



(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) 
1-0023010

(51)⁷ **C07C 7/00, 11/02, 11/107, C08G 8/22** (13) **B**

(21) 1-2018-04632

(22) 18.10.2018

(45) 25.02.2020 383

(43) 25.09.2019 378

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN (VN)**
334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) **Phạm Hùng Việt (VN), Phan Minh Giang (VN), Dương Hồng Anh (VN), Đỗ Thị Việt Hương (VN), Vũ Minh Trang (VN)**

(54) **PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH HỢP CHẤT (8'Z)-1,3-DIHYDROXY-5-[16'-(3'',5''-DIHYDROXYPHENYL)-8'-HEXADECEN-1'-YL]BENZEN TỪ CÂY BÀN TAY MA (HELICIOPSIS TERMINALIS (KURZ) SLEUMER (PROTEACEAE))**

(57) **Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách hợp chất (8'Z)-1,3-dihydroxy-5-[16'-(3'',5''-dihydroxyphenyl)-8'-hexadecen-1'-yl]benzen (1) từ cây Bàn tay ma (Heliciopsis terminalis (Kurz) Sleumer (Proteaceae)).**

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách hợp chất (8'*Z*)-1,3-dihydroxy-5-[16'-(3'',5''-dihydroxyphenyl)-8'-hexadecen-1'-yl]benzen (**1**) từ cây Bàn tay ma (*Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer (Proteaceae)).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây Bàn tay ma có tên khoa học là *Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer (Proteaceae). Cây Bàn tay ma là cây gỗ nhỏ, cao tới 7 – 8m hay hơn, cành nhỏ và cuống lá non, thường có lông nhung. Lá có thể xẻ sâu lông chim gần hình bầu dục, xẻ sâu 3 thùy dạng trứng, hay hình tròn dài không xẻ thùy, mép lá nguyên hay có gợn sóng. Hoa của cây Bàn tay ma là hoa đơn tính, hay hình bầu dục, gần như không cuống. Quả của cây Bàn tay ma hình trứng hay hình bầu dục, dẹt, không có lông, khi chín thì có màu nâu đen. Hạt của cây Bàn tay ma đơn độc, hình bầu dục. Cây ra hoa vào tháng 6. Cây thường mọc trong rừng núi đất ở Bắc Thái, Vĩnh Phú, Ninh Bình, Lạng Sơn, Quảng Ninh. Khi thu hái làm nguyên liệu có thể thu hái toàn cây, rửa sạch, thái nhỏ, phơi khô. Đồng bào Dao dùng cây chữa bệnh thấp khớp, nấu nước tắm cho phụ nữ sau khi sinh để cho khỏe người và chống đau nhức. Cây cũng được dùng chữa lao hạch, chữa viêm gan siêu vi trùng. Thân cây Bàn tay ma *H. terminalis* đã được sử dụng trong một bài thuốc dân gian ở tỉnh Bắc Kạn bao gồm 3 dược liệu: Bàn tay ma *H. Terminalis*, Giảo cổ lam *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino (Cucurbitaceae), và Cà gai leo *Solanum procumbens* Lour (Solanaceae).

Q. Q. He và cộng sự đã mô tả phương pháp chiết tách các dẫn xuất arbutin mới từ phần chiết 70% EtOH lá cây *Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleum, một tên gọi khác của cây Bàn tay ma. Phương pháp này bao gồm các bước thu gom lá cây *H. lobata*, làm khô lá và chiết với nước trong 2 h ở 100 °C, phân tách phần chiết rửa giải với nước, 30%, 60% và 90% EtOH và tinh chế tiếp các phân đoạn trên sắc ký với các hệ dung môi CHCl₃-MeOH, CHCl₃-EtOAc-MeOH, ete dầu hỏa-EtOAc, CHCl₃-(CH₃)₂CO để thu được các hợp chất (Q. Q. He et al., "Phenolic glycosides from the leaves of *Heliciopsis lobata*", Journal of Asian Natural Products Research, 2006, 8, 373-377).

Mingsheng Liu và cộng sự đã mô tả phương pháp chiết tách các dẫn xuất arbutin mới từ phần chiết 70% EtOH lá cây *Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleum. Phương pháp này bao gồm các bước thu gom lá cây *H. lobata*, làm khô lá và chiết với 70% EtOH trong 1,5 h, phân tán phần chiết thô trong nước và phân bố với ete dầu hỏa, CHCl₃, EtOAc và *n*-BuOH, phân tách phần chiết *n*-BuOH trên cột polyamide rửa giải với nước, 30%, 60% và 95% EtOH và tinh chế tiếp các phân đoạn để thu được các hợp chất (Mingsheng Liu et al., "A new derivative from the leaves of *Heliciopsis lobata*", Natural Product Research, 2010, 24, 1861-1864).

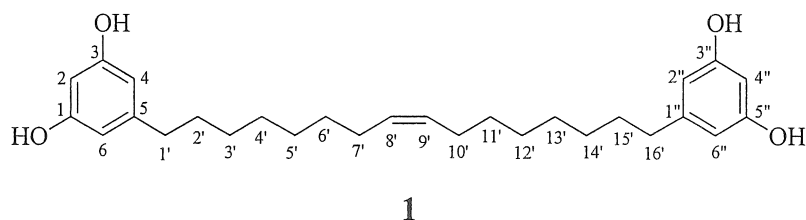
Wei-Yan Qui và cộng sự đã mô tả phương pháp chiết tách hai dẫn xuất arbutin mới có hoạt tính gây độc tế bào từ phần chiết nước lá cây *Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleum. Phương pháp này bao gồm các bước thu gom lá cây *H. lobata*, làm khô lá và chiết với nước ba lần ở 100 °C, chiết phần chiết nước với ete dầu hỏa, EtOAc và *n*-BuOH, phân tách phần chiết EtOAc trên cột silica gel rửa giải với ete dầu hỏa - EtOAc từ 3:1 đến 1:7, lần lượt tiến hành tinh chế với các hệ dung môi CHCl₃-MeOH, CH₂Cl₂-MeOH và CH₃CN-H₂O để thu được các hợp chất (Wei-Yan Qui et al., "New arbutin derivatives from the leaves of *Heliciopsis lobata* with cytotoxicity", Chinese Journal of Natural Medicines, 2016, 14, 0789-0793).

Để kiểm tra các bằng chứng khoa học và tác dụng của bài thuốc dân gian nêu trên, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu về hóa thực vật cũng như các hoạt tính sinh học của thân cây Bàn tay ma *H. terminalis* để tìm ra hợp chất phổ biến có mặt trong cây (8'*Z*)-1,3-dihydroxy-5-[16'-(3'',5''-dihydroxyphenyl)-8'-hexadecen-1'-yl]benzen (1), có tác dụng đem lại hiệu quả chữa bệnh gan và lợi mật.

V. S. Prahash Charturvedura và cộng sự đã mô tả phương pháp chiết tách các hợp chất có hoạt tính sinh học từ phần chiết CH_2Cl_2 -MeOH của loài *Oncostemon bojerianum*, bao gồm hợp chất theo sáng chế. Phương pháp này bao gồm các bước thu gom lá cây *Oncostemon bojerianum*, làm khô, nghiền thành bột và chiết với CH_2Cl_2 -MeOH, phân tán phần chiết thô trong dung dịch MeOH- H_2O , chiết với *n*-hexan và CHCl_3 , phân tách phần chiết CHCl_3 trên cột Sephadex LH-20 rửa giải với *n*-hexan-EtOAc từ 100:0 đến 0:100, lần lượt tiến hành sắc ký lớp mỏng điều chế pha đảo (MeOH- H_2O 85:15) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) pha đảo với pha động CH_3CN - H_2O 9:1 để thu được hợp chất theo sáng chế (V. S. Prahash Charturvedura et al., "New cytotoxic bis-5-alkylresorcinol derivatives from the leaves of *Oncostemon bojerianum* from the Madagascar reinforeset", Journal Natural Products, 2002, 65, 1627-1632).

Bản chất của kỹ thuật sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp chiết tách hợp chất (8'*Z*)-1,3-dihydroxy-5-[16'-(3'',5''-dihydroxyphenyl)-8'-hexadecen-1'-yl]benzen (1):



từ thân cây Bàn tay ma (*Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer (Proteaceae)) bao gồm các bước:

(i) thu gom nguyên liệu thân cây Bàn tay ma (*Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer (Proteaceae)), phơi khô, sấy nhẹ trong tủ sấy ở nhiệt độ 40 °C rồi nghiền mịn thành bột;

(ii) ngâm chiết bột nguyên liệu với 60% EtOH (96%)/H₂O ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày, sau đó lọc thu dịch chiết, lặp lại hai lần, rồi gộp các dịch chiết và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết;

(iii) chiết cặn chiết thô thu được lần lượt với *n*-hexan, diclometan và etyl axetat, các dịch chiết hữu cơ được cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho ra các phần chiết tương ứng lần lượt được ký hiệu là phần chiết HT-H, phần chiết HT-D và phần chiết HT-E;

(iv) phân tách sắc ký phần chiết HT-E (21,8 g) trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 µm) với hệ gradient CH₂Cl₂-EtOAc theo tỷ lệ 9:1, 6:1, 3:1, 2:1 và 1:1 (thể tích/thể tích) cho 29 phân đoạn, gộp các phân đoạn có TLC giống nhau và cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho 4 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E1 (bao gồm các phân đoạn 1-4), HT-E2 (bao gồm các phân đoạn 5-14), HT-E3 (bao gồm các phân đoạn 15-22) và HT-E4 (bao gồm các phân đoạn 23-27);

(v) phân tách trên cột sắc ký thường (CC) nhóm phân đoạn HT-E1 trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 µm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-etyl axetat theo tỷ lệ 29:1, 19:1, 12:1, 9:1, 6:1, 3:1, 2:1 và 1:1 (thể tích/thể tích) cho 19 phân đoạn, gộp các phân đoạn có TLC giống nhau cho 8 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E11 (bao gồm các phân đoạn 9-10), HT-E12 (bao gồm các phân đoạn 11-12), HT-E13 (bao gồm các phân đoạn 13-14), HT-E14 (bao gồm các phân đoạn 15-19), HT-E15 (bao gồm các phân đoạn 20-30), HT-E16 (bao gồm các phân đoạn 31-35), HT-E17 (bao gồm các phân đoạn 36-45) và HT-E18 (bao gồm các phân đoạn 46-54), sau đó rửa nhóm phân đoạn HT-E12 bằng etyl axetat cho ra hợp chất (1) dưới dạng bột vô định hình màu trắng, và

(vi) phân tách trên cột sắc ký thường (CC) nhóm phân đoạn HT-E3 trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-etyl axetat theo tỷ lệ 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:5 và diclometan-etyl axetat theo tỷ lệ 1:1, 1:3 và 1:5 (thể tích/thể tích) cho 24 phân đoạn, gộp các phân đoạn có TLC giống nhau cho 7 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E31 (bao gồm phân đoạn 2), HT-E32 (bao gồm các phân đoạn 3-4), HT-E33 (bao gồm các phân đoạn bao gồm các phân đoạn 5-8), HT-E34 (bao gồm các phân đoạn 9-11), HT-E35 (bao gồm các phân đoạn 12-13), HT-E36 (bao gồm các phân đoạn 14-19), HT-E37 (bao gồm các phân đoạn 20-24), sau đó phân tách trên cột sắc ký (CC) nhóm phân đoạn HT-E32 trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm) rồi rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-etyl axetat theo tỷ lệ 2:1 cho ra hợp chất (1) dưới dạng bột vô định hình màu trắng, và phân tách trên cột sắc ký (CC) nhóm phân đoạn HT-E33 trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40-63 μm) rồi rửa giải với hệ dung môi gradient diclometan-etyl axetat theo tỷ lệ 2:1, 1:1 và 1:3 cho ra hợp chất (1) (10 mg) dưới dạng bột vô định hình màu trắng; và

(vii) phân tách trên cột sắc ký thường (CC) nhóm phân đoạn HT-E4 trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-etyl axetat theo tỷ lệ 6:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 và diclometan-etyl axetat theo tỷ lệ 1:1, 1:2, 1:3 và 1:4 (thể tích/thể tích) cho 39 phân đoạn, gộp các phân đoạn có TLC giống nhau cho 7 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E41 (bao gồm các phân đoạn 1-6), HT-E42 (bao gồm các phân đoạn 7-9), HT-E43 (bao gồm các phân đoạn 10-14), HT-E44 (bao gồm các phân đoạn 15-19), HT-E45 (bao gồm các phân đoạn 20-27), HT-E46 (bao gồm các phân đoạn 28-37), HT-E47 (bao gồm các phân đoạn 38-39), sau đó rửa nhóm phân đoạn HT-E43 bằng etyl axetat cho ra hợp chất (1) dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

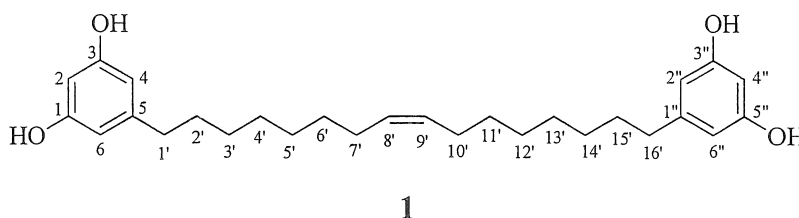
Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ minh họa phương pháp chiết tách hợp chất (8'Z)-1,3-dihydroxy-5-[16'-(3'',5''-dihydroxyphenyl)-8'-hexadecen-1'-yl]benzen (1) từ cây Bàn tay ma (*Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer (Proteaceae)).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết các phương án cụ thể.

Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách hợp chất (8'Z)-1,3-dihydroxy-5-[16'-(3'',5''-dihydroxyphenyl)-8'-hexadecen-1'-yl]benzen (1) có công thức:



Mẫu thân cây Bàn tay ma (*Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer (Proteaceae)) được thu gom, phơi khô, sấy nhẹ trong tủ sấy ở 40 °C rồi nghiền mịn, rồi tiến hành chiết xuất, phân lập, xác định cấu trúc hóa học của hợp chất có mặt phổ biến trong nguyên liệu, xác định hoạt tính sinh học theo các phương pháp được nêu dưới đây.

Phương pháp chiết xuất bao gồm cả việc chọn dung môi, dụng cụ và cách chiết. Một phương pháp chiết xuất thích hợp chỉ có thể được hoạch định khi biết rõ thành phần của các chất cần biết trong cây ra. Mỗi loại hợp chất có độ hòa tan khác nhau trong từng loại dung môi. Vì vậy không thể có một phương pháp chiết xuất chung cho tất cả các dược liệu. Để phân tách các phần chiết và phân lập các hợp chất đã sử dụng các phương pháp chiết hai pha rắn – lỏng, chiết hai pha lỏng – lỏng, các phương pháp sắc ký phân tích như sắc ký lớp mỏng (TLC), các phương pháp sắc ký điều chế như sắc ký cột thường (CC), sắc ký cột nhanh (FC), sắc ký cột tinh chế (Mini-C), sắc ký cột pha đảo (RP-CC) và các phương pháp kết tinh chọn lọc. Phương pháp chung để xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất là kết hợp giữa

việc xác định các thông số vật lý với các phương pháp phổ hiện đại. Tuy nhiên, phương pháp phổ biến nhất là các phương pháp đo phổ như: phổ hồng ngoại (IR), phổ khối (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, HMBC, HSQC, COSY...). Các phương pháp thử hoạt tính bảo vệ gan của hợp chất (1) bao gồm phương pháp thử khả năng ức chế sự peroxyl hóa lipid màng tế bào, phương pháp thử khả năng bảo vệ tế bào gan HepG2 gây độc bởi CCl_4 , phương pháp xác định khả năng ức chế sinh NO trên tế bào RAW 264.7, phương pháp xác định ảnh hưởng của hợp chất (1) đến sự tổng hợp các cytokin interleukin-6, interleukin-10 và TNF-alpha trên tế bào RAW 264.7.

Mẫu bột nguyên liệu thân cây Bàn tay ma (*Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer (Proteaceae)) được ngâm chiết với 60% EtOH (96%)/ H_2O ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày, sau đó lọc thu dịch chiết. Quy trình chiết được lặp lại hai lần. Các dịch chiết được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm. Cặn chiết thô thu được được chiết lần lượt với *n*-hexan, diclometan và etyl axetat. Các dịch chiết hữu cơ được cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho các phần chiết tương ứng. Phần chiết *n*-hexan ký hiệu là HT-H, phần chiết diclometan ký hiệu là HT-D và phần chiết etyl axetat ký hiệu là HT-E.

Phần chiết HT-E (21,8 g) được phân tách sắc ký trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40-63 μm) với hệ gradient CH_2Cl_2 -EtOAc theo tỷ lệ 9:1, 6:1, 3:1, 2:1 và 1:1 (thể tích/thể tích) cho 29 phân đoạn. Các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho 4 nhóm phân đoạn ký hiệu lần lượt là: HT-E1 (bao gồm các phân đoạn 1-4), HT-E2 (bao gồm các phân đoạn 5-14), HT-E3 (bao gồm các phân đoạn 15-22) và HT-E4 (bao gồm các phân đoạn 23-27). Các phân đoạn HT-E1 - HT-E4 qua phân tích TLC đều chứa hợp chất (1). Do đó, tiếp tục tinh chế hợp chất (1) từ các nhóm phân đoạn HT-E1, HT-E3 và HT-E4.

Nhóm phân đoạn HT-E1 được phân tách trên cột sắc ký thường (CC) trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-

ethyl axetat theo tỷ lệ 29:1, 19:1, 12:1, 9:1, 6:1, 3:1, 2:1 và 1:1 (thể tích/thể tích) cho 19 phân đoạn. Các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại cho 8 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E11 (bao gồm các phân đoạn 9-10), HT-E12 (bao gồm các phân đoạn 11-12), HT-E13 (bao gồm các phân đoạn 13-14), HT-E14 (bao gồm các phân đoạn 15-19), HT-E15 (bao gồm các phân đoạn 20-30), HT-E16 (bao gồm các phân đoạn 31-35), HT-E17 (bao gồm các phân đoạn 36-45) và HT-E18 (bao gồm các phân đoạn 46-54). Nhóm phân đoạn HT-E12 được rửa với ethyl axetat cho ra hợp chất (1) dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

Nhóm phân đoạn HT-E3 được phân tách trên cột sắc ký thường (CC) trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:5 và diclometan-ethyl axetat theo tỷ lệ 1:1, 1:3 và 1:5 (thể tích/thể tích) cho 24 phân đoạn. Các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại cho 7 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E31 (bao gồm phân đoạn 2), HT-E32 (bao gồm các phân đoạn 3-4), HT-E33 (bao gồm các phân đoạn 5-8), HT-E34 (bao gồm các phân đoạn 9-11), HT-E35 (bao gồm các phân đoạn 12-13), HT-E36 (bao gồm các phân đoạn 14-19), HT-E37 (bao gồm các phân đoạn 20-24). Nhóm phân đoạn HT-E32 được phân tách trên cột sắc ký (CC) trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ 2:1 cho ra hợp chất (1) dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Nhóm phân đoạn HT-E33 được phân tách trên cột sắc ký (CC) trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40-63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient diclometan-ethyl axetat theo tỷ lệ 2:1, 1:1 và 1:3 cho ra hợp chất (1) dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

Nhóm phân đoạn HT-E4 được phân tách trên cột sắc ký thường (CC) trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ 6:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 và diclometan-ethyl axetat 1:1, 1:2, 1:3 và 1:4 (thể tích/thể tích) cho 39 phân đoạn. Các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại cho 7 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E41 (bao gồm

các phân đoạn 1-6), HT-E42 (bao gồm các phân đoạn 7-9), HT-E43 (bao gồm các phân đoạn 10-14), HT-E44 (bao gồm các phân đoạn 15-19), HT-E45 (bao gồm các phân đoạn 20-27), HT-E46 (bao gồm các phân đoạn 28-37), HT-E47 (bao gồm các phân đoạn 38-39). Nhóm phân đoạn HT-E43 được rửa etyl axetat cho ra hợp chất (1) dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

1. Quy trình chiết tách hợp chất (1)

Nguyên liệu cây Bàn tay ma (*Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer (Proteaceae)) được thu hái tại vùng Tây Bắc, Việt Nam. Mẫu nguyên liệu được phơi khô, sấy tiếp trong tủ sấy ở nhiệt độ 40 °C, sau đó được xay thành bột mịn.

Bột nguyên liệu thân cây Bàn tay ma (*Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer (Proteaceae)) (4,8 kg) được ngâm chiết với 60% EtOH (96%)/H₂O ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày, sau đó lọc thu dịch chiết. Quy trình chiết được lặp lại hai lần. Các dịch chiết được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm. Cặn chiết thô thu được được chiết lần lượt với *n*-hexan, diclometan và etyl axetat. Các dịch chiết hữu cơ được cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho các phần chiết tương ứng *n*-hexan ký hiệu là HT-H (1,27 g), diclometan HT-D (47,1 g) và etyl axetat HT-E (21,8 g).

Phần chiết EtOAc HT-E (21,8 g) được phân tách sắc ký trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 µm) với hệ gradient CH₂Cl₂-EtOAc theo tỷ lệ 9:1, 6:1, 3:1, 2:1 và 1:1 (thể tích/thể tích) cho 29 phân đoạn, mỗi phân đoạn 20 ml. Các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho 4 nhóm phân đoạn: HT-E1 (bao gồm các phân đoạn 1-4), HT-E2 (bao gồm các phân đoạn 5-14), HT-E3 (bao gồm các phân đoạn 15-22) và HT-E4 (bao gồm các phân đoạn 23-27). Khối lượng từng nhóm phân đoạn là HT-E1 (1,37 g), HT-E2 (3,27 g), HT-E3 (3,71 g) và HT-E4 (0,81 g). Các phân đoạn HT-E1 - HT-E4 qua phân tích TLC đều chứa hợp chất (1).

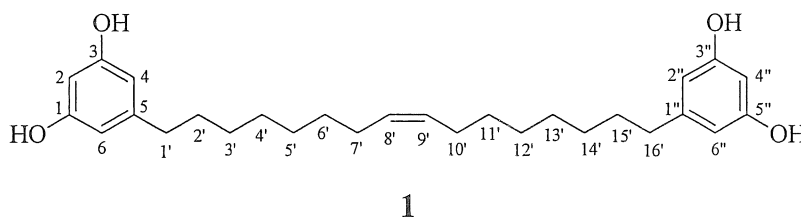
Tinh chế hợp chất (1) từ các phân đoạn HT-E1, HT1-E3, HT-E4 như sau:

Nhóm phân đoạn HT-E1 (1,37 g) được phân tách trên cột sắc ký thường (CC) trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ 29:1, 19:1, 12:1, 9:1, 6:1, 3:1, 2:1 và 1:1 (thể tích/thể tích) cho 19 phân đoạn, mỗi phân đoạn 20 ml. Các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại cho 8 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E11 (bao gồm các phân đoạn 9-10), HT-E12 (bao gồm các phân đoạn 11-12), HT-E13 (bao gồm các phân đoạn 13-14), HT-E14 (bao gồm các phân đoạn 15-19), HT-E15 (bao gồm các phân đoạn 20-30), HT-E16 (bao gồm các phân đoạn 31-35), HT-E17 (bao gồm các phân đoạn 36-45) và HT-E18 (bao gồm các phân đoạn 46-54). Nhóm phân đoạn HT-E12 được rửa với ethyl axetat cho ra hợp chất (1) (8,7 mg) dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

Nhóm phân đoạn HT-E3 (3,7 g) được phân tách trên cột sắc ký thường (CC) trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:5 và diclometan-ethylaxetat theo tỷ lệ 1:1, 1:3 và 1:5 (thể tích/thể tích) cho 24 phân đoạn, mỗi phân đoạn 10 ml. Các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại cho 7 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E31 (bao gồm phân đoạn 2), HT-E32 (bao gồm các phân đoạn 3-4), HT-E33 (bao gồm các phân đoạn 5-8), HT-E34 (bao gồm các phân đoạn 9-11), HT-E35 (bao gồm các phân đoạn 12-13), HT-E36 (bao gồm các phân đoạn 14-19), HT-E37 (bao gồm các phân đoạn 20-24). Nhóm phân đoạn HT-E32 (674,8 mg) được phân tách trên cột sắc ký (CC) trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ 2:1 cho ra hợp chất (1) (10,1 mg) dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Nhóm phân đoạn HT-E33 (100,6 mg) được phân tách trên cột sắc ký (CC) trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient diclometan-ethyl axetat theo tỷ lệ 2:1, 1:1 và 1:3 cho ra hợp chất (1) (10 mg) dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

Nhóm phân đoạn HT-E4 (0,85 g) được phân tách trên cột sắc ký thường (CC) trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ 6:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 và diclometan-ethyl axetat theo tỷ lệ 1:1, 1:2, 1:3 và 1:4 (thể tích/thể tích) cho 39 phân đoạn, mỗi phân đoạn 10 ml. Các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại cho 7 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E41 (bao gồm các phân đoạn 1-6), HT-E42 (bao gồm các phân đoạn 7-9), HT-E43 (bao gồm các phân đoạn 10-14), HT-E44 (bao gồm các phân đoạn 15-19), HT-E45 (bao gồm các phân đoạn 20-27), HT-E46 (bao gồm các phân đoạn 28-37), HT-E47 (bao gồm các phân đoạn 38-39). Nhóm phân đoạn HT-E43 được rửa ethyl axetat cho ra hợp chất (1) (10,1 mg) dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

Hợp chất (1) có công thức:



Hợp chất (1) có tên theo IUPAC là (8'*Z*)-1,3-dihydroxy-5-[16'-(3'',5''-dihydroxyphenyl)-8'-hexadecen-1'-yl]benzen

Các dữ liệu phổ của hợp chất này:

IR (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3305, 1659, 1561, 1595, 1507, 1465.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ (ppm) 1,35 (16H, s br, 2H-3', 2H-4', 2H-5', 2H-6', 2H-11', 2H-12', 2H-13', 2H-14'), 1,58 (4H, t, $J = 7,5$ Hz, 2H-2', 2H-15'), 2,04 (4H, q-like, $J = 5,5$ Hz, 2H-7', 2H-10'), 2,45 (4H, t, $J = 7,5$ Hz, 2H-1', 2H-16'), 5,36 (2H, t, $J = 5,0$ Hz, H-8', H-9'), 6,10 (2H, t, $J = 2,5$ Hz, H-2, H-4''), 6,15 (4H, d, $J = 2,5$ Hz, H-4, H-6, H-2'', H-6'').

^{13}C -NMR (CD_3OD): δ (ppm) 28,1 (CH_2 , C-7', C-10'), 30,2 (CH_2), 30,3 (CH_2), 30,4 (CH_2), 30,8 (CH_2) (C-3', C-4', C-5', C-6', C-11', C-12', C-13', C-14'), 32,4 (CH_2 , C-2', C-15'), 36,97 (CH_2 , C-1', C-16'), 100,9 (C, C-2, C-4''), 107,96 (CH, C-4, C-6, C-2'', C-6''), 130,84 (C-8', C-9'), 146,3 (C-1, C-1''), 159,23 (C, C-3, C-5, C-3'', C-5'').

HR-ESI-MS (negative mode): m/z 439,2852 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (tính toán lý thuyết cho $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_4$: 439,2843).

HR-ESI-MS (positive mode): m/z 441,2999 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết cho $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{O}_4$: 441,2999).

2. Nghiên cứu dược lý

a) Vật liệu và hóa chất

DMEM, FBS của GIBCO, Invitrogen; MTT do Sigma cung cấp. Đĩa 96 giếng nhựa (Corning, USA), pipette (Eppendorf), máy đọc ELISA 96 giếng (Bio-rad). Bộ KIT định lượng Interleukin 6 (IL-6 mouse ELISA Kit), Interleukin 10 (IL-10 mouse ELISA Kit) và Tumor necrosis factor Alpha ($\text{TNF-}\alpha$) do hãng BioVision cung cấp. Dòng tế bào HepG2, RAW 264.7 do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long Island, US và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp.

b) Phương pháp

Phương pháp nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào HepG2, RAW 264.7 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy DMEM với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamin, 10 mM HEPES, và 1,0 mM natri pyruvat, ngoài ra bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (fetal bovine serum) – FBS (GIBCO) và nuôi trong tủ ấm CO_2 ở điều kiện 37°C , 5% CO_2 .

Phương pháp xác định khả năng bảo vệ tế bào gan

Tế bào HepG2 được nuôi trong đĩa 96 giếng với nồng độ tế bào 3×10^4 tế bào/giếng và ủ 24 giờ ở tủ ấm 37°C , 5% CO_2 . Mẫu thí nghiệm được đưa vào các

giếng nuôi cấy ở các nồng độ khác nhau với sự có mặt của CCl_4 40 mM. Sau đó ủ đĩa thêm 2 giờ rồi thêm MTT để xác định tỉ lệ sống sót của tế bào dưới tác động của CCl_4 . Khả năng sinh sống của tế bào dưới tác động của CCl_4 được xác định thông qua phép thử MTT. Sau khi loại bỏ môi trường nuôi cấy, thêm 50 μl MTT (1 mg/ml) vào mỗi giếng. Ủ đĩa ở nhiệt độ 37 °C trong 4 giờ. Màu formazan hình thành được hòa tan bằng DMSO. Đo giá trị OD ở bước sóng 540 nm.

% tế bào sống được xác định theo công thức:

$$\% \text{ tế bào sống} = (\text{OD}_{\text{mẫu thử} + \text{CCl}_4} / \text{OD}_{\text{mẫu chứng}}) \times 100$$

Trong đó $\text{OD}_{\text{mẫu chứng}}$ là OD của giếng tế bào chỉ chứa dung môi pha mẫu.

Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác.

Phương pháp xác định khả năng ức chế sinh NO trên tế bào RAW 264.7

Sự phát triển của tế bào dưới tác động của mẫu thử được xác định bằng phương pháp MTT để từ đó xác định nồng độ trong thử nghiệm ức chế NO: Tế bào RAW 264.7 được nuôi trong đĩa 96 giếng và ủ ở 37 °C qua đêm để tế bào ổn định; Chất thử được thêm vào các giếng ở các nồng độ khác nhau. LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) được thêm vào các giếng sau 2 h ủ mẫu và tiếp tục nuôi cấy trong tủ ẩm CO_2 ; Sau 24 giờ hoặc 48 giờ, tế bào được ủ với 20 μl MTT (5 mg/ml) trong 4 giờ. Sau đó môi trường được loại bỏ và thêm 100 μl DMSO để hòa tan màu formazan được tạo ra; Mật độ quang được xác định bằng máy đo ELISA (BioTek, Winooski, VT, USA) ở bước sóng 540 nm. Tế bào RAW 274.7 được đưa vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 2×10^5 tế bào/giếng và nuôi trong tủ ẩm ở 37 °C và 5% CO_2 trong 24 giờ. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3 giờ. Tế bào sau đó được ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2 giờ trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) trong 24 giờ. Một số giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm. Trong khi đối chứng dương được sử dụng là NG-metyl-L-arginin axetat (L-NMMA) (Sigma) ở các nồng độ 100; 20; 4 và 0,8 $\mu\text{g/ml}$. Nitrit (NO_2^-), được xem

là chỉ thị cho việc tạo NO, sẽ được xác định nhờ bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể là, 100 μ L môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 μ L Griess reagent: 50 μ L của 1% (w/v) sulfanilamit trong 5% (v/v) axit phosphoric và 50 μ L 0,1% (w/v) N-1-naphtyletylendiamin dihydroclorua pha trong nước. Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrit sẽ được đo bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank). Hàm lượng nitrit của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO_2 và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).

Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định nhờ công thức :

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{sample}} / \text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] * 100$$

Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4

Xác định tác động của mẫu thử đến sự tổng hợp các cytokin

Tế bào RAW 264.7 được đưa vào các giếng thí nghiệm của đĩa 96 giếng với lượng tế bào phù hợp (5×10^4 tế bào trong 190 μ L môi trường) và ủ ở 37°C qua đêm cho tế bào ổn định. Chất thử (10 μ L) pha trong DMSO 10% được đưa vào các giếng ở các nồng độ khác nhau. Một số giếng không có chất thử nhưng có tế bào (190 μ L) và 10 μ L DMSO sẽ được sử dụng làm đối chứng âm. Sau 2 giờ thêm LPS với nồng độ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vào tất cả các giếng thí nghiệm. Sau 24 giờ, thu dịch nuôi tế bào đã được thử chất để xác định sự có mặt của interleukin 6, interleukin 10 (IL-10 mouse ELISA Kit) và interferon alpha có trong môi trường nuôi cấy.

Phương pháp xác định interleukin 6, interleukin 10 và $\text{TNF-}\alpha$

Được thực hiện dựa trên IL-6, IL-10, $\text{TNF-}\alpha$ mouse ELISA Kit (BioVision) và theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thêm 100 μ l mẫu thử (môi trường nuôi cấy) vào các giếng thí nghiệm và 100 μ l dung môi làm đối chứng âm. Ủ bản ở 37 °C trong 90 phút. Loại bỏ dịch nổi và thêm 100 μ l kháng thể IL-6, IL-10, TNF- α gắn biotin vào các giếng thí nghiệm. Ủ bản ở 37 °C trong 60 phút. Rửa bản 5 lần bằng PBS 0,01 M, thêm 100 μ l Avidin-Biotin-Peroxidase Complex vào các giếng thí nghiệm. Ủ bản ở 37 °C trong 30 phút. Rửa bản 5 lần bằng PBS 0,01 M, thêm 90 μ l cơ chất TMB vào các giếng thí nghiệm. Ủ bản ở 37 °C, tránh ánh sáng trong 20 - 25 phút. Dừng phản ứng bằng 100 μ l dung dịch làm dừng (stop solution). Đọc kết quả trên máy Tecan GENios Promicroplate reader ở bước sóng 450 nm.

c) Phân tích kết quả

Kết quả được trình bày dưới dạng $TB \pm SD$. Số liệu được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA). Sai khác có ý nghĩa thống kê khi $P < 0,05$.

d) Xác định khả năng chống oxy hóa của mẫu nghiên cứu

Khả năng ức chế sự peroxyl hóa lipid màng tế bào

Hoạt tính chống oxy hóa của mẫu nghiên cứu được xác định bằng phương pháp MDA. Kết quả được thể hiện ở bảng 1 cho thấy mẫu thí nghiệm ức chế nhẹ sự peroxyl hóa lipid ở nồng độ 100 μ g/ml với % ức chế là 19,78%. Mẫu đối chứng Trolox hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

Bảng 1. Khả năng ức chế sự peroxyl hóa lipid

Nồng độ (μ g/ml)	% ức chế tạo MDA	
	Hợp chất (1)	Trolox
100	19,78	73,59
20	7,02	69,14
4	-3,36	51,04
0,8	- 4,06	18,69
IC ₅₀	> 100	6,48 $\pm$ 0,45

Khả năng bảo vệ tế bào gan in vitro dưới tác động của CCl₄

Mẫu nghiên cứu được khảo sát tác động bảo vệ tế bào gan in vitro dưới tác động của CCl₄ sử dụng tế bào HepG2. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Phần trăm tế bào sống dưới tác động của các mẫu nghiên cứu khi có mặt CCl₄

Nồng độ (µg/ml)	% tế bào sống khi không có CCl ₄		% tế bào sống khi có tác động của CCl ₄	
	Hợp chất (1)	Đối chứng	Hợp chất (1)	Đối chứng
100	99,56		44,42*	
20	101,22		31,41	
4	103,99		30,30	
0,8	101,88		29,38	
0		100,00		29,93

Ghi chú: * là sai khác có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$

Qua bảng trên các tác giả sáng chế nhận thấy dưới tác động của CCl₄, chỉ có 29,93% tế bào HepG2 sống sót. Tuy nhiên khi có mặt của mẫu thử hợp chất (1), tỉ lệ tế bào HepG2 sống tăng cao ở nồng độ 100 (µg/ml) đến 44,42% ($P < 0,05$). Khi nồng độ mẫu thí nghiệm thấp hơn 20 µg/ml thì hoạt tính bảo vệ tế bào gan của hợp chất (1) giảm mạnh và không thể hiện sự sai khác so với đối chứng không ủ mẫu. Như vậy, kết quả từ bảng trên cho thấy mẫu nghiên cứu có thể hiện khả năng bảo vệ, phòng ngừa sự ức chế tăng trưởng tế bào do CCl₄ gây ra.

e) Hoạt tính ức chế NO của mẫu nghiên cứu

Bảng 3. Tác động của mẫu nghiên cứu đến khả năng sản sinh NO

Nồng độ (µg/ml)	% ức chế sản sinh NO			
	Hợp chất (1)		L-NMMA	
	% ức chế	% tế bào sống	% ức chế	% tế bào sống
100	71,12	62,83	93,55	87,95
20	12,73	99,87	79,61	98,79
4	1,75		39,33	
0,8	-1,43		6,23	
IC ₅₀	71,15 ± 6,66		7,07 ± 0,81	

Qua bảng trên, nhận thấy hợp chất (1) có khả năng ức chế sự sản sinh NO với $IC_{50} = 71,15 \pm 6,66 \mu\text{g/ml}$. Chất đối chứng L-NMMA hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

f) Tác động của mẫu thử đến nồng độ cytokin

Bảng 4. Tác động của hợp chất (1) đến nồng độ cytokin tại các thời điểm khác nhau

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Hàm lượng cytokin (pg/ml) ở 24 giờ			Hàm lượng cytokin (pg/ml) ở 48 giờ		
	IL-6	IL-10	TNF- α	IL-6	IL-10	TNF- α
20	126,26	204,84*	417,12*	85,86*	414,34*	501,19*
4	90,91	198,63	516,72	176,77	270,02*	647,39
0,8	101,01	158,29	523,12	154,04	237,43	689,42
LPS	103,54	152,08	568,80	171,72	218,81	714,09

Ghi chú: * là sai khác có ý nghĩa thống kê với $P < 0.05$

Do nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ gây ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào RAW 264.7 nên nồng độ được sử dụng để xác định tác động của mẫu thí nghiệm đến sự sản sinh các cytokin là 20,4 và 0,8 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Qua bảng trên nhận thấy:

Tại thời điểm 24 giờ, mẫu hợp chất (1) kích thích nhẹ sự tăng sinh của IL-6 ở nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$. Tuy nhiên sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê. Tại thời điểm 48 giờ, hàm lượng IL-6 ở giếng tế bào được ủ mẫu hợp chất (1) (20 $\mu\text{g/ml}$) giảm mạnh so với đối chứng không ủ mẫu ($P < 0,05$). Kết quả này cho thấy mẫu hợp chất (1) có khả năng ức chế sản sinh IL-6 ở thời điểm 48 giờ.

Hàm lượng IL-10 ở giếng tế bào được ủ với hợp chất (1) tại nồng độ 20 và 4 $\mu\text{g/ml}$ đều cao hơn so với đối chứng ở cả 2 thời điểm 24 và 48 giờ. Kết quả này cho thấy mẫu hợp chất (1) kích thích tế bào RAW 264.7 tổng hợp IL-10.

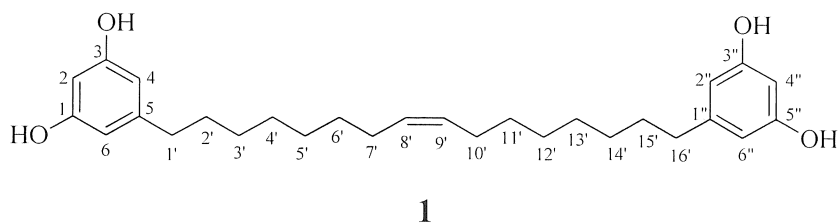
Mẫu hợp chất (1) cũng thể hiện khả năng ức chế sinh tổng hợp TNF- α ở cả hai thời điểm 24 và 48 giờ.

Những lợi ích có thể đạt được

Cho đến nay chưa có báo cáo về hóa thực vật và tính chất sinh học của cây Bàn tay ma *H. terminalis*. Nghiên cứu đầu tiên của các tác giả sáng chế về *H. terminalis* cho thấy sự hiện diện của các hợp chất thuộc các nhóm triterpenoit, steroid, axit béo và bisresorcinol, (8'*Z*)-1,3-dihydroxy-5-[16'-(3'',5''-dihydroxyphenyl)-8'-hexadecen-1'-yl] benzen là thành phần có mặt phổ biến nhất trong các phân đoạn chiết xuất hữu cơ (diclometan và etyl axetat) từ thân cây Bàn tay ma *H. terminalis*. Các hoạt tính bảo vệ gan của hợp chất (1) bao gồm tác dụng ức chế sự peroxyl hóa lipid màng tế bào, tác dụng bảo vệ tế bào gan HepG2 gây độc bởi CCl₄, tác dụng ức chế sự sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7, xác định ảnh hưởng của hợp chất (1) đến sự tổng hợp các cytokin interleukin-6, interleukin-10 và TNF-alpha trên tế bào RAW 264.7 đã được thực hiện để tìm hiểu tương quan giữa tiềm năng dược lý của hợp chất (8'*Z*)-1,3-dihydroxy-5-[16'-(3'',5''-dihydroxyphenyl)-8'-hexadecen-1'-yl] benzen và tác dụng bảo vệ gan của vỏ cây Bàn tay ma *H. terminalis*. Nghiên cứu này tạo cơ sở nghiên cứu khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các thuốc có tác dụng điều trị bệnh gan và lợi mật hữu hiệu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp chiết tách hợp chất (8'*Z*)-1,3-dihydroxy-5-[16'-(3'',5''-dihydroxyphenyl)-8'-hexadecen-1'-yl]benzen (1):



từ thân cây Bàn tay ma (*Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer (Proteaceae)) bao gồm các bước:

(i) thu gom nguyên liệu thân cây Bàn tay ma (*Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer (Proteaceae)), phơi khô, sấy nhẹ trong tủ sấy ở nhiệt độ 40 °C rồi nghiền mịn thành bột;

(ii) ngâm chiết bột nguyên liệu với 60% EtOH (96%)/H₂O ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày, sau đó lọc thu dịch chiết, lặp lại hai lần, rồi gộp các dịch chiết và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết;

(iii) chiết cặn chiết thô thu được lần lượt với *n*-hexan, diclometan và etyl axetat, các dịch chiết hữu cơ được cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho ra các phần chiết tương ứng lần lượt được ký hiệu là phần chiết HT-H, phần chiết HT-D và etyl axetat phần chiết HT-E;

(iv) phân tách sắc ký phần chiết HT-E (21,8 g) trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm) với hệ gradient CH₂Cl₂-EtOAc theo tỷ lệ 9:1, 6:1, 3:1, 2:1 và 1:1 (thể tích/thể tích) cho 29 phân đoạn, gộp các phân đoạn có TLC giống nhau và cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho 4 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E1 (bao gồm các phân đoạn 1-4), HT-E2 (bao gồm các phân đoạn 5-14), HT-E3 (bao gồm các phân đoạn 15-22) và HT-E4 (bao gồm các phân đoạn 23-27);

(v) phân tách trên cột sắc ký thường (CC) nhóm phân đoạn HT-E1 trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ 29:1, 19:1, 12:1, 9:1, 6:1, 3:1, 2:1 và 1:1 (thể tích/thể tích) cho 19 phân đoạn, gộp các phân đoạn có TLC giống nhau cho 8 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E11 (bao gồm các phân đoạn 9-10), HT-E12 (bao gồm các phân đoạn 11-12), HT-E13 (bao gồm các phân đoạn 13-14), HT-E14 (bao gồm các phân đoạn 15-19), HT-E15 (bao gồm các phân đoạn 20-30), HT-E16 (bao gồm các phân đoạn 31-35), HT-E17 (bao gồm các phân đoạn 36-45) và HT-E18 (bao gồm các phân đoạn 46-54), sau đó rửa nhóm phân đoạn HT-E12 bằng etyl axetat cho ra hợp chất (1) dưới dạng bột vô định hình màu trắng, và

(vi) phân tách trên cột sắc ký thường (CC) nhóm phân đoạn HT-E3 trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:5 và diclometan-ethylaxetat theo tỷ lệ 1:1, 1:3 và 1:5 (thể tích/thể tích) cho 24 phân đoạn, gộp các phân đoạn có TLC giống nhau cho 7 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E31 (bao gồm phân đoạn 2), HT-E32 (bao gồm các phân đoạn 3-4), HT-E33 (bao gồm các phân đoạn bao gồm các phân đoạn 5-8), HT-E34 (bao gồm các phân đoạn 9-11), HT-E35 (bao gồm các phân đoạn 12-13), HT-E36 (bao gồm các phân đoạn 14-19), HT-E37 (bao gồm các phân đoạn 20-24), sau đó phân tách trên cột sắc ký (CC) nhóm phân đoạn HT-E32 trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm) rồi rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ 2:1 cho ra hợp chất (1) dưới dạng bột vô định hình màu trắng, và phân tách trên cột sắc ký (CC) nhóm phân đoạn HT-E33 trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm) rồi rửa giải với hệ dung môi gradient diclometan-ethyl axetat theo tỷ lệ 2:1, 1:1 và 1:3 cho ra hợp chất (1) (10 mg) dưới dạng bột vô định hình màu trắng; và

(vii) phân tách trên cột sắc ký thường (CC) nhóm phân đoạn HT-E4 trên silica gel (Merck, cỡ hạt 40 – 63 μm), rửa giải với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethyl axetat theo tỷ lệ 6:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 và diclometan-ethyl axetat theo tỷ lệ 1:1, 1:2, 1:3 và 1:4 (thể tích/thể tích) cho 39 phân đoạn, gộp các phân đoạn có TLC giống nhau cho 7 nhóm phân đoạn được ký hiệu là: HT-E41 (bao gồm các phân đoạn 1-6), HT-E42 (bao gồm các phân đoạn 7-9), HT-E43 (bao gồm các phân đoạn 10-14), HT-E44 (bao gồm các phân đoạn 15-19), HT-E45 (bao gồm các phân đoạn 20-27), HT-E46 (bao gồm các phân đoạn 28-37), HT-E47 (bao gồm các phân đoạn 38-39), sau đó rửa nhóm phân đoạn HT-E43 bằng ethyl axetat cho ra hợp chất (1) dưới dạng bột vô định hình màu trắng.

Hình 1: Phương pháp chiết tách hợp chất (8'*Z*)-1,3-dihydroxy-5-[16'-(3'',5''-dihydroxyphenyl)-8'-hexadecen-1'-yl]benzen (**1**) từ cây Bàn tay ma (*Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer (Proteaceae))

