



(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)



2-0003084

(51)⁷ **A61K 35/00**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00509

(22) 14/11/2019

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/05/2021 398

(73) Viện Công nghệ Hoá học (VN)

01 Mạc Đình Chi, phường Bến Nghé, quận 1, thành phố Hồ Chí Minh

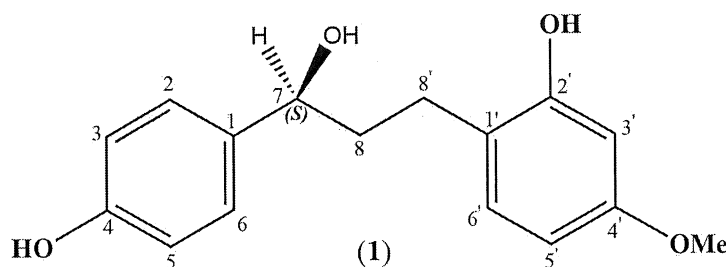
(72) Nguyễn Tấn Phát (VN); Lê Kiều Hưng (VN); Mai Đình Trị (VN).

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP HỢP CHẤT DIARYLPROPANOID TỪ CÂY ĐẠI CÁN TAM SẮC (MACROSOLEN TRICOLOR (LECOMTE) DANSER.)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập hợp chất diarylpropanoid từ cây Đại cán Tam sắc (*Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser.) bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết nguyên liệu dạng bột bằng etanol 96° nóng; c) chiết phân đoạn bằng *n*-hexan; d) tinh chế cao chiết phân đoạn *n*-hexan; e) tinh chế phân đoạn H.II; g) phân lập hợp chất diarylpropanoid; và h) tinh chế hợp chất diarylpropanoid.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập hợp chất diarylpropanoid từ cây Đại cán Tam sắc (*Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser.). Cụ thể là, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình hiệu quả để phân lập hợp chất diarylpropanoid mới được đặt tên là Macrotricolorin A (công thức 1) từ cây Đại cán Tam sắc sử dụng phương pháp chiết bằng cồn 96° nóng sau đó sử dụng *n*-hexan cho phép giảm lượng hóa chất cần dùng, tiết kiệm thời gian phân lập đồng thời giảm thiểu khả năng gây ô nhiễm môi trường.



Tên khoa học: (1*S*)-(-)-1-(4-hydroxyphenyl)-3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-propan-1-ol).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đại cán Tam sắc (*Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser.) thuộc họ Tầm gửi (Loranthaceae) cây dạng bụi bán ký sinh không lông, phân bố chủ yếu Nha Trang, Phan Rang. Theo tác giả Nguyen T. M. H. (2002) trong Nghiên cứu đặc điểm thực vật thành phần hóa học và tác dụng sinh học của một số loài tầm gửi, họ tầm gửi (Loranthaceae), Đại cán Tam sắc có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây độc gan chuột bằng CCl₄. Theo Vu X. G., Pham T. K., Nguyen T. T., Pham T. V. A. đăng trên Tạp chí Dược học (số 426 năm 2011), Đại cán Tam sắc có tác dụng bảo vệ gan khi gây tổn thương gan bằng paracetamol và chống viêm

cấp trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin và gây viêm màng bụng chuột bằng carrageenin và formaldehyt. Tuy nhiên, có rất ít về nghiên cứu về thành phần hoá học của loài này ở Việt Nam và trên thế giới. Hiện có 5 hợp chất được phân lập từ loài này là quersetin 3-rhamnosit, 3β -nonadecanoyllup-20(29)-en- 7β -ol, 3β -nonadecanoyllup-20(29)-en- 7β , 15α -diol, lupeol và metyl brevifolin carboxylat (theo Tạp chí dược học số 450 năm 2013).

Do đó, cần có sự khảo sát thành phần hóa học và quy trình phân lập nhằm thu được hợp chất có hoạt tính sinh học trong cây Đại cán Tam sắc có khả năng làm nguyên liệu sản xuất thuốc điều trị các loại bệnh.

Mặt khác, cho đến nay, chưa có tài liệu nào công bố (i) tìm ra công thức hóa học của hợp chất Macrotricolorin A (công thức 1) và (ii) quy trình phân lập Macrotricolorin A từ cây Đại cán Tam sắc (*Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser.).

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập hợp chất diarylpropanoid từ cây Đại cán Tam sắc (*Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser.), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu lấy toàn cây Đại cán Tam sắc, phơi trong bóng râm và sấy khô ở nhiệt độ 40°C , nghiền nguyên liệu thu được nguyên liệu dạng bột;

b) chiết nguyên liệu dạng bột bằng etanol 96° nóng bằng cách ngâm bột cây Đại cán Tam sắc với etanol 96° nóng theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong 4 giờ, sau khi loại bỏ bã, phần nước được cô dưới áp suất giảm để thu hồi dung môi thu được dạng cao lỏng;

c) chiết phân đoạn cao lỏng thu được ở bước b) bằng *n*-hexan, cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết phân đoạn *n*-hexan và dịch nước;

d) tinh chế cao chiết phân đoạn *n*-hexan thu được ở bước c) bằng cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha thường (kích thước 0,040-0,063 mm) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ thể tích ethyl axetat tăng dần 0, 25, 50, 75 và 100%, thu được 05 phân đoạn được ký hiệu từ H.I đến H.V;

e) tinh chế phân đoạn H.II thu được ở bước d) bằng cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha thường (kích thước 0,040-0,063 mm) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ thể tích ethyl axetat tăng dần 5, 10, 15, 20, 25 và 30%, thu được 06 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ H.II.1 đến H.II.6;

g) phân lập hợp chất Macrotricolorin A bằng cách đưa phân đoạn H.II.1 thu được ở bước e) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha thường (kích thước 0,040-0,063 mm) và hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 1, 2, 3, 4 và 5%, thu được 05 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ H.II.1.1 đến H.II.1.5; và

h) tinh chế hợp chất Macrotricolorin A bằng cách đưa phân đoạn H.II.1.1 thu được ở bước g) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha đảo RP-18 với hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 20:80 (thể tích/thể tích) và tiếp tục tinh chế bằng cách kết tinh lại nhiều lần với hệ dung môi là *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ thể tích 10:1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất Macrotricolorin A dạng tinh thể hình kim, màu trắng có tên khoa học là (1*S*)-(-)-1-(4-hydroxyphenyl)-3-(2-hydroxy-4-metoxyphenyl)-propan-1-ol (công thức 1).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả một cách chi tiết phương án thực hiện quy trình phân lập hợp chất diarylpropanoid từ cây Đại cán Tam sắc (*Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser.) cùng với ví dụ minh họa cụ thể. Tuy nhiên, ví dụ minh họa này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập hợp chất diarylpropanoid từ cây Đại cán Tam sắc (*Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser), quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết nguyên liệu dạng bột bằng etanol 96° nóng; c) chiết phân đoạn bằng *n*-hexan; d) tinh chế cao *n*-hexan; e), tinh chế phân đoạn H.II; g) phân lập hợp chất Macrotricolorin A; và h) tinh chế hợp chất Macrotricolorin A.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, toàn bộ cây Đại cán Tam sắc (*Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser) được thu hái, loại bỏ tạp chất, phơi trong bóng râm và sấy khô ở nhiệt độ 40°C, sau đó toàn bộ cây được nghiền thành bột thu được bột mịn. Bột toàn bộ cây này được sử dụng làm nguyên liệu cho quy trình phân lập hợp chất Macrotricolorin A theo giải pháp hữu ích.

Trong bước chiết nguyên liệu dạng bột bằng etanol 96° nóng, phần bột toàn bộ cây được ngâm etanol 96° nóng theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi chiết, loại bỏ phần bã bằng cách lọc và ép kiệt etanol 96°. Theo một phương án ưu tiên, bước chiết này được thực hiện ba lần. Loại bỏ etanol 96° từ phần dịch chiết thu được dưới áp suất giảm để thu được dạng cao lỏng.

Trong bước chiết phân đoạn bằng *n*-hexan, phần cao lỏng được đem chiết phân đoạn với dung môi *n*-hexan, sau đó cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết phân đoạn *n*-hexan tương ứng và phần dịch nước.

Trong bước tinh chế cao chiết phân đoạn *n*-hexan, phần cao chiết phân đoạn *n*-hexan được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha thường (kích thước 0,040-0,063 mm) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan-etyl axetat theo tỷ lệ thể tích etyl axetat tăng dần 0, 25, 50, 75 và 100%, thu được 05 phân đoạn được ký hiệu từ H.I đến H.V.

Trong bước tinh chế phân đoạn H.II, phân đoạn H.II được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha thường (kích thước 0,040-0,063 mm) và hệ

dung môi rửa giải là *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ thể tích ethyl axetat tăng dần 5, 10, 15, 20, 25 và 30%, thu được 06 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ H.II.1 đến H.II.6.

Trong bước phân lập hợp chất Macrotricolorin A, tiếp tục tinh chế phân đoạn H.II.1 bằng cách đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha thường (kích thước 0,040-0,063 mm) và hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 1, 2, 3, 4 và 5%, thu được 05 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ H.II.1.1 đến H.II.1.5.

Trong bước tinh chế hợp chất Macrotricolorin A, phân đoạn H.II.1.1 được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha đảo RP-18 với hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 20:80 (thể tích/thể tích) và tiếp đó tục tinh chế bằng kết tinh lại nhiều lần với hệ dung môi là *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ thể tích 10:1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất Macrotricolorin A dạng tinh thể hình kim, màu trắng.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất mới chưa được công bố trên bất kỳ tài liệu nào là Macrotricolorin A thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó hợp chất này có công thức (1). Hợp chất Macrotricolorin A theo giải pháp hữu ích có công thức cấu tạo $C_{16}H_{18}O_4$.

Macrotricolorin A có công thức cấu tạo $C_{16}H_{18}O_4$ ở dạng tinh thể hình kim, màu trắng, tan tốt trong các dung môi hữu cơ như ethyl axetat, metanol. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng silicagel tráng sẵn 60 F254 (Merck), $R_f = 0,5$ với dung môi triển khai là clorofom-metanol 98:2 (thể tích/thể tích).

+ Độ quay cực: $[\alpha]_{25D} - 80,0^\circ$ (c 0,167, MeOH) + IR (KBr) cm^{-1} : 3446, 2361, 2338, 1650 + UV $\lambda_{max}(MeOH)$: 208, 212, 233, 281 nm + Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS m/z : 257.1179 $[M+H-H_2O]^+$.

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz, J in Hz): 7,22 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-2, H-6), 6,78 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-3, H-5), 9,42 (1H,

s, OH-4), 4,95 (1H, dd, $J = 10,0$ & $2,0$ Hz, H-7), 2,05-2,10 (1H, m, H-8a), 1,92-1,99 (1H, m, H-8b), 6,36 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-3'), 6,44 (1H, dd, $J = 8,5$ & $2,5$ Hz, H-5'), 6,98 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-6'), 2,82-2,89 (1H, m, H-8'a), 2,63-2,68 (1H, m, H-8'b), 3,69 (3H, s, OCH₃).

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): 131,7 (C-1), 127,5 (C-2), 115,0 (C-3), 156,9 (C-4), 115,0 (C-5), 127,5 (C-6), 77,0 (C-7), 29,1 (C-8), 113,8 (C-1'), 155,6 (C-2'), 101,3 (C-3'), 158,5 (C-4'), 106,8 (C-5'), 129,9 (C-6'), 23,9 (C-8'), 55,0 (OCH₃).

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Phân lập hợp chất Macrotricolorin A từ toàn bộ cây Đại cán Tam sắc (*Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser.)

Toàn bộ cây Đại cán Tam sắc (*Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser.) được thu hái, loại bỏ tạp chất, phơi trong bóng râm và sấy khô ở nhiệt độ 40°C, sau đó toàn bộ cây được nghiền thành bột thu được bột mịn.

Lấy 4,3 kg bột toàn bộ cây đem chiết với 21,5 lít etanol 96° nóng (80°C) trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng (bước chiết này được thực hiện ba lần). Sau khi chiết, loại bỏ phần bã bằng cách lọc và ép kiệt etanol 96°. Loại bỏ etanol 96° từ phần dịch chiết thu được dưới áp suất giảm để thu được dạng cao lỏng.

Phần cao lỏng (1,1 kg) này được đem chiết phân đoạn với dung môi *n*-hexan (5 lít), sau đó cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết phân đoạn *n*-hexan tương ứng và dịch nước.

Phần cao chiết phân đoạn *n*-hexan được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha thường (kích thước 0,040-0,063 mm) (100 g) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ thể tích ethyl axetat tăng dần 0, 25, 50, 75 và 100%, loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được 05 phân đoạn lần lượt là H.I, H.II, H.III, H.IV và H.V.

Phân đoạn H.II (50 g) tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha thường (kích thước 0,040-0,063 mm) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan-etyl axetat theo tỷ lệ thể tích etyl axetat tăng dần 5, 10, 15, 20, 25 và 30%, thu được 06 phân đoạn nhỏ lần lượt là H.II.1, H.II.2, H.II.3, H.II.4, H.II.5 và H.II.6.

Tiếp tục tinh chế phân đoạn H.II.1 (6.5 g) bằng cách đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha thường (kích thước 0,040-0,063 mm) và hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 1, 2, 3, 4 và 5%, thu được 05 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ H.II.1.1, H.II.1.2, H.II.1.3, H.II.1.4 và H.II.1.5.

Tinh chế hợp chất Macrotricolorin A bằng cách đưa phân đoạn H.II.1.1 (1,1 g) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha đảo RP-18 với hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 20:80 (thể tích/thể tích) và tiếp tục tinh chế bằng kết tinh lại nhiều lần với hệ dung môi là *n*-hexan-etyl axetat theo tỷ lệ thể tích 10:1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất Macrotricolorin A dạng tinh thể hình kim, màu trắng.

Hợp chất Macrotricolorin A thu được ở dạng tinh thể hình kim, màu trắng, tan tốt trong các dung môi hữu cơ như etyl axetat, metanol. Định tính bằng sắc ký lớp bản mỏng silicagel tráng sẵn 60 F254 (Merck), $R_f = 0,5$ với dung môi triển khai là clorofom-metanol 98:2 (thể tích/thể tích). Dữ liệu cho thấy hợp chất Macrotricolorin A thu được có độ tinh khiết trên 95%.

+ Độ quay cực: $[\alpha]_{25D} - 80,0^\circ$ (c 0,167, MeOH) + IR (KBr) cm^{-1} : 3446, 2361, 2338, 1650 +UV λ_{max} (MeOH): 208, 212, 233, 281 nm + Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS m/z : 257.1179 $[M+H-H_2O]^+$.

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz, J in Hz): 7,22 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2, H-6), 6,78 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3, H-5), 9,42 (1H, s, OH-4), 4,95 (1H, dd, $J = 10,0$ & $2,0$ Hz, H-7), 2,05-2,10 (1H, m, H-8a), 1,92-

1,99 (1H, m, H-8b), 6,36 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-3'), 6,44 (1H, dd, $J = 8,5$ & $2,5$ Hz, H-5'), 6,98 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-6'), 2,82-2,89 (1H, m, H-8'a), 2,63-2,68 (1H, m, H-8'b), 3,69 (3H, s, OCH_3).

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): 131,7 (C-1), 127,5 (C-2), 115,0 (C-3), 156,9 (C-4), 115,0 (C-5), 127,5 (C-6), 77,0 (C-7), 29,1 (C-8), 113,8 (C-1'), 155,6 (C-2'), 101,3 (C-3'), 158,5 (C-4'), 106,8 (C-5'), 129,9 (C-6'), 23,9 (C-8'), 55,0 (OCH_3).

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Qua ví dụ được minh họa ở trên, cho thấy rằng phương pháp theo giải pháp hữu ích cho phép (i) tìm ra công thức hóa học của hợp chất diarylpropanoid mới được đặt tên là Macrotricolorin A (công thức 1) và (ii) phương pháp phân lập Macrotricolorin A từ cây Đại cán Tam sắc (*Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser).

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình phân lập hợp chất diarylpropanoid từ cây Đại cán Tam sắc (*Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser.) bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu lấy toàn bộ cây Đại cán Tam sắc, phơi trong bóng râm và sấy khô ở nhiệt độ 40°C, nghiền nguyên liệu thu được nguyên liệu dạng bột;

b) chiết nguyên liệu dạng bột bằng etanol 96° nóng bằng cách ngâm bột thu được ở bước a) với etanol 96° nóng theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong 4 giờ, sau khi loại bỏ bã, phần nước được cô dưới áp suất giảm để thu hồi dung môi thu được cao lỏng;

c) chiết phân đoạn cao lỏng thu được ở bước b) bằng *n*-hexan, sau khi cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết phân đoạn *n*-hexan và dịch nước;

d) tinh chế cao chiết phân đoạn *n*-hexan thu được ở bước c) bằng cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha thường (kích thước 0,040-0,063 mm) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ thể tích ethyl axetat tăng dần 0, 25, 50, 75 và 100%, thu được 05 phân đoạn được ký hiệu từ H.I đến H.V;

e) tinh chế phân đoạn H.II thu được ở bước d) bằng cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha thường (kích thước 0,040-0,063 mm) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ thể tích ethyl axetat tăng dần 5, 10, 15, 20, 25 và 30%, thu được 06 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ H.II.1 đến H.II.6;

g) phân lập hợp chất diarylpropanoid bằng cách đưa phân đoạn H.II.1 thu được ở bước e) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha thường (kích thước 0,040-0,063 mm) và hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 1, 2, 3, 4 và 5%, thu được 05 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ H.II.1.1 đến H.II.1.5; và

h) tinh chế hợp chất diarylpropanoid bằng cách đưa phân đoạn H.II.1.1 thu được ở bước g) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Silicagel pha đảo RP-18 với hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 20:80 (thể tích/thể tích) và tiếp tục tinh chế bằng cách kết tinh lại nhiều lần với hệ dung môi là *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ thể tích 10:1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất diarylpropanoid dạng tinh thể hình kim, màu trắng có tên khoa học là (1*S*)-(-)-1-(4-hydroxyphenyl)-3-(2-hydroxy-4-metoxyphenyl)-propan-1-ol).