

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

DƯƠNG THÚY QUỲNH

**NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH CẤU TRÚC VÀ HÀM LƯỢNG
MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ TRONG NẤM HƯƠNG
(*LENTINULA EDODES*) BẰNG CÁC PHƯƠNG PHÁP
PHÂN TÍCH HIỆN ĐẠI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA HỌC

THÁI NGUYÊN - 2019

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

DƯƠNG THÚY QUỲNH

NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH CẤU TRÚC VÀ HÀM LƯỢNG
MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ TRONG NẤM HƯƠNG
(*LENTINULA EDODES*) BẰNG CÁC PHƯƠNG PHÁP
PHÂN TÍCH HIỆN ĐẠI

Chuyên ngành: Hóa phân tích

Mã số: 8.44.01.18

LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

1. TS. Nguyễn Hữu Tùng
2. PGS.TS. Dương Nghĩa Bang

THÁI NGUYÊN - 2019

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình nghiên cứu đề tài “**Nghiên cứu phân tích cấu trúc và hàm lượng một số hợp chất có trong nấm hương (*Lentinula edodes*) bằng các phương pháp phân tích hiện đại**”, em đã nhận được sự giúp đỡ, chỉ bảo nhiệt tình của các thầy cô giáo, gia đình và bạn bè đồng nghiệp.

Em xin bày tỏ sự biết ơn đặc biệt đến TS. Nguyễn Hữu Tùng - Trưởng nhóm nghiên cứu Hóa dược và Hoạt chất sinh học, Trường Đại học Phenikaa. PGS. TS. Dương Nghĩa Bang - Trưởng phòng Hành chính - Tổ chức, Trường ĐH Khoa Học - ĐH Thái Nguyên. TS Lê Đăng Quang - Giám đốc trung tâm nghiên cứu triển khai các hoạt chất sinh học, Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam; đã hướng dẫn em tận tình, chu đáo trong suốt quá trình làm luận văn, giúp em hoàn thành luận văn này.

Em xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Phạm Thế Chính - Trưởng Khoa Hóa học cùng các thầy, cô tại khoa Hóa học trường ĐH Khoa học - ĐH Thái N và các bạn trong lớp cao học K11 đã tạo điều kiện giúp đỡ em trong suốt quá trình hoàn thành luận văn.

Em xin chân thành cảm ơn Ban Giám hiệu cùng toàn thể cán bộ giáo viên Trường THPT Hàm Long - Bắc Ninh đã tạo điều kiện thuận lợi về thời gian và công việc để em hoàn thành luận văn.

Em xin chân thành cảm ơn gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã động viên, cổ vũ, khích lệ tinh thần trong suốt thời gian qua.

Mặc dù đã có nhiều cố gắng trong quá trình thực hiện đề tài, song không thể tránh những hạn chế và thiếu sót. Em rất mong nhận được những ý kiến đóng góp của các thầy cô giáo và bạn bè đồng nghiệp.

Tác giả luận văn

Dương Thúy Quỳnh

MỤC LỤC


DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	a
DANH MỤC HÌNH ẢNH	b
DANH MỤC BẢNG BIỂU	d
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	3
1.1. Tổng quan về các phương pháp xác định cấu trúc.....	3
1.1.1. Phương pháp phổ hồng ngoại (IR).....	3
1.1.2. Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹ H-NMR và ¹³ C-NMR..	4
1.1.3. Phương pháp phổ khối lượng (MS)	6
1.1.4. Phân tích hàm lượng các chất bằng HPLC	8
1.2. Giới thiệu về nấm hương (<i>Lentinula edodes</i>)	10
1.3. <i>Lentinan</i>	11
1.3.1. Đặc điểm cấu tạo	11
1.3.2. Hoạt tính và ứng dụng của <i>Lentinan</i>	13
1.4. Phương pháp chiết tách <i>Lentinan</i>	16
1.4.1. Một số phương pháp chiết tách phổ biến	16
1.4.2. Định hướng lựa chọn phương pháp chiết tách <i>Lentinan</i>	18
CHƯƠNG 2: THỰC NGHIỆM	19
2.1. Đối tượng, hóa chất và thiết bị nghiên cứu	19
2.1.1. Đối tượng	19
2.1.2. Hóa chất.....	19
2.1.3. Thiết bị	19
2.2. Thực nghiệm	20
2.2.1. Phân tích hàm lượng <i>Lentinan</i>	20
2.2.2. Phương pháp tạo mẫu phân tích <i>Lentinan</i>	22
2.2.3. Phân tích xác định cấu trúc của <i>Lentinan</i>	22

2.2.4. Xác định hàm lượng tổng Phenolic.....	25
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	25
3.1. Xây dựng đường chuẩn β -glucan.....	25
3.2. Kết quả nghiên cứu quá trình tạo mẫu <i>Lentinan</i>	25
3.2.1. Nghiên cứu lựa chọn dung dịch đệm cho quá trình tạo mẫu <i>Lentinan</i> ở giai đoạn 2.....	26
3.2.2. Nghiên cứu lựa chọn pH dung dịch đệm cho quá trình tạo mẫu <i>Lentinan</i> ở giai đoạn 2.....	27
3.2.3. Qui trình tạo mẫu <i>Lentinan</i>	29
3.3. Phân tích xác định cấu trúc của <i>Lentinan</i>	33
3.3.1. Đặc điểm mẫu M2 trên cơ sở phương pháp phổ hồng ngoại IR.....	33
3.3.2. Phân tích chất M2 trên cơ sở phương pháp ESI-MS/MS	34
3.3.3. Phân tích các dữ liệu thu được trên cơ sở phương pháp NMR.....	36
3.3.4. Phân tích khối lượng phân tử của <i>Lentinan</i> (M2) bằng phương pháp sắc ký thẩm thấu gel (Gel Permeation Chromatography).....	40
3.3.5. Tổng hợp dữ liệu phổ của <i>Lentinan</i> (M2).....	42
3.4. Phân tích xác định hàm lượng tổng Phenolic.....	42
KẾT LUẬN	43
TÀI LIỆU THAM KHẢO	44

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

^{13}C - NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon-13 (^{13}C Nuclear Magnetic Resonance)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
^1H - NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (^1H Nuclear Magnetic Resonance)
IR	Phổ hồng ngoại (Infrared Spectroscopy)
MS	Phổ khối lượng (Mass Spectrometry)
NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance)
ESI-MS	Phổ khối lượng Ion hóa (Electrospray Ionization Mass Spectrometry)
HSQC	Phổ NMR 2 chiều HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
HMBC	Phổ NMR 2 chiều HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Phổ hồng ngoại của 7 - hidroxy - 4- methylcoumarin	3
Hình 1.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của benzyl axetat	5
Hình 1.3. Sơ đồ thiết bị phân tích HPLC	8
Hình 1.4. Sơ đồ cấu trúc <i>Lentinan</i> [13].....	12
Hình 1.5. Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử AFM (Atomic force microscope) và ảnh của <i>Lentinan</i> trong dung dịch 25 ⁰ C [32]	12
Hình 1.6. Mô hình phân tử xoắn kép ba theo chiều phải của β -glucan (<i>Lentinan</i>) [29]	12
Hình 1.7. Liên kết β -1,3 glicozit và β -1,6 glicozit [24]	13
Hình 1.8. Cơ chế kháng u của <i>Lentinan</i> [32]	14
Hình 2.1. Đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc mật độ quang vào nồng độ D-glucose.....	21
Hình 3.1. Đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc mật độ quang vào nồng độ D-glucose.....	25
Hình 3.2. Quy trình tạo mẫu <i>Lentinan</i> (giai đoạn 1).....	30
Hình 3.3. Quy trình tạo mẫu <i>Lentinan</i> (giai đoạn 2).....	31
Hình 3.4. Quy trình tạo mẫu <i>Lentinan</i>	32
Hình 3.5. Phổ IR của mẫu M2.....	34
Hình 3.6. Phổ ESI-MS (negative-mode) của mẫu M2 chế độ MS/MS	34
Hình 3.7. Phổ LCMS-QTOF của mẫu <i>Lentinan</i> tiêu chuẩn từ nấm hương [37]	35
Hình 3.8. Phân tử <i>Lentinan</i> dạng β -D-glucan polysaccharide với mảnh m/z 1151 tương ứng mắt xích $C_{42}H_{72}O_{36}$	35
Hình 3.9. (A) Mảnh phân nhánh với liên kết β -D-1 \rightarrow 6 glucosic và liên kết β -D-1 \rightarrow 3 glycosidic trong chuỗi chính của lentinan. Tương tác HMBC [] của liên kết trong chuỗi chính. (B). Cấu trúc	

chuỗi xoắn helix tạo thành từ 3 chuỗi đơn single của lentinan trong dung môi nước và DMSO [41].	37
Hình 3.10. Phổ ^1H -NMR của M2 ghi trong D_2O tại tần số 500 MHz ghi trên máy Bruker AM 500 FT-NMR	38
Hình 3.11. Phổ ^{13}C -NMR của các tín hiệu carbon thuộc mẫu M2. Mẫu ghi trong dung môi D_2O tại tần số 125 MHz trên máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker AM 500 FT-NMR	38
Hình 3.12. Phổ ^{13}C -NMR của mẫu M2 và phần giãn rộng từ δ 72-75.5 ppm.	39
Hình 3.13. Phổ HSQC của các tín hiệu cross-peak của mẫu M2	39
Hình 3.14. Phổ HMBC của các tín hiệu cross-peak thuộc mẫu M2	40
Hình 3.15. Khối lượng phân tử ước tính của M2.1 (B)	40
Hình 3.16. Đường chuẩn định lượng biểu diễn sự phụ thuộc mật độ quang vào nồng độ acid gallic.	42

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 1.1. Một số loại β -glucan[10]	13
Bảng 3.1. Kết quả lựa chọn dung dịch đệm cho quá trình tạo mẫu <i>Lentinan</i> ở giai đoạn 2	26
Bảng 3.2. Kết quả lựa chọn pH dung dịch đệm photphat trong quá trình tạo mẫu <i>Lentinan</i> ở giai đoạn 2.....	28
Bảng 3.3. Tín hiệu $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của chất M2 ghi trong dung môi D_2O	38
Bảng 3.4. Tổng hợp dữ liệu phổ của <i>Lentinan</i> (M2).....	41

MỞ ĐẦU

Hiện nay, các phương pháp phổ không chỉ ứng dụng trong phạm vi ngành hóa học mà còn ở nhiều ngành khác nhau như hóa sinh, y dược, nông nghiệp, dầu khí, vật liệu, môi trường... Sự phát triển mạnh mẽ của các phương pháp phổ đã giúp cho việc nghiên cứu trong các ngành khoa học đặc biệt là hóa học các hợp chất thiên nhiên trở nên dễ dàng hơn, phát triển nhanh hơn. Trước đây, để chứng minh cấu tạo của một chất có thể mất nhiều thời gian thậm chí có khi kéo dài nhiều năm thì nay có thể thực hiện sau vài giờ, sở dĩ làm được như vậy là nhờ sự hỗ trợ của các phương pháp vật lý hiện đại.

Để phân tích cấu trúc của các hợp chất hữu cơ có thể sử dụng các phương pháp phổ như phổ hồng ngoại, phổ tử ngoại khả kiến, phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ khối lượng... Mỗi phương pháp cho phép xác định một số thông tin khác nhau của cấu trúc phân tử và hỗ trợ lẫn nhau trong việc xác định cấu trúc các hợp chất hữu cơ.

Bên cạnh đó, cùng với sự phát triển ngày càng cao của khoa học kỹ thuật và kinh tế xã hội, đời sống tinh thần và vật chất của con người ngày càng được nâng cao và không ngừng được cải thiện. Theo đó, vấn đề đảm bảo tính “Sạch - An toàn - Tốt cho sức khỏe” của các sản phẩm sử dụng trong cuộc sống ngày càng được chú trọng. Các loại sản phẩm ấy có thể cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng đa lượng, vi lượng thiết yếu cho cơ thể, bên cạnh đó chúng phải có tính phòng và chữa bệnh.

Nấm ăn là một trong số các loại thực phẩm đáp ứng được mục tiêu đó. Từ hàng ngàn năm nay, nấm là một loại thực phẩm được ưa chuộng từ lâu đời và hiện nay được xếp vào nguồn cung cấp thực phẩm chức năng của nhiều quốc gia trên thế giới. Trong số đó, nấm hương (*Lentinula edodes*) là một loại thực phẩm được xem là “Thịt sạch - Rau sạch” có giá trị dinh dưỡng cao. Nấm hương chứa khá nhiều các nguyên tố đa lượng, vi lượng, khoáng cũng như các acid amin... *Lentinula* là một β -glucan từ nấm hương, polysaccharit mang hoạt tính sinh học - chất tăng cường miễn dịch mới phổ biến nhất hiện nay.