



(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) 
2-0001819

(51)⁷ **C07D 519/04, A61K 36/24**

(13) **Y**

(21) 2-2013-00032

(22) 27.02.2013

(45) 25.09.2018 366

(43) 25.09.2014 318

(73) **VIỆN HÓA HỌC CÔNG NGHIỆP VIỆT NAM (VN)**

Số 2 Phạm Ngũ Lão, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội, Việt Nam

(72) **Trần Bạch Dương (VN), Nguyễn Thị Hiền Anh (VN), Ngô Thị Hải Yến (VN),
Nguyễn Quốc Đạt (VN), Nguyễn Thanh Hằng (VN), Hà Thu Thủy (VN), Trần
Nguyễn Việt Anh (VN), Phạm Thị Thanh Hiếu (VN), Lê Anh Thư (VN), Nguyễn
Thị Xuân Hoa (VN)**

(54) **QUY TRÌNH TÁCH HỢP CHẤT CATHARANTHIN VÀ VINDOLIN TỪ CAO
CHỨA ALKALOIT THU ĐƯỢC TỪ CÂY DỪA CẠN (CATHARANTHUS
ROSEUS (L.) G.DON)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách các hợp chất catharanthin và vindolin từ cao chứa alkaloit thu được từ cây Dừa cạn trên cột tách Sephadex LH20, trong đó sử dụng pha động là dung dịch axit H₂SO₄ 98%/dung dịch hỗn hợp MeOH/H₂O (95/5; thể tích/thể tích) với tỷ lệ 0,05:99,95 về thể tích.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách các hợp chất catharanthin và vindolin từ cao chứa alkaloid thu được từ cây Dừa cạn (*Catharanthus Roseus (l.) G. don*) trên cột tách Sephadex LH20, trong đó sử dụng pha động là dung dịch axit H_2SO_4 98%/dung dịch hỗn hợp MeOH/ H_2O (95/5; thể tích/thể tích) với tỷ lệ 0,05:99,95 về thể tích.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Vinblastin (VLB) là thuốc đặc hiệu sử dụng trong điều trị ung thư máu và các bệnh Hopkin phân lập từ lá và hoa cây Dừa cạn (*Catharanthus Roseus (l.) G. don*). Tuy nhiên, hàm lượng của vinblastin trong lá Dừa cạn rất thấp (khoảng 0,01% theo lá khô), do đó nếu chỉ dựa vào phương pháp chiết tách, sản lượng vinblastin sẽ rất thấp và giá thành sản phẩm rất cao. Để hạ giá thành thuốc, tận dụng các *Vinca* alkaloid khác, các nghiên cứu bán tổng hợp vinblastin và các dẫn xuất đã được phát triển mạnh mẽ và đưa vào áp dụng trên thế giới từ cuối những năm 1970. Ví dụ, phản ứng Potier-Polonovski cải tiến theo Mangeney oxy hóa-ghép đôi các ancaloid thành phần trong lá dừa cạn vindolin và catharanthin đã cho sản phẩm vinblastin với hiệu suất cao.

Năm 1988, Sarath P. Guanasekera (Sarath P. Guanasekera et al, 6/1988, U.S. Pat. No. 4,749,787, Process of isolating vinblastine from the plant *Catharanthis roseus*) đã công bố sáng chế về quá trình sản xuất thuốc chống ung thư vinblastin. Từ lá dừa cạn, vinblastin được chiết bằng dung dịch axit và khi điều chỉnh pH dịch chiết axit nước được chiết lại bằng dung môi hữu cơ thu được hỗn hợp ancaloid tổng. Hỗn hợp alkaloid này được tách bằng sắc ký cột, chất hấp phụ dùng dextran và silica gel nhằm thu được vinblastin.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình tách các hợp chất catharanthin và vindolin từ cao chứa alkaloid thu được từ cây Dừa cạn (*Catharanthus Roseus (l.) G. don*) bằng phương pháp sắc ký lọc gel trên cột tách Sephadex LH20, trong đó sử

dung pha động là dung dịch axit H_2SO_4 98%/dung dịch hỗn hợp $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (95/5; thể tích/thể tích) với tỷ lệ 0,05:99,95 về thể tích.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 thể hiện quy trình tách các hợp chất catharanthin và vindolin từ cao chứa alkaloit thu được từ cây Dừa cạn.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Các hợp chất catharanthin và vindolin được tách từ cao chiết chứa alkaloit tổng trên dàn tách pilot HPLC với các điều kiện tách như sau:

- Thiết bị: Pilot Prep. HPLC Labomatic HP 3000;
- Cột tách: Sephadex LH 20, đường kính trong ID× chiều dài cột L: 100×800 mm;
- Pha động: dung dịch axit H_2SO_4 98%/dung dịch hỗn hợp $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (95/5; thể tích/thể tích) với tỷ lệ 0,05:99,95 về thể tích (dung dịch pha động được pha bằng cách: pha dung dịch hỗn hợp $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ theo tỉ lệ về thể tích $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ là 95:5 trước, sau đó tiến hành pha dung dịch pha động bằng cách thêm dung dịch axit H_2SO_4 98% với dung dịch hỗn hợp $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ thu được ở trên theo tỉ lệ về thể tích dung dịch axit H_2SO_4 98%: dung dịch hỗn hợp $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ là 0,05:99,95);
- Đầu dò phát hiện UV/Vis có sóng hấp phụ: 284 nm;
- Tốc độ dòng: 70 ml/phút.

Quy trình tách bao gồm các bước:

- tiến hành bơm mẫu lên cột sắc ký và rửa giải bằng dung môi pha động, trong đó dung môi pha động này là dung dịch axit H_2SO_4 98%/dung dịch hỗn hợp $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (95/5; thể tích/thể tích) với tỷ lệ 0,05:99,95 về thể tích,
- kiểm soát quá trình tách bằng thiết bị đầu dò UV/Vis kết nối với cột sắc ký và sắc ký lớp mỏng dùng hệ dung môi triển khai $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 25:1(\text{v/v})$, thuốc hiện màu Dragendorff–Munier;
- dựa vào sự hiển thị các thành phần trên bản mỏng, tách riêng các phân đoạn chứa hợp chất vindolin và phân đoạn chứa hợp chất catharanthin;

- gộp các phân đoạn sắc ký tương ứng chứa hợp chất vindolin hoặc hợp chất catharanthin, sau đó tiến hành cô kiệt các phân đoạn và xác định lượng cân.

Theo một khía cạnh, quy trình này còn bao gồm thêm các bước:

- tách tiếp các phân đoạn chứa catharanthin trên cột Silica gel khử hoạt hóa với pha động là hệ dung môi $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ gradient để thu được các phân đoạn chứa hợp chất catharanthin tinh khiết hơn;

- các phân đoạn chứa hợp chất catharanthin thu được cũng được xác định bằng bản mỏng như trên, sau đó được gom lại và cô kiệt và xác định lượng cân;

- tinh chế lại hợp chất catharanthin thu được bằng cách kết tinh lại trong MeOH.

Theo một khía cạnh, quy trình này còn bao gồm thêm các bước:

- tách tiếp các phân đoạn chứa vindolin trên cột Silica gel khử hoạt hóa với pha động là hệ dung môi $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ gradient để thu được các phân đoạn chứa hợp chất vindolin tinh khiết hơn;

- các phân đoạn chứa hợp chất vindolin thu được cũng được xác định bằng bản mỏng như trên, sau đó được gom lại và cô kiệt và xác định lượng cân;

- tinh chế lại hợp chất vindolin thu được bằng cách kết tinh lại trong MeOH.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1

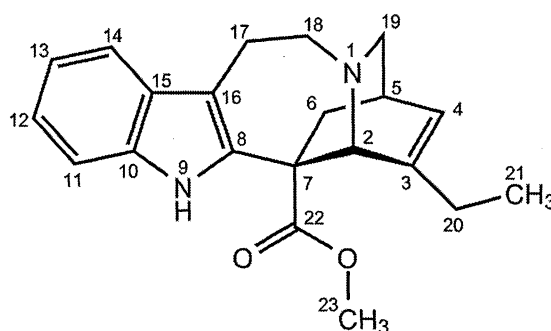
Hòa tan 100g mẫu cao chứa alkaloid tổng trong dung môi pha động là dung dịch axit H_2SO_4 98%/dung dịch hỗn hợp $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (95/5; thể tích/thể tích) với tỷ lệ 0,05:99,95 về thể tích, sau đó nạp vào vòng bơm mẫu. Từ vòng bơm mẫu, mẫu được bơm vào cột tách Sephadex LH20. Tại đây đầu dò điều khiển theo quy trình đã được lập sẵn sẽ tự động tiến hành rửa giải và thu được 6 phân đoạn. Các phân đoạn chứa catharanthin, vindolin được chấm xác định lại bằng bản mỏng, hệ dung môi triển khai $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 25:1$ (v/v), thuốc hiện Dragendorff- Munier. Các phân đoạn chứa catharanthin và vindolin được gom lại và cô kiệt dưới áp suất thấp thu được 5g cao chứa catharanthin và 35,4g cao chứa vindolin.

Hòa tan 5,0g cao chứa catharanthin thu được ở trên vào 20ml CHCl_3 , chạy dung dịch này trên cột khử hoạt tính Silica gel. Silica gel (300 g Keisegel 60, kích thước 230-400, Merck) được khử hoạt tính bằng hỗn hợp gồm 20ml NH_4OH , 150ml MeOH và 1500ml CHCl_3 . Silica gel đã khử hoạt tính được nhồi vào cột thủy tinh, tiếp đó được tôi bằng CHCl_3 để đẩy hết MeOH ra khỏi cột. Rửa giải cột bằng hỗn hợp MeOH/ CHCl_3 1%, 2%, 3% và 10%. Phân đoạn giàu catharanthin được xác định bằng bản mỏng như nêu trên. Các phân đoạn chứa catharanthin được cô chân không đến khô thu được 4,45g sản phẩm.

Hòa tan 4,45g sản phẩm này trong khoảng 15,0ml MeOH ở nhiệt độ thường, sau đó để kết tinh trong tủ lạnh, lọc tinh thể kết tủa thu được 3,84g catharanthin.

Catharanthin sạch dạng tinh thể nhỏ màu vàng có điểm nóng chảy nằm trong khoảng từ 123 đến 125°C, chất được đo phổ và kết quả phổ như sau:

Cấu trúc của catharanthin



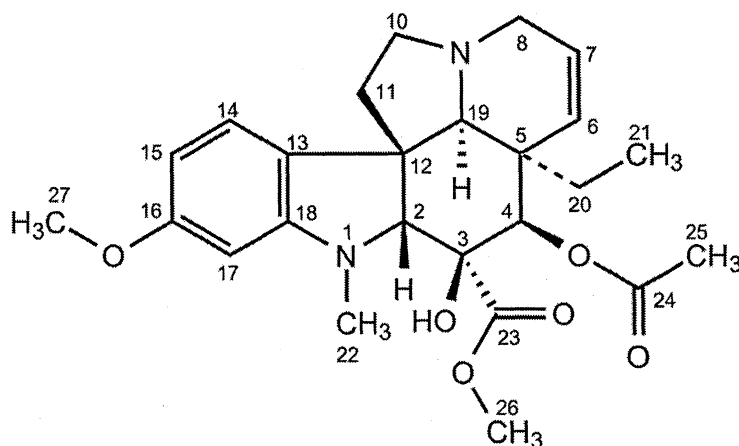
^1H NMR(CDCl_3): 4,18 d (1 Hz; H-2), 5,92 m (H-4), 2,84 m (H-5), 1,78 dd (13,5 Hz; 3 Hz; $\text{H}\alpha$ -6), 2,72 m ($\text{H}\beta$ -6), 7,67 s (NH, H-9), 7,48 d (8 Hz; H-11), 7,14 td (7 Hz; 1 Hz; H-12), 7,09 td (7 Hz; 1 Hz; H-13), 7,22 td (8 Hz; 1 Hz; H-14), 3,56 m ($\text{H}\alpha$ -17), 3,36 m ($\text{H}\beta$ -17), 2,92 dt (16 Hz; 4 Hz; $\text{H}\alpha$ -18), 3,29 m ($\text{H}\beta$ -18), 2,84 m (H-19), 2,11 m ($\text{H}\alpha$ -20), 2,31 m ($\text{H}\beta$ -20), 3,73 br (H-23);

^{13}C NMR (CDCl_3): 61,87 s (2), 149,42 s (3), 123,64 d (4), 30,76 d (5), 38,69 t (6), 55,44 s (7), 136,44 s (8), 135,01 s (10), 110,45 d (11), 121,88 d (12), 119,47 d (13), 118,22 d (14), 129,04 s (15), 110,78 s (16), 21,39 t (17), 49,4 t (18), 53,11 t (19), 26,22 t (20), 10,68 q (21), 174,15 s (22), 52,33 q (23).

Tương tự, 35,4g cao chứa vindolin thu được ở trên được tách tiếp trên cột silica gel đã khử hoạt tính thu được 29,0g sản phẩm giàu vindolin.

Kết tinh lại 29,0g sản phẩm giàu vindolin này thu được 22,8g vindolin sạch dạng tinh thể lập phương nhỏ có điểm nóng chảy nằm trong khoảng từ 153 đến 155°C, chất được đo phổ và kết quả phổ như sau:

Cấu trúc của vindolin



^1H NMR(CDCl_3): 3,44 m overlap (H-2), 5,45 s (H-4), 5,24 m (H-6), 5,58 ddd overlap (10 Hz; 5 Hz; 1,5 Hz; H-7), 3,51 dd (16 Hz; 4,5 Hz; $\text{H}\alpha$ -8), 2,37 m ($\text{H}\beta$ -7), 3,44 m ($\text{H}\alpha$ -10), 2,32 m ($\text{H}\beta$ -10), 1,66 d (7,3 Hz; $\text{H}\alpha$ -11), 2,07 br overlap ($\text{H}\beta$ -11), 6,89 d (8 Hz; H-14), 6,30 dd (8 Hz; 2 Hz; H-15), 6,08 d (2 Hz; H-17), 2,53 d (8 Hz; H-19), 1,65 dd (15 Hz; 7,5 Hz; $\text{H}\alpha$ -20), 1,14 dd (15 Hz; 7,5 Hz; $\text{H}\beta$ -20), 0,49 t (7,5 Hz; H-21), 2,67 br (H-22), 2,07 br overlap (H-25), 3,78 br overlap (H-26), 3,79 br overlap (H-27);

^{13}C NMR (CDCl_3): 83,35 d (2), 79,61 s (3), 76,35 d (4), 42,94 s (5), 130,52 d (6), 124,01 d (7), 51,09 t (8), 52,00 t (10), 44,00 t (11), 52,79 s (12), 125,04 s (13), 122,67 d (14), 104,65 d (15), 161,20 s (16), 95,87 d (17), 153,74 s (18), 67,16 d (19), 30,81 t (20), 7,63 q (21), 38,23 q (22), 170,76 s (23), 171,91 s (24), 21,01 q (25), 52,29 q (26), 55,36 q (27).

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình tách các hợp chất catharanthin và vindolin từ cao chứa alkaloid thu được từ cây Dừa cạn bằng cách sử dụng pha động là dung dịch axit H_2SO_4 98%/dung dịch hỗn hợp $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (95/5; thể tích/thể tích) với tỷ lệ 0,05:99,95 về thể tích làm pha động trên cột tách Sephadex LH20 theo giải pháp hữu ích hạn chế

được việc sử dụng lượng lớn dung môi có nguồn gốc clo, từ đó có thể giảm được việc sử dụng các dung môi độc hại trong sản xuất công nghiệp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tách các hợp chất catharanthin và vindolin từ cao chứa alkaloit thu được từ cây Dừa cạn (*Catharanthus Roseus (L.) G. don*) bằng phương pháp sắc ký lọc gel trên cột tách Sephadex LH20 sử dụng pha động là dung dịch axit H_2SO_4 98%/dung dịch hỗn hợp MeOH/ H_2O (95/5; thể tích/thể tích) với tỷ lệ 0,05:99,95 về thể tích bao gồm các bước:

- tiến hành bơm mẫu lên cột sắc ký và rửa giải bằng dung môi pha động, trong đó dung môi pha động này là dung dịch axit H_2SO_4 98%/dung dịch hỗn hợp MeOH/ H_2O (95/5; thể tích/thể tích) với tỷ lệ 0,05:99,95 về thể tích,

- kiểm soát quá trình tách bằng thiết bị đầu dò UV/Vis kết nối với cột sắc ký và sắc ký lớp mỏng dùng hệ dung môi triển khai $CHCl_3/CH_3OH = 25:1(v/v)$, thuốc hiện màu Dragendorff –Munier,

- dựa vào sự hiển thị các thành phần trên bản mỏng, tách riêng các phân đoạn chứa hợp chất vindolin và phân đoạn chứa hợp chất catharanthin,

- gộp các phân đoạn sắc ký tương ứng chứa hợp chất vindolin hoặc hợp chất catharanthin, sau đó tiến hành cô kiệt các phân đoạn và xác định lượng cân.

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

- tách tiếp các phân đoạn chứa catharanthin trên cột Silica gel khử hoạt hóa với pha động là hệ dung môi $CHCl_3/CH_3OH$ gradient để thu được các phân đoạn chứa hợp chất catharanthin tinh khiết hơn;

- các phân đoạn chứa hợp chất catharanthin thu được cũng được xác định bằng bản mỏng như trên, sau đó được gom lại và cô kiệt và xác định lượng cân;

- tinh chế lại hợp chất catharanthin thu được bằng cách kết tinh lại trong MeOH.

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

- tách tiếp các phân đoạn chứa vindolin trên cột Silica gel khử hoạt hóa với pha động là hệ dung môi $CHCl_3/CH_3OH$ gradient để thu được các phân đoạn chứa hợp chất vindolin tinh khiết hơn;

- các phân đoạn chứa hợp chất vindolin thu được cũng được xác định bằng bản mỏng như trên, sau đó được gom lại và cô kiệt và xác định lượng cân;

- tinh chế lại hợp chất vindolin thu được bằng cách kết tinh lại trong MeOH.

Hình 1: Sơ đồ tách các hợp chất catharanthin và vindolin từ cao chứa alkaloit thu được từ cây dừa cạn trên cột Sephadex LH20

