

(72) Nguyễn Xuân Nhiệm (VN); Nguyễn Thị Cúc (VN); Phan Văn Kiệm (VN); Châu Văn Minh (VN); Bùi Hữu Tài (VN); Phạm Hải Yến (VN); Nguyễn Thế Cường (VN).

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất flavonol glycosit có công thức (I), trong đó các biến là như được xác định trong bản mô tả và phương pháp phân lập hợp chất này từ lá trà *C. sinensis*. Hợp chất flavonol theo sáng chế có tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza. Hợp chất flavonol glycosit và phương pháp phân lập hợp chất này theo sáng chế rất hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các sản phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên có tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza nhằm nghiên cứu ứng dụng để chữa bệnh tiểu đường. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất flavonol glycosit và phương pháp phân lập hợp chất này từ lá *Camellia sinensis* (L.) Kuntze.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

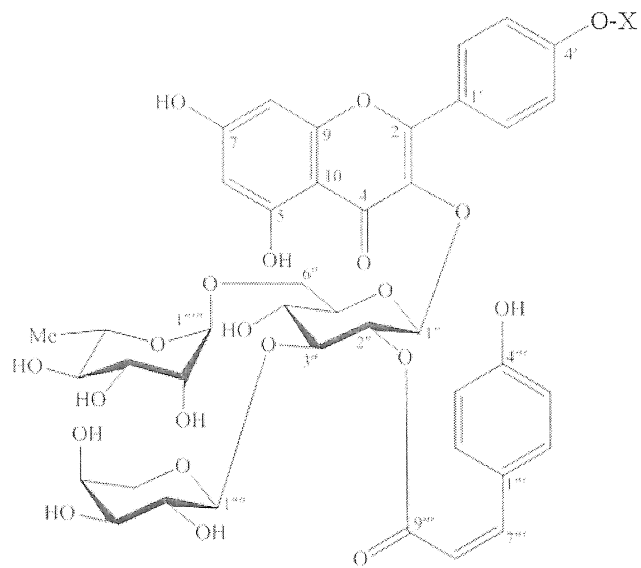
Việc nghiên cứu, phát hiện các hợp chất mới có hoạt tính sinh học từ thiên nhiên nhằm phục vụ cuộc sống của con người là một trong những nhiệm vụ quan trọng đặt ra cho các nhà khoa học. Nguồn tài nguyên sinh vật của nước ta dồi dào, đặc biệt hệ thực vật Việt Nam vô cùng phong phú. Theo ước tính của các nhà khoa học, số loài thực vật bậc cao có mặt ở nước ta khoảng 12.000 loài trong đó có khoảng 3.500 loài là cây thuốc; đây là nguồn nguyên liệu phục vụ cho sản xuất thuốc chữa bệnh. Nhiều cây thuốc trong đó đã được phát hiện có tác dụng hạ đường huyết, có thể sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường.

Bệnh tiểu đường là căn bệnh nguy hiểm và khá phổ biến ở nước ta và trên thế giới. Bệnh tiểu đường thường gây ra những biến chứng nguy hiểm như: các tổn thương thần kinh, tim mạch, thị giác, nguy cơ nhiễm trùng, v.v.

Lá trà xanh cũng thường được sử dụng để hạ đường huyết. Do vậy, việc điều tra, nghiên cứu về lá trà xanh, đặc biệt là phát hiện ra các hợp chất flavonol glycosit mới từ lá trà *Camellia sinensis* (hay *C. sinensis*) sẽ có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao. Nghiên cứu này sẽ góp phần làm rõ giá trị cũng như công dụng của chi Trà *Camellia*. Vì vậy, sẽ góp phần tích cực vào việc khai thác và sử dụng một cách hợp lý nguồn tài nguyên thiên nhiên của đất nước.

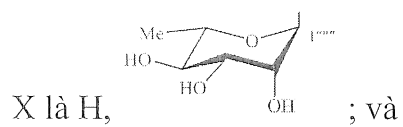
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất hợp chất flavonol glycosit có công thức (I):



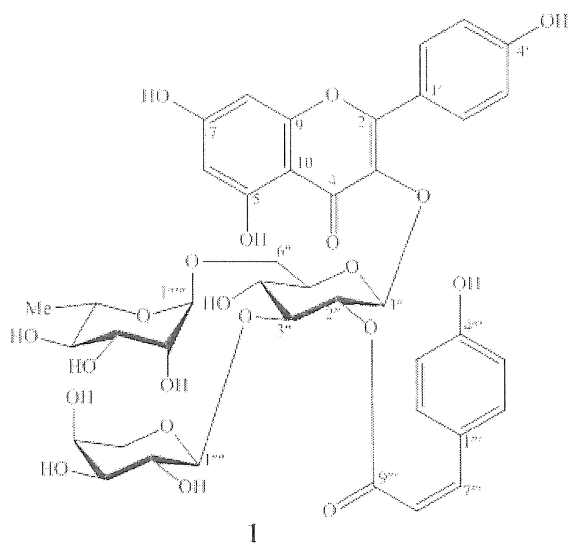
(I)

trong đó:

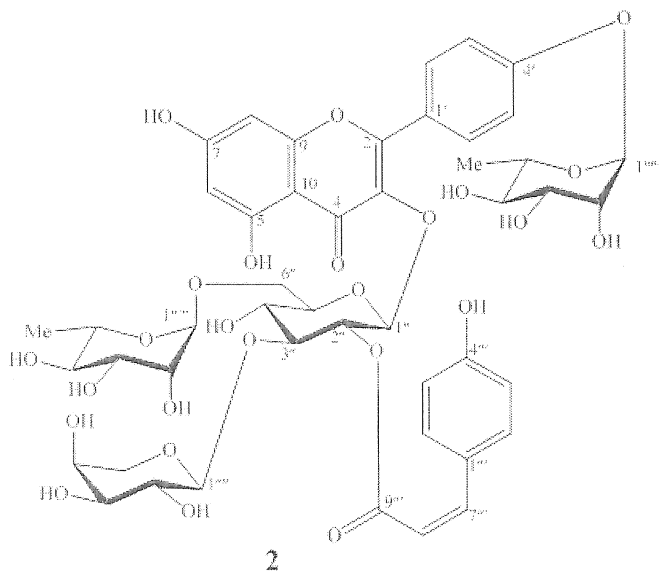


Me là CH₃.

Theo một phương án của khía cạnh thứ nhất, hợp chất có công thức (I) là hợp chất kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)][2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit có công thức (1):



Theo một phương án khác của khía cạnh thứ nhất, hợp chất có công thức (I) là hợp chất 4'-*O*- α -L-rhamnopyranosylkaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)] [2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit có công thức (2):



Các hợp chất flavonol glycosit theo sáng chế thể hiện tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza, và do đó có thể sử dụng để phát triển thành các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập hợp chất flavonol glycosit trên đây từ lá trà *C. sinensis*, phương pháp này bao gồm các bước:

i) thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn mẫu lá cây *C. sinensis*, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần 60 phút;

ii) gom các dịch chiết ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol;

iii) hòa tan cặn chiết metanol với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích;

iv) tiến hành loại bỏ dung môi các dịch chiết dưới áp suất giảm để thu được các cặn chiết *n*-hexan (CS1), diclometan (CS2), etyl axetat (CS3) và dịch chiết nước (CS4);

v) tiến hành loại bỏ dung môi etyl axetat dịch chiết nước (CS4), sau đó đưa lên cột Diaion HP-20, loại bỏ đường bằng nước sau đó tăng dần nồng độ metanol trong nước (25, 50, 75 và 100% metanol) thu được 4 phân đoạn, ký hiệu lần lượt là CS4A-CS4D;

vi) tiến hành phân tách cặn chiết CS4D trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi

rửa giải tăng dần nồng độ metanol (MeOH) trong diclometan (CH_2Cl_2) là $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ tỷ lệ 20/1 $\rightarrow$ 0/1 thu được năm phân đoạn, ký hiệu lần lượt là CS4D1 đến CS4D5;

vii) phân lập các hợp chất trên đây, trong đó:

- tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn CS4D4 được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fujisilysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ CS4D4A đến CS4D4C; và hợp chất: kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)][2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn CS4D4C khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 28% trong nước;
- tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn CS4D5 được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fujisilysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 1/1,2 về thể tích, thu được hai phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ CS4D5A đến CS4D5B; và hợp chất: 4'-*O*- α -L-rhamnopyranosylkaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)] [2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit có công thức (2) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn CS4D5B khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 28% trong nước.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế, trên cơ sở đã nghiên cứu thành phần hóa học của loài *C. sinensis* và phân lập thành công các hợp chất từ loài này, đề xuất các hợp chất có cấu trúc hóa học mới, cụ thể là hợp chất kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)][2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit và 4'-*O*- α -L-rhamnopyranosylkaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)] [2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit. Đây là một phát hiện hoàn toàn mới, hai hợp chất này thuộc lớp chất flavonol glycosit và chưa được phát hiện từ trước đến nay trên thế giới. Hai hợp chất này cũng được đánh giá tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza mà sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn sau đây.

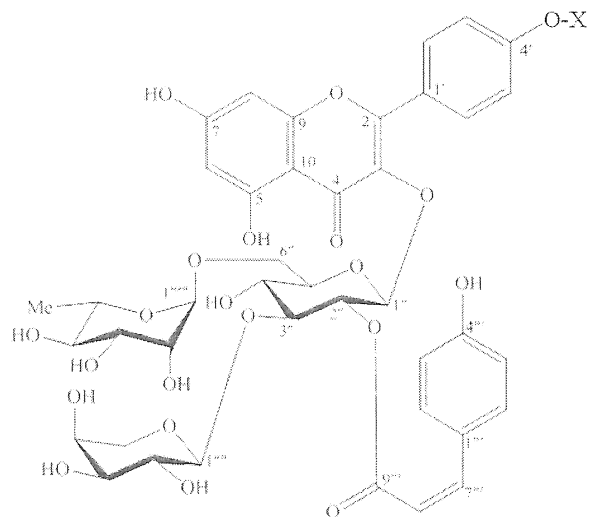
Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế còn được mô tả thông qua các phương án cụ thể minh họa và mô tả chi tiết hơn nữa cho sáng chế. Ngoài ra, cần phải hiểu rằng, các phương án cụ thể sau đây được mô tả chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế và sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể này. Rõ ràng là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trên cơ sở các nội dung mô tả trong bản mô tả này, có thể thực hiện các phương án tương đương mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế như được mô tả trong yêu cầu bảo hộ kèm theo sau đây.

Trong bản mô tả này, các giá trị số nên được hiểu là bao gồm cả nghĩa “khoảng”, cụ thể là chỉ chính giá trị số đó cũng như các giá trị số nằm trong khoảng $\pm 10\%$, tốt hơn là $\pm 5\%$, và tốt nhất là 0% của giá trị số đó.

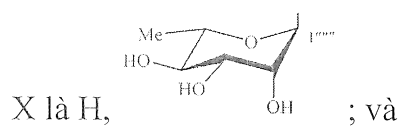
Ngoài ra, trong bản mô tả này, mẫu lá trà là mẫu lá trà *C. sinensis* được thu tại Tân Cương, Thái Nguyên tháng 02 năm 2018. Tên khoa học được giám định bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Mẫu tiêu bản (NCCT-CS1) được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển. Mẫu lá trà *C. sinensis* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm 3 lần, mỗi lần 60 phút, với metanol ở nhiệt độ 50°C sau đó tiến hành chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hóa học theo các phương pháp mô tả dưới đây: Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn (loại DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715) hoặc RP18 F254s (Merck)). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu. Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel hoặc pha đảo. Silica gel có cỡ hạt là 40-63 μm (230-400 mesh, Merck). Pha đảo RP-18 (30 - 50 μm , Fuji silysia Chemical Ltd). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruker AM500 FT NMR. Phổ khối lượng phân giải cao được đo trên máy Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất flavonol glycosit có công thức (I):



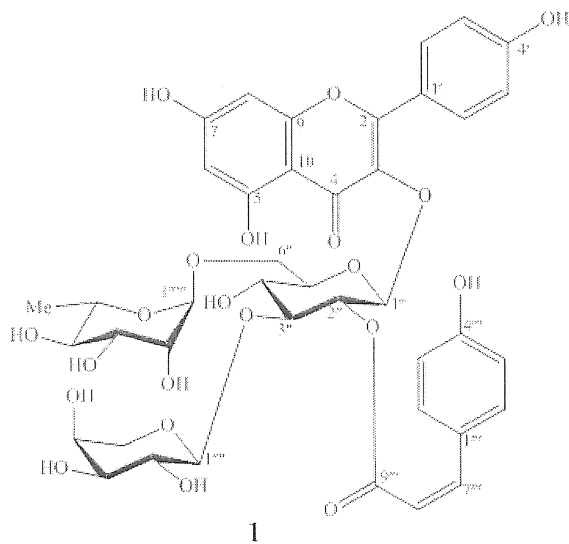
(I)

trong đó:

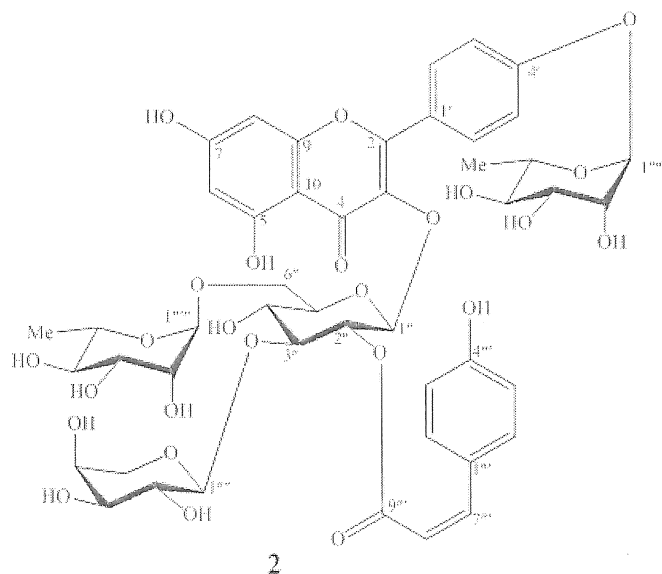


Me là CH₃.

Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức (1):



Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức (2):



Các hợp chất flavonol glycosit trên đây theo sáng chế là các hợp chất có cấu trúc hóa học mới. Các thông số hóa lý của các hợp chất này như sau:

Hợp chất kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)][2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit có công thức (1):

+ Công thức phân tử: $C_{41}H_{44}O_{21}$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 872$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu vàng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 88,0^\circ$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 873,2444 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{41}H_{45}O_{21}]^+$, 873,2448;

Hợp chất 4'-*O*- α -L-rhamnopyranosylkaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)] [2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit có công thức (2):

+ Công thức phân tử: $C_{47}H_{54}O_{25}$;

Khối lượng phân tử: $M = 1018$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu vàng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 76,0^\circ$ (c 01, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 1019.3025 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{47}H_{55}O_{25}]^+$, 1019,3027;

Theo khía cạnh thứ khác, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập hợp chất flavonol glycosit trên đây từ lá trà *C. sinensis*, phương pháp này bao gồm các bước:

i) thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn mẫu lá cây *C. sinensis*, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần 60 phút;

ii) gom các dịch chiết ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol;

iii) hòa tan cặn chiết metanol với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích;

iv) tiến hành loại bỏ dung môi các dịch chiết dưới áp suất giảm để thu được các cặn chiết *n*-hexan (CS1), diclometan (CS2), etyl axetat (CS3) và dịch chiết nước (CS4);

v) tiến hành loại bỏ dung môi etyl axetat dịch chiết nước (CS4), sau đó đưa lên cột Diaion HP-20, loại bỏ đường bằng nước sau đó tăng dần nồng độ metanol trong nước (25, 50, 75 và 100% metanol) thu được 4 phân đoạn, ký hiệu lần lượt là CS4A-CS4D;

vi) tiến hành phân tách cặn chiết CS4D trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol (MeOH) trong diclometan (CH_2Cl_2) là $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ tỷ lệ 20/1 $\rightarrow$ 0/1 thu được năm phân đoạn, ký hiệu lần lượt là CS4D1 đến CS4D5;

vii) phân lập các hợp chất trên đây, trong đó:

- tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn CS4D4 được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fujisilysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ CS4D4A đến CS4D4C; Và hợp chất: kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)][2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn CS4D4C khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 28% trong nước;
- tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn CS4D5 được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fujisilysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 1/1,2 về thể tích, thu được hai phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ CS4D5A

đến CS4D5B; và hợp chất: 4'-O- α -L-rhamnopyranosylkaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)] [2-(Z)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit có công thức (2) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn CS4D5B khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 28% trong nước.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập hai hợp chất flavonol glycosit từ lá trà *C. sinensis*

Mẫu lá cây *C. sinensis* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn (5,0 kg). Sau đó, bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần 60 phút. Các dịch chiết được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol (600 g).

Cặn chiết metanol được hòa tan với nước cất (3 lít) rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích. Các dịch chiết được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết *n*-hexan (CS1, 160 g), diclometan (CS2, 44 g), etyl axetat (CS3, 70 g) và dịch chiết nước (CS4). Dịch chiết nước (CS4) được tiến hành loại bỏ dung môi etyl axetat sau đó đưa lên cột Diaion HP-20, loại bỏ đường bằng nước sau đó tăng dần nồng độ metanol trong nước (25, 50, 75 và 100% metanol) thu được 4 phân đoạn, CS4A-CS4D.

Cặn chiết CS4D (13 g) được tiến hành phân tách trên cột sắc ký (Φ 8 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol trong diclometan là CH₂Cl₂/MeOH tỷ lệ 20/1 $\rightarrow$ 0/1 thu được năm phân đoạn, ký hiệu lần lượt từ CS4D1 đến CS4D5. Phân đoạn CS4D4 (2,0 g) được tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký (Φ 4 cm, L 60 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μ m, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ CS4D4A đến CS4D4C. Hợp chất: kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)][2-(Z)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit (6,0 mg) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn CS4D4C (500,0 mg) khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 28% trong nước.

Phân đoạn CS4D5 (4,0 g) được tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký (Φ 6 cm, L 60 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μ m, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 1/1,2 về thể tích, thu được hai phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu là CS4D5A (0,6g) và CS4D5B (0,4 g). Hợp chất: 4'-*O*- α -L-rhamnopyranosylkaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)] [2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit (8,0 mg) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn CS4D5B khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 28% trong nước.

Hợp chất kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)][2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit có công thức (1).

+ Chất bột vô định hình màu vàng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 88,0^{\circ}$ (*c* 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 873,2444 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{41}H_{45}O_{21}]^+$, 873,2448;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Số liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR (δ , ppm) của hợp chất kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)][2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a)}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a)}$ (mult., <i>J</i> = Hz)	C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a)}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a)}$ (mult., <i>J</i> = Hz)
2	158.8	-	2''-Cou		
3	134.4	-	1'''	127.7	-
4	178.9	-	2''',6'''	133.6	7.66 (d, 8.5)
5	163.4	-	3''',5'''	115.7	6.72 (d, 8.5)
6	100.6	6.19 (s)	4'''	159.9	-
7	167.4	-	7'''	145.1	6.92 (d, 12.5)
8	95.1	6.36 (s)	8'''	117.1	5.92 (d, 12.5)
9	158.8	-	9'''	167.4	-
10	105.1	-	3''-OAra		
1'	122.8	-	1''''	105.3	4.27 (d, 7.0)
2', 6'	132.2	8.02 (d, 9.0)	2''''	72.2	3.51 (m)
3', 5'	116.2	6.92 (d, 9.0)	3''''	74.0	3.50 (m)
4'	161.3	-	4''''	69.6	3.80 (m)
3-OGlc			5''''	67.2	3.55 (m)
1''	100.7	5.59 (d, 8.0)			3.89 (dd, 2.5, 12.5)

2''	74.2	5.16 (dd, 8.0, 9.5)	6''-ORha		
3''	83.8	3.78 (t, 9.5)	1''''	102.3	4.54 (br s)
4''	70.2	3.42 (m)	2''''	72.0	3.63 (br s)
5''	77.0	3.44 (m)	3''''	72.1	3.56 (m)
6''	68.1	3.45 (dd, 4.5, 10.0)	4''''	73.8	3.28 (t, 9.0)
			5''''	69.7	3.48 (m)
			6''''	17.8	1.14 (d, 6.0)

^{a)} Đo trong CD₃OD, Glc: glucopyranosyl, Ara: arabinopyranosyl, Rha: rhamnopyranosyl, Cou: coumaroyl

Hợp chất 4'-*O*- α -L-rhamnopyranosylkaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)] [2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit có công thức (2)

+ Chất bột vô định hình màu vàng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 76,0^\circ$ (*c* 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại *m/z* 1019.3025 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{47}H_{55}O_{25}]^+$, 1019,3027;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Số liệu phổ ¹H- NMR và ¹³C-NMR (δ , ppm) của hợp chất 4'-*O*- α -L-rhamnopyranosylkaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)] [2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit

C	$\delta_C^a)$	$\delta_H^a)$ (mult., <i>J</i> = Hz)	C	$\delta_C^a)$	$\delta_H^a)$ (mult., <i>J</i> = Hz)
2	158.2	-	4'''	159.9	-
3	134.9	-	7'''	145.2	6.93 (d, 12.5)
4	179.0	-	8'''	117.1	5.93 (d, 12.5)
5	163.1	-	9'''	167.3	-
6	100.1	6.21 (s)	3''-OAra		
7	166.4	-	1''''	105.3	4.28 (d, 7.0)
8	95.0	6.39 (s)	2''''	72.2	3.52 (m)
9	158.5	-	3''''	74.0	3.50 (m)
10	105.7	-	4''''	69.6	3.80 (m)
1'	125.5	-	5''''	67.2	3.55 (m)
2', 6'	132.1	8.09 (d, 9.0)			3.88 (br d, 10.5)
3', 5'	117.0	7.21 (d, 9.0)	6''-ORha		
4'	159.7	-	1''''	102.2	4.51 (br s)
3-OGlc			2''''	72.0	3.61 (br s)
1''	100.6	5.61 (d, 7.0)	3''''	72.1	3.52 (m)

2''	74.2	5.15 (dd, 7.0, 9.0)	4''''	73.8	3.28 (t, 9.0)
3''	83.7	3.78 (t, 9.0)	5''''	69.7	3.46 (m)
4''	70.2	3.40 (m)	6''''	17.9	1.13 (d, 6.0)
5''	76.9	3.47 (m)	4'-ORha		
6''	68.2	3.41 (dd, 4.5, 10.0)	1''''	99.5	5.60 (br s)
		3.86 (m)	2''''	71.9	4.07 (br s)
2''-Cou			3''''	72.1	3.91 (m)
1'''	127.7	-	4''''	73.8	3.50 (m)
2''',6'''	133.7	7.67 (d, 8.5)	5''''	70.9	3.67 (m)
3''',5'''	115.7	6.73 (d, 8.5)	6''''	18.1	1.28 (d, 6.0)

^{a)} Đo trong CD₃OD, Glc: glucopyranosyl, Ara: arabinopyranosyl, Rha: rhamnopyranosyl, Cou: coumaroyl.

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác dụng dược lý của các hợp chất flavonol glycosit

Các hợp chất flavonol glycosit theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza như sau:

Hoạt tính ức chế α -glucosidaza được thực hiện dựa trên phản ứng thủy phân 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranosit (p NPG) thành đường glucose và *p*-nitrophenol, hợp chất có màu vàng, dưới xúc tác của enzym α -glucosidaza. Khi mẫu thử có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza, sự tạo thành hợp chất *p*-nitrophenol sẽ giảm, do vậy mật độ quang (OD) của *p*-nitrophenol so với mẫu đối chứng, không bị ức chế sẽ giảm theo. Mật độ quang (OD) của *p*-nitrophenol sinh ra sau phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm và được dùng để đánh giá hoạt động ức chế enzym của mẫu thử. Nồng độ ức chế 50%, IC₅₀ được xây dựng trên 5 nồng độ thử nghiệm. Giá trị IC₅₀ được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 5.0. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

Trong mỗi giếng nghiên cứu chứa: 50 μ L mẫu thử và 100 μ L dung dịch enzym α -glucosidaza được ủ 25°C trong 5 phút, tiếp tục bổ sung 50 μ L 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranosit, đo trên máy ELISA ở bước sóng 405 nm. Chất chuẩn dương (*positive control*) acarboza được dùng để kiểm soát độ ổn định và đánh giá hoạt tính ức chế tương đương. Các phép thử được lặp lại 3 lần. Acarboza được sử dụng làm chất đối chứng dương.

Kết quả được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Kết quả hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza

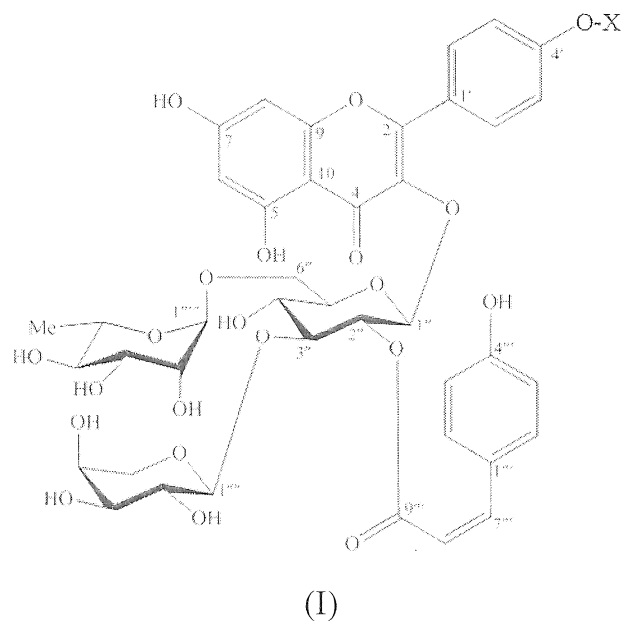
Tên mẫu	Nồng độ thử ($\mu\text{g/mL}$)	% Ức chế	Sai số
kaempferol 3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)][2-(<i>Z</i>)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit	200	41,4	4,0
4'- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosylkaempferol 3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)] [2-(<i>Z</i>)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit	200	32,1	2,7
Acarboza	200	82,7	5,9

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

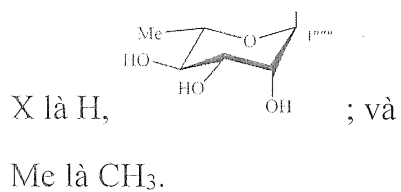
Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hai hợp chất, kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)][2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit và 4'-*O*- α -L-rhamnopyranosylkaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)] [2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit từ lá trà *C. sinensis* thu hái tại Tân Cương, Thái Nguyên. Hai hợp chất này thể hiện hoạt tính khá cao ức chế enzym α -glucosidaza so với chất chuẩn đối chứng acarboza. Sáng chế này tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường dựa trên việc khai thác nguồn dược liệu quý, sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

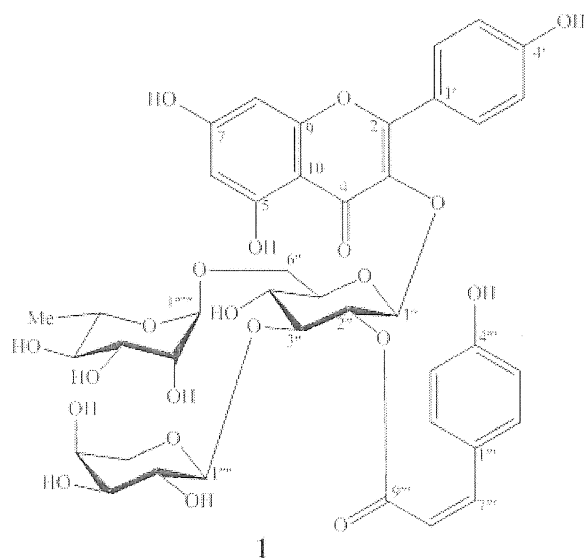
1. Hợp chất flavonol glycosit có công thức (I):



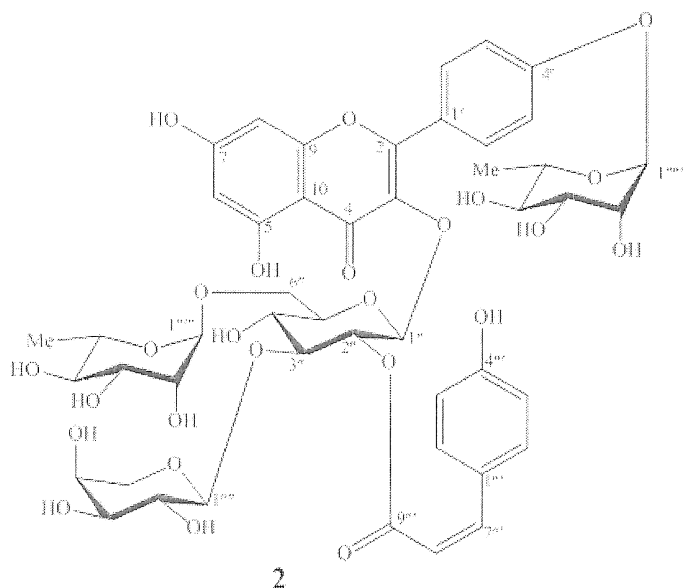
trong đó:



2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức (1):



3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức (2):



4. Phương pháp chiết hợp chất flavonol glycosit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 từ lá trà *C. sinensis*, phương pháp này bao gồm các bước:

- i) thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn mẫu lá cây *C. sinensis*, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần 60 phút;
- ii) gom các dịch chiết ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol;
- iii) hòa tan cặn chiết metanol với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích;
- iv) tiến hành loại bỏ dung môi các dịch chiết dưới áp suất giảm để thu được các cặn chiết *n*-hexan (CS1), diclometan (CS2), etyl axetat (CS3) và dịch chiết nước (CS4);
- v) tiến hành loại bỏ dung môi etyl axetat dịch chiết nước (CS4), sau đó đưa lên cột Diaion HP-20, loại bỏ đường bằng nước sau đó tăng dần nồng độ metanol trong nước (25, 50, 75 và 100% metanol) thu được 4 phân đoạn, ký hiệu lần lượt là CS4A-CS4D;
- vi) tiến hành phân tách cặn chiết CS4D trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol (MeOH) trong diclometan (CH₂Cl₂) là CH₂Cl₂/MeOH tỷ lệ 20/1→0/1 thu được năm phân đoạn, ký hiệu lần lượt là CS4D1 đến CS4D5;

vii) phân lập các hợp chất trên đây, trong đó:

- tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn CS4D4 được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fujisilysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ CS4D4A đến CS4D4C; Và hợp chất: kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)][2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn CS4D4C khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 28% trong nước;
- tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn CS4D5 được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fujisilysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 1/1,2 về thể tích, thu được hai phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ CS4D5A đến CS4D5B; và hợp chất: 4'-*O*- α -L-rhamnopyranosylkaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)] [2-(*Z*)-coumaroyl]- β -D-glucopyranosit có công thức (2) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn CS4D5B khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 28% trong nước.