



(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)



2-0003029

(51) **A61K 35/00; C07D 311/00; A61K 36/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00080

(22) 05/10/2018

(67) 1-2018-04397

(45) 25/01/2023 418

(43) 25/11/2019 380A

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

Nhà 1H, Số 18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội

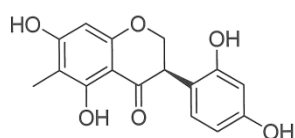
2. Trung tâm nghiên cứu và chuyển giao công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Số 18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Lê Minh Hà (VN); Nguyễn Tiến Đạt (VN); Ngô Thị Phương (VN).

(54) QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT VÀ TINH CHẾ HỢP CHẤT (3R)-2',4',5,7-TETRAHYDROXY-6-METYLISOFLAVANON TỪ CÂY HÀN THE DESMODIUM HETEROPHYLLUM

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất (3R)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-methylisoflavanon từ cây hàn the *Desmodium heterophyllum* Việt Nam có công thức (I). Hợp chất có công thức (I) theo giải pháp hữu ích có tác dụng ức chế men alpha-glucosidaza liên quan đến quá trình chuyển hoá và hấp thu glucoza vào cơ thể. Do vậy hợp chất (3R)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-methylisoflavanon theo giải pháp hữu ích có thể được dùng để bào chế dược phẩm có tác dụng phòng ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường typ 2.



(I)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất (3R)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-methylisoflavanon từ cây hàn the *Desmodium heterophyllum* (Wild.) DC.. Hợp chất này có tác dụng ức chế men alpha-glucosidaza có thể được dùng trong hỗ trợ, phòng ngừa và điều trị bệnh đái tháo đường typ 2.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Chi thóc lép hay tràng quả (*Desmodium* Desv.) là một chi lớn trong họ Đậu (Fabaceae), gồm khoảng 350 loài, thường được dùng làm thức ăn và thuốc chữa bệnh. Trong đó, khoảng 30 loài đã được nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng dược lý. Khoảng hơn hai trăm hợp chất đã được phân lập từ 15 loài thuộc chi *Desmodium*. Nhóm chất chính có mặt trong các loài *Desmodium* được xác định là flavonoid và alkaloid, ngoài ra còn có các lớp chất khác như terpenoid, steroid, phenol, phenylpropanoid, glycosit và tinh dầu. Các cao chiết cũng như những thành phần hóa học chính trong một số loài *Desmodium* đã được nghiên cứu chứng minh có tác dụng kháng viêm, gây độc tế bào, kháng khuẩn, chống tiểu đường, v.v., (Xueqin Ma và cộng sự. Review The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology, 138 (2011), 314 – 332). Flavonoid và alkaloid là những lớp chất lớn trong tự nhiên, không những phong phú về cấu trúc hóa học mà còn sở hữu đa dạng nhiều hoạt tính sinh học quý báu. Một số hoạt tính rất có giá trị của lớp chất flavonoid có thể kể đến là: kháng nấm, kháng khuẩn, kháng viêm, giảm đau, ức chế khối u, chống ung thư, bảo vệ gan, bảo vệ thành mạch, chống oxy hóa, chống tiểu đường, chống cao huyết áp, hạ đường huyết, v.v., (A. N. Panche và cộng sự. Flavonoids: an overview. Journal of Nutritional Science, 5 (2016), 1-15). Trong khi đó, lớp chất alkaloid có nhiều tác dụng lên hệ thần kinh (kích thích hoặc ức chế hệ thần kinh trung ương, hệ giao cảm, phó giao cảm, gây tê), tim mạch, hô hấp và tác dụng hạ huyết áp, chống ung thư, diệt khuẩn, diệt ký sinh trùng, v.v., (T.P. Tim Cushnie và cộng sự. Review Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. International Journal

of Antimicrobial Agents, 44 (2014), 377-386). Nhiều hợp chất đã được nghiên cứu kỹ lưỡng và sử dụng rộng rãi làm thuốc chữa bệnh. Nhờ sự phong phú về hoạt tính lẫn cấu trúc hóa học mà hai lớp chất này vẫn luôn thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học nhằm tìm kiếm chất mới và những chất chứa hoạt tính sinh học tốt, có thể ứng dụng trong y dược.

Ở Việt Nam, chi thóc lép có 29 loài, các loài trong chi này chủ yếu có dạng thân cỏ hoặc cây bụi nhỏ, phân cành nhiều, chiều cao 10-150 cm. Các loài trong chi thóc lép có thể mọc trên nhiều loại đất khác nhau như đất sét, đá vôi, đất đỏ bazan, bãi cát ven biển và đất phù sa. Phần lớn các loài thuộc chi Thóc lép có phân bố rộng, thường mọc ở ven đường, các bãi đất hoang, bãi cát ven biển, trảng cỏ và cây bụi, đôi khi có trong các rừng thường xanh, rừng thông, với độ cao tới 2000 m. Kim tiền thảo (*D. styracifolium* (Osbeck) Merr.) là một loài mọc khá phổ biến trong chi *Desmodium*, đã được nghiên cứu, thử nghiệm thành công và được ứng dụng rộng rãi để điều trị hạ huyết áp, làm giảm kích thước và tan các loại sỏi thận, sỏi bàng quang, v.v., (Vũ Văn Điền và cộng sự. Thăm dò một số tác dụng dược lý của Kim Tiền Thảo *Desmodium styracifolium* (osb) Merr. TC Dược học, 4 (1997), 16-18). Các kết quả đã đạt được từ loài kim tiền thảo cho thấy tiềm năng khai thác và sử dụng các loài thực vật mọc phổ biến nói chung và các loài trong chi *Desmodium* nói riêng nhằm phục vụ đời sống kinh tế xã hội.

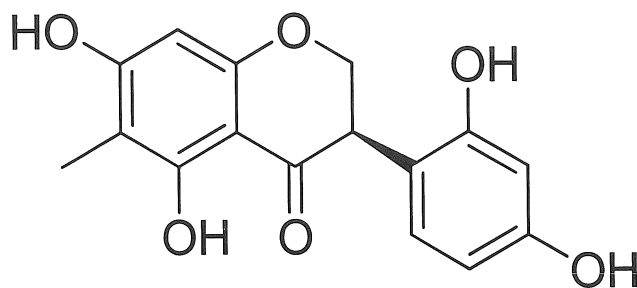
Hàn the có tên khoa học là *Desmodium heterophyllum* (Wild.) DC., thuộc họ Đậu (Fabaceae). Hàn the là cây bụi thấp, mọc bò sát đất, phân cành từ gốc. Lá mọc so le, thường có ba lá chét, các lá gần gốc thường chỉ có một lá chét; lá chét hình trái xoan ngược, gốc tù, chóp cụt lõm, mặt trên xanh sẫm, mặt dưới nhạt màu có lông. Cụm hoa rất ngắn mọc ở nách lá, gồm ít hoa, không cuống, màu tím hồng. Quả nhỏ, tròn, có 4 – 5 ngăn, mỗi ngăn chứa một hạt. Theo Đông y (Y học cổ truyền Tuệ Tĩnh), lá hàn the có vị hơi chua chát, tính mát. Trong nhân dân, cây hàn the được sử dụng để chữa sốt nóng, ho có đờm, tiêu sưng, tiêu viêm, cầm máu. Dùng ngoài giã nát đắp vết thương, chữa lở loét, mụn mủ, bثور. Thường dùng chữa các chứng lậu ra máu, đái buốt, bí tiểu do cơ thể bị nhiệt quá, dùng giải nhiệt, chữa sốt và ho khò khè, đau dạ dày, viêm loét hành tá tràng. Hàn the là cây mọc hoang dại ở các bãi cỏ, ven bờ ruộng ở khắp nước ta. Trên thế giới còn thấy mọc hoang ở nhiều nước nhiệt đới khu vực

Đông Nam Á. Nhân dân dùng toàn cây tươi hay sấy khô, thu hái quanh năm (Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học (2004), 151).

Mặc dù là vị thuốc nam khá phổ biến và có nhiều tác dụng chữa bệnh nhưng những nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây hàn the còn khá nghèo nàn. Trên thế giới hầu như chưa thấy bất kì công bố nào về cây này. Ở Việt Nam mới chỉ có 1 công trình nghiên cứu trong khuôn khổ luận văn Thạc sĩ tại trường Đại học Thái nguyên. Trong nghiên cứu này tác giả đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 4 hợp chất phổ biến là stigmast-5,22-dien-24 R -3 β -ol; stigmasterol-3- O - β -D-glucopyranosyl; β -sitosterol-3- O - β -D-glucopyranosit và vitexin (Nghiêm Thị Hương, Nghiên cứu thành phần hoá học có trong cây hàn the (*Desmodium heterophyllum*) họ Cánh bướm (Papilionaceae), Luận văn Thạc sĩ, Đại học Thái Nguyên (2009)). Do đó việc nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của cây hàn the (*Desmodium heterophyllum*) là rất cần thiết, nhằm mục đích làm sáng việc sử dụng cây hàn the trong các bài thuốc dân gian, tìm kiếm chất mới có hoạt tính tốt, để từ đó chúng ta có thể sử dụng cây hàn the trong điều trị bệnh một cách hiệu quả hơn.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề cập đến quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất (3 R)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-methylisoflavanon có công thức cấu tạo (I) từ cây hàn the *Desmodium heterophyllum* (Wild.) DC.:



(I)

Cụ thể, quy trình này bao gồm các bước:

- (i) thu gom cây hàn the *Desmodium heterophyllum*, sau đó rửa sạch bằng nước rồi hong khô trong bóng râm ở nhiệt độ từ 25 – 30°C trong 140 giờ, sau đó xay thành bột nhỏ;

- (ii) ngâm chiết bột thu được ở bước (i) bằng dung môi hữu cơ theo tỷ lệ 2 lít/1 kg mẫu, tiến hành từ 1 đến 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 1 đến 48 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 60°C, để thu được dịch chiết, trong đó dung môi hữu cơ được sử dụng được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol và axeton, sau đó gom các dịch chiết dung môi hữu cơ từ các lần ngâm chiết thu được dịch chiết A;
- (iii) cô quay dịch chiết A thu được ở bước (ii) để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 1;
- (iv) hòa tan cao chiết 1 vào nước theo tỷ lệ 4,5 lít nước/1 kg cao tạo thành dịch cao-nước, sau đó chiết phân bố bằng dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp, không tan hoặc ít tan trong nước theo tỷ lệ 1,5 lít dung môi/2 lít dịch cao-nước, từ 1 đến 5 lần, trong đó dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp được chọn từ nhóm bao gồm ete dầu hoả, n-hexan, xăng công nghiệp và dietyl ete, sau đó tách loại lớp dịch dung môi hữu cơ nằm bên trên thu được phần dịch nước B nằm bên dưới;
- (v) chiết phân bố phần dịch nước B thu được ở bước (iv) bằng etyl axetat theo tỷ lệ theo tỷ lệ 1,5 lít dung môi/2 lít dịch nước B từ 1 đến 5 lần, tiếp đó tách và thu gom lớp dịch chiết etyl axetat nằm bên trên, sau đó cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết etyl axetat (cao chiết 2);
- (vi) tách phân đoạn cao chiết 2 thu được ở bước (v) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ cao chiết/chất hấp phụ bằng 1/10 theo khối lượng) và dung môi giải hấp là hệ clorofom-metanol ở các tỷ lệ clorofom/metanol lần lượt là 100/1, 20/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 theo thể tích, sau đó thu gom phân đoạn giải hấp từ hệ dung môi tỷ lệ clorofom/metanol là 20/1 (phân đoạn ký hiệu E2), tiếp theo cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 3;
- (vii) tách cao chiết 3 thu được ở bước (vi) bằng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường, hệ dung môi rửa giải là n-hexan-axeton với tỷ lệ n-hexan/axeton là 3/1 theo thể tích, trong đó các dịch giải hấp ra được chấm kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng pha thường, sau đó gom những dịch giải hấp có sắc ký đồ giống nhau thu được 3 phân đoạn lần lượt là E2.1, E2.2 và E2.3;
- (viii) cô quay phân đoạn E2.2 thu được ở bước (vii) để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 4;

(ix) phân tách cao chiết 4 thu được ở bước (viii) bằng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường có hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol với tỷ lệ clorofom/metanol là 15/1 theo thể tích, trong đó các dịch giải hấp ra được chấm kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng pha thường, tiếp theo gom những dịch giải hấp có sắc ký đồ giống nhau thu được 3 phân đoạn E2.2.1, E2.2.2 và E2.2.3

(x) cô quay phân đoạn E2.2.2 để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 5;

(xi) tinh chế cao chiết 5 thu được ở bước (x) bằng sắc ký cột với chất hấp phụ silica gel pha đảo C18, sau đó rửa giải bằng hệ dung môi metanol-nước với tỷ lệ metanol/nước là 2/1 theo thể tích, thu được hợp chất có công thức (I) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt.

Hợp chất (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-methylisoflavanon (I) theo giải pháp hữu ích thể hiện hoạt tính ức chế men alpha-glucosidaza là cơ sở để nghiên cứu phát triển các dược phẩm mới có tác dụng phòng ngừa và điều trị bệnh đái tháo đường typ 2. Hợp chất (I) được phân lập từ dịch chiết chứa nước hoặc dịch chiết dung môi hữu cơ của hàn the. Dung môi hữu cơ được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metanol, etanol và axeton. Trong số chúng, metanol là được ưu tiên.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Lấy mẫu khô cây hàn the xay nhỏ và tiến hành chiết bằng nước hoặc dung môi hữu cơ theo phương pháp được mô tả dưới đây. Các phương pháp sắc ký để sử dụng cho phương pháp theo giải pháp hữu ích bao gồm phương pháp sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 và RP18 F254 (Merck-Đức), trong đó các vết chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng là 254 và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% phun đều lên bản mỏng rồi sấy ở nhiệt độ cao cho đến khi hiện màu; và phương pháp sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ silica gel pha thường hoặc pha đảo C18. Các dung môi hữu cơ sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metanol, etanol, clorofom, axeton, n-hexan. Để xác định cấu trúc của hợp chất thu được, các tác giả giải pháp hữu ích sử dụng các phương pháp phổ bao gồm phổ cộng hưởng từ nhân (¹H-NMR và ¹³C-NMR) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS trên

máy Waters Q-TOF micromass spectrometer Waters Q-TOF micromass spectrometer, phổ lưỡng sắc tròn CD trên máy JASCO J-1100 spectropolarimeter.

Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất (3R)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-metylisoflavanon từ cây hàn the *Desmodium heterophyllum* bao gồm các bước:

(i) thu gom cây hàn the *Desmodium heterophyllum*, sau đó rửa sạch bằng nước rồi hong khô trong bóng râm ở nhiệt độ từ 25 – 30°C trong 140 giờ, sau đó xay thành bột nhỏ;

(ii) ngâm chiết bột thu được ở bước (i) bằng dung môi hữu cơ theo tỷ lệ 2 lít/1 kg mẫu, tiến hành từ 1 đến 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 1 đến 48 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 60°C, để thu được dịch chiết, trong đó dung môi hữu cơ được sử dụng được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol và axeton, sau đó gom các dịch chiết dung môi hữu cơ từ các lần ngâm chiết thu được dịch chiết A;

(iii) cô quay dịch chiết A thu được ở bước (ii) để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 1;

(iv) hòa tan cao chiết 1 vào nước theo tỷ lệ 4,5 lít nước/1 kg cao, sau đó chiết phân bố bằng dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp, không tan hoặc ít tan trong nước theo tỷ lệ 1,5 lít dung môi/2 lít dịch cao-nước, từ 1 đến 5 lần, trong đó dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp được chọn từ nhóm bao gồm ete dầu hoả, n-hexan, xăng công nghiệp và dietyl ete, sau đó tách loại lớp dịch dung môi hữu cơ nằm bên trên thu được phần dịch nước B nằm bên dưới;

(v) chiết phân bố phần dịch nước B thu được ở bước (iv) bằng etyl axetat theo tỷ lệ theo tỷ lệ 1,5 lít dung môi/2 lít dịch cao-nước từ 1 đến 5 lần, tiếp đó tách và thu gom lớp dịch chiết etyl axetat nằm bên trên, sau đó cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết etyl axetat (cao chiết 2);

(vi) tách phân đoạn cao chiết 2 thu được ở bước (v) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ cao chiết/chất hấp phụ bằng 1/10 theo khối lượng) và dung môi giải hấp là hệ clorofom-metanol ở các tỷ lệ 100/1, 20/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 theo thể tích, sau đó thu gom phân đoạn giải hấp từ hệ dung môi tỷ

lệ 20/1 (phân đoạn ký hiệu E2), tiếp theo cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 3;

(vii) tách cao chiết 3 thu được ở bước (vi) bằng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường, hệ dung môi rửa giải là n-hexan-axeton tỷ lệ 3:1 theo thể tích, trong đó các dịch giải hấp ra được chấm kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng pha thường, sau đó gom những dịch giải hấp có sắc ký đồ giống nhau thu được 3 phân đoạn lần lượt là E2.1, E2.2, E2.3;

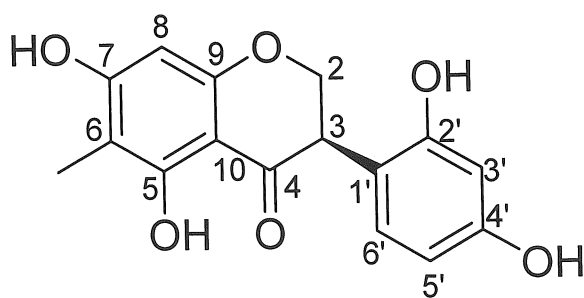
(viii) cô quay phân đoạn E2.2 thu được ở bước (vii) để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 4;

(ix) phân tách cao chiết 4 thu được ở bước (viii) bằng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường có hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol tỷ lệ 15:1 theo thể tích, trong đó các dịch giải hấp ra được chấm kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng pha thường, tiếp theo gom những dịch giải hấp có sắc ký đồ giống nhau thu được 3 phân đoạn E2.2.1, E2.2.2, E2.2.3;

(x) cô quay phân đoạn E2.2.2 để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 5;

(xi) tinh chế cao chiết 5 thu được ở bước (x) bằng sắc ký cột với chất hấp phụ silica gel pha đảo C₁₈, sau đó rửa giải bằng hệ dung môi metanol-nước tỷ lệ 2:1 theo thể tích, thu được hợp chất (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-metylisoflavanon có công thức (I) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt.

Hợp chất có công thức (I) theo giải pháp hữu ích có tên khoa học theo IUPAC là (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-metylisoflavanon có công thức cấu tạo sau:



(I)

Hợp chất này có các thông số hoá lý như sau:

- Chất rắn màu vàng nhạt;
- Công thức phân tử là $C_{16}H_{14}O_6$;
- Độ quay cực $[\alpha]_D^{24} = -7,5$ (c 0,1, MeOH);
- Phổ lưỡng sắc tròn CD (c 0,5 mg/ml, MeOH): $\lambda_{max}(\Delta\epsilon)$ nm 220 (+9,30), 292 (+1,59), 310 (+1,17);
- Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS m/z : 303,0856 $[M + H]^+$;
- Phổ 1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 6,84 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6'), 6,34 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-3'), 6,27 (1H, dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz, H-5'), 5,93 (1H, s, H-8), 4,52 (1H, dd, $J = 10,5, 11,0$ Hz, Ha-2), 4,36 (1H, dd, $J = 5,5, 11,0$ Hz, Hb-2), 4,18 (1H, dd, $J = 5,5, 10,5$ Hz, H-3), 1,97 (3H, s, Me-6);
- Phổ ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 199,5 (C-4), 165,8 (C-7), 162,9 (C-5), 162,6 (C-9), 159,1 (C-4'), 157,6 (C-2'), 131,8 (C-6'), 114,2 (C-1'), 107,7 (C-5'), 105,2 (C-6), 103,7 (C-10), 103,6 (C-3'), 95,0 (C-8), 71,5 (C-2), 47,9 (C-3), 6,9 (Me-6).

Quy trình chiết xuất và tinh chế theo giải pháp hữu ích là đơn giản, dễ thực hiện và cho phép phân lập được hợp chất (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-metylisoflavanon tinh khiết ra khỏi hỗn hợp của nhiều chất từ cây hàn the *Desmodium heterophyllum*. Hợp chất này được thử nghiệm hoạt tính sinh học và kết quả cho thấy rằng nó có khả năng ức chế men alpha-glucosidaza. Việc phân lập được hợp chất (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-metylisoflavanon tinh khiết có hoạt tính đáng quý nêu trên mở ra hướng nghiên cứu mới trong việc sử dụng hợp chất này bào chế được phẩm hỗ trợ, phòng ngừa và điều trị bệnh đái tháo đường typ 2.

Giải pháp hữu ích sẽ được giải thích tiếp bằng ví dụ và phương án minh họa sau. Tuy nhiên, ví dụ này không được coi là giới hạn phạm vi của giải pháp hữu ích. Các cải biến sẽ dễ dàng được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và chúng sẽ nằm trong phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích và của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập và tinh chế hợp chất (3R)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-metylisoflavanon từ cây hàn the *Desmodium heterophyllum* Việt Nam

20 kg cây hàn the *Desmodium heterophyllum* sau khi thu hái được rửa sạch bằng nước và hong khô trong bóng râm ở nhiệt độ từ 25 – 30°C trong 140 giờ, sau đó xay thành bột nhỏ thu được 3,0 kg bột mẫu khô. Ngâm chiết 3,0 kg nguyên liệu bột khô này bằng 6 lít dung môi metanol ở nhiệt độ 40°C. Sau 24 giờ, dịch chiết được rút kiệt ra rồi bổ sung metanol vào và ngâm tiếp. Sau 3 lần ngâm chiết như vậy, các dịch chiết được gom lại và cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 80 g cao chiết tổng, ký hiệu là cao chiết 1.

Hòa tan cao chiết 1 vào 0,36 lít nước cất rồi chiết phân bố bằng n-hexan 3 lần, mỗi lần 0,27 lít. Sau khi tách loại lớp dịch dung môi n-hexan phía trên thu được 0,36 lít dịch nước còn lại nằm bên dưới, phần dịch nước này tiếp tục được chiết phân bố bằng etyl axetat (0,27 lít x 3 lần). Lớp dịch etyl axetat nằm bên trên được gom lại rồi cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 26,0 g cao chiết etyl axetat, ký hiệu là cao chiết 2.

Tách phân đoạn cao chiết 2 thu được trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ cao chiết/chất hấp phụ = 1/10 theo khối lượng, cột nhồi đường kính trong 5 cm) và dung môi giải hấp là hệ clorofom/metanol ở các tỷ lệ clorofom/metanol lần lượt là 100/1, 20/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 theo thể tích. Thu gom phân đoạn giải hấp từ hệ dung môi tỷ lệ 20/1 (phân đoạn ký hiệu E2) rồi cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 3,5 g cao chiết 3.

Cao chiết 3 tiếp tục được phân tách qua sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ cao chiết/chất hấp phụ = 1/20 theo khối lượng, cột nhồi đường kính trong 2,5 cm), dung môi rửa giải là 1,5 lít hệ n-hexan-axeton với tỷ lệ n-hexan/axeton là 3/1 theo tỷ lệ thể tích thu được 3 phân đoạn nhỏ ký hiệu là E2.1 (thể tích giải hấp 550 ml), E2.2 (thể tích giải hấp 600 ml) và E2.3 (thể tích giải hấp 350 ml). Cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm phân đoạn E2.2 thu được 1,0 g cao chiết 4.

Tiến hành chạy sắc ký đối với cao chiết 4 trên cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ cao chiết/chất hấp phụ = 1/30 theo khối lượng, cột nhồi đường kính trong 1,5 cm), hệ dung môi rửa giải là 1,0 lít clorofom-metanol

với tỷ lệ clorofom/metanol là 15/1 theo thể tích. Các dịch giải hấp ra được chấm kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng pha thường, gom những dịch giải hấp có sắc ký đồ giống nhau thu được 3 phân đoạn E2.2.1 (thể tích giải hấp 150 ml), E2.2.2 (thể tích giải hấp 450 ml) và E2.2.3 (thể tích giải hấp 400 ml). Cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm phân đoạn E2.2.2 thu được 130 mg cao chiết 5.

Tiến hành chạy sắc ký đối với cao chiết 5 trên cột chất hấp phụ silica gel pha đảo C₁₈, rửa giải bằng hệ dung môi metanol-nước với tỷ lệ metanol/nước là 2/1 theo thể tích, thu được 25 mg hợp chất (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-methylisoflavanon có công thức (I) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. Cấu trúc hóa học của (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-methylisoflavanon (I) được xác định bằng các số liệu phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (m/z : 303,0856 [M + H]⁺) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H và ¹³C chiều (Bảng 1) kết hợp với phổ lưỡng sắc tròn CD.

Bảng 1. Số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H và ¹³C NMR của hợp chất (I):

C	$\delta_H^{a, b}$	$\delta_C^{a, c}$
2	4,52 (1H, dd, $J = 10,5, 11,0$ Hz, Ha-2) 4,36 (1H, dd, $J = 5,5, 11,0$ Hz, Hb-2)	71,5
3	4,18 (1H, dd, $J = 5,5, 10,5$ Hz, H-3)	47,9
4	-	199,5
5	-	162,9
6	-	105,2
7	-	165,8
8	5,93 (1H, s, H-8)	95,0
9	-	162,6
10	-	103,7
1'	-	114,2
2'	-	157,6
3'	6,34 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-3')	103,6
4'	-	159,1

5'	6,27 (1H, dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz, H-5')	107,7
6'	6,84 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6')	131,8
6-Me	1,97 (3H, s, Me-6)	6,9

^aĐo trong CD₃OD, ^b500 MHz, ^c125 MHz

Cấu trúc của hợp chất có công thức (I) 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 (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-metylisoflavanon (I) là hợp chất mới chưa từng được công bố trong bất cứ ấn phẩm nào trước đó.

Ví dụ 2: Thử nghiệm tác dụng ức chế men alpha-glucosidaza của hợp chất (I)

Hoạt tính ức chế alpha-glucosidaza được thực hiện dựa vào phản ứng thủy phân *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranozit thành đường glucoza và *p*-nitrophenol dưới xúc tác của men alpha-glucosidaza trong sự có mặt/không có hoạt chất nghiên cứu. Mật độ quang của *p*-nitrophenol sinh ra sau phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm. Theo đó, hợp chất (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-metylisoflavanon (I) thu được theo giải pháp hữu ích được pha trong dung môi dimetylsulfosit (DMSO) thành các nồng độ 30,0, 10,0, 3,0, 1,0 và 0,3 mg/ml. Chuyển 2 μ L dung dịch chất (I) vào các giếng của phiên 96 giếng đã chứa sẵn 40 μ L dung dịch men alpha-glucosidaza nồng độ 50 μ g/ml pha trong đệm photphat có độ pH = 7,0. Ủ hỗn hợp này trong 5 phút ở 37°C, sau đó bổ sung 160 μ L dung dịch cơ chất *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranozit nồng độ 5 mM pha trong đệm photphat có pH = 7,0. Hỗn hợp phản ứng được ủ tiếp trong 30 phút, sau đó đo mật độ quang của các giếng tại bước sóng 405 nm bằng máy đọc microplate reader (Molecular Device, USA). Hoạt chất Acarbose được sử dụng làm đối chứng dương. Hoạt tính ức chế men alpha-glucosidaza được xác định theo công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = (\text{OD}_{\text{mẫu}} / (\text{OD}_{\text{dương}}) \times 100$$

trong đó:

OD_{mẫu} là giá trị mật độ quang của giếng có ủ với men alpha-glucosidaza, cơ chất *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranozit và mẫu thử nghiệm.

OD_{dương} là giá trị mật độ quang của giếng ủ với men alpha-glucosidaza, cơ chất *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranozit và không có mẫu thử nghiệm.

Giá trị nồng độ ức chế bán phần (IC_{50}) cũng được tính toán và được liệt kê trong Bảng 2.

Bảng 2. Hoạt tính ức chế alpha-glucosidaza của hợp chất (I):

Mẫu thử	Giá trị IC_{50} (μM)
Hợp chất (I)	$879,4 \pm 43,1$
Acarbose	$671,4 \pm 32,7$

Theo kết quả trong Bảng 2, hợp chất (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-methylisoflavanon (I) có tác dụng ức chế alpha-glucosidaza thể hiện qua giá trị ức chế bán phần IC_{50} gấp khoảng 1,3 lần so với đối chứng dương là thuốc chữa tiểu đường Acarbose.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-methylisoflavanon từ cây hàn the *Desmodium heterophyllum* Việt Nam. Hợp chất (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-methylisoflavanon (I) theo giải pháp hữu ích có tác dụng ức chế men alpha-glucosidaza có thể dùng để bào chế dược phẩm có tác dụng phòng ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường typ 2.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất (3*R*)-2',4',5,7-tetrahydroxy-6-methylisoflavanon từ cây hàn the *Desmodium heterophyllum*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- (i) thu gom cây hàn the *Desmodium heterophyllum*, sau đó rửa sạch bằng nước rồi hong khô trong bóng râm ở nhiệt độ từ 25 – 30°C trong 140 giờ, sau đó xay thành bột nhỏ;
- (ii) ngâm chiết bột thu được ở bước (i) bằng dung môi hữu cơ theo tỷ lệ 2 lít/1 kg mẫu, tiến hành từ 1 đến 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 1 đến 48 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 60°C, để thu được dịch chiết, trong đó dung môi hữu cơ được sử dụng được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol và axeton, sau đó gom các dịch chiết dung môi hữu cơ từ các lần ngâm chiết thu được dịch chiết A;
- (iii) cô quay dịch chiết A thu được ở bước (ii) để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 1;
- (iv) hòa tan cao chiết 1 vào nước theo tỷ lệ 4,5 lít nước/1 kg cao tạo thành dịch cao-nước, sau đó chiết phân bố bằng dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp, không tan hoặc ít tan trong nước theo tỷ lệ 1,5 lít dung môi/2 lít dịch cao-nước, từ 1 đến 5 lần, trong đó dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp được chọn từ nhóm bao gồm ete dầu hoả, n-hexan, xăng công nghiệp và dietyl ete, sau đó tách loại lớp dịch dung môi hữu cơ nằm bên trên thu được phần dịch nước B nằm bên dưới;
- (v) chiết phân bố phần dịch nước B thu được ở bước (iv) bằng etyl axetat theo tỷ lệ theo tỷ lệ 1,5 lít dung môi/2 lít dịch nước B từ 1 đến 5 lần, tiếp đó tách và thu gom lớp dịch chiết etyl axetat nằm bên trên, sau đó cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết etyl axetat (cao chiết 2);
- (vi) tách phân đoạn cao chiết 2 thu được ở bước (v) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ cao chiết/chất hấp phụ bằng 1/10 theo khối lượng) và dung môi giải hấp là hệ clorofom-metanol ở các tỷ lệ clorofom/metanol lần lượt là 100/1, 20/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 theo thể tích, sau đó thu gom phân đoạn giải hấp từ hệ dung môi tỷ lệ clorofom/metanol là 20/1 (phân đoạn ký hiệu E2), tiếp theo cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 3;

- (vii) tách cao chiết 3 thu được ở bước (vi) bằng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường, hệ dung môi rửa giải là n-hexan-axeton với tỷ lệ n-hexan/axeton là 3/1 theo thể tích, trong đó các dịch giải hấp ra được chấm kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng pha thường, sau đó gom những dịch giải hấp có sắc ký đồ giống nhau thu được 3 phân đoạn lần lượt là E2.1, E2.2 và E2.3;
- (viii) cô quay phân đoạn E2.2 thu được ở bước (vii) để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 4;
- (ix) phân tách cao chiết 4 thu được ở bước (viii) bằng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường có hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol với tỷ lệ clorofom/metanol là 15/1 theo thể tích, trong đó các dịch giải hấp ra được chấm kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng pha thường, tiếp theo gom những dịch giải hấp có sắc ký đồ giống nhau thu được 3 phân đoạn E2.2.1, E2.2.2 và E2.2.3
- (x) cô quay phân đoạn E2.2.2 để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 5;
- (xi) tinh chế cao chiết 5 thu được ở bước (x) bằng sắc ký cột với chất hấp phụ silica gel pha đảo C18, sau đó rửa giải bằng hệ dung môi metanol-nước với tỷ lệ metanol/nước là 2/1 theo thể tích, thu được hợp chất có công thức (I) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt.