



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

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

(11)



2-0003090

(51)⁷ **C07D 311/02; A61K 36/48**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00551

(22) 06/12/2019

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/02/2020 383A

(73) Trường Đại học Phenikaa (VN)

Phường Yên Nghĩa, Quận Hà Đông, Thành Phố Hà Nội

(72) Tô Đạo Cường (VN).

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ TÍNH CHẾ HỢP CHẤT SULFURETIN TỪ HẠT CHANH
LEO VÀNG (*PASSIFLORA EDULIS* VAR. *FLAVICARPA*) CÓ TÁC DỤNG ĐIỀU TRỊ
BỆNH TIM MẠCH

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tính chế hợp chất sulfuretin có tác dụng điều trị bệnh tim mạch từ hạt Chanh leo vàng (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*). Quy trình theo giải pháp bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột hạt Chanh leo vàng để loại bỏ dầu và thu bã; c) chiết bã hạt Chanh leo vàng; d) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất sulfuretin; e) chiết hợp chất sulfuretin; f) thu hợp chất sulfuretin thô; và g) tính chế hợp chất sulfuretin. Quy trình theo giải pháp thu được hợp chất sulfuretin có công thức (1). Hợp chất sulfuretin thu được từ quy trình theo giải pháp có tác dụng điều trị tim mạch trên cơ sở ức chế enzym sEH.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ hóa sinh và các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là giải pháp đề cập đến quy trình phân lập hợp chất sulfuretin từ hạt Chanh leo vàng (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*). Hợp chất sulfuretin thu được từ quy trình theo giải pháp này được sử dụng trực tiếp hoặc phối hợp với các thảo dược khác để sản xuất sản phẩm có tác dụng điều trị bệnh tim mạch.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Các bệnh về tim mạch và là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trên toàn cầu. Theo ước tính của Tổ chức Y tế thế giới, hàng năm trên thế giới có khoảng 17,5 triệu người tử vong liên quan đến các bệnh về tim mạch. Có nhiều phương pháp để điều trị bệnh tim mạch và một trong những phương pháp hay được sử dụng phổ biến hiện nay là sử dụng thuốc. Tuy nhiên, thuốc điều trị tim mạch thường có nguồn gốc tổng hợp, nhiều tác dụng phụ và đắt.

Do đó, việc tìm kiếm các nguồn dược liệu có nguồn thảo dược thay thế cho các loại thuốc tổng hợp đã được quan tâm nghiên cứu. Đối với hạt Chanh leo vàng (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), các tác giả đã phát hiện ra tác dụng điều trị bệnh tim mạch tốt của dịch chiết từ Chanh leo vàng (Zhao, C.N., Meng, X., Li, Y., Li, S., Liu, Q., Tang, G.Y., Li, H.B. Fruits for Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases Nutrients, 2017, 9, 598). Ngoài ra, sulfuretin, một hoạt chất được tìm thấy trong loài Chanh leo vàng có tác dụng chống béo phì (Kim, S., Song, N. J., Chang, S. H., Bahn, G., Choi, Y., Rhee, D. K., Yun, U. J., Choi, J., Lee, J., Yoo, J. H., Shin, D., Park, K. M., Kang, H., Lee, S., Ku, J. M., Cho, Y. S., Park, K. W. Sulfuretin Prevents Obesity and Metabolic Diseases in Diet Induced Obese Mice Biomolecules & Therapeutics, 2019, 27, 107-116), chống tạo mỡ thành mạch (Lamichhane, R., Kim, S. G., Kang, S., Lee, K. H., Pandeya, P. R., Jung, H. J. Exploration of Underlying Mechanism of Anti-adipogenic Activity of Sulfuretin. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2017, 40, 1366-1373) và chống kết tập tiểu cầu (Lee, J. H., Kim, M., Chang, K. H., Hong, C.Y., Na, C. S., Dong, M. S., Lee, D., Lee, M. Y. Antiplatelet effects of

Rhus verniciflua stokes heartwood and its active constituents--fisetin, butein, and sulfuretin--in rats. Journal of Medicinal Food, 2015, 18, 21-30).

Sulfuretin là một flavonoid tự nhiên và thuộc khung aurone. Aurone có hai đồng phân, đó là có cấu hình *Z* và cấu hình *E*. Phân tử này chứa một nguyên tố benzofuran liên kết với một benzylidene được liên kết ở vị trí C-2. Cấu hình *Z* chiếm ưu thế và quyết định hoạt tính sinh học của hợp chất thuộc khung aurone. Sulfuretin ngoài sản xuất từ con đường tổng hợp thì nó còn được sản xuất từ một số loài thực vật và được liệu như cây Hợp hoan, Sơn mài, Sưa đỏ, Huỳnh đàn, Chanh leo tím, v/v. Hợp chất sulfuretin thường được chiết, phân lập và tinh chế bằng cách ngâm, chiết hồi lưu, chiết soxhlet, v/v. có/hoặc không hỗ trợ vi sóng, sóng siêu âm với các dung môi hữu cơ như ethyl axetat, axeton, metanol, etanol, v/v từ các nguồn nguyên liệu khác nhau. Tuy nhiên, cho tới nay chưa có công trình nào công bố dưới dạng bài báo hoặc sáng chế về phương pháp phân lập và tinh chế hợp chất sulfuretin từ hạt Chanh leo vàng. Do đó, giải pháp này đưa ra quy trình phân lập và tinh chế hợp chất sulfuretin có hiệu suất cao và có hoạt tính sinh học, cụ thể là có tác dụng điều trị tim mạch từ hạt Chanh leo vàng (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) đủ làm nguồn nguyên liệu để sản xuất thực phẩm chức năng và thuốc điều trị bệnh tim mạch. Sử dụng hạt Chanh leo vàng (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), quy trình phân lập và tinh chế tối ưu hợp chất sulfuretin sử dụng sắc ký cột hở cho hiệu suất cao, độ tinh sạch của sản phẩm > 95%, chi phí thấp và có tác dụng sinh học (thông qua ức chế enzym sEH-soluble epoxide hydrolaza) là các điểm mới của đơn giải pháp hữu ích này.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế hợp chất sulfuretin từ hạt Chanh leo vàng (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) có tác dụng điều trị bệnh tim mạch và hợp chất sulfuretin thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề xuất quy trình phân lập và tinh chế hợp chất sulfuretin có tác dụng ức chế enzym sEH từ hạt Chanh leo vàng (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hạt Chanh leo vàng (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), loại bỏ tạp chất, rửa sạch bằng nước cất, sau đó sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 70⁰C và xay hạt thành bột;

b) chiết bột hạt Chanh leo vàng bằng cách bổ sung phần bột thu được ở bước a) vào dung môi *n*-hexan theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích), tiến hành chiết bã hạt trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 10 đến 30 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, sau đó lọc loại bỏ dịch chiết *n*-hexan và thu bã hạt sau khi sấy khô;

c) chiết bã hạt Chanh leo vàng bằng cách bổ sung phần bã thu được ở bước b) vào etanol 96° theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết bã hạt trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 10 đến 30 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C, sau đó thu dịch chiết và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etanol (PESF);

d) hòa tan cao chiết PESF bằng cách hòa tan cao chiết PESF vào nước nóng theo tỉ lệ 1/3 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết PESF thu được hỗn hợp dạng lỏng;

e) chiết bằng diclorometan bằng cách bổ sung diclorometan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước d) theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi diclorometan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết diclorometan (PESF-1), dịch nước còn lại được sử dụng để chiết bằng etyl axetat;

f) chiết bằng etyl axetat bằng cách bổ sung etyl axetat vào dịch nước còn lại thu được ở bước e) theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi etyl axetat và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etyl axetat (PESF-2);

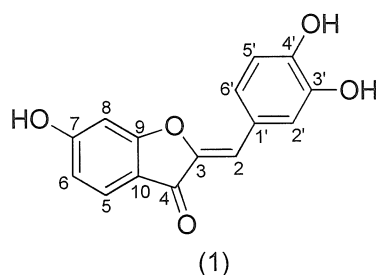
g) thu phân đoạn chứa hợp chất flavonoid bằng cách đưa phân đoạn chứa cao chiết PESF-2 thu được ở bước f) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là diclorometan/metanol theo tỷ lệ 20/1, 15/1, 10/1, 7/1 và 5/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclorometan/metanol là 5/1 và có kí hiệu là PESF-2.5;

h) thu hợp chất flavonoid thô bằng cách đưa phân đoạn PESF-2.5 thu được ở bước g) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) với hệ dung môi rửa giải là diclorometan/axeton theo tỷ lệ 5/1, 4/1, 3/1 và 2/1 (thể tích/thể

tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclorometan/axeton là 2/1 và có kí hiệu là PESF-2.5.4;

i) tinh chế hợp chất flavonoit bằng cách hòa tan phân đoạn có kí hiệu PESF-2.5.4 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (tỷ lệ 1/2, thể tích/thể tích) thu được hợp chất flavonoit có công thức (1) dạng rắn vô định hình màu vàng.

Hợp chất flavonoit thu được từ quy trình theo giải pháp có tên là sulfuretin và có công thức (1) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết bằng *n*-hexan, diclorometan và etyl axetat đều được thực hiện 3 lần.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hệ dung môi rửa giải trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất sulfuretin thô là diclorometan/axeton hoặc diclorometan/metanol theo tỷ lệ axeton và metanol tăng dần từ 0 đến 100%.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó còn có bước tinh sạch hợp chất sulfuretin bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi diclorometan/metanol hoặc acetonitrile/nước để thu hợp chất sulfuretin tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất sulfuretin có công thức (1) được sử dụng trực tiếp hoặc phối hợp với các thảo dược khác làm nguyên liệu sản xuất sản phẩm điều trị bệnh tim mạch.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Tác dụng ức chế enzym soluble epoxide hydrolaza (sEH, %) của các phân đoạn (PESF-1 và PESF-2) tách từ cao chiết etanol (PESF) (hình 1A). sEH (%) của hợp chất sulfuretin và chất đối chứng dương-AUDA (hình 1B).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp được mô tả một cách chi tiết với các phương án thực hiện quy trình phân lập và tinh chế hợp chất sulfuretin có tác dụng điều trị bệnh tim mạch từ hạt

Chanh leo vàng (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) và hợp chất sulfuretin thu được từ quy trình này cùng với các ví dụ minh họa cụ thể. Tuy nhiên, các ví dụ minh họa này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề cập đến quy trình sản xuất hợp chất sulfuretin có tác dụng điều trị bệnh tim mạch từ hạt Chanh leo vàng (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột hạt Chanh leo vàng để loại bỏ dầu và thu bã; c) chiết bã hạt Chanh leo vàng; d) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất sulfuretin; e) chiết hợp chất sulfuretin; f) thu hợp chất sulfuretin thô; và g) tinh chế hợp chất sulfuretin.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, thu hạt Chanh leo vàng, loại bỏ tạp chất, rửa sạch bằng nước cất, sau đó sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C và xay nhỏ (đến kích thước 0,2 mm) để tạo ra bột hạt Chanh leo vàng.

Trong bước chiết bột hạt Chanh leo vàng, tiến hành chiết ba lần phần bột thu được ở trên bằng *n*-hexan theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 10 đến 30 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C. Sau khi chiết, phần dịch chiết được loại bỏ và thu bã hạt sau khi sấy khô.

Trong bước chiết bã hạt Chanh leo vàng, tiến hành chiết ba lần phần bã thu được ở trên bằng ethanol 96⁰ theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 10 đến 30 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C. Sau khi chiết, phần dịch chiết được thu gom và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết ethanol (PESF).

Trong bước hòa tan cao chiết PESF, hòa tan cao chiết PESF vào nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết PESF thu được hỗn hợp dạng lỏng.

Trong bước thu cao chiết diclorometan, bổ sung diclorometan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở trên, sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi diclorometan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết diclorometan (PESF-1). Bước chiết bằng diclorometan được thực hiện 3 lần và dịch nước còn lại được sử dụng để chiết bằng etyl axetat.

Trong bước thu cao chiết etyl axetat và cao nước, bổ sung etyl axetat vào dịch nước còn lại thu được ở bước trên, sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó

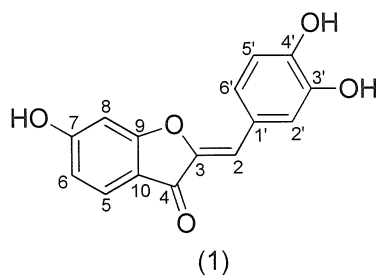
bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi etyl axetat, cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etyl axetat (PESF-2). Bước chiết bằng etyl axetat được thực hiện 3 lần.

Trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất flavonoit, đưa phân đoạn chứa cao chiết PESF-2 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là diclorometan/metanol theo tỷ lệ 20/1, 15/1, 10/1, 7/1 và 5/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ diclorometan/metanol là 5/1 và có ký hiệu là PESF-2.5.

Trong bước thu hợp chất flavonoit thô, đưa phân đoạn PESF-2.5 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) với hệ dung môi rửa giải là diclorometan/axeton theo tỷ lệ 5/1, 4/1, 3/1 và 2/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ diclorometan/axeton là 2/1 và có ký hiệu là PESF-2.5.4.

Trong bước tinh chế hợp chất flavonoit, hòa tan phân đoạn có ký hiệu PESF-2.5.4 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (tỷ lệ 1/2, thể tích/thể tích) thu được hợp chất flavonoit có tên là sulfuretin có công thức (1) dạng rắn vô định hình màu vàng.

Hợp chất sulfuretin thu được từ quy trình theo giải pháp có công thức (1) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó hệ dung môi rửa giải trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất sulfuretin thô là diclorometan/axeton hoặc diclorometan/metanol theo tỷ lệ axeton và metanol tăng dần từ 0 đến 100%.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó còn có bước tinh sạch hợp chất sulfuretin bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi diclorometan/metanol hoặc acetonitrile/nước để thu hợp chất sulfuretin tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất sulfuretin thu được bằng quy trình theo giải pháp, trong đó hợp chất sulfuretin có công thức (1) được sử

dụng trực tiếp hoặc phối hợp với các thảo dược khác làm nguyên liệu sản xuất sản phẩm điều trị bệnh tim mạch.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập và tinh chế hợp chất flavonoit từ hạt Chanh leo vàng (Passiflora edulis var. flavicarpa).

Thu hạt Chanh leo vàng, loại bỏ tạp chất, rửa sạch bằng nước cất, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 70⁰C đến khối lượng không đổi sau đó nghiền nhỏ thành bột (có kích thước 0,2 mm) và thu được 1,0 kg bột. Phần bột này được chiết ba lần bằng dung môi *n*-hexan (3 x 5,0 L) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 10 đến 30 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 40 đến 60⁰C, loại bỏ dịch chiết và thu bã hạt sau khi sấy khô. Bã hạt (0,85 kg) tiếp tục được chiết ba lần bằng etanol 96⁰ (3 x 4,0 L) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 10 đến 30 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 60 đến 80⁰C, sau khi cô quay loại bỏ dung môi thu được cao etanol (PESF; 65 g). Cao chiết PESF được hòa tan vào 195 mL nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết PESF thu được hỗn hợp dạng lỏng. Bổ sung 780 mL diclorometan vào hỗn hợp dạng lỏng, sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi diclorometan và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết diclorometan (PESF-1; 4,2 g) và dịch nước còn lại. Dịch nước lại tiếp tục được bổ sung 780 mL etyl axetat, sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi etyl axetat, cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etyl axetat (PESF-2; 15 g). Cao chiết PESF-2 (15,0 g) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là diclorometan/metanol theo tỷ lệ 20/1, 15/1, 10/1, 7/1 và 5/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclorometan/metanol là 5/1 và có kí hiệu là PESF-2.5 (0,80 g). Phân đoạn PESF-2.5 (0,80 g) tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) với hệ dung môi rửa giải là diclorometan/axeton theo tỷ lệ 5/1, 4/1, 3/1 và 2/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ diclorometan/axeton là 2/1 và có kí hiệu là PESF-2.5.4 (0,30 g). Hòa tan phân đoạn có kí hiệu PESF-2.5.4 (0,30 g) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với

hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (tỷ lệ 1/2, thể tích/thể tích) thu được hợp chất flavonoid có tên là sulfuretin (40 mg) có công thức (1) dạng rắn vô định hình màu vàng.

Như vậy, quy trình phân lập và tinh chế hợp chất sulfuretin sử dụng sắc ký cột hở với kích thước cột và hệ dung môi tối ưu cho phép chiết hợp chất sulfuretin hiệu suất cao mà vẫn có tác dụng sinh học mạnh.

Ví dụ 2: Định tính và định lượng hợp chất flavonoid được phân lập và tinh chế từ hạt Chanh leo vàng.

Phân bột vô định hình màu vàng thu được ở Ví dụ 1 được xác định về mặt định tính và định lượng bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kết quả như sau:

Đặc tính của hợp chất flavonoid có công thức (1)

- Tên theo IUPAC: (Z)-2-(3,4-dihydroxybenzylidene)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one.

- Mô tả: Chất dạng rắn vô định hình màu vàng, tan tốt trong dung môi metanol. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo tráng sẵn RP-18 F254S (Merck), dung môi triển khai là metanol/nước = 1/1 (v/v); $R_f = 0,50$.

- CTPT: $C_{15}H_{10}O_5$ (M=270).

- Phổ khối phân giải thấp ESI-MS m/z : 271 $[M + H]^+$ ($C_{15}H_{11}O_5$).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: 1H -NMR (500 MHz, Metanol- d_4) δ_H (ppm): 7,63 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5), 7,54 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8), 7,26 (1H, dd, $J = 8,5$; 2,0 Hz, H-6), 6,86 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,73 (1H, dd, $J = 8,0$; 2,0 Hz, H-6'), 6,72 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,71 (1H, s, H-2); ^{13}C -NMR (125 MHz, Metanol- d_4) δ_C (ppm): 184,5 (C-4), 169,8 (C-7), 168,4 (C-9), 149,3 (C-4'), 147,7 (C-3), 146,7 (C-3'), 126,8 (C-5), 126,3 (C-6'), 125,5 (C-1'), 118,9 (C-2'), 116,7 (C-5'), 114,8 (C-10), 114,6 (C-6), 114,1 (C-2), 99,3 (C-8).

Cấu trúc hóa học của hợp chất stilbenoid có công thức (1) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hợp chất hóa học và khẳng định rằng hợp chất flavonoid có công thức (1) là hợp chất có tên sulfuretin.

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính ức chế enzym sEH của các cao chiết và hợp chất sulfuretin phân lập từ hạt Chanh leo vàng (Passiflora edulis var. flavicarpa).

Để xác định hoạt tính ức chế enzyme sEH của các cao chiết và hợp chất sulfuretin phân lập từ hạt Chanh leo vàng thu được từ Ví dụ 1, tiến hành thử nghiệm theo phương pháp của Bai và cộng sự (Bai, M.M., Shi, W., Tian, J.M., Lei, M., Kim, J.H., Sun, Y.N., Kim, Y.H., Gao, J.M. Soluble epoxide hydrolase inhibitory and anti-inflammatory components from the leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver (Duzhong). Journal of Agriculture Food Chemistry, 2015, 63, 2198-2205) có một số điều chỉnh cho phù hợp. 130 μ L dung dịch enzyme sEH tái tổ hợp của người (62,5 ng/mL) được pha với dung dịch đệm (25 mM Bis-TrisHCl, pH 7,0 chứa 0,1 mg/mL BSA) rồi hoà tan với 20 μ L phối tử (được pha loãng trong MeOH), và sau đó 50 μ L PHOME ở các dải nồng độ khác nhau của mẫu thử hoặc mẫu đối chứng (AUDA) được lần lượt thêm vào. Phản ứng sEH được thực hiện ở 37°C trong 1 giờ. Lượng sản phẩm được chuyển đổi từ cơ chất của enzyme được xác định bằng phương pháp đo huỳnh quang (bộ lọc kích thích 330 nm và bộ lọc phát xạ tại bước sóng $\lambda = 465$ nm) bằng máy Tecan (Mannedorf, Thụy Sĩ).

Tác dụng ức chế enzyme sEH cho mỗi mẫu được tính như sau:

$$\text{sEH (\%)} = 100 - [(S_{60} - S_0 / C_{60} - C_0) \times 100]$$

Trong đó C_{60} và S_{60} là huỳnh quang của chất đối chứng và mẫu thử sau 60 phút, S_0 và C_0 là huỳnh quang của chất đối chứng và mẫu thử ở 0 phút.

Bảng 1. Hoạt tính ức chế enzyme sEH của các cao chiết từ hạt Chanh leo vàng.

Hợp phần	Cao chiết	% ức chế sEH*		
		37,5 μ g/mL	75 μ g/mL	150 μ g/mL
PESF	Etanol	62,8	92,5	102,4
PESF-1	Diclorometan	88,3	92,6	101,9
PESF-2	Etyl axetat	101,2	106,8	115,4

(*): hoạt tính ức chế enzyme sEH của các cao chiết và phân đoạn PESF, PESF-1, và PESF-2 được thực hiện ở các nồng độ 37,5, 75 và 150 μ g/mL.

Tác dụng ức chế enzyme sEH của các cao chiết được thể hiện ở bảng 1. Trong đó, cao chiết PES-2 có tác dụng ức chế enzyme sEH mạnh nhất (> 100%) ở cả 3 nồng độ (hình 1A). Do đó, cao chiết PESF-2 được lựa chọn để chiết các phân đoạn, phân lập và tinh chế các hợp chất có hoạt tính ức chế enzyme sEH. Cao chiết PESF-2 được phân tách bằng cột hờ silica và thu được phân đoạn phụ PESF-2.5. Phân đoạn phụ PESF-2.5 tiếp tục được phân tách bằng cột hờ silica và thu được phân đoạn phụ PESF-2.5.4. Hợp

chất sulfuretin có công thức (1) được phân lập và tinh chế từ phân đoạn phụ PESF-2.5.4. Bảng 2 và hình 1B cho thấy tại nồng độ 100 μM , hợp chất sulfuretin có hoạt tính ức chế enzyme sEH (74,6%) mạnh gấp 1,08 lần so với chất đối chứng dương, AUDA (68,9%).

Bảng 2. Hoạt tính ức chế enzyme sEH của hợp chất sulfuretin
tách từ phân đoạn phụ PES-2.5.4

Hợp chất	100 μM (%)
Sulfuretin	74,6
AUDA	68,9

Như vậy, sulfuretin được coi là hợp chất tiềm năng ức chế enzyme sEH, từ đó định hướng hợp chất sulfuretin có/hoặc không phối hợp với các thảo dược khác làm nguyên liệu sản xuất sản phẩm có tác dụng điều trị tim mạch.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình của giải pháp hữu ích cho phân lập và tinh chế hợp chất sulfuretin với độ tinh khiết > 95% có tác dụng điều trị tim mạch, trên cơ sở ức chế enzyme sEH từ hạt Chanh leo vàng (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) với hiệu suất chiết cao và có tác dụng sinh học mạnh. Bằng cách sử dụng sắc ký cột và điều chỉnh hệ dung môi tối ưu nhất, quy trình cho phép chiết được hoạt chất với một lần chiết duy nhất mà vẫn thu được hiệu suất chiết cao, mở ra một hướng sản xuất có khả năng cung cấp nguyên liệu cho ngành dược trên cơ sở các hoạt chất có nguồn gốc từ tự nhiên.

Hợp chất sulfuretin thu được từ quy trình theo giải pháp đã được chứng minh có tác dụng điều trị tim mạch trên cơ sở ức chế enzyme sEH. Bằng cách sử dụng sắc ký cột kết hợp với hệ dung môi tối ưu, quy trình theo giải pháp cho phép thu được hoạt chất sulfuretin có hiệu quả ức chế enzyme sEH mạnh. Hợp chất sulfuretin theo giải pháp có tiềm năng phát triển thành dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng hỗ trợ trong việc ngăn ngừa và điều trị tim mạch.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập và tinh chế hợp chất sulfuretin từ hạt Chanh leo vàng (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) có tác dụng điều trị bệnh tim mạch, quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hạt Chanh leo vàng, loại bỏ tạp chất, rửa sạch bằng nước cất, sau đó sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,2 mm để tạo ra bột hạt Chanh leo vàng;

b) chiết bột hạt Chanh leo vàng bằng cách chiết phần bột thu được ở bước a) với *n*-hexan ba lần theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 10 đến 30 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, sau đó loại bỏ dịch chiết và thu bã hạt sau khi sấy khô;

c) chiết bã hạt Chanh leo vàng bằng cách chiết phần bã thu được ở bước b) với ethanol 96° ba lần theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 10 đến 30 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C, sau đó thu dịch chiết và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết ethanol (PESF);

d) hòa tan cao chiết PESF bằng cách hòa tan cao chiết PESF thu được ở bước c) vào nước nóng theo tỉ lệ 1/3 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết PESF thu được hỗn hợp dạng lỏng;

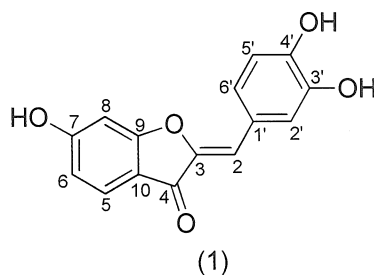
e) chiết bằng diclorometan bằng cách bổ sung diclorometan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước d) theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi diclorometan và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết diclorometan (PESF-1), dịch nước còn lại được sử dụng để chiết bằng etyl axetat;

f) chiết bằng etyl axetat bằng cách bổ sung etyl axetat vào dịch nước còn lại thu được ở bước e) theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi etyl axetat, cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etyl axetat (PESF-2);

g) thu phân đoạn chứa hợp chất sulfuretin bằng cách đưa phân đoạn chứa cao chiết PESF-2 thu được ở bước f) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là diclorometan/metanol theo tỷ lệ 20/1, 15/1, 10/1, 7/1 và 5/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ diclorometan/metanol là 5/1 và có kí hiệu là PESF-2.5;

h) thu hợp chất sulfuretin thô bằng cách đưa phân đoạn PESF-2.5 thu được ở bước g) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) với hệ dung môi rửa giải là diclorometan/axeton theo tỷ lệ 5/1, 4/1, 3/1 và 2/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ diclorometan/axeton là 2/1 và có kí hiệu là PESF-2.5.4; và

i) tinh chế hợp chất sulfuretin bằng cách hòa tan phân đoạn có kí hiệu PESF-2.5.4 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (tỷ lệ 1/2, thể tích/thể tích) thu được hợp chất sulfuretin dạng rắn vô định hình màu vàng và có công thức (1):



HÌNH 1

