

THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA TINH DẦU LÁ TRẦU (*PIPER BETLE* L.) TRỒNG TẠI HẢI DƯƠNG

Phạm Thế Chính*, Dương Nghĩa Bang, Phan Thanh Phương,
Khiếu Thị Tâm, Phạm Thị Thắm, Lê Thị Xuân, Bùi Thị Thúy

Trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên

TÓM TẮT

Bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước đặc biệt có hiệu ứng muối kết hợp với đun hồi lưu, chúng tôi đã tách thành công tinh dầu lá trầu được trồng tại Hải Dương với hiệu suất đạt 1,01%.

Tinh lá trầu tách được có tỷ trọng cao là $d_4^{25}=0,963$ và chiết suất lớn $n_D^{25}=1,5362$. Bằng phương pháp sắc ký khí ghép nối khối phổ (GC/MS), chúng tôi đã khẳng định tinh dầu lá trầu trồng tại Hải Dương có thành phần hóa học chính là eugenol, với hàm lượng lên tới 77,24%. Từ tinh dầu này chúng tôi đã sử dụng phương pháp sắc ký cột thường nhồi bằng silica gel theo phương pháp nhồi ướt với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat, 10/1, v/v; đã phân lập được eugenol tinh khiết và đã khẳng định được cấu trúc của nó bằng các phương pháp phổ hiện đại IR, MS, ^1H & ^{13}C -NMR.

Từ khóa: trầu không, tinh dầu trầu, eugenol, allylbenzen, polyphenol

MỞ ĐẦU

Cây trầu (*Piper betel* L.) được trồng ở khắp nơi trong nước ta để lấy lá ăn trầu. Nó còn được trồng tại nhiều nước khác ở châu Á, vùng nhiệt đới như Malaysia, Indonexia, Philipin... Ngoài việc dùng lá trầu nhai với cau và vôi để ăn trầu và bảo vệ răng miệng, dân gian còn dùng nước lá trầu để sát trùng, chống lở loét, chống viêm nhiễm...[1]. Các hợp chất polyphenol trong lá trầu có khả năng chống oxi hóa cao, và ức chế một số nguyên nhân gây bệnh loét dạ dày [4].

Tinh dầu lá trầu Ấn Độ chứa cadinen, γ -lacton, metyl eugenol...[3], theo Nguyễn Thị Lý và cộng sự, tinh dầu lá trầu trồng ở Nam Bộ chứa chủ yếu là 4-allyl-1,2-diaxetoxylbenzen (43,21%), phenol- 4-allyl-2metoxyaxetat (19,44%) và phenol-2-metoxi-4-(1-propenyl) (19,82%) [2].

Tinh dầu lá trầu trồng ở các địa phương phía Bắc chưa có số liệu công bố về thành phần hóa học. Hơn nữa sản phẩm nước súc miệng có nguồn gốc từ tinh dầu lá trầu của nhiều công ty được phẩm đã được bán trên thị

trường, chúng được sản xuất dựa trên các kinh nghiệm dân gian mà chưa có tiêu chuẩn kiểm nghiệm hóa học về thành phần chính tạo nên hoạt tính của sản phẩm, nên cần phải nghiên cứu kỹ về thành phần hóa học của tinh dầu lá trầu, đó là những lý do cho nghiên cứu của công trình này.

THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu thực vật

Lá cây trầu (*Piper betel* L.), được thu hái vào tháng 2 năm 2009 tại Hải Dương. Mẫu do phòng thực vật, Viện sinh thái và Tài nguyên Sinh vật thuộc Viện Khoa học Việt Nam giám định. Mẫu sau khi thu hái được làm sạch và phơi khô trong điều kiện ánh sáng tự nhiên, sau đó nghiền thành bột mịn.

Hóa chất và thiết bị

Chất hấp phụ dùng cho sắc ký cột là silica gel (0,040 – 0,063 mm, Merck). Sắc ký lớp mỏng dùng bản mỏng trắng sẵn 60F₂₅₄ (Merck). Các dung môi chiết và chạy sắc ký đạt loại tinh khiết (PA).

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được ghi trên máy Bruker AV ở 500 MHz đối với phổ ^1H và 125,7 MHz đối với ^{13}C -NMR. Phổ khối

* Tel: 0988113933; Email: chemistry20069@gmail.com

lượng được đo trên máy Hewlett Packard HP 5890, Serie II. Phổ IR được đo trên máy Impac 410-Nicolet FT-IR.

Chưng cất tinh dầu

Cho 300 g bột lá trà vào bình cất, 600 ml dung dịch NaCl 15%, lắp bẫy tinh dầu có sẵn 100 ml toluen, lắp sinh hàn, đun hồi lưu 3 giờ, tháo dung môi trong bẫy, cất lấy 1,5 lít nước-dầu. Bão hòa dịch cất bằng NaCl, chiết dịch thu được bằng 150 ml toluen, chia làm 3 lần. Gộp dịch chiết toluen với toluen lấy từ bẫy, làm khô, cất loại toluen thu được 3,03 g tinh dầu (hiệu suất 1,01%), là chất lỏng màu vàng, mùi thơm dễ chịu, $d_4^{25}=0,963$, $n_D^{25}=1,5362$.

Phân tích tinh dầu bằng sắc ký khí ghép nối khối phổ

Tinh dầu lá trà được phân tích thành phần bằng máy GC/MS (Gas Chromatography Mass Spectrometry), trên thiết bị Hewlett Packard 6890 Series GC System với cột HP-5 (5% phenyl methyl polysiloxan), Hewlett Packard HP 5973 Mass Selective Detector. Được tiến hành với khí mang He tốc độ 1ml/phút, nhiệt độ buồng bơm mẫu 250°C, theo chương trình nhiệt độ: giữ ở 30°C trong 5 phút sau đó tăng 5°C/phút đến 270°C, giữ nhiệt độ này trong vòng 5 phút. Điều kiện của detector phổ khối lượng: nhiệt độ nguồn là 230°C, điện thế 70eV, nguồn 2A, phân giải 1000. Cấu trúc của các thành phần được xác định bằng so sánh phổ của thành phần tinh dầu với phổ khối có trong thư viện máy, nếu độ trùng lặp từ 90% trở lên được coi như đã nhận biết. Kết quả phân tích thể hiện trên phổ đồ GC (Hình 1) và Bảng 1.

Phân lập thành phần chính của tinh dầu lá trà

Tiến hành sắc ký cột 1 g tinh dầu với cột dài 70 cm và đường kính 2,0 cm, sử dụng 50 g sili cagel cỡ hạt 0,040 – 0,063 mm, theo phương pháp nhồi ướt, dung môi rửa giải là hệ n-hexan/etyl axetat 10/1 (v/v) thu được 50 phân đoạn, mỗi phân đoạn 3 ml. Khảo sát sắc ký lớp mỏng (SKLM) các phân đoạn thu được, gom các phân đoạn có R_f giống nhau thành một nhóm, loại dung môi thu sản phẩm. Từ phân đoạn 10 đến phân đoạn 24 thu được 0,53 g chất lỏng (T1), hiệu suất đạt 53% so

với cặn tinh dầu, $n_D^{25}=1,5401$, tan tốt trong axeton, benzen, $R_f=0,59$ (n-hexan/etyl axetat 10/1), EI-MS: $M^+=164$, m/z (%): 164 (100%), 149(38%), 131(22%), 121 (18%), 103 (21%), 91(20%), 77 (23%), 65(10%), 55(22%); IR (Film): $\nu_{max}cm^{-1}$: 3517 (OH), 3083 (CH thơm); 2941, 2849 (CH_3, CH_2); 1594, 1443 ($C=C$, thơm); 850 ($=CH_2$); $^1H&^{13}C$ -NMR (DMSO) (xem Bảng 2).

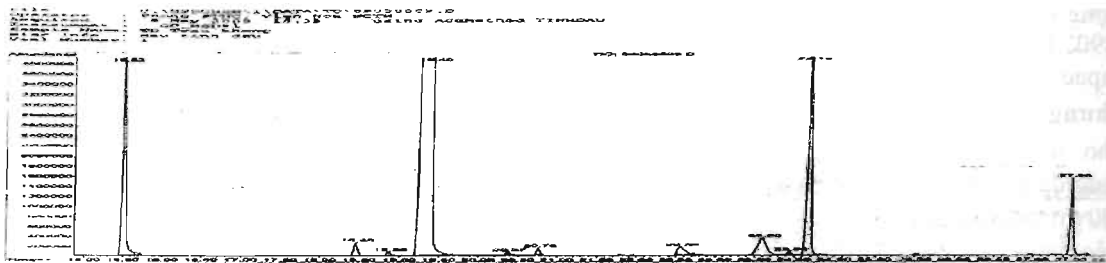
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Điều chế và phân tích tinh dầu lá trà Hải Dương

Theo các tài liệu đã công bố [2,3,4,5], thành phần chính của tinh dầu lá trà là các dẫn xuất của phenol. Các dẫn xuất này có nhiệt độ sôi cao, vì vậy chúng tôi dùng phương pháp cất lôi cuốn hơi nước đặc biệt có hiệu ứng muối, đun hồi lưu và bẫy dung môi để cất tinh dầu. Kết quả cho thấy tinh dầu lá trà vùng Hải Dương có hiệu suất cao 1,01%, tinh dầu có mùi dễ chịu, có tỷ trọng khá lớn $d_4^{25}=0,963$ và chiết suất $n_D^{25}=1,5362$. Điều này chứng tỏ tinh dầu có thành phần có nhiệt độ sôi cao chiếm đa số. Quả vậy, phân tích tinh dầu lá trà Hải Dương bằng phương pháp GC/MS chạy theo chương trình nhiệt độ và so sánh phổ khối lượng với phổ khối trên thư viện máy để nhận dạng các chất với điều kiện có độ trùng lặp 90% trở lên. Kết quả ở hình 1, bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa học của tinh dầu lá trà Hải Dương

S TT	Thời gian lưu (phút)	Thành phần	Hàm lượng (%)
1	15,52	Chavicol	7,56
2	18,45	Chavicyl axetat	0,58
3	18,86	Chưa xác định	0,19
4	19,40	Eugenol	77,24
5	20,37	Chưa xác định	0,14
6	20,76	β -Caryophyllen	0,27
7	22,56	Chưa xác định	0,62
8	23,60	Chưa xác định	1,83
9	23,94	β -cadinen	0,17
10	24,18	Eugenyl axetat	8,67
11	27,51	4-allyl-1,2-diaxetoxybenzen	2,73



Hình 1. Phổ GC của tinh dầu lá trầu Hải Dương

Kết quả cho thấy tinh dầu của lá trầu Hải Dương có 11 thành phần, 7 thành phần đã nhận dạng được chiếm 96,37%, 4 thành phần chưa xác định được chiếm 3,63%. Thành phần chính của tinh dầu là eugenol chiếm đến 77,24%, hai thành phần có hàm lượng lớn nữa là eugenyl axetat 8,67% và chavicol 7,56%, thành phần 4-allyl-1,2-axetoxibenzen chiếm 2,73%. Rõ ràng thành phần tinh dầu của lá trầu Hải Dương rất khác thành phần tinh dầu của lá trầu Nam Bộ, tinh dầu lá trầu Nam Bộ có thành phần chính là 4-allyl-1,2-axetoxibenzen 43,21% [3], không có chavicol và cũng không có eugenyl axetat. Thành phần chính của tinh dầu lá trầu Hải Dương cũng rất khác với thành phần chính của tinh dầu Ấn Độ, Malaysia [2,3,4]. Có sự khác biệt trên có thể do thổ nhưỡng và khí hậu, cũng có thể do phương pháp điều chế tinh dầu. Thành phần chính eugenol, chavicol, eugenyl axetat và 4-allyl-1,2-diacetoxibenzen của tinh dầu lá trầu Hải Dương chiếm 96,37%. Tất cả chúng đều là dẫn xuất của phenol, chúng có nhiệt độ sôi cao, tỷ trọng và chiết suất cao. Vì eugenol trong tinh dầu lá trầu chiếm tới 77,24% nên có thể nói tinh dầu lá trầu Hải Dương là nguồn nguyên liệu quý cho sản xuất eugenol.

Phân lập và xác định cấu trúc các thành phần của tinh dầu

Phân lập tinh dầu bằng sắc ký cột:

Giá trị của tinh dầu tăng lên nhiều lần khi chúng ta phân lập được nhiều chất tinh khiết có giá trị về kinh tế. Vì vậy chúng tôi đặt vấn đề phân lập các chất tinh khiết từ tinh dầu lá trầu Hải Dương.

Như ở phần trên đã trình bày, 4 thành phần chính của tinh dầu lá trầu Hải Dương là: eugenol (77,24%), eugenyl axetat (8,67%), chavicol (7,56%) và 4-allyl-1,2-diacetoxylbenzen (2,73%). Bốn hợp chất này có nhiệt độ sôi cao và cấu trúc phân tử gần giống nhau nên phương pháp phân lập tốt nhất có thể là phương pháp sắc ký cột.

Với hệ dung môi n-hexan/etyl axetat, 10/1, v/v; trên cột dài 70 cm đường kính 2 cm, chất hấp phụ là silica gel 40-63 μm , tỷ lệ chất phân tách trên chất hấp phụ là 1/50, nhồi cột theo phương pháp nhồi ướt. Chúng tôi phân lập được một chất tinh khiết từ tinh dầu lá trầu Hải Dương, hiệu suất 53% ký hiệu là T1. T1 là chất lỏng có mùi thơm dễ chịu, hấp dẫn, $R_f = 0,59$ (n-hexan/etyl axetat, 10/1, v/v), hiện màu tím nâu với vanilin/ H_2SO_4 1% và xanh đen với FeCl_3 5%.

Xác định cấu trúc của T1:

T1 là chất lỏng có mùi thơm dễ chịu, chiết suất cao $n_D^{25} = 1,5401$. Phổ IR của T1 cho thấy nhóm OH $\nu = 3517 \text{ cm}^{-1}$, có 1 nhân thơm $\nu = 3083, 1594, 1443 \text{ cm}^{-1}$; tín hiệu của liên kết C-H no $\nu = 2941, 2849 \text{ cm}^{-1}$; ngoài ra còn có tín hiệu của nhóm metylen đầu mạch $\delta = 850 \text{ cm}^{-1}$.

Từ phổ ^1H & ^{13}C -NMR và DEPT cho biết T1 có 10 nguyên tử cacbon, trong đó có 1 nhóm OCH_3 $\delta_{\text{H}} = 3,72 \text{ ppm}$, s, 3H; 1 nhóm OH $\delta_{\text{H}} = 8,80 \text{ ppm}$, s, 1H; 1 nhóm allyl: $\delta_{\text{H}} = 3,25 \text{ ppm}$, d br, J = 4,8 Hz ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), $\delta_{\text{H}} = 5,89 \text{ ppm}$, m, 1H ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$) và $\delta_{\text{H}} = 5,02 \text{ ppm}$, d br, 2H, J = 7 Hz ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$) và có một nhân thơm 3 nhóm thế ở các vị trí 1,2,4 thể hiện ở 3 pic của proton thơm: $\delta_{\text{H}} = 6,81 \text{ ppm}$, d, 1H, J = 8,0 Hz (tương tác octo-

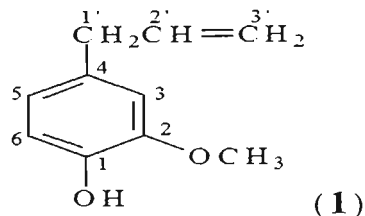
octo); $\delta_H = 6,55$ ppm, dd, 1H, $J = 8,0; 1,8$ Hz (tương tác *octo-octo* và *meta-meta*); $\delta_H = 6,63$ ppm, d, 1H, $J = 1,8$ Hz (tương tác *meta-meta*).

Xác định cấu trúc của T1

T1 là chất lỏng có mùi thơm dễ chịu, chiết suất cao $n_D^{25} = 1,5401$. Phổ IR của T1 cho thấy nhóm OH $\nu = 3517$ cm^{-1} , có 1 nhân thơm $\nu = 3083$, 1594, 1443 cm^{-1} ; tín hiệu của liên kết C-H no $\nu = 2941$, 2849 cm^{-1} ; ngoài ra còn có tín hiệu của nhóm metylen đầu mạch $\delta = 850$ cm^{-1} .

Từ phổ ^1H & ^{13}C -NMR và DEPT cho biết T1 có 10 nguyên tử cacbon, trong đó có 1 nhóm OCH_3 $\delta_H = 3,72$ ppm, s, 3H; 1 nhóm OH $\delta_H = 8,80$ ppm, s, 1H; 1 nhóm allyl: $\delta_H = 3,25$ ppm, d br, $J = 4,8$ Hz ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), $\delta_H = 5,89$ ppm, m, 1H ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$) và $\delta_H = 5,02$ ppm, d br, 2H, $J = 7$ Hz ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$) và có một nhân thơm 3 nhóm thế ở các vị trí 1,2,4 thể hiện ở 3 pic của proton thơm: $\delta_H = 6,81$ ppm, d, 1H, $J = 8,0$ Hz (tương tác *octo-octo*); $\delta_H = 6,55$ ppm, dd, 1H, $J = 8,0; 1,8$ Hz (tương tác *octo-octo* và *meta-meta*); $\delta_H = 6,63$ ppm, d, 1H, $J = 1,8$ Hz (tương tác *meta-meta*)

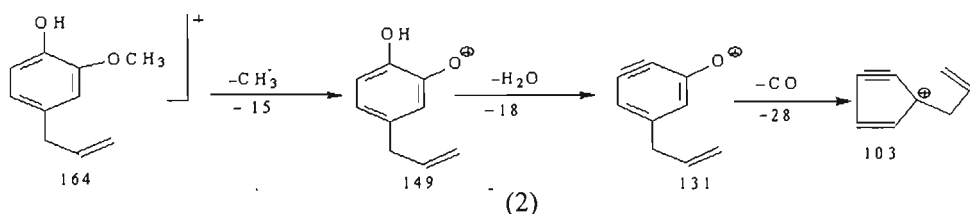
Như vậy từ các dữ liệu phổ IR, ^1H & ^{13}C -NMR và DEPT cấu trúc của T1 được nhận danh là eugenol (1):



Cấu trúc này của T1 được khẳng định lại một lần nữa bằng cách so sánh phổ khối của nó với phổ khối của eugenol trong thư viện máy, kết quả cho thấy chúng có độ trùng lặp 98% và phù hợp với qui luật phân mảnh (2):

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp cất lôi cuốn hơi nước đặc biệt có hiệu ứng muối, chúng tôi đã tách được tinh dầu lá trầu Hải Dương với hiệu suất 1,01%, tinh dầu có tỷ trọng và chiết suất cao $d_4^{25} = 0,963$, $n_D^{25} = 1,5362$. Tinh dầu lá trầu Hải Dương có hàm lượng eugenol rất lớn 77,24%. Từ tinh dầu này chúng tôi đã phân lập xác định cấu trúc của eugenol bằng các phương pháp phổ hiện đại.



Số liệu phổ ^1H & ^{13}C -NMR xem bảng 2:

Bảng 2. Dữ liệu của phổ ^1H & ^{13}C -NMR của T1

Số tên khung C	^{13}C -NMR			^1H -NMR		
	δ_C (ppm)	Nhóm có H	δ_H (ppm)	Số H	Độ bội	J (Hz)
C-1	145,99	C				
C-2	146,48	C				
C-3	115,83	CH	6,63	1H	d	1,8
C-4	132,30	C				
C-5	118,83	CH	6,55	1H	dd	1,8; 8,0
C-6	112,37	CH	6,81	1H	d	8,0
C-1'	38,89	CH ₂	3,25	2H	d br	4,8
C-2'	138,05	CH	5,89	1H	m	
C-3'	115,21	CH ₂	5,02	2H	m	7,0
OCH ₃	55,68	OCH ₃	3,72	3H	s	

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi (2005), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Y học, tr 118-119.
2. Nguyễn Thị Lý, Trần Thị Hồng Vân, *tách tinh dầu và carotenoid từ lá trầu (Piper betle L.)*, Hội nghị KHCN (lần 9), ĐH Bách Khoa TP Hồ Chí Minh.
3. K. Ghosh and T. K. Bhattacharya (2005), *Chemical Constituents of Piper betle Linn. (Piperaceae) roots*, *Molecules*, 10, p 798-802.

- [4] Lakshmi Arambewela, K.G.A Kumaratunga and Kalyani Dias (2005), *Studies on piper betle of Sri Lanka*, *J. Natn.Sci.Foundation Sri Lanka*, 33(2), p133-139.
5. T. Nalina and Z.H.A. Rahim (2007), *The Crude Aqueous Extract of Piper betle L. and its Antibacterial Effect Towards Streptococcus mutans*, *American Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 3(1), p10-1.

SUMMARY

CHEMICAL CONSTITUENTS OF ESSENTIAL OIL IN LEAF PIPER BETLE L. HAIDUONG

Pham The Chinh*, Dương Nghĩa Bang, Phan Thanh Phương,
Khieu Thi Tam, Pham Thi Tham, Le Thi Xuan, Bui Thi Thuy
College of Sciences – Thai Nguyen University

By method of steam distillation appealing special effects combined with boiling salt reflux, we have successfully prepared the essential oil of betel leaf grown in Hai Duong to the performance achieved 1.01%. The essential oil of betel leaf is modulated high density ($d_4^{25} = 0.963$) and $n_D^{25} = 1.5362$. By method of gas chromatography mass spectrometry coupling (GC/MS), we have confirmed the betle oil which is the main chemical ingredient is eugenol, with levels of up to 77.24%. we have used column chromatography method with solvent cleaning solution is n-hexan/ethyl acetate, 10/1, v/v; the eugenol was isolated and was confirmed the structure by modern spectroscopy: IR, MS, ^1H & ^{13}C -NMR.

Keyword: *piper betle, betel oil, eugenol, allylbenzene, polyphenol*

* Tel: 0988.113.933; Email: chemistry20069@gmail.com