



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11) 
2-0001803

(51)⁷ C07H 17/06, 1/08, A61K 36/75

(13) Y

(21) 2-2016-00026

(22) 26.01.2016

(45) 25.09.2018 366

(43) 25.05.2016 338

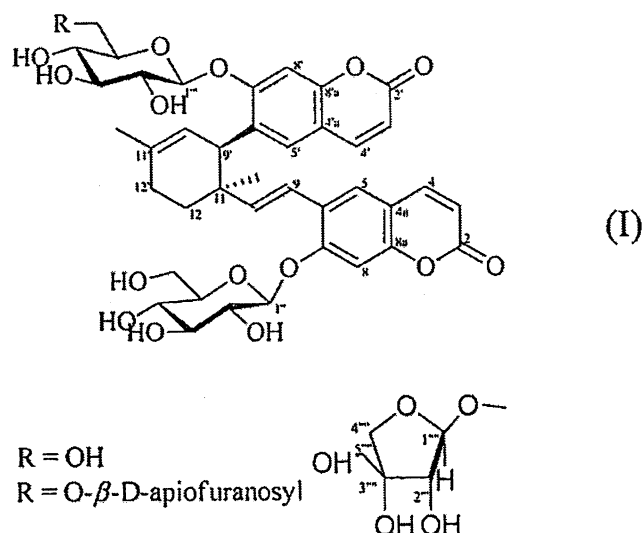
(73) VIỆN HÓA HỌC CÁC HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN - VIỆN HÀN LÂM KHOA
HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)

Nhà 1H, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội, Việt Nam

(72) Nguyễn Mạnh Cường (VN), Trần Thu Hương (VN), Phạm Ngọc Khanh (VN),
Nguyễn Văn Tài (VN), Vũ Thị Hà (VN), Ninh Thế Sơn (VN), Bùi Hữu Tài (VN), Tô
Đạo Cường (VN), Young Ho Kim (KR)

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP HỢP CHẤT BISCOUMARIN MONOTERPEN
GLYCOSIT TỪ CÂY XÁO TAM PHÂN (PARAMIGNYA TRIMERA) VÀ HỢP
CHẤT BISCOUMARIN MONOTERPEN GLYCOSIT THU ĐƯỢC BẰNG QUY
TRÌNH NÀY

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập hợp chất biscoumarin
monoterpen glycosit từ cây xáo tam phân (Paramignya trimera). Giải pháp hữu
ích cũng đề cập đến hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit có công thức (I)
thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ hóa sinh và các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là đề cập đến quy trình phân lập hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit (paratrimerin A và paratrimerin B) từ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trên thế giới, chi *Paramignya* thuộc họ Cam (Rutaceae) được nghiên cứu từ năm 1990, tập trung chủ yếu vào 2 loài *P. monophylla* và *P. griffithii*. Ở Việt Nam, 7 loài thuộc chi *Paramignya* đã được phát hiện, phân bố chủ yếu ở miền Nam Việt Nam (Hộ, Cây cỏ Việt Nam, quyển 2, Nxb Trẻ, 437-439). Từ những năm cuối thế kỷ thứ 20 trở lại đây, các nhà khoa học đã phân lập được gần 20 hợp chất tự nhiên từ chi *Paramignya*. Các hợp chất này thuộc các dạng như: coumarin (Kumar et al., Phytochemistry, 1995, 38, 805-806; Kumar et al., Phytochemistry, 1998, 49, 215-218; Cường và cộng sự, Tạp chí Hóa học, 2013, 5, 292-296), flavonoid, triterpenoid, chromene (Wattanapiromsakul et al., Phytochemistry, 2000, 55, 269-273; Sung và cộng sự, Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, 2011, 74-75) và các dẫn xuất tirucallane (Kumar et al., Phytochemistry, 1991, 30, 1231-1233; Phan et al., Phytochemistry letter, 2014, 9, 78-81).

Gần đây, trên báo điện tử Khánh Hòa (11/4/2012) và một số báo điện tử và báo in khác có đăng tin về một loại cây “thần dược” ở xã Ninh Vân, tỉnh Khánh Hòa có khả năng chữa bệnh xơ gan cổ chướng. Theo báo chí, một số người bị bệnh xơ gan giai đoạn cuối đã sử dụng nước sắc từ rễ và thân cây thuốc trên và đã khỏi bệnh. Theo kết quả giám định thực vật, cây thuốc trên có tên khoa học là *Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum (Xáo tam phân). Cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) thuộc họ Cam (Rutaceae) và thuộc chi *Paramignya* mọc chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Thân và rễ cây xáo tam phân được sử dụng làm thuốc dân gian để chữa bệnh gan, đặc biệt là xơ gan (Cường và cộng sự, Tạp chí Hóa học, 2013, 5, 292-296). Phân tích bằng HPLC chỉ ra rằng các hợp chất flavonoid và phenol chiếm hàm lượng lớn trong dịch chiết metanol của cây xáo tam phân (Nguyen et al., Industrial Crops and

Products, 2015, 67, 192-200). Lớp chất coumarin, dịch chiết thân và rễ cây xáo tam phân được phát hiện có tác dụng chữa bệnh về gan như xơ gan, viêm gan, và có tác dụng hồi phục gan bị gây tổn thương bởi paracetamol và CCl_4 (Cường và cộng sự, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 2014, 45, 1-5). Lớp chất coumarin đã được tìm thấy trong một số loài như *Dipteryx odorata*, *Anthoxanthum odoratum*, *Galium odoratum*, *Verbascum spp.*, *Hierochloe odorata*, *Dichanthelium clandestinum*, *Justicia pectoralis*... Đặc biệt, lớp chất coumarin còn được tìm thấy ở chi *Paramignya* như từ loài *P. monophylla* (Kumar et al., Phytochemistry, 1991, 30, 1231-1233; Kumar et al., Phytochemistry, 1995, 38, 805-806), *P. trimera* (Cường và cộng sự, Tạp chí Hóa học, 2013, 5, 292-296). Hợp chất biscoumarin monoterpene glycosit bao gồm paratrimerin A và paratrimerin B là hai hợp chất mới thuộc khung coumarin, lần đầu tiên được các tác giả phân lập từ thân và rễ cây xáo tam phân và đã xác định cấu trúc hóa học (Cuong et al., Chemical Pharmaceutical and Bulletin, 2015, 63, 945-949). Trong phân tử hai hợp chất paratrimerin A và paratrimerin B có 2 nguyên tử cacbon bất đối, nên chúng có nhiều dạng đồng phân lập thể khác nhau, và do vậy, có thể có các hoạt tính sinh học khác nhau.

Do đó, cần có quy trình nhằm thu được hợp chất biscoumarin monoterpene glycosit, cụ thể là hợp chất paratrimerin A và paratrimerin B từ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) để làm nguyên liệu sản xuất thuốc điều trị bệnh gan.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm đề xuất quy trình phân lập hợp chất biscoumarin monoterpene glycosit từ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*).

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình phân lập hợp chất biscoumarin monoterpene glycosit từ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu lấy thân và rễ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*), phơi trong bóng râm và sấy khô ở nhiệt độ 40°C , nghiền nguyên liệu thu được nguyên liệu dạng bột;

b) chiết nguyên liệu dạng bột bằng nước nóng bằng cách ngâm bột thân và rễ với nước nóng theo tỷ lệ 1/2 (khối lượng/thể tích) trong 4 giờ, sau khi loại bỏ bã, phần nước được cô dưới áp suất giảm để loại bỏ nước thu được dạng cao lỏng;

c) chiết phân đoạn bằng etyl axetat bằng cách đem dạng cao lỏng thu được ở bước b) chiết phân đoạn với dung môi etyl axetat, sau khi cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết phân đoạn etyl axetat tương ứng và cao nước;

d) tinh chế cao nước bằng cách đưa cao nước thu được từ bước c) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Diaion HP-20 và hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 0, 20, 40, 60, 80 và 100%, thu được 6 phân đoạn được ký hiệu từ WF.1 đến WF.6;

e) phân lập hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit bằng cách đưa phân đoạn WF.5 thu được từ bước d) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel và hệ dung môi rửa giải là diclometan-metanol theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 0, 20, 40, 60, 80 và 100%, thu được 5 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ WF.5.1 đến WF.5.5;

g) phân lập hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit từ phân đoạn WF.5.4 bằng cách đưa phân đoạn WF.5.4 thu được từ bước e) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel và hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 4:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích) thu được 5 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ WF.5.4.1 đến WF.5.4.5;

h) tinh chế hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit bằng cách đưa phân đoạn WF.5.4.4 thu được từ bước g) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel Sephadex-LH 20 với hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 1:1 (thể tích/thể tích) và tiếp đó tục tinh chế bằng chất hấp phụ là silicagel YMC-RP với hệ dung môi rửa giải là axeton-nước theo tỷ lệ thể tích 1:2 (thể tích/thể tích), sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit dạng bột vô định hình màu trắng.

Theo một phương án khác, quy trình theo giải pháp hữu ích còn bao gồm các bước:

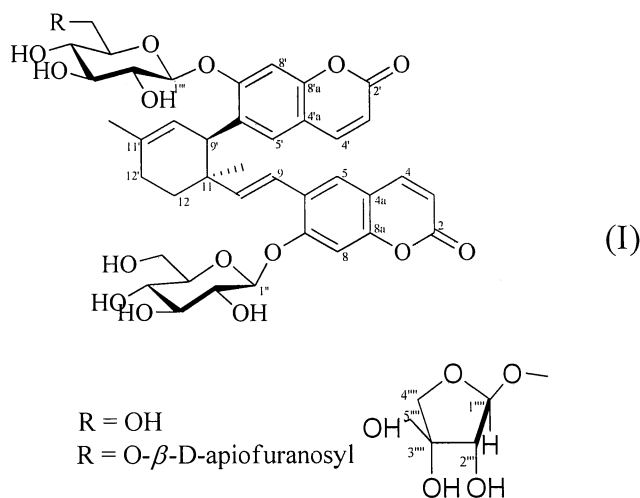
i) phân lập hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit từ phân đoạn WF.5.2 bằng cách đưa phân đoạn WF.5.2 thu được từ bước e) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel và hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 4:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích) thu được 3 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ WF.5.2.1 đến WF.5.2.3;

k) tinh chế sơ bộ hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit bằng cách đưa phân đoạn WF.5.2.1 thu được từ bước i) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel YMC-

RP và hệ dung môi rửa giải là axeton-nước theo tỷ lệ thể tích 2:3 (thể tích/thể tích) thu được 2 phân đoạn nhỏ được ký hiệu là WF.5.2.1.1 và WF.5.2.1.2; và

l) tinh chế hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit bằng cách đưa phân đoạn WF.5.2.1.1 thu được từ bước k) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel Sephadex-LH 20 với hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 1:1 (thể tích/thể tích), sau khi loại bỏ dung môi, thu được hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit dạng bột màu vàng nhạt.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích có công thức (I):



Theo một phương án ưu tiên, hợp chất theo giải pháp hữu ích có nhóm R là -OH (paratrimerin A) hoặc -O-β-D-apiofuranosyl (paratrimerin B).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả một cách chi tiết với các phương án thực hiện quy trình phân lập hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit từ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) và hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit thu được từ quy trình này cùng với ví dụ minh họa cụ thể. Tuy nhiên, ví dụ minh họa này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit từ thân và rễ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*), quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết nguyên liệu dạng bột bằng nước nóng; c) chiết phân đoạn bằng etyl axetat; d) tinh chế cao

nước; e) phân lập hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit; và g) tinh chế hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit.

Cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) là dạng cây bụi leo, dài 3-5 m, gốc to 10-15 cm. Thân và cành có gai cứng, nhọn, dài 2-3 cm, hơi cong xuống. Lá tròn dài hẹp, rộng 1-2 cm, dài 6-10 cm, khi khô có màu nâu, gốc tròn hay hình nêm, đầu tròn hay hơi lõm, nguyên, dày, dai, hai mặt nhẵn, mép uốn xuống, gân phụ 8-10 cặp, hướng lên trên, rõ ở mặt dưới; cuống lá ngắn 3-4 mm. Cụm hoa chum ở nách gai; cuống hoa 2 mm; đài 3, cánh hoa 3, dài 4 mm; nhị 3, rời, bầu 3 ô. Quả tròn, đường kính 1,5-2 cm, khi chín màu vàng nhạt. Toàn cây có mùi thơm tinh dầu. Cây thường mọc trên sườn núi đá hoặc núi đất lẫn đá nơi khô cạn (Hộ, Cây cỏ Việt Nam, quyển 2, Nxb Trẻ, 437-439).

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, thân và rễ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) được thu hái, loại bỏ tạp chất, phơi trong bóng râm và sấy khô ở nhiệt độ 40°C, sau đó thân và rễ được nghiền thành bột thu được bột mịn. Bột thân và rễ này được sử dụng làm nguyên liệu cho quy trình phân lập hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit theo giải pháp hữu ích.

Trong bước chiết nguyên liệu dạng bột bằng nước nóng, phần bột thân và rễ cây được ngâm nước nóng theo tỷ lệ 1/2 (khối lượng/thể tích) trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi chiết, loại bỏ phần bã bằng cách lọc và ép kiệt nước. Theo một phương án ưu tiên, bước chiết này được thực hiện ba lần. Loại bỏ nước từ phần nước thu được dưới áp suất giảm để thu được dạng cao lỏng.

Trong bước chiết phân đoạn bằng etyl axetat, phần cao nước tổng được đem chiết phân đoạn với dung môi etyl axetat, sau đó cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết phân đoạn etyl axetat tương ứng và cao nước.

Trong bước tinh chế cao nước, phần cao nước còn lại được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Diaion HP-20 và hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 0, 20, 40, 60, 80 và 100%, loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được 6 phân đoạn được ký hiệu tương ứng từ WF.1 đến WF.6.

Trong bước phân lập hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit, phân đoạn WF.5 được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel và hệ dung môi rửa giải là diclometan-metanol theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 0, 20, 40, 60, 80 và 100%, thu được 5 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ WF.5.1 đến WF.5.5.

Trong bước tinh chế phân đoạn WF.5.4, tiếp tục tinh chế phân đoạn WF.5.4 bằng cách đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel và hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 4:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích) thu được 5 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ WF.5.4.1 đến WF.5.4.5.

Trong bước tinh chế hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit, phân đoạn WF.5.4.4 được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel Sephadex-LH 20 với hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 1:1 (thể tích/thể tích) và tiếp tục tinh chế với chất hấp phụ là silicagel YMC-RP và hệ dung môi rửa giải là axeton-nước theo tỷ lệ thể tích 1:2 (thể tích/thể tích), sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit dạng bột vô định hình màu trắng.

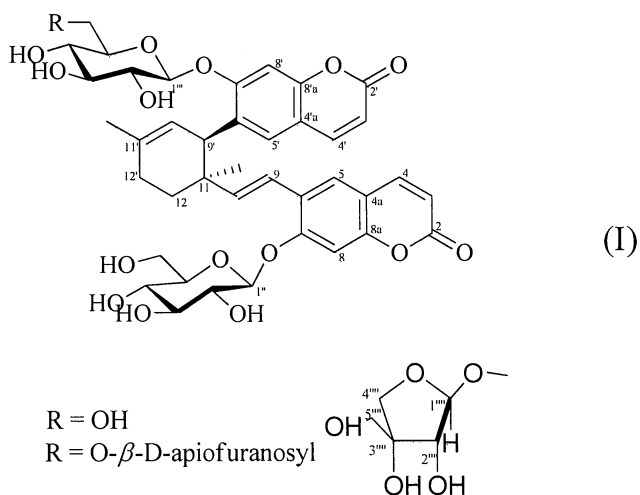
Theo một phương án khác, quy trình theo giải pháp hữu ích còn bao gồm các bước: h) phân lập hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit từ phân đoạn WF.5.2; i) tinh chế sơ bộ hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit; và k) tinh chế hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit.

Trong bước phân lập hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit từ phân đoạn WF.5.2, phân đoạn WF.5.2 thu được ở trên được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel và hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 4:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích) thu được 3 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ WF.5.2.1 đến WF.5.2.3.

Trong bước tinh chế sơ bộ hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit, phân đoạn WF.5.2.1 được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel YMC-RP và hệ dung môi rửa giải là axeton-nước theo tỷ lệ thể tích 2:3 (thể tích/thể tích) thu được 2 phân đoạn nhỏ được ký hiệu là WF.5.2.1.1 và WF.5.2.1.2.

Trong bước tinh chế hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit, phân đoạn WF.5.2.1.1 thu được từ bước tinh chế sơ bộ được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel Sephadex-LH 20 với hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 1:1 (thể tích/thể tích), sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit dạng bột màu vàng nhạt.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó hợp chất này có công thức (I).



Hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit theo giải pháp hữu ích có nhóm R là -OH (paratrimerin A) có công thức cấu tạo $C_{40}H_{44}O_{16}$ hoặc -O- β -D-apiofuranosyl (paratrimerin B) có công thức cấu tạo $C_{45}H_{52}O_{20}$.

Trong trường hợp hợp chất có công thức (I) có R là -OH (paratrimerin A) có công thức cấu tạo $C_{40}H_{44}O_{16}$ ở dạng bột vô định hình màu trắng, tan tốt trong các dung môi hữu cơ như axeton, metanol. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng silicagel trắng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), $R_f = 0,5$ với dung môi triển khai là diclometan/metanol 6:1 (thể tích/thể tích).

+ Độ quay cực: $[\alpha]_D^{25} - 25,0^\circ$ (c 0,02, MeOH)

+ IR (KBr) cm^{-1} : 3379, 2935, 1722, 1646, 1088, 990, 746, 660, 514

+ UV λ_{max} (MeOH): 204, 256, 292, 330 nm

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS m/z : 781,2691 $[M+H]^+$, 803,2548 $[M+Na]^+$.

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: 1H -NMR (500 MHz, Metanol- d_4 , δ ppm): 7,95 (1H, d, 9,5 Hz, H-4), 7,88 (1H, d, 9,5 Hz, H-4'), 7,47 (1H, s, H-5), 7,39 (1H, s, H-5'), 7,09 (1H, s, H-8'), 7,03 (1H, s, H-8), 6,41 (1H, d, 16,5 Hz, H-9), 6,37 (1H, d, 16,5 Hz, H-10), 6,28 (1H, d, 9,5 Hz, H-3), 6,22 (1H, d, 9,5 Hz, H-3'), 5,35 (1H, s, H-10'), 4,99 (1H, d, 8,0 Hz, H-1''), 4,93 (1H, d, 8,0 Hz, H-1'''), 4,13 (1H, s, H-9'), 3,99 (1H, m, H-2''), 3,89 (1H, dd, 12,0, 2,0 Hz, H_a-6'''), 3,85 (1H, dd, 12,0, 2,0 Hz, H_a-6''), 3,70 (1H, dd, 12,0, 6,0 Hz, H_b-6'''), 3,58 (1H, dd, 9,0, 8,0 Hz, H-2'''), 3,50 (4H, m, H-3'', H-5'', H-3''', H-5'''), 3,37 (1H, m, H_b-6''), 3,36 (1H, m, H-4'''), 3,23 (1H, t, 9,0 Hz, H-4''), 2,29 (1H, dt-like, 18,4, 5,7 Hz, H_a-12'), 2,16 (1H, dt-like, 18,4, 7,0 Hz, H_b-12'), 1,87 (1H,

m, H_a-12), 1,85 (3H, brs, 11'-CH₃), 1,65 (1H, dt-like, 13,3, 5,9 Hz, H_b-12), 1,31 (3H, brs, 11-CH₃).

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹³C-NMR (125MHz, Metanol-*d*₄, δ ppm): 163,3 (s, C-1), 114,3 (d, C-3), 146,0 (d, C-4), 115,2 (s, C-4a), 126,6 (d, C-5), 127,7 (s, C-6), 158,3 (s, C-7), 104,0 (d, C-8), 155,2 (s, C-8a), 163,5 (s, C-2'), 114,1 (d, C-3'), 145,9 (d, C-4'), 114,4 (s, C-4'a), 131,0 (d, C-5'), 131,6 (s, C-6'), 160,0 (s, C-7'), 103,6 (d, C-8'), 155,0 (s, C-8'a), 121,2 (d, C-9), 140,9 (d, C-10), 40,2 (s, C-11), 31,9 (t, C-12), 25,8 (q, 11-CH₃), 44,3 (d, C-9'), 124,6 (d, C-10'), 135,6 (s, C-11'), 28,6 (t, C-12'), 23,7 (q, 11'-CH₃), 101,6 (d, C-1''), 74,8 (d, C-2''), 78,2 (d, C-3''), 71,7 (d, C-4''), 78,4 (d, C-5''), 62,7 (t, C-6''), 102,5 (d, C-1'''), 75,0 (d, C-2'''), 78,3 (d, C-3'''), 71,2 (d, C-4'''), 78,4 (d, C-5'''), 62,5 (t, C-6''').

Trong trường hợp hợp chất có công thức (I) có R là -O-β-D-apiofuranosyl (paratrimerin B) có công thức cấu tạo C₄₅H₅₂O₂₀ ở dạng bột màu vàng nhạt, tan tốt trong dung môi hữu cơ như metanol. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên sắc kí bản mỏng silicagel tráng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), R_f = 0,6 với dung môi triển khai là diclometan/metanol 3:1 (thể tích/thể tích).

+ Độ quay cực: [α]_D²⁵ - 67,5° (c 0,04, MeOH).

+ UV λ_{max} (MeOH): 207, 255, 294, 330 nm.

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS *m/z*: 913,3101 [M+H]⁺, 935,2965 [M+Na]⁺.

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR (500 MHz, Metanol-*d*₄, δ ppm): 7,91 (2H, d, 9,5 Hz, H-4, H-3'), 7,42 (1H, s, H-5), 7,07 (1H, s, H-8), 6,49 (1H, d, 16,5 Hz, H-9), 6,32 (1H, d, 9,5 Hz, H-3), 6,23 (1H, d, 16,5 Hz, H-10), 6,25 (1H, d, 9,5 Hz, H-3'), 5,35 (1H, s, H-10'), 5,03 (1H, d, 7,5 Hz, H-1''), 4,90 (1H, d, 7,5 Hz, H-1'''), 4,84 (1H, d, 2,5 Hz, H-1'''), 4,12 (1H, d, 10,0 Hz, H_a-4'''), 4,11 (1H, s, H-9'), 4,03 (1H, d, 2,5 Hz, H-2'''), 3,96 (1H, dd, 11,0, 2,0 Hz, H_a-6''), 3,89 (1H, dd, 12,5, 2,0 Hz, H_a-6''), 3,80 (1H, d, 9,5 Hz, H_a-4'''), 3,71 (1H, dd, 12,0, 2,0 Hz, H_b-6''), 3,68 (1H, d, 3,5 Hz, H-5'''), 3,66 (1H, m, H_b-5'''), 3,61 (1H, m, H-2'''), 3,46 (4H, m, H-2'', H-3'', H-5'', H-3'''), 3,41 (1H, m, H-4''), 3,22 (1H, dd, 11,0, 2,0 Hz, H_b-6'''), 3,15 (1H, t, 9,5 Hz, H-3'''), 2,27 (1H, dt-like, 18,2, 5,9 Hz, H_a-12'), 2,18 (1H, dt-like, 18,2, 7,0 Hz, H_b-12'), 1,85 (3H, brs, 11'-CH₃), 1,83 (1H, m, H_a-12), 1,61 (1H, dt-like, 13,3, 5,9 Hz, H_b-12), 1,33 (3H, brs, 11-CH₃).

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C -NMR (125MHz, Metanol- d_4 , δ ppm): 163,9 (s, C-2'), 163,3 (s, C-1), 160,0 (s, C-7'), 158,5 (s, C-7), 155,2 (s, C-8'a), 155,1 (s, C-8a), 146,1 (d, C-4), 146,0 (d, C-4'), 140,9 (d, C-10), 136,0 (s, C-11'), 131,5 (s, C-6'), 131,0 (d, C-5'), 127,7 (s, C-6), 126,4 (d, C-5), 124,4 (d, C-10'), 121,0 (d, C-9), 115,3 (s, C-4a), 114,5 (d, C-3), 114,4 (s, C-4'a), 114,0 (d, C-3'), 111,2 (d, C-1'''), 104,2 (d, C-8), 103,8 (d, C-8'), 102,4 (d, C-1'''), 102,0 (d, C-1''), 80,5 (s, C-3'''), 78,6 (d, C-3'''), 78,3 (d, C-2'''), 78,4 (d, C-3'', C-5''), 77,2 (t, C-5'''), 75,01 (t, C-4'''), 75,0 (d, C-2''), 74,9 (d, C-2''), 72,1 (d, C-4'''), 71,2 (d, C-4''), 69,4 (t, C-6'''), 65,7 (t, C-5'''), 62,4 (t, C-6''), 44,3 (d, C-9'), 40,0 (s, C-11), 31,7 (t, C-12), 28,5 (t, C-12'), 25,3 (q, 11-CH₃), 23,7 (q, 11'-CH₃).

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Phân lập hợp chất biscoumarin monoterpene glycosit (paratrimarin A và paratrimarin B) từ thân và rễ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*)

Thân và rễ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) được thu hái, loại bỏ tạp chất, phơi trong bóng râm và sấy khô ở nhiệt độ 40°C, sau đó thân và rễ được nghiền thành bột thu được bột mịn.

Lấy 5 kg bột thân và rễ cây đem chiết với 10 lít nước nóng (80°C) trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng (bước chiết này được thực hiện ba lần). Sau khi chiết, loại bỏ phần bã bằng cách lọc và ép kiệt nước. Loại bỏ nước từ phần nước thu được dưới áp suất giảm để thu được dạng cao lỏng.

Phần cao lỏng này được đem chiết phân đoạn với dung môi etyl axetat (2 lít), sau đó cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết phân đoạn etyl axetat tương ứng và cao nước.

Phần cao nước được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Diaion HP-20 (500 g) và hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 0, 20, 40, 60, 80 và 100%, loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được 6 phân đoạn ký hiệu lần lượt là WF.1, WF.2, WF.3, WF.4, WF.5 và WF.6.

Phân đoạn WF.5 (32 g) tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel và hệ dung môi rửa giải là diclometan-metanol theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 0, 20, 40, 60, 80 và 100%, thu được 5 phân đoạn nhỏ được ký hiệu lần lượt là WF.5.1, WF.5.2, WF.5.3, WF.5.4 và WF.5.5.

Tiếp tục tinh chế phân đoạn WF.5.4 (10 g) bằng cách đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel và hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 4:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích) thu được 5 phân đoạn nhỏ được ký hiệu là WF.5.4.1, WF.5.4.2, WF.5.3.1, WF.5.4.4 và WF.5.4.5.

Tinh chế hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit bằng cách đưa phân đoạn WF.5.4.4 (772 mg) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel Sephadex-LH 20 với hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 1:1 (thể tích/thể tích) và tiếp tục tinh chế với chất hấp phụ là silicagel YMC-RP và hệ dung môi rửa giải là axeton-nước theo tỷ lệ thể tích 1:2 (thể tích/thể tích), sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit dạng bột vô định hình màu trắng.

Hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit thu được ở dạng bột màu trắng, tan tốt trong các dung môi hữu cơ như axeton, metanol. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng silicagel tráng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), R_f = 0,5 với dung môi triển khai là diclometan/metanol (6:1 thể tích/thể tích). Dữ liệu cho thấy hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit thu được là hợp chất paratrimerin A có độ tinh khiết trên 95%.

+ Độ quay cực: $[\alpha]_D^{25} - 25,0^\circ$ (c 0,02, MeOH)

+ IR (KBr) cm⁻¹: 3379, 2935, 1722, 1646, 1088, 990, 746, 660, 514

+ UV $\lambda_{\max}$ (MeOH): 204, 256, 292, 330 nm

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS m/z : 781,2691 [M+H]⁺, 803,2548 [M+Na]⁺.

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (500 MHz, Metanol-*d*₄, δ ppm): 7,95 (1H, d, 9,5 Hz, H-4), 7,88 (1H, d, 9,5 Hz, H-4'), 7,47 (1H, s, H-5), 7,39 (1H, s, H-5'), 7,09 (1H, s, H-8'), 7,03 (1H, s, H-8), 6,41 (1H, d, 16,5 Hz, H-9), 6,37 (1H, d, 16,5 Hz, H-10), 6,28 (1H, d, 9,5 Hz, H-3), 6,22 (1H, d, 9,5 Hz, H-3'), 5,35 (1H, s, H-10'), 4,99 (1H, d, 8,0 Hz, H-1''), 4,93 (1H, d, 8,0 Hz, H-1'''), 4,13 (1H, s, H-9'), 3,99 (1H, m, H-2''), 3,89 (1H, dd, 12,0, 2,0 Hz, H_a-6'''), 3,85 (1H, dd, 12,0, 2,0 Hz, H_a-6''), 3,70 (1H, dd, 12,0, 6,0 Hz, H_b-6'''), 3,58 (1H, dd, 9,0, 8,0 Hz, H-2'''), 3,50 (4H, m, H-3'', H-5'', H-3''', H-5'''), 3,37 (1H, m, H_b-6''), 3,36 (1H, m, H-4'''), 3,23 (1H, t, 9,0 Hz, H-4''), 2,29 (1H, dt-like, 18,4, 5,7 Hz, H_a-12'), 2,16 (1H, dt-like, 18,4, 7,0 Hz, H_b-12'), 1,87 (1H, m, H_a-12), 1,85 (3H, brs, 11'-CH₃), 1,65 (1H, dt-like, 13,3, 5,9 Hz, H_b-12), 1,31 (3H, brs, 11-CH₃).

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C -NMR (125MHz, Metanol- d_4 , δ ppm): 163,3 (s, C-1), 114,3 (d, C-3), 146,0 (d, C-4), 115,2 (s, C-4a), 126,6 (d, C-5), 127,7 (s, C-6), 158,3 (s, C-7), 104,0 (d, C-8), 155,2 (s, C-8a), 163,5 (s, C-2'), 114,1 (d, C-3'), 145,9 (d, C-4'), 114,4 (s, C-4'a), 131,0 (d, C-5'), 131,6 (s, C-6'), 160,0 (s, C-7'), 103,6 (d, C-8'), 155,0 (s, C-8'a), 121,2 (d, C-9), 140,9 (d, C-10), 40,2 (s, C-11), 31,9 (t, C-12), 25,8 (q, 11-CH₃), 44,3 (d, C-9'), 124,6 (d, C-10'), 135,6 (s, C-11'), 28,6 (t, C-12'), 23,7 (q, 11'-CH₃), 101,6 (d, C-1''), 74,8 (d, C-2''), 78,2 (d, C-3''), 71,7 (d, C-4''), 78,4 (d, C-5''), 62,7 (t, C-6''), 102,5 (d, C-1'''), 75,0 (d, C-2'''), 78,3 (d, C-3'''), 71,2 (d, C-4'''), 78,4 (d, C-5'''), 62,5 (t, C-6''').

Tiếp tục tinh chế phân đoạn WF.5.2 (3,8 g) bằng cách đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel và hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol-nước theo tỷ lệ thể tích (4:1:0,1 thể tích/thể tích/thể tích) thu được 3 phân đoạn nhỏ được ký hiệu là WF.5.2.1 WF.5.2.2 và WF.5.2.3.

Phân đoạn WF.5.2.1 (345 mg) tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel YMC-RP và hệ dung môi rửa giải là axeton-nước theo tỷ lệ thể tích 2:3 (thể tích/thể tích) thu được 2 phân đoạn nhỏ được ký hiệu là WF.5.2.1.1 và WF.5.2.1.2.

Đưa phân đoạn WF.5.2.1.1 (98 mg) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel Sephadex-LH 20 với hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 1:1 (thể tích/thể tích), sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit dạng bột màu vàng nhạt.

Hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit thu được ở dạng bột màu vàng nhạt, tan tốt trong dung môi hữu cơ như metanol. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên sắc kí bản mỏng silicagel tráng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), $R_f = 0,6$ với dung môi triển khai là diclometan/metanol (3:1 thể tích/thể tích). Dữ liệu cho thấy hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit thu được là hợp chất paratrimerin B có độ tinh khiết trên 95%.

+ Độ quay cực: $[\alpha]_D^{25} - 67,5^\circ$ (c 0,04, MeOH).

+ UV $\lambda_{\max}$ (MeOH): 207, 255, 294, 330 nm.

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS m/z : 913,3101 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 935,2965 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H -NMR (500 MHz, Metanol- d_4 , δ ppm): 7,91 (2H, d, 9,5 Hz, H-4, H-3'), 7,42 (1H, s, H-5), 7,07 (1H, s, H-8), 6,49 (1H, d, 16,5 Hz,

H-9), 6,32 (1H, d, 9,5 Hz, H-3), 6,23 (1H, d, 16,5 Hz, H-10), 6,25 (1H, d, 9,5 Hz, H-3'), 5,35 (1H, s, H-10'), 5,03 (1H, d, 7,5 Hz, H-1''), 4,90 (1H, d, 7,5 Hz, H-1'''), 4,84 (1H, d, 2,5 Hz, H-1'''), 4,12 (1H, d, 10,0 Hz, H_a-4'''), 4,11 (1H, s, H-9'), 4,03 (1H, d, 2,5 Hz, H-2'''), 3,96 (1H, dd, 11,0, 2,0 Hz, H_a-6'''), 3,89 (1H, dd, 12,5, 2,0 Hz, H_a-6''), 3,80 (1H, d, 9,5 Hz, H_a-4'''), 3,71 (1H, dd, 12,0, 2,0 Hz, H_b-6''), 3,68 (1H, d, 3,5 Hz, H-5'''), 3,66 (1H, m, H_b-5'''), 3,61 (1H, m, H-2'''), 3,46 (4H, m, H-2'', H-3'', H-5'', H-3'''), 3,41 (1H, m, H-4''), 3,22 (1H, dd, 11,0, 2,0 Hz, H_b-6'''), 3,15 (1H, t, 9,5 Hz, H-3'''), 2,27 (1H, dt-like, 18,2, 5,9 Hz, H_a-12'), 2,18 (1H, dt-like, 18,2, 7,0 Hz, H_b-12'), 1,85 (3H, brs, 11'-CH₃), 1,83 (1H, m, H_a-12), 1,61 (1H, dt-like, 13,3, 5,9 Hz, H_b-12), 1,33 (3H, brs, 11-CH₃).

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹³C-NMR (125MHz, Metanol-*d*₄, δ ppm): 163,9 (s, C-2'), 163,3 (s, C-1), 160,0 (s, C-7'), 158,5 (s, C-7), 155,2 (s, C-8'a), 155,1 (s, C-8a), 146,1 (d, C-4), 146,0 (d, C-4'), 140,9 (d, C-10), 136,0 (s, C-11'), 131,5 (s, C-6'), 131,0 (d, C-5'), 127,7 (s, C-6), 126,4 (d, C-5), 124,4 (d, C-10'), 121,0 (d, C-9), 115,3 (s, C-4a), 114,5 (d, C-3), 114,4 (s, C-4'a), 114,0 (d, C-3'), 111,2 (d, C-1'''), 104,2 (d, C-8), 103,8 (d, C-8'), 102,4 (d, C-1'''), 102,0 (d, C-1''), 80,5 (s, C-3'''), 78,6 (d, C-3'''), 78,3 (d, C-2'''), 78,4 (d, C-3'', C-5''), 77,2 (t, C-5'''), 75,01 (t, C-4'''), 75,0 (d, C-2'''), 74,9 (d, C-2''), 72,1 (d, C-4'''), 71,2 (d, C-4''), 69,4 (t, C-6'''), 65,7 (t, C-5'''), 62,4 (t, C-6''), 44,3 (d, C-9'), 40,0 (s, C-11), 31,7 (t, C-12), 28,5 (t, C-12'), 25,3 (q, 11-CH₃), 23,7 (q, 11'-CH₃).

Lợi ích của giải pháp hữu ích

Quy trình giải pháp hữu ích cho phép phân lập hợp chất biscoumarin monoterpene glycosit, cụ thể là hợp chất paratrimerin A và hợp chất paratrimerin B từ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*). Hợp chất biscoumarin monoterpene glycosit thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích có độ tinh khiết trên 95%.

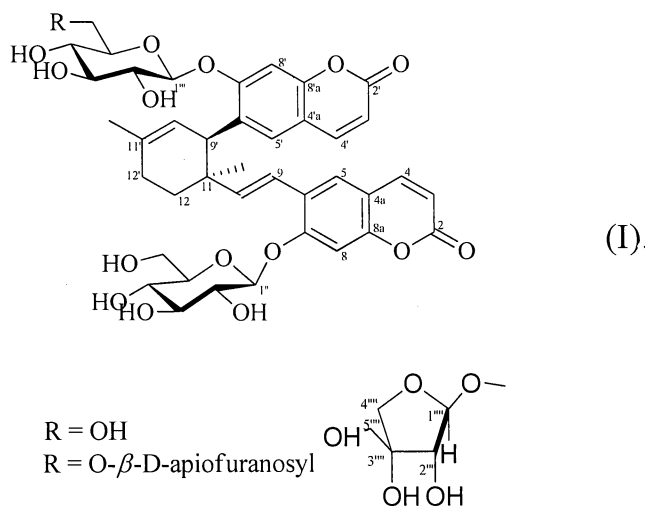
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập hợp chất biscoumarin monotерpen glycosit từ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*), quy trình này bao gồm các bước:
 - a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu lấy thân và rễ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*), phơi trong bóng râm và sấy khô ở nhiệt độ 40°C, nghiền nguyên liệu thu được nguyên liệu dạng bột;
 - b) chiết nguyên liệu dạng bột bằng nước nóng bằng cách ngâm bột thân và rễ với nước nóng theo tỷ lệ 1/2 (khối lượng/thể tích) trong 4 giờ, sau khi loại bỏ bã, phần nước được cô dưới áp suất giảm để loại bỏ nước thu được dạng cao lỏng;
 - c) chiết phân đoạn bằng etyl axetat bằng cách đem dạng cao lỏng thu được ở bước b) chiết phân đoạn với dung môi etyl axetat, sau khi cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết phân đoạn etyl axetat tương ứng và cao nước;
 - d) tinh chế cao nước bằng cách đưa cao nước thu được từ bước c) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Diaion HP-20 và hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 0, 20, 40, 60, 80 và 100%, thu được 6 phân đoạn được ký hiệu từ WF.1 đến WF.6;
 - e) phân lập hợp chất biscoumarin monotерpen glycosit bằng cách đưa phân đoạn WF.5 thu được từ bước d) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel và hệ dung môi rửa giải là diclometan-metanol theo tỷ lệ thể tích metanol tăng dần 0, 20, 40, 60, 80 và 100%, thu được 5 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ WF.5.1 đến WF.5.5;
 - g) phân lập hợp chất biscoumarin monotерpen glycosit từ phân đoạn WF.5.4 bằng cách đưa phân đoạn WF.5.4 thu được từ bước e) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel và hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 4:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích) thu được 5 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ WF.5.4.1 đến WF.5.4.5; và
 - h) tinh chế hợp chất biscoumarin monotерpen glycosit bằng cách đưa phân đoạn WF.5.4.4 thu được từ bước g) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel Sephadex-LH 20 với hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 1:1 (thể tích/thể tích) và tiếp tục tinh chế bằng chất hấp phụ là silicagel YMC-RP với hệ dung môi rửa giải là axeton-nước theo tỷ lệ thể tích 1:2 (thể tích/thể tích), sau khi loại bỏ

dung môi thu được hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit dạng bột vô định hình màu trắng.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình còn bao gồm các bước:

- i) phân lập hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit từ phân đoạn WF.5.2 bằng cách đưa phân đoạn WF.5.2 thu được từ bước e) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel và hệ dung môi rửa giải là clorofom-metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 4:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích) thu được 3 phân đoạn nhỏ được ký hiệu từ WF.5.2.1 đến WF.5.2.3;
 - k) tinh chế sơ bộ hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit bằng cách đưa phân đoạn WF.5.2.1 thu được từ bước i) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel YMC-RP và hệ dung môi rửa giải là axeton-nước theo tỷ lệ thể tích 2:3 (thể tích/thể tích) thu được 2 phân đoạn nhỏ được ký hiệu là WF.5.2.1.1 và WF.5.2.1.2; và
 - l) tinh chế hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit bằng cách đưa phân đoạn WF.5.2.1.1 thu được từ bước k) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silicagel Sephadex-LH 20 với hệ dung môi rửa giải là metanol-nước theo tỷ lệ thể tích 1:1 (thể tích/thể tích), sau khi loại bỏ dung môi, thu được hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit dạng bột màu vàng nhạt.
3. Hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit thu được bằng quy trình theo điểm 1 hoặc 2 có công thức (I):



4. Hợp chất biscoumarin monoterpen glycosit theo điểm 3, trong đó nhóm R là -OH hoặc -O- β -D-apiofuranosyl.