



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0040852

(51)<sup>7</sup> A61K 36/82; C07H 17/04; C07G 3/00; (13) B  
A61P 39/06; C07D 311/00

(21) 1-2019-02231

(22) 02/05/2019

(45) 26/08/2024 437

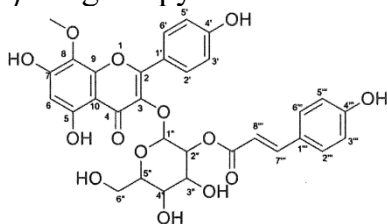
(43) 25/09/2019 378A

(73) Hợp tác xã bảo tồn và phát triển dược liệu Sóc Sơn (VN)  
Thôn Phúc Xuân, xã Bắc Sơn, huyện Sóc Sơn, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thanh Tuyên (VN); Trần Văn Hiệu (VN); Phạm Gia Điền (VN); Vũ Đình Hoàng (VN); Trần Ninh (VN); Nguyễn Thế Hùng (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT SEXANGULARETIN 3-O-(2''-O-(E)-P-CUMAROYL-B-D-GLUCOPYRANOSID TỪ HOA CÂY TRÀ HOA VÀNG (CAMELLIA HAKODAE NINH)

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất có hoạt tính sinh học từ cây trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh), cụ thể là sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất sexangularetin 3-O-(2''-O-(E)-p-cumaroyl-β-D-glucopyranosid có công thức (I) từ hoa của cây trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh). Bằng cách chiết chọn lọc, phương pháp theo sáng chế phân lập được hợp chất (I) có hoạt tính chống oxy hóa quét gốc tự do DPPH tốt, và gây độc tế bào yếu đối với hai dòng tế bào ung thư người là ung thư biểu mô (KB) và ung thư phổi (Lu). Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến hợp chất sexangularetin 3-O-(2''-O-(E)-p-cumaroyl-β-D-glucopyranosid có công thức (I):



(I)

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa học và các hợp chất thiên nhiên có nguồn gốc từ thực vật và có hoạt tính sinh học, cụ thể là sáng chế đề cập đến hợp chất sexangularetin 3-O-(2''-O-(E)-p-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid và phương pháp phân lập hợp chất này từ hoa cây trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh).

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chi Trà *Camellia* là một chi lớn thuộc họ chè Theaceae với đặc điểm là thân cây gỗ (loại nhỏ), cao 3- 5m, lá cây chịu bóng, là loại cây ưa ẩm và thường mọc dưới tán rừng tự nhiên. *Camellia* có nhiều loài hoa đẹp với đủ các màu sắc khác nhau như trắng, đỏ, hồng, vàng với thời gian ra hoa khá dài (thường kéo dài từ tháng 10 năm trước đến tháng 2 năm sau) nên trước đây thường được sử dụng làm cây cảnh trang trí vào dịp Tết.

Trong chi *Camellia*, ngoài trà xanh *Camellia sinensis* đã được biết đến nhiều về tác dụng chống oxy hoá, các loài *Camellia* có hoa màu vàng, hiện mới chỉ phát hiện được ở Việt Nam và Trung Quốc, cũng đang ngày thu hút sự quan tâm không chỉ vì vẻ đẹp của loài hoa này mà còn ở các công dụng tốt cho sức khỏe đã được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền.

Theo y học cổ truyền Trung Quốc, nước sắc lá trà hoa vàng có tác dụng hạ huyết áp rõ ràng và tác dụng kéo dài, ức chế sự tụ tập của tiểu cầu, chống sự hình thành huyết khối gây tắc nghẽn mạch máu, phòng ngừa ung thư và ức chế sự phát triển của các khối u khác, hưng phấn thần kinh, lợi tiểu, giải độc gan và thận, ngăn ngừa xơ vữa động mạch máu, ức chế và tiêu diệt vi khuẩn và chống viêm, chống dị ứng và duy trì trạng thái bình thường của tuyến giáp. Từ đó, đã có nhiều nghiên cứu sâu về loài cây này nhằm tìm ra các hoạt chất mang lại các công dụng nêu trên. Các nghiên cứu về Kim hoa trà, một loài trà hoa vàng đặc hữu của Trung Quốc, có tên khoa học là *Camellia Chrysantha*, cho thấy trong hoa và lá của loài cây này có hàm lượng flavonoid khá cao và khác nhau nhiều về các lớp chất, ngoài ra còn có nhiều các nguyên tố vi lượng như Ge, Se, Mn, Mo, Zn...cũng được tìm thấy. Các hoạt chất flavonoid tìm thấy có tác dụng hạ huyết áp, giảm tiểu đường, hạ cholesterol, hạ mỡ

máu, chống u bướu là hoàn toàn phù hợp với các công dụng đã được biết đến trong dân gian. Từ các công trình nghiên cứu này, hiện đã có nhiều loại thực phẩm chức năng khác nhau được chế biến từ *Camellia Chrysantha* mang lại giá trị kinh tế cao.

Flavonoit được biết đến là một loại chất chuyển hóa trung gian của thực vật và giữ vai trò là chất bảo vệ, chống oxy hóa, bảo tồn axit ascorbic trong tế bào, ngăn cản một số tác nhân gây hại cho cây (vi khuẩn, virus, côn trùng, v.v.), và thậm chí một số loại flavonoit còn có tác dụng điều hòa sự sinh trưởng của cây cối. Ngoài ra, qua các nghiên cứu chuyên sâu, đã phát hiện được nhóm flavonoit có mặt trong các loại trà xanh có tác dụng nổi bật là khả năng chống oxy hóa mạnh.

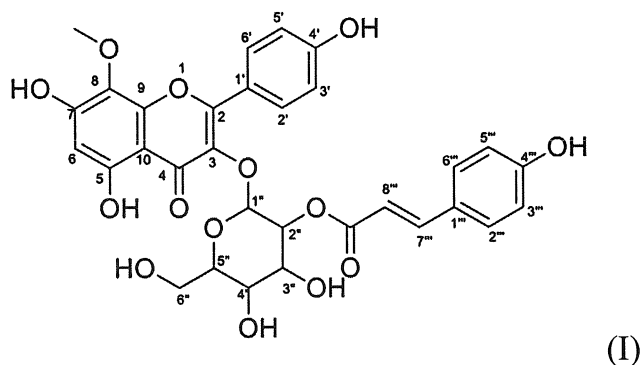
Ở Việt Nam, trà hoa vàng lần đầu tiên được người Pháp phát hiện đầu tiên vào những năm 1910. Đến nay, đã xác định được hơn 20 loài trà hoa vàng đặc hữu chỉ có ở Việt Nam. Trong dân gian, trà hoa vàng thường được sử dụng dưới dạng nước uống (trà) chủ yếu được sắc từ lá và đôi khi là hoa trà khô, với các công dụng như giải độc gan, giảm căng thẳng, phòng ngừa các bệnh mỡ máu, tim mạch, v.v. Với tiềm năng cao như thế, loài cây này đang bị khai thác và sử dụng với nhiều mục đích khác nhau, dẫn đến số lượng cũng như khu vực phân bố của loài cây này ngày càng bị thu hẹp một cách nhanh chóng. Chính vì vậy, việc định hướng nghiên cứu và bảo tồn nguồn gen cho hệ thực vật này là hết sức cần thiết, và hiện đã có một số dự án nghiên cứu được tiến hành nhằm bảo tồn và nhân giống loài cây quý này. Tuy nhiên, như đã biết, vì hàm lượng và cả thành phần hóa học của các hoạt chất quý có thể có trong cây không những phụ thuộc vào từng loài mà còn phụ thuộc vào điều kiện thổ nhưỡng, ví dụ, cây mọc ở vùng nhiệt đới và núi cao thường có hàm lượng hoạt chất nhiều hơn so với cây mọc ở nơi thiếu ánh sáng, thậm chí còn sản sinh ra các lớp chất khác nhau nên việc nghiên cứu thành phần hoá học trên một đối tượng cụ thể tạo điều kiện cho việc định hướng bảo tồn cũng như phát triển vùng trồng cây trà làm dược liệu để phục vụ sức khỏe cộng đồng, phát triển kinh tế xã hội và đặc biệt là kinh tế vùng miền là hướng cần thiết, cấp bách của các nhà khoa học và các nhà đầu tư.

Với mục đích nghiên cứu nhằm tìm ra các hoạt chất có hoạt tính sinh học, cụ thể là từ cây trà hoa vàng, nhằm tìm ra các hợp chất có hoạt tính sinh học để phát triển dược phẩm. Cần có các phương pháp phân lập các hoạt chất sinh học cũng như phương pháp phân lập các hoạt chất này nhằm đánh giá một cách chính xác về tác dụng, khả năng sản xuất cũng như ứng dụng phát triển nguồn dược chất từ cây trà hoa vàng này, nhằm góp phần vào việc định hướng phát triển kinh tế xã hội.

### Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là sáng chế đề cập đến hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid phân lập được từ hoa của cây trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh) và phương pháp phân lập hợp chất này.

Theo mục đích thứ nhất, sáng chế đề cập đến hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid phân lập được từ hoa của cây trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh) có công thức (I) sau:



Hợp chất hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid theo sáng chế có hoạt tính chống oxy hoá quét gốc tự do DPPH, và có hoạt tính gây độc tế bào trên hai dòng tế bào ung thư người thực nghiệm là ung thư biểu mô (KB) và ung thư phổi (Lu).

Theo mục đích thứ hai, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid từ hoa cây trà hoa vàng, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) thu cao chiết ethanol tổng bằng cách sấy lạnh hoa cây trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh), nghiền nhỏ thu nguyên liệu dạng bột, sau đó ngâm chiết 3 lần với rượu ethanol ở nhiệt độ 60°C, mỗi lần 60 phút trong điều kiện siêu âm, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/2 (w/v), gộp dịch chiết và lọc bỏ tạp chất, cất loại bỏ dung môi ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện áp suất giảm thu được cao chiết ethanol tổng;

b) thu phân đoạn giàu flavonoid bằng cách hòa tan cao chiết ethanol tổng với một lượng metanol rồi tẩm với chất hấp phụ là oxit silic SiO<sub>2</sub> và làm khô ở áp suất giảm và nghiền mịn, sau đó nhồi lên cột sắc ký chứa silicagel nhồi sẵn, và rửa giải lần lượt với các hệ dung môi bao gồm *n*-hexan, diclometan, etylaxetat, axeton, metanol, và metanol:axit axetic 9/1, thu phân đoạn rửa giải bằng etylaxetat và cất loại bỏ dung môi

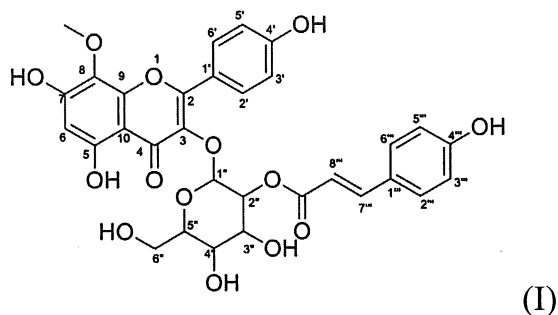
trong điều kiện áp suất giảm, cặn chiết này được nhồi lên cột sắc ký silica gel 60 có kích thước hạt nằm trong khoảng từ 0,040 đến 0,063 mm và rửa giải bằng hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  thay đổi với các tỷ lệ dung môi tương ứng là 100/0; 90/10; 80/20; 70/30; 40/60 và 0/100 (theo thể tích), thu phân rửa giải  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  có tỷ lệ 80/20 (theo thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được phân đoạn giàu flavonoid;

c) thu phân đoạn giàu nhóm chất sexangularetin bằng cách hòa tan phân đoạn giàu flavonoid với một lượng vừa đủ dung môi  $\text{CH}_3\text{OH}$  nồng độ 98,75%, sau đó nhồi lên cột silica gel 60 kích thước nằm trong khoảng từ 0,040 đến 0,063mm và rửa giải bằng hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  thay đổi tăng dần độ phân cực theo tỷ lệ bao gồm 90/10; 80/20; 70/30; 60/40; 0/100 (theo thể tích) thu phân đoạn chứa sexangularetin trên cơ sở kiểm tra sắc ký lớp mỏng, tiếp đó nhồi phân đoạn này lên cột sắc ký sephadex LH-20 và rửa giải bằng metanol với mỗi phân đoạn 100 ml, thu phân đoạn thứ ba giàu nhóm chất sexangularetin; và

d) thu hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid bằng cách cô loại dung môi phân đoạn giàu nhóm chất sexangularetin rồi hòa trong hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  tỷ lệ 8/2 (theo thể tích) thu phần kết tủa, cuối cùng nhồi phần kết tủa này trên cột Sephadex LH-20 và rửa giải với metanol, sau khi cô loại dung môi thu trong điều kiện áp suất giảm thu được hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid dưới dạng bột vô định hình màu vàng nhạt.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid phân lập được từ hoa của cây trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh) có công thức (I). Mẫu hoa trà *Camellia hakodae* Ninh tươi thu được đem sấy lạnh, nghiền nhỏ và ngâm chiết ba lần với rượu etylic ở nhiệt độ 60°C với sự hỗ trợ của thiết bị sóng siêu âm, mỗi lần tối thiểu 60 phút và tiến hành chiết xuất, phân lập, và xác định cấu trúc hóa học theo phương pháp được mô tả bên dưới: phát hiện chất bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng TLC Silica gel 60 F254 với các hệ dung môi khác nhau. Tinh chế bằng sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là Silica gel 60,  $\text{SiO}_2$  (0,040 – 0,063 mm) và Sephadex LH-20 bằng dung môi metanol; xác định cấu trúc bằng phổ khối lượng ion hoá phun điện tử có độ phân giải cao (HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều proton ( $^1\text{H}$ -NMR và  $^{13}\text{C}$ -NMR), phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều (HSQC, HMBC). Hợp chất này có công thức (I) sau:



Hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid có công thức (I) nêu trên có công thức phân tử:  $C_{31}H_{28}O_{14}$ ; khối lượng phân tử:  $M = 624$ , là chất bột vô định hình màu vàng nhạt; phổ khối lượng HR-ESI-MS tại  $m/z$  625,1548 ( $[M+H]^+$ ).

Hợp chất hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid theo sáng chế có hoạt tính chống oxy hoá quét gốc tự do DPPH, và có hoạt tính gây độc tế bào trên hai dòng tế bào ung thư người thực nghiệm là ung thư biểu mô (KB) và ung thư phổi (Lu).

Theo mục đích thứ hai, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid từ hoa cây trà hoa vàng, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: thu cao chiết ethanol tổng, thu phân đoạn giàu flavonoid, thu phân đoạn giàu nhóm chất sexangularetin và thu hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid.

Trong bước thu cao chiết ethanol tổng bằng cách sấy lạnh hoa cây trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh), nghiền nhỏ thu nguyên liệu dạng bột, sau đó ngâm chiết 3 lần với rượu ethanol ở nhiệt độ 60°C, mỗi lần 60 phút trong điều kiện siêu âm, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/2 (w/v), gộp dịch chiết và lọc bỏ tạp chất, cất loại bỏ dung môi ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện áp suất giảm thu được cao chiết ethanol tổng.

Trong bước thu phân đoạn giàu flavonoid bằng cách hòa tan cao chiết ethanol tổng với một lượng metanol rồi tẩm với chất hấp phụ là oxit silic  $SiO_2$  và làm khô ở áp suất giảm và nghiền mịn, sau đó nhồi lên cột sắc ký chứa silicagel nhồi sẵn, và rửa giải lần lượt với các hệ dung môi bao gồm *n*-hexan, diclometan, etylaxetat, axeton, metanol, và metanol:axit axetic 9/1 (theo thể tích), thu phân đoạn rửa giải bằng etylaxetat và cất loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm, cặn chiết này được nhồi lên cột sắc ký silica gel 60 có kích thước hạt nằm trong khoảng từ 0,040 đến 0,063 mm và rửa giải bằng hệ dung môi  $CH_2Cl_2/MeOH$  thay đổi với các tỷ lệ dung môi tương ứng là 100/0; 90/10; 80/20; 70/30; 40/60 và 0/100 (theo thể tích), thu phân rửa giải  $CH_2Cl_2/MeOH$

có tỷ lệ 80/20 (theo thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được phân đoạn giàu flavonoid.

Trong bước thu phân đoạn giàu nhóm chất sexangularetin bằng cách hòa tan phân đoạn giàu flavonoid với một lượng vừa đủ dung môi  $\text{CH}_3\text{OH}$  nồng độ 98,75%, sau đó nhồi lên cột silica gel 60 kích thước nằm trong khoảng từ 0,040 đến 0,063mm và rửa giải bằng hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  thay đổi tăng dần độ phân cực theo tỷ lệ bao gồm 90/10; 80/20; 70/30; 60/40; 0/100 (theo thể tích) thu phân đoạn chứa sexangularetin trên cơ sở kiểm tra sắc ký lớp mỏng, tiếp đó nhồi phân đoạn này lên cột sắc ký sephadex LH-20 và rửa giải bằng metanol với mỗi phân đoạn 100 ml, thu phân đoạn thứ ba giàu nhóm chất sexangularetin.

Trong bước thu hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid bằng cách cô loại dung môi phân đoạn giàu nhóm chất sexangularetin rồi hòa trong hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  tỷ lệ 8/2 (theo thể tích) thu phần kết tủa, cuối cùng nhồi phần kết tủa này trên cột Sephadex LH-20 và rửa giải với metanol, sau khi cô loại dung môi thu trong điều kiện áp suất giảm thu được hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid dưới dạng bột vô định hình màu vàng nhạt.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### ***Ví dụ 1: Phân lập hợp chất sexangularetin 3-O-(2''-O-(E)-p-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid từ hoa cây trà hoa vàng***

Mẫu hoa của cây trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh) tươi được thu hái từ vườn bảo tồn và phát triển dược liệu Sóc Sơn được sấy lạnh đến khô. Cho 5 kg hoa trà khô được nghiền nhỏ cho vào thùng inox 12 lít. Bổ sung 10 lít EtOH 96% vào thùng, và ngâm chiết siêu âm ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 60 phút rồi rút dịch chiết. Lặp lại quá trình ngâm chiết thêm 2 lần, mỗi lần sử dụng 5 lít EtOH 96%. Gộp dịch chiết của 3 lần lại, lọc và cô loại dung môi ở 50°C, dưới áp suất giảm bằng máy hút chân không thu được 200 gam cao chiết etanol tổng.

Hoà tan 200 gam mẫu cao thô thu được với 1 lít metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$  98,85%) rồi tẩm với 200 gam  $\text{SiO}_2$ . Sau đó làm khô dưới áp suất giảm rồi nghiền mịn bằng cối sứ đến kích thước hạt đồng đều. Đưa toàn bộ mẫu tẩm  $\text{SiO}_2$  lên cột sắc ký đã nhồi sẵn 200 gam silica gel 60 (kích thước hạt nằm trong khoảng từ 0,040 đến 0,063 mm), nhồi chặt rồi tiến hành rửa giải với các loại dung môi lần lượt là: *n*-hexan; diclometan; etylaxetat; axeton; metanol, và methanol/axit axetic tỷ lệ 9/1 (theo thể tích). Dịch rửa

giải ở các phân đoạn này được thu gom và cô loại dung môi ở áp suất giảm để thu các cặn chiết tương ứng. Qua khảo sát định tính bằng sắc ký bản mỏng, thu phân đoạn etyl axetat (ký hiệu là HVE) giàu flavonoid.

Hoà tan 40 gam cặn chiết HVE thu được ở trên trong lượng vừa đủ dung môi 100 ml CH<sub>3</sub>OH 98,85%, và đưa lên cột silica gel 60 (0,040 – 0,063 mm) để tiến hành sắc ký cột với hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH có độ phân cực tăng dần. Tổng số chạy 600ml thu 6 phân đoạn, tỷ lệ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH thay đổi theo từng phân trong mỗi phân đoạn lần lượt là 100/0; 90/10; 80/20; 70/30; 60/40; 0/100 (mỗi phân đoạn 100ml). Thu được các dịch rửa giải tương ứng, cô loại dung môi các dịch rửa giải này dưới điều kiện áp suất giảm thu được 6 phân đoạn được ký hiệu lần lượt từ F1 đến F6. Sau khi khảo sát bằng sắc ký lớp mỏng, lựa chọn phân đoạn F3 giàu flavonoid để tiếp tục tách chiết và tinh chế.

Hoà tan 19 gam phân đoạn F3 giàu flavonoid trong 40 ml dung môi CH<sub>3</sub>OH 98,85% với lượng vừa đủ. Tiếp đó nhồi lên cột silica gel 60 (0,040 – 0,063 mm) và tiến hành sắc ký với hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH có độ phân cực tăng dần. Tổng thể tích các phân đoạn là 500ml tương ứng với các tỷ lệ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH theo thể tích là 90/10; 80/20; 70/30; 60/40; 0/100 (mỗi phân đoạn 100ml) thu được năm dịch rửa giải tương ứng. Sau khi cô loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 5 phân đoạn nhỏ, được ký hiệu lần lượt từ F3.1 đến F3.5. Khảo sát 5 phân đoạn này bằng sắc ký lớp mỏng với nhóm chất sexangularetin, lựa chọn phân đoạn thứ ba (F3.3) để tinh chế tiếp bằng sắc ký cột Sephadex LH-20 với dung môi rửa giải metanol. Từ 2 gam phân đoạn F3.3, sau khi chạy sắc ký cột Sephadex LH-20 với 500 ml dung môi metanol thu được 5 phân đoạn nhỏ tương ứng với thể tích từng phân đoạn là 100 ml và được ký hiệu lần lượt từ F3.3.1 đến F3.3.5.

Phân đoạn thứ ba (F3.3.3) 100 mg được kết tủa bằng hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH tỷ lệ 8/2 theo thể tích thu được 36 mg chất rắn có độ sạch 70%. Tiếp tục nhồi 36 mg chất rắn này lên cột sắc ký Sephadex LH-20 và rửa giải với 200 ml dung môi metanol thu được 15 mg chất sạch dưới dạng chất bột vô định hình màu vàng nhạt (ký hiệu HV9A1).

#### ***Ví dụ 2: Xác định cấu trúc của hợp chất phân lập từ hoa cây trà hòa vàng***

Để xác định cấu trúc phân tử của hợp chất thu được từ Ví dụ 1, thực hiện phân tích khối phổ ion hoá phun điện tử có độ phân giải cao (HR-ESI-MS), qua đó xác định

được hợp chất HV9A1 có công thức phân tử là  $C_{31}H_{28}O_{14}$  tại pic ion giả phân tử  $m/z$  625,1548 ( $[M+H]^+$ ).

Tiếp tục phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1H$ -NMR cho thấy sự hiện diện của aglycon flavonoid với 1 tín hiệu proton thơm ở 6,21 (1H, s) và nhóm thế methoxy ở 3,84 (3H, s, 8-OCH<sub>3</sub>) đặc trưng cho vòng flavonoid A với 5 vị trí thế và 4 tín hiệu proton thơm ở 8,08 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz, H-2',6') và 6,92 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz, H-3',5') đặc trưng cho vòng thơm hệ AABB của vòng flavonoid B, Ngoài ra, phổ  $^1H$ -NMR của chất HV9A1 còn cho sự hiện diện của phần đường  $\beta$ -D-glucoza gắn vào nhóm thế (*E*)-*p*-coumaroyl với tín hiệu proton anomeric ở 5,70 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1''), proton ở 5,05 (1H, t,  $J = 9,0$  Hz, H-2'') gợi ý sự thay thế bởi nhóm (*E*)-*p*-coumaroyl, các tín hiệu proton đường còn lại cũng xuất hiện ở 3,35-3,81. Các tín hiệu proton thơm ở 7,45 (2H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-2'',6'') và 6,82 (2H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-3'',5'') và 2 tín hiệu proton *trans*-olefin ở 7,66 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz, H-7'') và 6,34 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz, H-8'') chứng tỏ sự hiện diện của nhóm thế (*E*)-*p*-coumaroyl trong hợp chất HV9A1. Toàn bộ dữ liệu phổ  $^1H$ -NMR của hợp chất HV9A1 thu được từ Ví dụ 1 được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Dữ liệu phổ  $^1H$ -NMR

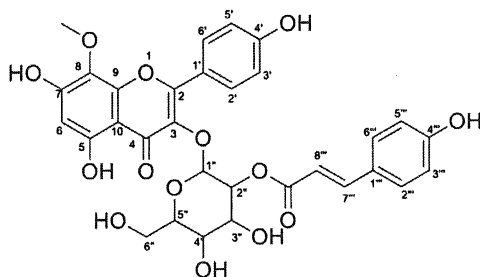
| <b>1<sup>a</sup></b> |            |                              |
|----------------------|------------|------------------------------|
| Vị trí               | $\delta_C$ | $\delta_H$ mult. ( $J$ (Hz)) |
| 1                    | -          |                              |
| 2                    | 157,9      |                              |
| 3                    | 134,8      |                              |
| 4                    | 179,2      |                              |
| 5                    | 158,1      |                              |
| 6                    | 100,6      | 6,21 s                       |
| 7                    | 160,1      |                              |
| 8                    | 129,4      |                              |
| 9                    | 150,3      |                              |
| 10                   | 105,2      |                              |
| OCH <sub>3</sub>     | 61,8       | 3,84 s                       |
| 1'                   | 122,9      |                              |
| 2', 6'               | 132,1      | 8,08 d (9,0)                 |
| 3', 5'               | 116,8      | 6,92 d (9,0)                 |
| 4'                   | 161,6      |                              |
| 1''                  | 100,6      | 5,70 d (8,0)                 |
| 2''                  | 75,8       | 5,05 t (9,0)                 |
| 3''                  | 76,3       | 3,62 m                       |
| 4''                  | 78,8       | 3,35 m                       |
| 5''                  | 71,6       | 3,44 d (9,0)                 |
| 6''                  | 62,5       | 3,81 dd (2,0; 13,5); 3,62 m  |

|             |       |               |
|-------------|-------|---------------|
| 1'''        | 127,3 |               |
| 2''' , 6''' | 131,2 | 7,45 d (8,0)  |
| 3''' , 5''' | 116,3 | 6,82 d (8,0)  |
| 4'''        | 161,3 |               |
| 7'''        | 146,9 | 7,66 d (16,0) |
| 8'''        | 115,2 | 6,34 d (16,0) |
| 9'''        | 168,4 |               |

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR cho 27 tín hiệu cacbon, trong đó có 1 tín hiệu cacbon metoxyl ở 61,8 (8-OCH<sub>3</sub>) và các tín hiệu đặc trưng cho flavonoid: 1 tín hiệu carbonyl ở 179,2 (C-4), 7 tín hiệu cacbon gắn nguyên tử O ở 157,9 (C-2), 134,8 (C-3), 158,1 (C-5), 160,1 (C-7), 129,4 (C-8), 150,3 (C-9), 161,6 (C-4'), 3 tín hiệu của 5 cacbon thơm methin ở 100,6 (C-6), 132,1 (C-2',6'), 116,8 (C-3',5') và 2 tín hiệu cacbon thơm không nhóm thế ở 105,2 (C-10), 122,9 (C-1'). Các tín hiệu cacbon trong khoảng 62,5-100,6 đặc trưng cho cacbon đường  $\beta$ -D-glucosa. Thêm vào đó, phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR cũng cho thấy 1 carbonyl ở 168,4 (C-9'''), 2 cacbon olefin ở 115,2 (C-8''') và 146,9 (C-7''') cùng 4 tín hiệu của vòng thơm hệ AABB ở 127,3 (C-1'''), 131,2 (C-2''',6'''), 116,3 (C-3''',5''') và 161,3 (C-4'''). Các tín hiệu này đặc trưng cho phần (*E*)-*p*-coumaroyl. Từ các dữ liệu phổ trên, nhận định được hợp chất HV9A1 thu được từ Ví dụ 1 là dẫn xuất flavonoid glucosid với 1 nhóm thế (*E*)-*p*-coumaroyl. Phần aglycon là flavonoid có vòng A với 2 nhóm thế hydroxyl và 1 nhóm thế methoxy và vòng B với hệ AABB và 1 nhóm thế hydroxyl. So sánh dữ liệu flavonoid cho thấy aglycon trùng khớp với sexangularetin, từ đó xác định được hợp chất HV9A1 là dẫn xuất sexangularetin glucosid với 1 nhóm thế (*E*)-*p*-coumaroyl.

Phổ HMBC cũng cho thấy các tương tác giữa H-1'' (5,70) và C-3 (134,8), H-2'' (5,05) và C-9''' (168,4), chứng tỏ vị trí thế glucoza ở vị trí C-3 và (*E*)-*p*-coumaroyl thế ở C-2''. Các vị trí khác cũng lần lượt được làm sáng tỏ bằng tương tác trên phổ HMBC.

Từ các phân tích phổ HR-ESI-MS và NMR, đã nhận định hợp chất HV9A1 là sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid có công thức (I) như dưới đây.



(I)

**Ví dụ 2: Thử nghiệm hoạt tính quét gốc tự do DPPH của hợp chất có công thức (I)**

Hoạt tính chống oxy hoá của của hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid có công thức (I) thu được từ Ví dụ 1 được khảo sát bằng phương pháp quét gốc tự do được tạo ra bằng cách pha 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) trong metanol. Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua việc làm giảm màu của DPPH, được xác định bằng cách đo quang ở bước sóng  $\lambda = 517$  nm.

Cách tiến hành: Pha dung dịch DPPH có nồng độ 1 mM trong metanol (MeOH). Hợp chất có công thức (I) thu được từ Ví dụ 1 được pha trong DMSO 100% sao cho nồng độ cuối cùng đạt được là 50  $\mu$ M và 200  $\mu$ M  $\mu$ g/ml. Thực hiện phản ứng trong thời gian 30 phút ở 37°C, đọc mật độ hấp thụ của DPPH chưa phản ứng bằng máy đọc Genios Tecan ở bước sóng 517 nm. Tỷ lệ % quét gốc tự do DPPH của mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$SC\% = (OD_{\text{trắng}} - OD_{\text{mẫu thử}}) / OD_{\text{trắng}} (\%)$$

DMSO 10% là dung môi pha chất được sử dụng như đối chứng âm (mẫu trắng). Axit ascorbic ở các nồng độ 10  $\mu$ g/mL và 50  $\mu$ g/mL được sử dụng làm đối chứng dương để so sánh mức độ ổn định của phương pháp. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác của thí nghiệm và của dữ liệu. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây

**Bảng 2: Kết quả thử nghiệm hoạt tính quét gốc tự do DPPH**

| STT | Tên mẫu       | Nồng độ thử   | % ức chế | Sai số |
|-----|---------------|---------------|----------|--------|
| 1   | Hợp chất (I)  | 50 $\mu$ M    | 37,12    | 0,33   |
|     |               | 200 $\mu$ M   | 78,30    | 0,32   |
| 2   | Axit Ascorbic | 10 $\mu$ g/mL | 40,49    | 2,27   |
|     |               | 50 $\mu$ g/mL | 97,65    | 0,10   |

Từ kết quả trong bảng 2 cho thấy hợp chất (I) có hoạt tính chống oxy hóa quét gốc tự do DPPH ở hai nồng độ thử nghiệm 50 $\mu$ g/mL và 200 $\mu$ g/mL. Trong đó, ở nồng độ thử nghiệm 200 $\mu$ M, mẫu hợp chất (I) biểu hiện khả năng chống oxy hóa quét gốc tự do DPPH tốt.

**Ví dụ 4: Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào**

Hợp chất thu được từ Ví dụ 1 được thử nghiệm tác dụng gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư bao gồm tế bào ung thư biểu mô KB (Human epidermic

carcinoma) CCL -17<sup>TM</sup>, tế bào ung thư gan Hep G2 (Hepatocellular carcinoma) HB - 8065<sup>TM</sup>, tế bào ung thư phổi LU-1 (Human lung carcinoma) HTB - 57<sup>TM</sup>, và tế bào ung thư vú MCF-7 (Human breast carcinoma) HTB - 22<sup>TM</sup>, tất cả đều do Bảo tàng giống chuẩn Hoa kỳ (ATCC) cung cấp.

Các dòng tế bào nêu trên được lưu giữ trong nitơ lỏng, hoạt hóa và duy trì trong các môi trường dinh dưỡng như DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt) có bổ sung 7-10% FBS (Fetal Bovine Serum) và một số thành phần thiết yếu khác. Tế bào được nuôi trong các điều kiện tiêu chuẩn (5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm 98%, nhiệt độ 37°C, vô trùng tuyệt đối) và được cấy chuyển 1-2 lần trước khi thí nghiệm. Tế bào phát triển ở pha log sẽ được sử dụng để thử độc tính.

Hợp chất thu được từ Ví dụ 1 được pha ở nồng độ gốc là 20mg/ml trong dimethylsulfoxit (DMSO) 100%. Sau đó được pha loãng 2 bước trên đĩa 96 giếng thành 5 dãy nồng độ từ cao xuống thấp lần lượt là 2564, 640, 160, 40 và 10 µg/ml. Nồng độ chất thử trong đĩa thử nghiệm tương ứng là 128, 32, 8, 2 và 0.5 µg/ml. Chất tham chiếu được sử dụng là Elipticin (Sigma) pha trong DMSO với nồng độ 2 mg/ml.

Các tế bào ung thư được trypsin hoá để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm tế bào. Sau đó, pha tế bào bằng môi trường sạch và điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thử nghiệm (khoảng 1-3x10<sup>4</sup> tế bào/ml tùy theo từng dòng tế bào). Lấy vào mỗi giếng 10 µl chất thử đã chuẩn bị ở trên và 190 µl dung dịch tế bào. Đối chứng dương của thử nghiệm là môi trường có chứa tế bào, đối chứng âm chỉ có môi trường nuôi cấy. Ở các đĩa thí nghiệm ở điều kiện tiêu chuẩn. Sau 72 giờ mỗi giếng thí nghiệm được tiếp tục ủ với 10 µl MTT (5 mg/ml) trong thời gian 4 giờ. Sau khi loại bỏ môi trường, tinh thể formaran được hòa tan bằng 100 µl DMSO 100%. Kết quả thử nghiệm được xác định bằng giá trị mật độ quang OD đo ở bước sóng 540 nm trên máy quang phổ Genios Tecan. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị IC<sub>50</sub> được xác định thông qua giá trị % ức chế tế bào phát triển và phần mềm máy tính Rawdata như sau:

$$\% \text{ ức chế tế bào} = (\text{OD}_{\text{chứng (+)}} - \text{OD}_{\text{mẫu thử}}) / (\text{OD}_{\text{chứng (+)}} - \text{OD}_{\text{chứng (-)}}) \times 100\%$$

$$\text{IC}_{50} = \text{High}_{\text{Conc}} - \frac{(\text{High}_{\text{Inh}}\% - 50) \times (\text{High}_{\text{Conc}} - \text{Low}_{\text{Conc}})}{\text{High}_{\text{Inh}}\% - \text{Low}_{\text{Inh}}\%}$$

Trong đó: *High<sub>Conc</sub>/Low<sub>Conc</sub>*: chất thử ở nồng độ cao/chất thử ở nồng độ thấp;

*High<sub>Inh</sub>%/Low<sub>Inh</sub>%*: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp

Giá trị  $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$  (với dịch chiết thô) và  $IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/ml}$  (với chất sạch) được đánh giá là có hoạt tính gây độc tế bào. Kết quả thử nghiệm đối với hợp chất glucosid Tuyen68 được nêu trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào.

| STT        | Tên mẫu | Nồng độ mẫu thử (µg/ml) | Phần trăm ức chế các dòng tế bào ung thư |        |       |      |
|------------|---------|-------------------------|------------------------------------------|--------|-------|------|
|            |         |                         | KB                                       | Hep-G2 | Lu    | MCF7 |
| 1          | HV9A1   | 256                     | 71                                       | 58     | 69    | 50   |
|            |         | 64                      | 49                                       | 34     | 47    | 45   |
|            |         | 16                      | 43                                       | 25     | 43    | 28   |
|            |         | 4                       | 41                                       | 22     | 25    | 22   |
|            |         | 1                       | 39                                       | 17     | 20    | 14   |
|            |         | IC <sub>50</sub>        | 72,72                                    | 192    | 90,18 | 256  |
| Ellipticin |         | IC <sub>50</sub>        | 0,27                                     | 0,30   | 0,35  | 0,48 |

Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của 4 dòng tế bào ung thư KB, Hep-G2, Lu và MCF7 cho thấy hợp chất (I) có khả năng ức chế yếu đối với các tế bào ung thư KB và Lu ( $IC_{50}=72,72 \mu\text{g/ml}$  với KB và  $90,18 \mu\text{g/ml}$  với Lu), và gần như không có khả năng ức chế đối với các tế bào ung thư Hep-G2 và MCF7 ( $IC_{50}=192 \mu\text{g/ml}$  với Hep-G2 và  $256 \mu\text{g/ml}$  với MCF7).

#### Hiệu quả đạt được của sáng chế

Hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid) thu được theo sáng chế thể hiện hoạt tính chống oxy hoá tốt và gây độc tế bào yếu trên hai dòng tế bào ung thư người bao gồm ung thư phổi (LU -1), ung thư biểu mô (KB). Phương pháp theo sáng chế tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các chế phẩm, thực phẩm chức năng tốt cho sức khoẻ từ cây trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh).

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phân lập hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid từ hoa cây trà hoa vàng, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) thu cao chiết etanol tổng bằng cách sấy lạnh hoa cây trà hoa vàng (*Camellia hakodae* Ninh), nghiền nhỏ thu nguyên liệu dạng bột, sau đó ngâm chiết 3 lần với rượu etanol ở nhiệt độ 60°C, mỗi lần 60 phút trong điều kiện siêu âm, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/2 (w/v), gộp dịch chiết và lọc bỏ tạp chất, cất loại bỏ dung môi ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện áp suất giảm thu được cao chiết etanol tổng;

b) thu phân đoạn giàu flavonoit bằng cách hòa tan cao chiết etanol tổng với một lượng metanol rồi tẩm với chất hấp phụ là oxit silic SiO<sub>2</sub> và làm khô ở áp suất giảm và nghiền mịn, sau đó nhồi lên cột sắc ký chứa silicagel nhồi sẵn, và rửa giải lần lượt với các hệ dung môi bao gồm *n*-hexan, diclometan, etylaxetat, axeton, metanol, và metanol:axit axetic 9/1, thu phân đoạn rửa giải bằng etylaxetat và cất loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm, cặn chiết này được nhồi lên cột sắc ký silica gel 60 có kích thước hạt nằm trong khoảng từ 0,040 đến 0,063 mm và rửa giải bằng hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH thay đổi với các tỷ lệ dung môi tương ứng là 100/0; 90/10; 80/20; 70/30; 40/60 và 0/100 (theo thể tích), thu phân đoạn rửa giải CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH có tỷ lệ 80/20 (theo thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được phân đoạn giàu flavonoit;

c) thu phân đoạn giàu nhóm chất sexangularetin bằng cách hòa tan phân đoạn giàu flavonoit với một lượng vừa đủ dung môi CH<sub>3</sub>OH nồng độ 98,75%, sau đó nhồi lên cột silica gel 60 kích thước nằm trong khoảng từ 0,040 đến 0,063mm và rửa giải bằng hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH thay đổi tăng dần độ phân cực theo tỷ lệ bao gồm 90/10; 80/20; 70/30; 60/40; 0/100 (theo thể tích) thu phân đoạn chứa sexangularetin trên cơ sở kiểm tra sắc ký lớp mỏng, tiếp đó nhồi phân đoạn này lên cột sắc ký sephadex LH-20 và rửa giải bằng metanol với mỗi phân đoạn 100 ml, thu phân đoạn thứ ba giàu nhóm chất sexangularetin; và

d) thu hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid bằng cách cô loại dung môi phân đoạn giàu nhóm chất sexangularetin rồi hòa trong hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH tỷ lệ 8/2 (theo thể tích) thu phân kết tủa, cuối cùng nhồi phân kết tủa này trên cột Sephadex LH-20 và rửa giải với metanol, sau khi cô loại dung môi thu trong điều kiện áp suất giảm thu được hợp chất sexangularetin 3-*O*-(2''-*O*-(*E*)-*p*-cumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranosid dưới dạng bột vô định hình màu vàng nhạt.