



(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)



2-0003270

(51) **C07D 311/02; A61K 36/48**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00142

(22) 15/04/2021

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/06/2021 399

(73) Trường Đại học Phenikaa (VN)

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

(72) Tô Đạo Cường (VN); Ngũ Trường Nhân (VN); Nguyễn Phi Hùng (VN); Trần Mạnh Hùng (VN); Nguyễn Phương Đại Nguyên (VN); Dương Anh Tuấn (VN); Nguyễn Hồng Hạnh (VN); Trần Đăng Thạch (VN).

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ TÍNH CHẾ HỢP CHẤT GERONTOXANTHONE I CÓ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM TỪ CÂY BỨA TRÂU (*GARCINIA DELPYANA*)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế hợp chất gerontoxanthone I có tác dụng điều trị viêm từ vỏ thân cây Bứa trâu (*Garcinia delpyana*). Quy trình theo giải pháp bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột vỏ thân cây Bứa trâu; c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất gerontoxanthone I; d) thu hợp chất gerontoxanthone I thô; và e) tinh chế hợp chất gerontoxanthone I. Quy trình theo giải pháp thu được hợp chất gerontoxanthone I có công thức (1). Hợp chất gerontoxanthone I thu được từ quy trình theo giải pháp có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế sự sản sinh NO.

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 gerontoxanthone I từ vỏ thân cây Bứa trâu (*Garcinia delphyana*). Hợp chất gerontoxanthone I thu được từ quy trình theo giải pháp này có thể được sử dụng trực tiếp hoặc phối hợp với các thảo dược khác để sản xuất sản phẩm có tác dụng điều trị các bệnh viêm.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Các bệnh viêm là nguyên nhân hàng đầu gây ra bệnh ung thư, tim mạch, Alzheimer, tiểu đường typ II, xương khớp, tự miễn dịch, thần kinh, các bệnh về phổi. Tỷ lệ nhiễm, mức độ nghiêm trọng và sự phức tạp của các bệnh này đang gia tăng nhanh chóng, từ đó làm tăng đáng kể gánh nặng chi phí về chăm sóc sức khỏe.

Có nhiều phương pháp để điều trị viêm và một trong những phương pháp hay được sử dụng phổ biến hiện nay là sử dụng thuốc. Các loại thuốc phổ biến nhất hiện nay được sử dụng để điều trị các bệnh viêm là các lớp thuốc corticosteroid, các lớp chất antihistamine, các lớp chất không steroid, decongestants, anticholinergic agent, Mast cell stabilizer, v/v. (C. A. Kontogiorgis and D. J. Hadjipavlou-Litina. Non Steroidal Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 2002, 9, 89-98). Ngoài ra, các thuốc thay thế như thuốc kháng viêm/dị ứng không steroid (Non-steroidal alternative inflammatory drugs - NSAID) có nguồn gốc tổng hợp như chlopheniramine, cetirizine, levocetirizine, diclofenac, acuvall, bromfenac, nevanac, v/v. (W. Xiao, O. A. Oreoluwa, M. M. Heidi. Pulmonary and Nasal Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Inhalation Aerosol Delivery Systems. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 2011, 10, 215-229). Các loại thuốc này tuy đã thành công về mặt thương mại nhưng có tác dụng phụ như rối loạn tim mạch, xuất huyết dạ dày và rối loạn hô hấp.

Do đó, việc tìm kiếm các hợp chất mới có tác dụng điều trị viêm từ nguồn thiên nhiên, đặc biệt là nguồn dược thay thế cho các loại thuốc tổng hợp đã được quan tâm và đầu tư nghiên cứu. Đối với chi Bứa (*Garcinia*), các tác giả đã phát hiện ra tác dụng

kháng viêm và chống ung thư (D. S. El-Agamy, G. A. Mohamed, N. Ahmed, M. A. Elkablawy, M. A. Elfaky, W. M. Elsaed, S. G. A. Mohamed, and S. R. M. Ibrahim. Protective Anti-Inflammatory Activity of Tovophyllin A Against Acute Lung Injury and Its Potential Cytotoxicity to Epithelial Lung and Breast Carcinomas. *Inflammopharmacology*, 2020, 28, 153-163), kháng khuẩn (S. Nanasombat, N. Kuncharoen, B. Ritcharoon, and P. Sukcharoen. Antibacterial activity of Thai medicinal plant extracts against oral and gastrointestinal pathogenic bacteria and prebiotic effect on the growth of *Lactobacillus acidophilus*. *Chiang Mai Journal of Science*, 2018, 45, 33-44), chống oxy hóa (N. Aboutorab, B. Sham Baharin, R. Abdul Rahman, J. Selamat, and C.G. Hean. Effects of indirect sonication pretreatment and solvent extraction on the xanthone content and its antioxidant activities of freeze dried mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) pericarp powder extracts. *International Food Research Journal*, 2018, 25, 2453-2458), chống tăng lipid máu (B. Datchanamurthy, K. Manimekalai, and K.J. Salwe. Evaluation of hypolipidemic activity of fruit rind extracts of *Garcinia gummigutta* in diet-induced hyperlipidemic rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2019, 12, 104-110), kháng virus (A. Adnan, Z.N. Allaudin, H. Hani, H.S. Loh, T.J. Khoo, K.N. Ting, and R. Abdullah. Virucidal Activity of *Garcinia parvifolia* Leaf Extracts in Animal Cell Culture. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2019 19, 169) và chống tiểu đường (G. K. Das, Satyavir, and S. B. Puranik. Isolation of *Garcinia mangostana* Extract to Evaluate Antioxidant and Anti-Diabetic Activity in Animals. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, 2019, 14, 10) của các cao chiết và hợp chất phân lập được. Ngoài ra, các nhà nghiên cứu cũng phát hiện tác dụng kháng viêm thông qua ức chế sự sản sinh nitric oxit (NO) của các cao chiết cũng như các hoạt chất phân lập được từ loài Bứa trâu (*Garcinia delphyana*), trong đó hoạt chất gerontoxanthone I có tác dụng ức chế sự sản sinh NO mạnh nhất và có tiềm năng phát triển thành dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng hỗ trợ trong việc ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm (V. D. Hoang, P. H. Nguyen, M. H. Tran, N. T. Huynh, H. T. Nguyen, B. S. Min, D. C To. Identification of Anti-inflammatory Constituents from Vietnamese *Piper hymenophyllum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2020, 30, 312–316). Hợp chất gerontoxanthone I được tách từ cây Bứa trâu ban đầu sử dụng cao chiết tổng, chiết phân đoạn, sau đó sử dụng cột sắc ký được nhồi hạt silica gel pha thuận và pha

đảo kết hợp dung môi khai triển để thu được hợp chất này (V. D. Hoang, P. H. Nguyen, M. H. Tran, N. T. Huynh, H. T. Nguyen, B. S. Min, D. C To. Identification of Anti-inflammatory Constituents from Vietnamese *Piper hymenophyllum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2020, 30, 312–316). Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp tách và tinh chế hợp chất này là các tác giả vẫn chưa tìm ra hệ dung môi thích hợp để rút ngắn quá trình tách và tinh chế khi phải sử dụng đến 4 công đoạn, từ đó khối lượng hợp chất thu được là thấp so với khối lượng thật của nó có trong cao chiết tổng do bị hao hụt dần qua nhiều công đoạn tách. Do đó, giải pháp sau đây đưa ra quy trình tách và tinh chế hợp chất gerontoxanthone I chỉ qua ba bước tách, bao gồm một bước tách phân đoạn chứa hợp chất gerontoxanthone I thô, một bước thu hợp chất gerontoxanthone I thô và một bước tinh chế hợp chất này. Bên cạnh đó, sử dụng phương pháp dẫn đường sinh học (chỉ tập trung nghiên cứu các phân đoạn có hoạt tính sinh học), sử dụng hệ dung môi hợp lý để rút ngắn thời gian và công đoạn tách mà lại thu được hợp chất gerontoxanthone I có khối lượng lớn và có độ tinh khiết cao là ưu điểm của giải pháp này.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế hợp chất gerontoxanthone I từ vỏ thân cây Bứa trâu (*Garcinia delopyana*) có tác dụng kháng viêm và hợp chất gerontoxanthone I thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề xuất quy trình phân lập và tinh chế hợp chất gerontoxanthone I có tác dụng ức chế sự sản sinh NO từ vỏ thân cây Bứa trâu (*Garcinia delopyana*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

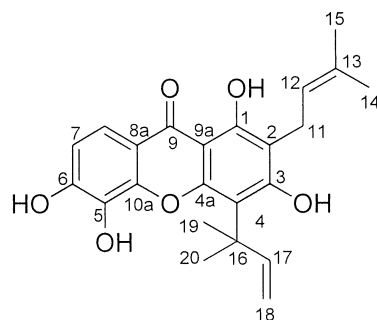
a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu vỏ thân của cây Bứa trâu, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch và sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 60°C và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,2 mm thu được nguyên liệu bột vỏ thân cây Bứa trâu;

b) chiết nguyên liệu bằng cách chiết nguyên liệu bột vỏ thân cây Bứa trâu với ête dầu hỏa theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) sử dụng thiết bị chiết Soxhlet, thời gian chiết từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 60°C, sau khi thu dịch chiết, loại dung môi thu cao chiết ête dầu hỏa (GDPE);

c) thu phân đoạn chứa hợp chất gerontoxanthone I bằng cách nhồi phân cao chiết ête dầu hỏa (GDPE) thu được ở bước b) lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh, tiến hành rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 7/1 và 5/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn *n*-hexan/axeton tỷ lệ 5/1 và có kí hiệu GDPE-6;

d) thu hợp chất gerontoxanthone I thô bằng cách nhồi phân đoạn có kí hiệu GDPE-6 thu được ở bước c) lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh, tiến hành rửa giải với hệ dung môi diclometan/metanol lần lượt theo tỷ lệ 50/1, 20/1 và 10/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/metanol tỷ lệ 10/1 và có kí hiệu GDPE-6-3;

e) tinh chế hợp chất gerontoxanthone I bằng cách nhồi phân đoạn có kí hiệu GDPE-6-3 thu được ở bước d) lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (lần lượt theo tỷ lệ 2/1, 3/1 và 4/1, thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất gerontoxanthone I tinh thể hình kim, màu vàng và có công thức (1) sau:



(1)

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết bằng ête dầu hỏa 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 gerontoxanthone I thô là *n*-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ etyl axetat tăng dần từ 0 đến 100%.

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

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất gerontoxanthone I 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 viêm.

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 gerontoxanthone I có tác dụng điều trị viêm từ vỏ thân cây Bứa trâu (*Garcinia delpyana*) và hợp chất gerontoxanthone I 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 gerontoxanthone I có tác dụng điều trị viêm từ vỏ thân cây Bứa trâu (*Garcinia delpyana*), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột vỏ thân cây Bứa trâu; c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất gerontoxanthone I; d) thu hợp chất gerontoxanthone I thô; và e) tinh chế hợp chất gerontoxanthone I.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, thu vỏ thân của cây Bứa trâu, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch, sau đó sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C và xay nhỏ (đến kích thước 0,2 mm) thu được nguyên liệu bột vỏ thân cây Bứa trâu.

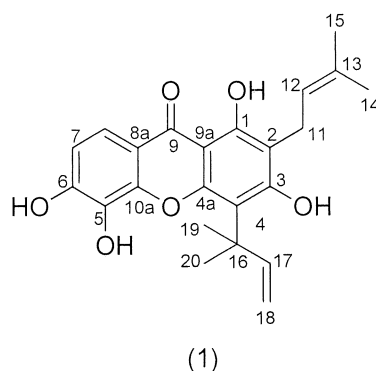
Trong bước chiết nguyên liệu bột vỏ thân cây Bứa trâu, tiến hành chiết ba lần phần bột thu được ở trên bằng ête dầu hỏa theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) sử dụng thiết bị chiết Soxhlet với thời gian chiết từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 60°C. Sau khi thu dịch chiết, loại dung môi dưới áp suất giảm thu cao chiết ête dầu hỏa (GDPE).

Trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất gerontoxanthone I, đưa cao chiết GDPE thu được ở bước trên lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh, tiến hành rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 7/1 và 5/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn *n*-hexan/axeton tỷ lệ 5/1 và có kí hiệu GDPE-6.

Trong bước thu hợp chất gerontoxanthone I thô, đưa phân đoạn có kí hiệu có kí hiệu GDPE-6 thu được ở bước trên lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh, tiến hành rửa giải với hệ dung môi diclometan/metanol lần lượt theo tỷ lệ 50/1,

20/1 và 10/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/metanol tỷ lệ 10/1 và có kí hiệu GDPE-6-3.

Trong bước thu hợp chất gerontoxanthone I tinh, đưa phân đoạn có kí hiệu GDPE-6-3 thu được ở bước trên lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (lần lượt theo tỷ lệ 2/1, 3/1 và 4/1, thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất gerontoxanthone I tinh thể hình kim, màu vàng và 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 gerontoxanthone I thô là *n*-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ etyl axetat tăng dần từ 0 đến 100%.

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

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất gerontoxanthone I thu được bằng quy trình theo giải pháp, trong đó hợp chất gerontoxanthone I 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 viêm.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập và tinh chế hợp chất gerontoxanthone I từ vỏ thân cây Bứa trâu (Garcinia delpyana).

Thu vỏ thân cây Bứa trâu, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C đến khối lượng không đổi sau đó nghiền nhỏ thành bột (có kích thước 0,2 mm) và thu được 2 kg bột. Phần bột này được chiết ba lần bằng ête dầu hỏa (3 x 10 L) sử dụng thiết bị chiết Soxhlet với thời gian chiết từ 40 đến 60

phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 60°C, sau khi cô quay loại bỏ dung môi thu được cao ête dầu hỏa (GDPE 64 g). Cao chiết GDPE (64 g) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 7/1 và 5/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 5/1 và có kí hiệu là GDPE-6 (12,6 g). Phân đoạn GDPE-6 (5,6 g) tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là diclometan/methanol lần lượt theo tỷ lệ 50/1, 20/1 và 10/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclometan/metanol là 10/1 và có kí hiệu là GDPE-6-3 (750 mg). Hòa tan phân đoạn có kí hiệu GDPE-6-3 (750 mg) lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 (có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (lần lượt theo tỷ lệ 2/1, 3/1 và 4/1, thể tích/thể tích) thu được hợp chất có tên là gerontoxanthone I (58 mg) có công thức (1) tinh thể hình kim, màu vàng.

Ví dụ 2: Định tính và định lượng hợp chất gerontoxanthone I được phân lập và tinh chế từ vỏ thân cây Bứa trâu.

Hợp chất tinh thể hình kim, 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 gerontoxanthone I có công thức (1)

- Tên theo IUPAC: 1,3,5,6-tetrahydroxy-4-(2-methylbut-3-en-2-yl)-2-(3-methylbut-2-enyl)xanthen-9-one.

- Mô tả: Hợp chất tinh thể hình kim, màu vàng, tan tốt trong dung môi chloroform. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo tráng sẵn 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck), dung môi triển khai là *n*-hexan/axeton = 5/1 (v/v); R_f = 0,40.

- CTPT: C₂₃H₂₄O₆ (M=396).

- Phổ khối phân giải thấp ESIMS m/z 397,2 [M + H]⁺.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 13,32 (1H, s, 1-OH); 7,71 (1H, d, J = 8,5 Hz, H-8); 6,94 (1H, d, J = 8,5 Hz, H-7); 3,42 (2H, brd, J = 6,5 Hz, H-11); 5,30 (1H, m, H-12); 1,80 (3H, s, H-14); 1,72 (3H, s, H-15); 6,63 (1H, dd, J = 17,5; 10,5 Hz, H-17); 5,24 (1H, br d, J = 17,5 Hz, Ha-18); 5,05 (1H, br d, J =

10,5 Hz, Hb-18); 1,68 (6H, s, H-19/H-20); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 160,1 (C-1); 118,7 (C-2); 164,5 (C-3); 118,4 (C-4); 152,8 (C-4a); 131,0 (C-5); 149,3 (C-6); 112,9 (C-7); 117,8 (C-8); 113,8 (C-8a); 181,3 (C-9); 105,6 (C-9a); 144,8 (C-10a); 22,9 (C-11); 122,6 (C-12); 132,1 (C-13); 18,0 (C-14); 25,7 (C-15); 42,0 (C-16); 156,6 (C-17); 104,4 (C-18); 28,8 (C-19/C-20).

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

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất gerontoxanthone I phân lập từ vỏ thân cây Bứa trâu (Garcinia delphyana) trên dòng đại thực bào RAW 264.7.

+ Nuôi cấy tế bào:

Tế bào RAW 264,7 được nuôi trong môi trường DMEM-F12, FBS 10% đến độ phủ 70–80 %, sau đó tế bào được cấy chuyển qua trong đĩa 96 giếng để thực hiện thí nghiệm với các thay đổi về nồng độ LPS, mật độ tế bào, các điều kiện gây đói tế bào, thời gian ủ với LPS. Sau đó, 50 μL dịch nổi trong đĩa 96 giếng nuôi tế bào (sau khi đã ủ với LPS và đạt được các chỉ tiêu về thời gian và thành phần thí nghiệm) được chuyển sang đĩa 96 giếng khác và bổ sung một thể tích 50 μL thuốc thử Griess, ủ 10 phút. Đo OD bước sóng 550 nm.

+ Phương pháp xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất gerontoxanthone I phân lập từ vỏ thân cây Bứa trâu (*Garcinia delphyana*).

Tế bào RAW 264,7 được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ 10^4 tế bào/giếng, ủ trong 12 giờ ở điều kiện 37°C , 5 % CO_2 . Hút bỏ môi trường cũ và thay thế bằng môi trường chứa 1 % FBS, ủ trong 6 giờ. Sau đó, thay môi trường cũ bằng môi trường có chứa hợp chất gerontoxanthone I (hoặc đối chứng dương-Celastrol) ở các nồng độ khác nhau và LPS nồng độ 0,5 $\mu\text{g/mL}$, ủ 24 giờ. Hút 50 μL dịch nổi trong mỗi giếng sang đĩa 96 giếng khác và bổ sung 50 μL thuốc thử Griess, ủ 10 phút. Đo OD tại bước sóng 550 nm. Khả năng ức chế sự sản sinh NO được tính bằng công thức:

$$\text{Khả năng ức chế} = \frac{\text{OD}_{550\text{nm}} \text{ kích thích LPS không trị liệu} - \text{OD}_{550\text{nm}} \text{ kích thích được trị liệu}}{\text{OD}_{550\text{nm}} \text{ kích thích LPS không trị liệu} - \text{OD}_{550\text{nm}} \text{ không kích thích LPS}} \times 100 (\%)$$

Bảng 1. Hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất gerontoxanthone I phân lập từ vỏ thân cây Bứa trâu.

Hợp chất	% ức chế	IC ₅₀ (μM)
Gerontoxanthone I	83,2 ± 2,8	14,5 ± 1,6
Celastrol	116,6 ± 1,0	1,0 ± 0,1

Tác dụng ức chế sự sản sinh NO của hợp chất gerontoxanthone I được thể hiện ở bảng 1. Hợp chất gerontoxanthone I có tác dụng ức chế trung bình sự sản sinh NO (83,2% và IC₅₀ = 14,5 ± 1,6 μM) so với chất đối chứng dương-Celastrol (116,6% và IC₅₀ = 1,0 ± 0,1 μM). Với tác dụng ức chế sự sản sinh NO, hợp chất gerontoxanthone I có tiềm năng trong điều trị viêm, từ đó định hướng hợp chất gerontoxanthone I có/hoặc không phối hợp với các thảo dược khác làm nguyên liệu sản xuất sản phẩm có tác dụng điều trị bệnh viêm.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình của giải pháp hữu ích cho phân lập và tinh chế hợp chất gerontoxanthone I với độ tinh khiết > 95% từ vỏ thân cây Bứa trâu (*Garcinia delphyana*) với hiệu suất chiết cao và có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế trung bình sự sản sinh NO. Bằng cách sử dụng sắc ký cột và điều chỉnh hệ dung môi tối ưu, quy trình cho phép chiết được hoạt chất có hiệu suất chiết cao, từ đó 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 gerontoxanthone I thu được từ quy trình theo giải pháp đã được chứng minh có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế sự sản sinh NO. 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 gerontoxanthone I có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO. Hợp chất gerontoxanthone I 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 bệnh viêm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập và tinh chế hợp chất gerontoxanthone I có tác dụng kháng viêm từ cây Bứa trâu (*Garcinia delphyana*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

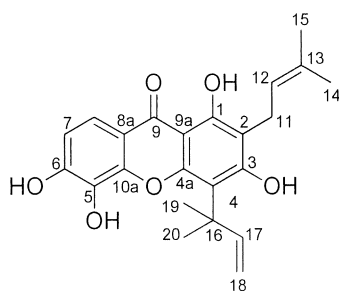
a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu vỏ thân của cây Bứa trâu, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ và sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,2 mm thu được nguyên liệu bột vỏ thân cây Bứa trâu;

b) chiết nguyên liệu bằng cách chiết nguyên liệu bột vỏ thân cây Bứa trâu với ête dầu hỏa theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) sử dụng thiết bị chiết Soxhlet, thời gian chiết từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 60°C, sau khi cất loại dung môi thu được phần cao chiết;

c) thu phân đoạn chứa hợp chất gerontoxanthone I bằng cách nhồi phần cao chiết thu được ở bước b) lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh, tiến hành rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 7/1 và 5/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 5/1;

d) thu hợp chất gerontoxanthone I thô bằng cách nhồi phân đoạn *n*-hexan/axeton là 5/1 thu được ở trên lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là diclometan/metanol lần lượt theo tỷ lệ 50/1, 20/1 và 10/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclometan/metanol là 10/1; và

e) tinh chế hợp chất gerontoxanthone I bằng cách nhồi phân đoạn có tỷ lệ diclometan/metanol là 10/1 lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (theo tỷ lệ 2/1, 3/1, và 4/1, thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất gerontoxanthone I tinh thể hình kim, màu vàng và có công thức (1):



(1)