



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

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**



**2-0002643**

(51)<sup>7</sup> **A61K 31/35; C07D 311/62 (13) Y**

- 
- (21) 2-2018-00020 (22) 12/01/2018  
(45) 25/06/2021 399 (43) 25/07/2019 376A  
(73) 1. Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam (VN)  
Số 2, Phạm Ngũ Lão, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội  
2. Trung tâm Hóa dược - Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam (VN)  
Km 10.5 Đường Hà Nội-Sơn Tây, Phúc Diễn, quận Bắc Từ Liêm, thành phố Hà Nội  
(72) Nguyễn Quốc Đạt (VN); Trần Bạch Dương (VN); Phạm Thị Thanh Hiếu (VN);  
Nguyễn Thị Hoa (VN); Nguyễn Thanh Hằng (VN); Lê Anh Thư (VN); Tạ Thị Sơn  
Đông (VN); Trương Thị Tố Chinh (VN); Đặng Thị Bích Hồng (VN); Nguyễn Thị  
Tuyệt Lan (VN).

---

(54) **QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ DẪN XUẤT AXETYL CỦA CATECHIN CHÈ XANH**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế dẫn xuất axetyl của catechin chè xanh như EC và EGC, bao gồm các bước sau:

(i) thực hiện phản ứng axetyl hóa catechin bằng cách sử dụng anhydrit axetic là tác nhân axetyl hóa với tỷ lệ catechin(mol)/anhydrit axetic(mol) là 1:6, ở các điều kiện phản ứng trong môi trường lạnh (0-5°C) trong 30 phút và sau đó để ở nhiệt độ phòng (20°C) trong 24 giờ, tránh ánh sáng và không khí; và

(ii) tinh chế sản phẩm thu được ở bước (i) bằng sắc ký cột nhanh: pha tĩnh là silicagel, pha động sắc ký là CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> gradien từ 0% đến 10% metanol theo thể tích, các phân đoạn chứa 3-axetyl EC, 4-axetyl EC, 5-axetyl EGC được cô loại kiệt dung môi và tiếp tục được tinh chế trên sắc ký cột nhanh bằng hệ dung môi EtOAc/n-hec-xan 20% đến 50% EtOAc theo thể tích, sau đó các phân đoạn chứa chất tinh khiết được loại kiệt dung môi ở nhiệt độ 55°C, áp suất 0,4Pa để thu được dẫn xuất axetyl của catechin.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế dẫn xuất axetyl của catechin chè xanh, cụ thể là epicatechin (EC) và epigallocatechin (EGC).

### Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Chè xanh từ lâu đã được biết đến với nhiều tác dụng tích cực đối với sức khỏe của con người, cùng với sự phát triển của khoa học và công nghệ các thành phần hữu ích trong chè xanh như các hợp chất catechin đã và đang được nghiên cứu ngày một nhiều để làm sáng tỏ hơn về mặt cấu trúc cũng như các tác dụng dược lý và hoạt tính sinh học của chúng. Tuy nhiên, với hoạt tính chống oxy hóa quá mạnh khiến các catechin này dễ bị phân hủy, làm giới hạn tác dụng của nó.

Nghiên cứu của Sandeep Vyas (*Sandeep Vyas, Manu Shama, Pritam D Sharma, Tej VSingh. Design, semisynthesis, evaluation O-acyl EGCG as antitumor agents. J Agric Food Chem, 55 (15), pp 6319 – 6324, (2007)*) chỉ ra rằng EGCG được hấp thụ yếu trong cơ thể chuột và người do trạng thái tự nhiên không bền trong môi trường trung tính và kiềm. Khi pH ở trong ruột và chất dịch do cơ thể tiết ra là trung tính hoặc kiềm nhẹ, hoạt tính sinh học của EGCG giảm rõ rệt trong cơ thể sống.

Nghiên cứu của Sano (*Sano M, Suzuki M, Miyase T, et al. Novel anti-allergic catechin derivatives isolated from oolong tea. J Agric Food Chem, 47 (5), 1906-1910, (1999)*) phát hiện EGCG sau khi tiến hành metyl hóa thành một số dẫn xuất, khả năng sử dụng được nâng cao rõ rệt, hơn nữa trên một số phương diện có hoạt tính còn mạnh hơn EGCG, ví dụ, dẫn xuất metyl của catechin có hoạt tính chống dị ứng cao hơn.

Lanis-Piwowar (*Lanis-Piwowar K R, Huo Congde, Chen Di, et al. A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate as a potential anticancer agent. Cancer Research, 67(9), 4303-43 10,(2007)*) chứng minh dẫn xuất axetyl của catechin có hoạt tính ức chế protein mạnh hơn.

Moon Y H (*Moon Y H, Lee J H, Ahn J S, et al. Synthesis, structure analyses, and characterization of novel epigallocatechin gallate (EGCG) glycosides using the glucansucrase from Leuconostoc mesenteroides B-1299CB]. J Agric Food Chem, 54(4),*

1230-1237, (2006)) chứng minh dẫn xuất glycosyl của catechin có hoạt tính chống nâu hóa (anti-browning) mạnh hơn.

James Hadley Bridson (*Derivatisation of polyphenols. Research commons at the University of Waikato, trang 13, và dòng 24-30 trang 33(2007)*) thực hiện phản ứng axetyl hóa catechin bằng anhydrit axetic có sử dụng xúc tác pyridin, 1-metyl imidazol là những hóa chất độc hại.

Bibigul T.Utenova (*Bibigul T.Utenova, Karl E.Malterud and Frode Rise. Antioxidant activity of O-protected derivatives of EGCG inhibition of soybean and rabbit 15-lipoxygenases. Issue in Honor of Prof.Berhanu Abegaz, AKIVOC, ix, 6-16, (2007)*) cũng thực hiện phản ứng axetyl hóa catechin bằng anhydrit axetic có sử dụng chất xúc tác độc hại là N,N- dimetyl amino pyridin.

### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Mục đích của giải pháp hữu ích là nhằm đưa ra một quy trình điều chế dẫn xuất axetyl của catechin, khiến nó trở nên bền vững hơn ở điều kiện thường, làm khả năng ứng dụng của nó được tăng lên, mà không phải sử dụng các hóa chất độc hại như các phương pháp đã biết nêu trên.

Để đạt được mục đích này, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình axetyl hóa catechin chè xanh để tạo ra các dẫn xuất axetyl EC, axetyl EGC, bằng cách thực hiện phản ứng axetyl hóa epi-catechin, epi-gallocatechin sử dụng anhydrit axetic làm tác nhân axetyl hóa với các điều kiện phản ứng đơn giản, dễ thực hiện không sử dụng những hóa chất độc hại như như pyridin; N,N- dimetyl amino pyridin. Đây là ưu điểm lớn của phản ứng này.

Cụ thể là, quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm 2 bước:

Bước 1: Thực hiện phản ứng axetyl hóa catechin chè xanh trong điều kiện nhiệt độ 0-5°C, tránh không khí và ánh sáng.

Bước 2: Tinh chế sản phẩm trên sắc ký cột nhanh, lần một với hệ dung môi là CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> gradien từ 0% đến 10% metanol theo thể tích. Lần 2 bằng hệ dung môi EtOAc/n-hecxa 20% đến 50% EtOAc theo thể tích.

### Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình điều chế dẫn xuất axetyl của catechin chè xanh đi từ nguyên liệu đầu là Epi-catechin (EC), Epi-gallocatechin (EGC), là các hợp chất được tách và tinh chế từ polyphenol chè xanh sử dụng cột sắc ký (D 100mm × L 800mm) pha tĩnh là Sephadex LH 20, pha động là etanol/nước – 95 : 5 (v/v).

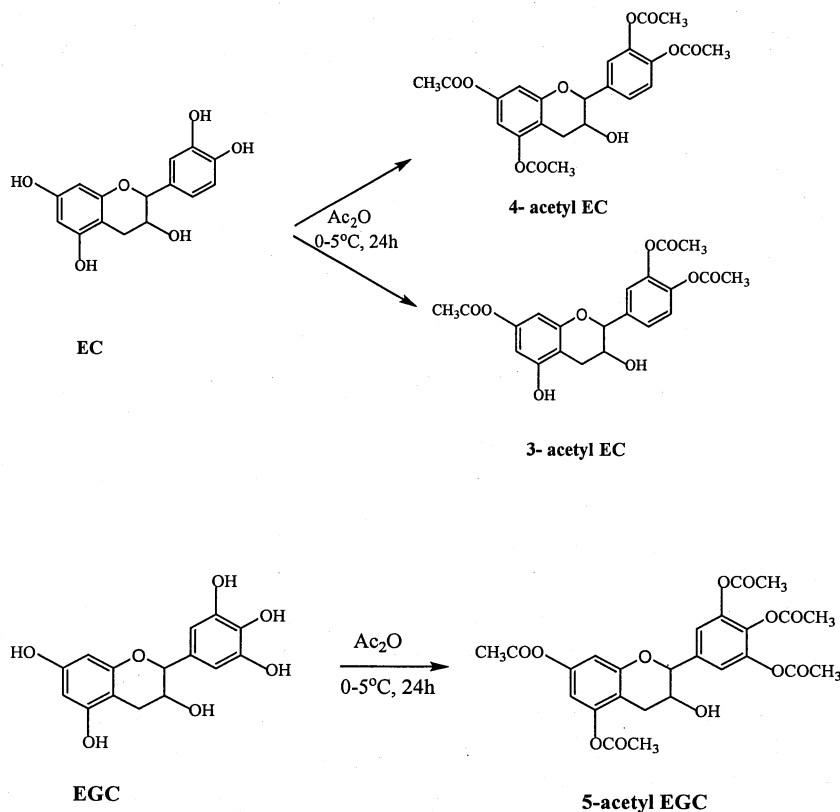
Cụ thể, quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

#### Bước 1: Thực hiện phản ứng axetyl hóa các catechin EC và EGC

EC và EGC được axetyl hóa bằng anhydrit axetic (với tỷ lệ catechin(mol)/anhydrit axetic(mol) là 1:6) trong môi trường lạnh (0-5°C) 30 phút và sau đó để ở nhiệt độ phòng (20°C) 24 giờ, tránh ánh sáng và không khí. Dịch phản ứng được kiểm tra thường xuyên bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng cho đến khi các catechin bị axetyl hóa hoàn toàn.

Sản phẩm phản ứng được chiết bằng dung môi etyl axetat và được rửa lại nhiều lần bằng nước đến khi hết axit. Sau đó được làm khan bằng Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> khan. Lọc thu dịch và loại kiệt dung môi ở nhiệt độ 50°C, áp suất 0,4Pa, thu được sản phẩm thô.

Sơ đồ phản ứng được thể hiện dưới đây:



*Bước 2: Tách và tinh chế sản phẩm trên cột sắc ký*

Sản phẩm phản ứng được tách và tinh chế bằng sắc ký cột nhanh. Cột tách cao từ 100 - 200 mm; đường kính trong 10mm, được nhồi pha tĩnh sắc ký là Silica gel. Sử dụng khí nén với áp lực từ 0,2 đến 0,3Pa để đẩy dung môi chạy qua cột sắc ký. Tốc độ rửa giải từ 1 - 1,5 ml/phút.

Pha động sắc ký là  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$  gradien từ 0 % đến 10 % metanol theo thể tích. Các phân đoạn chứa các hợp chất 3-axetyl EC, 4-axetyl EC, 5-axetyl EGC được cô loại kiệt dung môi và tiếp tục được tinh chế trên sắc ký cột nhanh bằng hệ dung môi EtOAc/n-hec-xan 20% đến 50% EtOAc theo thể tích. Sau đó các phân đoạn chứa chất tinh khiết được loại kiệt dung môi ở nhiệt độ  $55^\circ\text{C}$ , áp suất 0,4Pa thu sản phẩm.

**Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích***Bước 1: Thực hiện phản ứng axetyl hóa các catechin EC và EGC*

Lấy 2mmol (0,58g EC hoặc 0,612g EGC) và 1,2ml (~12mmol) anhydrit axetic vào bình phản ứng 10ml, nút kín lại. Siêu âm hỗn hợp trong nước đá 30 phút để hỗn hợp tan hoàn toàn. Sau đó để bình phản ứng trong bóng tối, quá trình phản ứng được theo dõi bằng phương pháp phân tích sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi triển khai  $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$  (9:1; v:v), hiện màu bằng thuốc hiện Von's. Phản ứng kết thúc sau 24 giờ.

Chiết sản phẩm phản ứng 3 lần bằng dung môi etyl axetat, lớp dung môi này được rửa lại nhiều lần bằng nước đến khi hết axit. Sau đó được làm khan bằng  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  khan. Lọc thu dịch và loại kiệt dung môi ở nhiệt độ  $50^\circ\text{C}$ , áp suất 0,4Pa, thu được sản phẩm thô.

*Bước 2: Tách và tinh chế sản phẩm trên cột sắc ký*

Các sản phẩm phản ứng được tách và tinh chế bằng sắc ký cột nhanh. Cột tách cao từ 150mm; đường kính trong 10mm, được nhồi pha tĩnh sắc ký là Silica gel. Sử dụng khí nén với áp lực từ 0,2 Pa để đẩy dung môi chạy qua cột sắc ký. Tốc độ rửa giải từ 1 - 1,5 ml/phút.

+ Phân đoạn chứa chất 4-axetyl EC được rửa giải ra ở pha động sắc ký là  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$  gradien từ 0 % đến 5 % metanol theo thể tích. Sau đó phân đoạn chất

này được cô loại kiệt dung môi và tinh chế lại với hệ pha động n-hexan/EtOAc - 2 : 1 (v/v). Phân đoạn chứa 4-axetyl EC tinh khiết được loại kiệt dung môi ở nhiệt độ 55°C, áp suất 0,4Pa . 4-axetyl EC thu được ở dạng bột, màu trắng.

+ Phân đoạn chứa chất 3-axetyl EC được rửa giải ra ở pha động sắc ký là CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> gradien từ 5 % đến 10 % metanol theo thể tích. Sau đó phân đoạn chất này được cô loại kiệt dung môi và được tinh chế lại với hệ pha động n-hexan/EtOAc - 1 : 1 (v/v). Phân đoạn chứa 3-axetyl EC tinh khiết được loại kiệt dung môi ở nhiệt độ 55°C, áp suất 0,4Pa. 3-axetyl EC thu được ở dạng bột, màu trắng.

+ Phân đoạn chứa chất 5-axetyl EGC được rửa giải ra ở pha động sắc ký là CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> gradien từ 0% đến 5% metanol theo thể tích. Sau đó phân đoạn chất này được cô loại kiệt dung môi và được tinh chế lại với hệ pha động n-hexan/EtOAc - 2 : 1 (v/v). Phân đoạn chứa 5-axetyl EGC tinh khiết được loại kiệt dung môi ở nhiệt độ 55°C, áp suất 0,4Pa. 5-axetyl EGC thu được ở dạng bột, màu trắng.

#### **Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

So với các quy trình đã biết, quy trình điều chế dẫn xuất axetyl của catechin chè xanh EC và EGC được thực hiện với những điều kiện phản ứng đơn giản, dễ thực hiện. Hóa chất sử dụng an toàn, dễ kiếm. Không sử dụng những hóa chất độc hại như pyridin, N,N- dimetyl amino pyridin. Đây là ưu điểm lớn của phản ứng này.

Các chất sau khi tinh chế được ghi phổ và xác định cấu trúc trên cơ sở dữ liệu của ESI-MS và NMR. Kháng định phản ứng axetyl hóa đã thực hiện thành công.

Nhóm OH- C3 được bảo toàn trong phản ứng axetyl hóa EC và EGC ở điều kiện 0-5°C, điều này có thể ảnh hưởng bởi sự che chắn không gian của 2 vòng benzen đã làm cho nhóm OH- C3 được “bao bọc” tốt hơn trước tác nhân axetyl này, thêm vào đó nhóm OH gắn với Csp<sup>3</sup> nên ít chịu ảnh hưởng trực tiếp của hiệu ứng liên hợp với vòng benzen, làm giảm độ linh động.

Hoạt tính chống oxy hóa của các dẫn xuất này giảm đi 5-10 lần so với các catechin ban đầu, nhưng vẫn khá cao khiến nó trở nên bền vững hơn trong những điều kiện thường, làm khả năng ứng dụng của nó tăng lên.

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Quy trình điều chế dẫn xuất axetyl của catechin chè xanh, bao gồm các bước sau:

(i) thực hiện phản ứng axetyl hóa catechin bằng cách sử dụng anhydrit axetic là tác nhân axetyl hóa với tỷ lệ catechin (mol)/anhydrit axetic (mol) là 1:6 ở các điều kiện phản ứng trong môi trường lạnh (0-5°C) trong 30 phút và sau đó để ở nhiệt độ phòng (20°C) trong 24 giờ, tránh ánh sáng và không khí; và

(ii) tinh chế sản phẩm thu được ở bước (i) bằng sắc ký cột nhanh: pha tĩnh là silicagel, pha động sắc ký là CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> gradien từ 0% đến 10% metanol theo thể tích, các phân đoạn chứa chất 3-axetyl catechin, 4-axetyl catechin, 5-axetyl catechin được cô loại kiệt dung môi và tiếp tục được tinh chế trên sắc ký cột nhanh bằng hệ dung môi EtOAc/n-hec-xan 20% đến 50% EtOAc theo thể tích, sau đó các phân đoạn chứa chất tinh khiết được loại kiệt dung môi ở nhiệt độ 55°C, áp suất 0,4Pa để thu được dẫn xuất axetyl của catechin.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó catechin này là epicatechin (EC) hoặc epigallocatechin (EGC), và các phân đoạn chứa 3-axetyl EC, 4-axetyl EC, 5-axetyl EGC được cô loại kiệt dung môi trên sắc ký cột nhanh với pha tĩnh là silicagel, pha động sắc ký là CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> gradien từ 0% đến 10% metanol theo thể tích.