



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11)   
**1-0020884**

(51)<sup>7</sup> **C07H 1/00**

(13) **B**

(21) 1-2015-00109

(22) 14.01.2015

(45) 27.05.2019 374

(43) 25.03.2015 324

(73) **VIỆN HÓA SINH BIỂN - VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)**

Số 18, đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Nguyễn Quốc Vương (VN), Vũ Văn Chiến (VN), Nguyễn Thị Huế (VN), Phạm Thị Hằng (VN), Phạm Văn Cường (VN), Nguyễn Hoài Nam (VN), Châu Văn Minh (VN)**

(54) **QUY TRÌNH TỔNG HỢP HỢP CHẤT ALPHITONIN-4-O-BETA-D-GLUCOPYRANOSIT**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình tổng hợp hợp chất alphononin-4-O-β-D-glucopyranosit bao gồm các bước sau:

(i) đồng phân hoá taxifolin để tạo ra alphononin;

(ii) glucosyl hóa alphononin bằng tác nhân 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-α-D-glucopyranosyl bromua sử dụng hệ xúc tiến K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> thu được 2,4,6-trihydroxy-2-[(3',4'-dihydroxyphenyl) methyl]-3(2H)-benzofuranon-4-yl-β-D-tetraaxetylglucopyranosit; và

(iii) loại nhóm bảo vệ (loại nhóm axetyl) ở phần đường của hợp chất thu được ở bước (ii) nêu trên để thu được hợp chất alphononin-4-O-β-D-glucopyranosit

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tổng hợp các hợp chất hoá học, cụ thể là đề cập đến quy trình tổng hợp hợp chất alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit (**1**) có tên khoa học là 2,4,6-trihydroxy-2-[(3',4'-dihydroxyphenyl)methyl]-3(2*H*)-benzofuranon-4-yl- $\beta$ -D-glucopyranosit.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hợp chất alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit (**1**) có tên khoa học là 2,4,6-trihydroxy-2-[(3',4'-dihydroxyphenyl)methyl]-3(2*H*)-benzofuranon-4-yl- $\beta$ -D-glucopyranosit) lần đầu tiên được phân lập từ lá cây Chay Bắc Bộ (*Artocarpus tonkinensis* A. Chev.) đã thể hiện hoạt tính ức chế miễn dịch tốt (Thuy T. et al., *Pharmazie* (2004), 59(4), 297-300), lá cây Chay Bắc Bộ đã được sử dụng trong dân gian trong việc điều trị bệnh thấp khớp và đau lưng. Từ năm 1994, GS. Phan Chúc Lâm ở Viện Quân y 108 đã chẩn đoán hồi cứu các trường hợp liệt được chữa khỏi bằng lá cây Chay Bắc Bộ, xác định có thể là những trường hợp bị bệnh nhược cơ (Myasthenia gravis: MG), một bệnh tự miễn phải điều trị bằng thuốc ức chế miễn dịch như prednisolon, azathioprin.

Do đó, hợp chất alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit có thể được phân lập từ dịch chiết butanol của lá cây Chay Bắc Bộ mà có thể được định hướng nghiên cứu dùng để điều chế được phẩm ức chế miễn dịch. Tuy nhiên, hàm lượng của hoạt chất này trong cây rất thấp chỉ khoảng 0,001-0,005% trọng lượng lá chay khô. Vì thế, để nghiên cứu sâu hơn hoạt tính tác dụng đến hệ miễn dịch của hợp chất này đòi hỏi phải có một quy trình tổng hợp ổn định khả thi mà có khả năng cung cấp đủ lượng hợp chất này cho các nghiên cứu tiếp theo.

Đã biết các phương pháp thông thường để tổng hợp các auronol glucosit nói chung bao gồm 2 bước: bước 1 là điều chế aglycon là các phân tử auronol; bước 2 là gắn phân tử đường (glucosit) vào vị trí thích hợp trên phân tử auronol. Tuy nhiên, vẫn chưa có quy trình tổng hợp hợp chất alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit nào được đề cập mà đảm bảo khả năng cung cấp đủ lượng hợp chất này một cách ổn định.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là nhằm giải quyết vấn đề nêu trên.

Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất quy trình tổng hợp hợp chất alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit (2,4,6-trihydroxy-2-[(3',4'-dihydroxyphenyl)methyl]-3(2H)-benzofuranon-4-yl- $\beta$ -D-glucopyranosit) từ nguồn nguyên liệu sẵn có và với hiệu suất đảm bảo cho việc cung cấp đủ lượng hợp chất này một cách ổn định để phục vụ cho các mục đích khác nhau.

Cụ thể là, quy trình tổng hợp alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit theo sáng chế bao gồm các bước:

(i) điều chế hợp chất aglycon alphonin (**3**) từ taxifolin (**2**);

(ii) glucosyl hóa alphonin bằng tác nhân 2,3,4,6-tetra-*O*-axetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl bromua để thu được alphonin-axetyl glucosit (**5**), đây là bước chìa khóa của sáng chế. Phản ứng glucosyl hóa được xúc tiến với hệ  $K_2CO_3/Cs_2CO_3$ , trong đó chất xúc tiến  $Cs_2CO_3$  có tính tan tốt trong các dung môi hữu cơ aprotic như DMF, DMSO, v.v. tạo phức với các nhóm OH phenol (Ar-OH) hình thành phenoxit ( $ArO^-Cs^+$ ) có liên kết lỏng lẻo giống như một anion “naked” có tính nucleophil mạnh làm tăng tốc độ phản ứng glucosyl hóa alphonin.  $K_2CO_3$  đóng vai trò là 1 bazơ tan kém trong dung môi hữu cơ khan nhưng vẫn có khả năng trung hòa được HBr tạo ra nên được kết hợp để giảm chi phí phản ứng. Vì vậy hệ

xúc tiến  $K_2CO_3/Cs_2CO_3$  đã được sử dụng trong phản ứng glucosyl hóa alphononin để thu được sản phẩm alphononin-axetyl glucosit (**5**); và

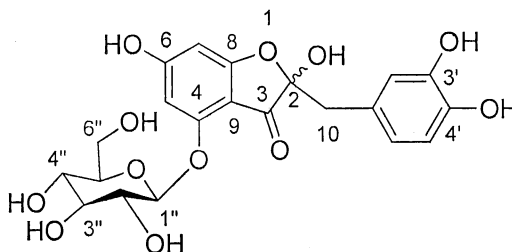
(iii) Loại nhóm bảo vệ (loại nhóm axetyl) ở phần đường của hợp chất thu được ở bước (ii) nêu trên để thu được hợp chất alphononin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit (**1**).

### Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 thể hiện quy trình tổng hợp hợp chất alphononin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit theo sáng chế.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Hợp chất alphononin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit (**1**) có công thức cấu tạo như thể hiện dưới đây. Hợp chất này có tên khoa học là 2,4,6-trihydroxy-2-[(3',4'-dihydroxyphenyl)metyl]-3(2*H*)-benzofuranon-4-yl- $\beta$ -D-glucopyranosit. Hợp chất này là một auronol glucosit với phân tử bao gồm khung chính là 2-hydroxyl-2-benzylcoumaranons được gắn một phân tử đường glucopyranosit tại C-4.



Alphononin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit (**1**)

Quy trình tổng hợp hợp chất alphononin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit theo sáng chế bao gồm các bước cụ thể được mô tả chi tiết như sau:

#### Bước 1: Điều chế alphononin từ taxifolin

Taxifolin là hợp chất thu được từ rễ cây Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb.), là nguồn nguyên liệu dễ kiếm và rẻ tiền.

Aglycon alphononin được điều chế từ taxifolin bằng phản ứng đồng phân hóa ở nhiệt độ cao được mô tả chi tiết như sau: phản ứng đồng phân hóa taxifolin được thực hiện trong dung môi nước loại ion (nước DI) trong một bình kín đã được loại hết oxy, được lấp đầy bằng khí nitơ và tiến hành gia nhiệt taxifolin ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 145°C đến 165°C, tốt nhất là 155°C với thời gian dài từ 80 đến 100 giờ, tốt nhất là 95 giờ để phản ứng đồng phân hoá taxifolin diễn ra, tạo thành alphononin. Tỷ lệ taxifolin/H<sub>2</sub>O nằm trong khoảng từ 1/8 đến 1/6 (mmol/ml), tốt nhất là ở tỷ lệ 1/7 (mmol/ml).

Việc loại bỏ khí oxy ra khỏi bình phản ứng được thực hiện như sau: hỗn hợp dung dịch được làm lạnh xuống dưới 0°C hình thành tinh thể đá nước, được hút chân không trong khoảng 30 phút, sau đó lại nạp khí nitơ vào rồi để hỗn hợp trở lại dạng dung dịch, dung dịch lại được làm lạnh tạo tinh thể đá và hút chân không rồi để ấm trở lại dung dịch, quá trình loại oxy được thực hiện 3 lần để hầu như loại hết oxy trong bình phản ứng rồi được nạp đầy khí nitơ. Sau đó, bình phản ứng chứa hỗn hợp dung dịch phản ứng được nhúng trong dầu truyền nhiệt với nhiệt độ nằm trong khoảng từ 140 đến 165°C, tốt nhất là 155°C, thời gian phản ứng có thể từ 80 đến 100 giờ, tốt nhất là 95 giờ để thực hiện việc gia nhiệt, tiến hành phản ứng đồng phân hoá taxifolin tạo alphononin. Sau khi kết thúc phản ứng, hỗn hợp được để nguội và lọc loại bỏ phần kết tủa màu vàng (nếu có), phần dung dịch được chiết bằng etyl axetat ít nhất là 5 lần ( $5 \times V_{EA}$ ) (1 mmol alphononin cần  $V_{EA} = 10$  ml etyl axetat) cho đến khi hết alphononin trong lớp nước (kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng). Dịch chiết etyl axetat chứa alphononin thu gom được cô quay dưới chân không thấp nhằm loại bỏ dung môi để thu được phần cặn chất rắn. Phần cặn chất rắn này được làm sạch sơ bộ qua cột ngắn silicagel (1 g chất rắn sử dụng khoảng 3 g silicagel) với hệ dung môi rửa giải diclorometan/etyl axetat (DCM/EtOAc, 2/1, v/v). Sau khi làm sạch sơ bộ, các phần dung dịch chứa alphononin được kết hợp lại và quay cất loại dung môi để thu được sản phẩm thô chứa alphononin. Sản phẩm thô chứa alphononin tiếp tục được tinh chế qua cột sắc ký chứa sephadex (1g sản phẩm thô

cần 20 g sephadex là chất hấp phụ) với dung môi rửa giải metanol (1 g sản phẩm thô cần 1l) để thu được hợp chất alphonin (**3**) tinh khiết (với hiệu suất khoảng 75%).

## Bước 2: Glucosyl hoá alphonin

Hợp chất alphonin (**3**) thu được từ bước 1 tiếp tục được glucosyl hóa tiếp theo với hợp chất 2,3,4,6-tetra-*O*-axetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl bromua (**4**, chất đóng vai trò là tác nhân glucosyl hoá). Phản ứng được tiến hành trong dung môi phân cực được chọn từ nhóm bao gồm *N,N*-dimetylformamit (DMF), dimetylsulfoxit (DMSO, *N,N*-dimetyloxetamit (DMAc), v.v. với tỷ lệ alphonin/dung môi nằm trong khoảng từ 1/20 đến 1/10 (mmol/ml), tốt nhất 1/15 (mmol/ml). Các bazơ được sử dụng trong phản ứng này là các bazơ vô cơ hoặc hữu cơ, chẳng hạn như  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , hoặc trietylamin (TEA). Tỷ lệ đương lượng của hợp chất alphonin/bazơ nằm trong khoảng từ 1/3 đến 1/1 (eqv.), tốt nhất là 1/2,2 (eqv.). Chất xúc tiến sử dụng được chọn từ nhóm các bazơ bao gồm  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CdCO}_3$  và  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ , tốt nhất là  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , tỷ lệ đương lượng của hợp chất alphonin/chất xúc tiến nằm trong khoảng từ 1/3 đến 1/1 (eqv.), tốt nhất là 1/1,1 (eqv.). Mục đích của chất xúc tiến dùng trong bước 2 là thúc đẩy quá trình phản ứng. Hỗn hợp phản ứng chứa alphonin được làm lạnh đến  $0^\circ\text{C}$  và tác nhân 2,3,4,6-tetra-*O*-axetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl bromua được thêm dần vào, giữ nhiệt độ hỗn hợp ở  $0^\circ\text{C}$ . Tỷ lệ đương lượng của hợp chất alphonin (2)/tác nhân glucosyl hoá (3) nằm trong khoảng từ 1/5 đến 1/1 (eqv.), tốt nhất là 1/1,1 (eqv.). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ có thể từ  $0^\circ\text{C}$  đến nhiệt độ phòng ( $25^\circ\text{C}$ ), tốt nhất ở  $0^\circ\text{C}$  trong khoảng thời gian từ 1 giờ đến 3 giờ phụ thuộc vào lượng chất phản ứng, sau đó, hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt lên đến nhiệt độ phòng ( $25^\circ\text{C}$ ) và tiếp tục được khuấy tiếp trong khoảng thời gian từ 3 đến 6 giờ ở nhiệt độ phòng ( $25^\circ\text{C}$ ). Hỗn hợp sau phản ứng được trung hòa về độ pH 6-7 bằng HCl 0,1 N rồi được chiết với etyl axetat ít nhất là ba lần với tỷ lệ thích hợp ( $3 \times V_{\text{EA}2}$ , 1 mmol alphonin đã glucosyl

hoá hay còn gọi là alphononin-axetyl glucosit sử dụng 15 ml etyl axetat). Dịch chiết được rửa bằng nước rồi được làm khan bằng  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , được quay cất dưới chân không thấp loại dung môi thu được phần cặn dạng dầu. Phần cặn dạng dầu được tinh chế qua sắc ký cột trên silicagel pha đảo C-18 với hệ dung môi rửa giải metanol/nước ( $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ ) ở các tỷ lệ tăng dần của MeOH (1/1, 2/1, 1/0; v/v) thu được phân đoạn alphononin đã glucosyl hoá ở dạng sạch là 2,4,6-trihydroxy-2-[(3',4'-dihydroxyphenyl)methyl]-3(2H)-benzofuranon-4-yl- $\beta$ -D-tetraaxetylglucopyranosit (hợp chất **5**, alphononin-axetyl glucosit) với hiệu suất khoảng 39%.

Bước 3. Tạo ra alphononin-4-O- $\beta$ -D-glucopyranosit từ hợp chất alphononin-axetyl glucosit (**5**)

Để thu được hợp chất alphononin-4-O- $\beta$ -D-glucopyranosit mong muốn, nhóm bảo vệ (*O*-axetyl) ở phần đường của alphononin-axetyl glucosit (**5**) phải được loại bỏ. Phản ứng deaxetyl hóa (loại nhóm axetyl) nhóm bảo vệ ở phần đường của hợp chất **5** được tiến hành trong môi trường kiềm. Các tác nhân bazơ được sử dụng để tạo môi trường kiềm là NaOH, KOH, KO*t*-Bu (Kali *t*-butoxit),  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , tốt nhất là NaOH, với tỷ lệ đương lượng của hợp chất **5**/bazơ nằm trong khoảng từ 1/8 đến 1/4 (eqv.), tốt nhất là 1/4,4 (eqv.). Hợp chất alphononin-axetyl glucosit được hòa tan trong dung môi phân cực, chẳng hạn như metanol (MeOH), etanol (EtOH), dimethylformamit (DMF) hoặc dimethyl sulfoxit (DMSO), tốt nhất là trong MeOH, tỷ lệ của hợp chất **5**/dung môi nằm trong khoảng từ 1/30 đến 1/10 (mmol/ml), tốt nhất ở tỷ lệ 1/20 (mmol/ml). Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh từ  $-10^\circ\text{C}$  đến  $25^\circ\text{C}$ , tốt nhất là từ  $-5$  đến  $5^\circ\text{C}$ . Bazơ có thể được hòa tan trong hệ dung môi với nước ở tỷ lệ dung môi/ $\text{H}_2\text{O}$  là 1/1 (v/v) thu được dung dịch bazơ/dung môi/ $\text{H}_2\text{O}$  có tỷ lệ bazơ/dung môi/ $\text{H}_2\text{O}$  là 1/2,5/2,5 (mmol/ml/ml), dung dịch này được nhỏ giọt từ từ với sự khuấy vào hỗn hợp dung dịch hợp chất **5** theo tỷ lệ alphononin-axetyl glucosit/bazơ là 1/4 (mol/mol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ nằm

trong khoảng từ  $-5^{\circ}\text{C}$  đến  $5^{\circ}\text{C}$  trong khoảng 20 phút đến 1 giờ phụ thuộc vào lượng chất phản ứng cho đến khi sự thủy phân kết thúc (kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng). Sau khi sự thủy phân kết thúc, hỗn hợp phản ứng được trung hòa về độ pH 6-7 bằng HCl 0,1 N rồi được chiết 3 lần bằng etyl axetat theo tỷ lệ thích hợp ( $3 \times V_{\text{EA}}$ , 1 mmol sản phẩm sử dụng từ 10-15 ml etyl axetat). Dịch chiết được rửa bằng nước rồi được làm khan bằng  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , được quay cất dưới chân không thấp để loại dung môi, thu được phần cặn dạng dầu. Phần cặn dầu được tinh chế qua sắc ký cột trên silicagel pha đảo C-18 với hệ dung môi rửa giải MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  ở các tỷ lệ tăng dần của MeOH (4/1, 5/1, 6/1; v/v) để thu được phân đoạn chứa alphononin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit (**1**) sạch với hiệu suất 45%.

Như vậy, ở trên đây, các tác giả sáng chế đã mô tả một cách chi tiết quy trình mới để tổng hợp auronol glucosit là alphononin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit (**1**) từ taxifolin qua 3 bước phản ứng với các điều kiện thích hợp của từng bước, để thu được hợp chất alphononin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit (**1**) mong muốn ở hiệu suất toàn phần là khoảng 13%. Sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết, cụ thể hơn dựa vào những ví dụ dưới đây, tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa rõ hơn bản chất mà không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### **Ví dụ 1: Điều chế hợp chất alphononin từ taxifolin**

Trong bình 1 cổ 250 ml có khóa, hỗn hợp huyền phù của taxifolin (4,56 g, 15 mmol) trong 105 ml nước loại ion ( $\text{H}_2\text{O}$  DI) được làm lạnh xuống  $\leq 0^{\circ}\text{C}$ . Hỗn hợp dung dịch đóng đá được hút chân không để loại hết khí trong khoảng 30 phút sau đó khí  $\text{N}_2$  được nạp vào và hỗn hợp được để ấm trở lại dạng dung dịch. Quá trình loại khí oxy được lặp lại 3 lần, sau đó bình phản ứng được khóa kín và nhúng vào bồn chứa dầu truyền nhiệt ở nhiệt độ  $155^{\circ}\text{C}$  trong khoảng 96 giờ rồi để nguội đến nhiệt độ phòng. Kết tủa màu vàng xanh hình thành trong phản ứng được lọc loại bỏ (0 - 0,26 g, phụ thuộc vào khả năng loại khí oxy trong hỗn hợp phản ứng),



phần dung dịch màu nâu đỏ được chiết 5 lần bằng dung môi etyl axetat (5 x 50 ml), dịch etyl axetat tổng chứa alphonin được làm khan, quay cất loại dung môi thu được phần cặn rắn. Phần cặn rắn (khoảng 4,3 g) được làm sạch sơ bộ qua cột ngắn silicagel (15 g) với hệ dung môi rửa giải  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$  (2/1, v/v). Phần dung dịch chứa alphonin thu được được kết hợp lại và quay cất loại dung môi thu được sản phẩm thô chứa alphonin (khoảng 4,0 g). Sản phẩm thô này tiếp tục được tinh chế qua sắc ký cột sử dụng chất hấp phụ sephadex (75g) với dung môi rửa giải metanol (3l) thu được 3,42 g alphonin tinh khiết với hiệu suất 75%.

$^1\text{H-NMR}$  (Acetone- $d_6$ , 500 MHz): 9,65 (1H, brs, OH), 7,70 (1H, br. s, OH), 7,66 (1H, br. s, OH), 6,72 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-2'), 6,61 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H-5'), 6,54 (1H, d,  $J = 2,0$  and 8,0 Hz, H-6'), 6,43 (1H, br. s, OH), 5,86 (1H, d,  $J = 1,5$  Hz, H-5), 5,82 (1H, d,  $J = 1,5$  Hz, H-7), 3,05 (1H, d,  $J = 13,5$  Hz, H<sub>b</sub>-10), 3,02 (1H, d,  $J = 13,5$  Hz, H<sub>a</sub>-10).

$^{13}\text{C-NMR}$  (Acetone- $d_6$ , 125 MHz): 195,4 (C=O), 172,5 (C-8), 169,6 (C-6), 158,8 (C-4), 145,3 (C-3'), 144,7 (C-4'), 126,3 (C-1'), 122,9 (C-6'), 118,5 (C-2'), 115,5 (C-5'), 107,0 (C-2), 102,7 (C-9), 96,7 (C-5), 91,4 (C-7), 41,8 (C-10).

ESI-MS (ion âm):  $m/z = 303$   $[\text{M-H}]^-$ .

Ví dụ 2: Tổng hợp 2,4,6-trihydroxy-2-[(3',4'-dihydroxyphenyl) methyl]-3(2H)-benzofuranon-4-yl- $\beta$ -D-tetraaxetylglucopyranosit (**5**) từ alphonin

Hỗn hợp dung dịch của alphonin (3,04 g, 10 mmol) trong DMF (50ml) được làm lạnh xuống  $0^\circ\text{C}$ , sau đó được lần lượt cho thêm 2,3,4,6-tetra-*O*-axetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl bromua (4,51 g, 11 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3,04 g, 22 mmol),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (3,59 g, 11 mmol) vào ở  $0^\circ\text{C}$ . Hỗn hợp phản ứng thu được được khuấy ở  $0^\circ\text{C}$  trong khoảng 1 giờ rồi được làm ấm đến nhiệt độ phòng ( $25^\circ\text{C}$ ) và được khuấy tiếp khoảng 4 giờ ở nhiệt độ này. Sau khi phản ứng kết thúc (kiểm tra sắc ký lớp mỏng), hỗn hợp phản ứng được trung hòa với dung dịch axit loãng HCl 0,1N đến độ pH 6-7 rồi được chiết bằng etyl axetat (3 x 50 ml). Các dịch chiết etyl axetat được kết

hợp lại, rửa với nước sau đó được làm khô qua  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  và được cô dưới áp suất thấp thu được cặn dịch dạng dầu màu vàng. Cặn dịch dầu (3,47 g) được tinh chế qua sắc ký cột trên silicagel pha đảo C-18 với hệ dung môi rửa giải  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  ở các tỷ lệ tăng dần của metanol (1/1; 2/1, 1/0; v/v). Các phân đoạn chứa sản phẩm sạch được gom lại và quay cất dưới chân không thấp ở dưới  $40^\circ\text{C}$  thu được 2,47 g hợp chất 2,4,6-trihydroxy-2-[(3',4'-dihydroxyphenyl)methyl]-3(2H)-benzofuranon-4-yl- $\beta$ -D-tetraaxetyl glucopyranosit (**5**) với hiệu suất 39%.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 6,66/6,64 (1H, mỗi d,  $J = 1,5$  Hz, H-2'), 6,57/6,53 (1H, mỗi d,  $J = 8,0$  Hz, H-5'), 6,52/6,48 (1H, mỗi dd,  $J = 1,5, 8,0$  Hz, H-6'), 6,02/6,01 (1H, mỗi d,  $J = 1,5$  Hz, H-5), 5,96/5,93 (1H, mỗi d,  $J = 1,5$  Hz, H-7), 5,35 (1H, t,  $J = 9,0$  Hz, H-3''), 5,32/5,22 (1H, mỗi d,  $J = 8,0$  Hz, H-1''), 5,23 (1H, dd,  $J = 8,0, 9,0$  Hz, H-2''), 5,11 (1H, m, H-4''), 4,33/4,31 (1H, mỗi dd,  $J = 5,0, 12,0$  Hz, H<sub>b</sub>-6''), 4,18/4,11 (1H, mỗi dd,  $J = 1,7, 12,0$  Hz, H<sub>a</sub>-6''), 4,09/4,02 (1H, m, H-5''), 3,02 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -10), 2,00-2,10 (12H,  $4 \times \text{OAc}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 194,9 (C=O), 174,3 (OAc), 172,4 (OAc), 171,6/171,4 (OAc), 171,3 (OAc), 157,7/157,5 (C-4), 145,6 (C-3'), 145,1 (C-4'), 126,5 (C-1'), 123,1/122,9 (C-6'), 118,8/118,7 (C-2'), 115,9/115,7 (C-5'), 107,4/107,1 (C-2), 103,0/102,9 (C-9), 100,1/99,4 (C-5), 99,8 (C-1''), 94,6/94,5 (C-7), 74,1 (C-3''), 73,2/73,1 (C-5''), 72,4/72,3 (C-2''), 69,7/69,6 (C-4''), 63,0/62,9 (C-6''), 42,3/42,2 (C-10), 20,8, 20,7, 20,6 and 20,5 ( $4 \times \text{OAc}$ ).

ESI-MS (ion âm):  $m/z = 633$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

Ví dụ 3: Tổng hợp 2,4,6-trihydroxy-2-[(3',4'-dihydroxyphenyl)methyl]-3(2H)-benzofuranon-4-yl- $\beta$ -D-glucopyranosit (alphitonin-4-O- $\beta$ -D-glucopyranosit) từ hợp chất **5**

Dung dịch của hợp chất **5** (1,24 g, 2 mmol) trong metanol (40 ml) được làm lạnh xuống dưới  $0^\circ\text{C}$  và được thêm dần dung dịch của  $\text{NaOH}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (0,352 g, 8 mmol)/20 ml/20 ml ở  $0^\circ\text{C}$ . Hỗn hợp phản ứng được khuấy tiếp ở  $0^\circ\text{C}$  trong

khoảng 30 phút, sau đó được trung hòa với dung dịch HCl 0,1 N tới độ pH = 6-7. Hỗn hợp dung dịch thu được được chiết 4 lần với etyl axetat (4 x 50 ml). Dịch chiết được kết hợp lại, rửa với nước rồi được làm khô và cô quay loại dung môi dưới chân không thấp thu được sản phẩm thô chứa alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit rắn (0,56 g). Sản phẩm thô được tinh chế qua sắc ký cột trên silicagel pha đảo C-18 với hệ dung môi rửa giải MeOH/H<sub>2</sub>O ở các tỷ lệ tăng dần của metanol (4/1, 5/1, 6/1; v/v). Các phân đoạn chứa sản phẩm sạch được gom lại và quay cất dưới chân không thấp ở dưới 40°C thu được 0,42 g hợp chất alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit (**1**) với hiệu suất 45%.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR của hợp chất alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit cho các tín hiệu kép được giả thiết do cân bằng giữa các diastereome của sản phẩm.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 6,66/6,67 (1H, mỗi d, *J* = 2,5 Hz, H-2'), 6,57/6,55 (1H, mỗi d, *J* = 8,5 Hz, H-5'), 6,52/6,51 (1H, mỗi dd, *J* = 2,5, 8,5 Hz, H-6'), 6,00/5,98 (1H, mỗi d, *J* = 1,2 Hz, H-5), 5,88/5,87 (1H, mỗi d, *J* = 1,2 Hz, H-7), 4,88 (1H, bao phủ, H-1''), 3,88 (1H, br. d, *J* = 12,5 Hz, H<sub>b</sub>-6''), 3,70 (1H, m, H<sub>a</sub>-6''), 3,53 (1H, dd, *J* = 8,0, 9,0 Hz, H-2''), 3,48 (1H, m, H-3''), 3,43 (2H, m, H-4'' và H-5''), 3,04 (2H, m, CH<sub>2</sub>-10).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 196,0/195,8 (C=O), 174,9/174,7 (C-8), 174,8/174,6 (C-6), 158,4/158,3 (C-4), 145,6/145,5 (C-3'), 145,1 (C-4'), 126,5/126,4 (C-1'), 123,1/123,0 (C-6'), 118,7/118,6 (C-2'), 115,9/115,8 (C-5'), 107,6/107,5 (C-2), 102,4/102,3 (C-1''), 101,7/101,5 (C-9), 99,0/98,3 (C-5), 94,0/93,8 (C-7), 78,3/78,2 (C-5''), 77,3 (C-3''), 74,1/74,0 (C-2''), 71,1 (C-4''), 62,2 (C-6''), 42,3/42,2 (C-10).

ESI-MS (ion âm): *m/z* = 465 [M-H]<sup>-</sup>.

**Hiệu quả đạt được của sáng chế**

Quy trình tổng hợp hợp chất alphononin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit theo sáng chế thu được hợp chất alphononin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit với hiệu suất cao (45%), an toàn và tận dụng được nguồn nguyên liệu sẵn có là taxifolin thu được từ rễ cây Thổ phục linh nên quy trình tổng hợp có giá thành thấp.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tổng hợp hợp chất alphonon-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) đồng phân hoá taxifolin để tạo ra alphonon bằng cách cho hỗn hợp taxifolin và dung môi nước vào bình kín đã loại bỏ khí oxy và nạp đầy khí nitơ theo tỷ lệ taxifolin/nước nằm trong khoảng từ 1/8 đến 1/6 (mmol/ml), rồi tiến hành gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 145°C đến 165°C trong khoảng thời gian từ 80 đến 100 giờ;

(ii) glucosyl hóa hợp chất alphonon bằng cách sử dụng tác nhân glucosyl hoá là 2,3,4,6-tetra-*O*-axetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl bromua theo tỷ lệ đương lượng của hợp chất alphonon/tác nhân glucosyl hoá nằm trong khoảng từ 1/5 đến 1/1 (eqv.), trong đó phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 0°C trong khoảng thời gian từ 1 đến 3 giờ và tiếp đó ở nhiệt độ 25°C trong khoảng thời gian từ 3 đến 6 giờ, dưới các điều kiện khuấy trộn trong dung môi phân cực được chọn từ nhóm bao gồm *N,N*-dimetylformamit, dimetylsulfoxit, *N,N*-dimetylaxetamit theo tỷ lệ alphonon/dung môi nằm trong khoảng từ 1/20 đến 1/10 (mmol/ml), sử dụng các bazơ được chọn từ nhóm bao gồm Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> và trietylamin theo tỷ lệ đương lượng của alphonon/bazơ nằm trong khoảng từ 1/3 đến 1/1 (eqv.), chất xúc tiến được chọn từ nhóm bao gồm Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CdCO<sub>3</sub> và Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> theo tỷ lệ đương lượng của alphonon/chất xúc tiến nằm trong khoảng từ 1/3 đến 1/1 (eqv.) thu được alphonon-axetyl glucosit (**5**); và

(iii) thu hợp chất alphonon-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit bằng cách loại nhóm bảo vệ (loại nhóm axetyl) ở phần đường của hợp chất alphonon-axetyl glucosit (**5**) thu được ở bước (ii), trong đó phản ứng loại nhóm bảo vệ này được thực hiện bằng cách hoà tan tác nhân bazơ được chọn từ nhóm bao gồm NaOH, KOH, Kali *t*-butoxit (KO*t*Bu), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> vào dung dịch alphonon đã glucosyl hoá theo tỷ lệ đương lượng của alphonon-axetyl glucosit (**5**)/tác nhân bazơ nằm trong khoảng từ 1/8 đến

1/4 (eqv.), tiến hành khuấy trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ  $-5^{\circ}\text{C}$  đến  $5^{\circ}\text{C}$  trong khoảng thời gian từ 20 phút đến 1 giờ đến khi sự thủy phân kết thúc thu được hợp chất alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó tỷ lệ taxifolin/nước nêu ở bước (i) là 1/7 (mmol/ml).

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó bước đồng phân hoá taxifolin được gia nhiệt ở nhiệt độ  $155^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 95 giờ.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 3, trong đó quy trình này còn bao gồm bước thu hồi alphonin tạo ra ở bước (i) bằng cách để nguội hỗn hợp sản phẩm phản ứng và lọc loại bỏ phần kết tủa, phần dung dịch được chiết bằng dung môi etyl axetat ít nhất là năm lần ( $5 \times V_{\text{EA}}$ ) theo tỷ lệ alphonin/etyl axetat là 1/10 (mmol/ml) cho đến khi hết alphonin trong phần dung dịch, tiếp đó, dịch chiết etyl axetat được rửa với nước, làm khan và cô quay dưới chân không để loại dung môi thu được phần cặn chất rắn, phần cặn chất rắn này được làm sạch sơ bộ qua cột silicagel theo tỷ lệ khối lượng phần cặn chất rắn/silicagel là 1/3 với hệ dung môi rửa giải  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$  theo tỷ lệ 2/1 về thể tích, phần dung dịch chứa alphonin thu được tiếp tục được quay cất loại dung môi để thu được sản phẩm thô chứa alphonin, tinh chế sản phẩm thô ba lần qua cột sắc ký sephadex bằng dung môi rửa giải metanol theo tỷ lệ khối lượng sản phẩm thô/chất hấp phụ sephadex là 1/20 thu được hợp chất alphonin tinh khiết.

5. Quy trình theo điểm 1, trong đó tỷ lệ đương lượng của alphonin/tác nhân glucosyl hoá nêu ở bước (ii) là 1/1,1.

6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó tỷ lệ alphonin/dung môi dùng ở bước (ii) là 1/15 (mmol/ml).

7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó ở bước (ii), tỷ lệ đương lượng của alphonin/bazơ là 1/2,2.

8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó ở bước (ii), tỷ lệ đương lượng của alphononin/chất xúc tiến là 1/1,1.
9. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 8, trong đó quy trình này còn bao gồm bước thu hồi alphononin-axetyl glucosit (**5**) tạo ra ở bước (ii) bằng cách trung hòa hỗn hợp sản phẩm phản ứng tạo ra, sau đó chiết ít nhất ba lần bằng dung môi etyl axetat ( $3 \times V_{EA2}$ ) theo tỷ lệ alphononin-axetyl glucosit/etyl axetat là 1/15 (mmol/ml), tiếp theo rửa dịch chiết bằng nước, làm khan bằng  $Na_2SO_4$  và quay cất dưới chân không thấp loại dung môi thu được phần cặn dạng dầu, tinh chế phần cặn dạng dầu qua sắc ký cột trên silicagel pha đảo C-18 với hệ dung môi rửa giải MeOH/H<sub>2</sub>O ở các tỷ lệ tăng dần của MeOH (1/1, 2/1, 1/0; v/v) thu được phân đoạn alphononin-axetyl glucosit (**5**) sạch.
10. Quy trình theo điểm 1, trong đó ở bước (iii), dung dịch NaOH/MeOH/H<sub>2</sub>O (1/2,5/2,5; mmol/ml/ml) được nhỏ giọt từ từ với sự khuấy trộn vào dung dịch alphononin-axetyl glucosit (**5**) theo tỷ lệ alphononin-axetyl glucosit/bazơ là 1/4 (mol/mol).
11. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó ở bước (iii), alphononin-axetyl glucosit (**5**) được hòa tan trong dung môi phân cực được lựa chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol, dimetylformamit (DMF), dimetyl sulfoxit (DMSO) theo tỷ lệ alphononin-axetyl glucosit (**5**)/dung môi nằm trong khoảng từ 1/30 đến 1/10 (mmol/ml), trước khi được phản ứng với tác nhân bazơ.
12. Quy trình theo điểm 11, trong đó ở bước (iii), tỷ lệ của alphononin-axetyl glucosit (**5**)/dung môi tốt nhất là 1/20 (mmol/ml).
13. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó ở bước (iii), tỷ lệ đương lượng của alphononin-axetyl glucosit (**5**)/bazơ tốt nhất là 1/4,4 (eqv.).
14. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó quy trình này còn bao gồm bước thu hồi hợp chất alphononin-4-O- $\beta$ -D-glucopyranosit tạo ra ở

bước (iii) bằng cách trung hòa hỗn hợp phản ứng tạo ra, sau đó chiết ít nhất ba lần bằng dung môi etyl axetat ( $3 \times V_{EA}$ ) theo tỷ lệ alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit/etyl axetat nằm trong khoảng từ 1/10 đến 1/15 (mmol/ml) thu được dịch chiết, tiếp theo rửa dịch chiết bằng nước, làm khan bằng  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  và quay cất dưới chân không thấp loại dung môi thu được phần cặn dạng dầu, và sau đó tinh chế phần cặn dạng dầu qua sắc ký cột trên silicagel pha đảo C-18 với hệ dung môi rửa giải MeOH/H<sub>2</sub>O ở các tỷ lệ tăng dần của MeOH (4/1, 5/1, 6/1; v/v) thu được phân đoạn alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit.



Hình 1. Quy trình tổng hợp hợp chất alphonin-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosit (1)

