dầu Citrus.

Ngoài ra, qua khảo sát sơ bộ thành phần của nước quả Quất đã cô lại thành cao Quất có chứa flavonoid, alkaloid, phytosterol, steroid, carotenoid, acid hữu cơ, đường khử. Bên cạnh quá trình tách chiết tinh dầu, việc nghiên cứu tách chiết alcaloid có dược tính cao từ nước quả Quất cũng là vấn đề khá mới mẻ góp phần tìm ra những chất có dược tính từ thiên nhiên.

II.NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

1.Nguyên liệu:

1kg quả Quất thu được 140 g vỏ Quất (độ ẩm 72,62%), lượng cao Quất 152 g/1kg quả (độ ẩm 56,51%)

2.Tách chiết tinh dầu Quất:

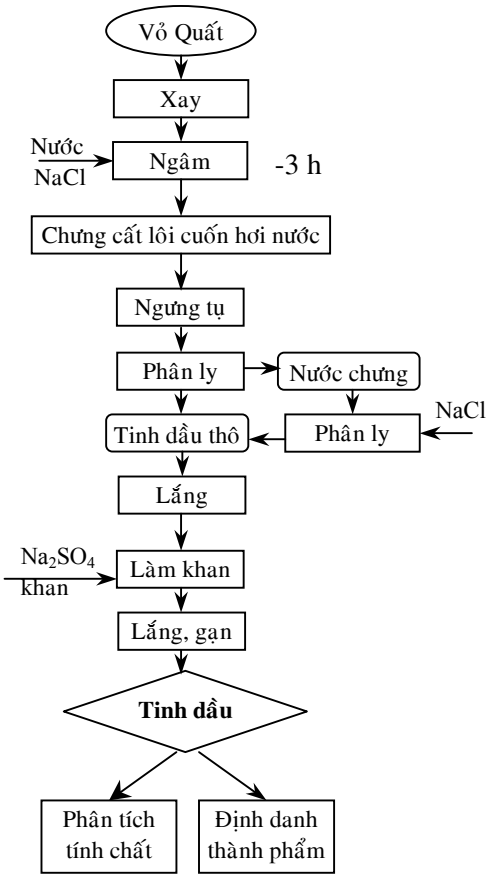
Tinh dầu từ vỏ quả Quất được tách chiết bằng 2 phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước: đun nóng cổ điển và chiếu xạ vi sóng.

Xác định thành phần của tinh dầu Quất bằng phương pháp sắc ký ghép khối phổ (GC/MS) trên máy Fisons Instrument tại Trung tâm Dịch Vụ Phân Tích Thí Nghiệm, số 2 Nguyễn Văn Thủ, thành phố Hồ Chí Minh.

Hiệu suất tinh dầu được tính dựa theo trọng lượng tinh dầu thu được trên trọng lượng của nguyên liệu tươi.

Thuyết minh qui trình:

Phương pháp chưng cất hơi nước cổ điển: Vỏ Quất tươi đem xay nhỏ, để ngâm trong dung dịch NaCl 10% khoảng 3 giờ. Sau đó tiến hành chưng cất lôi cuốn theo hơi nước. Làm khan tinh dầu bằng Na_2SO_4 khan, thu được tinh dầu tinh khiết.



Sơ đồ 1: Quy trình tách chiết tinh dầu

Phương pháp chưng cất hơi nước dưới sự chiếu xạ của vi sóng: 100g vỏ Quất tươi đem xay nhỏ, sau đó tiến hành chưng cất lôi cuốn hơi nước trong lò vi sóng gia dụng cải tiến ở công suất 450W. Tinh dầu cũng được cô lập theo sơ đồ 1.

3.Phương pháp nghiên cứu và tách chiết alkaloid trong nước quả Quất:

-Phương pháp tách chiết: chiết tận trích với dung môi $CHCl_3$ trong môi trường kiềm.

-Phương pháp xác định hợp chất: phương pháp phân tích sơ bộ hóa thực vật.

-Phương pháp nhận danh alkaloid: đo điểm chảy, phương pháp tạo tủa và màu với các thuốc thử đặc trưng, sắc ký lớp mỏng (SKLM), xác định phổ UV trên máy UV- Vis Spectrophotometer Jenway 6505.

Thuyết minh qui trình:

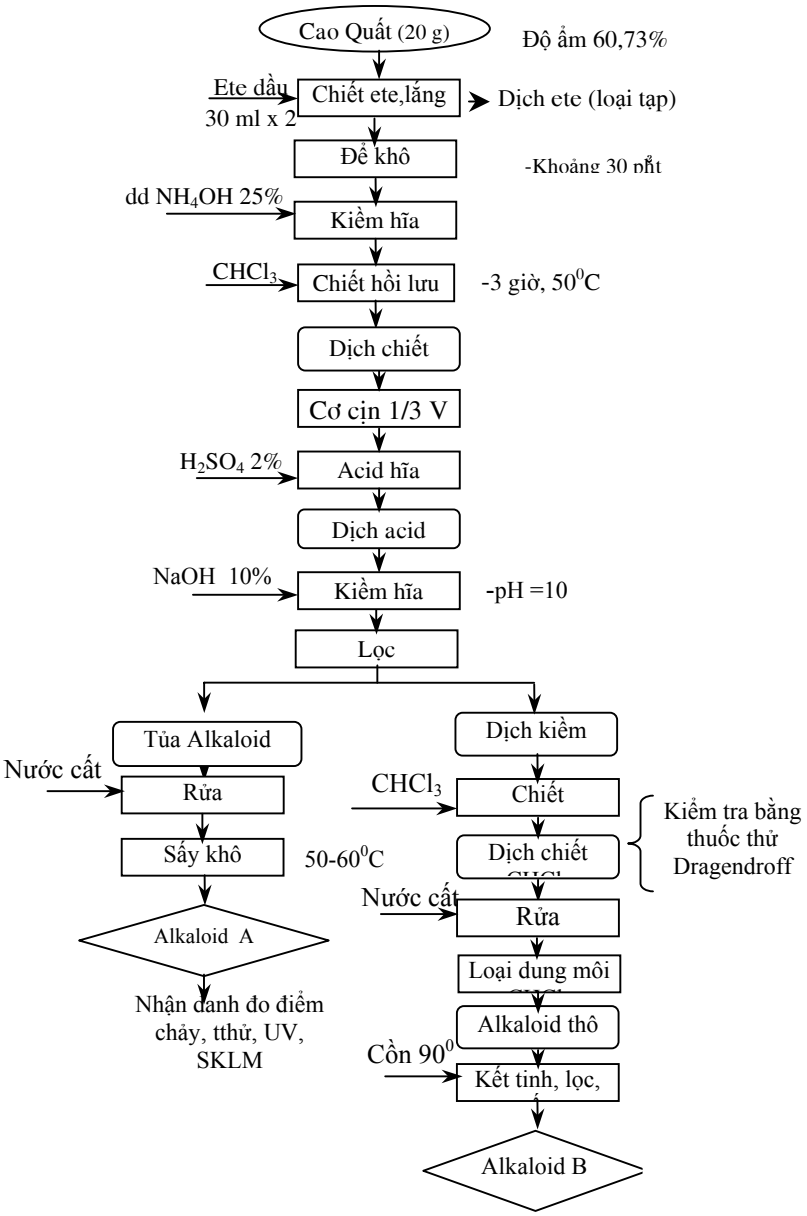
Nước quả Quất đem cô đặc trong chân không thành cao Quất, trích ly với ete dầu hỏa để loại tạp. Kiềm hóa bằng dung dịch NH_4OH 25% đến pH = 9 trong 60 phút. Chiết hồi lưu bằng dung dịch chloroform khoảng 3 giờ. Nhiệt độ chiết khoảng 50 –60^oC.

Dịch chiết được cô còn khoảng 1/3 thể tích, sau đó acid hóa bằng H_2SO_4 2%. Dịch acid được kiềm hóa bằng dung dịch NaOH 10% đến pH=10. Lọc lấy tủa, rửa tủa bằng nước cất. Đem sấy khô ở 50- 60^0, được tủa alkaloid A dạng tinh thể trắng, khá sạch (1,49% tính trên khối lượng cao Quất).

Dịch kiềm được đem chiết với $CHCl_3$, rửa loại kiềm bằng nước cất. Cô thu hồi $CHCl_3$, kết tinh alkaloid thô trong cồn 90^0. Lọc và sấy khô được alkaloid B.

1.Các yếu tố ảnh hưởng đến lượng tinh dầu:

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến lượng tinh dầu thu được như nước, nồng độ NaCl, độ ẩm vỏ, thời gian thu hoạch, …



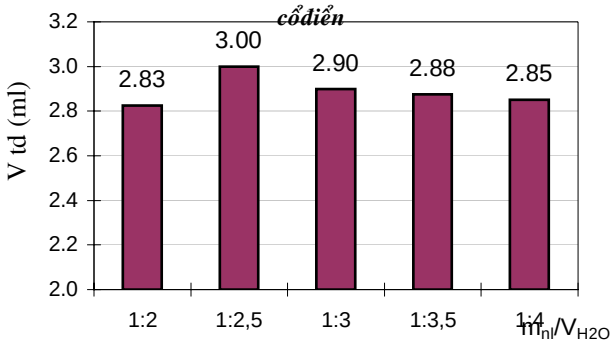
Sơ đồ 2: Quy trình tách chiết alkaloid

III.KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU:

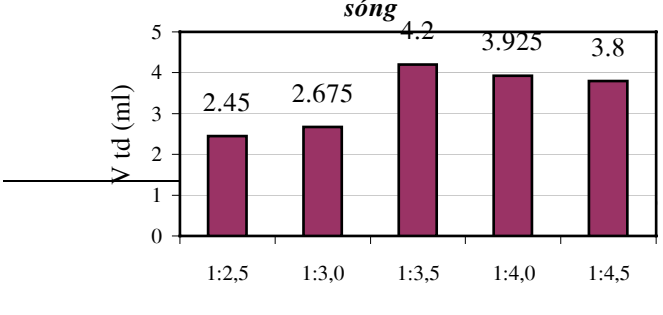
1.1.Khảo sát tỷ lệ khối lượng vỏ tươi/nước:

Khối lượng nguyên liệu: 100 gam vỏ tươi.

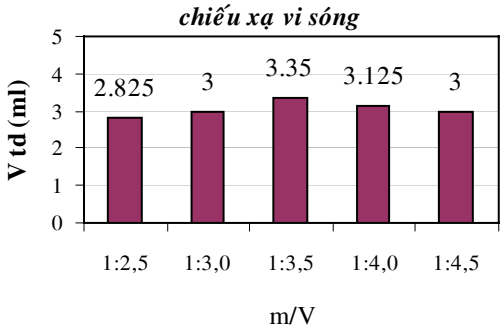
Đồ thị 1: Khảo sát lượng nước chưng tối ưu với vỏ tươi thực hiện bằng phương pháp đun nóng cổđiển



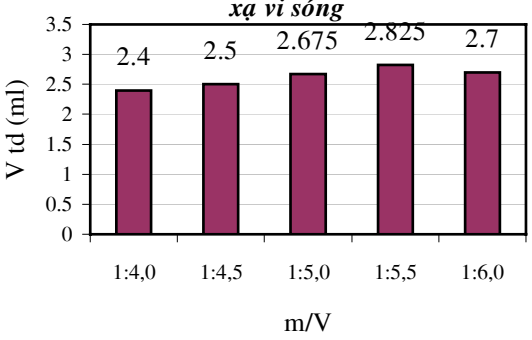
Đồ thị 2: Khảo sát lượng nước chưng tối ưu với vỏ tươi thực hiện bằng chiếu xạ vi sóng



Đồ thị 3: Khảo sát lượng nước chưng tối ưu với vỏ trữ đông thực hiện bằng chiếu xạ vi sóng



Đồ thị 4: Khảo sát lượng nước chưng ttối ưu với vỏ khô thực hiện bằng chiếu xạ vi sóng



Khi gia nhiệt hỗn hợp nguyên liệu và nước, hơi nước thẩm thấu vào trong các lớp tế bào, làm phá vỡ túi tinh dầu và bị lôi cuốn theo hơi nước, hơi nước thẩm thấu vào trong tế bào, làm phá vỡ túi tinh dầu và tinh dầu bị lôi cuốn theo hơi nước. Tỷ lệ khối lượng nguyên liệu/ nước nhỏ hơn hay lớn hơn lượng nước tối ưu đều làm giảm lượng tinh dầu. Lượng nước quá nhiều một số thành phần tinh dầu có tính phân cực sẽ tan vào nước, lượng nước quá ít thì không đủ hòa tan các chất keo, muối bao bọc xung quanh túi tinh dầu. Lượng nước tối ưu khảo sát được trình bày trong bảng sau:

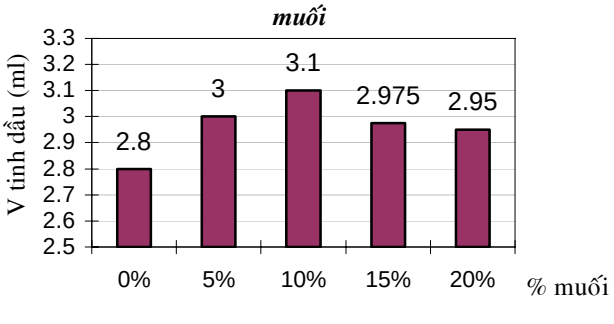
Tỉ lệ khối lượng vỏ tươi/ Thể tích nước tối ưu			
Phương pháp đun nóng cổ điển	Phương pháp chiếu xạ vi sóng		
Vỏ tươi	Vỏ tươi	Vỏ trữ đông	Vỏ khô
1:2.5	1:3.5	1:3.5	1:5.5

1.2.Khảo sát nồng độ muối ăn:

Lượng muối ăn NaCl thêm vào đóng vai trò:

- Làm tăng tỷ trọng của nước, phá vỡ hệ nhũ tinh dầu- nước, làm cho tinh dầu dễ dàng tách lớp trong quá trình chưng cất.
- Rút ngắn thời gian chưng cất.

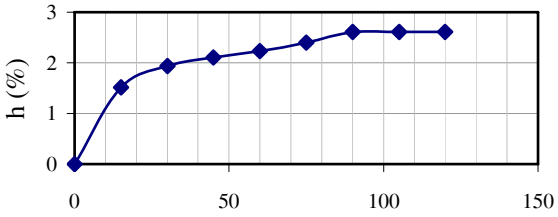
Đồ thị 5: Thể tích tinh dầu thay đổi theo tỉ lệ muối



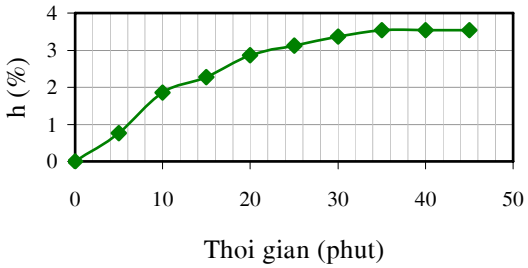
1.3.Khảo sát thời gian chưng cất tối ưu:

Thời gian chưng cất tối ưu đối với phương pháp chưng cất hơi nước cổ điển là: 90 phút, đối với phương pháp chưng cất hơi nước dưới sự chiếu xạ của vi sóng là: 35 phút, sau đó lượng tinh dầu tăng không đáng kể.

Đồ thị 6: Hiệu suất tinh dầu theo thời gian chưng cất hơi nước cổ điển



Đồ thị 7: Hiệu suất tinh dầu theo thời gian chiếu xạ vi sóng



1.4.Thành phần hóa học và các chỉ số hóa lý của tinh dầu Quất:

Qua kết quả kiểm tra cảm quan tinh dầu Quất có phẩm chất tốt, trong suốt, có mùi thơm đặc trưng dễ chịu.

STT	Thành phần hóa học	%	
		a (*)	b(*)
1	1R-a -Pinene	1.16	-
2	Bicylo [3.1.3]-heptan-6,6-dimethyl-2-methylene	2.21	-
3	Limonene	93.12	89.02
4	Santolia triene	0.32	-
5	m-Metha-4,8-diene,(1S,3S)-(+)-	0.23	-
6	Germacrene D	1.71	0.79
7	Hexanedioc acid, mono (2-ethylhexy) ester	1.25	-
8	3-carene	-	1.19
9	Beta.-pinene	-	1.29
10	Beta.-myrcene	-	4.59
11	Nonanal	-	0.17
12	Pinal,2,3-epoxy	-	0.31
13	p-menth-6,8-dien-2-one	-	0.57
14	p-menth-8-ene-1,2-epoxy	-	0.2
15	Lauraldehyde	-	0.47
16	Acetic acid, geraniol ester	-	0.92
17	Diisooctyl phthalate	-	0.47
Tổng cộng		100	100

Chỉ số hoá lý	Giá trị
Tỷ trọng d_{25}	0.8417
Chiết suất n_D^{30}	1.4673
Tỷ lệ tinh dầu hòa tan trong cồn 90^0, ở 25^0C	1:4.775
Độ sôi, ^{0}C	176
Năng suất quay cực, $[a]_D^{30}$	+92,8
Chỉ số acid	0.54
Chỉ số xà phòng	6.86
Chỉ số ester	6.32
Chỉ số iod	56.375

(*)Chú thích:
a: Phương pháp chưng cất hơi nước cổ điển
b: Phương pháp chưng cất hơi nước dưới sự chiếu xạ của vi sóng

2.Khảo sát thành phần hóa học trong nước quả Quất và tách chiết alcaloid:

2.1.Phân tích các thành phần hóa học có trong cao của dịch quả Quất:

Dịch nước quả Quất sau khi lọc để loại bỏ hột, chất nhày, tạp rồi được hòa tan bằng cồn 90^0, đem cô chân không ở 60^0, 3 giờ được cao Quất với hàm lượng là tính trên nước quả sử dụng.

Phân tích sơ bộ hóa thực vật kết quả cho thấy trong cao quả Quất chứa f*lavonoid, alkcaloid, phytosterol, steroid, acid hữu cơ, đường khử, carotenoid, saponin.*

2.2.Các thông số ảnh hưởng đến quá trình tách chiết alkaloid:

Với dung môi chloroform ở tỷ lệ m_{cao}/V_{dm} = 1:3 đạt hiệu quả trích ly cao nhất.

-Thời gian chiết hồi lưu tối ưu là 3 giờ

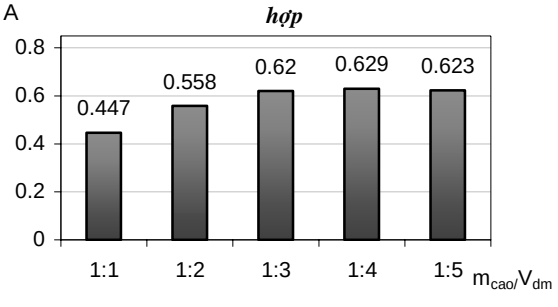
Khi chiết bằng dung dịch $CHCl_3$ xảy ra chủ yếu 2 quá trình:

+Quá trình thẩm thấu dung môi vào cao đã kiềm hóa.

+Quá trình các hợp chất có trong cao khuếch tán vào dịch chiết.

Dưới tác động của dung dịch NH_4OH25%, alkaloid dạng muối trong cao chuyển thành dạng base hòa tan được trong chloroform.

Đồ thị 3: Khảo sát lượng $CHCl_3$ chiết thích hợp



2.3.Nhận danh alkaloid:

Alkaloid A:

Lựa chọn bước sóng l = 285 nm để đo A (trong chi Citrus có nhiều alkaloid thuộc cấu trúc benzylisoquinolin, isoquinolin chủ yếu có l_{max} = 250-350 nm).

a) Đo điểm chảy: mẫu, mp = 157-159^{0}C.

Theo tài liệu (Merck Index I), điểm chảy Codein = 154 –157^{o}C.

b) Định tính bằng phương pháp hiện màu, phương pháp tủa:

-Thuốc thử Dragerdroff sẽ xuất hiện tủa màu cam hay đỏ cam.

-1ml H_2SO_4 đđ và 0,05 ml dung dịch $FeCl_3$ 13% xuất hiện màu xanh lam, thêm 0,05 ml HNO_3 màu sẽ chuyển sang đỏ.

c) Phương pháp sắc ký lớp mỏng:

Dùng bản mỏng silicagel Merck 60 F_{254}. Hệ dung môi khai triển: chloroform- methanol-amoniac (20:4:1)

Chất chuẩn: lấy 2 viên thuốc Neo-Cordion (trị ho) chứa Codein, nghiền nhỏ, hòa 1ml dung dịch $CHCl_3$, chấm ở vị trí 1.

Mẫu: lấy mẫu thử khoảng 10 mg, hòa vào 0,5 ml $CHCl_3$ chấm ở vị trí 2.

Hiện vết : hơi iod cho vết màu nâu; bằng thuốc thử Dragendorff cho vết màu vàng cam.

+Chất chuẩn: cho 1 vết có Rf_1=0,736.

+Mẫu: cho 1 vết có Rf_2=0,736 (trùng với chuẩn).

Alkaloid B:

a) Nhận diện alkaloid bằng các phản ứng tủa:

Thuốc thử Mayer cho tủa trắng; thuốc thử Dragendorff xuất hiện tủa vàng cam; thuốc thử Bouchardat cho tủa nâu.

b) Nhận diện alkaloid bằng phổ hồng ngoại IR:

Phổ hồng ngoại có những mũi đặc trưng: 3625, 2900, 1451, 1365, 715, 412 cm^{-1}

c) Nhận diện alkaloid bằng sắc ký lớp mỏng:

Hệ dung môi khai triển: chloroform-methanol-amoniac (20:4:1).

Chất mẫu: lấy mẫu thử khoảng 10 mg, hòa vào 0,5 ml $CHCl_3$.

Hiện vết : hơi iod cho vết màu nâu có Rf_2 =0,824.

IV.KẾT LUẬN

Hiệu suất tinh dầu thu được khá cao (2.61% từ phương pháp đun nóng cổ điển và 3.54% từ phương pháp chiếu xạ vi sóng), phẩm chất của tinh dầu rất tốt. Qua kết quả khảo sát, chúng tôi nhận thấy phương pháp ly trích tinh dầu dưới sự hỗ trợ của vi sóng có đặc điểm là thời gian ly trích ngắn, thành phần tinh dầu xuất hiện nhiều hợp chất chứa oxy có nhiệt độ sôi cao làm tăng độ bền và làm dịu mùi thơm của hợp hương do đó tinh dầu thu được có mùi rất giống với mùi tự nhiên. Cả 2 phương pháp dễ dàng thực hiện trong điều kiện sản xuất thủ công với các thiết bị đơn giản.

Thành phần chính trong tinh dầu Quất là limonen: 93.12% (từ phương pháp đun nóng cổ điển) và 89.02% (từ phương pháp chiếu xạ vi sóng). Trường hợp này có thể giải thích vì limonene là một hợp chất không phân cực nên rất ít chịu tác dụng của vi sóng.

Alkaloid thu được từ nước quả Quất gồm alkaloid A và alkaloid B với hiệu suất là 6,68% (so với lượng cao khô). Bước đầu nhận danh alkaloid A là Codein.

Alkaloid B thì chỉ định tính sơ bộ, cần được nhận danh chính xác và xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ MS, NMR.

Như vậy việc khai thác tinh dầu Quất là điều cần thiết để đáp ứng nhu cầu cho ngành công nghiệp hương liệu trong nước. Đồng thời mở ra hướng nghiên cứu mới là tách chiết alkaloid từ quả Quất, một nguồn nguyên liệu rất dồi dào và phổ biến ở tại nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1].Đỗ Chung Võ, Vũ Ngọc Lộ, *Những cây tinh dầu Việt Nam –Khai thác, chế biến, ứng dụng,* NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 1996.

[2].Nguyễn Năng Vinh, *Kỹ thuật khai thác và sơ chế tinh dầu,* NXB Nông nghiệp, 1978.

[3].Đỗ Tất Lợi, *Tinh dầu Việt Nam*, NXB Y học TP.HCM, 1985.

[4].Nguyễn Văn Đàn, Nguyễn Viết Tựu, *Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc,* NXB Y học TP.HCM, 1985.

[5].Lê Ngọc Thạch, *Tinh dầu*, NXB Đại học Quốc gia TP.Hồ Chí Minh, 2003.

[6].*The Merk Index* , Vol. 1,2 – Merk & Co. Inc. Rahway N.J.U.S.A 1989.

[7].CRC,*Handbook of Chemistry and Physics,* 62 nd edition,– 1981-1982.

[8].*The Essential Oil,* Vol 1, 2, 3 Ernest Guenther, Ph. D-D. Van Nostrand Company, Inc.