

ĐẠI HỌC QUỐC GIA THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

NGUYỄN KIM PHI PHỤNG

PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

NHÀ XUẤT BẢN
ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP HỒ CHÍ MINH – 2007

GT.01. H(V)
DHQG.HCM-07

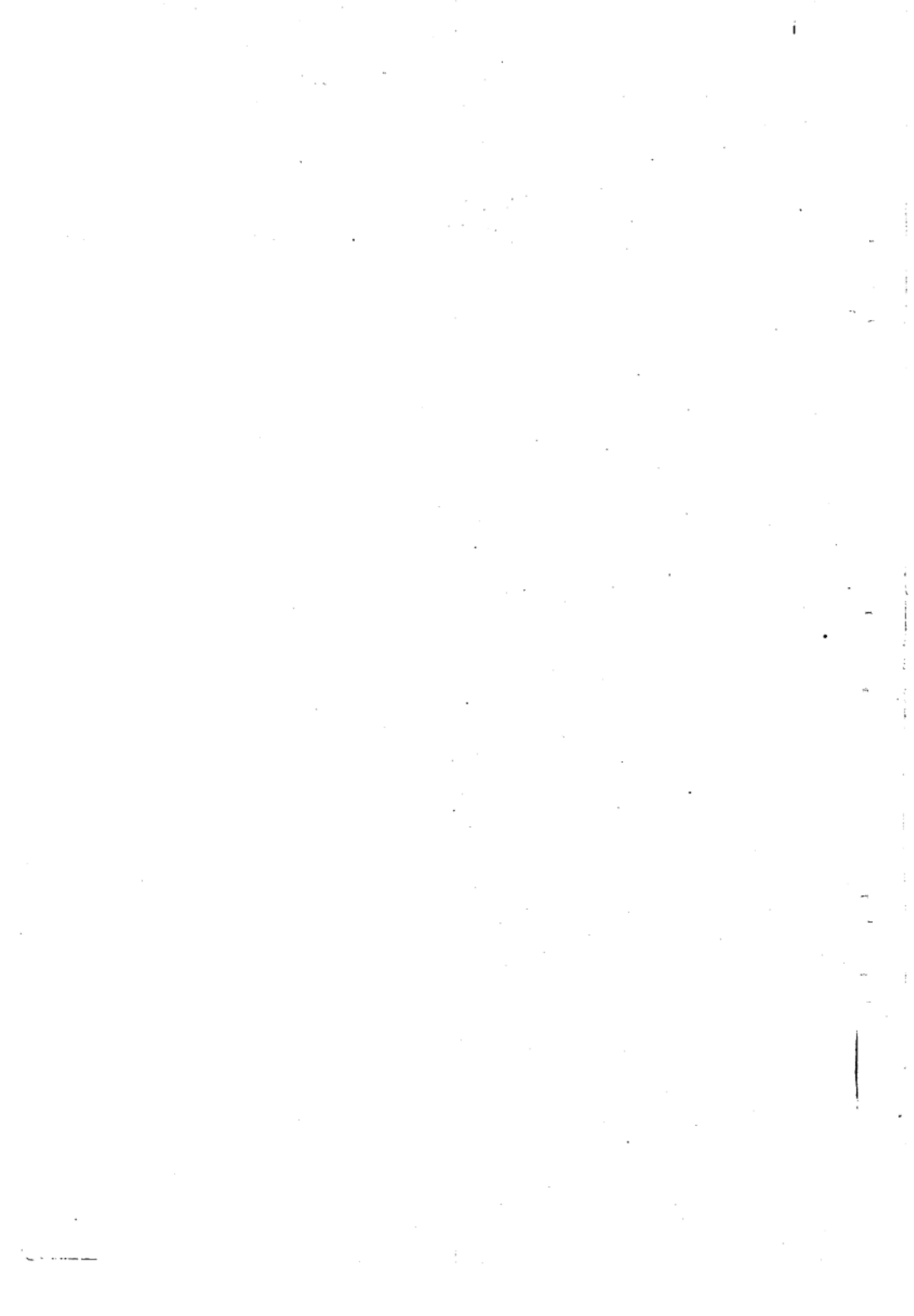
732-2006/47-72/DHQGTPHCM

H.GT.491-07(T)

Kính tặng

PGS-TS Nguyễn Ngọc Sương

*Người cô kính yêu, người đã hướng dẫn
tôi đi theo con đường hoá học các hợp
chất tự nhiên.*



LỜI NÓI ĐẦU

* * *

Sách “*Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*” được biên soạn làm giáo trình cho chương trình cao học của Bộ môn Hoá hữu cơ, Khoa Hoá. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Sách cũng hữu ích cho sinh viên các năm cuối bậc đại học, học viên cao học, nghiên cứu sinh chuyên ngành Hoá học và Sinh học, cũng như các nghiên cứu viên ở các Viện Hoá hoặc Sinh Hoá khi cần cô lập một hợp chất hữu cơ từ cây cỏ, từ một phản ứng hóa học hoặc từ các sinh khối.

Việc sử dụng các kỹ thuật sắc ký khác nhau nhằm cô lập hợp chất hữu cơ là một hoạt động mà tất cả những ai làm việc trong các phòng thí nghiệm hoá cũng như sinh đều phải tiến hành thường xuyên, tuy nhiên ở Việt Nam sách trình bày về các loại kiến thức này vẫn còn rất ít. Sách trình bày phần kiến thức cơ bản và cung cấp những kiến thức chuyên sâu về các phương pháp sắc ký, mỗi vấn đề đều có thêm những hình ảnh minh hoạ để người đọc dễ hiểu.

Sách gồm có chín chương và một chương phụ lục:

- Chương 1: Kỹ thuật chiết tách hợp chất hữu cơ khỏi cây cỏ
- Chương 2: Phương pháp nhận danh các loại hợp chất tự nhiên
- Chương 3: Phương pháp sắc ký cột
- Chương 4: Phương pháp sắc ký lớp mỏng
- Chương 5: Phương pháp sắc ký trao đổi ion
- Chương 6: Phương pháp sắc ký gel
- Chương 7: Phương pháp sắc ký khí (GC)
- Chương 8: Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)
- Chương 9: Điện di

Biên soạn một quyển sách về một lĩnh vực chuyên sâu, hiện đại trong khi ở Việt Nam chưa có nhiều sách về kỹ thuật này nên chúng tôi gặp không ít khó khăn về thuật ngữ. Những thuật ngữ được sử dụng trong sách là theo quyển "Từ điển Kỹ thuật tổng hợp Anh – Việt" của Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 1991. Với phần lớn các thuật ngữ, chúng tôi cố gắng phiên dịch và đều có ghi lại trong ngoặc đơn nguyên mẫu bằng tiếng Anh, còn một số ít thuật ngữ chúng tôi đành để ở nguyên dạng tiếng Anh.

Các hình ảnh trong bài đều là hình ảnh minh họa.

Đây là lần đầu tiên biên soạn quyển sách này nên chúng tôi sẽ khó tránh khỏi những sai sót, rất mong nhận được những ý kiến đóng góp quý báu để chúng tôi có thể hoàn thiện hơn trong những lần tái bản.

Cuối cùng chúng tôi xin chân thành cảm ơn PGS-TS Nguyễn Ngọc Sương, người cô kính yêu. Tấm gương lao động khoa học miệt mài của cô là kim chỉ nam để tôi dõi theo mà tiến tới trong khoa học. Cô luôn cho tôi những lời khuyên quý báu trong cuộc sống cũng như trong công tác giảng dạy; cô đã dành thời giờ đáng lẽ để nghỉ ngơi mà đọc giúp bản thảo, giúp tôi kịp thời chỉnh sửa, hoàn tất.

Xin chân thành cảm ơn.

Thành phố Hồ Chí Minh, tháng 05 năm 2007.

TÁC GIẢ

Nguyễn Kim Phi Phụng

CÁC PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

Chương 1

KỸ THUẬT CHIẾT TÁCH HỢP CHẤT TỰ NHIÊN RA KHỎI CÂY CỎ

Hợp chất tự nhiên (natural products), phân tử sinh học tự nhiên (biological molecule), là chất biến dưỡng thứ cấp (secondary metabolite), có trọng lượng phân tử nhỏ ($M \leq 1500$ amu), được tạo ra bởi cơ thể của một sinh vật. Chất biến dưỡng thứ cấp có thể cần thiết hoặc nhiều khi không cần thiết cho sự sống của sinh vật, điều này khác với những hợp chất đại phân tử như protein, acid nucleic, polisacarid là những hợp chất cần bản nhất thiết cần phải có cho sự sống của một sinh vật.

Các chất biến dưỡng thứ cấp bao gồm nhiều loại hợp chất và được sắp xếp thành những nhóm (group) khác nhau. Việc phân loại các hợp chất thành *một nhóm* thường không phải bởi một định nghĩa duy nhất, cũng như ranh giới của một nhóm thường không rõ ràng. Người ta nhận thấy một chất biến dưỡng thứ cấp nào đó thường hay hiện diện trong một loài sinh vật đặc trưng nào đó. Chất biến dưỡng thứ cấp có thể đóng vai trò như một chất gây chán ăn (antifeedants), chất dẫn dụ giới tính (sex attractants), chất kháng sinh (antibiotic agents) để bảo vệ sinh vật đó không bị các loài khác làm hại..., nhưng rất nhiều chất biến dưỡng thứ cấp không có hoạt tính sinh học hoặc có thể có nhưng chưa được biết đến.

Các chất biến dưỡng thứ cấp của thực vật thường thuộc các nhóm sau: alcaloid, quinonoid, steroid, terpenoid (bao gồm tinh dầu là các terpen thấp), iridoid, flavonoid, coumarin, glycosid....

Nếu những hợp chất đại phân tử có trọng lượng phân tử lớn, tính chất hóa học tương đối đồng nhất, người ta có thể đề xuất được một số qui trình

tổng quát để chiết tách cô lập chúng, thì các hợp chất tự nhiên có trọng lượng phân tử nhỏ, tính chất hóa học đa dạng, khác biệt, nên không thể có một qui trình tổng quát nào có thể áp dụng chung cho tất cả các nhóm, mà mỗi loại nhóm phải có một số phương pháp khác nhau, cần phải được khảo sát cụ thể.

Mục đích của việc chiết tách, cô lập hợp chất tự nhiên

Khi một nhà hóa học chọn nghiên cứu trên một loài cây, có thể người ấy muốn hiểu biết một số trong các điều sau.

- Khảo sát thành phần hóa học của một cây mới, trước đó chưa có ai nghiên cứu và xem những chất này có hoạt tính sinh học gì không? Muốn biết được điều này cần phải cô lập hợp chất đạt độ tinh khiết $\geq 95\%$ mới có thể khảo sát cấu trúc hóa học bằng các phương pháp quang phổ hiện đại.
- Cần có thêm lượng mẫu một hợp chất đã biết rõ cấu trúc hóa học, nay muốn khảo sát thêm về hoạt tính sinh học của chất đó. Nếu việc thử nghiệm cho kết quả hấp dẫn thì sẽ xét xem có thể tổng hợp hóa học để có số lượng nhiều.
- Tìm hiểu một hợp chất đã biết và xem chất này được sản sinh ra từ bộ phận nào của sinh vật (sự sinh tổng hợp).
- Tìm hiểu sự khác biệt của những chất biến dưỡng thứ cấp được sản sinh ra từ cùng một nguồn tự nhiên nhưng không cùng điều kiện sinh thái: thí dụ tìm hiểu xem hai thực vật cùng họ (family), cùng chi (genus), cùng loài (species) nhưng mọc ở hai nơi có điều kiện khí hậu, đất đai thổ nhưỡng khác nhau có chứa cùng những hợp chất tự nhiên và những chất này có cùng hàm lượng hay không?

Các nghiên cứu trên cây *Hedyotis corymbosa* L. và cây *Hedyotis diffusa* L. mọc ở Hồng Kông và mọc ở Việt Nam cho biết cả hai loài cây này đều có chứa những hợp chất giống nhau nhưng hàm lượng phần trăm các chất đó trong cây có khác nhau nhiều.

1. QUÁ TRÌNH KHẢO SÁT HÓA – THỰC VẬT CỦA MỘT CÂY

Quá trình khảo sát hoá - thực vật của một loài cây thường theo những giai đoạn như sau

1.1. Lựa chọn nghiên cứu trên một loài cây (của một họ)^[1]

Các nhà nghiên cứu quyết định làm việc trên một loài cây của một họ cây nào đó là tùy vào mục đích đã lựa chọn trước. Việc lựa chọn này tùy thuộc rất nhiều vào tài liệu tham khảo và các phương tiện sẵn có hoặc liên kết được của phòng thí nghiệm đó. Các tài liệu tham khảo có thể là dữ liệu tin học NAPRALERT (phần mềm phải mua) cho biết các thông tin về hóa-thực vật, đặc điểm thực vật, hoạt tính sinh học của hợp chất cụ thể, hoặc tất cả các thông tin có thể có được của từng vùng địa phương, từng quốc gia.

Luôn luôn cần phải có thông tin từ Chemical Abstracts (Viết tắt là C.A.) vì cho biết tổng quát về các nghiên cứu trên thế giới trên một cây nào đó. Tuy nhiên, thông tin trên CA chỉ cho biết tóm tắt kết quả của bài báo, nếu sau khi đọc, nhận thấy thông tin đó cần thiết thì người đọc cần tìm bài báo gốc để có đầy đủ chi tiết hơn (CA cho biết luôn bài báo gốc đã được đăng ở tạp chí nào).

Thông thường sau khi nghiên cứu trên các tài liệu mà nhận thấy rằng cây được chọn khảo sát chưa có tác giả nào trên thế giới nghiên cứu, nghĩa là hoàn toàn không có thông tin nào về thành phần hóa học của cây thì nên tra khảo thành phần hóa học của các cây khác nhưng *cùng một chi* với cây khảo sát. Các nghiên cứu cho thấy có đặc điểm “Hóa – Thực vật” (Chemotaxonomy) nghĩa là những cây cùng một chi (hoặc cùng họ) có thể chứa những hợp chất giống nhau hoặc hợp chất có cùng loại khung sườn.

Thí dụ chi *Hedyotis*, thuộc họ Cà phê (Rubiaceae) thường chứa hợp chất acid triterpen với khung sườn ursan và oleanan. Các cây thuộc họ Rau răm (Polygonaceae), họ Vang (Caesalpiniaceae), họ Táo (Rhamnaceae), họ Cà phê (Rubiaceae)... thường chứa hợp chất anthraquinon và cần biết là các anthraquinon có tính thăng hoa. Họ Cúc (Asteraceae) thường chứa hợp chất sesquiterpen lacton....

Sau khi đã chọn làm việc trên một loài cây nào đó, cần phải thu thập mẫu cây.

1.2. Xác định tên khoa học cho cây

Rất nhiều trường hợp chỉ với một loài cây nhưng lại có nhiều tên gọi khác nhau tùy theo địa phương. Một loài cây có thể có nhiều tên địa phương khác nhau nhưng chỉ có một tên khoa học (một số ít cây có hai tên khoa học). Thí dụ cây Cúc chi thiên *Elephantopus scaber* L., thuộc họ Cúc (Asteraceae) còn có các tên khác như Cỏ lưỡi mèo, Chân voi nhám; vì thế trước khi thu hái mẫu cây cần phải nhờ nhà thực vật nhiều kinh nghiệm xác định tên khoa học cho cây. Muốn vậy cần phải cung cấp cho nhà thực vật mẫu cây tươi, còn nguyên, với đầy đủ các bộ phận hoa, lá, thân, rễ, vì nhiều khi cần phải khảo sát hết tất cả các bộ phận của cây, nhất là bộ phận hoa, rễ, mới có thể xác định được tên khoa học cho cây.

Các nghiên cứu cho thấy tất cả những sự thay đổi về cao độ của vùng cây mọc, tuổi của cây, khí hậu, thổ nhưỡng đều có ảnh hưởng đến hàm lượng của hợp chất trong cây, trong một vài trường hợp có ảnh hưởng đến loại hợp chất được sinh tổng hợp trong cây. Điều này đã được truyền tụng từ lâu trong dân gian qua câu “Cây cam trồng ở Giang Nam thì ngọt, đem về trồng ở Giang Bắc thì chua”.

Mỗi bộ phận của cây có thể chứa những chất biến dưỡng thứ cấp khác nhau, thí dụ các flavonoid thường hiện diện trong lá và nhất là hoa của một số loài cây. Các alcaloid tropan hiện diện trong rễ, các sesquiterpen lacton và tinh dầu thường hiện diện ở hạch tiết của lá, vỏ thân.... (Cho dù giả sử có tài liệu cho biết trước rằng một bộ phận của cây chứa loại hợp chất nào đó thì cũng nên có các khảo sát sơ bộ trên các bộ phận riêng biệt hoa, lá, thân, rễ ... để so sánh định tính / định lượng sự hiện diện của các hợp chất đó để có thể chọn được bộ phận cây phù hợp cho nghiên cứu).

Do những lý do nêu trên, trong bài viết báo cáo cần ghi rõ cây đã được thu hái ở địa phương nào, vùng cây mọc có cao độ bao nhiêu, thời tiết và loại đất nơi cây mọc, thời gian thu hái, độ tuổi của cây. Phải ghi rõ tên nhà thực vật (và cơ quan mà nhà thực vật công tác) đã xác định tên khoa học cho cây; mẫu cây được lưu giữ tại viện bảo tàng thực vật địa phương nào hoặc cơ quan