



(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) 
2-0001967

(51)⁷ **A61K 31/00, C08B 37/00, A61K 36/898** (13) **Y**

(21) 2-2016-00337

(22) 22.09.2016

(45) 25.02.2019 371

(43) 26.03.2018 360

(73) **VIỆN ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ (VN)**

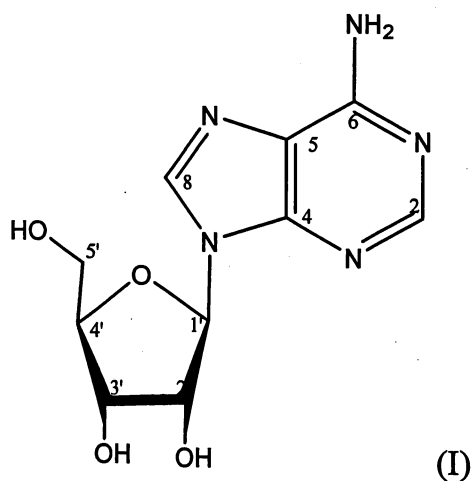
Số 25 Lê Thánh Tông, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội.

(72) **Phạm Hương Sơn (VN), Nguyễn Thị Lài (VN), Nguyễn Tiến Đạt (VN), Nguyễn Thị Luyến (VN)**

(74) **Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Bình Minh (SUNRISE IP CO.,LTD.)**

(54) **PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT HỢP CHẤT ADENOSINE TỪ CÂY LAN KIM
TUYẾN ANOECTOCHILUS ROXBURGHII (WALL.) LINDL.**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp tách chiết hợp chất adenosine có công thức (I) từ cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. Hợp chất adenosine có nhiều hoạt tính sinh học quý và đang được sử dụng làm thuốc chống loạn nhịp tim.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất thiên nhiên có nguồn gốc từ thực vật có hoạt tính sinh học để sử dụng trong việc hỗ trợ điều trị bệnh. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp tách chiết hợp chất adenosine từ cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây lan kim tuyến có tên khoa học là *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl., thuộc họ Phong lan (Orchidaceae). Lan kim tuyến là loài bò trên mặt đất, có thân rễ mọc dài, thân trên đất mọng nước và có nhiều lông mềm. Theo đông y, cây lan kim tuyến được sử dụng làm thuốc trị lao phổi, ho do phế nhiệt, phong thấp, đau nhức khớp xương, chấn thương, viêm dạ dày mãn tính, viêm khí quản, viêm gan mãn tính, suy nhược thần kinh, giúp tăng cường sức khỏe, làm khí huyết lưu thông. Một vài công trình nghiên cứu cho thấy thành phần của lan kim tuyến gồm các chất béo, flavonoid, glucosides, steroid [Liu và cộng sự, 3-Hydroxybutanolide derivatives and flavonoid glucosides from *Anoectochilus roxburghii*. *Phytochemistry Letters*. 8, 109–115 (2014); Wang và cộng sự, Simultaneous structural identification of natural products in fractions of crude extract of the rare endangered plant *Anoectochilus roxburghii* using ¹H-NMR/RRLC-MS parallel dynamic spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 2556–2571 (2011); He và cộng sự, A novel flavonoid glucoside from *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. *Journal of Integrative Plant Biology* 48(3), 359-363 (2011)]. Các hợp chất trên đều có cấu trúc khác hoàn toàn với hợp chất adenosine đề cập trong giải pháp hữu ích này. Ngoài ra các hợp chất adenosine, narcissin và roseoside cũng đã được phân lập từ phần trên mặt đất của cây này [Sơn và cộng sự, Isolation and simultaneous quantification of adenosine, narcissin and roseoside in *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall ex Lindl. *Journal of Chemical, Biological and Physical Science*, 5(4), 4002-4007 (2015)]. Trong công trình này không đề cập đến độ tinh sạch của hợp chất adenosine. Các nghiên cứu trên thế giới đã cho thấy lan kim tuyến được sử dụng điều trị bệnh tiểu đường [Zhang và cộng sự, Antihyperglycemic activity of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharose in

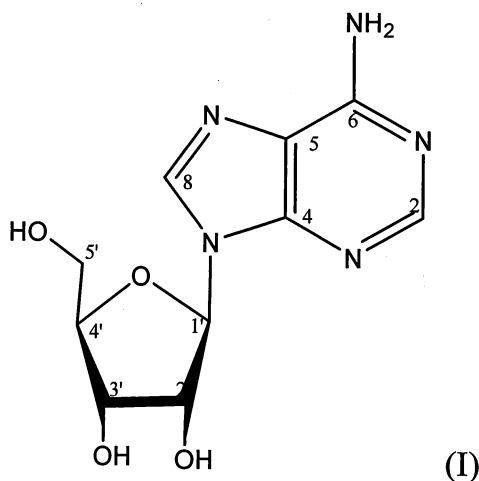
diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology*. 164, 180-185 (2015); Zhang và cộng sự, Antihyperglycemic activity of kinsenoside, a high yielding constituent from *Anoectochilus roxburghii* in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 114, 141–145 (2007)], ung thư, gan, bệnh tim mạch, nhiễm trùng đường hô hấp, suy dinh dưỡng ở trẻ em [Liu và cộng sự, 3-Hydroxybutanolide derivatives and flavonoid glucosides from *Anoectochilus roxburghii*. *Phytochemistry Letters*. 8, 109–115 (2014)].

Trong giải pháp hữu ích này, nhóm tác giả đã xác định được hợp chất adenosine có mặt trong cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. Adenosine được chứng minh có trong tất cả các tế bào con người; nó giúp cải thiện tuần hoàn ngoại biên và tim mạch, cải thiện năng lực cơ bắp, giảm sinh trưởng của tế bào xấu, tăng lượng oxy trong máu, giúp điều hòa lại nhịp tim, khắc phục các hiện tượng loạn nhịp, chậm nhịp tim. Adenosine còn có tác dụng ức chế sự ngưng tụ quá độ của tiểu cầu, có khả năng trị máu đông tốt ở bệnh huyết người già, từ đó làm cải thiện tuần hoàn máu ở cơ thể, ngăn ngừa các bệnh tắc mạch máu như tắc mạch máu não, nhồi máu cơ tim, máu lưu thông không tốt, cơ thể hư vốn vô lực [Hasko và Cronstein, Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology* 2004, 25(1): 33-39; Sato và cộng sự, Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2005, 288(4): H1633-40]. Ngoài ra, adenosine còn có tác dụng chống thiếu dưỡng khí, góp phần quan trọng vào quá trình thúc đẩy giấc ngủ, điều hòa quá trình sinh hóa giúp giấc ngủ sâu và ngon hơn, gián tiếp giúp sức khỏe con người ổn định. Ngoài ra tác dụng thúc đẩy mọc tóc và làm dày tóc của Adenosine ở nữ giới cũng được các nhà khoa học Nhật Bản nghiên cứu [Oura và cộng sự, Adenosine increases anagen hair growth and thick hairs in Japanese women with female pattern hair loss: a pilot, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of dermatology* 2008, 35(12): 763-767]. Trên thực tế, hiện nay, Adenosine đang được sử dụng làm thuốc chống loạn nhịp tim rất hiệu quả.

Hợp chất Adenosine này được phân lập từ loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. thuộc họ Phong lan (Orchidaceae), nhờ đó giúp làm rõ hơn tác dụng chữa bệnh của cây lan kim tuyến, một loại cây quý của Việt Nam.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất phương pháp chiết tách hợp chất adenosine từ cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. có công thức (I).



Phương pháp tách chiết hợp chất adenosine từ cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

(i) thu gom phần thân và lá của cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl, sau đó rửa sạch, sấy khô rồi xay thành bột;

(ii) tiến hành ngâm chiết phần bột thu được ở bước (i) bằng siêu âm trong dung môi hữu cơ theo tỷ lệ bột/dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 1/2 đến 1/4 (theo trọng lượng/thể tích) từ 1 đến 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 10 đến 30 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 70°C, sau đó gộp các phần dịch chiết dung môi hữu cơ thu được từ các lần ngâm chiết lại rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C để thu được dịch chiết ở dạng đậm đặc ký hiệu là dịch cô đặc 1;

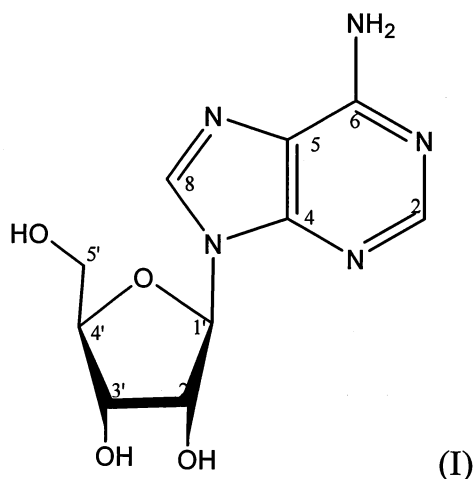
(iii) hòa tan dịch cô đặc 1 trong nước cất theo tỷ lệ dịch cô đặc 1/nước cất nằm trong khoảng từ 1/2 đến 1/4 (theo trọng lượng/thể tích) để thu được dung dịch 1A, rồi chiết phân bố bằng dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp, không tan hoặc ít tan trong nước theo tỷ lệ dung môi hữu cơ/dung dịch 1A nằm trong khoảng từ 1/1 đến 1/2 (theo thể tích) từ 1 đến 5 lần, sau đó tách loại phần dung môi nằm bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới ký hiệu là dung dịch nước 2;

(iv) chiết phân bố phần dung dịch nước 2 thu được ở bước (iii) bằng dung môi etyl axetat nồng độ 95-100% theo tỷ lệ dung môi etyl axetat/dung dịch nước 2 nằm trong khoảng từ 1/1 đến 1/2 (theo thể tích) từ 1 đến 5 lần, sau đó tách loại phần dung môi nằm bên trên và phần dung dịch nước nằm bên dưới ký hiệu là dung dịch nước 3 được giữ lại và được cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ, thu được dịch cô trong nước ký hiệu là dịch cô 4;

(v) tiến hành phân tách dịch cô 4 trên cột sắc ký với chất hấp phụ Diaion HP-20 và rửa bằng nước cất để loại bỏ tạp chất sau đó giải hấp bằng metanol/nước cất theo tỷ lệ 1/1 (theo thể tích), thu gom dịch được giải hấp bằng metanol/nước cất, rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ thu được dịch cô đặc ký hiệu là dịch cô đặc 5;

(vi) tách phân đoạn dịch cô đặc 5 ở bước (v) trên cột sắc ký một lần nữa với chất hấp phụ silica gel pha thường theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ nằm trong khoảng từ 1/5 đến 1/20 (theo khối lượng), rửa giải bằng hỗn hợp hệ dung môi etyl axetat/metanol/nước theo tỷ lệ 4/1/0,1 (theo thể tích), kiểm tra các dịch rửa giải trên sắc ký lớp mỏng pha thường, thu gom các dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau và có vết chất Adenosine, cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ, thu được dịch cô đặc ký hiệu là dịch cô đặc 6; và

(vii) tinh chế lại dịch cô đặc 6 thu được ở bước (vi) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ nằm trong khoảng từ 1/30 đến 1/70 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol/nước theo tỷ lệ 3/1/0,1 (theo thể tích), dịch rửa giải được cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ, thu được hợp chất Adenosine có công thức (I) dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng.



Theo một khía cạnh, ở bước (ii), tỷ lệ bột/dung môi hữu cơ là 1/3 (theo trọng lượng/thể tích).

Theo một khía cạnh, ở bước (ii), dung môi hữu cơ được sử dụng là dung môi metanol nồng độ 95-100% hoặc còn 95-98%.

Theo một khía cạnh, ở bước (ii), dung môi hữu cơ được sử dụng là dung môi metanol có nồng độ 97%.

Theo một khía cạnh, ở bước (iii), dịch cô đặc 1 được hòa tan trong nước cất theo tỷ lệ dịch cô đặc 1/nước cất là 1/3 (theo trọng lượng/thể tích) để thu được dung dịch 1A.

Theo một khía cạnh, ở bước (iii), dung dịch 1A được chiết phân bố bằng dung môi hữu cơ theo tỷ lệ dung môi hữu cơ/dung dịch 1A là 1/2 (theo thể tích).

Theo một khía cạnh, ở bước (iii), dung môi hữu cơ là hexan nồng độ 95-100% hoặc ete dầu hoả 30-60%.

Theo một khía cạnh, ở bước (iii), dung môi hữu cơ là hexan nồng độ 97%.

Theo một khía cạnh, ở bước (iv), việc chiết phân bố phần dung dịch nước 2 thu được ở bước (iii) là bằng dung môi ethyl axetat có nồng độ 97%.

Theo một khía cạnh, ở bước (iv), tỷ lệ dung môi ethyl axetat/dung dịch nước 2 là 1/2 (theo thể tích).

Theo một khía cạnh, ở bước (vi) chất hấp phụ silica gel pha thường có cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm .

Theo một khía cạnh, ở bước (vi), tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/10 (theo khối lượng).

Theo một khía cạnh, ở bước (vii), chất hấp phụ silica gel pha thường có cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm .

Theo một khía cạnh, ở bước (vii), tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/70 (theo khối lượng).

Ưu điểm của phương pháp chiết tách theo giải pháp hữu ích này là đơn giản, dễ thực hiện và cho phép phân lập được hợp chất adenosine có công thức (I) tinh khiết ra khỏi hỗn hợp của nhiều chất có trong cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl..

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là phổ ^1H -NMR của hợp chất có công thức (I) theo giải pháp hữu ích.

Hình 2 là phổ ^{13}C -NMR của hợp chất có công thức (I) theo giải pháp hữu ích.

Hình 3 là phổ khối phun mù điện tử ESI-MS m/z : 268 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Hình 4 là sắc ký đồ HPLC của adenosine theo ví dụ 2.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Phương pháp chiết tách này có sử dụng kết hợp các kỹ thuật chiết lỏng-lỏng, kỹ thuật sắc ký bao gồm sắc ký lớp mỏng (TLC) thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn (DC-Alufolien 60 F254, Merck), sắc ký cột với chất hấp phụ là Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Corp), silica gel (Merck) và các dung môi pha động gồm nước, metanol, diclometan, etyl axetat, hexan. Thiết bị được dùng để cất loại dung môi dưới áp suất giảm là thiết bị cất quay thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Dưới đây, các bước của phương pháp tách chiết hợp chất adenosine từ cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. theo giải pháp hữu ích sẽ được mô tả chi tiết một cách tuần tự.

(i) Thu gom phần trên mặt đất cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl., cụ thể là thu gom phần thân và lá, sau đó rửa sạch bằng nước rồi làm khô trong bóng mát, sau đó xay thành bột.

(ii) Tiến hành ngâm chiết phần bột này bằng siêu âm trong dung môi hữu cơ theo tỷ lệ bột/dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 1/2 đến 1/4, ưu tiên là 1/3 (theo trọng lượng/thể tích) từ 1 đến 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 10 đến 30 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 70°C. Dung môi hữu cơ được sử dụng là metanol nồng độ 95-100% hoặc cồn 95-98%, ưu tiên là dung môi metanol có nồng độ 97%. Sau đó, gộp các phần dịch chiết dung môi hữu cơ thu được từ các lần ngâm chiết lại rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C để thu được dịch chiết ở dạng đậm đặc ký hiệu là dịch cô đặc 1.

(iii) Hòa tan dịch cô đặc 1 trong nước cất theo tỷ lệ dịch cô đặc 1/nước cất nằm trong khoảng từ 1/2 đến 1/4, ưu tiên là 1/3 (theo trọng lượng/thể tích) để thu được dung dịch 1A, rồi chiết phân bố bằng dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp, không tan hoặc ít tan trong nước theo tỷ lệ dung môi hữu cơ/dung dịch 1A nằm trong khoảng từ 1/1 đến 1/2, ưu tiên là 1/2 (theo thể tích) từ 1 đến 5 lần. Dung môi thường được sử dụng là hexan nồng độ 95-100%, ete dầu hoả 30-60%, ưu tiên là hexan nồng độ 97%. Sau đó, tách loại phần dung môi nằm bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới ký hiệu là dung dịch nước 2.

(iv) Chiết phân bố phần dung dịch nước 2 thu được ở bước (iii) bằng dung môi ethyl axetat nồng độ 95-100%, ưu tiên là 97%, theo tỷ lệ dung môi ethyl axetat/dung dịch nước 2 nằm trong khoảng từ 1/1 đến 1/2, ưu tiên là 1/2 (theo thể tích) từ 1 đến 5 lần, sau đó tách loại phần dung môi bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới ký hiệu là dung dịch nước 3. Phần dung dịch nước 3 được cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ, thu được dịch cô trong nước ký hiệu là dịch cô 4.

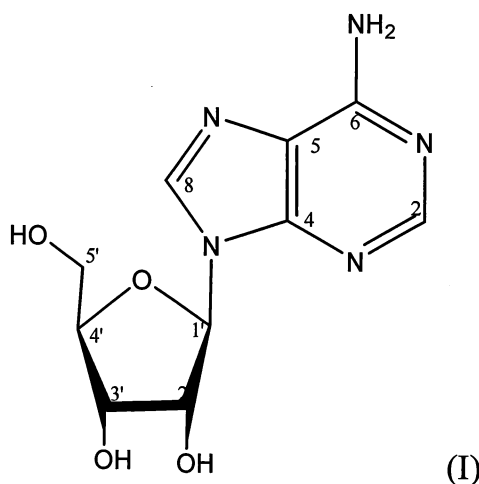
(v) Tiến hành phân tách dịch cô 4 trên cột sắc ký với chất hấp phụ Diaion HP-20 và rửa bằng nước cất để loại bỏ tạp chất, sau đó giải hấp bằng metanol/nước cất theo tỷ lệ 1/1 (theo thể tích), thu gom dịch được giải hấp bằng metanol/nước cất, rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ, thu được dịch cô đặc ký hiệu là dịch cô đặc 5.

(vi) Tách phân đoạn dịch cô đặc 5 ở bước (v) trên cột sắc ký một lần nữa với chất hấp phụ silica gel pha thường có cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 µm, theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ nằm trong khoảng từ 1/5 đến 1/20 (theo khối lượng), với tỷ lệ

1/10 là tối ưu nhất. Tiến hành rửa giải bằng hỗn hợp hệ dung môi etyl axetat/metanol/nước theo tỷ lệ 4/1/0,1 (theo thể tích). Các dịch rửa giải được kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng pha thường. Thu gom các dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau và có vết chất Adenosine khi kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng, sau đó cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ, thu được dịch cô đặc ký hiệu là dịch cô đặc 6.

(vii) Tinh chế lại dịch cô đặc 6 thu được ở bước (vi) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường có cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm , theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ nằm trong khoảng từ 1/30 đến 1/70 (theo khối lượng), ưu tiên là 1/70. Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol/nước theo tỷ lệ 3/1/0,1 (theo thể tích). Dịch rửa giải được cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ, thu được hợp chất Adenosine dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

Hợp chất Adenosine thu được từ cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. có công thức cấu tạo sau:



Tên khoa học của hợp chất Adenosine theo IUPAC: (2R,3R,4S,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)oxolane-3,4-diol

Các thông số hoá lý của hợp chất Adenosine:

- Chất bột vô định hình màu trắng.
- Công thức phân tử: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_5$.
- Điểm nóng chảy: 234-235°C.
- Phổ khối phun mù điện tử ESI-MS m/z : 268 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

- Phổ ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.34 (1H, s, H-2), 8.12 (1H, s, H-8), 5.89 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 4.61 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, H-2'), 4.16 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-3'), 3.98 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-4'), 3.69 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, Ha-5'), 3.57 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, Hb-5').

- Phổ ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 152.4 (C-2), 149.1 (C-4), 119.3 (C-5), 156.1 (C-6), 139.9 (C-8), 87.9 (C-1'), 70.6 (C-2'), 73.5 (C-3'), 85.9 (C-4'), 61.7 (C-5').

Các phổ nêu trên của adenosine được thể hiện trên các hình từ hình 1 đến hình 3.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sẽ được giải thích tiếp bằng các ví dụ và phương án minh họa sau. Tuy nhiên, các ví dụ này không nhằm làm giới hạn phạm vi của giải pháp hữu ích. Các cải biến sẽ dễ dàng được thực hiện bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và chúng sẽ nằm trong phạm vi ý tưởng của giải pháp hữu ích và của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Tách chiết hợp chất adenosine

Phần thân và lá của cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl sau khi thu hái, được rửa sạch bằng nước và hong khô trong bóng râm, sau đó xay thành bột.

Ngâm chiết 2,0 kg nguyên liệu bột này bằng 6,0 lít dung môi metanol nồng độ 97% ở nhiệt độ 30°C trong bể siêu âm trong 15 phút. Lọc lấy phần dịch chiết rồi bổ sung 6,0 lít metanol nồng độ 97% vào và ngâm tiếp ở nhiệt độ 30°C trong 15 phút. Lọc lấy phần dịch chiết rồi bổ sung 6,0 lít metanol nồng độ 97% vào và ngâm tiếp một lần nữa ở nhiệt độ 30°C trong 15 phút. Sau 3 lần ngâm chiết, các phần dịch chiết được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 60°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ để thu được 250 g dịch cô đặc 1.

Hòa tan dịch cô đặc 1 vào 0,75 lít nước cất để thu được dung dịch 1A, rồi chiết phân bố dung dịch 1A bằng hexan nồng độ 97% 3 lần, mỗi lần 0,5 lít. Sau khi tách loại phần dung môi hexan nằm bên trên, phần dung dịch nước 2 còn lại nằm bên dưới tiếp tục được chiết phân bố bằng dung môi etyl axetat nồng độ 97% 3 lần, mỗi lần 0,5 lít. Sau khi tách loại phần dung môi etyl axetat nằm bên trên, thu gom phần dịch nước 3

nằm bên dưới và chung cất dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 70°C cho đến khi còn khoảng 100-200 ml dịch. Dịch thu được ký hiệu là dịch cô 4.

Tiến hành phân tách dịch cô 4 trên cột sắc ký với chất hấp phụ Diaion HP-20 (1,0 kg, cột nhồi đường kính trong 10 cm), rửa loại bỏ tạp chất bằng nước cất rồi giải hấp bằng metanol/nước cất theo tỷ lệ 1/1. Thu gom dịch được giải hấp bằng metanol/nước, cất loại dung môi thu được 11 g dịch cô đặc 5;

Dịch cô đặc 5 thu được ở trên được tách phân đoạn trên cột sắc ký với 110 g chất hấp phụ silica gel pha thường có cỡ hạt nằm trong khoảng 50 μm , cột nhồi có đường kính trong 3,5 cm. Tiến hành rửa giải bằng hỗn hợp hệ dung môi etyl axetat/metanol/nước theo tỷ lệ 4/1/0,1 (theo thể tích). Các dịch rửa giải được kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng pha thường. Thu gom các dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau và có vết chất Adenosine khi kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng, sau đó cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 200 mg dịch cô đặc ký hiệu là dịch cô đặc 6;

Dịch cô đặc 6 thu được ở trên được tinh chế lại bằng cột sắc ký với 10 g chất hấp phụ silica gel pha thường có cỡ hạt khoảng 50 μm , cột nhồi có đường kính trong 1,2 cm. Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol/nước theo tỷ lệ 3/1/0,1 (theo thể tích), thu gom dịch giải hấp rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được 50 mg hợp chất Adenosine dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

Ví dụ 2: Thử nghiệm đánh giá độ tinh sạch

Thử nghiệm này nhằm đánh giá độ tinh sạch của adenosine thu được theo ví dụ 1 bằng thiết bị sắc ký lỏng tính năng cao (HPLC) có kết nối đầu dò mảng điốt (DAD). Hợp chất adenosine thu được theo ví dụ 1 được hoà tan với nước cất thành dung dịch A có nồng độ 1,0 mg/ml.

Điều kiện phân tích trên máy HPLC được thiết lập gồm cột pha tĩnh RP18, pha động chứa axetonitril/axit axetic 0,1% theo tỷ lệ 5:95 (theo thể tích), tốc độ dòng 0,5 ml/phút, đầu dò quang phổ tử ngoại DAD bước sóng 260 nm. Tiêm 5 μl dung dịch A vào máy HPLC và tiến hành phân tích như điều kiện đã thiết lập. Trên sắc ký đồ thu được tín hiệu adenosine là một pic duy nhất có cường độ tích phân lớn hơn 98%. Số liệu này khẳng định độ tinh khiết của adenosine lớn hơn 98%. Sắc ký đồ HPLC của adenosine được thể hiện trên hình 4.

Khả năng ứng dụng của giải pháp hữu ích

Giải pháp này được áp dụng để tách chiết hợp chất adenosine có nhiều tác dụng dược lý từ cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. Đồng thời, giải pháp này cũng nhằm định hướng cho những nghiên cứu sâu hơn về cây lan kim tuyến, giúp làm sáng tỏ công dụng chữa bệnh đáng quan tâm của loài thảo dược quý này ở Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tách chiết hợp chất adenosine từ cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. bao gồm các bước:

(i) thu gom phần thân và lá của cây lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl., sau đó rửa sạch, sấy khô rồi xay thành bột;

(ii) tiến hành ngâm chiết phần bột thu được ở bước (i) bằng siêu âm trong dung môi hữu cơ theo tỷ lệ bột/dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 1/2 đến 1/4 (theo trọng lượng/thể tích) từ 1 đến 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 10 đến 30 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 70°C, sau đó gộp các phần dịch chiết dung môi hữu cơ thu được từ các lần ngâm chiết lại rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C để thu được dịch chiết ở dạng đậm đặc ký hiệu là dịch cô đặc 1;

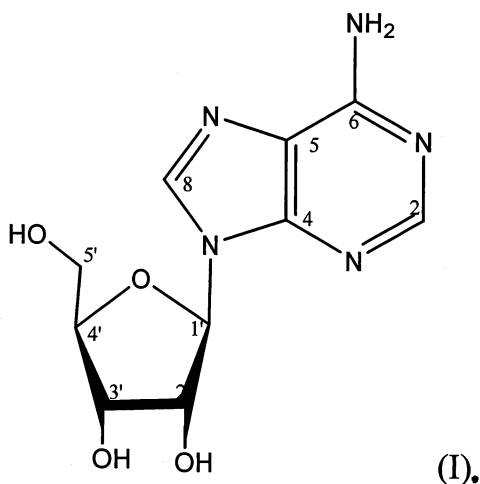
(iii) hòa tan dịch cô đặc 1 trong nước cất theo tỷ lệ dịch cô đặc 1/nước cất nằm trong khoảng từ 1/2 đến 1/4 (theo trọng lượng/thể tích) để thu được dung dịch 1A, rồi chiết phân bố bằng dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp, không tan hoặc ít tan trong nước theo tỷ lệ dung môi hữu cơ/dung dịch 1A nằm trong khoảng từ 1/1 đến 1/2 (theo thể tích) từ 1 đến 5 lần, sau đó tách loại phần dung môi nằm bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới ký hiệu là dung dịch nước 2;

(iv) chiết phân bố phần dung dịch nước 2 thu được ở bước (iii) bằng dung môi ethyl axetat nồng độ 95-100% theo tỷ lệ dung môi ethyl axetat/dung dịch nước 2 nằm trong khoảng từ 1/1 đến 1/2 (theo thể tích) từ 1 đến 5 lần, sau đó tách loại phần dung môi nằm bên trên và phần dung dịch nước nằm bên dưới ký hiệu là dung dịch nước 3 được giữ lại và được cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ, thu được dịch cô trong nước ký hiệu là dịch cô 4;

(v) tiến hành phân tách dịch cô 4 trên cột sắc ký với chất hấp phụ Diaion HP-20 và rửa bằng nước cất để loại bỏ tạp chất, sau đó giải hấp bằng metanol/nước cất theo tỷ lệ 1/1 (theo thể tích), thu gom dịch được giải hấp bằng metanol/nước cất, rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ, thu được dịch cô đặc ký hiệu là dịch cô đặc 5;

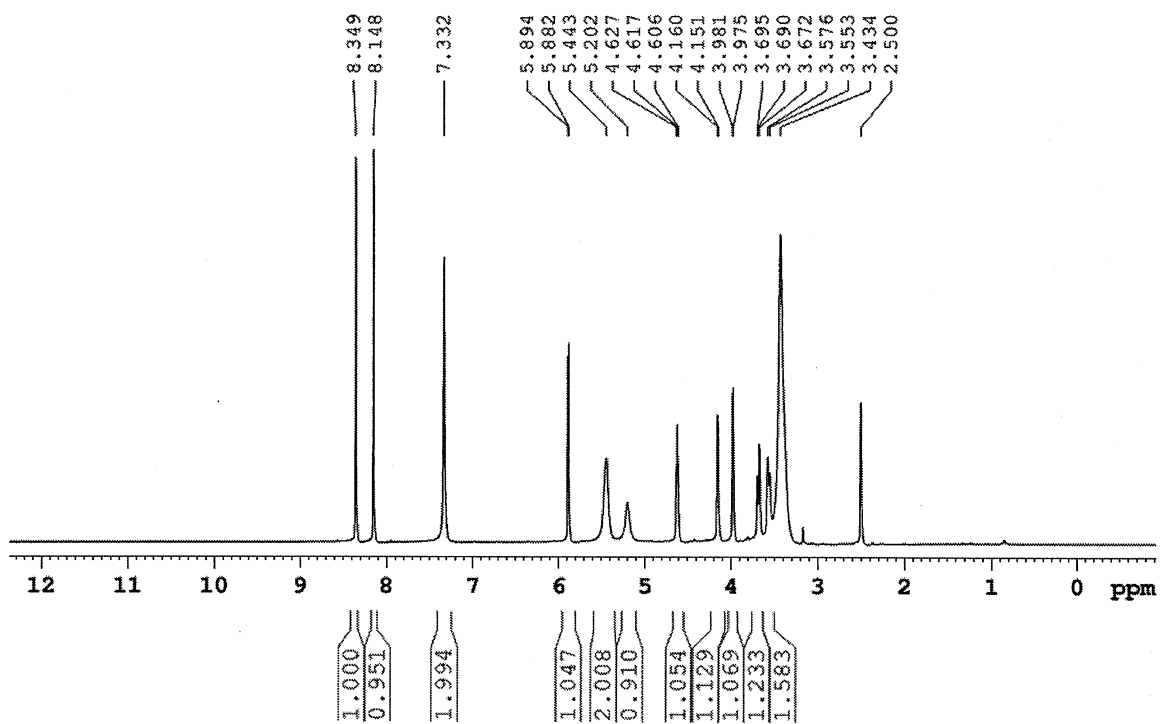
(vi) tách phân đoạn dịch cô đặc 5 ở bước (v) trên cột sắc ký một lần nữa với chất hấp phụ silica gel pha thường theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ nằm trong khoảng từ 1/5 đến 1/20 (theo khối lượng), rửa giải bằng hỗn hợp hệ dung môi etyl axetat/metanol/nước theo tỷ lệ 4/1/0,1 (theo thể tích), kiểm tra các dịch rửa giải trên sắc ký lớp mỏng pha thường, thu gom các dịch rửa giải có sắc ký đồ giống nhau và có vết chất Adenosine, cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ, thu được dịch cô đặc ký hiệu là dịch cô đặc 6; và

(vii) tinh chế lại dịch cô đặc 6 thu được ở bước (vi) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ nằm trong khoảng từ 1/30 đến 1/70 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol/nước theo tỷ lệ 3/1/0,1 (theo thể tích), dịch rửa giải được cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 70°C cho đến khi không còn hơi dung môi ngưng tụ, thu được hợp chất Adenosine có công thức (I) dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng.

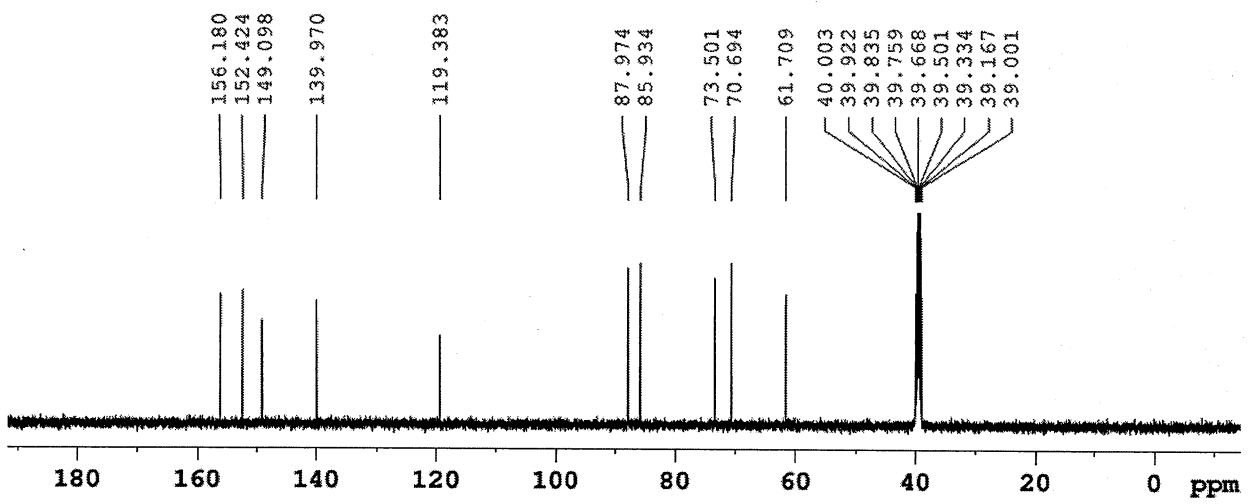


2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước (ii), tỷ lệ bột/dung môi hữu cơ là 1/3 (theo trọng lượng/thể tích).
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ở bước (ii), dung môi hữu cơ được sử dụng là dung môi metanol nồng độ 95-100% hoặc cồn 95-98%.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó ở bước (ii), dung môi hữu cơ được sử dụng là dung môi metanol có nồng độ 97%.

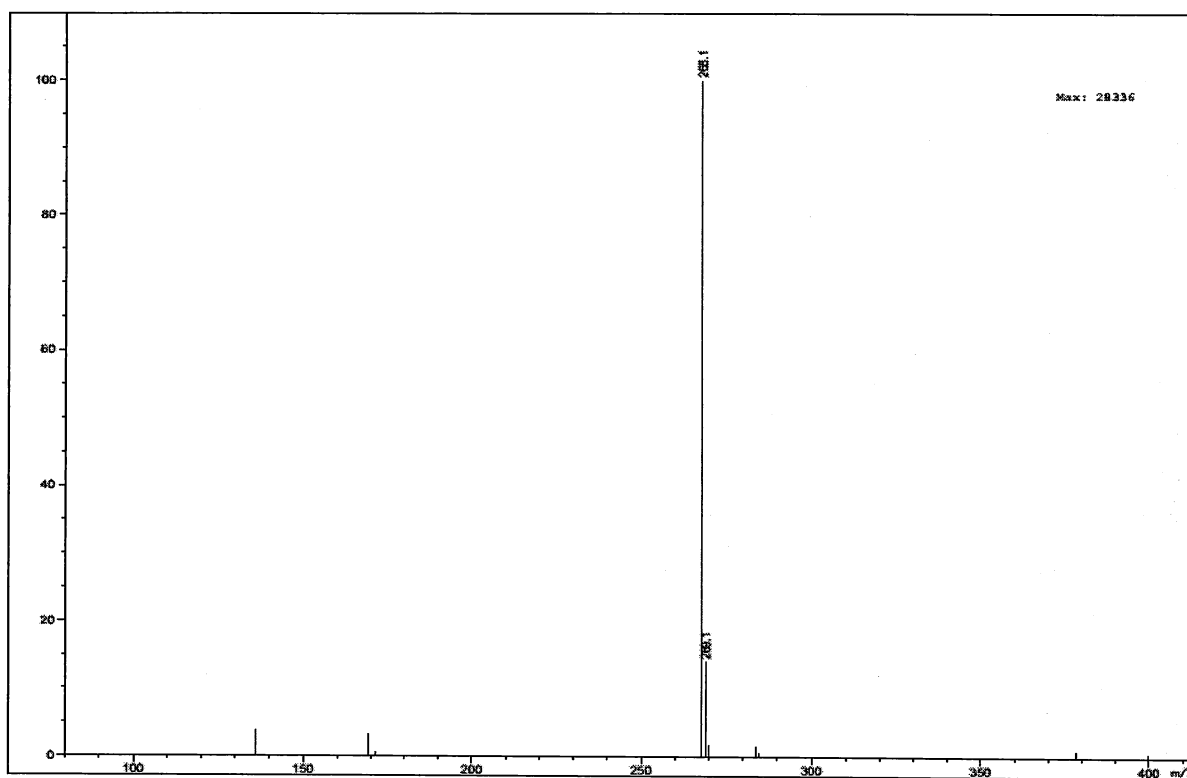
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iii), dịch cô đặc 1 được hòa tan trong nước cất theo tỷ lệ dịch cô đặc 1/nước cất là 1/3 (theo trọng lượng/thể tích) để thu được dung dịch 1A.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iii), dung dịch 1A được chiết phân bố bằng dung môi hữu cơ theo tỷ lệ dung môi hữu cơ/dung dịch 1A là 1/2 (theo thể tích).
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iii), dung môi hữu cơ là hexan nồng độ 95-100% hoặc ete dầu hoả 30-60%.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iii), dung môi hữu cơ là hexan nồng độ 97%.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iv), việc chiết phân bố phần dung dịch nước 2 thu được ở bước (iii) là bằng dung môi etyl axetat có nồng độ 97%.
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (iv), tỷ lệ dung môi etyl axetat/dung dịch nước 2 là 1/2 (theo thể tích).
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (vi) chất hấp phụ silica gel pha thường có cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm .
12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (vi), tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/10 (theo khối lượng).
13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (vii), chất hấp phụ silica gel pha thường có cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm .
14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước (vii), tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/70 (theo khối lượng).



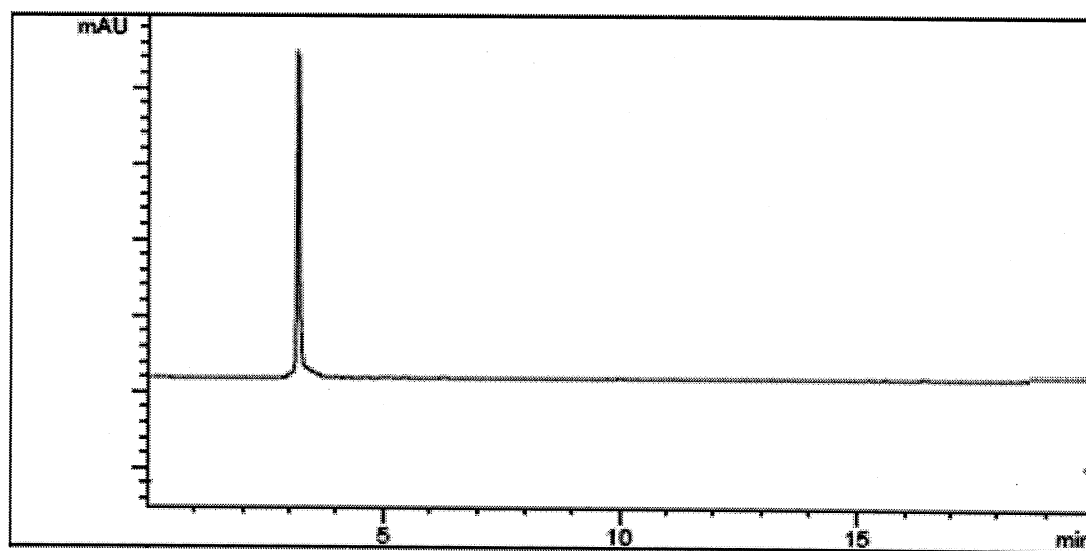
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4