



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0030079

(51)^{2019.01} B01D 11/04; A61K 31/7068; A61K
36/00

(13) B

(21) 1-2020-01115

(22) 28/02/2020

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/01/2021 394

(73) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
334 Nguyễn Trãi, Quận Thanh Xuân, Thành phố Hà Nội

(72) PHẠM HÙNG VIỆT (VN); NGÔ QUỐC ANH (VN); NGUYỄN VĂN TUYẾN
(VN); DƯƠNG HỒNG ANH (VN); PHAN VĂN KIÊM (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH HỢP CHẤT CAPPARILOSIT A TỪ CÂY TRỨNG
QUỐC (STIXIS SUAVEOLENS (ROXB.) PIERRE (CAPPARACEAE)

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách hợp chất capparilosite A (1H-indol-3-
axetonitril-4-O-β-D-glucopyranosit) (**1**) từ thân cây Trứng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.)
Capparaceae).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách hợp chất cappariloside A (1H-indol-3-axetonitril-4-O- β -D-glucopyranosit) (1) từ cây Trứng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Capparaceae).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây Trứng quốc có các tên gọi khác là Tiết xích, Mác nam ngoa (Tày), Co sáy tầu (Thái), có tên khoa học: *Stixis suaveolens* (Roxb.) Pierre (Capparaceae). *Stixis suaveolens* (Roxb.) là một loài cây bụi thuộc họ Capparaceae mọc ở vùng núi nhiệt đới tại nhiều tỉnh thành của Việt Nam như Lai Châu, Hòa Bình, Sơn La, Kon Tum, Đắk Lắk, Gia Lai. Cây bụi trườn hoặc leo. Cuống lá dài 1,5 - 3 cm; phiến lá hình bầu dục, hình thuôn, đôi khi hình trứng ngược, cỡ (10) 15 - 28 $\times$ (3,5) 4 - 10 cm, nhẵn; gốc lá nhọn hay tròn, chóp lá nhọn có mũi dài 0,5 - 1,5cm; gân bên 7 - 12 cặp. Cụm hoa chùm ở nách lá, hiếm khi tập hợp thành cụm hoa chùy, dài 15 - 25cm, có lông. Lá bắc hình thuôn hoặc hình tam giác, dài 3 - 6mm, có lông. Đài hình bầu dục, hình trứng ngược, cỡ 4 - 6 (9) $\times$ 2 - 3mm, hợp một phần ở gốc, có lông. Cuống nhị nhụy dài 2mm, nhẵn. Nhị (27-)40 -50 (-80); chỉ nhị dài 4 - 6 (11) mm, có lông. Cuống bầu dài 7 - 10 mm, có lông. Bầu hình bầu dục, hình trứng, nhẵn; 3 - 4 ô, cỡ 1,7 - 2,5 $\times$ 1,5 mm; vòi nhụy 3 - 4, dài 0,7 - 1 mm. Quả hình bầu dục, chín có màu vàng, cỡ 3 - 5 $\times$ 2,5 - 4 cm. Hạt hình bầu dục, dài 1,8 - 2 cm. Trứng quốc được dân gian sử dụng nhiều làm thuốc. Các bộ phận như rễ cành và lá cây được sử dụng chữa bệnh bong gân, xương, khớp và các bệnh về mắt.

Cappariloside A (1H-indol-3-axetonitril-4-O- β -D-glucopyranosit) được phân lập lần đầu tiên từ quả cây *Capparis spinosa* L. [*Phytochemistry* **1999**, 50, 7, 1205-1208]

Phương pháp điều chế cappariloside A từ cây *Capparis spinosa* L. bao gồm bước chiết xuất dược liệu, tẩy trắng bằng than hoạt, tách và tinh chế bằng sắc ký cột, sắc ký ngược dòng tốc độ cao, các bước cụ thể như sau: (1) Chiết xuất: nguyên liệu là phần trên mặt đất được nghiền nhỏ, chiết 3 lần bằng dung môi etanol và lọc để thu lấy dịch chiết; (2) tẩy trắng: than hoạt tính được thêm vào dịch chiết, ủ ở 70 °C trong 30 - 60 phút để tẩy trắng, dịch chiết được lọc bỏ than hoạt, cô đặc dưới áp suất giảm, thu hồi etanol để thu được cao cô đặc; (3) sắc ký cột: sử dụng cột nhựa hấp phụ đậm đặc, rửa bằng nước và 40 - 60% etanol, etanol và dịch rửa giải được gộp lại, sấy khô và cô đặc để tạo ra bột thô cappariloside A; (4) Sắc ký ngược dòng tốc độ cao: cappariloside A thô được tách và tinh chế sử dụng sắc ký ngược dòng tốc độ cao, các phân đoạn chứa cappariloside A được cô đặc và sấy khô dưới áp suất giảm để cho cappariloside A sạch, hàm lượng 96,3%. [CN102391331A]

Masanori Somei và các đồng tác giả đã lần đầu tiên tổng hợp được cappariloside A (1) trong năm bước từ indol-3-carbaldehyt với hiệu suất 41% bằng cách glycosyl hóa đơn giản 4-hydroxyindol-3-axetonitril với 2,3,4,6-tetra- O-axetyl-D-glucopyranosyl bromua sử dụng lithi hydroxit. [*Heterocycle* **2000**, 53, 7, 1573 - 1578]

Các tác giả đã nghiên cứu hoạt tính sinh học của hợp chất cappariloside A (1H-indol-3-axetonitril-4-O- β -D-glucopyranosit) (1).

Saksit Nobsathian và các đồng tác giả khi tìm kiếm các tác nhân diệt ấu trùng muỗi *Aedes aegypti* mang virus bệnh sốt xuất huyết từ cây *Maerua siamensis* (Kurt) Pax Capparidaceae đã phát hiện ra rằng cappariloside A là tác nhân diệt ấu trùng tiềm năng tốt. Hoạt tính diệt ấu trùng *Aedes aegypti* của Cappariloside A với LC_{50} = 71,14 và 99.79 ppm tương ứng lần lượt ở 24 và 48 giờ. [Nobsathian et al. *Chem. Biol. Technol. Agric.* (2018) 5:8]

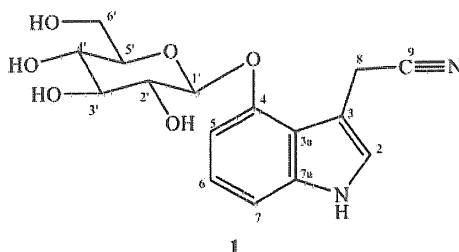
Zifeng Yang và các đồng tác giả đã phát hiện cappariloside A có thể ức chế sự nhân lên của nhiều loại virus, bao gồm cả virus cúm H1N1 và H3N2, PIV3 và ADV trên *in vitro*. Đồng thời, nó làm giảm đáng kể biểu hiện của IL-6, IP-10, MIG và RANTES / CCL-5 được kích thích bởi A / PR / 8/34 (H1N1) ở một loạt các liều, thậm chí 0,5 mg / mL. Cappariloside A có hiệu quả kháng virus nhẹ và tác dụng kháng viêm do nhiễm virus cúm tương đối mạnh. Mặc dù cơ chế tác dụng vẫn chưa được làm rõ hoàn toàn, tác dụng chống cúm của cappariloside A thông qua điều hòa con đường tín hiệu IFN của vật chủ. [*Life Sciences* 200 (2018) 115–125, CN104814973A, CN104814973B]

Từ dịch chiết metanol của lá cây *Stixis suaveolens* Ngô Quốc Anh và các đồng tác giả đã phân lập được các chất 1H-Indol-3-axetonitril-4-O-β-D-glucopyranosit (1), α-adenosine (2), β-adenosine (3), 1-O-syrinoyl-β-D-glucopyranosit (4), 2,6-dimethoxy-p-hydroquinon 1-O-β-D-glucopyranosit (5), icariside B5 (6). Đây là báo cáo đầu tiên về các hợp chất này từ cây *Stixis suaveolens*. [Ngo Quoc Anh et al. *Vietnam J. Chem.* 57(3) (2019) 304 - 310].

Từ lá của *Stixis suaveolens* (Roxb.), Ngô Quốc Anh và các đồng tác giả đã phân lập được 10 hợp chất khác là (±) -5-methoxylariciresinol (1), (7S, 8R, 8R') - 5,5 -dimethoxylariciresinol (2), rượu (+) - dehydrodiconiferyl (3), (+) - dehydrodiconiferyl rượu -4-O-β-D-glucoside (4), (7R, 8R) -threo-guaiacylglycerol-8-O-4 - sinapyl ete 7-O-β-D-glucopyranosit (5), 3-hydroxy-2 {4 - [(1E) -3-hydroxyprop-1-en-1-yl] -2 methoxyphenoxy} propyl β-D-glucopyranosit (6), coniferin (7), syringin (8), Z-coniferin (9), và dihydrosyringin (10) [Ngo Quoc Anh et al. *Vietnam J. Chem.* 57(3) (2019) 311 - 317].

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp chiết tách hợp chất cappariloside A (1H-indol-3-axetonitril-4-O-β-D-glucopyranosit) (1):



từ cây Trứng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Capparaceae) bao gồm các bước:

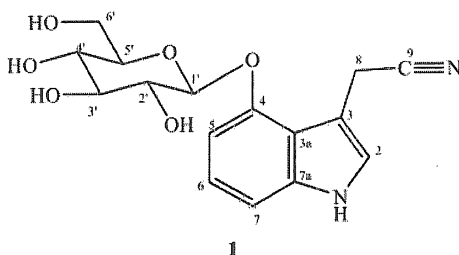
Mẫu cây khô được nghiền nhỏ thành bột và chiết với MeOH 3 lần trong bể siêu âm ở nhiệt độ phòng. Sau khi cô quay chân không đuổi hết dung môi, cao chiết MeOH thô được hòa trong nước và chiết phân bố với diclometan, etyl axetat, thu được cao chiết diclometan, cao chiết etyl axetat và lớp nước.

Lớp nước được đưa lên chạy qua cột Diaion HP-20, hệ dung môi rửa giải gồm 25%, 50%, 75% và 100% MeOH, thu được 4 phân đoạn (SSW1-SSW4). Phân đoạn SSW2 và SSW3 được gom và tách với hệ dung môi biến thiên từ 5 - 100% MeOH, thu được 6 phân đoạn SSW2.1-SSW2.6. Phân đoạn SSW2.3 tiếp tục được tách với cột pha đảo C-18 (RP-18) với hệ dung môi MeOH/nước (1/2, v/v), thu được 8 phân đoạn SSW2.3.1-SSW2.3.8. Hợp chất **1** được phân lập từ phân đoạn SSW2.3.5 bằng cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi axeton/nước (1/7, thể tích/thể tích).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết các phương án cụ thể.

Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách hợp chất cappariloside A (1H-indol-3-axetonitril-4-O-β-D-glucopyranosit) (**1**) có công thức:



Mẫu thân cây Trứng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Capparaceae) được thu gom, phơi khô, sấy nhẹ trong tủ sấy ở 40 °C rồi nghiền mịn, rồi tiến hành chiết xuất, phân lập, xác định cấu trúc hóa học của hợp chất có mặt phổ biến trong nguyên liệu, xác định hoạt tính sinh học theo các phương pháp được nêu dưới đây.

Phương pháp chiết xuất bao gồm cả việc chọn dung môi, dụng cụ và cách chiết. Một phương pháp chiết xuất thích hợp chỉ có thể được hoạch định khi biết rõ thành phần của các chất cần biết trong cây ra. Mỗi loại hợp chất có độ hòa tan khác nhau trong từng loại dung môi. Vì vậy không thể có một phương pháp chiết xuất chung cho tất cả các dược liệu. Để phân tách các phần chiết và phân lập các hợp chất đã sử dụng các phương pháp chiết hai pha rắn – lỏng, chiết hai pha lỏng – lỏng, các phương pháp sắc ký phân tích như sắc ký lớp mỏng (TLC), các phương pháp sắc ký điều chế như sắc ký cột thường (CC), sắc ký cột nhanh (FC), sắc ký cột tinh chế (Mini-C), sắc ký cột pha đảo (RP-CC) và các phương pháp kết tinh chọn lọc. Phương pháp chung để xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất là kết hợp giữa việc xác định các thông số vật lý với các phương pháp phổ hiện đại. Tuy nhiên, phương pháp phổ biến nhất là các phương pháp đo phổ như: phổ hồng ngoại (IR), phổ khối (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, HSQC, COSY...).

Mẫu bột nguyên liệu thân cây Trứng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Capparaceae) được nghiền thành bột và chiết bằng MeOH ba lần trong bể siêu âm ở nhiệt độ phòng. Sau khi làm bay hơi dung môi, dịch chiết metanol thô được hòa thành hỗn dịch trong nước và được chiết phân bố bằng diclometan, etyl axetat để thu được dịch chiết diclometan, etyl axetat và lớp nước.

Lớp nước được đưa lên chạy qua cột Diaion HP-20, hệ dung môi rửa giải gồm 25%, 50%, 75% và 100% MeOH (thể tích/thể tích), thu được 4 phân đoạn (SSW1-SSW4). Phân đoạn SSW2 và SSW3 được gom và tách với hệ dung môi biến thiên từ 5 - 100% MeOH (thể tích/thể tích) cho 29 phân đoạn. Các phân đoạn có TLC giống

nhau được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho 6 nhóm phân đoạn ký hiệu lần lượt là: SSW2.1 (bao gồm các phân đoạn 1-4), SSW2.2 (bao gồm các phân đoạn 5-10), SSW2.3 (bao gồm các phân đoạn 11-16) và SSW2.4 (bao gồm các phân đoạn 17-22), SSW2.5 (bao gồm các phân đoạn 23-27), SSW2.6 (bao gồm các phân đoạn 24-29). Phân đoạn SSW2.3 tiếp tục được tách với cột pha đảo C-18 (RP-18) với hệ dung môi MeOH/nước (1/2, thể tích/thể tích), cho 54 phân đoạn. Các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại cho 8 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: SSW2.3.1 (bao gồm các phân đoạn 9-10), SSW2.3.2 (bao gồm các phân đoạn 11-12), SSW2.3.3 (bao gồm các phân đoạn 13-14), SSW2.3.4 (bao gồm các phân đoạn 15-19), SSW2.3.5 (bao gồm các phân đoạn 20-30), SSW2.3.6 (bao gồm các phân đoạn 31-35), SSW2.3.7 (bao gồm các phân đoạn 36-45) và SSW2.3.8 (bao gồm các phân đoạn 46-54). Hợp chất 1 được phân lập từ phân đoạn SSW2.3.5 bằng cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi axeton/nước (1/7, thể tích/thể tích) dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

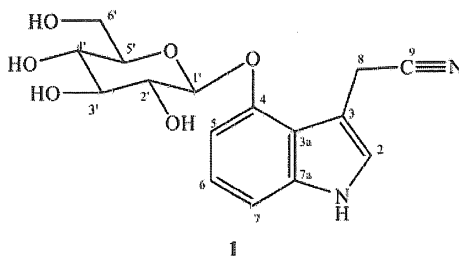
1. Quy trình chiết tách hợp chất (1)

Mẫu cây Trứng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Capparaceae) khô (5 kg) được nghiền nhỏ thành bột và chiết với MeOH 3 lần (mỗi lần 10 L) trong bể siêu âm ở nhiệt độ phòng. Sau khi cô quay chân không đuổi hết dung môi, cao chiết MeOH thô (220g) được hòa trong nước và chiết phân bố với diclometan, etyl axetat, thu được 57 g cao chiết diclometan, 13 g cao chiết etyl axetat và lớp nước.

Lớp nước được đưa lên chạy qua cột Diaion HP-20, hệ dung môi rửa giải gồm 25%, 50%, 75% và 100% MeOH (thể tích/thể tích), thu được 4 phân đoạn (SSW1-SSW4). Phân đoạn SSW2 và SSW3 được gom và tách với hệ dung môi biến thiên từ 5 - 100% MeOH (thể tích/thể tích) cho 29 phân đoạn. Các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho 6 nhóm phân đoạn ký hiệu lần lượt là: SSW2.1 (bao gồm các phân đoạn 1-4), SSW2.2 (bao gồm các phân

đoạn 5-10), SSW2.3 (bao gồm các phân đoạn 11-16) và SSW2.4 (bao gồm các phân đoạn 17-22), SSW2.5 (bao gồm các phân đoạn 23-27), SSW2.6 (bao gồm các phân đoạn 24-29). Phân đoạn SSW2.3 tiếp tục được tách với cột pha đảo C-18 (RP-18) với hệ dung môi MeOH/nước (1/2, thể tích/thể tích), cho 54 phân đoạn. Các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại cho 8 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: SSW2.3.1 (bao gồm các phân đoạn 9-10), SSW2.3.2 (bao gồm các phân đoạn 11-12), SSW2.3.3 (bao gồm các phân đoạn 13-14), SSW2.3.4 (bao gồm các phân đoạn 15-19), SSW2.3.5 (bao gồm các phân đoạn 20-30), SSW2.3.6 (bao gồm các phân đoạn 31-35), SSW2.3.7 (bao gồm các phân đoạn 36-45) và SSW2.3.8 (bao gồm các phân đoạn 46-54). Hợp chất **1** (10 mg) được phân lập từ phân đoạn SSW2.3.5 bằng cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi axeton/nước (1/7, thể tích/thể tích) dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

Hợp chất (**1**) có công thức:



Hợp chất (**1**) có tên theo IUPAC là 2-(4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-1H-indol-3-yl)axetonitril

Các dữ liệu phổ của hợp chất này:

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δH (ppm): 11,10 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, 1-NH), 7,20 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-2), 6,69 (1H, dd, *J* = 8,5, 1,5 Hz, H-5), 7,00 (1H, dd, *J* = 8,5, 8,5 Hz, H-6), 6,99 (1H, dd, *J* = 8,5, 1,5 Hz, H-7), 4,18 (2H, AB system, *J* = 18,5 Hz, H-8), 4,89 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H-1'), 3,39 (1H, dd, *J* = 7,5, 9,0 Hz, H-2'), 3,29 (1H, t, *J* = 9,0 Hz, H-3'), 3,20 (1H, t, *J* = 9,0 Hz, H-4'), 3,33 (1H, m, H-5'), 3,50 (1H, dd, *J* = 12,0, 5,0 Hz, Ha-6'), 3,74 (dd, *J* = 12,0, 2,0 Hz, Hb-6').

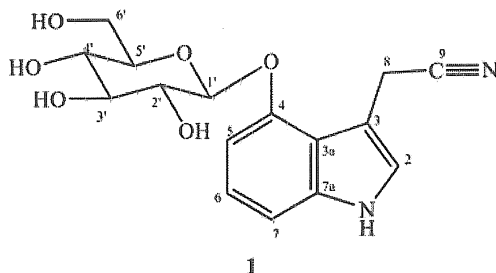
^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz), δC (ppm): 122,8 (C-2), 103,7 (C-3), 116,6 (C-3a), 151,8 (C-4), 103,5 (C-5), 122,5 (C-6), 106,9 (C-7), 137,9 (C-7a), 14,9 (C-8), 120,1 (C-9), 101,3 (C-1'), 73,5 (C-2'), 76,7 (C-3'), 69,8 (C-4'), 77,0 (C-5'), 60,8 (C-6').

$[\alpha]_D^{25} -60,0^\circ$ ($c = 0,1$, MeOH);

HR-ESI-MS: m/z 357,1059 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, tính được $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$: 357,1063.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp chiết tách hợp chất cappariloside A (1H-indol-3-axetonitril-4-O- β -D-glucopyranosit) (1):



từ thân cây Trứng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Capparaceae) bao gồm các bước:

(i) thu gom nguyên liệu thân cây Trứng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Capparaceae) phơi khô, sấy nhẹ trong tủ sấy ở nhiệt độ 40°C rồi nghiền mịn thành bột;

(ii) ngâm chiết bột nguyên liệu với MeOH ba lần trong bể siêu âm ở nhiệt độ phòng, sau đó lọc thu dịch chiết;

(iii) làm bay hơi dung môi và hòa dịch chiết metanol thô thành hỗn dịch trong nước rồi chiết phân bố bằng diclometan, etyl axetat để thu được dịch chiết diclometan, etyl axetat và lớp nước;

(iv) phân tách lớp nước trên cột sắc ký Diaion HP-20, hệ dung môi rửa giải gồm 25%, 50%, 75% và 100% MeOH (thể tích/thể tích), thu được 4 phân đoạn (SSW1-SSW4), phân đoạn SSW2 và SSW3 được gom và tách với hệ dung môi biến thiên từ 5-100% MeOH (thể tích/thể tích) cho 29 phân đoạn, các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho 6 nhóm phân đoạn ký hiệu lần lượt là: SSW2.1 (bao gồm các phân đoạn 1-4), SSW2.2 (bao gồm các phân đoạn 5-10), SSW2.3 (bao gồm các phân đoạn 11-16) và SSW2.4 (bao gồm các phân đoạn 17-22), SSW2.5 (bao gồm các phân đoạn 23-27), SSW2.6 (bao gồm các phân đoạn 24-29);

(v) phân tách phân đoạn SSW2.3 trên cột pha đảo C-18 (RP-18) với hệ dung môi MeOH/nước (1/2, thể tích/thể tích), cho 54 phân đoạn, các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại cho 8 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: SSW2.3.1 (bao gồm các phân đoạn 9-10), SSW2.3.2 (bao gồm các phân đoạn 11-12), SSW2.3.3 (bao gồm các phân đoạn 13-14), SSW2.3.4 (bao gồm các phân đoạn 15-19), SSW2.3.5 (bao gồm các phân đoạn 20-30), SSW2.3.6 (bao gồm các phân đoạn 31-35), SSW2.3.7 (bao gồm các phân đoạn 36-45) và SSW2.3.8 (bao gồm các phân đoạn 46-54);

(vi) phân tách phân đoạn SSW2.3.5 bằng cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi axeton/nước (1/7, thể tích/thể tích) thu được hợp chất **1** dưới dạng bột vô định hình màu trắng.