



(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)



2-0002991

(51) **C07H 17/07; A01H 3/04**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00163

(22) 27/04/2020

(45) 25/10/2022 415

(43) 27/07/2020 388AHI

(73) Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Nhà A18, số 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà
Nội

(72) Nguyễn Thị Thu Hà (VN); Nguyễn Văn Tuyên (VN); Ninh Thế Sơn (VN); Nguyễn
Thanh Trà (VN); Lê Thị Tú Anh (VN).

(54) QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT HỖN HỢP CHỨA HOẠT CHẤT ISODIOSPYRIN VÀ 8'-
HYDROXYISODIOSPYRIN TỪ LÁ CÂY THỊ ĐÀI LÁ RỘNG (DIOSPYROS
FLEURYANA)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách chiết hỗn hợp chứa hợp chất isodiospyrin
và 8'-hydroxyisodiospyrin từ lá cây Thị đài lá rộng (*Diospyros fleuryana*).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ thực vật. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách chiết hỗn hợp giàu hai hoạt chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin từ lá cây Thị đài lá rộng (*Diospyros fleuryana*) thuộc chi thị (*Diospyros*), họ thị (Ebenaceae). Hỗn hợp theo giải pháp hữu ích chứa hai hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin có hoạt tính kháng một số chủng vi sinh vật kiểm định gây bệnh trên người.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây Thị đài lá rộng có tên khoa học *Diospyros fleuryana*, thuộc chi Thị (*Diospyros*), họ Thị (Ebenaceae). Loài này được 2 nhà khoa học A. Chev. và Lecomte mô tả khoa học đầu tiên năm 1930. Theo tác giả Phạm Hoàng Hộ, cây Thị đài lá rộng là cây đại mộc cao 15 m; vỏ đỏ trở nâu đen; nhánh xám sậm, vàng lúc non. Phiến lá bầu dục hay tròn dài, không lông, dày như da cứng, gân-phụ nhiều, gân tam cấp thành mạng rõ; cuống to, có đốt ở đáy. Hoa đực, hoa cái 4-5 phân; lá đài gần như xoan tròn cao đến 1cm; tiểu nhụy lép 7-8. Trái xoan tròn, vàng có lông mịn, to đến 4,5 x 3 cm, trên cọng ngắn; hạt 4-5. Gỗ vàng. Cây sống trong rừng, ở độ cao 700-1500 m, phân bố khá rộng rãi từ Thanh Hóa vào đến Nha Trang, Tây Ninh. Cho đến nay, có rất ít các nghiên cứu về cây Thị đài lá rộng ở nước ta cũng như trên thế giới. Tuy nhiên các loài khác trong chi này đã được nghiên cứu khá nhiều.

Chi Thị là một trong những chi lớn nhất của họ Thị (Ebenaceae), gồm khoảng 475 loài phân bố ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới trên cả hai bán cầu. Ở châu Á có khoảng 200 loài. Việc sử dụng rộng rãi trong Y học cổ truyền để điều trị nhiều loại bệnh cho thấy sự phong phú các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học của chi Thị. Các loài thuộc chi *Diospyros* được biết đến với cây lấy gỗ quý như *D. mun*, cây ăn quả như loài *D. kaki*, *D. kirkii* và một số được sử dụng trong y học cổ truyền. Loài *D. lycioides* được dùng để chữa bệnh nhiễm trùng răng miệng, *D. maritima* against

dùng trị bệnh thấp khớp, *D. kirki* chống dùng chữa sốt và bệnh lậu, *D. usambarensis* làm thuốc giải độc nọc rắn. Ở Tanzania, nước sắc từ rễ loài *D. fischeri* chữa đau bụng và ho khan. Rễ và lá của loài *D. usambarensis* sử dụng để điều trị bệnh đau dạ dày, táo bón, phát ban, sa tử cung, động kinh, sốt rét, sỏi, vô sinh, và đau khớp. Loài *D. verrucosifera* điều trị rối loạn tâm thần và quả của nó có tác dụng chống suy nhược (Chhabra et al., *J. Ethnopharmacol*, 25, pp. 339-359, 1989).

Việc đánh giá tổng hợp về thành phần hóa học của các loài thực vật thuộc chi *Diospyros* được thực hiện bởi tác giả Mallavadhani và cộng sự vào năm 1998. Cho tới nay thống kê có khoảng 100/475 loài của chi này được nghiên cứu về thành phần hóa học. Các báo cáo đã chỉ ra sự có mặt của các lớp chất như naphthoquinon, naphthol, phenol, triterpenoid, và coumarin ... với nhiều hoạt tính rất đáng quan tâm, đặc biệt là hoạt tính chống ung thư và kháng vi sinh vật (B. N. Sinha et al., *Journal of Natural Remedies*, 8(1), pp. 11 – 17, 2008; M. Maridass, *Ethnobotanical Leaflets*, 12, pp. 231-244, 2008).

Từ loài *D. quercina* thu hái ở Madagascar, các nhà khoa học đã phân lập được 3 hợp chất có tên là 1,4'-dihydroxy-2,3'-dimethyl-1,2'-binaphthyl-5,5',8,8'-tetraon, 6'-ethoxy-1',3'-dihydroxy-4,6 dimethyl-1,2'-binaphthyl-2,5',8,8'-tetraon và (*E*)-5,6-dimethyl-2-(2-methyl-3-(prop-1-enyl)phenyl)-2*H*-chrome. Cả 3 hợp chất này đều thể hiện hoạt tính gây độc với dòng tế bào ung thư máu lympho P-388 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 0,0175 ± 0,0060 µg/ml, 0,089 ± 0,005 µg/ml và 1,027 ± 0,070 µg/ml (Fatiany P.R et al., *Asian Pac J. Trop Biomed*, 4(3), pp. 169-175, 2014).

Từ thân và rễ loài *D. shimbaensis*, đã phân lập được 1 hợp chất naphthoquinon mới là 8,8-oxo-biplumbagin và 4 hợp chất đã biết là *trans*-isoshinanolon, *cis*-isoshinanolon, plumbagin và 3,3'-biplumbagin. Các hợp chất này thể hiện hoạt tính trên dòng tế bào ung thư vú MDA-MB-231 với giá trị IC₅₀ từ 82,1-520 µM (Per Aronsson et al., *Diseases*, 4(3), pp. 1-9, 2006).

Bốn flavonoid (kaempferol-3-*O*-β-D-glucoside, quercetin-3-*O*-β-D-glucoside, kaempferol, quercetin) và ba triterpen (axit ursolic, 3,19,24-trihydroxyurs-12-en và 3,19,24-trihydroxy-15-oxo-urs-12-en) được phân lập từ loài *D. kaki* thu hái ở Ai Cập, trong đó chất 3,19,24-trihydroxyurs-12-en và 3,19,24-trihydroxy-15-oxo-urs-12-en thể hiện hoạt tính gây độc với ba dòng tế bào là ung thư cổ tử cung (HELA), ung thư vú (

MCF7) và ung thư ruột kết (HCT116) với giá trị IC_{50} trong khoảng từ 13,42-19,06 $\mu\text{g/ml}$ (Ola A.S et al., *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(1), pp. 231-234, 2014).

Một hợp chất naphthoquinon epoxide là diosquinon đã được phân lập từ rễ của 2 loài *D. mespiliformis* (Hostch) và *D. tricolor*. Hợp chất này thể hiện hoạt tính đối với cả 10 dòng tế bào ung thư bao gồm: ung thư vú BC-1, ung thư phổi Lu-1, ung thư tiền liệt tuyến LNCaP, ung thư ruột kết COL-2, ung thư biểu mô KB, u nguyên bào thần kinh SKNSH, u não U373, ung thư xương HT-1080 và 2 dòng ung thư kháng Vinblastine với giá trị ED_{50} nằm trong khoảng 0,18-4,5 $\mu\text{g/ml}$ (B. A. Adeniyi et al., *Phytotherapy Research*, 17, pp. 282-284, 2003).

Loài *D. cuneata* lần đầu tiên được nghiên cứu về thành phần hóa học bởi tác giả Quintal và cộng sự năm 2013. Bảy hợp chất là plumbagin, elliptinon, lupeol, atraric acid methyl este, maritinon, betulin và betulinaldehyt được phân lập từ vỏ thân của cây, trong đó plumbagin thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh trên dòng tế bào KB với giá trị $CC_{50} = 3,56 \mu\text{g/ml}$, hợp chất maritinon có hoạt tính trên 3 dòng tế bào là ung thư gan Hep-G2, ung thư cổ tử cung Hela và ung thư biểu mô KB với giá trị CC_{50} lần lượt là 17,30 $\mu\text{g/ml}$, 21,10 $\mu\text{g/ml}$ và 20,30 $\mu\text{g/ml}$ (Quintal N.C et al., *Natural Product Research*, 27(17), pp. 1594-1597, 2013).

Từ dịch chiết MeOH của cây *D. lotus*, Menichini và đồng nghiệp đã phân lập được 8 hợp chất axit gallic, methyl gallat, axit ellagic, kaempferol, quercetin, myricetin, myricetin-3-O- β -glucuronide và myricetin-3-O- α -rhamnoside. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào đối 8 dòng tế bào ung thư bao gồm ung thư phổi (COR-L23, A549), ung thư da (A375,C32), ung thư ruột kết (CaCo-2), ung thư thận (ACHN), ung thư vú (MCF-7), ung thư tiền liệt tuyến (LNCaP), cho thấy tất cả 8 hợp chất đều có hoạt tính với các dòng tế bào ung thử nghiệm, trong đó hợp chất quercetin có hoạt tính với cả 8 dòng tế bào ung thư với giá trị IC_{50} từ 0,3-22,1 $\mu\text{g/ml}$, hợp chất kampferol có hoạt tính đối với 7 dòng tế bào ung thư với giá trị IC_{50} từ 2,7-42,8 $\mu\text{g/ml}$ và myricetin có hoạt tính đối với 7 dòng tế bào ung thư với giá trị IC_{50} từ 0,5-4,6 $\mu\text{g/ml}$ (Monica R.L et al., *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, pp. 264-270, 2009).

Ngoài ra, từ vỏ thân của loài *D. anisandra*, các nhà khoa học Mexico đã phân lập được 8 hợp chất naphthoquinon là plumbagin, droseron, cis-isoshinanolon, 3,3'-

biplumbagin, maritinon, ellipti-non, chitranon và zeylanon epoxide. Kết quả thử hoạt tính cho thấy các hợp chất thể hiện hoạt tính kháng lao đối với vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* (S-MTB) và vi khuẩn lao kháng thuốc MDR-MTB với giá trị MIC nằm trong khoảng từ 1,56-3,13 $\mu\text{g/ml}$. Đặc biệt là 2 hợp chất maritinon và 3,3'-biplumbagin không độc với tế bào thận khi Vero lành tính (Andrés H.U.C et al., *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, pp.1-7, 2013).

Ở nước ta chi *Diospyros* đã thống kê được 70 loài và nhiều loài đã biết công dụng chủ yếu dựa vào kinh nghiệm dân gian. Những nghiên cứu về các loài thuộc chi *Diospyros* đến nay rất ít. Đã có một số công trình nghiên cứu sơ bộ về thành phần hóa học và hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của lá cây hồng (*D. kaki*) và lá cây thị (*D. decandra*) của Việt Nam. Kết quả cho thấy cận chiết của các loài này có tác dụng tốt trên một số chủng vi khuẩn Gram (+) và Gram (-) (Bạc Cẩm My, Khóa luận tốt nghiệp dược sỹ, *Đại học Dược Hà Nội*, 2014; Đinh Thị Xuân, Khóa luận tốt nghiệp dược sỹ, *Đại học Dược Hà Nội*, 2014).

Tuy đã có các công trình nghiên cứu về một số loài của chi *Diospyros* ở cả trong và ngoài nước, nhưng cho đến nay chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của cây Thị đài lá rộng *Diospyros fleuryana* mọc ở Việt Nam và thế giới; cũng chưa có công bố cụ thể nào về quy trình tách chiết của hỗn hợp chứa hoạt chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin có hoạt tính kháng các chủng vi sinh vật kiểm gây bệnh trên người từ lá cây Thị đài lá rộng.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình tách chiết hỗn hợp chứa hai hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin từ lá cây Thị đài lá rộng, với hàm lượng hai hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin khoảng 60%. Hỗn hợp này chứa hai hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 2 chủng gram (+) *Staphylococcus aureu* ATCC 13709, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 và 1 chủng gram (-) là *Escherichia coli* ATCC 25922.

Cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình tách chiết hỗn hợp chứa hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin từ lá cây Thị đài lá rộng (*Diospyros fleuryana*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

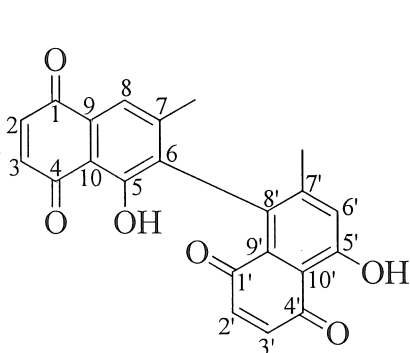
i) phơi lá cây Thị đài lá rộng trong bóng mát để khô tự nhiên; mẫu được xay nhỏ ngâm chiết với ethyl axetat (EtOAc) bằng siêu âm trong 45 phút ở 45°C/3 lần; lọc lấy phần dịch và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn EtOAc;

ii) sắc ký cột silica gel cặn chiết etylaxetat thu được ở bước (i) với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỉ lệ thể tích 100/0; 90/10; 80/20; 70/30; 50/50; 40/60; 20/80 và 0/100; thu được 8 phân đoạn ký hiệu từ F1 đến F8;

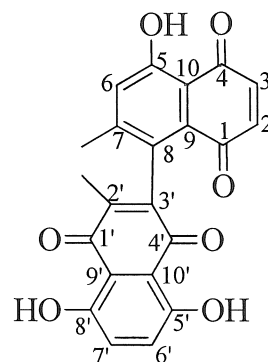
iii) hòa tan phân đoạn F3 thu được ở bước (ii) trong dung môi diclometan thu được 2 phần là phần tan (F3.1) và phần không tan (F3.2); cô khô phần F3.1;

iv) tinh chế phần F3.1 thu được ở bước (iii) bằng cột Sephadex với dung môi MeOH/CH₂Cl₂ tỉ lệ 9/1, thu được 3 phân đoạn nhỏ kí hiệu F3.1.1 đến F3.1.3; trong đó phân đoạn F3.1.2 chứa hỗn hợp hai chất là isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin dưới dạng chất rắn màu vàng;

Công thức của hai hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin là như sau:



isodiospyrin (1)



8'-hydroxyisodiospyrin (2)

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Quy trình tách chiết hỗn hợp giàu hợp chất isodiospyrin (1) và 8'-hydroxyisodiospyrin (2) từ lá cây Thị đài lá rộng (*Diospyros fleuryana*).

Hình 2: Thể hiện dữ liệu phổ NMR của hợp chất isodiospyrin (1) và 8'-hydroxyisodiospyrin (2).

Hình 3: Mô tả một số hợp chất flavonoid và triterpenoid phân lập từ lá cây Thị đài lá rộng (*Diospyros fleuryana*).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách chiết hỗn hợp chứa hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin từ lá cây Thị đài lá rộng (*Diospyros fleuryana*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) phơi lá cây Thị đài lá rộng trong bóng mát đến khô, mẫu được xay nhỏ ngâm chiết với dung môi EtOAc bằng siêu âm theo tỉ lệ 1/3 (trọng lượng/thể tích) trong 40 phút ở 45°C, ngâm chiết lặp lại 3 lần, sau đó lọc lấy phần dịch. Phần dịch chiết được cô chân không dưới điều kiện áp suất giảm để loại hoàn toàn dung môi và thu được cặn chiết EtOAc.

ii) chạy sắc ký cột silica gel cặn chiết EtOAc thu được ở bước (i) nêu trên với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton gradient theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/0; 90/10; 80/20; 70/30; 50/50; 40/60; 20/80 và 0/100 thu được 8 phân đoạn ký hiệu từ F1 đến F8 (bảng 1).

Bảng 1: Các phân đoạn của cột cặn etyl axetat

STT	Phân đoạn	Tỉ lệ thể tích hệ dung môi (theo thể tích)
1	F1	<i>n</i> -hexan/axeton 100/0
2	F2	<i>n</i> -hexan/axeton 90/10
3	F3	<i>n</i> -hexan/axeton 80/20
4	F4	<i>n</i> -hexan/axeton 70/30
5	F5	<i>n</i> -hexan/axeton 50/50
6	F6	<i>n</i> -hexan/axeton 40/60
7	F7	<i>n</i> -hexan/axeton 20/80
8	F8	<i>n</i> -hexan/axeton 0/100

iii) cô khô phân đoạn F3 thu được ở bước (ii) rồi hòa tan lại trong dung môi diclometan theo tỉ lệ 1:1 (theo thể tích); thu được 2 phần là phần tan (F3.1) và phần không tan (F3.2); cô khô phần F3.1;

iv) tinh chế phần F3.1 thu được ở bước (iii) bằng cột Sephadex với dung môi MeOH/CH₂Cl₂ tỉ lệ 9/1, thu được 3 phân đoạn nhỏ kí hiệu F3.1.1 đến F3.1.3; trong đó phân đoạn F3.1.2 chứa hỗn hợp dưới dạng chất rắn màu vàng;

v) tinh chế phân đoạn F3.1.2 thu được ở bước (iv) bằng sắc kí bản mỏng điều chế với hệ dung môi *n*-hexan/axeton tỉ lệ 8/2, thu được 2 hợp chất: hợp chất 1 màu vàng cam (5 mg) và hợp chất 2 (6 mg) màu đỏ cam; các hợp chất được xác định là isodiospyrin (1) và 8'-hydroxyisodiospyrin (2) bằng các phương pháp phổ NMR và phổ khối lượng MS với hàm lượng lớn hơn 60% tính theo tổng hàm lượng của hỗn hợp.

Hỗn hợp chứa 2 hoạt chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin được đánh giá khả năng kháng các chủng vi sinh vật kiểm định gram (+) và gram (-) đại diện gây bệnh trên người. Kết quả cho thấy hỗn hợp này có hoạt tính kháng các chủng vi sinh vật gram (+) là *S. aureu* và *B. subtilis* mạnh với giá trị MIC lần lượt là 32 µg/ml và 64 µg/ml; kháng chủng vi sinh vật gram (-) là *E. coli* với giá trị MIC là 128 µg/ml; không có hoạt tính trên chủng *P. aeruginosa* với giá trị MIC > 256 µg/ml. Hợp chất isodiospyrin (1) thể hiện hoạt tính kháng các chủng vi sinh vật gram (+) *S. aureu* và *B. subtilis* tốt nhất với giá trị MIC lần lượt là 16 µg/ml và 32 µg/ml; kháng các chủng vi sinh vật gram (-) là *E. coli* và *P. aeruginosa* với giá trị MIC lần lượt là 32 µg/ml và 64 µg/ml. Hợp chất 8'-hydroxyisodiospyrin (2) có hoạt tính kháng chủng *S. aureu* mạnh với giá trị MIC là 32 µg/ml; kháng chủng *B. subtilis* với giá trị MIC là 64 µg/ml; kháng chủng *E. coli* với giá trị MIC là 128 µg/ml; không kháng chủng *P. aeruginosa* với giá trị MIC > 128 µg/ml. Hỗn hợp chứa isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin và các hợp chất isodiospyrin (1) và 8'-hydroxyisodiospyrin (2) phân lập từ hỗn hợp trên đều không thể hiện hoạt tính trên chủng nấm *C. albicans*.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được minh họa bằng các ví dụ cụ thể, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích làm rõ, nhưng không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của giải pháp này.

Các ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích tiến hành đo điểm nóng chảy bằng máy đo điểm nóng chảy hiệu Boetius. Phổ khối phun mù electron (ESI-MS) được đo trên máy ghi phổ khối Agilent 1100. Các phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được ghi trên máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân hiệu Bruker Avance 500 MHz với TMS là chất chuẩn nội. Sắc ký cột được thực hiện trên chất mang là silicagel (hệ dung môi rửa giải với độ phân cực tăng dần) và sephadex LH-20. Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng silicagel Merck 60 F254, dày 0,25 mm.

Các chủng vi sinh vật và nấm tiêu biểu bao gồm : vi khuẩn gram (+) *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709); vi khuẩn gram (-) *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442); nấm men *Candida albicans* (ATCC 10231), được cung cấp bởi Bảo tàng giống chuẩn Hoa kỳ ATCC (American Type Culture Collection).

Các hóa chất được sử dụng trong các ví dụ gồm: MHB (Mueller-Hinton Broth), MHA (Mueller-Hinton Agar); TSB (Tryptic Soy Broth); TSA (Tryptic Soy Agar) cho vi khuẩn; và SA (Sabourand- 4% dextrose agar) cho nấm. Kháng sinh tham chiếu Ampicillin và Cefotaxim do hãng Sigma cung cấp. Độ hấp thụ quang (OD) được đo trên máy quang phổ Biotech ở bước sóng 595 nm.

Ví dụ 1 : Quy trình tách chiết hỗn hợp chứa hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin từ lá cây Thị đài lá rộng (*Diospyros fleuryana*).

i) phơi khô lá cây Thị đài lá rộng (3.5 kg) trong bóng mát để khô tự nhiên; mẫu được xay nhỏ (1.16 kg) ngâm chiết với ethyl axetat (EtOAc) bằng siêu âm trong 45 phút ở 45°C/3 lần; lọc lấy phần dịch và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn EtOAc (155 g);

ii) chạy sắc ký cột silica gel cặn chiết EtOAc với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton gradient theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/0; 90/10; 80/20; 70/30; 50/50; 40/60; 20/80 và 0/100 thu được 8 phân đoạn ký hiệu từ F1 đến F8 (bảng 2).

Bảng 2: Các phân đoạn của cột cặn etyl axetat

STT	Phân đoạn	Tỷ lệ thể tích hệ dung môi (theo thể tích)	Khối lượng các phân đoạn (g)
1	F1	<i>n</i> -hexan/axeton 100/0	27
2	F2	<i>n</i> -hexan/axeton 90/10	21
3	F3	<i>n</i> -hexan/axeton 80/20	13
4	F4	<i>n</i> -hexan/axeton 70/30	19
5	F5	<i>n</i> -hexan/axeton 50/50	21
6	F6	<i>n</i> -hexan/axeton 40/60	18
7	F7	<i>n</i> -hexan/axeton 20/80	16
8	F8	<i>n</i> -hexan/axeton 0/100	25

i) hòa tan phân đoạn F3 (1.5 g) trong dung môi diclometan thu được 2 phần là phân tan F3.1 (150 mg) và phần không tan F3.2; cô khô phần F3.1;

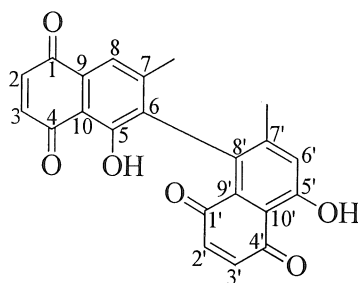
ii) tinh chế phần F3.1 bằng cột Sephadex với dung môi MeOH/CH₂Cl₂ tỉ lệ 9/1, thu được 3 phân đoạn nhỏ kí hiệu F3.1.1 đến F3.1.3; trong đó phân đoạn F3.1.2 (20 mg) dưới dạng chất rắn màu vàng;

Hỗn hợp được phân tích thành phần hóa học, kết quả cho thấy hỗn hợp chứa hai hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin từ lá cây Thị đài lá rộng với hàm lượng lớn hơn 60% tính theo tổng hàm lượng của hỗn hợp.

Ví dụ 2. Phân lập hai hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin từ hỗn hợp thu được.

Lấy 20 mg hỗn hợp thu được ở trên để thực hiện phân tách trên bản mỏng điều chế TLC, sử dụng hệ dung môi *n*-hexan/axeton tỉ lệ 8/2, thu được 5 mg hợp chất (1) dưới dạng chất rắn màu vàng cam và 6 mg hợp chất (2) dưới dạng chất rắn màu đỏ cam. Các hợp chất được xác định bằng các phương pháp phổ NMR 1 chiều, 2 chiều và phổ khối lượng MS. Hợp chất (1) được xác định là 5-hydroxy-6-(4-hydroxy-2-methyl-5,8-dioxonaphthalen-1-yl)-7-methylnaphthalene-1,4-dione, còn gọi là isodiospyrin, có điểm nóng chảy 226-228°C. Hợp chất (2) được xác định là 4,5',8'-trihydroxy-2,3'-dimethyl[1,2'-binaphthalene]-1',4',5,8-tetrone, còn gọi là 8'-hydroxyisodiospyrin, có điểm nóng chảy 275-277°C. Cấu trúc hóa học của các hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ NMR 1D và 2D, phổ khối lượng ESI-MS, phổ hồng ngoại.

- Hợp chất 1: isodiospyrin

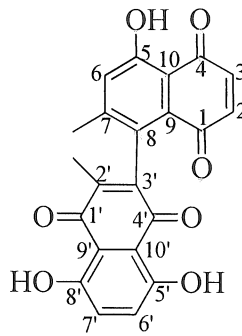


isodiospyrin (1)

CTPT: C₂₂H₁₄O₆

ESI-MS *m/z*: 375 [M+ H]⁺

- Hợp chất 2: 8'-hydroxyisodiospyrin



8'-hydroxyisodiospyrin (2)

CTPT: $C_{22}H_{14}O_7$

ESI-MS m/z : 391 $[M+H]^+$

Ví dụ 3: Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của hỗn hợp chứa hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin và các hợp chất isodiospyrin, 8'-hydroxyisodiospyrin được tinh sạch.

Nguyên lý của phương pháp:

Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua độ đục của môi trường nuôi cấy. Giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (Minimum Inhibitor Concentration - nồng độ ức chế tối thiểu).

Quy trình thí nghiệm:

- Pha loãng mẫu thử: Mẫu ban đầu được pha loãng 2 bước trong DMSO 100% và nước cất tiệt trùng thành một dãy 5-10 nồng độ. Nồng độ thử cao nhất trong thử nghiệm là 256 $\mu\text{g/ml}$ đối với hỗn hợp và 128 $\mu\text{g/ml}$ đối với chất sạch; Kháng sinh tham chiếu với các chủng gram (+) là Ampicillin, với các chủng gram (-) là Cefotaxime, với chủng nấm là Nystatin

- Vi sinh vật kiểm định được lưu giữ ở -80°C . Trước khi thí nghiệm, vi sinh vật kiểm định được hoạt hóa bằng môi trường nuôi cấy sao cho nồng độ vi khuẩn đạt 5×10^5 CFU/ml;

- Lấy 10 μl dung dịch mẫu thử ở các nồng độ vào đĩa 96 giếng, thêm 190 μl dung dịch vi khuẩn và nấm đã được hoạt hóa ở trên, ủ ở 37°C / 18-24h. Giếng đối chứng dương bao gồm vi sinh vật nuôi trong môi trường phù hợp, giếng đối chứng âm chỉ có môi trường nuôi cấy.

Xử lý kết quả

- Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật. Giếng này có OD ngang bằng với giếng đối chứng âm. Đánh giá hoạt tính: mẫu hỗn hợp có MIC \leq 200 $\mu\text{g/ml}$; chất sạch có MIC \leq 50 $\mu\text{g/ml}$.

Kết quả đánh giá khả năng kháng các chủng vi sinh vật và nấm kiểm định đại diện gây bệnh trên người cho thấy, hỗn hợp này có hoạt tính kháng các chủng *S. aureu* và *B. subtilis* mạnh với giá trị MIC lần lượt là 32 $\mu\text{g/ml}$ và 64 $\mu\text{g/ml}$; hoạt tính kháng chủng *E. coli* với giá trị MIC là 128 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất isodiospyrin có hoạt tính kháng các chủng vi sinh vật mạnh nhất với giá trị MIC lần lượt là 16 $\mu\text{g/ml}$ và 32 $\mu\text{g/ml}$ trên chủng *S. aureu* và *B. subtilis*, có hoạt tính kháng chủng *E. coli* với giá trị MIC là 32 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất 8'-hydroxyisodiospyrin có hoạt tính kháng chủng *S. aureu* mạnh với giá trị MIC là 32 $\mu\text{g/ml}$ (bảng 3).

Bảng 3: Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật và nấm kiểm định của hỗn hợp và các hoạt chất isodiospyrin (1) và 8'-hydroxyisodiospyrin (2)

TT	Tên chất	Giá trị MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
		Chủng vi khuẩn gram (+)		Chủng vi khuẩn gram (-)		Nấm men
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albical</i>
1	Hỗn hợp theo sáng chế	32	64	128	>256	>256
2	Isodiospyrin (1)	16	32	32	64	>128
3	8'-hydroxyisodiospyrin (2)	32	64	128	>128	>128
4	Ampicillin	0,5	2			
5	Cefotaxime			2	8	
6	Nystatin					4

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích đã thu nhận được hỗn hợp giàu hai hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin từ lá cây Thị đài lá rộng (*Diospyros fleuryana*). Quy trình được thực hiện đơn giản và hiệu quả nhằm thu được hỗn hợp giàu hai hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin với hàm lượng lớn hơn 60% tính theo tổng hàm lượng của hỗn hợp thu được. Hỗn hợp theo giải pháp hữu ích chứa hai hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 2 chủng gram (+) *Staphylococcus aureu* ATCC 13709, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 và 1 chủng gram (-) là *Escherichia coli* ATCC 25922. Đây là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm phát triển và sử dụng hỗn hợp này trong điều trị bệnh viêm nhiễm dựa vào nguồn thực vật Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tách chiết hỗn hợp chứa hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin từ lá cây Thị đài lá rộng (*Diospyros fleuryana*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) phơi lá cây Thị đài lá rộng trong bóng mát, mẫu được xay nhỏ ngâm chiết với dung môi EtOAc bằng siêu âm theo tỉ lệ 1/3 (trọng lượng/thể tích) trong 40 phút ở 45°C, ngâm chiết lặp lại 3 lần, sau đó lọc lấy phần dịch; phần dịch chiết được cô chân không dưới điều kiện áp suất giảm để loại hoàn toàn dung môi và thu được cặn chiết EtOAc;

ii) chạy sắc ký cột silica gel cặn chiết EtOAc thu được ở bước (i) nêu trên với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton gradient theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/0; 90/10; 80/20; 70/30; 50/50; 40/60; 20/80 và 0/100 thu được 8 phân đoạn ký hiệu từ F1 đến F8;

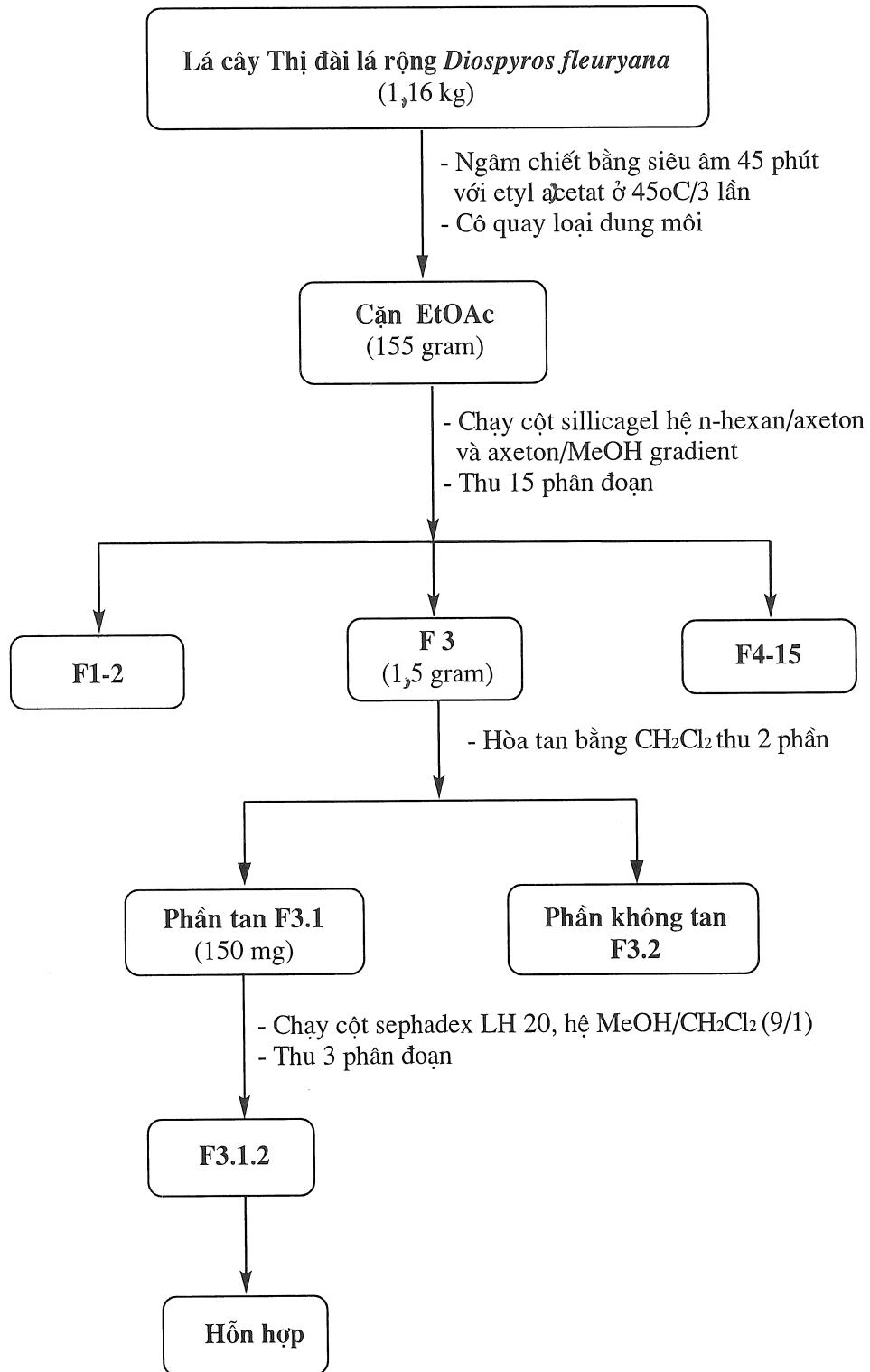
iii) hòa tan phân đoạn F3 thu được ở bước (ii) trong dung môi diclometan thu được 2 phần là phần tan (F3.1) và phần không tan (F3.2); cô khô phần F3.1;

iv) tinh chế phần F3.1 thu được ở bước (iii) bằng cột Sephadex với dung môi MeOH/CH₂Cl₂ tỉ lệ 9/1, thu được 3 phân đoạn nhỏ kí hiệu F3.1.1 đến F3.1.3; trong đó phân đoạn F3.1.2 chứa hỗn hợp hai chất là isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin dưới dạng chất rắn màu vàng.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này thu được hỗn hợp chứa hợp chất isodiospyrin và 8'-hydroxyisodiospyrin với hàm lượng lớn hơn 60% tính theo tổng hàm lượng của hỗn hợp.

3. Quy trình theo điểm 2, trong đó hỗn hợp thu được có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 2 chủng gram (+) *Staphylococcus aureu* ATCC 13709, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 và 1 chủng gram (-) là *Escherichia coli* ATCC 25922.

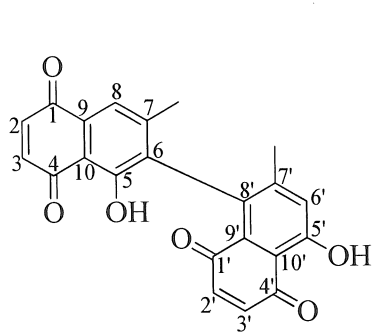
Hình 1



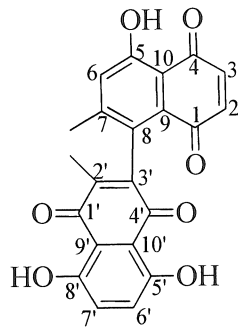
Hình 2

Vị trí	Isodiospyrin (1)		8'-hydroxyisodiospyrin (2)	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	184,4		184,9	
1'	184,9		186,6	
2	139,6	6,94 (d, 10,5)	139,7	6,77 (d, 10,0)
2'	140,1	6,72 (d, 10,5)	147,3	
3	137,7	6,92 (d, 10,5)	138,0	6,94 (d, 10,0)
3'	138,8	6,94 (d, 10,5)	143,0	
4	190,1		190,1	
4'	190,3		186,1	
5	158,6		162,1	
5'	162,0		158,9	
6	135,1		125,7	7,30 (chồng lấp)
6'	125,7	7,30 (s)	129,7	7,28 (chồng lấp)
7	145,5		146,8	
7'	148,2		129,7	7,28 (chồng lấp)
8	121,4	7,61 (s)	127,1	
8'	130,3		158,8	
9	128,6		129,2	
9'	128,8		112,2	
10	113,2		114,0	
10'	114,2		112,1	
7-CH ₃	20,4	2,01 (s)	20,6	2,19 (s)
7'-CH ₃	20,6	2,03 (s)	13,4	1,86 (s)
5-OH		12,05 (s)		12,34 (s)
5'-OH		12,43 (s)		12,31 (s)
8'-OH				12,66 (s)

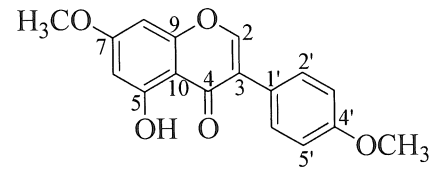
Hình 3



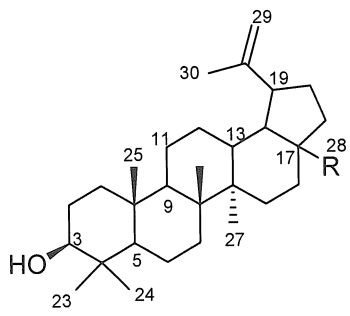
isodiospyrin



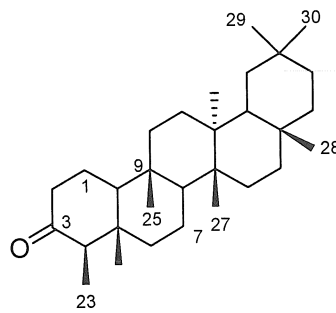
8'-hydroxyisodiospyrin



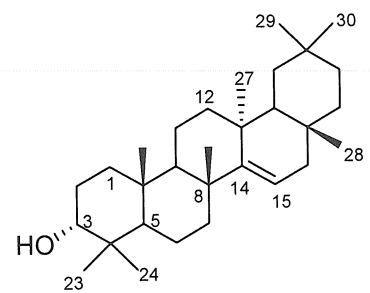
7-O-methylbiochanin A



betulin R=CH₂OH
 axit betulinic R=COOH
 lupeol R=CH₃



friedelin



epitaraxerol