



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

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

(11)



1-0052866

(51)^{2022.01} C07F 9/10; A61K 36/00

(13) B

(21) 1-2022-07494

(22) 16/11/2022

(45) 27/10/2025 451

(43) 25/03/2024 432

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

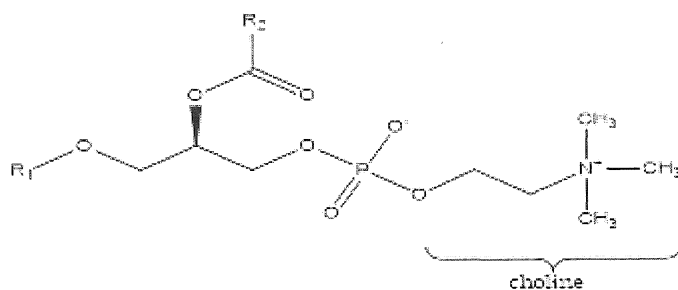
Nhà H1, số 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Đoàn Lan Phương (VN); Phạm Quốc Long (VN); Trần Thị Thu Thủy (VN); Đặng Thị Phương Ly (VN); Đặng Thị Minh Tuyết (VN); Đào Thị Kim Dung (VN); Đinh Thị Kim Hoa (VN); Nguyễn Thị Thủy (VN).

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP PHOSPHOLIPIT PHOSPHATIDYLCHOLIN CHỨA AXIT BÉO OMEGA 6 TỪ HẠT CÂY SỮA (DALBERGIA TONKINENSIS PRAIN)

(21) 1-2022-07494

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình phân lập phosphatidylcholin chứa các axit béo họ omega 6 từ nguyên liệu hạt Sưa (*Dalbergia tonkinensis* Prain), hợp chất phosphatidylcholin này có công thức cấu tạo như sau:



trong đó:

R₁ được chọn từ nhóm bao gồm acyl béo, alkyl béo, vinyl béo;

R₂ là alkyl.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này liên quan đến lĩnh vực các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên từ dầu hạt thực vật có hoạt tính sinh học và có khả năng ứng dụng trong công nghệ mỹ phẩm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình phân lập phospholipit, cụ thể hơn là phosphatidylcholin chứa axit béo họ omega 6 từ dầu hạt Sưa (*Dalbergia tonkinensis* Prain).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây Sưa là thực vật hạt kín, có tên khoa học là *Dalbergia tonkinensis* Prain. Ở Việt Nam, cây Sưa được trồng nhiều tại các tỉnh như Thừa Thiên Huế, Vĩnh Phúc, Thái Nguyên, Hà Nội... Hạt Sưa chứa đến 15% là dầu béo, trong dầu của hạt Sưa có chứa nhiều thành phần axit béo không no, chủ yếu là axit omega 6-linoleic (18:2 ω 6; cis, cis-9,12-octadecadienoic axit) với hàm lượng trên 60% và lớp chất phospholipit chiếm 18,29%.

Phospholipit là một lớp lipid có cấu tạo tương tự như các triaxylglyxerit, tuy nhiên trong cấu trúc phospholipit có sự thay thế của 1 phospho ở vị trí của axit béo trong phân tử triaxylglyxerit. Cấu tạo đó của phospholipit giúp nó thể hiện tính chất của một chất lưỡng cực, thường tạo thành lớp kép lipid có khả năng bán thấm. Trong cơ thể sống, phospholipit là một thành phần cấu tạo nên màng tế bào động vật, tập trung nhiều ở tế bào thần kinh, tim, gan và hệ thống sinh dục. Ngoài ra, nó còn là tiền chất để tổng hợp nên các hoocmon giúp điều hòa các quá trình sinh trưởng và phát triển của cơ thể sống, là yếu tố quan trọng trong điều hòa chuyển hóa lipid, cholesterol và phospholipit là các hợp chất độc đáo cho các công thức của sản phẩm mỹ phẩm. Điều này là do các đặc tính đa chức năng của chúng như một nguyên liệu kỹ thuật và hoạt chất mỹ phẩm kết hợp với mức độ dung nạp cao của chúng. Các phospholipit tự nhiên phân lập từ hạt là chất có hoạt

tính trong mỹ phẩm, cung cấp các axit béo quan trọng là axit linoleic và axit linolenic. Những phospholipit này nổi tiếng với khả năng duy trì làn da ở tình trạng khỏe mạnh và cải thiện các rối loạn da như mụn trứng cá và viêm da thần kinh, hoặc làm chậm quá trình lão hóa da. Hơn nữa, chúng đóng một vai trò để hóa lỏng lớp sừng và là chất tăng cường thâm nhập hoặc hoạt động như các hợp chất tăng cường chức năng hàng rào bảo vệ da. Sự sẵn có của các hợp chất tự nhiên này với chất lượng được kiểm soát ở nhiều cấp độ và thay đổi khác nhau cung cấp cho nhà sản xuất một công cụ có giá trị để thiết kế các công thức mỹ phẩm tối ưu.

Phân tử phospholipit bao gồm khung là glyxerol bị este hóa ở vị trí 1 và 2 với axit béo và ở vị trí 3 với phosphat. Trong các phospholipit màng điển hình, ví dụ như phosphatidylcholin (PC), phosphatidyletanolamin (PE) và phosphatidylglyxerol (PG), nhóm phosphat tiếp tục được este hóa với các rượu khác.

Do cấu trúc phân tử bao gồm một phần ưa nước và một phần ưa béo, các phospholipit có tính lưỡng phần đặc biệt. Khi trộn với nước, chúng tạo thành các cấu trúc khác nhau tùy thuộc vào số lượng axit béo được este hóa từ khung glyxerol và các dạng hình học của phân tử. Khi chỉ có một axit béo được este hóa từ khung của glyxerol, các phân tử monoacyl phospholipit/lysophospholipit có dạng hình nón và chúng có thể tạo thành các mixen. Trong khi đó, các diacylphospholipit với cấu tạo hình trụ được sắp xếp thành các lớp lipid kép với các đuôi kỵ nước xếp vào nhau và nhóm đầu ưa nước quay ra ngoài ở cả hai phía. Các cấu trúc này được gọi là liposom. Màng tập hợp liposom như vậy là các cấu trúc cơ bản của màng tế bào. Vậy nên, rõ ràng là các cấu trúc như vậy sẽ có tương tác hữu ích với các tế bào da. Phospholipit có thể được sử dụng trong các sản phẩm mỹ phẩm như là một thành phần bào chế mỹ phẩm, chẳng hạn nó có thể được sử dụng làm chất nhũ hóa, chất tạo liposom, chất hòa tan và chất làm ẩm.

Axit linoleic có thể được este hóa để tạo thành lipit trung tính và phân cực như phospholipit, triacylglycerol và cholesterol este. Là một phần của phospholipit màng, axit linoleic có chức năng như một thành phần cấu trúc để duy trì một mức độ nhất định tính lưu động màng của hàng rào nước xuyên da của lớp biểu bì. Ngoài ra, khi được giải phóng khỏi màng phospholipit, nó có thể bị oxy hóa bằng enzym thành nhiều loại dẫn xuất liên quan đến tín hiệu tế bào, ví dụ axit 13-hydroxy hoặc 13-hydroperoxy octadecadienoic. Khi thoa lên da, các di-acyl phospholipit không bão hòa PC hoạt động như một nguồn axit linoleic và linolenic. Một phần các phospholipit chứa axit linoleic tiếp cận các tế bào da chuyển hóa cũng có thể tăng cường hàng rào tự nhiên của da thông qua việc kết hợp với ceramide I. Ngoài ra, những phospholipit này có thể đóng một vai trò trong việc ngăn ngừa mụn trứng cá viêm da thần kinh và bệnh vẩy nến. Axit linolenic bao quanh phosphatidylcholin có thể được chuyển đổi thành axit béo omega-3 gồm axit docosahexaenoic (DHA, 22:6n-3) và axit eicosapentaenoic (EPA, 20:5n-3).

Trong các công thức mỹ phẩm, di-acyl phosphatidylcholin là phospholipit chính được sử dụng. Trong tài liệu tham khảo, lexitin đôi khi được sử dụng giống như phosphatidylcholin; chỉ thị của EU 2006/257/EC và CAS định nghĩa lexitin là một hỗn hợp phospholipit chủ yếu là phosphatidylcholin cùng một số các phospholipit và nguyên liệu khác như axit béo, triglycerit, sterol, hydrat cacbon và glycolipit. Những lexitin này có thể được phân biệt theo hàm lượng phosphatidylcholin của chúng. Bằng cách này, một số loại có thể được sản xuất bắt đầu từ lexitin thô với 15% PC chứa một lượng đáng kể dầu thực vật mà từ đó nó đã được phân lập, và lexitin được khử dầu hoặc phân đoạn để thu được hàm lượng từ 25-96% PC.

Omega 6 là axit cần thiết để giảm khả năng thấm nước của da. Nếu thiếu Omega 6 sẽ làm tăng sự mất nước qua biểu bì, gây thô ráp và có vảy ở da đồng thời gây viêm da. Các axit béo omega 6 này thường có mặt nhiều trong dầu hạt

thực vật. Chính vậy, nhiều hãng mỹ phẩm đã sử dụng một số dầu hạt đưa vào ứng dụng trong mỹ phẩm. Trên thị trường, đã có một số sản phẩm mỹ phẩm như: kem dưỡng da “Rich Compensating Cream” chứa dầu đậu nành có tác dụng cung cấp dưỡng chất cho da khô, làm dịu da; sản phẩm sữa rửa mặt “Cleanance” và kem “Avène Trixéra” có tác dụng chống kích ứng, kháng viêm, trị trứng cá chứa dầu hạt bí ngô của hãng của hãng Avene - Pháp. Sản phẩm “Spa Siam Lemongrass Apricot Face Scrub” tẩy tế bào da chết, dưỡng toàn thân chiết xuất từ hạt mơ và chanh tẩy sạch các chất bẩn trên bề mặt da, làm cho làn da trở nên mềm mại và thanh khiết của hãng Spasiam.

Nhìn chung, các sản phẩm mỹ phẩm hiện nay chủ yếu sử dụng các phospholipit được phân lập từ các nguồn thực vật tự nhiên như đậu nành, hạt cải dầu và hạt hướng dương.

Ở Việt Nam, việc phân lập các chất phân cực đặc biệt từ đối tượng dầu hạt ở Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu. Cho đến nay, đã có một số công trình nghiên cứu về hàm lượng, thành phần trong vỏ, lá của cây Sưa thuộc chi *Dalbergia*, tuy nhiên, bộ phận hạt của loài này chưa được nghiên cứu nhiều và chưa có nghiên cứu theo hướng phospholipit ở dầu hạt. Trong quá trình nghiên cứu, các tác giả sáng chế nhận thấy hàm lượng dầu béo có mặt cao trong hạt Sưa (13,8 %) chứa đầy đủ các hợp chất phospholipit như PC, PE, PG... giàu các axit béo họ omega 6 với tổng hàm lượng phospholipit lên tới trên 30%, và có hoạt tính chống oxy hoá khả quan.

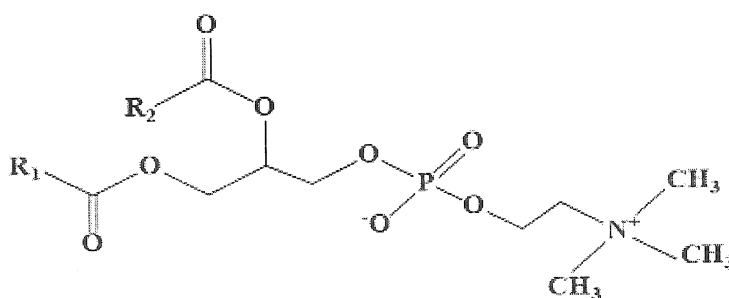
Hằng năm, lượng hạt Sưa sau mỗi vụ nhiều và chỉ là nguyên liệu phế thải. Từ các kết quả nghiên cứu sơ bộ nêu trên và với mục đích tạo cơ sở khoa học để có thể đánh giá đúng giá trị đích thực của nguồn tài nguyên hạt thực vật, cũng như nhằm định hướng khai thác các hoạt chất có triển vọng sử dụng trong y dược, ngành mỹ phẩm..., các tác giả sáng chế đã đi sâu nghiên cứu hóa học về thành phần dầu béo hạt Sưa, từ đó đề xuất việc phân lập hợp chất phosphatidylcholin

(PC) để khai thác có hiệu quả nguồn dầu hạt chi Sưa và nâng cao giá trị sử dụng nguồn lợi từ tài nguyên thực vật Việt Nam.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất:

[1]. Quy trình phân lập phosphatidylcholin giàu axit béo omega 6 từ dầu hạt Sưa (*Dalbergia tonkinensis* Prain), hợp chất phosphatidylcholin (PC) này có công thức cấu tạo như sau:



trong đó:

R_1 là alkyl hoặc alkenyl;

R_2 là alkyl hoặc alkenyl; và

trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) xử lý nguyên liệu:

làm sạch hạt Sưa khỏi các tạp chất cơ học, sau đó sấy khô ở nhiệt độ 35-45°C, và nghiền nhỏ hạt;

(ii) chiết xuất dầu béo:

cho hạt Sưa đã nghiền nhỏ vào dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ với tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng (0,8 - 1,2) : 2 (ml/ml), trong đó tỷ lệ thể tích dung môi/khối lượng hạt Sưa nằm trong khoảng khoảng (2,5 - 3,5) : 1 (ml/g),

tiến hành siêu âm nhiều lần, mỗi lần 30-50 phút,

bổ sung CH_2Cl_2 và H_2O vào hỗn hợp nêu trên với tỷ lệ thể tích của CH_2Cl_2 và H_2O tính trên mỗi 2 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ nêu trên nằm trong khoảng (0,8-1,2) ml, tiếp tục siêu âm 30-50 phút, sau đó đem lọc hỗn hợp trên phễu lọc, thu lấy phần dung dịch lọc,

bổ sung tiếp H_2O vào phần dung dịch lọc thu được với tỷ lệ thể tích của H_2O tính trên mỗi 2 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ nêu trên nằm trong khoảng (0,8-1,2) ml để phân tách dung dịch thành hai lớp, lớp trên gồm $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, H_2O và các tạp chất khác, lớp dưới gồm CH_2Cl_2 và lipit,

tách lấy lớp dưới và cô cất chân không dưới áp suất thấp để làm bay hơi dung môi, thu được lipit tổng;

(iii) phân lập chất:

hòa tan lipit tổng thu được từ bước (ii) trong CHCl_3 theo tỷ lệ khối lượng lipit tổng/thể tích CHCl_3 nằm trong khoảng (25 - 35) : (1200 - 1800) (g/ml),

đưa hỗn hợp nêu trên lên cột sắc ký sử dụng chất hấp phụ là oxit nhôm cỡ hạt 0,063-0,200 mm với hỗn hợp dung môi rửa giải là *n*-hexan/diethyl ete/axit axetic có tỷ lệ thể tích (tính theo ml) nằm trong khoảng (82-87) : (11-17) : (0,8-1,1), thu được sáu phân đoạn phân đoạn kí hiệu là SD1-SD6, quá trình phân tách được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng TLC,

hòa tan phân đoạn SD3, SD4 và SD5 sau khi kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng trong CHCl_3 theo tỷ lệ khối lượng mỗi phân đoạn/thể tích CHCl_3 nằm trong khoảng 80-120/1 (mg/ml), tốt hơn là 100/1 (mg/ml) và tiếp tục tiến hành phân tách trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường có kích thước hạt 37 - 63 μm (230 - 400 mesh), trong đó:

dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD3 là hỗn hợp dung môi $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ với tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng (92-96) : (3,5-5,5) (ml/ml), thu được ba phân đoạn nhỏ kí hiệu là SD3.1, SD3.2 và SD3.3 chứa phosphatidylinositol (PI),

dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD4 là hỗn hợp dung môi $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 28-30% với tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng (88-92) : (8,8-10,2) : (0,85-1,1), thu được ba phân đoạn nhỏ ký hiệu là SD4.1; SD4.2; SD4.3 chứa phosphatidylcholin (PC),

dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD5 là hỗn hợp dung môi $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5/1\text{-propanol}/\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{KCl}$ 25-28% với tỷ lệ thể tích (tính theo ml) nằm trong khoảng (23,5-25,5) : (34-36) : (9-11) : (13-15,5) : (8,5-10,5), thu được phân đoạn chứa phosphatidyletanolamin (PE); và

(iv) tinh chế:

hòa tan phân đoạn nhỏ SD 4.2 chứa phosphatidylcholin cần phân lập trong axeton theo tỷ lệ khối lượng phân đoạn nhỏ SD 4.2/thể tích axeton nằm trong khoảng từ (1-10):100 (mg/ml), lọc hỗn hợp dung dịch trên phễu lọc chân không để thu lấy phần dung dịch,

bổ sung $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-C}_2\text{H}_5\text{OH}$ theo tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng (0,8-1,2):2 (ml/ml), trong đó tỷ lệ thể tích của hai dung môi này/phần dung dịch nằm trong khoảng (0,8-1,2) : (1,5-2,5) (ml/ml), và

bổ sung nước cất vào dung dịch trên cho phân lớp triệt để, chiết lấy pha dưới và làm khan bằng Na_2SO_4 , sau đó đem cất loại dung môi, thu được phosphatidylcholin (PC).

[2]. Quy trình theo điểm [1], trong đó ở bước (ii), hạt Sưa sau khi nghiền nhỏ được cho vào dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ có tỷ lệ thể tích là 1 : 2 (ml/ml).

[3]. Quy trình theo điểm [1] hoặc [2], trong đó ở bước (ii), tỷ lệ thể tích dung môi/khối lượng hạt Sưa là 3 : 1 ml/g.

[4]. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (ii), CH_2Cl_2 và H_2O được bổ sung vào hỗn hợp sau khi siêu âm với tỷ lệ thể tích của CH_2Cl_2 và H_2O tính trên mỗi 2 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ nêu trên là 1 ml.

[5]. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (ii), để phân tách dung dịch lọc thu được thành hai lớp, H_2O được bổ sung vào dung dịch này với tỷ lệ thể tích tính trên mỗi 2 ml C_2H_5OH nêu trên là 1 ml.

[6]. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (ii), lớp dưới được làm khan trước bằng Na_2SO_4 .

[7]. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iii), lipid tổng thu được từ bước (ii) được hòa tan trong $CHCl_3$ theo tỷ lệ khối lượng lipid tổng/thể tích $CHCl_3$ là 35 : 1500 (g/ml).

[8]. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iii), tại cột sắc ký sử dụng chất hấp phụ là oxit nhôm, hỗn hợp dung môi rửa giải là n-hexan/diethyl ete/axit axetic có tỷ lệ thể tích là 85 : 15 : 1 (tính theo ml).

[9]. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iii), mỗi phân đoạn SD3, SD4 và SD5 được hòa tan trong $CHCl_3$ theo tỷ lệ khối lượng mỗi phân đoạn/thể tích $CHCl_3$ là 100/1 (mg/ml).

[10]. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iii), dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD4 là hỗn hợp dung môi $CHCl_3/CH_3OH/NH_4OH$ 28% với tỷ lệ thể tích là 90:10:1 (tính theo ml).

[11]. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iv), phân đoạn nhỏ SD 4.2 được hòa tan trong axeton theo tỷ lệ khối lượng phân đoạn nhỏ SD 4.2/thể tích axeton là (2-8):100 (mg/ml), tốt hơn là (4-6):100 (mg/ml).

[12]. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iv), $CH_2Cl_2-C_2H_5OH$ được bổ sung theo tỷ lệ thể tích là 1:2 (ml/ml).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sắc ký đồ HRMS $[E^+]$ lớp chất phosphatidylcholin của mẫu hạt Sura (*Dalbergia tonkinensis* Prain).

Hình 2 là sắc ký đồ phổ $MS[E^-]$ và $MS[E^+]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion dương $[M+H]^+$ tại giá trị m/z 758,5691.

Hình 3 thể hiện sự phân mảnh của ion phân tử PC có tín hiệu ion dương tại m/z 758,5691.

Hình 4 là hình vẽ thể hiện sự phân mảnh trong phổ MS^2 và $MS^3 [E^-]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm $[M+HCOO]^-$ tại m/z 802,5536.

Hình 5 là hình vẽ thể hiện sự phân mảnh trong phổ $MS^2 [E^-]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm $[M-CH_3]^-$ tại m/z 742,5305 (PC 16:0/18:2).

Hình 6 là sắc ký đồ phổ $MS[E^-]$ và $MS[E^+]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion dương $[M+H]^+$ tại giá trị m/z 782,5676.

Hình 7 là hình vẽ thể hiện sự phân mảnh trong phổ MS^2 và $MS^3 [E^-]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm $[M+HCOO]^-$ tại m/z 826,5629.

Hình 8 là hình vẽ thể hiện sự phân mảnh trong phổ $MS^2 [E^-]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm $[M-CH_3]^-$ tại m/z 766,5450.

Hình 9 là sắc ký đồ phổ $MS[E^-]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion dương $[M+H]^+$ tại giá trị m/z 784,5895.

Hình 10 là hình vẽ thể hiện sự phân mảnh trong phổ $MS^2 [E^-]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm $[M-CH_3]^-$ tại m/z 768,2676.

Hình 11 là sắc ký đồ phổ $MS[E^-]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion dương $[M+H]^+$ tại giá trị m/z 786,5972.

Hình 12 là hình vẽ thể hiện sự phân mảnh trong phổ $MS^2 [E^-]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm $[M-CH_3]^-$ tại m/z 768,2676.

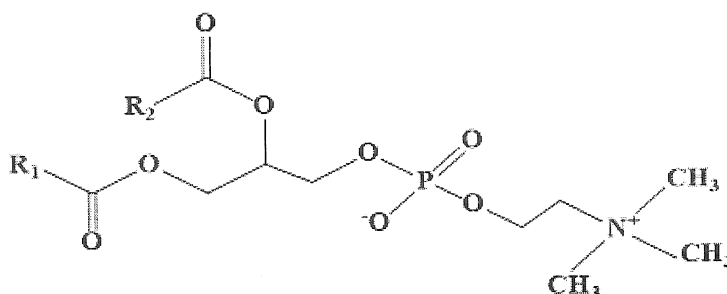
Hình 13 là sắc ký đồ phổ $MS[E^-]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion dương $[M+H]^+$ tại giá trị m/z 788,6141.

Hình 14 là hình vẽ thể hiện sự phân mảnh trong phổ $MS^2 [E^-]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm $[M-CH_3]^-$ tại m/z 772,2672.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các phương án thực hiện ưu tiên của quy trình theo sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn. Tuy nhiên, lưu ý rằng phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án thực hiện ưu tiên được mô tả dưới đây dưới dạng ví dụ minh họa cho sáng chế và cần hiểu rằng phạm vi của sáng chế bao gồm tất cả các cải biến, các thay đổi tương đương khác của chúng.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất quy trình phân lập phosphatidylcholin giàu axit béo họ omega 6 từ dầu hạt Sưa (*Dalbergia tonkinensis* Prain) của Việt Nam, hợp chất phosphatidylcholin (PC) này có công thức cấu tạo như sau:



trong đó:

R_1 là alkyl hoặc alkenyl;

R_2 là alkyl hoặc alkenyl.

Quy trình theo sáng chế bao gồm các bước:

(i) Xử lý nguyên liệu:

Làm sạch hạt Sưa, tốt hơn là sử dụng hạt được thu từ quả trưởng thành, khỏi các tạp chất cơ học, sấy khô ở nhiệt độ 35-45°C, ví dụ 40°C, sau đó nghiền nhỏ hạt bằng máy nghiền, ví dụ máy nghiền trục vít. Nước trong mẫu hạt có thể làm giảm hiệu quả tách chiết của dung môi, dẫn đến thu hồi được ít chất béo, do đó tốt hơn là mẫu hạt Sưa cần được sấy khô trước nhằm ngăn mẫu bị vón cục

trong quá trình tách chiết và cải thiện dòng dung môi, để tối ưu việc tách chiết dầu béo.

(ii) Chiết xuất dầu béo:

Cho hạt Sura đã nghiền nhỏ vào dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ với tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng $(0,8 - 1,2) : 2$ (ml/ml), tốt hơn là $1 : 2$ (ml/ml), trong đó tỷ lệ thể tích dung môi/khối lượng hạt Sura nằm trong khoảng khoảng $(2,5 - 3,5) : 1$ (ml/g), tốt hơn là $3 : 1$ (ml/g). Sau đó, tiến hành siêu âm nhiều lần, ví dụ 3 lần, mỗi lần 30-50 phút, chẳng hạn 40 phút. Việc siêu âm có thể tiến hành bằng máy siêu âm, ví dụ tại tần số siêu âm 25 KHz, 37 KHz, 40 KHz hoặc các tần số siêu âm thích hợp khác.

Bổ sung CH_2Cl_2 và H_2O vào hỗn hợp nêu trên với tỷ lệ thể tích của CH_2Cl_2 và H_2O tính trên mỗi 2 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ nêu trên nằm trong khoảng $(0,8-1,2)$ ml, tốt hơn là 1 ml, tiếp tục siêu âm 30-50 phút, ví dụ 30 phút, sau đó đem lọc hỗn hợp trên phễu lọc, thu lấy phần dung dịch lọc.

Bổ sung tiếp H_2O vào phần dung dịch lọc thu được với tỷ lệ thể tích của H_2O tính trên mỗi 2 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ nêu trên nằm trong khoảng $(0,8-1,2)$ ml, tốt hơn là 1 ml để phân tách dung dịch thành hai lớp, lớp trên gồm $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, H_2O và các tạp chất khác, lớp dưới gồm CH_2Cl_2 và lipit.

Tách lấy lớp dưới và cô cất chân không dưới áp suất thấp để làm bay hơi dung môi, thu được lipit tổng (dầu béo). Tốt hơn là trước khi tiến hành cô cất chân không, lớp dưới được làm khan trước bằng Na_2SO_4 . Lipit thu được được bảo quản lưu giữ ở nhiệt độ -8 đến -12°C , ví dụ -10°C . Theo sáng chế, hàm lượng lipit tổng được tính theo phần trăm so với khối lượng ban đầu.

(iii) Phân lập chất:

Hòa tan lipit tổng thu được từ bước (ii) trong CHCl_3 theo tỷ lệ khối lượng lipit tổng/thể tích CHCl_3 nằm trong khoảng $(25 - 35) : (1200 - 1800)$ (g/ml), tốt hơn là $35 : 1500$ (g/ml).

Đưa hỗn hợp nêu trên lên cột sắc ký sử dụng chất hấp phụ là oxit nhôm cỡ hạt 0,063-0,200 mm với hỗn hợp dung môi rửa giải là *n*-hexan/dietyl ete/axit axetic có tỷ lệ thể tích (tính theo ml) nằm trong khoảng (82-87) : (11-17) : (0,8-1,1), tốt hơn là 85 : 15 : 1, thu được sáu phân đoạn kí hiệu là SD1-SD6, quá trình phân tách được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng TLC. Theo một phương án thực hiện, quá trình phân tách được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng TLC với thuốc thử H₂SO₄ 8-12%, tốt hơn là 10%, trong dung môi CH₃OH và hơi trên phương tiện sấy, ví dụ bếp sấy, ở nhiệt độ 75-85°C, ví dụ 80°C. Kết thúc quá trình chạy cột sắc ký, các phân đoạn SD1-SD3 chỉ chứa dung môi rửa giải sẽ được loại bỏ.

Hòa tan phân đoạn SD3, SD4 và SD5 sau khi kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng trong CHCl₃ theo tỷ lệ khối lượng mỗi phân đoạn/thể tích CHCl₃ nằm trong khoảng 80-120/1 (mg/ml), tốt hơn là 100/1 (mg/ml) và tiếp tục tiến hành phân tách trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường có kích thước hạt 37 - 63 μ m (230 - 400 mesh), trong đó:

Dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD3 là hỗn hợp dung môi CHCl₃/CH₃OH với tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng (92-96) : (3,5-5,5) (ml/ml), tốt hơn là 95:5 (ml/ml), thu được ba phân đoạn nhỏ ký hiệu là SD3.1, SD3.2 và SD3.3 chứa phosphatidylinositol (PI).

Dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD4 là hỗn hợp dung môi CHCl₃/CH₃OH/NH₄OH 28-30% với tỷ lệ thể tích (tính theo ml) nằm trong khoảng (88-92) : (8,8-10,2) : (0,85-1,1), tốt hơn là 90:10:1, thu được ba phân đoạn nhỏ ký hiệu là SD4.1; SD4.2; SD4.3 chứa phosphatidylcholin (PC).

Dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD5 là hỗn hợp dung môi CH₃COOC₂H₅/1-propanol/CHCl₃/CH₃OH/KCl 25-28% với tỷ lệ thể tích (tính theo ml) nằm trong khoảng (23,5-25,5) : (34-36) : (9-11) : (13-15,5) : (8,5-10,5), tốt hơn là 25 : 35 : 10 : 15 : 10, thu được phân đoạn chứa phosphatidyletanolamin (PE).

(iv) Tinh chế:

Hòa tan phân đoạn nhỏ SD 4.2 chứa phosphatidylcholin cần phân lập trong axeton theo tỷ lệ khối lượng phân đoạn nhỏ SD 4.2/thể tích axeton nằm trong khoảng từ (1-10):100 (mg/ml), tốt hơn là (2-8):100 (mg/ml), tốt hơn nữa là (4-6):100 (mg/ml), lọc hỗn hợp dung dịch trên phễu lọc chân không để thu lấy phần dung dịch.

Bổ sung CH_2Cl_2 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ theo tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng (0,8-1,2):2 (ml/ml), tốt hơn là 1:2 (ml/ml), trong đó tỷ lệ thể tích của hai dung môi này/phần dung dịch nằm trong khoảng (0,8-1,2) : (1,5-2,5) (ml/ml), tốt hơn là 1:2 (ml/ml).

Bổ sung nước cất vào dung dịch trên cho phân lớp triệt để, chiết lấy pha dưới và làm khan bằng Na_2SO_4 , sau đó đem cất loại dung môi, thu được phosphatidylcholin (PC).

Theo một phương án thực hiện, trong đó quy trình theo sáng chế còn bao gồm bước:

(v) Chứng minh cấu trúc:

Sau khi phân lập được phân lớp PC sạch, tiến hành hòa tan trong dung môi CHCl_3 sau đó phân tích trên thiết bị phổ khối phân giải cao (High resolution mass spectrometry - HRMS): LCMS - IT TOF* (Shimadzu, Nhật Bản) với cột sắc ký Shim – Pack diol column (50mm x 4,6mm ID, kích thước hạt 5 μ) sử dụng hai hệ dung môi *n*-hexan: i-PrOH (isopropanol) với tỷ lệ thể tích bằng 410:85 (ml/ml) và i-PrOH : H_2O với tỷ lệ thể tích bằng 95:5 (ml/ml). Kết hợp với việc so sánh sự phân mảnh của các chất chuẩn trên phổ khối MS^1 , MS^2 , MS^3 để xác định được dạng phân tử của phân lớp PC.

* LCMS: *Liquid chromatography mass spectrometry* – Sắc ký lỏng khối phổ

IT: *Ion trap* - Bẫy ion

TOF: *Time of flight* - Thời gian bay

MS: Mass spectrometry - Phổ khối.

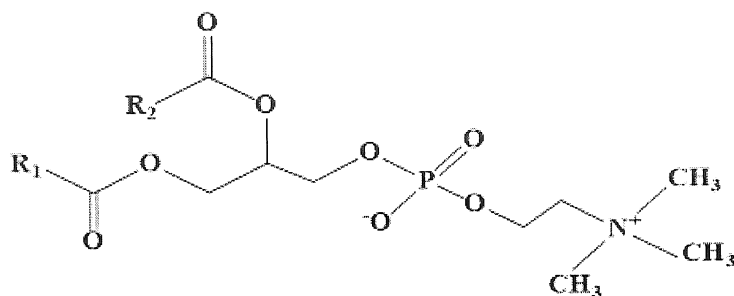
Hàm lượng và cấu trúc của các dạng phân tử, các nhóm chất ở phân đoạn PC trong lipit phân cực của hạt Sưa được phát hiện bằng bẫy ion có độ phân giải cao theo thời gian lưu của phép đo khối phổ, sử dụng thiết bị phổ khối phân giải cao LCMS-IT-TOF, quá trình phân tích được thực hiện trong chế độ ion hóa phun mù điện tử (ESI) với nhận dạng đồng thời các tín hiệu của ion dương và âm. Quá trình quét lấy giới hạn khối lượng phân tử ion được thực hiện trong phạm vi phát hiện m/z 100-1200. Các dạng phân tử riêng lẻ của lipit phân cực được phát hiện bằng cách so sánh với các tiêu chuẩn xác thực trên phần mềm xử lý Shimadzu LC-MS (v.3.60.361), mỗi mảnh ion trong phổ khối MS và MS/MS (MS hai lần) đã có tính sai số tuyệt đối (difference). Sau khi kiểm tra sai số của các ion, cùng với độ bội của liên kết và dạng phân tử thỏa mãn sẽ chọn và xác định diacyl để từ đó xác định được dạng phân tử. Phần trăm các dạng phân tử trong mỗi nhóm chất ở các phân lớp lipit được tính bằng diện tích đỉnh của các ion âm $[M-H]^-$, riêng dạng phân tử PC được xác định bằng diện tích đỉnh của các ion dương $[M+H]^+$ hay $[M+Na]^+$.

Phosphatidylcholin thu được theo sáng chế là một chất màu nâu vàng, dễ hòa tan trong CH_2Cl_2 - C_2H_5OH (tỷ lệ thể tích 1:2 ml/ml) và nước, rất ít hòa tan trong CH_3OH và benzen và không hòa tan trong axeton. Các dạng phân tử phosphatidylcholin của mẫu hạt Sưa (*Dalbergia tonkinensis* Prain) được thể hiện ở Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

TT	Dạng phân tử PC	$[M+H]^+$	Công thức phân tử	%trong phân lớp PC
1	18:2/16:0	758,5691	$C_{42}H_{80}NO_8P$	30,20
2	18:2/18:2	782,5676	$C_{44}H_{80}NO_8P$	26,14
3	18:2/18:1	784,5895	$C_{44}H_{82}NO_8P$	16,90
4	18:2/18:0	786,5972	$C_{44}H_{84}NO_8P$	20,83
5	18:1/18:0	788,6141	$C_{44}H_{86}NO_8P$	4,93

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất phosphatidylcholin (PC) thu được từ quy trình theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên. Hợp chất này có công thức cấu tạo như sau:



trong đó:

R_1 là alkyl hoặc alkenyl;

R_2 là alkyl hoặc alkenyl.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, quy trình theo sáng chế tiếp tục được làm rõ thông qua ví dụ.

Ví dụ 1. Phân lập hợp chất phosphatidylcholin giàu axit béo omega 6 từ hạt Sưa (*Dalbergia tonkinensis* Prain) của Việt Nam

(i) Xử lý nguyên liệu:

Các hạt Sưa sau khi bóc khỏi quả được loại bỏ tạp chất cơ học, sau đó được sấy khô ở nhiệt độ 40°C trong 6 giờ. Lấy 1 kg hạt Sưa khô và nghiền nhỏ bằng máy nghiền trục vít.

(ii) Chiết xuất dầu béo:

Cho 1 kg nguyên liệu sau khi nghiền nhỏ vào 3 lít dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ với tỷ lệ thể tích là 1:2 (ml/ml). Sau đó, tiến hành siêu âm 3 lần, mỗi lần 40 phút bằng máy siêu âm Elmasonic S100H tại tần số siêu âm 37 KHz.

Bổ sung 1 lít CH_2Cl_2 và 1 lít H_2O vào hỗn hợp nêu trên, tiếp tục siêu âm 30 phút, sau đó lọc hỗn hợp trên phễu lọc.

Bổ sung tiếp 1 lít H_2O vào phần dung dịch thu được để phân tách dung dịch thành hai lớp, lớp trên gồm $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, H_2O và các tạp chất khác, lớp dưới gồm CH_2Cl_2 và lipid.

Thu pha hữu cơ phía dưới chứa lipid, làm khan bằng 100 g Na_2SO_4 . Sau đó, pha này được làm bay hơi dung môi bằng máy cất cô chân không Eyela N1300 để thu được lipid tổng (dầu béo). Cân bằng cân phân tích Sartorius analytic (độ chính xác 10^{-4}g) và hàm lượng lipid tổng được tính theo phần trăm so với khối lượng ban đầu, thu được 148 g lipid tổng và bảo quản ở nhiệt độ -10°C .

(iii) Phân lập chất:

Hòa tan 30 g lipid tổng thu được từ bước (ii) trong 1500 ml CHCl_3 sau đó đưa lên cột sắc ký sử dụng chất hấp phụ là 120g oxit nhôm cỡ hạt 0,063 mm (Merck), kích thước cột (4x30 cm) với hỗn hợp dung môi rửa giải là *n*-hexan/diethyl ete/axit axetic có tỷ lệ thể tích là 85 : 15 : 1 (tính theo ml), thu được sáu phân đoạn kí hiệu là SD1-SD6, quá trình phân tách được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng TLC 5 μl chấm trên bản mỏng silica gel 6x6 cm, thực hiện chạy trong hệ dung môi như trên, hiện màu bằng dung dịch H_2SO_4 10%/CH₃OH và hơi nóng trên bếp sấy ở nhiệt độ 80°C.

Hòa tan các phân đoạn SD3 (1,96g), SD4 (4,98g), SD5 (m1,25g) trong CHCl_3 và tiếp tục tiến hành phân tách trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường (Silica gel: 20g, kích thước hạt 42 μm , Merck, Đức). Trong đó:

Dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD3 là hỗn hợp dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ theo tỷ lệ thể tích bằng 95:5 (ml/ml), thu được ba phân đoạn nhỏ ký hiệu là SD3.1, SD3.2 và SD3.3 chứa phosphatidylinositol (PI).

Dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD4 là hỗn hợp dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ 28% theo tỷ lệ thể tích bằng 90:10:1, thu được ba phân đoạn nhỏ ký hiệu là SD 4.1; SD4.2; SD4.3 chứa phosphatidylcholin (PC).

Dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD5 là hỗn hợp dung môi $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$: 1-propanol : CHCl_3 : CH_3OH : KCl 25% theo tỷ lệ thể tích (tính theo ml) bằng 25 : 35 : 10 : 15 : 10, thu được phân lớp phosphatidyletanolamin (PE).

(iv) Tinh chế:

Hòa tan 2,76 g phân đoạn nhỏ SD 4.2 thu được trong 100ml axeton rồi lọc trên phễu lọc chân không Buchner, dung dịch được hút giữ lại vào bình Bunsen sau đó bổ sung $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-C}_2\text{H}_5\text{OH}$ theo tỷ lệ thể tích 1:2 (ml/ml), trong đó tỷ lệ thể tích của hai dung môi này/phần dung dịch là 1:2 (ml/ml), và rửa bằng nước cất, làm khan bằng Na_2SO_4 sau đó đem cất loại dung môi, thu được 1,87 g phosphatidylcholin (PC). PC thu được là chất màu nâu vàng, dễ hòa tan trong $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (tỷ lệ thể tích 1:2 ml/ml) và nước, rất ít hòa tan trong CH_3OH và benzen và không hòa tan trong axeton. PC thu được được bảo quản trong một chiếc bình tối.

(v) Chứng minh cấu trúc:

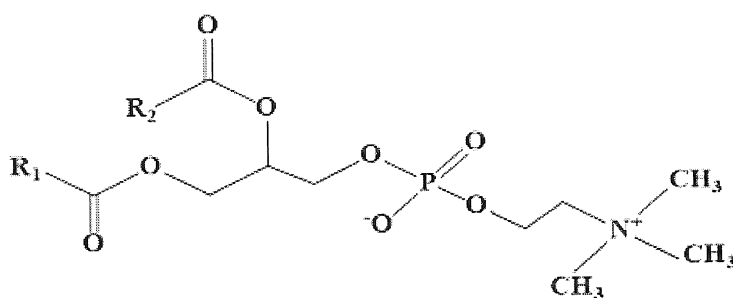
Sau khi phân lập được phân lớp PC sạch, tiến hành hòa tan trong dung môi CHCl_3 . Hàm lượng và cấu trúc của các dạng phân tử, các nhóm chất ở các phân lớp trong lipit phân cực của hạt Sưa được phát hiện bằng bể ion có độ phân giải

cao theo thời gian lưu của phép đo khối phổ, sử dụng thiết bị phổ khối phân giải cao LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Nhật Bản), quá trình phân tích được thực hiện trong chế độ ion hóa phun mù điện tử (ESI) với nhận dạng đồng thời các tín hiệu của ion dương và âm. Quá trình quét được thực hiện trong phạm vi m/z 100-1200. Các dạng phân tử riêng lẻ của lipid phân cực được phát hiện bằng cách so sánh với các tiêu chuẩn xác thực trên phần mềm xử lý Shimadzu LC-MS (v.3.60.361), mỗi mảnh ion trong MS và MS/MS đã có tính sai số tuyệt đối. Sau khi kiểm tra sai số của các ion, cùng với độ bội của liên kết và dạng phân tử thỏa mãn sẽ chọn và xác định diacyl để từ đó xác định được dạng phân tử. Phần trăm các dạng phân tử trong mỗi nhóm chất ở các phân lớp lipid được tính bằng diện tích đỉnh của các ion âm $[M-H]^-$, riêng các dạng phân tử PC được xác định bằng diện tích đỉnh của các ion dương $[M+H]^+$ hay $[M+Na]^+$.

Dạng phân tử phosphatidylcholin của mẫu hạt Sura (*Dalbergia tonkinensis* Prain)

Công thức phân tử: $C_xH_yNO_8P$

Công thức cấu tạo của phosphatidylcholin:



Sau khi phân tích trên thiết bị LCMS – IT TOF với cột sắc ký Shim – Pack diol column (50mm x 4.6mm ID, kích thước hạt 5 μ) sử dụng hai hệ dung môi *n*-hexan: i-PrOH = 410:85 (ml/ml) và i-PrOH : H₂O = 95:5 (ml/ml). Các thông tin

thu được về MS^1 , MS^2 và MS^3 trên phổ ion âm và ion dương sẽ được sử dụng để nhận dạng các dạng phân tử của PC trong mẫu hạt Sura *Dalbergia tonkinensis* Prain.

Đối với các phân tử PC, tín hiệu của ion phân tử trên phổ ion dương quan sát tốt hơn ion phân tử trên phổ ion âm. Trên phổ $MS[E^-]$, quan sát được tín hiệu của ion âm $[M + HCOO]^-$ và $[M - CH_3]^-$, đồng thời trên phổ $MS[E^+]$ quan sát được tín hiệu của ion dương $[M + H]^+$. Dựa vào các dữ liệu MS^2 và MS^3 đã sàng lọc được 6 tín hiệu tương ứng với 6 dạng phân tử trong lớp chất này (Hình 1 và Bảng 2).

Bảng 2. Tín hiệu của ion phân tử $[M+H]^+$ của các dạng phân tử có mặt trong lớp chất phosphatidylcholin của mẫu hạt Sura (*Dalbergia tonkinensis* Prain) trên phổ MS^1

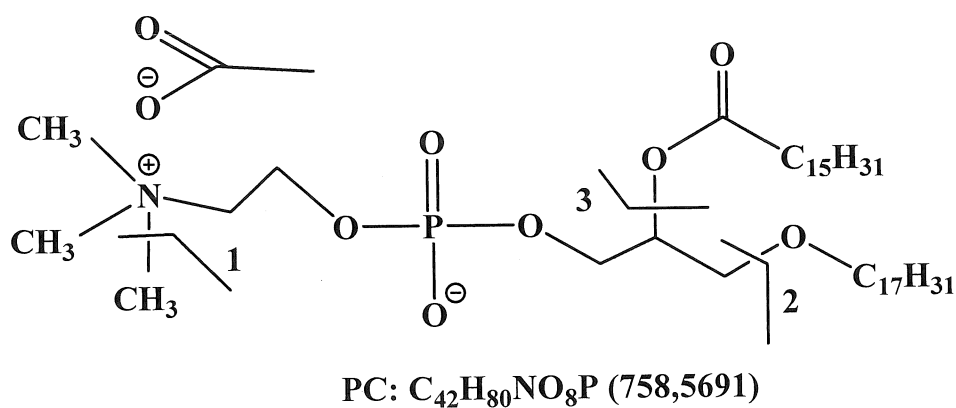
TT	Thời gian lưu	$[M+H]^+$ m/z
1	27,32	758,5691
2	27,22	782,5676
3	26,94	784,5895
4	26,94	786,5972
5	26,99	788,6141

$[M+H]^+$ 758,5691

Trong số các tín hiệu thu được, tín hiệu ion dương $[M+H]^+$ có cường độ mạnh nhất tại m/z 758,5691; tương ứng với dạng phân tử PC chiếm hàm lượng cao nhất trong phân lớp này. Trên phổ ion âm các ion $[M+HCOO]^-$ và $[M-CH_3]^-$ tương ứng có tín hiệu tại m/z 802,5536 và 742,5305 (Hình 2). Công thức phân tử tính toán được là $C_{42}H_{80}NO_8P$, với 8 nguyên tử O trong phân tử thì đây là một diacyl PC.

Bảng 3. Dữ liệu phổ MS¹, MS², MS³ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion dương [M+H]⁺ tại giá trị m/z 758,5691

Ion	MS ¹	MS ²	MS ³	Thành phần
	m/z			
[M+H] ⁺	758,5691			C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ P
[M+HCOO] ⁻	802,5536	[M+HCOO-C ₂ H ₄ O ₂] ⁻ 742,5305		
			279,2280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂ (C18:2)
			255,2283	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ (C16:0)
[M-CH ₃] ⁻	742,5305	279,2291		C ₁₈ H ₃₂ O ₂ (C18:2)
		255,2347		C ₁₆ H ₃₂ O ₂ (C16:0)



Hình 3. Sự phân mảnh của ion phân tử PC có tín hiệu ion dương tại m/z 758,5691

[M+HCOO]⁻ 802,5536

Các thông tin về dữ liệu phổ MS², MS³ thu được của dạng phân tử PC được trình bày trong Bảng 3. Trên phổ ion âm MS² của ion [M+HCOO]⁻ 802,5536 có

xuất hiện tín hiệu tại m/z 742,5305 tương ứng với anion $[M+HCOO-C_2H_4O_2]^-$. Trên phổ MS^3 của ion mảnh 742,5305 cho các ion mảnh có tín hiệu tại m/z 279,2280 tương ứng với anion của axit béo $C_{18}H_{32}O_2$ (18:2) (Hình 4), và tín hiệu tại m/z 255,2283 tương ứng với anion của axit béo $C_{16}H_{32}O_2$ (16:0) (Hình 5).

Trên phổ ion âm MS^2 của ion $[M-CH_3]^-$ 742,5305 thu được tín hiệu của các ion mảnh tại m/z 279,2291 tương ứng với anion của axit béo $C_{18}H_{32}O_2$ (18:2n), và tín hiệu tại m/z 255,2347 tương ứng với anion của axit béo $C_{16}H_{32}O_2$ (16:0) (Hình 5). Từ các dữ liệu thu được, dạng phân tử của PC với các ion $[M+H]^+$ cho tín hiệu tại m/z 758,5691, ion âm $[M+HCOO]^-$ tại m/z 802,5536, ion âm $[M-CH_3]^-$ tại m/z 742,5305 được xác định là phosphatidylcholin **16:0/18:2**

$[M+H]^+$ 782,5676

Tín hiệu ion phân tử dương $[M+H]^+$ tại m/z 782,5676 có cường độ mạnh thứ 2 trong phân lớp phosphatidylcholin. Những tín hiệu đồng thời quan sát được trên phổ ion âm của các ion $[M+HCOO]^-$ và $[M-CH_3]^-$ tại m/z 826,5629 và 766,5450 (Hình 6). Công thức phân tử tính toán được là $C_{44}H_{80}NO_8P$, với 8 nguyên tử O trong phân tử thì đây cũng là một diacyl PC.

Trên phổ ion âm MS^2 của ion $[M+HCOO]^-$ 826,5629 có xuất hiện tín hiệu tại m/z 766,5480 tương ứng với anion $[M+HCOO-C_2H_4O_2]^-$. Trên phổ MS^3 của ion mảnh 766,5480 cho ion mảnh có tín hiệu tại m/z 279,2290 tương ứng với anion của axit béo $C_{18}H_{32}O_2$ (18:2) (Hình 7). Trên phổ ion âm MS^2 của ion $[M-CH_3]^-$ 766,5450 thu được tín hiệu của các ion mảnh tại m/z 279,2334 tương ứng với anion của axit béo $C_{18}H_{32}O_2$ (18:2) (Hình 8). Cấu hình PC 18:2/18:2 phù hợp với các thông tin thu được. Do dạng phân tử PC chứa 2 mạch axit béo giống nhau nên trên phổ MS^2 và MS^3 chỉ thu được tín hiệu anion của 1 axit béo. Dạng phân tử PC xác định được là **PC 18:2/18:2**.

$[M+H]^+$ 784,5895

Tín hiệu ion phân tử dương $[M+H]^+$ tại m/z 784,5895 có cường độ tương đối mạnh trong phân lớp phosphatidylcholin. Những tín hiệu đồng thời quan sát được trên phổ ion âm của các ion $[M+HCOO]^-$ và $[M-CH_3]^-$ tại m/z 828,5528 và 768,2676 (Hình 9). Công thức phân tử tính toán được là $C_{44}H_{82}NO_8P$, với 8 nguyên tử O trong phân tử đây cũng là một diacyl PC.

Trên phổ ion âm MS^2 của ion $[M+HCOO]^-$ 828,5528 có xuất hiện tín hiệu tại m/z 768,2676 tương ứng với anion $[M+HCOO-C_2H_4O_2]^-$. Trên phổ ion âm MS^2 của ion $[M-CH_3]^-$ 768,2676 thu được tín hiệu của các ion mảnh tại m/z 279,231 tương ứng với anion của axit béo $C_{18}H_{32}O_2$ (18:2) và m/z 281,226 tương ứng với anion của axit béo $C_{18}H_{34}O_2$ (18:1) (Hình 10). Dạng phân tử PC xác định được là **PC 18:2/18:1**.

$[M+H]^+$ 786,5972

Tín hiệu ion phân tử dương $[M+H]^+$ tại m/z 786,5972 chiếm 20,83% trong phân lớp phosphatidylcholin. Những tín hiệu đồng thời quan sát được trên phổ ion âm của các ion $[M+HCOO]^-$ và $[M-CH_3]^-$ tại m/z 830,5920 và 770,382 (Hình 11). Công thức phân tử tính toán được là $C_{44}H_{84}NO_8P$, với 8 nguyên tử O trong phân tử thì đây cũng là một diacyl PC.

Trên phổ ion âm MS^2 của ion $[M+HCOO]^-$ 830,5920 có xuất hiện tín hiệu tại m/z 770,382 tương ứng với anion $[M+HCOO-C_2H_4O_2]^-$. Trên phổ ion âm MS^2 của ion $[M-CH_3]^-$ 770,382 thu được tín hiệu của các ion mảnh tại m/z 279,229 tương ứng với anion của axit béo $C_{18}H_{32}O_2$ (18:2) và m/z 283,244 tương ứng với anion của axit béo $C_{18}H_{36}O_2$ (18:0) (Hình 12). Dạng phân tử PC xác định được là **PC 18:2/18:0**.

$[M+H]^+$ 788,6141

Tín hiệu ion phân tử dương $[M+H]^+$ tại m/z 788,6141 chiếm hàm lượng thấp nhất trong phân lớp phosphatidylcholin. Những tín hiệu đồng thời quan sát được trên phổ ion âm của các ion $[M+HCOO]^-$ và $[M-CH_3]^-$ tại m/z 832,5910 và

772,2672 (Hình 13). Công thức phân tử tính toán được là $C_{44}H_{84}NO_8P$, với 8 nguyên tử O trong phân tử thì đây cũng là một diacyl PC.

Trên phổ ion âm MS^2 của ion $[M+HCOO]^-$ 832,5910 có xuất hiện tín hiệu tại m/z 772,2672 tương ứng với anion $[M+HCOO-C_2H_4O_2]^-$. Trên phổ ion âm MS^2 của ion $[M-CH_3]^-$ 772,2672 thu được tín hiệu của các ion mảnh tại m/z 281,247 tương ứng với anion của axit béo $C_{18}H_{34}O_2$ (18:1) và m/z 283,226 tương ứng với anion của axit béo $C_{18}H_{36}O_2$ (18:0) (Hình 14). Dạng phân tử PC xác định được là **PC 18:1/18:0**.

Kết quả về thành phần và hàm lượng các dạng phân tử của phân lớp phosphatidylcholin (PC) trong mẫu hạt Sura *Dalbergia tonkinensis* Prain được trình bày trong Bảng 4. Cũng tương tự như phân lớp phosphatidylethanolamine, trong phân lớp PC có mặt chủ yếu các axit béo C16:0 và C18, trong đó axit béo C18 chiếm ưu thế, có mặt trong cả 6 dạng phân tử PC. Tỷ lệ phân bố nhiều nhất là axit béo 18:2.

Bảng 4. Các dạng phân tử phosphatidylcholin của mẫu hạt Sura (*Dalbergia tonkinensis* Prain)

TT	Dạng phân tử PC	$[M+H]^+$	Công thức phân tử	% trong phân lớp PC
1	18:2/16:0	758,5691	$C_{42}H_{80}NO_8P$	30,20
2	18:2/18:2	782,5676	$C_{44}H_{80}NO_8P$	26,14
3	18:2/18:1	784,5895	$C_{44}H_{82}NO_8P$	16,90
4	18:2/18:0	786,5972	$C_{44}H_{84}NO_8P$	20,83
5	18:1/18:0	788,6141	$C_{44}H_{86}NO_8P$	4,93

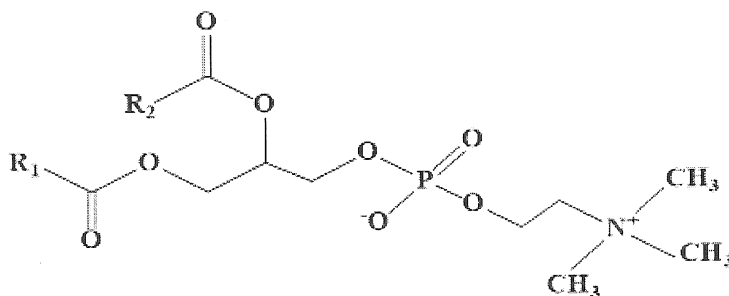
Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình phân lập hợp chất phosphatidylcholin (PC) giàu axit béo omega 6 từ hạt Sura (*Dalbergia tonkinensis* Prain) của Việt Nam. Sáng chế này đã đưa ra quy trình phân lập các phospholipit phân cực cho đối tượng dầu hạt Sura, một nghiên cứu hoàn toàn mới ở Việt Nam. Đồng thời, sáng

chế này cũng tạo cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo nguồn nguyên liệu cho việc bào chế mỹ phẩm dựa trên sự khai thác nguồn phế liệu dư thừa hàng năm và góp phần vào việc khai thác, gieo trồng bảo tồn và nâng cao giá trị sử dụng các loại thực vật quý trong nước.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình phân lập phosphatidylcholin giàu axit béo omega 6 từ dầu hạt Sưa (*Dalbergia tonkinensis* Prain), trong đó hợp chất phosphatidylcholin này có công thức cấu tạo như sau:



trong đó:

R_1 là alkyl hoặc alkenyl;

R_2 là alkyl hoặc alkenyl; và

trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) xử lý nguyên liệu:

làm sạch hạt Sưa khỏi các tạp chất cơ học, sau đó sấy khô ở nhiệt độ 35-45°C, và nghiền nhỏ hạt;

(ii) chiết xuất dầu béo:

cho hạt Sưa đã nghiền nhỏ vào dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ với tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng (0,8 - 1,2) : 2 (ml/ml), trong đó tỷ lệ thể tích dung môi/khối lượng hạt Sưa nằm trong khoảng khoảng (2,5 - 3,5) : 1 (ml/g),

tiến hành siêu âm nhiều lần, mỗi lần 30-50 phút,

bổ sung CH_2Cl_2 và H_2O vào hỗn hợp nêu trên với tỷ lệ thể tích của CH_2Cl_2 và H_2O tính trên mỗi 2 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ nêu trên nằm trong khoảng (0,8-1,2) ml, tiếp

tục siêu âm 30-50 phút, sau đó đem lọc hỗn hợp trên phễu lọc, thu lấy phần dung dịch lọc,

bổ sung tiếp H_2O vào phần dung dịch lọc thu được với tỷ lệ thể tích của H_2O tính trên mỗi 2 ml C_2H_5OH nêu trên nằm trong khoảng (0,8-1,2) ml để phân tách dung dịch thành hai lớp, lớp trên gồm C_2H_5OH , H_2O và các tạp chất khác, lớp dưới gồm CH_2Cl_2 và lipit,

tách lấy lớp dưới và cô cất chân không dưới áp suất thấp để làm bay hơi dung môi, thu được lipit tổng;

(iii) phân lập chất:

hòa tan lipit tổng thu được từ bước (ii) trong $CHCl_3$ theo tỷ lệ khối lượng lipit tổng/thể tích $CHCl_3$ nằm trong khoảng (25 - 35) : (1200 - 1800) (g/ml),

đưa hỗn hợp nêu trên lên cột sắc ký sử dụng chất hấp phụ là oxit nhôm cỡ hạt 0,063-0,200 mm với hỗn hợp dung môi rửa giải là *n*-hexan/diethyl ete/axit axetic có tỷ lệ thể tích (tính theo ml) nằm trong khoảng (82-87) : (11-17) : (0,8-1,1), thu được sáu phân đoạn phân đoạn kí hiệu là SD1-SD6, quá trình phân tách được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng TLC,

hòa tan phân đoạn SD3, SD4 và SD5 sau khi kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng trong $CHCl_3$ theo tỷ lệ khối lượng mỗi phân đoạn/thể tích $CHCl_3$ nằm trong khoảng 80-120/1 (mg/ml) và tiếp tục tiến hành phân tách trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường có kích thước hạt 37 - 63 μm (230 - 400 mesh), trong đó:

dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD3 là hỗn hợp dung môi $CHCl_3/CH_3OH$ với tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng (92-96) : (3,5-5,5) (ml/ml), thu được ba phân đoạn nhỏ ký hiệu là SD3.1, SD3.2 và SD3.3 chứa phosphatidylinositol (PI),

dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD4 là hỗn hợp dung môi $CHCl_3/CH_3OH/NH_4OH$ 28-30% với tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng (88-92) :

(8,8-10,2) : (0,85-1,1), thu được ba phân đoạn nhỏ ký hiệu là SD4.1; SD4.2; SD4.3 chứa phosphatidylcholin (PC),

dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD5 là hỗn hợp dung môi $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ /1-propanol/ CHCl_3 / CH_3OH /KCl 25-28% với tỷ lệ thể tích (tính theo ml) nằm trong khoảng (23,5-25,5) : (34-36) : (9-11) : (13-15,5) : (8,5-10,5), thu được phân đoạn chứa phosphatidyletanolamin (PE); và

(iv) tinh chế:

hòa tan phân đoạn nhỏ SD 4.2 chứa phosphatidylcholin cần phân lập trong axeton theo tỷ lệ khối lượng phân đoạn nhỏ SD 4.2/thể tích axeton nằm trong khoảng từ (1-10):100/1 (mg/ml), lọc hỗn hợp dung dịch trên phễu lọc chân không để thu lấy phân dung dịch,

bổ sung CH_2Cl_2 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ theo tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng (0,8-1,2):2 (ml/ml), trong đó tỷ lệ thể tích của hai dung môi này/phân dung dịch nằm trong khoảng (0,8-1,2) : (1,5-2,5) (ml/ml), và

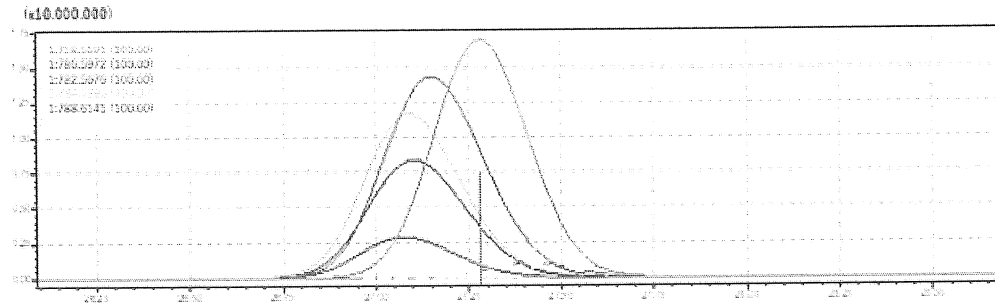
bổ sung nước cất vào dung dịch trên cho phân lớp triệt để, chiết lấy pha dưới và làm khan bằng Na_2SO_4 , sau đó đem cất loại dung môi, thu được phosphatidylcholin (PC).

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó ở bước (ii), hạt Sưa sau khi nghiền nhỏ được cho vào dung môi CH_2Cl_2 / $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ có tỷ lệ thể tích là 1 : 2 (ml/ml).

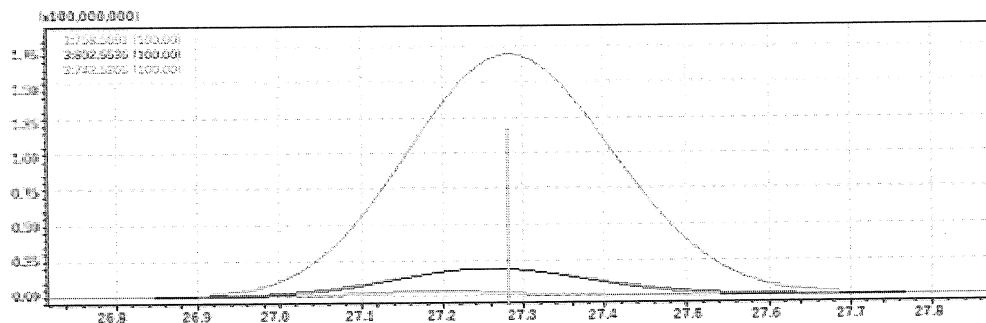
3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ở bước (ii), tỷ lệ thể tích dung môi/khối lượng hạt Sưa là 3 : 1 ml/g.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (ii), CH_2Cl_2 và H_2O được bổ sung vào hỗn hợp sau khi siêu âm với tỷ lệ thể tích của CH_2Cl_2 và H_2O tính trên mỗi 2 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ nêu trên là 1 ml.

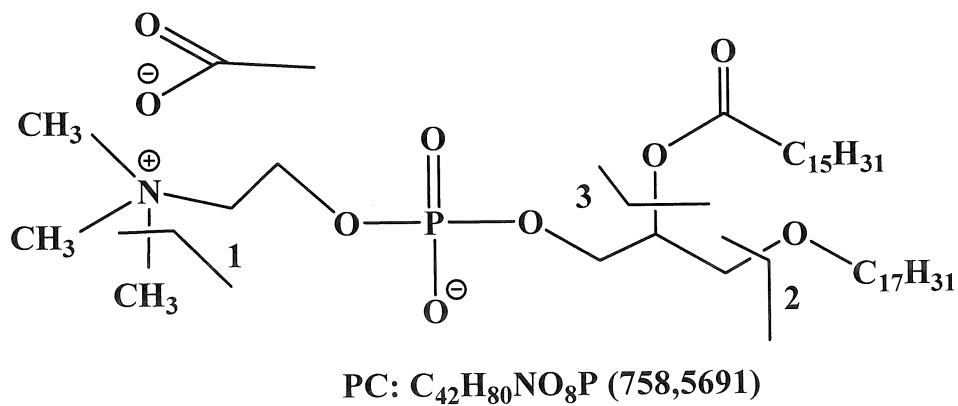
5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (ii), để phân tách dung dịch lọc thu được thành hai lớp, H_2O được bổ sung vào dung dịch này với tỷ lệ thể tích tính trên mỗi 2 ml C_2H_5OH nêu trên là 1 ml.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (ii), lớp dưới được làm khan trước bằng Na_2SO_4 .
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iii), lipit tổng thu được từ bước (ii) được hòa tan trong $CHCl_3$ theo tỷ lệ khối lượng lipit tổng/thể tích $CHCl_3$ là 35 : 1500 (g/ml).
8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iii), tại cột sắc ký sử dụng chất hấp phụ là oxit nhôm, hỗn hợp dung môi rửa giải là n-hexan/diethyl ete/axit axetic có tỷ lệ thể tích là 85 : 15 : 1 (tính theo ml).
9. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iii), mỗi phân đoạn SD3, SD4 và SD5 được hòa tan trong $CHCl_3$ theo tỷ lệ khối lượng mỗi phân đoạn/thể tích $CHCl_3$ là 100/1 (mg/ml).
10. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iii), dung môi rửa giải đối với phân đoạn SD4 là hỗn hợp dung môi $CHCl_3/CH_3OH/NH_4OH$ 28% với tỷ lệ thể tích là 90:10:1 (tính theo ml).
11. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iv), phân đoạn nhỏ SD 4.2 được hòa tan trong axeton theo tỷ lệ khối lượng phân đoạn nhỏ SD 4.2/thể tích axeton là (2-8):100 (mg/ml), tốt hơn là (4-6):100 (mg/ml).
12. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iv), $CH_2Cl_2-C_2H_5OH$ được bổ sung theo tỷ lệ thể tích là 1:2 (ml/ml).



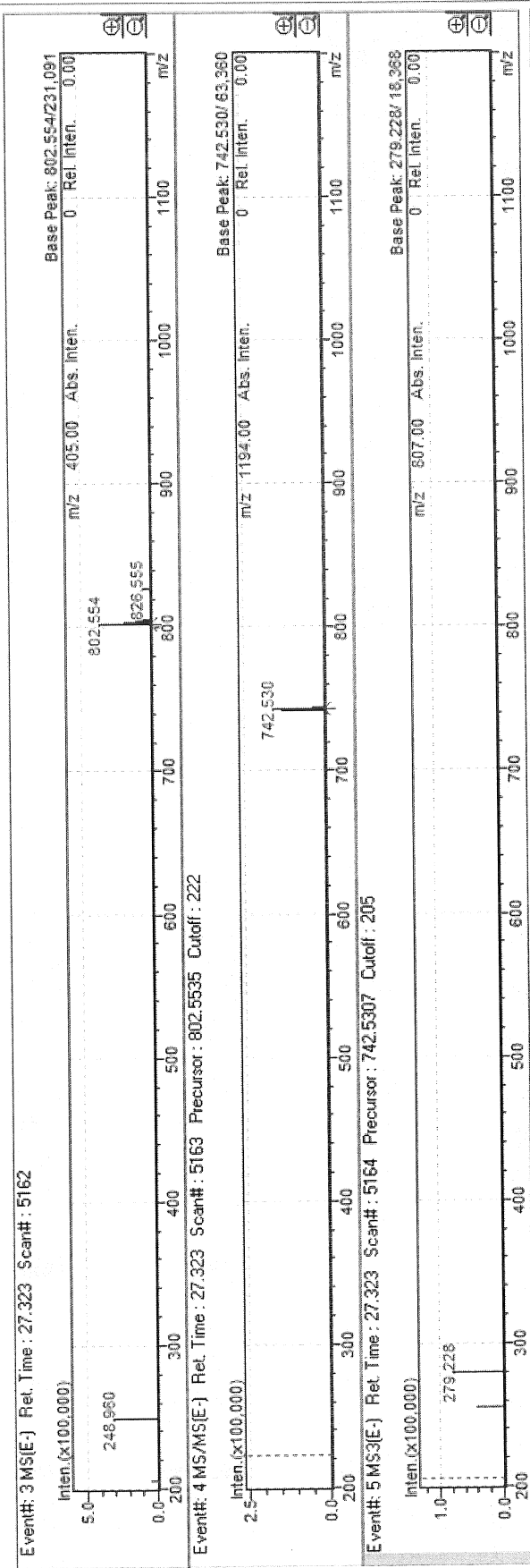
Hình 1. Sắc ký đồ HRMS $[E^+]$ lớp chất phosphatidylcholin của mẫu hạt Sưa (*Dalbergia tonkinensis* Prain)



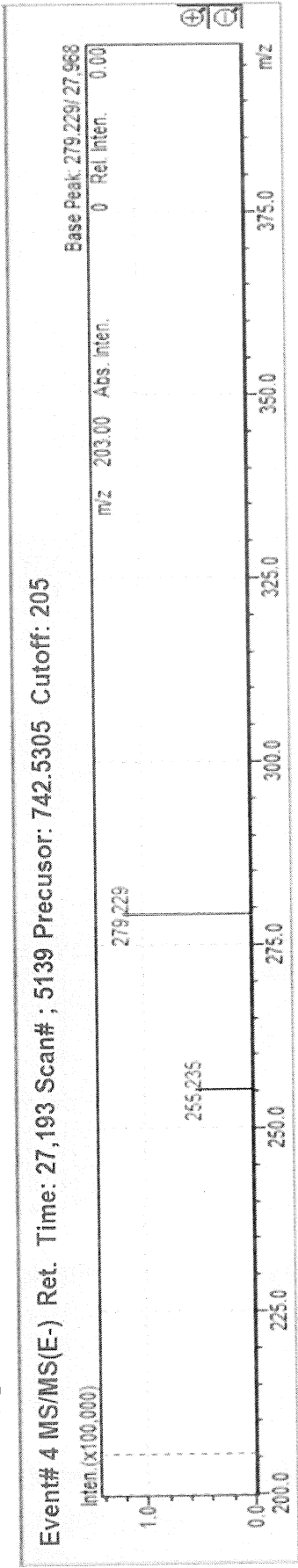
Hình 2. Sắc ký đồ phổ MS $[E^-]$ và MS $[E^+]$ của dạng phân tử PC có tín hiệu ion dương $[M+H]^+$ tại giá trị m/z 758,5691



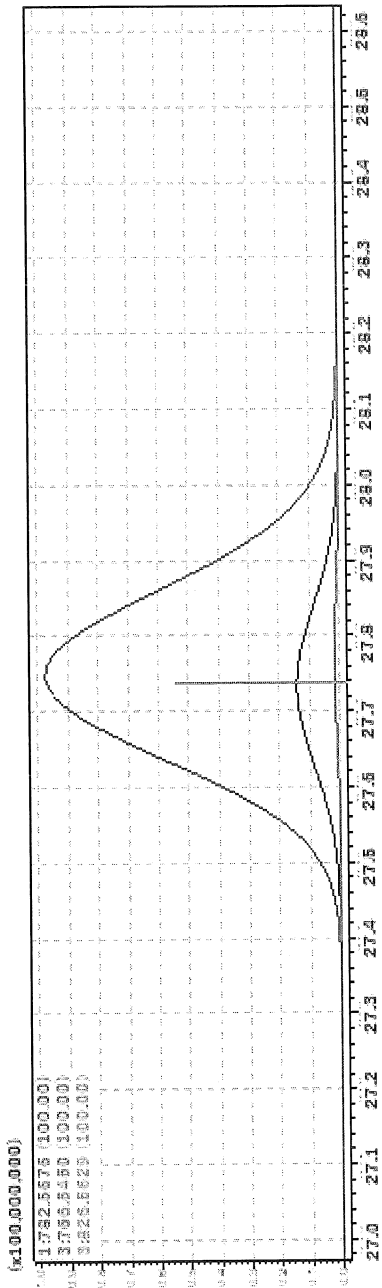
Hình 3. Sự phân mảnh của ion phân tử PC có tín hiệu ion dương tại m/z 758,5691



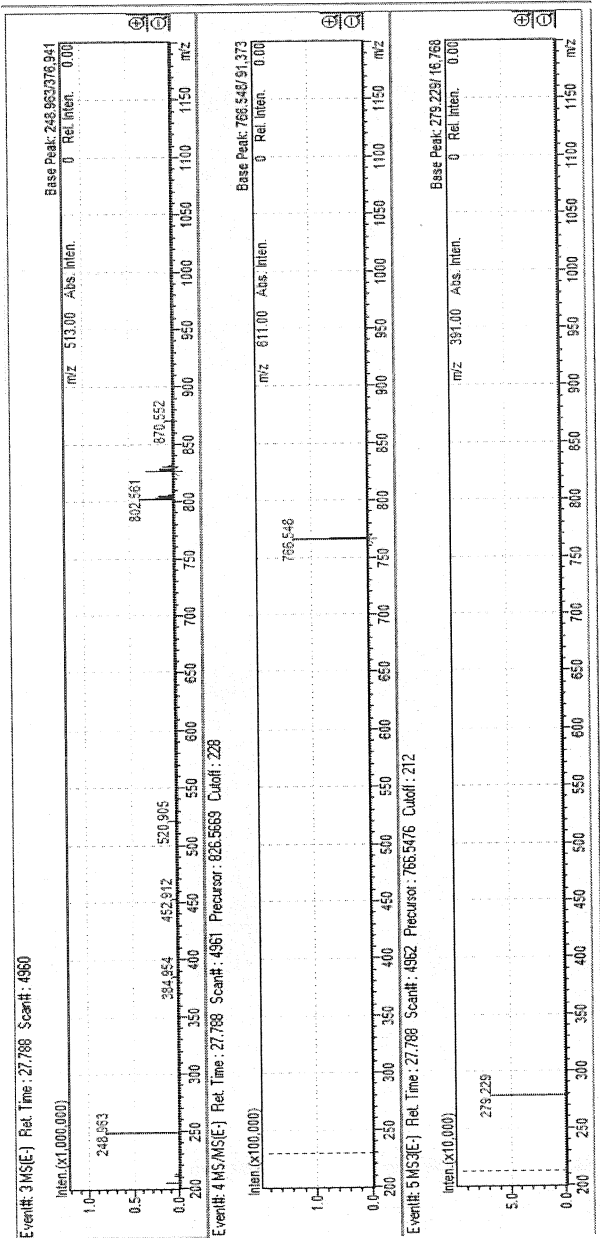
Hình 4. Sự phân mảnh trong phổ MS² và MS³ [E⁻] của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm [M+HCOO]⁻ tại m/z 802,5536



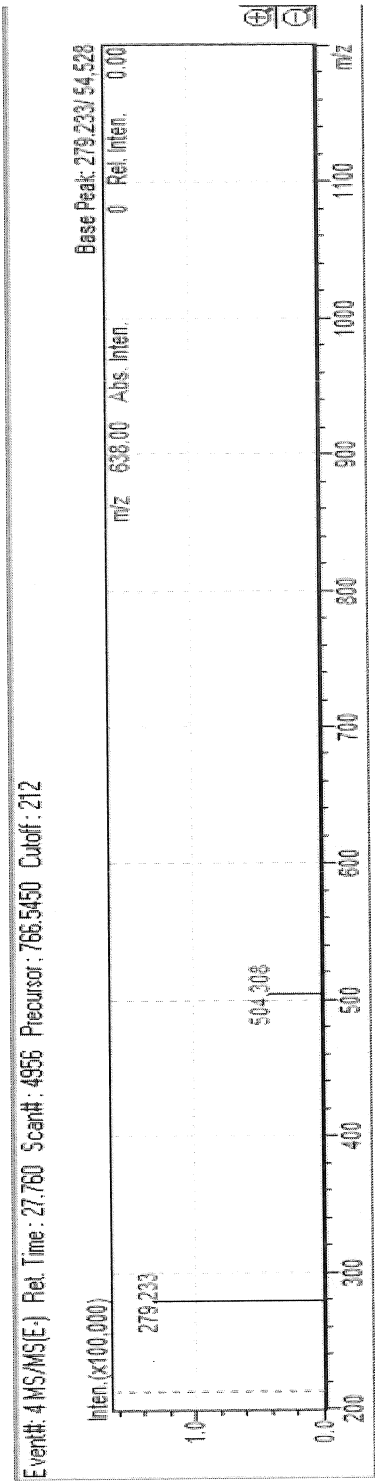
Hình 5. Sự phân mảnh trong phổ MS² [E⁻] của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm [M-CH₃]⁻ tại m/z 742,5305 (PC 16:0/18:2)



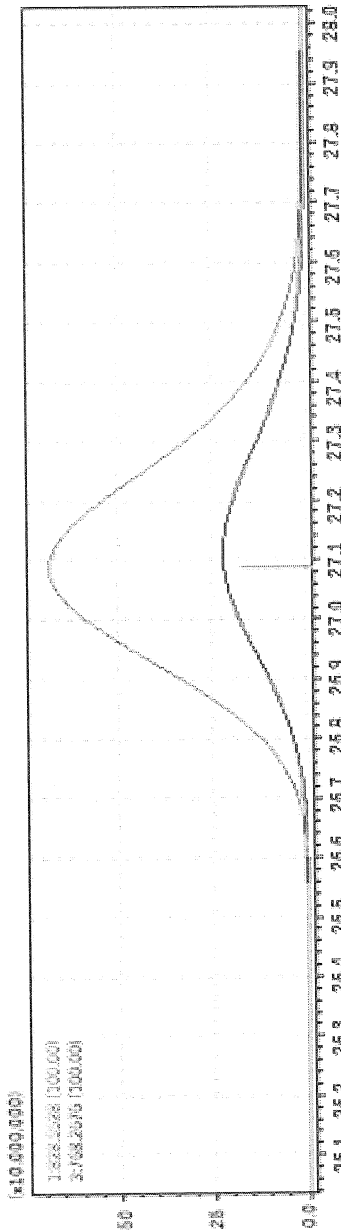
Hình 6. Sắc ký đồ phổ MS[E⁻] và MS[E⁺] của dạng phân tử PC có tín hiệu ion dương [M+H]⁺ tại giá trị m/z 782,5676



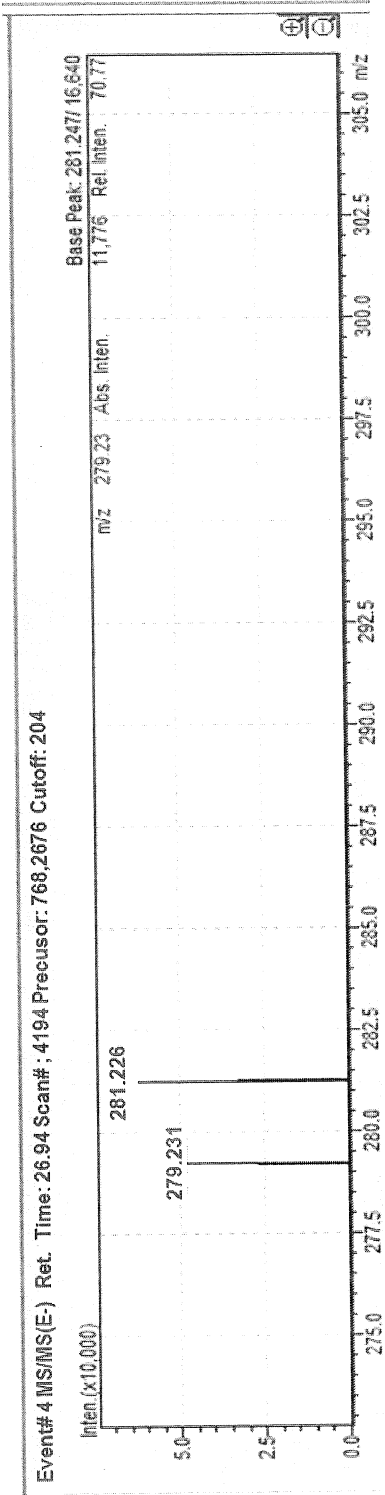
Hình 7. Sự phân mảnh trong phổ MS² và MS³ [E⁻] của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm [M+HCOO]⁻ tại m/z 826,5629



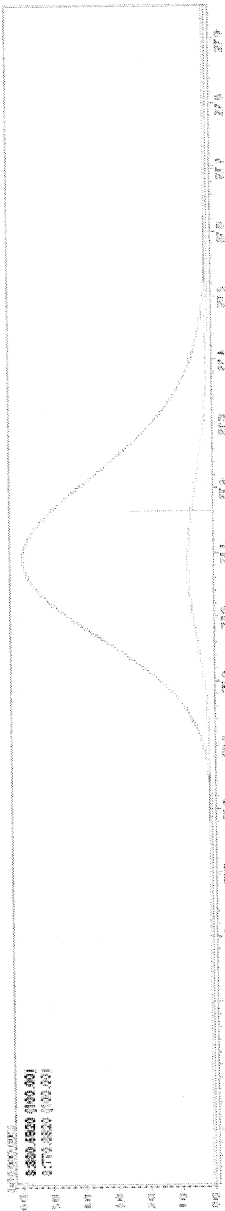
Hình 8. Sự phân mảnh trong phổ MS² [E⁻] của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm [M-CH₃]⁻ tại m/z 766,5450



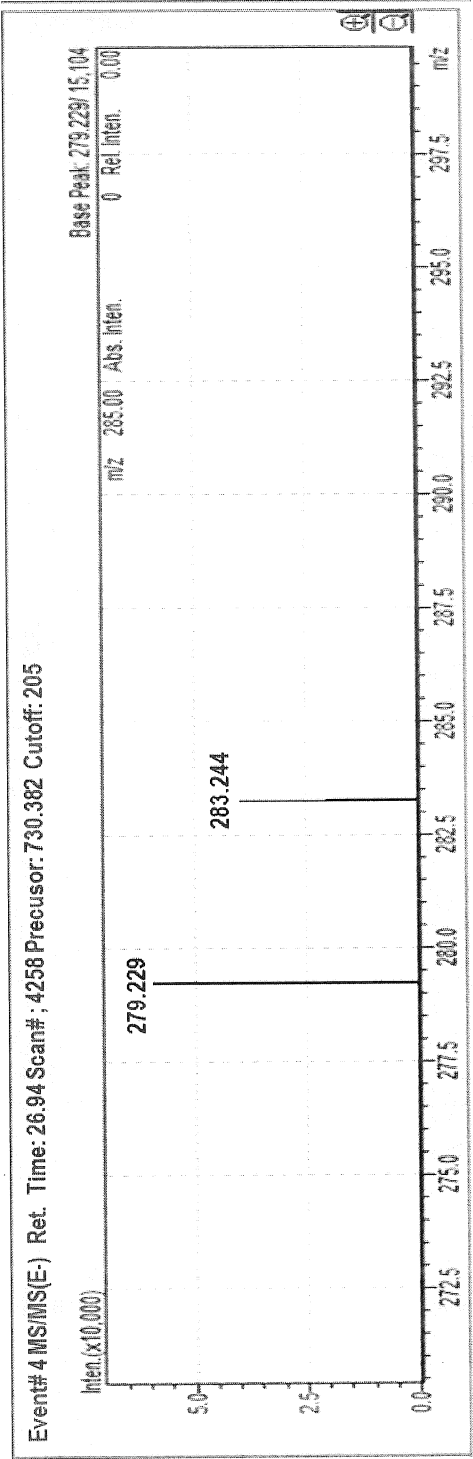
Hình 9. Sắc ký đồ phổ MS[E⁻] của dạng phân tử PC có tín hiệu ion dương [M+H]⁺ tại giá trị m/z 784,5895



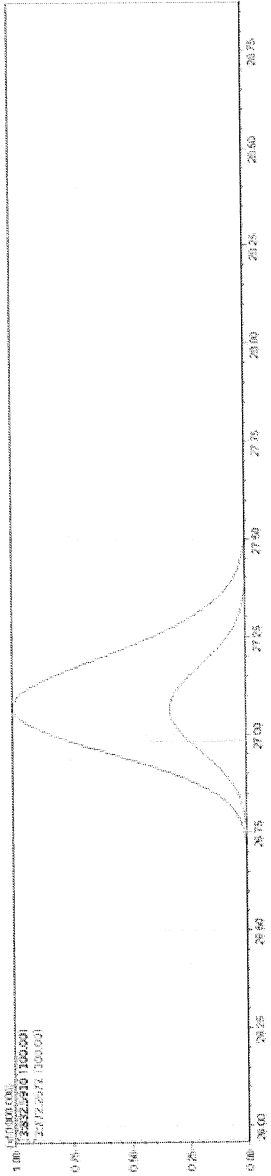
Hình 10. Sự phân mảnh trong phổ MS² [E⁻] của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm [M-CH₃]⁻ tại m/z 768,2676



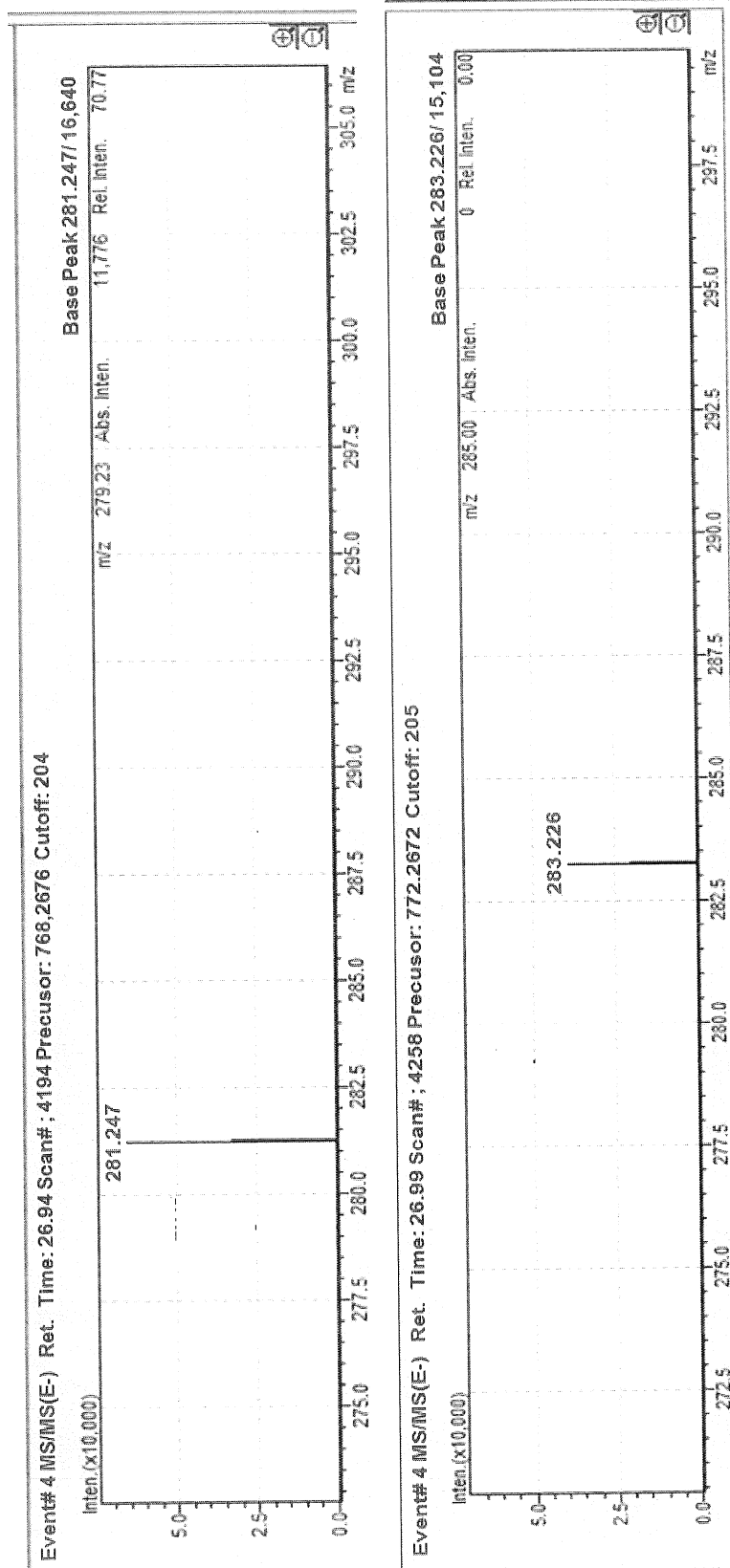
Hình 11. Sắc ký đồ phổ MS[E⁻] của dạng phân tử PC có tín hiệu ion dương [M+H]⁺ tại giá trị m/z 786,5972



Hình 12. Sự phân mảnh trong phổ MS² [E⁻] của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm [M-CH₃]⁻ tại m/z 768,2676



Hình 13. Sắc ký đồ phổ MS[E⁻] của dạng phân tử PC có tín hiệu ion dương [M+H]⁺ tại giá trị m/z 788,6141



Hình 14. Sự phân mảnh trong phổ MS² [E⁻] của dạng phân tử PC có tín hiệu ion âm [M-CH₃]⁻ tại m/z 772,2672