



(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)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003046

(51) **A61K 35/616; B01D 11/02**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00249

(22) 17/12/2015

(67) 1-2015-04829

(45) 27/02/2023 419

(43) 26/06/2017 351A

(73) Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
02A Hùng Vương, thành phố Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa

(72) Bùi Minh Lý (VN); Trần Thị Thanh Vân (VN); Võ Mai Như Hiếu (VN); Mischenko Natalia Petrovna (RU); Fedoreev Sergey Alecsandrovich (RU); Vasilieva Elena Andreevna (RU); Stonik Valentin Aronovich (RU).

(74) Công ty TNHH Tư vấn sở hữu trí tuệ Việt (VIET IP CO.,LTD.)

(54) QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT HỖN HỢP HOẠT CHẤT CHỐNG OXY HÓA TỪ LOÀI NHÍM BIỂN

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa từ loài nhím biển như *Astropyga radiatay*, *Diadema savigny*, *D. setosum*, *Echinotrix diadema*, *Ech. calamaris*, *Toxopneustes pileolus*, *Stomopneustes variolaris*, *Tripneustes gratilla* và *Phyllacanthus imperialis* bằng cồn etylic 96% và H₂SO₄10%.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực hóa học, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa từ loài nhím biển.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Tất cả khuyết tật xuất hiện trong cơ thể con người như các quá trình lão hóa cơ thể, đục nhãn tinh thể, huyết khối, nhồi máu cơ tim và các bệnh khác đều có liên quan tới sự hiện diện của các dạng oxy hoạt động (ROS, reactive oxygen species). Vì vậy, không có sự tồn tại hay cơ thể khỏe mạnh nếu không có hệ thống sinh học bảo vệ tốt bằng chất chống oxy hóa.

Các polyhydroxynaptoquinon (PHNQ) như echinochrom A (Ech A), spinochrom (Sp E, Sp D, Sp A, Sp C) và binaptoquinon BiNQ-1, BiNQ-2, có khả năng thể hiện rõ các tính chất chống oxy hóa, là thành phần quý hiếm quan trọng có mặt trong vỏ và gai của loài nhím biển [Lebedev AV et al., 2008; Kuwahara R. et al., 2009]. Khác với các chất chống oxy hóa nội sinh như vitamin E và ubiquinon, PHNQ có khả năng vô hiệu hóa tác dụng của các tác nhân khơi mào quá trình oxy hóa phi enzym của các lipit màng tế bào, cụ thể là các cation sắt tích tụ trong mô đã bị tổn thương do đột quy. Tính chất đặc thù về cơ chế tác dụng của các PHNQ đã làm nổi bật vai trò của chúng như một chất chống oxy hóa tự nhiên hàng đầu và mở ra triển vọng sử dụng chúng làm chất phụ gia thực phẩm và dược phẩm hoạt tính cao cũng như sản xuất các chế phẩm chữa bệnh thể hệ mới.

Hiện nay tồn tại một số chế phẩm phòng ngừa và điều trị các bệnh tim mạch trong đó chứa tổ hợp các chất hoạt tính sinh học (HTSH) từ bộ phận sinh dục của nhím biển *Strongylocentrotus droebachiensis* (xem patent RU 2520695 C1). Trên cơ sở dịch chiết từ các loài nhím biển (*Scaphechinus mirabilis*) đã điều chế được các chất phụ gia HTSH, trong đó chứa 0,75 – 0,85% echinochrom A (xem patent RU 2340216 C1), và chất phụ gia HTSH “Timarin” được điều chế trên cơ sở echinochrom A thêm axit ascorbic (xem patent RU 2337696 C1). Cả hai bổ sung chất HTSH đều thể hiện tác dụng hạ lipit máu và chống oxy hóa.

Được biết, chất tạo màu thực phẩm là tổng các chất màu quinonoit được tách chiết từ vỏ, gai và nội tạng của loài nhím biển *Strongylocentrotus nudus* hoặc *Strongylocentrotus intermedius*, được bọc trong một bao làm từ vật liệu có nguồn gốc thực phẩm. Phương pháp thu nhận bao gồm các công đoạn: phân hủy vỏ, gai và nội tạng nhím biển bằng axit, lọc lấy dung dịch và chiết bằng ete, rửa, sấy và sau đó làm giàu các chất màu thu được rồi bọc chúng trong một bao liposom được làm từ phospholipit đậu tương ổn định bằng alpha-tocopherol và cholesterol (xem RU 2004124260 A, công bố ngày 27.01.2006).

Tại Liên bang Nga, chế phẩm chống oxy hóa Histochrome® đã được đăng ký bảo hộ Sáng chế. Chế phẩm này chứa chất HTSH là muối natri của pentahydroxyetylnaptoquinon (echinochrom A) với nồng độ 0,2 mg/ml. Chế phẩm này được sử dụng để điều trị các bệnh liên quan đến rối loạn trao đổi chất, các quá trình viêm giác mạc, mạch máu mắt, cải thiện dinh dưỡng, giảm thiểu phù nề, hỗ trợ quá trình lên da non và nhiều bệnh khác về mắt. (xem RU 2134107 công bố ngày 10.08.1999; EP 1121929 (A1) công bố ngày 08.08.2001).

Chế phẩm bảo vệ tim hoạt tính cao Histochrome®, chứa muối natri của pentahydroxyetylnaptoquinon 10 mg/ml, có khả năng giảm vùng hoại thư tới 57% ở những bệnh nhân trụ tim nặng, phục hồi khả năng co bóp, chống loạn nhịp, tác dụng có lợi cho quá trình điều trị lâm sàng, giảm nguy cơ đột quỵ (xem RU 2137472, công bố ngày 20.09.1999; EP 1121930 (A1), công bố ngày 08.08. 2001).

Được biết một phương pháp thu nhận Spinochrom A từ vỏ và gai loài nhím biển *Strongylocentrotus nudus* gồm các công đoạn: xử lý nguyên liệu bằng cồn etylic, vô cơ hóa vỏ và gai bằng dung dịch 20 % axit phosphoric, lọc, làm sạch bằng sắc ký trong đó sử dụng chất hấp phụ polychrom 1 (polytetrafloretyleen), rửa giải các chất màu bằng hỗn hợp nước-cồn, làm giàu và sấy sản phẩm, hòa tan trở lại vào nước, kết tủa các thành phần protein bằng cồn etylic, tách sắc ký spinochrom A trên cột Sephadex LH-20 và tái kết tinh trong axeton (xem RU 2362573 C1).

Gần hơn cả về bản chất kỹ thuật so với phương pháp đề xuất là phương pháp thu nhận chế phẩm có tính năng chống viêm nhiễm và chống dị ứng, trên cơ sở hỗn hợp chứa tổ hợp khoáng-màu từ vỏ nhím biển *Strongylocentrotus droebachiensis* (0,05-2,0 %). Chế

phẩm này chứa spinochrom B, D, các dime PHNQ và các khoáng (Ca, Mg, P, Na, K) dưới dạng muối tan (xem RU 2488402 C1).

Tại Việt Nam ước tính có đến 60 loài nhím biển phân bố tại vùng biển từ Bắc đến Nam, đặc biệt tại vùng nước ấm từ Quảng Ngãi đến Bình Thuận có sản lượng cao hơn các vùng biển khác của Việt Nam. Trong số 60 loài thì có 04 loài phân bố phổ biến có kích thước lớn và có thể khai thác và nuôi nhân tạo được là *Echinothrix calamaris*, *Echinothrix sp*, *Diadema setosum*, *Tripneustes gratilla*. Các nghiên cứu ban đầu cho thấy chất màu chiết từ vỏ và gai của 04 loài nhím biển này đều có chứa echinochrom [Natalya P. Mishchenko at al 2013]. Như vậy có thể sử dụng nhím biển sinh trưởng tại bờ biển Việt Nam làm nguyên liệu để chiết, tách echinochrom có hoạt tính sử dụng trong dược phẩm. Tuy nhiên, cho đến nay nhím biển được người dân ven biển khai thác chỉ để sử dụng trứng của chúng làm thực phẩm bổ dưỡng còn phần vỏ và gai chiếm từ 40-70 % khối lượng của nhím biển bị loại bỏ. Với hàm lượng các chất echinochrom từ 0,023 đến 10,7 mg/g ướt và giá trị dược dụng cao, việc loại bỏ và tiêu hủy hàng tấn vỏ, gai của nhím biển hàng năm gây lãng phí về kinh tế rất lớn.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là nhằm khắc phục nhược điểm nêu trên. Để đạt được mục đích này, theo một phương án, giải pháp hữu ích đề cập quy trình chiết xuất hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa từ loài nhím biển gồm các bước:

- a) thu dịch chiết từ loài nhím biển bằng cách chiết xuất vỏ cùng với gai của loài nhím biển đã được nghiền mịn bằng cồn etylic 96% và H_2SO_4 10% theo tỷ lệ khối lượng loài nhím biển/thể tích cồn etylic 96%/thể tích H_2SO_4 10% là 1/3/0,1 trong thời gian từ 5 đến 7 giờ thu dịch chiết; và
- b) thu hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa bằng cách lọc rửa và làm giàu dịch chiết thu được ở bước a) để loại cồn etylic 96% thu dung dịch nước, tiếp theo chiết dung dịch nước lần lượt bằng cloroform (cloroform/dung dịch nước là 1/2) và etyl axetat (etyl axetat/dung dịch nước là 1/2) ở nhiệt độ phòng thu dịch chiết cloroform và etyl axetat, sau đó rửa dịch chiết cloroform và etyl axetat bằng nước và cô quay dưới áp suất thấp để loại bỏ dung môi thu được hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa.

Theo một phương án khác, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nêu trên, trong đó loài nhím biển là loài được chọn từ nhóm các loài nhím biển ở Biển Đông bao gồm *Astropyga radiata*, *Diadema savigny*, *D. setosum*, *Echinotrix diadema*, *Ech. Calamaris*, *Toxopneustes pileolus*, *Stomopneustes variolaris*, *Tripneustes gratilla*, và *Phylacanhtus imperialis*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là phổ HPLC của các loài nhím biển vùng Biển Đông đã được sử dụng để thu được các chất chống oxy hóa với quy trình theo giải pháp hữu ích.

Hình 2 là đồ thị thể hiện biến thiên khối lượng linetol (Δm) bởi sự hình thành các sản phẩm oxy hóa peoxit phụ thuộc vào thời gian phản ứng oxy hóa bởi các gốc tự do (t)

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích.

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả một cách chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ minh họa cụ thể, tuy nhiên các phương án thực hiện và các ví dụ minh họa cụ thể này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Loài nhím biển được sử dụng để chiết xuất hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa là loài nhím biển sinh sống tại Biển Đông. Loài nhím biển sinh sống tại Biển Đông có chứa nhiều chất chống oxy hóa như echinochrome A, spinochrom, v.v..

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa từ loài nhím biển bao gồm các bước:

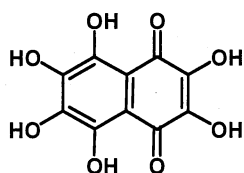
a) thu dịch chiết từ loài nhím biển

Vỏ và gai của loài nhím biển được nghiền mịn và chiết xuất bằng cồn etylic 96% và H_2SO_4 10% theo tỷ lệ khối lượng loài nhím biển/thể tích cồn etylic 96%/thể tích H_2SO_4 10% là 1/3/0,1 trong thời gian từ 5 đến 7 giờ thu dịch chiết.

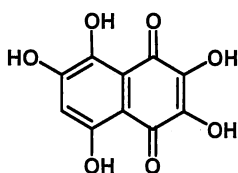
b) thu hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa

Lọc rửa và làm giàu dịch chiết thu được ở bước a) để loại cồn etylic 96% thu dung dịch nước, tiếp theo chiết dung dịch nước lần lượt bằng cloroform (cloroform/dung dịch nước là 1/2) và etyl axetat (etyl axetat/dung dịch nước là 1/2) ở nhiệt độ phòng thu dịch chiết cloroform và etyl axetat, sau đó rửa dịch chiết cloroform và etyl axetat bằng nước và cô quay dưới áp suất thấp để loại bỏ dung môi thu được hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa.

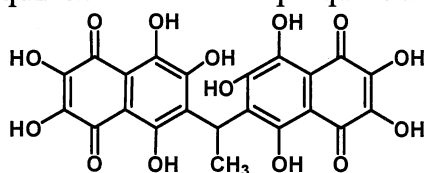
Hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa chứa các chất echinochrom A, các spinochrom A, B, C, D, E và các binaptoquinon với hoạt tính chống oxy hóa cao với cấu trúc phân tử và tên hóa học được thể hiện như dưới đây.

**Sp E (1)****Spinochrom E**

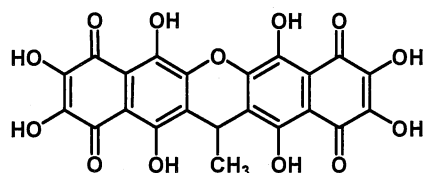
2,3,5,6,7,8-
hexahydroxy-1,4-
naptoquinon

**Sp D (2)****Spinochrom D**

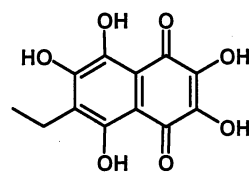
2,3,5,6,8-
pentahydroxy-1,4-
naptoquinon

**BiNQ-2 (4)**

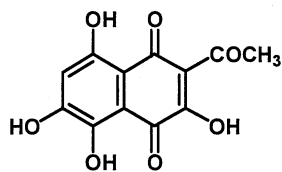
Etyliden-6,6'-bis(2,3,7-trihydroxynaptazarin)

**BiNQ-1 (3)**

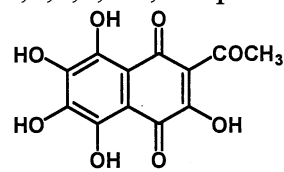
7,7'-anhydroetyliden-6,6'-bis(2,3,7-
trihydroxynaptazarin)

**Ech A (5)****Echinochrom A**

6-etyl-2,3,5,7,8-1,4-naptoquinon
7-etyl-2,3,5,6,8-1,4-naphtoquinon

**Sp A (6)****Spinochrom A**

2-axetyl-3,5,6,8-tetrahydroxy-1,4-
naptoquinon

**Sp C (7)****Spinochrom C**

2-axetyl-3,5,6,7,8-pentahydroxy-1,4-
naptoquinon

Mỗi tổ hợp các chất chống oxy hóa tự nhiên được cấu tạo từ các PHNQ khác nhau trong đó bao gồm các spinochrom E (1), D (2), A (6), C (7), echinochrom A (5) và các binaptoquinon BiNQ-1(3) và BiNQ-2 (4) có tính chống oxy hóa. Hàm lượng và thành phần PHNQ trong mỗi tổ hợp các chất chống oxy hóa từ các loài nhím biển Biển Đông như được thể hiện trên đây được xác định bằng phương pháp sắc ký khối phổ (LC-MS) như được trình bày trong Bảng 1 và Bảng 2 dưới đây.

Bảng 1. Các tham số sắc ký-khối phổ của các PHNQ 1-7 sử dụng ion hóa phun điện tử (ESI-MS)

Stt	Hợp chất	Khối lượng phân tử (M), thành phần và phổ UV(nm) của các PHNQ			Ion phân tử, m/z	
		M	Công thức	Phổ UV	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
1	Sp E	254	C ₁₀ H ₆ O ₈	264, 350, 478	255	253
2	Sp D	238	C ₁₀ H ₆ O ₇	251, 327, 463	239	237
3	BiNQ-1	502	C ₂₂ H ₁₄ O ₁₄	254, 339, 471	503	501
4	BiNQ-2	484	C ₂₂ H ₁₂ O ₁₃	265, 316, 470	485	483
5	Ech A	266	C ₁₂ H ₁₀ O ₇	254, 338, 471	267	265
6	Sp A	264	C ₁₂ H ₈ O ₇	266, 312, 508	265	263
7	Sp C	280	C ₁₂ H ₈ O ₈	290, 456	281	279

Bảng 2. Thành phần và hàm lượng PHNQ 1-7 trong các loài nhím biển tại Biển Đông

Loài nhím biển	Hàm lượng PHNQ 1-7 trong tổng các chất, %							Hàm lượng tổng PHNQ, %
	Sp E	Sp D	BiNQ-1	BiNQ-2	Ech A	Sp A	Sp C	
<i>Astropyga radiata</i> (Leske)	2,2	3,8	2	6	85	-	-	0,16
<i>Diadema savignyi</i> (Audouin)	14	8	-	-	59	-	-	0,11
<i>Diadema setosum</i> (Leske)	6	-	-	-	87	-	-	0,12
<i>Echinotrix diadema</i> (Linnaeus)	8	12	32	-	48	-	-	0,01
<i>Echinotrix calamaris</i> (Pallas)	4	5	25	-	66	-	-	0,013
<i>Toxopneustes pileolus</i> (Lamarck)	-	-	-	-	64	-	-	0,009
<i>Stomopneustes variolaris</i> (Lamarck)	26	-	-	-	73	-	-	0,006
<i>Tripneustes gratilla</i>	72	-	-	-	-	26	-	0,093

Loài nhím biển	Hàm lượng PHNQ 1-7 trong tổng các chất, %							Hàm lượng tổng PHNQ, %
	Sp E	Sp D	BiNQ-1	BiNQ-2	Ech A	Sp A	Sp C	
(Linnaeus)								
<i>Phyllacanthus imperialis</i> (Brandt)	-	-	-	-	-	26	72	0,008

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. chiết xuất hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa từ loài nhím biển

Nguyên liệu ban đầu (1kg) là vỏ và gai đã được nghiền mịn của những con nhím biển Biển Đông vừa mới đánh bắt hoặc tan đông, thuộc các loài như *Astropyga radiata* hoặc *Diadema savignyi* hoặc *Diadema setosum* hoặc *Echinotrix diadema* hoặc *Echinotrix calamaris* hoặc *Toxopneustes pileolus* hoặc *Stomopneustes variolaris* hoặc *Tripneustes gratilla* hoặc *Phyllacanthus imperialis*, tiếp theo bổ sung 3 lít cồn etylic cồn 96 % vào nguyên liệu đã được nghiền mịn, thêm 100 ml H₂SO₄ 10 % (pH 1,8-2,0) và ngâm trong 6 giờ thu 3120ml. Dịch chiết được lọc và làm giàu lên 10 lần (15mg/ml) để loại cồn etylic 96% thu 300ml dung dịch nước. Sau đó, chiết dung dịch nước lần lượt bằng cloroform (cloroform/ dung dịch nước là 1/2), sau đó bằng etyl axetat (etyl axetat/dung dịch nước là 1/2) ở nhiệt độ phòng thu dịch chiết cloroform và etyl axetat, tiếp theo rửa dịch chiết cloroform và etyl axetat bằng nước để loại bỏ axit và cô quay dưới áp suất kém để loại bỏ hết dung môi thu được 4,3 g hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa.

Thành phần và hàm lượng chất chống oxy hóa trong hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp sắc ký khối phổ (LC-MS) Shimadzu-2020 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) sử dụng cột Discovery HS C18 (150×2,1 mm, kích thước hạt 3 pm). Quá trình rửa giải được tiến hành hệ kép dung môi 0,5 % axit axetic (dung dịch A) – axetonitryl chứa 0,5 % axit axetic (dung dịch B), với biến thiên gradient như sau: 10-40 % B (0-6 phút), 40-100 % B (6-11 phút), 100 % B (11-12 phút), 100-10 % B (12-13 phút) và 10 % B (13-17 phút). Tốc độ dòng dung môi 0,2 mL/phút. Phổ được ghi đo trên detector diot-ma trận ở bước sóng 254 nm. Thu nhận phổ khối trong chế độ ESI-MS tại áp suất bình thường. Ghi nhận các ion dương (1,30 kV) và ion âm (1,50 kV) được tiến hành trong khoảng m/z 100 -800 với kết quả như được thể hiện trên Hình 1.

Ví dụ 2. Hoạt tính chống oxy hóa của hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa

Thử nghiệm được thực hiện trên mô hình peoxi hóa lipit bằng phương pháp cải tiến (Veselova M.v. and et al).

Chuyển vào bình thí nghiệm 250 μL (khoảng 200 mg) linetol đã được làm sạch peoxit (linetol là hỗn hợp của các este etylic của các axit béo không no từ dầu lạnh (bao gồm 15 % axit oleic, 15 % axit linolic và 57 % axit linoleic), thêm vào đó 5, 10 hoặc 20 μL dung dịch metanol 10 mM của các chất khảo sát. Đồng thời chuẩn bị các mẫu linetol với các thể tích metanol như trên làm đối chứng và 10 mM dung dịch metanol của chất chống oxy hóa chuẩn (axit ascorbic).

Các bình thí nghiệm được đặt trong bộ ổn nhiệt, giữ trong 1 giờ tại nhiệt độ 37°C để đuổi hết dung môi, sau đó cân các bình thí nghiệm với hỗn hợp phản ứng với độ chính xác 0,1 mg. Trọng lượng này được xem là trọng lượng ban đầu. Các bình thí nghiệm lại được đặt trở lại vào bộ ổn nhiệt tại 37°C rồi tiến hành cân bình thí nghiệm 2 lần/ngày cho đến khi trọng lượng chất đạt 10 -15 mg. Chu kỳ cảm ứng phản ứng dây chuyền của quá trình oxy hóa peoxit đối với linetol (τ_0 và $\Delta\tau$) được xác định bằng cách phân tích đồ thị đường cong dạng chữ S biểu diễn sự phụ thuộc của Δm vào thời gian phản ứng như được minh họa trên Hình 2.

Bằng cách sử dụng phần mềm Microsoft Excel, hoạt tính chống oxy hóa (AOA) được tính theo công thức:

$$AOA = \frac{(\tau_0 + \Delta\tau)}{\tau_0},$$

trong đó:

τ_0 - chu kỳ cảm ứng tự oxy hóa (autooxidation) của linetol mẫu đối chứng;

$\Delta\tau$ - thời gian, mà ở đó chu kỳ cảm ứng oxy hóa linetol tăng lên khi có mặt chất chống oxy hóa so với đối chứng.

Chu kỳ cảm ứng của phản ứng dây chuyền oxy hóa peoxit linetol tại 37°C xác định bằng phương pháp đồ thị đường cong S của sự phụ thuộc biến thiên khối lượng linetol Δm vào thời gian phản ứng (Hình 2).

Hình 2 mô tả sự phụ thuộc của biến thiên khối lượng linetol (Δm) vào thời gian phản ứng (t) do sự hình thành các sản phẩm peoxy hóa:

- a) - của mẫu đối chứng;
- b) - oxy hóa linetol khi có mặt chất ức chế.

τ_0 – chu kỳ cảm ứng của phản ứng tự oxy hóa linetol khi có mặt metanol (đối chứng),

$\Delta\tau$ - hiệu giữa các chu kỳ cảm ứng của phản ứng oxy hóa linetol khi có mặt chất ức chế và mẫu đối chứng.

Chu kỳ cảm ứng là thời gian mà chất chống oxy hóa làm chậm quá trình tích góp các sản phẩm oxy hóa các axit linolic và linoleic có trong thành phần linetol, và được so sánh với đối chứng. Trong điều kiện thí nghiệm trên, chu kỳ cảm ứng của mẫu đối chứng là 21 giờ. Trong mô hình thí nghiệm này, chất PHNQ cho hiệu quả cao nhất là echinochrom A, trong khi hiệu ứng chống oxy hóa của nó thể hiện sự phụ thuộc liều lượng: khi tăng nồng độ echinochrom A trong linetol lên 2 lần thì thời gian cảm ứng cũng tăng lên khoảng 2 lần. Cụ thể là, $\Delta\tau$ từ 161 giờ tại nồng độ echinochrom A 0,4 mM tăng lên tới 318 giờ tại nồng độ 0,8 mM (Bảng 3). Hiệu ứng echinochrom A trong mô hình này lớn gấp nhiều lần so với chất chống oxy hóa chuẩn axit ascorbic.

Kết quả thí nghiệm, như được thể hiện trên Bảng 3 dưới đây, cho thấy tất cả các PHNQ như Ech A, Sp A, Sp B, Sp C, Sp D, Sp E, trong đó kể cả các binaptoquinon BiNQ-1, BiNQ-2, [Mishchenko N.P. and et al] đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa (AOA) – đều gia tăng thời gian cảm ứng của phản ứng oxy hóa các axit linolic và linoleic, đồng thời hoạt tính chống oxy hóa của chúng đều vượt trội so với hoạt tính của chất chống oxy hóa chuẩn, tức là axit ascorbic.

Bảng 3. Chu kỳ cảm ứng ($\Delta\tau$) của quá trình tự oxy hóa linetol tại nhiệt độ 37 °C khi có mặt các PHNQ và hoạt tính AOA của chúng

Chất chống oxy hóa (PHNQ)	0.4 mM		0.8 mM	
	$\Delta\tau$, giờ	AOA	$\Delta\tau$, giờ	AOA
Echinochrom A	161,0	8,6	318,4	16,2
Spinochrom A	10,5	1,5	15,1	1,7
Spinochrom B	20,1	1,9	33,8	2,6
Spinochrom C	96,5	5,6	168,0	9,0
Spinochrom D	29,6	2,4	35,0	2,6

Spinochrom E	6,2	1,3	8,6	1,4
Chất chống oxy hóa chuẩn - axit ascorbic	1,3	1,1	1,5	1,1

Hoạt tính chống oxy hóa của hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa được chiết tách từ các loài nhím biển thuộc vùng Biển Đông phụ thuộc vào thành phần và hàm lượng của chúng trong các loài *Astropyga radiata*, *Diadema savignyi*, *D. setosum*, *Echinotrix diadema*, *Ech. calamaris*, *Toxopneustes pileolus*, *Stomopneustes variolaris*, *Tripneustes gratilla*, *Phyllacanthus imperialis*.

Ví dụ, các tổ hợp PHNQ từ nhím biển *Astropyga radiata* và *Diadema setosum*, chứa lần lượt 0,16 và 0,12% tổng các chất màu quinonoid tính theo khối lượng nhím biển, sẽ có AOA cao nhất, có nghĩa là cho hiệu quả cao nhất trong quá trình sử dụng chúng nhằm phòng ngừa và điều trị các bệnh liên quan đến quá trình ức chế oxy hóa (xem Bảng 1 và Bảng 2). Ngoài ra, hàm lượng tương đối của echinochrom A (với AOA cao nhất và có tính quyết định đối với hoạt tính chống oxy hóa trong các tổ hợp PHNQ) trong các loài nhím biển này có giá trị cao nhất so với hàm lượng của nó trong các tổ hợp thu được từ các loài nhím biển khác.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình chiết xuất theo giải pháp hữu ích có khả năng chiết tách các hoạt chất hữu ích từ vỏ và gai của loài nhím biển sinh sống tại Biển Đông. Quy trình chiết xuất đơn giản, tận dụng được nguồn nguyên liệu sẵn có và chiết xuất được hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa có hàm lượng các chất chống oxy hóa cao như nêu trong bảng 2.

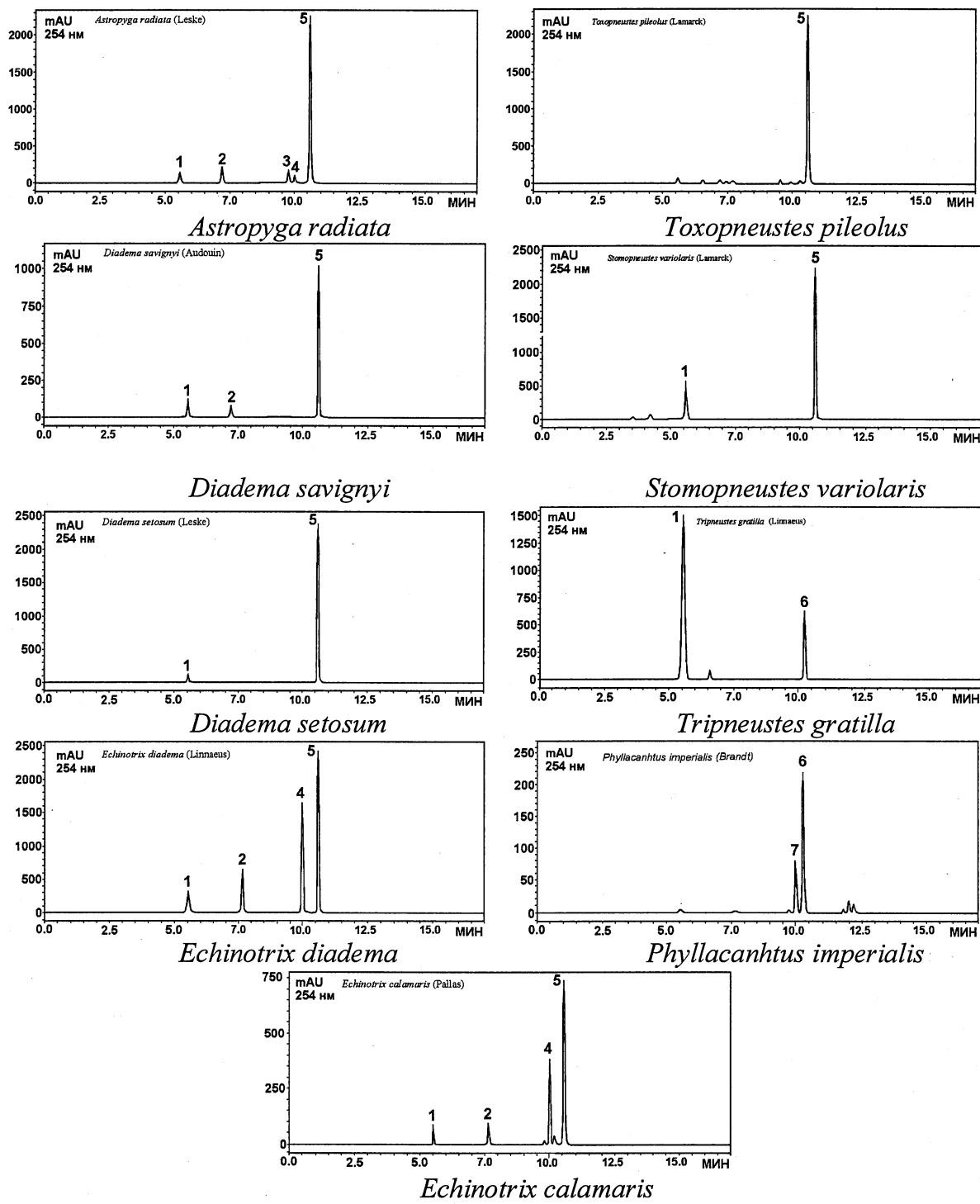
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chiết xuất hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa từ loài nhím biển bao gồm các bước:

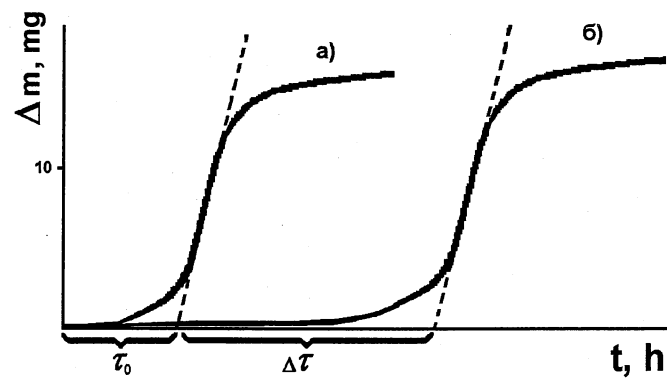
a) thu dịch chiết từ loài nhím biển bằng cách chiết xuất vỏ cùng với gai của loài nhím biển đã được nghiền mịn bằng cồn etylic 96% và H₂SO₄ 10% theo tỷ lệ khối lượng loài nhím biển/thể tích cồn etylic 96%/thể tích H₂SO₄ 10% là 1/3/0,1 trong thời gian từ 5 đến 7 giờ thu dịch chiết; và

b) thu hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa bằng cách lọc rửa và làm giàu dịch chiết thu được ở bước a) để loại cồn etylic 96% thu dung dịch nước, tiếp theo chiết dung dịch nước lần lượt bằng cloroform (cloroform/dung dịch nước là 1/2) và etyl axetat (etyl axetat/dung dịch nước là 1/2) ở nhiệt độ phòng thu dịch chiết cloroform và etyl axetat, sau đó rửa dịch chiết cloroform và etyl axetat bằng nước và cô quay dưới áp suất kém để loại bỏ dung môi thu được hỗn hợp hoạt chất chống oxy hóa.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó loài nhím biển là loài được chọn từ nhóm các loài nhím biển ở biển Đông bao gồm *Astropyga radiata*, *Diadema savigny*, *D. setosum*, *Echinotrix diadema*, *Ech. Calamaris*, *Toxopneustes pileolus*, *Stomopneustes variolaris*, *Tripneustes gratilla*, và *Phylacanhtus imperialis*.



Hình 1.



Hình 2