



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002866

(51)⁷ **C07H 1/00; C07H 17/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00113

(22) 13/04/2018

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/07/2018 364A

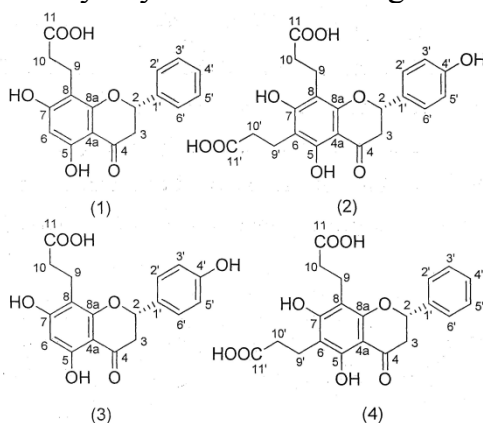
(73) Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Nhà 1H, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Mạnh Cường (VN); Ninh Thế Sơn (VN); Ngũ Trường Nhân (VN); Tô Đạo Cường (VN).

(54) QUY TRÌNH TÁCH VÀ TÍNH CHẾ CÁC HỢP CHẤT CARBOXYETHYLFLAVANON TỪ LỖI GỖ CÂY SỪA ĐỎ (*DALBERGIA TONKINENSIS*)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế các hợp chất carboxyethylflavanon từ bột lõi gỗ cây Sữa Đỏ *Dalbergia tonkinensis* nhiều năm tuổi của Việt Nam. Quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột lõi gỗ cây Sữa Đỏ; c) thu phân đoạn chứa các hợp chất carboxyethylflavanon; d) phân lập các hợp chất carboxyethylflavanon; e) thu các hợp chất carboxyethylflavanon thô; và f) tinh chế các hợp chất carboxyethylflavanon. Quy trình theo giải pháp hữu ích thu được bốn hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (1), (2), (3) và (4).



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực hóa học các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách và tinh chế các hợp chất carboxyethylflavanon từ lõi gỗ cây Sưa Đỏ *Dalbergia tonkinensis* (Fabaceae) có ở Việt Nam.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Chi *Dalbergia* (chi Trắc) thuộc họ Đậu (Fabaceae) có hơn 300 loài đã được ghi nhận (*Dalbergia abbreviata*, *Dalbergia abrahamii*, *Dalbergia acariiantha*, *Dalbergia acuta*, *Dalbergia acutifoliolata*, *Dalbergia adami*, *Dalbergia sissoo*, v/v.), phân bố rộng rãi ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới (The Plant List. Available: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=dalbergia>, (Accessed, July 29, 2017); N. Vasudeva, M. Vats, S. K. Sharma, S. Sardana. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia* - A review. *Pharmacognosy Reviews*, 2009, 3, 307-319). Gỗ của nhiều loài thuộc chi *Dalbergia* thường được gọi là “gỗ hồng” do có màu đỏ đậm và được sử dụng làm đồ nội thất và các nhạc cụ chất lượng cao từ hàng trăm năm nay.

Nhiều loài *Dalbergia* được sử dụng để điều trị các bệnh như chữa loét, chảy máu, ho, tiêu chảy, kiết lỵ, khó tiêu, thương vị, chảy máu cam, bệnh lậu, xuất huyết, phong, sốt rét, thấp khớp, ghe, đau dạ dày, giang mai, chấn thương, v/v. (N. Vasudeva, M. Vats, S. K. Sharma, S. Sardana. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia* - A review. *Pharmacognosy Reviews*, 2009, 3, 307-319). Trong y học cổ truyền, chúng cũng được sử dụng như các thuốc giảm đau, thuốc chống ho, tiêu chảy, chống viêm, chống ung thư, chống vi khuẩn, hạ sốt, chống loét sinh dục, diệt tinh trùng, tim mạch (S. M. Yu, Z. J. Cheng, S. C. Kuo. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta by butein, a novel cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor. *European Journal of Pharmacology*, 1995, 280, 69-77; S. M. Yu, S. C. Kuo. Vasorelaxant effect of isoliquiritigenin, a novel soluble guanylate cyclase activator, in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*, 1995, 114, 1587-1594). Lõi gỗ của cây Sưa Đỏ ở Việt Nam có giá trị kinh tế cao và được cho là có được sử dụng làm thuốc hiệu dụng. Đã có một số nghiên cứu ở Trung Quốc cho thấy lõi gỗ của loài Sưa Hải Nam

Dalbergia odorifera được sử dụng để điều trị các bệnh về tim mạch như suy tim, viêm cơ tim, nhồi máu cơ tim và xơ vữa động mạch (A. Sugiyama, B. M. Zhu, A. Takahara, Y. Satoh, K. Hashimoto. Cardiac effects of *Salvia miltiorrhiza*/*Dalbergia odorifera* mixture, an intravenously applicable Chinese medicine widely used for patients with ischemic heart disease in China. Circulation Journal, 2002, 66, 182-184; L. H. Wu, Y. Wang, Z. Li, B. L. Zhang, Y. Y. Cheng, X. H. Fan. Identifying roles of “*Jun-Chen-Zuo-Shi*” component herbs of *QiShenYiQi* formula in treating acute myocardial ischemia by network pharmacology. Chinese Medicine, 2014, 9, 24). Ngoài ra, các loài *Dalbergia* còn có các tác dụng sinh học quý khác như tái tạo xương, làm giãn động mạch vành, chống bệnh than, chống dị ứng, chống androgen, chống tia tử ngoại, kháng ký sinh trùng, chống oxy hóa, kháng plasmodium, điều hòa miễn dịch, diệt muỗi, ức chế enzyme Tyrosinase, v/v. (N. Vasudeva, M. Vats, S. K. Sharma, S. Sardana. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia* - A review. Pharmacognosy Reviews, 2009, 3, 307-319).

Các nghiên cứu hóa học về các loài *Dalbergia* tập trung là nghiên cứu bộ phận gỗ và lá. Thành phần hóa học của các loài *Dalbergia* rất đa dạng và phong phú, có thể kể đến các dạng flavonoid như flavon, isoflavon, neoflavon, flavanon, isoflavanon (S. Saha, J. A. Shilpi, H. Mondal, F. Hossain, M. Anisuzzman, M. M. Hasan. Ethnomedicinal, phytochemical, and pharmacological profile of the genus *Dalbergia* L. (Fabaceae). Phytopharmacology, 2013, 4, 291-346), isoflavanon glycosit (S. Kaennakam, P. Siripong, S. Tip-Pyang. Dalvelutinoside, a new isoflavone glycoside from the methanol extract of *Dalbergia velutina* roots. Natural Products Research, 2016, 30, 1493-1498), flavanes (H. Wang, W. H. Dong, W. J. Zuo, H. Wang, H. M. Zhong, W. L. Mei H. F. Dai. Three new phenolic compounds from *Dalbergia odorifera*. Journal of Asian Natural Products Research, 2014, 16, 1109-1118), isoflavanes (S. Kaennakam, P. Siripong, S. Tip-Pyang S. Cytotoxicities of two new isoflavanes from the roots of *Dalbergia velutina*. Journal of Nature Medicine, 2017, 71, 310-314), neoflavanes (S. Saha, J. A. Shilpi, H. Mondal, F. Hossain, M. Anisuzzman, M. M. Hasan. Ethnomedicinal, phytochemical, and pharmacological profile of the genus *Dalbergia* L. (Fabaceae). Phytopharmacol. 2013, 4, 291-346), flavonol (P. Dixit, R. Chillara, V. Khedgikar, J. Gautam, P. Kushwaha, A. Kumar, D. Singh, R. Trivedi, R. Maurya. Constituents of *Dalbergia sissoo* Roxb.

leaves with osteogenic activity. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22, 890-897), flavanonol và isoflavanonol, 4-aryl-coumarins, phenols, sesquiterpenes (S. Saha, J. A. Shilpi, H. Mondal, F. Hossain, M. Anisuzzman, M. M. Hasan. Ethnomedicinal, phytochemical, and pharmacological profile of the genus *Dalbergia* L. (Fabaceae). *Phytopharmacol.* 2013, 4, 291-346), phytosterols (M. M. Gláucia Guedesa, R. S. Albuquerque, R. S. Soares-Maciel, M. A. Freitas, V. A. Silva, E. O. Lima, M. A. Lima, E. V. L. Cunha, H. D. M. Coutinho. Isolation of phytosterols of *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Leguminosae) and modulation of antibiotic resistance by a possible membrane effect. *Arabian Journal of Chemistry*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.10.014>), các dẫn xuất của coumestan và coumaronochromone (J. P. Abdou, J. Momeni, A. Adhikarid, N. Tsabang, A. T. Tchinda, M. I. Choudhary, A. E. Nkengfack. New coumestan and coumaronochromone derivatives from *Dalbergia boehmii* Taub. (Fabaceae). *Phytochemistry Letters*, 2017, 21, 109-113).

Loài *Dalbergia tonkinensis* có hoa màu trắng, nhưng trong dân gian thường được gọi là “Sưa Đỏ” do lõi gỗ cây nhiều năm tuổi có màu đỏ và lõi gỗ đỏ này thường được buôn bán, săn lùng với giá trị cao. Loài *Dalbergia tonkinensis* còn được gọi là Sưa Bắc Bộ (Tuấn, T. A., Đạt, N. T., Nam, N. H., Hùng, N. Q., Hoi, T. M., Thái, T. H., Minh C. V., Kiệm, P. V. Các hợp chất isoflavan và dihydrophenanthren từ cây Sưa Bắc bộ (*Dalbergia tonkinensis* *Tạp chí Hóa học*, 2009, 47, 716-719). Trong nước mới có một nghiên cứu về thành phần gỗ cây Sưa *Dalbergia tonkinensis*. Từ dịch chiết metanol của thân gỗ Sưa (*Dalbergia tonkinensis*), tác giả Trần Anh Tuấn và cộng sự (Việt Nam) đã thu được các hợp chất flavonoid như genistein, lanceolarin. Đặc điểm của các quy trình chiết flavonoid theo tài liệu trên là sử dụng hệ dung môi cloroform và metanol, với tỷ lệ cloroform cao, đây là dung môi độc, gây ung thư (Tuấn, T. A., Đạt, N. T., Nam, N. H., Hùng, N. Q., Hoi, T. M., Thái, T. H., Minh C. V., Kiệm, P. V. Các hợp chất isoflavan và dihydrophenanthren từ cây Sưa Bắc bộ (*Dalbergia tonkinensis*). *Tạp chí Hóa học*, 2009, 47, 716-719). Ngoài ra, tác giả Phạm Thanh Loan và cộng sự cũng đã nghiên cứu thân loài *Dalbergia vietnamensis* đặc hữu của Việt Nam và đã thu được nhiều hợp chất flavonoid, cụ thể là các hợp chất isoflavone và isoflavan glycosit như caviunin, 2 dẫn xuất của caviunin và 1 dẫn xuất của dalspinosin. Theo đó, tác giả Phạm Thanh Loan và cộng sự chiết phân thân gỗ trực tiếp bằng dung môi metanol, tiếp

đó phân lập các hợp chất isoflavone trên cột silica gel (Loan, P. T., Anh, H. T. L., Cuc, N. T., Yen, D. T. H., Hang, D. T. T., Ha, T. M., Nhiem, N. X., Du, N. V., Thai, T. H., Minh, C. V., Kiem, P. V. New isoflavone glycoside from the stems of *Dalbergia vietnamensis*. *Natural Product Communications*, 2014, 9, 809-810). Tuy nhiên, cho đến nay chưa có công trình nào nghiên cứu về lõi gỗ cũng như các hợp chất carboxyethylflavanon được phân lập và tinh chế từ lõi gỗ Sưa Đỏ nhiều năm tuổi của Việt Nam.

Flavanon là lớp chất được đặc biệt tìm thấy trong lõi gỗ Sưa Đỏ có tác dụng chống oxy hóa, kháng viêm, hạ lipid, chống thiếu máu cục bộ, dung nạp glucose và tác dụng tim mạch như chống giãn mạch nên có tiềm năng phát triển thành thực phẩm chức năng, thuốc chữa bệnh tim mạch (L. Testai, V. Calderone. Nutraceutical value of Citrus flavanones and their implications in cardiovascular disease. *Nutrients*, 2017, 9, 502; doi:10.3390/nu9050502). Các hợp chất carboxyethylflavanon thuộc nhóm flavanon khá hiếm gặp trong thiên nhiên. Tác giả Nguyễn Mạnh Cường và cộng sự đã phân lập lần đầu tiên từ lõi gỗ cây Sưa Đỏ nhiều năm tuổi (N. M. Cuong, N. T. Nhan, N. T. Son, D. H. Nghi, T. D. Cuong. Daltonkins A and B, Two New Carboxyethylflavanones from the Heartwood of *Dalbergia tonkinensis*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2017, 38, 1511-1514; N. T. Son, K. Harada, N. M. Cuong, Y. Fukuyama. Two new carboxyethylflavanones from the heartwood of *Dalbergia tonkinensis* and their antimicrobial activities. *Natural Product Communications*, 2017, 12, 1721-1723). Khác với các quy trình phân lập hợp chất thiên nhiên thông thường (chiết các cao tổng bằng các dung môi hữu cơ như metanol, etanol), các hợp chất carboxyethylflavanon phân lập từ cao tổng được chiết bằng nước, sau đó mới dùng các dung môi thông thường để phân lập. Sử dụng lõi gỗ Sưa Đỏ nhiều năm tuổi, dùng nước để chiết cao tổng, quy trình tách và tinh chế lần đầu tiên các hợp chất carboxyethylflavanon là các điểm mới của đơn giải pháp hữu ích này.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Từ tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích, chúng tôi thấy việc sử dụng bộ phận cây để nghiên cứu, kỹ thuật tách sử dụng các vật liệu không tái sử dụng, các hệ dung môi độc hại, các phức hệ đắt tiền để phân lập các hợp chất flavonoid là rào cản lớn đối với sự phát triển dược chất cho ngành công nghiệp dược.

Do đó, giải pháp hữu ích này nhằm khắc phục rào cản nêu trên, theo đó giải pháp hữu ích đề xuất quy trình tách và tinh chế các hợp chất carboxyethylflavanon từ lõi gỗ Sưa Đỏ nhiều năm tuổi của Việt Nam theo quy trình tối ưu hơn và tiết kiệm hơn. Các hợp chất carboxyethylflavanon phân lập từ lõi gỗ Sưa Đỏ nhiều năm tuổi của Việt Nam không hiện diện ở các dịch chiết tổng axeton, metanol và etanol sau khi được định tính bằng sắc ký bản mỏng.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách các hợp chất carboxyethylflavanon từ lõi gỗ Sưa Đỏ nhiều năm tuổi, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) thu thân và lấy lõi gỗ Sưa Đỏ nhiều năm tuổi, sau đó sấy khô đến khối lượng không đổi, chặt và xay nhỏ để tạo ra bột lõi gỗ Sưa Đỏ;

b) chiết bột lõi gỗ Sưa Đỏ bằng cách chiết phần bột thu được ở bước a) với metanol (3 lần) ở nhiệt độ phòng, sau đó thu dịch chiết và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được phần cặn chiết và phần bã còn lại được làm khô;

c) chiết phần bã khô còn lại bằng cách chiết phần bã khô thu được ở bước b) bằng Soxhlet ba lần với nước sôi, sau đó thu dịch chiết và cất loại bỏ nước dưới áp suất giảm để thu được phần cặn chiết;

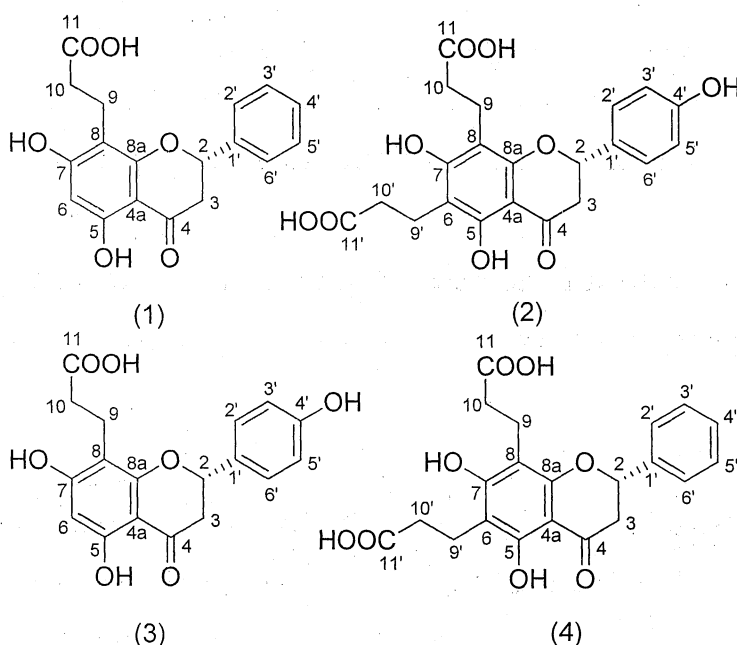
d) thu phân đoạn chứa các hợp chất carboxyethylflavanon bằng cách đưa phân đoạn chứa cặn chiết thu được ở bước c) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Diaion HP-20 và hệ dung môi rửa giải là metanol/nước theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 0, 25, 50, 75 và 100% thu hai phân đoạn có tỷ lệ metanol là 25% và 75%;

e) thu các hợp chất carboxyethylflavanon thô bằng cách đưa phân đoạn có tỷ lệ metanol 25% thu được ở bước d) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh, sau đó sử dụng hệ dung môi rửa giải là diclometan/metanol/nước theo tỷ lệ 30/1/0,1 (v/v/v), thu phân đoạn có kí hiệu là W2.2; phân đoạn có tỷ lệ metanol 75% thu được ở bước d) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh, sau đó sử dụng hệ dung môi rửa giải là diclometan/metanol/nước theo tỷ lệ 30/1/0,1 (v/v/v), thu hai phân đoạn có kí hiệu là W4.1 và W4.2;

f) tinh chế các hợp chất carboxyethylflavanon bằng cách hòa tan phân đoạn có kí hiệu W2.2 trong phức hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc/axit formic 130/80/2 (v/v/v) theo tỉ lệ khối lượng/thể tích là 1/10 (w/v) thu được hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (2) dạng rắn vô định hình màu trắng; phân đoạn có kí hiệu W4.1 được hòa tan trong phức hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc/axit formic 80/80/2 (v/v/v) theo tỉ lệ khối

lượng/thể tích là 1/10 (w/v) thu được hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (1) dạng rắn vô định hình màu trắng; phân đoạn có kí hiệu W4.2 được hòa tan trong phức hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc/axit formic 80/80/3 (v/v/v) theo tỉ lệ khối lượng/thể tích là 1/10 (w/v) thu được hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (3) và (4) dạng rắn vô định hình màu trắng.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó các hợp chất carboxyethylflavanon thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm hợp chất có công thức (1), (2), (3) và công thức (4) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó dung môi hữu cơ để chiết bột lõi gỗ Sưa Đỏ được lựa chọn từ nhóm bao gồm axeton, metanol, etanol hoặc nước.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hệ dung môi rửa giải trong bước thu phân đoạn chứa các hợp chất carboxyethylflavanon thô là diclometan/metanol/nước (v/v/v) theo tỷ lệ metanol tăng dần từ 0 đến 100%.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó còn có bước tinh sạch các hợp chất carboxyethylflavanon bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi *n*-hexan/etyl axetat/axit formic để thu sản phẩm chứa các hợp chất carboxyethylflavanon tinh khiết trên 98%.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể.

Theo đó giải pháp hữu ích đề xuất quy trình tách và tinh chế các hợp chất carboxyethylflavanon từ lõi gỗ Sưa Đỏ nhiều năm tuổi của Việt Nam.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách và tinh chế các hợp chất carboxyethylflavanon từ lõi gỗ Sưa Đỏ, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột lõi gỗ Sưa Đỏ; c) thu phân đoạn chứa các hợp chất carboxyethylflavanon; d) chiết các hợp chất carboxyethylflavanon; e) thu các hợp chất carboxyethylflavanon thô; và f) tinh chế các hợp chất carboxyethylflavanon.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, thu thân và lấy lõi gỗ cây Sưa Đỏ, sau đó sấy khô (60 °C) đến khối lượng không đổi (3,7 kg) và xay nhỏ (đến kích thước 0,2 mm) để tạo ra bột lõi gỗ cây Sưa Đỏ.

Trong bước chiết bột lõi gỗ cây Sưa Đỏ, tiến hành chiết phân bột thu được ở trên bằng metanol ba lần ở nhiệt độ phòng (3 x 1,0 L). Sau khi chiết, phần dịch chiết được thu gom và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được phần cặn chiết (350 g) và phần bã còn lại được làm khô (3,3 kg). Chiết phần bã khô còn lại bằng Soxhlet ba lần với nước sôi (3 x 1,0 L), thu dịch chiết và cất loại bỏ nước dưới áp suất giảm để thu được phần cặn chiết (4,2 g).

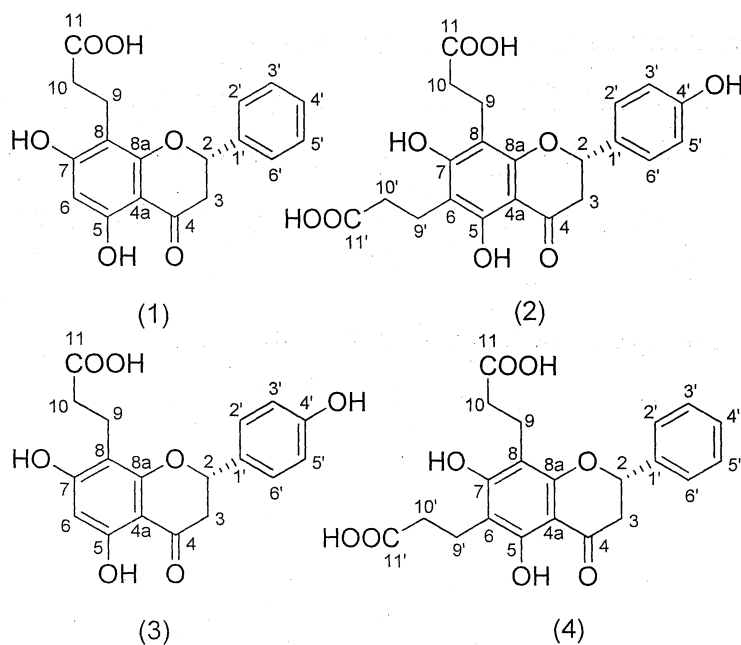
Trong bước thu phân đoạn chứa các hợp chất carboxyethylflavanon, phần cặn chiết thu được ở trên được đưa lên cột sắc ký (kích thước cột 2,5 x 50 cm) với chất hấp phụ là Diaion HP-20 (kích thước hạt 250 µm) và hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (v/v) theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 0, 25, 50, 75 và 100%. Sau khi cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, thu hai phân đoạn có tỷ lệ metanol là 25% và 75% chứa các hợp chất carboxyethylflavanon (cặn 25% và 75% metanol).

Trong bước chiết các hợp chất carboxyethylflavanon thô, phần cặn 25% metanol (450 mg) được đưa lên cột sắc ký (kích thước cột 1 x 40 cm) với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh theo tỷ lệ trọng lượng cặn 25% metanol/silicagel là 1:30 (w/w). Tiếp đó, tiến hành sắc ký với hệ dung môi rửa giải là diclometan/metanol/nước theo tỷ lệ 30/1/0,1 (v/v/v), thu phân đoạn có kí hiệu là W2.2 (25 mg). Tương tự, phần cặn 75% metanol (220 mg) được đưa lên cột sắc ký (kích thước cột 1 x 40 cm) với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh theo tỷ lệ trọng lượng cặn 75% metanol/silicagel là 1:30 (w/w). Tiếp đó, tiến hành sắc ký với hệ dung môi rửa giải là diclometan/metanol/nước theo tỷ lệ 30/1/0,1 (v/v/v), thu hai phân đoạn có kí hiệu là W4.1 (30 mg) và W4.2 (40 mg).

Trong bước tinh chế các hợp chất carboxyethylflavanon, phân đoạn có kí hiệu W2.2 (25 mg) được hòa tan trong phức hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc/axit formic

130/80/2 (v/v/v) theo tỉ lệ khối lượng/thể tích là 1/10 (w/v) thu được hợp chất carboxyethylflavanon dạng rắn vô định hình màu trắng có khối lượng 4,5 mg. Hợp chất này được xác định là có công thức (2). Phân đoạn có kí hiệu W4.1 (30 mg) được hòa tan trong phức hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc/axit formic 80/80/2 (v/v/v) theo tỉ lệ khối lượng/thể tích là 1/10 (w/v) thu được hợp chất carboxyethylflavanon dạng rắn vô định hình màu trắng có khối lượng 5,0 mg. Hợp chất này được xác định là có công thức (1). Phân đoạn có kí hiệu W4.2 (40 mg) được hòa tan trong phức hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc/axit formic 80/80/3 (v/v/v) theo tỉ lệ khối lượng/thể tích là 1/10 (w/v) thu được hai hợp chất carboxyethylflavanon đều ở dạng rắn vô định hình màu trắng lần lượt có khối lượng 4,0 mg và 5,0 mg. Hai hợp chất này được xác định là có công thức (3) và (4).

Các hợp chất carboxyethylflavanon thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm hợp chất có công thức (1), (2), (3) và công thức (4) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó các hợp chất carboxyethylflavanon còn được tinh sạch bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi *n*-hexan/etyl axetat/axit formic để thu sản phẩm chứa các hợp chất carboxyethylflavanon tinh khiết trên 98%.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Tách và tinh chế các hợp chất carboxyethylflavanon từ lõi gỗ Sưa Đỏ nhiều năm tuổi của Việt Nam.

Thu thân và lấy lõi gỗ Sưa Đỏ, sấy khô (60 °C) đến khối lượng không đổi và nghiền nhỏ thành bột (có kích thước 0,2 mm), tạo ra 3,7 kg bột. Phần bột này được chiết ba lần bằng dung môi metanol (3 x 1,0 L) ở nhiệt độ phòng, sau khi cô quay loại bỏ dung môi thu được cặn metanol (350 g) và phần bã còn lại được làm khô (3,3 kg). Phần bã này tiếp tục được chiết bằng Soxhlet ba lần với nước sôi (3 x 1,0 L). Sau khi cất loại bỏ nước, thu được 4,2 g phần cặn. Tiếp đó đưa phần cặn này lên cột sắc ký (có kích thước 2 x 50 cm) với chất hấp phụ là Diaion HP-20 (kích thước hạt 250 µm) và hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (v/v) theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 0, 25, 50, 75 và 100%, thu hai phân đoạn có tỷ lệ metanol 25% (450 mg) và 75% (220 mg). Phân đoạn 25% metanol (450 mg) được chiết trên cột sắc ký (kích thước cột 1 x 40 cm) với chất hấp phụ silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh, tỷ lệ nhồi cột 1:30 (w/w) với dung môi rửa giải là diclometan/metanol/nước theo tỷ lệ 30/1/0,1 (v/v/v), thu phân đoạn có kí hiệu là W2.2 (25 mg) giàu flavanon. Tương tự, phân đoạn 75% metanol (220 mg) được chiết trên cột sắc ký (kích thước cột 1 x 40 cm) với chất hấp phụ silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh, tỷ lệ nhồi cột 1:30 (w/w) với dung môi rửa giải là diclometan/metanol/nước theo tỷ lệ 30/1/0,1 (v/v/v), thu hai phân đoạn có kí hiệu là W4.1 (30 mg) và W4.2 (40 mg) giàu flavanon.

Phân đoạn có kí hiệu W2.2 (25 mg) được hòa tan trong phức hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc/axit formic (130/80/2, v/v/v) theo tỉ lệ khối lượng/thể tích là 1/10 (w/v) thu được hợp chất dạng rắn vô định hình màu trắng (4,5 mg) (hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (2)). Phân đoạn có kí hiệu W4.1 (30 mg) được hòa tan trong phức hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc/axit formic (80/80/2, v/v/v) theo tỉ lệ khối lượng/thể tích là 1/10 (w/v) thu được hợp chất dạng rắn vô định hình màu trắng (5,0 mg) (hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (1)). Phân đoạn có kí hiệu W4.2 (40 mg) được hòa tan trong phức hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc/axit formic (80/80/3, v/v/v) theo tỉ lệ khối lượng/thể tích là 1/10 (w/v) thu được hai hợp chất đều ở dạng rắn vô định hình màu trắng lần lượt có khối lượng là 4,0 mg và 5,0 mg (hai hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (3) và công thức (4)).

Ví dụ 2: Định tính và định lượng các hợp chất carboxyethylflavanon được phân lập và tinh chế từ lõi gỗ Sưa Đỏ nhiều năm tuổi của Việt Nam.

Phần chất rắn vô định hình màu trắng thu được ở Ví dụ 1 được xác định về mặt định tính và định lượng bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kết quả như sau:

Đặc tính của hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (1)

- Tên theo IUPAC: (2*S*)-8-carboxyethylpinocembrin.
- Mô tả: Chất rắn vô định hình màu trắng, tan tốt trong dung môi metanol. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel trắng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), dung môi triển khai là *n*-hexan/etyl axetat/axit formic = 80/120/2 (v/v/v); *R_f* = 0,40.
- CTPT: C₁₈H₁₆O₆ (M=328).
- Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS *m/z*: 327.0868 [M – H][–] (calcd for C₁₈H₁₅O₆: 327.0868).
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ_H (ppm): 5.47 (1H, dd, *J* = 13.0 và 3.0 Hz, H-2), 3.11 (1H, dd, *J* = 17.0 và 13.0 Hz, H-3_{ax}), 2.80 (1H, dd, *J* = 17.0 và 3.0 Hz, H-3_{eq}), 6.02 (1H, s, H-6), 7.52 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, H-2' và H-6'), 7.44 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, H-3' và H-5'), 7.39 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H-4'), 2.86 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, H-9), 2.49 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, H-10). ¹³C-NMR (125 MHz, methanol-*d*₄) δ_C (ppm): 80.5 (C-2), 44.3 (C-3), 197.5 (C-4), 103.3 (C-4a), 162.8 (C-5), 95.6 (C-6), 166.1 (C-7), 108.5 (C-8), 162.8 (C-8a), 18.7 (C-9), 34.1 (C-10), 177.7 (C-11), 140.5 (C-1'), 127.3 (C-2' và C-6'), 129.6 (C-4'), 129.7 (C-3' và C-5').
- Phổ hồng ngoại IR (KBr) cm^{–1}: 3354, 2947, 2835, 1710, 1637, 1610, 1452, 1022, 975, 689.
- Phổ tử ngoại UV λ_{max} (metanol) nm: 293.
- Phổ lưỡng sắc tròn CD (Circular dichroism): Δε₂₈₈ (nm) –10.43, Δε₃₃₀ (nm) +2.10.

Cấu trúc hóa học của hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (1) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hợp chất hóa học và không thấy có cấu trúc tương tự. Dữ liệu này khẳng định rằng hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (1) là hợp chất mới chưa từng được công bố trước đó.

Đặc tính của hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (2)

- Tên theo IUPAC: (2*S*)-6,8-dicarboxyethylnaringenin.

- Mô tả: Chất rắn vô định hình màu trắng, tan tốt trong dung môi metanol. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel trắng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), dung môi triển khai là *n*-hexan/etyl axetat/axit formic = 80/80/2 (v/v/v); *R_f* = 0,25.

- CTPT: C₂₁H₂₀O₉ (M=416).

- Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS *m/z*: 415.1014 [M – H][–] (calcd for C₂₁H₁₉O₉: 415.1024).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ_H (ppm): 5.39 (1H, dd, *J* = 13.0 và 3.0 Hz, H-2), 3.13 (1H, dd, *J* = 17.0 và 13.0 Hz, H-3_{ax}), 2.79 (1H, dd, *J* = 17.0 và 3.0 Hz, H-3_{eq}), 7.36 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2' và H-6'), 6.85 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3' và H-5'), 2.85 (2H, m, H-9), 2.55 (2H, m, H-10), 2.81 (2H, m, H-9'), 2.51 (2H, m, H-10'). ¹³C-NMR (125 MHz, methanol-*d*₄) δ_C (ppm): 80.3 (C-2), 44.0 (C-3), 198.6 (C-4), 103.4 (C-4a), 159.8 (C-5), 109.0 (C-6), 163.9 (C-7), 108.3 (C-8), 161.1 (C-8a), 18.8 (C-9), 34.4 (C-10), 179.1 (C-11), 19.4 (C-9'), 34.8 (C-10'), 179.2 (C-11'), 131.4 (C-1'), 128.8 (C-2' và C-6'), 158.9 (C-4'), 116.4 (C-3' và C-5').

- Phổ hồng ngoại IR (KBr) cm^{–1}: 3369, 2987, 2864, 1751, 1676, 1575, 1411, 1022, 894, 754, 696.

- Phổ tử ngoại UV $\lambda_{\max}$ (metanol) nm: 297.

- Phổ lưỡng sắc tròn CD (Circular dichroism): $\Delta\epsilon_{291}$ (nm) –8.29, $\Delta\epsilon_{330}$ (nm) + 2.05.

Cấu trúc hóa học của hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (2) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hợp chất hóa học và không thấy có cấu trúc tương tự. Dữ liệu này khẳng định rằng hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (2) là hợp chất mới chưa từng được công bố trước đó.

Đặc tính của hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (3)

- Tên theo IUPAC: (2*S*)-8-carboxyethylnaringenin.

- Mô tả: Chất rắn vô định hình màu trắng, tan tốt trong dung môi metanol. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel trắng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), dung môi triển khai là *n*-hexan/etyl axetat/axit formic = 80/120/2 (v/v/v); *R_f* = 0,35.

- CTPT: C₁₈H₁₆O₇ (M=344).

- Độ quay cực riêng $[\alpha]_D^{25}$ +37.0° (*c* = 0.53, MeOH)

- Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS *m/z*: 343.0815 [M – H][–] (calcd for C₁₈H₁₅O₇: 343.0817).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, methanol- d_4) δ_{H} (ppm): 5.34 (1H, dd, $J = 13.0$ và 2.5 Hz, H-2), 3.14 (1H, dd, $J = 17.0$ và 13.0 Hz, H-3_{ax}), 2.72 (1H, dd, $J = 17.0$ và 2.5 Hz, H-3_{eq}), 5.97 (1H, s, H-6), 7.33 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2' và H-6'), 6.84 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3' và H-5'), 2.84 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-9), 2.48 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-10). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, methanol- d_4) δ_{C} (ppm): 80.5 (C-2), 44.1 (C-3), 198.0 (C-4), 103.2 (C-4a), 162.9 (C-5), 95.7 (C-6), 166.3 (C-7), 108.6 (C-8), 162.7 (C-8a), 18.8 (C-9), 34.6 (C-10), 177.9 (C-11), 131.2 (C-1'), 129.0 (C-2' và C-6'), 159.0 (C-4'), 116.3 (C-3' và C-5').

- Phổ hồng ngoại IR (KBr) cm^{-1} : 3356, 3089, 2924, 2852, 1737, 1477, 1377, 1215, 1035, 759, 675, 428.

- Phổ tử ngoại UV λ_{max} (metanol) nm: 294.

- Phổ lưỡng sắc tròn CD (Circular dichroism): $\Delta\epsilon_{293}$ (nm) -0.71 , $\Delta\epsilon_{337}$ (nm) $+0.19$.

Cấu trúc hóa học của hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (3) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hợp chất hóa học và không thấy có cấu trúc tương tự. Dữ liệu này khẳng định rằng hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (3) là hợp chất mới chưa từng được công bố trước đó.

Đặc tính của hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (4)

- Tên theo IUPAC: (2*S*)-6,8-dicarboxyethylpinocembrin.

- Mô tả: Chất rắn vô định hình màu trắng, tan tốt trong dung môi metanol. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel tráng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), dung môi triển khai là *n*-hexan/etyl axetat/axit formic = 80/80/2 (v/v/v); $R_f = 0,30$.

- CTPT: $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_8$ ($M=400$).

- Độ quay cực riêng $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +45.0^\circ$ ($c = 0.22$, MeOH)

- Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS m/z : 399.1080 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_8$: 399.1079).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, methanol- d_4) δ_{H} (ppm): 5.50 (1H, dd, $J = 13.0$ và 3.0 Hz, H-2), 3.11 (1H, dd, $J = 17.0$ và 13.0 Hz, H-3_{ax}), 2.84 (1H, dd, $J = 17.0$ và 3.0 Hz, H-3_{eq}), 7.54 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-2' và H-6'), 7.44 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-3' và H-5'), 7.39 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-4'), 2.88 (4H, m, H-9 và H-9'), 2.54 (4H, m, H-10 và H-10'). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, methanol- d_4) δ_{C} (ppm): 80.2 (C-2), 44.2 (C-3), 198.1 (C-4), 103.5 (C-4a), 159.9 (C-5), 109.1 (C-6), 163.9 (C-7), 108.3 (C-8),

161.1 (C-8a), 19.5 (C-9), 34.7 (C-10), 178.7 (C-11), 18.8 (C-9'), 34.3 (C-10'), 178.5 (C-11'), 140.6 (C-1'), 127.2 (C-2' và C-6'), 129.5 (C-4'), 129.7 (C-3' và C-5').

- Phổ hồng ngoại IR (KBr) cm^{-1} : 3370, 2931, 1721, 1585, 1444, 1382, 1216, 1090, 899, 693.

- Phổ tử ngoại UV λ_{max} (metanol) nm: 296.

- Phổ lưỡng sắc tròn CD (Circular dichroism): $\Delta\epsilon_{290}$ (nm) -8.21 , $\Delta\epsilon_{339}$ (nm) $+0.83$.

Cấu trúc hóa học của hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (4) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hợp chất hóa học và không thấy có cấu trúc tương tự. Dữ liệu này khẳng định rằng hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (4) là hợp chất mới chưa từng được công bố trước đó.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép tách và tinh chế được các hợp chất carboxyethylflavanon từ lõi gỗ cây Sưa Đỏ nhiều năm tuổi của Việt Nam có công thức (1), (2), (3) và (4). Đây là bốn hợp chất mới và phương pháp này cho phép chiết được các hợp chất carboxyethylflavanon sạch trên 98%.

Quy trình theo giải pháp đơn giản, có khả năng tách được các hợp chất carboxyethylflavanon bằng các dung môi thông dụng, không gây độc và có khả năng tách đặc hiệu các hợp chất carboxyethylflavanon.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tách và tinh chế các hợp chất carboxyethylflavanon từ lõi gỗ cây Sưa Đỏ (*Dalbergia tonkinensis*) nhiều năm tuổi của Việt Nam, quy trình này bao gồm các bước:

a) thu thân và lấy lõi gỗ cây Sưa Đỏ, sau đó sấy khô đến khối lượng không đổi và xay nhỏ để tạo ra được bột lõi gỗ cây Sưa Đỏ;

b) chiết bột lõi gỗ cây Sưa Đỏ bằng cách chiết phân bột thu được ở bước a) bằng metanol ba lần ở nhiệt độ phòng, sau đó thu dịch chiết, cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được phần cặn chiết và phần bã được làm khô sau khi chiết;

c) chiết phần bã khô bằng cách chiết phần bã khô thu được ở bước b) bằng Soxhlet ba lần với nước sôi, sau đó thu dịch chiết và cất loại bỏ nước dưới áp suất giảm để thu được phần cặn chiết;

d) thu phân đoạn chứa các hợp chất carboxyethylflavanon bằng cách đưa phân đoạn chứa cặn chiết thu được ở bước c) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Diaion HP-20 và hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (v/v) theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 0, 25, 50, 75 và 100% thu hai phân đoạn có tỷ lệ metanol là 25% và 75%;

e) thu các hợp chất carboxyethylflavanon thô bằng cách đưa phân đoạn có tỷ lệ metanol 25% thu được ở bước d) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh với hệ dung môi rửa giải là diclometan/metanol/nước theo tỷ lệ 30/1/0,1 (v/v/v) thu phân đoạn có kí hiệu là W2.2; phân đoạn có tỷ lệ metanol 75% thu được ở bước d) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh với hệ dung môi rửa giải là diclometan/metanol/nước theo tỷ lệ 30/1/0,1 (v/v/v) thu hai phân đoạn có kí hiệu là W4.1 và W4.2; và

f) tinh chế các hợp chất carboxyethylflavanon bằng cách hòa tan phân đoạn có kí hiệu W2.2 trong phức hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc/axit formic (130/80/2, v/v/v) theo tỉ lệ khối lượng/thể tích là 1/10 (w/v) thu được hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (2) dạng rắn vô định hình màu trắng; phân đoạn có kí hiệu W4.1 được hòa tan trong phức hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc/axit formic (80/80/2, v/v/v) theo tỉ lệ khối lượng/thể tích là 1/10 (w/v) thu được hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (1) dạng rắn vô định hình màu trắng; phân đoạn có kí hiệu W4.2 được hòa tan trong phức hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc/axit formic (80/80/3, v/v/v) theo tỉ lệ khối lượng/thể tích

là 1/10 (w/v) thu được hợp chất carboxyethylflavanon có công thức (3) và (4) dạng rắn vô định hình màu trắng.

