

NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH VÀ PHÂN GIẢI ELLAGITANNIN THU NHẬN AXIT ELLAGIC TỪ VỎ QUẢ LỰU TRẮNG

STUDY ON EXTRACTION AND DEGRADATION OF ELLAGITANNIN TO OBTAIN ELLAGIC ACID FROM WHITE POMEGRANATE PEEL (*PUNICA GRANATUM L*)

Hoàng Thanh Đức^{1,*}, Hoàng Thị Ngọc¹

DOI: <http://doi.org/10.57001/huiv5804.2024.102>

TÓM TẮT

Giống lựu trắng có lớp vỏ dày được trồng phổ biến tại nhiều nơi ở Việt Nam. Vỏ quả lựu có chứa nhiều hợp chất phenolic và ellagitannin. Ellagitannin là nhóm hợp chất tanin có thể thủy phân được để tạo ra axit ellagic tự nhiên. Trong nghiên cứu này, ellagitannin được tách chiết từ vỏ quả lựu trắng ở huyện Hoài Đức, thành phố Hà Nội, bằng dung môi ethanol 60%, ở nhiệt độ 80°C trong 3 giờ. Bằng cách thủy phân ellagitannin trong dung dịch axit H₂SO₄ 5%, ở nhiệt độ 105°C trong thời gian 5 giờ thu được axit ellagic. Axit ellagic được tinh chế lại bằng cách kết tinh lặp lại nhiều lần trong methanol, với tỷ lệ 30ml methanol/1,0g axit ellagic thô. Loại dung môi và nồng độ dung môi dùng để chiết ellagitannin, nồng độ dung dịch axit H₂SO₄ và thời gian thủy phân ellagitannin để thu được axit ellagic với hiệu suất cao đã được khảo sát lựa chọn. Cấu tạo của axit ellagic được kiểm tra bằng các dữ kiện phổ hồng ngoại và phổ cộng hưởng từ hạt nhân. Hàm lượng của axit ellagic được xác định bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả nghiên cứu đã thu được 3,0 g axit ellagic hàm lượng 93,7% từ 100g bột vỏ quả lựu khô.

Từ khóa: Chiết tách, vỏ quả lựu, ellagitannin, axit ellagic, *Punica granatum L*.

ABSTRACT

White pomegranate variety with thick skin is popularly grown in many places in Vietnam. Pomegranate peel contains many phenolic compounds and ellagitannin. Ellagitannin are a group of tannin compounds that can be hydrolyzed to produce natural ellagic acid. In this study, ellagitannin were extracted from white pomegranate peels in Hoài Đức district, Hanoi city, using solvent ethanol 60%, at 80°C for 3 hours. By hydrolyzing ellagitannin in 5% H₂SO₄ solution, at 105°C for 5 hours, ellagic acid was obtained. Ellagic acid was purified by repeated crystallization in methanol, at a ratio of 30ml methanol/1.0g crude ellagic acid. The type of solvent and concentration of solvent used to extract ellagitannin, concentration of H₂SO₄ acid solution and hydrolysis time of ellagitannin to obtain ellagic acid with high yield were investigated and selected. The structure of ellagic acid was examined by infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy data. The content of ellagic acid was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Research results have obtained 3.0g of ellagic acid with 93.7% content from 100g of dried pomegranate peel powder.

Keywords: Extract, white pomegranate peel, ellagitannin, ellagic acid, *Punica granatum L*.

¹Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

*Email: ducht68@yahoo.com.vn

Ngày nhận bài: 15/11/2023

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 05/3/2024

Ngày chấp nhận đăng: 25/3/2024

1. MỞ ĐẦU

Ở Việt Nam có 3 giống lựu là lựu trắng, lựu đỏ, lựu bông được trồng phổ biến ở nhiều nơi. Lựu trắng (*Punica granatum L*) có trái to, vỏ dày, khi quả chín vỏ có màu trắng hơi vàng, hạt nhiều nước và ngọt. Lựu trắng trồng nhiều ở khu vực Hoài Đức và Hà Tây cũ. Vỏ quả lựu chiếm 40 - 50% tổng trọng lượng của quả lựu. Vỏ lựu có chứa nhiều hợp chất phenolic, isoquercetin và ellagitannin [1]. Ellagitannin là một hợp chất tanin có thể thủy phân được để tạo ra axit ellagic tự nhiên [2, 5]. Axit ellagic là một polyphenol vòng thơm, có tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa, chống đột biến gen và chống ung thư [2]. Axit ellagic bao gồm bốn nhóm OH tự do và hai nhóm acyloxy liên kết với các vòng thơm, có cấu trúc phẳng, đối xứng phân tử [3].

Để thu được axit ellagic từ vỏ quả lựu, trước tiên cần phải chiết tách được hợp chất ellagitannin, sau đó tiến hành thủy phân hợp chất ellagitannin để tạo ra axit ellagic. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng vỏ quả lựu trắng trồng ở huyện Hoài Đức, thành phố Hà Nội để chiết xuất và phân giải ellagitannin thu lấy axit ellagic. Dung môi và nồng độ dung môi thích hợp để chiết ellagitannin, nồng độ dung dịch axit H₂SO₄ và thời gian thủy phân ellagitannin được khảo sát lựa chọn để thu được axit ellagic với hiệu suất cao nhất. Các dung môi được khảo sát lựa chọn để chiết tách ellagitannin, bao gồm ethanol, acetone, methanol, ethanol + diethyl ether, dung dịch axit acetic 5%. Quá trình tinh chế axit ellagic được tiến hành theo phương pháp kết tinh lặp lại trong dung môi methanol tương tự phương pháp trong tài liệu [4, 6]. Cấu tạo của axit ellagic được kiểm tra bằng các phương pháp phổ hồng ngoại, phổ cộng hưởng từ hạt nhân. Hàm lượng của axit ellagic thu được từ vỏ lựu xác định bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị sử dụng

Các dung môi và hóa chất sử dụng để tách chiết và phân tích xác định hàm lượng ellagitannin và axit ellagic là loại hóa chất tinh khiết, bao gồm: ethanol 96%, methanol 99,0%, acetone 99%, axit acetic 99,5%, axit H₂SO₄ 98,0%, diethyl ete 99,0%, dung dịch EDTA 0,05M, NH₃ 25%, dung dịch Zn(CH₃COO)₂ 1M, dung dịch đệm NH₄Cl-NH₃-H₂O

(pH = 9). Vỏ quả lựu thu nhận tại các cửa hàng nước ép trái cây ở Hoài Đức, Hà Nội, được phơi khô, xay nhỏ đến kích thước 0,05 - 0,1mm.

Các dụng cụ sử dụng bao gồm: máy khuấy từ gia nhiệt AREC, máy cắt cô quay chân không IKA RV10, phễu lọc hút Bushler, tủ sấy Esco OFA-32-8, thiết bị phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, model: S000689.

2.2. Thục nghiệm

2.2.1. Khảo sát xác định dung môi chiết ellagitannin

Để lựa chọn được dung môi thích hợp nhằm chiết tách được ellagitannin với hiệu suất cao nhất, 6 loại dung môi bao gồm: ethanol 70%, aceton 99,5%, hỗn hợp aceton - nước: 50/50 theo thể tích, ethanol - nước-axit acetic: 45/45/10 theo thể tích, nước, dung dịch axit acetic 5% được khảo sát. Quy trình chung để chiết tách ellagitannin từ bột vỏ lựu bằng dung môi được tiến hành như sau: Cho 100 g bột vỏ quả lựu đã sấy khô vào bình cầu dung tích 1000ml, thêm vào đó 500ml dung môi, lắp sinh hàn hồi lưu và đun cách thủy ở nhiệt độ 80°C trong 3 giờ. Sau khi kết thúc đun, lọc lấy dịch chiết qua phễu lọc Bushler. Phần bã không tan được chiết lần thứ 2 với 500ml dung môi đó. Lọc lấy dịch chiết và gộp tất cả dịch chiết lại, đem cất loại dung môi trên máy cắt cô quay, thu được cao chiết ellagitannin. Tiến hành phân tích xác định lượng ellagitannin trong cao chiết, theo phương pháp chuẩn độ tạo phức ETDA tương tự như tài liệu [7]. Cách tiến hành như sau: 1,0g cao chiết ellagitannin được pha loãng bằng 400ml axeton nồng độ 50% trong bình định mức 500ml, thêm dung dịch 20ml kẽm axetat (Zn(Ac)2) 1M và 14ml dung dịch amoniac bão hòa. Lắc thật đều bình định mức để bột chiết ellagitannin phân tán đều trong dung dịch. Đun nóng bình định mức trong nồi cách thủy ở nhiệt độ 35°C trong 30 phút, sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng và lọc lấy dịch lọc bằng phễu Busher. Lấy 20ml dịch lọc được cho vào bình nón 500ml và pha loãng với 300ml nước cất, thêm vào bình nón 25ml dung dịch đệm pH = 10,0 (NH₄Cl.NH₃.H₂O) và 1ml Eriochrome T làm chất chỉ thị màu. Chuẩn độ bằng dung dịch ethylendiamin tetraacetic (EDTA) 0,05M, đến khi dung dịch trong bình chuyển từ đỏ sang xanh. Lượng ellagitannin khi xác định theo phương pháp chuẩn độ tạo phức được tính theo công thức:

$$m = 0,1556 \times (20 - 25 \times 0,05 \times V) / W \times 100$$

Trong đó: m là khối lượng ellagitannin (g/ 100g bột vỏ lựu); V là thể tích dung dịch EDTA đã dùng để chuẩn độ (ml); W là khối lượng bột vỏ quả lựu dùng để chiết ellagitannin (g).

Từ kết quả xác định lượng ellagitannin, lựa chọn dung môi thích hợp để chiết xuất được ellagitannin với hiệu suất cao.

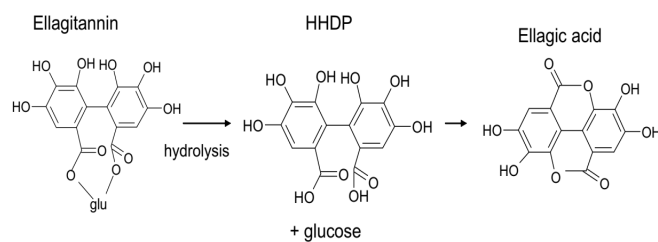
2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết đến hiệu suất ellagitannin

Sau khi xác định được dung môi thích hợp là ethanol, tiếp tục tiến hành khảo sát xác định nồng độ thích hợp của ethanol để thu được hiệu suất ellagitannin cao. Các thí nghiệm chiết suất ellagitannin được tiến hành với các nồng độ ethanol là 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. Xác định

lượng ellagitannin ứng với mỗi nồng độ ethanol theo phương pháp chuẩn độ tạo phức trình bày trong mục 2.2.1, tương tự tài liệu [6, 7]. Lựa chọn nồng độ ethanol cho hiệu suất chiết được ellagitannin cao nhất.

2.2.3. Thủy phân ellagitannin thu axit ellagic

Cho cao chiết ellagitamin từ 100g bột vỏ lựu vào bình cầu hai cổ dung tích 1,0 lít, lắp sinh hàn hồi lưu, nhiệt kế và bếp khuấy từ gia nhiệt. Thêm vào bình phản ứng 250ml dung dịch axit H₂SO₄ 5%, khuấy và đun phản ứng ở 105°C trong 5 - 6 giờ. Sau đó để nguội, lọc thu kết tủa, rửa kết tủa hai đến 3 lần bằng nước cất. Sấy khô kết tủa ở 40°C, thu được axit ellagic thô ở dạng chất rắn màu nâu sẫm. Quá trình thủy phân ellagitannin diễn ra theo sơ đồ hình 1.



Hình 1. Quá trình thủy phân ellagitannin

2.2.4. Khảo sát xác định nồng độ dung dịch axit H₂SO₄

Khảo sát xác định nồng độ của dung dịch axit H₂SO₄ để thực hiện phản ứng thủy phân ellagitamin được tiến hành với các nồng độ axit H₂SO₄ từ 1% đến 11%. Thực hiện phản ứng thủy phân 9,0g ellagitamin tách chiết được từ 100g bột vỏ quả lựu bằng 250ml dung dịch axit H₂SO₄ có nồng độ 1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11% ở nhiệt độ phản ứng là 105°C, trong thời gian 6 giờ. Xác định lượng axit ellagic thu được ở mỗi phản ứng với nồng độ axit H₂SO₄ tương ứng, chọn nồng độ dung dịch axit H₂SO₄ cho lượng sản phẩm axit ellagic lớn nhất.

2.2.5. Khảo sát xác định thời gian thủy phân ellagitannin

Sau khi xác định được nồng độ axit H₂SO₄ thích hợp, tiến hành các thí nghiệm thủy phân 9,0g cao chiết ellagitamin từ 100g bột vỏ quả lựu bằng 250ml dung dịch axit H₂SO₄, trong thời gian 1 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 6 giờ, 7 giờ, 8 giờ. So sánh lượng axit ellagic thu được ở các thí nghiệm, lựa chọn thời gian thủy phân ở thí nghiệm có lượng axit ellagic cao nhất.

2.2.6. Tinh chế lại axit ellagic

Tiến hành kết tinh lại liên tục axit ellagic trong dung môi methanol tinh khiết, theo phương pháp trong tài liệu [4, 6] để tinh chế lại axit ellagic thô thu được sau khi thủy phân ellagitamin. Bằng cách hòa tan axit ellagic thô trong methanol 99,5%, theo tỷ lệ 30ml methanol/1,0g axit ellagic trong bình nón dung tích 500ml. Đun cách thủy dung dịch methanol ở nhiệt độ 40 - 45°C, kết hợp khuấy trong thời gian khoảng 2 giờ, sau đó lọc lấy dịch lọc. Phần không tan hết tiếp tục được hoà tan lần thứ hai với methanol và lọc thu dịch lọc, loại bỏ phần cặn bẩn không tan. Toàn bộ dịch lọc được cất loại dung môi trên máy cắt cô quay, đến thể tích còn lại khoảng 10 - 15ml, sau đó để nguội để kết tủa axit ellagic. Lọc lấy axit ellagic, sấy khô ở 40 - 45°C, thu được axit ellagic sạch là chất bột màu vàng nâu.

2.2.7. Phân tích xác định cấu tạo của axit ellagic

Xác định cấu tạo của axit ellagic tách chiết được từ vỏ quả lựu bằng cách ghi phổ hồng ngoại ở dạng ép viên với KBr trên máy quang phổ Impact 410-Nicolet, phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H, ¹³C NMR ghi trên máy Avance AV 500 Spectrometer, Bruker, tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

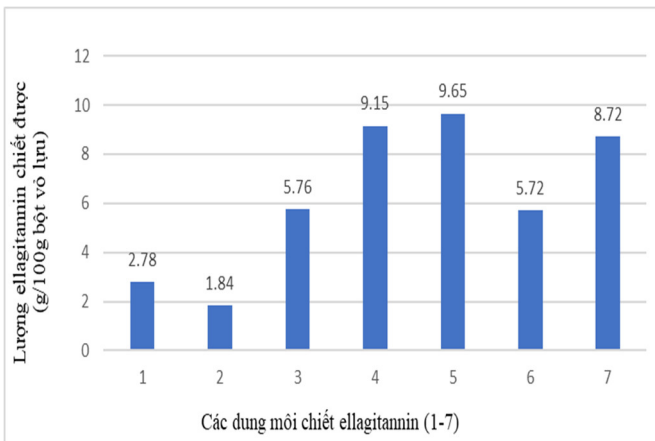
2.2.8. Phân tích xác định hàm lượng của axit ellagic tách chiết từ vỏ quả lựu

Xác định hàm lượng của axit ellagic sau khi tách chiết và tinh chế bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC tại Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội. Các điều kiện phân tích: Cột C18 pha đảo, nhiệt độ cột: 30°C; Dung môi: Pha lỏng A là 0,1% acid H₃PO₄ trong nước; pha lỏng B là methanol 65:35 (v/v); Tốc độ dòng: 1,0ml/phút; Bước sóng: 254nm; Thể tích bơm mẫu: 15µl.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả lựa chọn dung môi thích hợp chiết tách ellagitannin

Kết quả khảo sát lựa chọn dung môi chiết tách ellagitannin được thể hiện trên hình 2. Theo kết quả khi sử dụng dung môi ethanol - nước - axit acetic: 45/45/10, hiệu suất thu được ellagitannin cao nhất, đạt 9,65g/100g bột vỏ lựu. Dung môi ethanol 70% cho hiệu suất đạt 9,15g/100g bột vỏ lựu cao thứ hai, dung dịch axit acetic 5% cho hiệu suất ellagitannin đạt 8,72g/100g bột vỏ lựu. Dung môi acetone và aceton-nước đều cho hiệu suất chiết tách ellagitannin thấp.



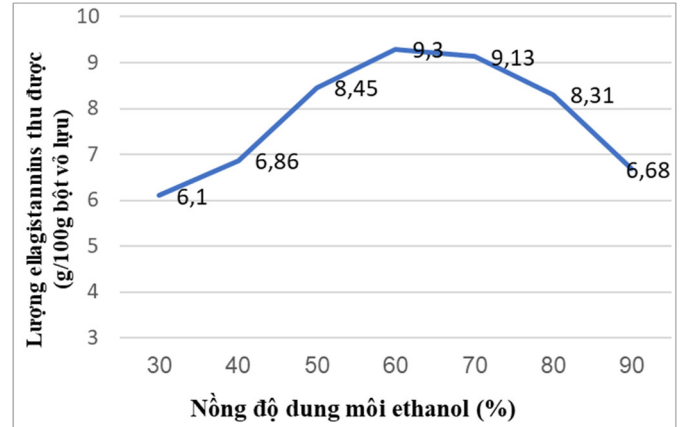
Hình 2. Kết quả khảo sát dung môi chiết ellagitannin từ vỏ lựu

1 là dung môi acetone; 2 là acetone-nước: 50/50; 3 là methanol 80%; 4 là ethanol 70%; 5 là ethanol-nước-axit acetic 45/45/10; 6 là nước cất; 7 là dung dịch axit acetic 5%.

Cũng theo kết quả khảo sát, mặc dù dung môi ethanol - nước - axit acetic: 45/45/10 cho hiệu suất chiết tách ellagitannin cao nhất, tuy nhiên khi sử dụng ethanol - nước - axit acetic lại rất khó tái sử dụng để chiết lần hai và sản phẩm ellagitannin bị lẫn acetic phải tinh chế lại mất nhiều công sức. Còn với dung môi ethanol 70%, có thể thu hồi và tái sử dụng lại để chiết tách ellagitannin. Chính vì vậy sử dụng dung môi ethanol 70% để chiết tách ellagitannin từ vỏ lựu là thích hợp nhất.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hiệu suất ellagitannin

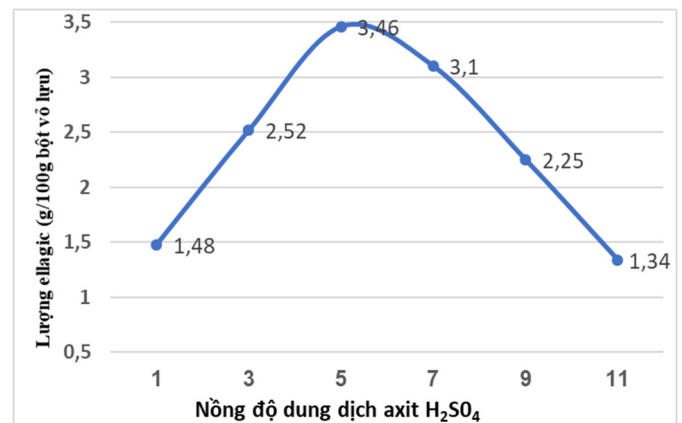
Ellagitannin là một hợp chất tanin ưa nước nên khả năng hòa tan trong dung môi ethanol có nồng độ khác nhau sẽ khác nhau. Kết quả khảo sát nồng độ dung môi chiết ethanol thu được, với nồng độ ethanol là 60% thì hiệu suất được ellagitannin là cao nhất. Hình 3 là kết quả khảo sát xác định nồng độ dung môi ethanol.



Hình 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết ethanol

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch axit H₂SO₄ đối với hiệu suất thủy phân ellagitannin

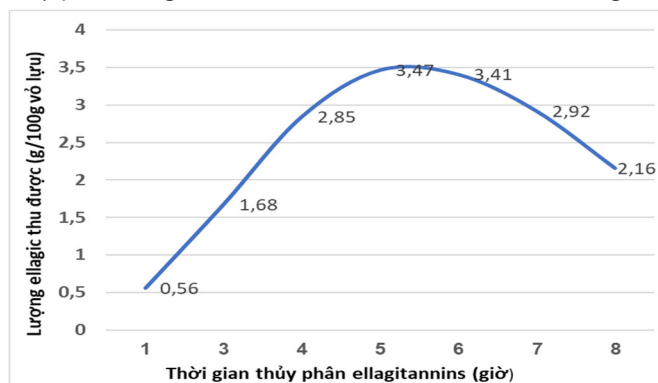
Axit H₂SO₄ có tác dụng xúc tác cho phản ứng thủy phân ellagitannin tạo thành axit ellagic. Nồng độ của axit H₂SO₄ trong phản ứng thủy phân ellagitannin có ảnh hưởng đến hiệu suất của phản ứng và độ tinh khiết của axit ellagic. Kết quả khảo sát cho thấy hiệu suất thu được axit ellagic tăng lên từ 1,48g đến 3,46g khi nồng độ dung dịch axit H₂SO₄ tăng từ 1% đến 5%. Hiệu suất thu được axit ellagic giảm từ 3,46g đến 1,34g khi nồng độ dung dịch axit H₂SO₄ tăng từ 5% đến 11%, đồng thời khi nồng độ axit H₂SO₄ càng cao thì sản phẩm ellagic càng bị keo hóa, rất khó tinh chế. Vì axit ellagic và cả ellagitannin bị phân hủy trong môi trường axit H₂SO₄ đặc do đó khi nồng độ axit H₂SO₄ càng cao thì hiệu suất thu được ellagic càng nhỏ. Nồng độ dung dịch axit H₂SO₄ thích hợp nhất để thủy phân ellagitannin là 5%. Hình 4 là đồ thị thể hiện ảnh hưởng của nồng độ dung dịch axit H₂SO₄ đến hiệu suất thủy phân ellagitannin.



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch H₂SO₄ đến hiệu suất thủy phân

3.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân ellagitannin đến hiệu suất axit ellagic

Thời gian thủy phân ellagitannin có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu được axit ellagic. Thời gian thủy phân ellagitannin được khảo sát từ 1,0 giờ đến 8 giờ. Kết quả khảo sát cho thấy với thời gian thủy phân là 5 giờ thì hiệu suất thu được axit ellagic là lớn nhất, đạt 3,47g/9g ellagitannin/100g bột vỏ lựu. Khi thời gian thủy phân là 6 giờ, hiệu suất thu được axit ellagic đạt 3,41g, khi thời gian thủy phân là 7 giờ và 8 giờ hiệu suất thu được ellagic giảm xuống là 2,92g và 2,16g. Hình 5 là kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian thủy phân ellagitannin đến hiệu suất thu được axit ellagic.



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất thu được axit ellagic

Nguyên nhân khi thời gian thủy phân lớn hơn 5 giờ thì hiệu suất thu được axit ellagic càng nhỏ là do có sự phân hủy axit ellagic trong môi trường axit H₂SO₄ ở nhiệt độ cao trong thời gian dài, làm cho hiệu suất thu được axit ellagic giảm đi.

3.5. Kết quả tinh chế lại axit ellagic

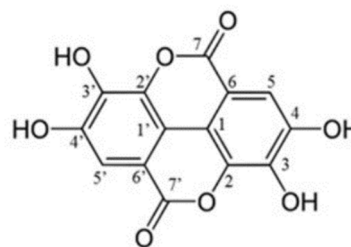
Axit ellagic thô sau thu được sau khi thủy phân ellagitannin được tinh chế lại theo phương pháp kết tinh lặp lại 3 - 4 lần trong dung môi methanol, ở nhiệt độ 45 - 50°C, trong thời gian 2 giờ. Tỷ lệ dung môi methanol và axit ellagic là 30ml methanol 99,5%/1,0g axit ellagic thô, tương tự như tài liệu tham khảo [6]. Axit ellagic sau khi tinh chế được phân tích xác định hàm lượng, kết quả phân tích cho thấy axit ellagic đạt hàm lượng tới 93,7%. Với phương pháp tinh chế này, từ 3,47g axit ellagic thô thu được từ 9,0g ellagitannin chiết tách được từ 100g bột vỏ lựu, đã thu được 3,0g axit ellagic sạch, có hàm lượng axit ellagic là 93,7%.

3.6. Kết quả phân tích xác định cấu tạo của axit ellagic tách chiết từ vỏ lựu

Cấu tạo của axit ellagic tách chiết từ bột vỏ lựu, được phân tích xác định cấu tạo bằng phân tích phổ hồng ngoại và phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR và ¹³C-NMR.

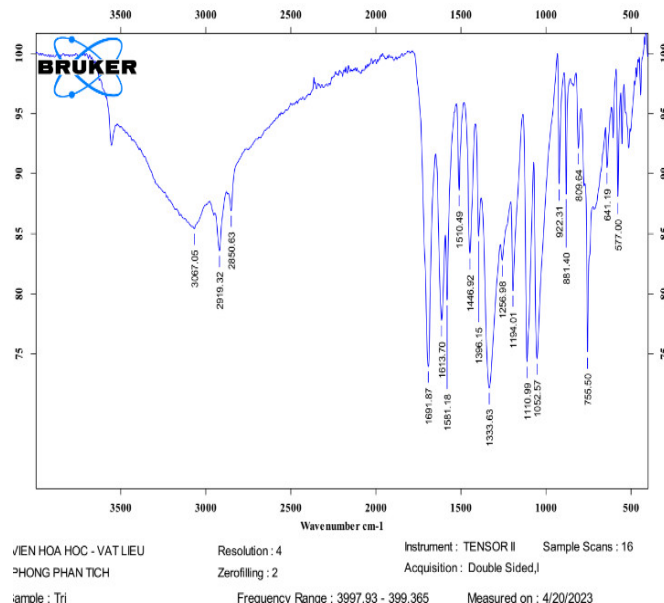
Trong phổ hồng ngoại của axit ellagic có các đỉnh hấp thụ đặc trưng cho các nhóm chức trong phân tử như nhóm OH nằm ở số sóng $\nu_{OH} = 3067,05\text{cm}^{-1}$, đỉnh hấp thụ của nhóm C=O nằm ở số sóng $\nu_{CO} = 1691,87\text{cm}^{-1}$, đỉnh hấp thụ của nhóm C-O-C nằm ở $\nu_{C-O-C} = 1110,99\text{cm}^{-1}$ và $1052,57\text{cm}^{-1}$. Trong phổ hồng ngoại còn có các đỉnh hấp thụ của liên kết C=C trong vòng thơm nằm ở $\nu_{C=C} = 1613,70\text{cm}^{-1}$; $1581,18\text{cm}^{-1}$; $1446,92\text{cm}^{-1}$, các đỉnh hấp thụ của liên kết C-H vòng thơm

của giao động biến dạng nằm ở số sóng $\delta_{C-H} = 922,31\text{cm}^{-1}$ và $755,50\text{cm}^{-1}$.



Hình 6. Công thức cấu tạo của phân tử axit ellagic

Phổ hồng ngoại của axit ellagic tách chiết từ vỏ lựu thể hiện trên hình 7.

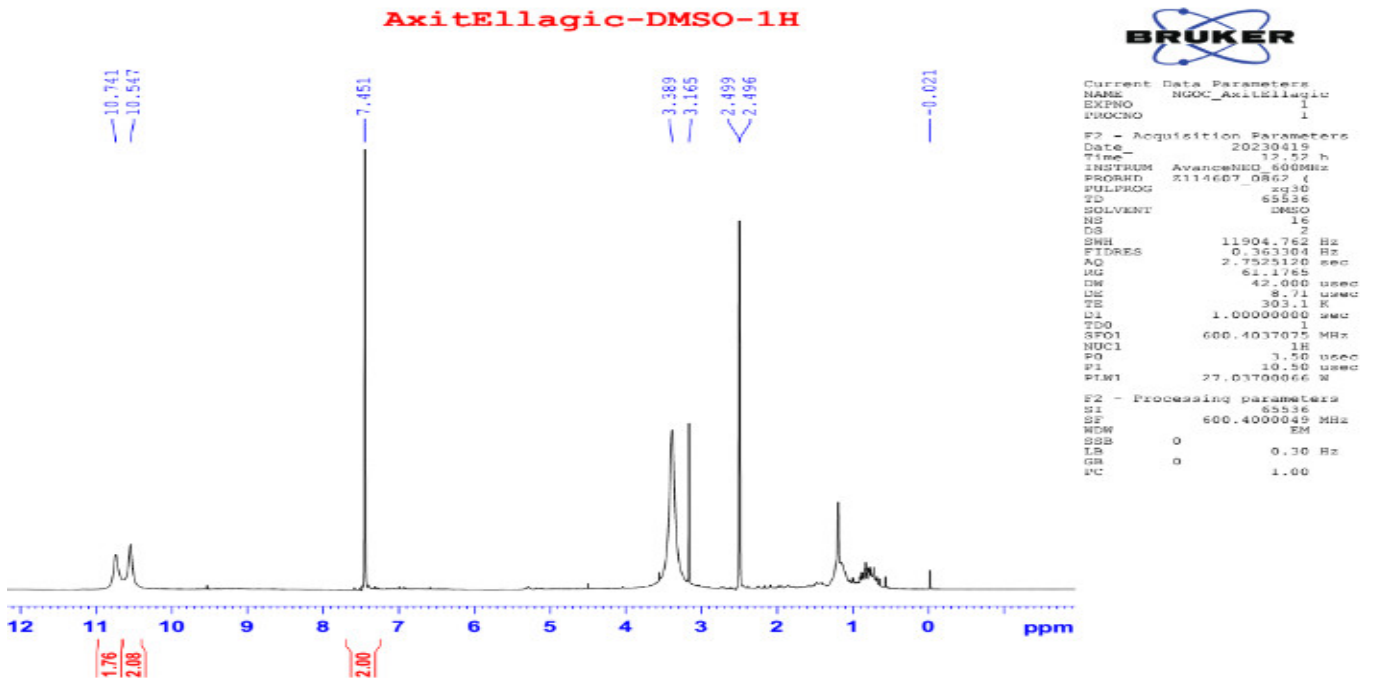


Hình 7. Phổ hồng ngoại của axit ellagic

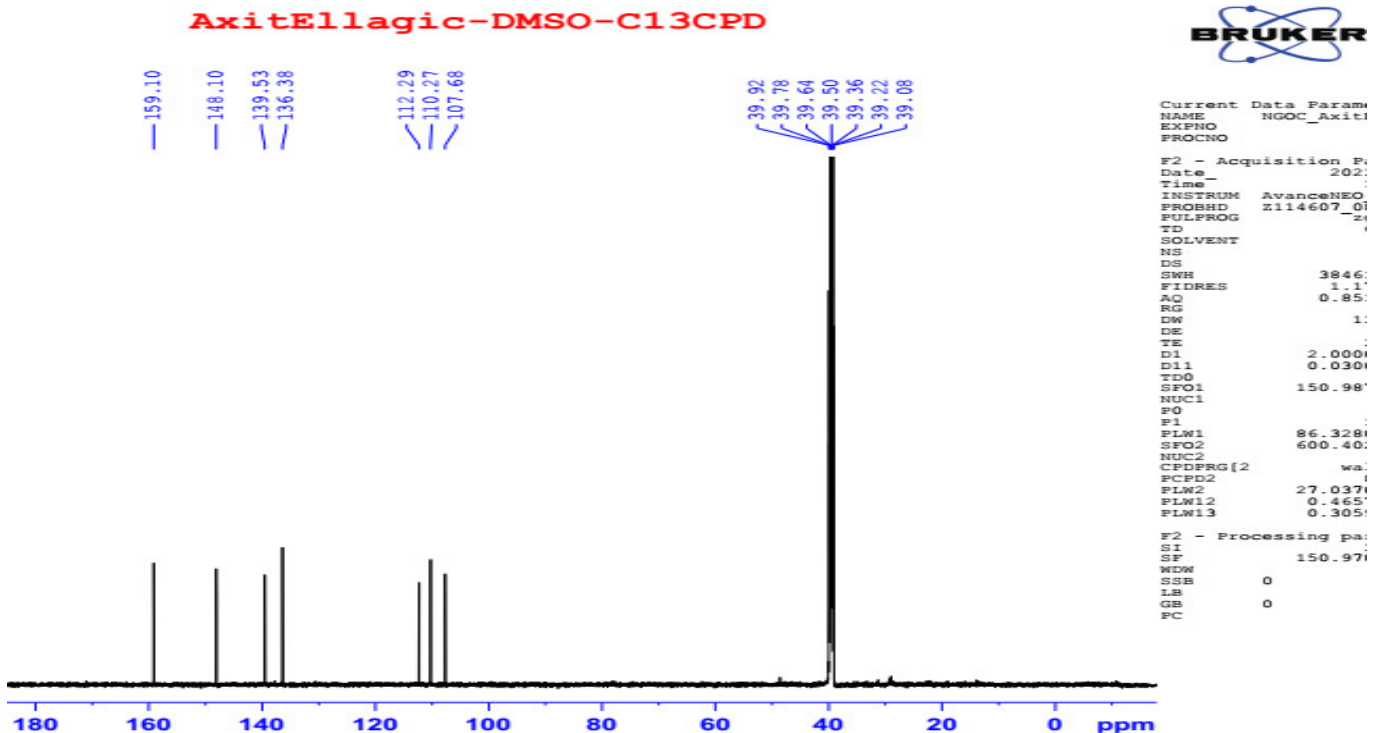
Trong phổ ¹H-NMR của axit ellagic có tín hiệu của 2 nguyên tử hydro trong nhóm OH liên kết với nguyên tử cacbon số 3 và 3' của phân tử axit ellagic (hình 6) với độ dịch chuyển hóa học ở $\delta = 10,741\text{ppm}$. Có tín hiệu của 2 nguyên tử hydro trong nhóm OH liên kết với nguyên tử cacbon số 4 và 4' của phân tử axit ellagic với độ dịch chuyển hóa học ở $\delta = 10,547\text{ppm}$. Hai nguyên tử hydro trong vòng thơm tại liên kết C-H ở nguyên tử cacbon số 5 và 5' cho tín hiệu có độ dịch chuyển hóa học tại $\delta = 7,451\text{ppm}$.

Trong phổ ¹³C NMR của axit ellagic có 7 tín hiệu của 14 nguyên tử cacbon trong phân tử, trong đó có 6 tín hiệu của 12 nguyên tử cacbon ở vòng thơm với độ dịch chuyển hóa học nằm trong vùng $\delta = 107,68 - 148,10\text{ppm}$ và 2 nguyên tử cacbon ở liên kết C=O có độ dịch chuyển hóa học ở $\delta = 159,10\text{ppm}$. Hình 8 và 9 là phổ ¹H và ¹³C-NMR của axit ellagic tách chiết từ vỏ lựu.

Các tín hiệu trong phổ hồng ngoại và phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR của axit ellagic có các đỉnh sóng của nhóm chức đặc trưng, có số tín hiệu của nguyên tử hydro và nguyên tử cacbon với độ dịch chuyển hóa học tương ứng, đã xác nhận đúng cấu tạo của axit ellagic.



Hình 8. Phổ ¹H-NMR của axit ellagic tách chiết từ vỏ lựu



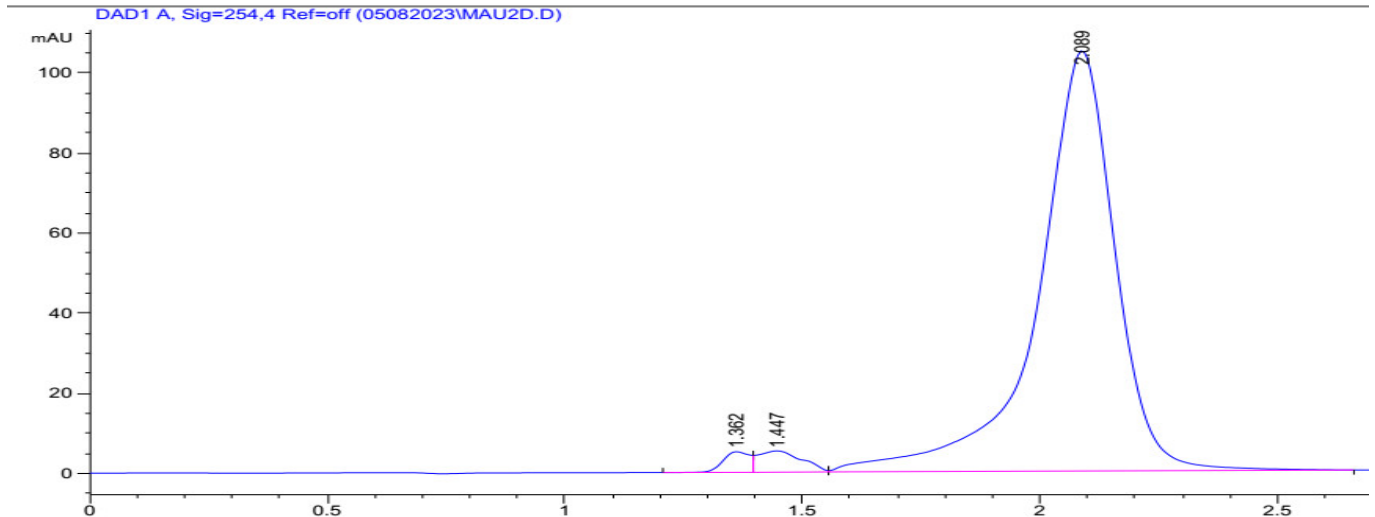
Hình 9. Phổ ¹³C-NMR của axit ellagic tách chiết từ vỏ lựu

3.7. Kết quả phân tích xác định hàm lượng của axit ellagic tách chiết từ vỏ lựu

Axit ellagic sau khi tinh chế, được phân tích xác định hàm lượng theo phương pháp HPLC. Xác định hàm lượng axit ellagic dựa vào đường chuẩn và diện tích trên phổ đồ thu được, theo công thức:

$$\% \text{Ellagic} = \frac{y-b}{1000 \cdot m} \cdot 100 = 97\%$$

Kết quả phân tích đã xác định được hàm lượng axit ellagic chiết tách từ vỏ quả lựu đạt 93,7%. Hình 10 là phổ đồ phân tích xác định hàm lượng của axit ellagic.



Hình 10. Phổ đồ phân tích HPLC xác định hàm lượng của axit ellagic

4. KẾT LUẬN

Từ vỏ quả lựu trắng ở huyện Hoài Đức, thành phố Hà Nội đã chiết tách được hợp chất ellagitannin bằng dung môi chiết ethanol 60%, nhiệt độ chiết là 80°C, trong thời gian 3 giờ. Lượng ellagitannin thu được từ 100g bột vỏ quả lựu là 9,0 - 9,3g.

Thủy phân ellagitannin chiết tách được từ vỏ quả lựu, bằng dung dịch axit H₂SO₄ 5%, ở nhiệt độ 105 - 110°C trong thời gian 5 giờ, thu được axit ellagic thô, tinh chế lại axit ellagic thô bằng cách kết tinh lại 3 - 4 lần trong methanol với tỷ lệ 30ml methanol/1,0g axit ellagic thô, thu được axit ellagic có hàm lượng 93,7%. Lượng axit ellagic thu được từ 100g bột vỏ quả lựu trắng ở Hoài Đức, Hà Nội là 3,0g axit ellagic hàm lượng 93,7%.

Cấu tạo của axit ellagic được kiểm tra bằng việc phân tích phổ hồng ngoại và phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR và ¹³C-NMR. Hàm lượng của axit ellagic được xác định bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P. S. Negi, G. K. Jayapraksha, B. S. Jena, "Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts," *Food Chemistry*, 80, 3, 393-397, 2003.
- [2]. Lidia Lipinska, Elbieta Klewicka, Michal Sojka, "Structure, occurrence and biological activity of ellagitannin: A general review," *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, 13(3), 289-299, 2014.
- [3]. A. M. Mathieson, B. J. Poppleton, "The crystal structure of ellagic acid," *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem*, 24, 1456-1461, 1968.
- [4]. O. Nara, "Effective purification of ellagic acid by successive automatic recrystallization and absolute determination of purity by absorptivity ratio," *Anal. Chim. Acta*, 333, 247-253, 1997.
- [5]. Javad Sharifirad, Cristina Quispe, Carla Marina Salgado Castillo, Rodrigo Caroca, A. Marco Lazo Velez, Halyna Antonyak, Alexandr Polishchuk, Roman

Lysiuk, Petro Oliinyk, Luigi De Masi, Paola Bontempo, Miquel Martorell, Sevgi Durna Dastan, Daniela Rigano, Michael Wink, C. Cho. William, "Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential," *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-24, 2022.

[6]. Jingjing Lu, Qipeng Yuan, "A new method for ellagic acid production from pomegranate husk," *Journal of Food Process Engineering*, 31, 443-445, 2008.

[7]. B. S. Zhang, R. Z. Zhang, C. Li, "The measurement of tannins content in cynomrium songaricum Rupr by complexometric titration," *Chin. Tradit Herbal Drugs*, 23, 577-578, 1992.

AUTHORS INFORMATION

Hoang Thanh Duc, Hoang Thi Ngoc

Hanoi University of Industry, Vietnam