



(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)



2-0003456

(51) C07H 1/08
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00091

(22) 05/03/2021

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/06/2021 399

(73) Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Mai Phương (VN); Nguyễn Thị Hồng Minh (VN).

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP ASTILBIN CÓ HOẠT TÍNH CẢM ỨNG TÁI TẠO XƯƠNG
TỪ RỄ CÂY THUỐC THỎ PHỤC LINH (*SMILAX GLABRA* ROXB)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập quy trình phân lập astilbin có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ rễ cây thuốc Thỏ phục linh (*Smilax glabra* Roxb), trong đó quy trình bao gồm các bước: thu cao chiết tổng số bằng cách xay nhỏ rễ cây Thỏ Phục linh thành bột rồi ngâm chiết với etanol, loại bỏ dung môi; tạo phân đoạn chiết bằng cách cho cao chiết tổng hòa loãng với nước rồi đem chiết phân đoạn với dung môi etyl axetat 03 lần, gộp các dịch chiết phân đoạn và cất để loại bỏ dung môi; phân lập astilbin bằng cách cho cao chiết phân đoạn phân tách trên cột sắc thu được 9 phân đoạn từ H1 đến H9, trong đó phân đoạn H6 giàu astilbin; và tinh chế astilbin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến một quy trình phân lập astilbin có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ rễ cây thuốc Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb).

Bệnh loãng xương đang là căn bệnh phổ biến toàn cầu. Loãng xương làm tăng tính giòn của xương dẫn đến dễ bị gãy, vì thế ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe, cuộc sống của mỗi cá nhân và cả cộng đồng xã hội. Các tổ chức y tế đang rất quan tâm và mong muốn cải thiện được tình trạng này nhằm nâng cao sức khỏe cũng như chất lượng cuộc sống của con người. Tỷ lệ người bị loãng xương đang ngày một tăng lên ở cả các nước phát triển và đang phát triển, đặc biệt là với những người có tuổi. Các số liệu thống kê cho thấy khoảng trên 200 triệu người trên toàn thế giới bị bệnh này và khoảng 2,8 triệu người Việt Nam đang mắc phải bệnh loãng xương.

Loãng xương xảy ra do sự mất cân bằng giữa sự mất xương và sự hình thành xương, trong đó sự hình thành xương xảy ra chậm hơn sự mất xương. Vì vậy, các nghiên cứu tập trung vào việc tìm kiếm các chất có hoạt tính làm tăng sự hình thành xương hoặc làm giảm sự mất xương để điều trị loãng xương đang là hướng nghiên cứu rất được quan tâm. Phần lớn các thuốc trên thị trường là các tác nhân làm giảm sự mất xương. Trong khi đó, chỉ có rất ít chất có khả năng cảm ứng làm tăng sự tạo xương. Thêm vào đó, việc sử dụng các thuốc hóa học hiện nay để xử lý loãng xương có một số hạn chế về hiệu quả cũng như gây phản ứng phụ khi sử dụng lâu dài. Do đó, việc phát hiện và sử dụng những chất tự nhiên có khả năng cảm ứng tái tạo xương mới, ít gây phản ứng phụ để xử lý bệnh loãng xương và duy trì độ bền của xương là hướng nghiên cứu mới, có nhiều tiềm năng ứng dụng để xử lý bệnh loãng xương cũng như các bệnh liên quan khác.

Các chất cảm ứng tái tạo xương có khả năng điều trị bệnh thông qua việc ức chế hoạt tính của tế bào hấp thụ xương osteoclast (bone-resorption cell) và kích thích biệt hóa tế bào tạo xương osteoblast (bone-forming cell). Hoạt tính này liên quan đến khả năng làm tăng

hoạt tính enzym alkin phosphat (ALP) và sự khoáng hóa ở tế bào tạo xương. Đây là những chỉ thị phân tử quan trọng đầu tiên được dùng để sàng lọc hoạt tính cảm ứng tái tạo xương.

Hướng nghiên cứu để tìm ra các chất có triển vọng nhằm ứng dụng trong điều trị loãng xương và các bệnh về xương đã và đang nhận được rất nhiều sự quan tâm, chú ý. Một trong số này là các nghiên cứu về các chất tự nhiên từ các cây dược liệu. Các cây thuốc sẽ là đối tượng rất tiềm năng để phân lập và nghiên cứu các chất có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương mới, làm cơ sở chứng minh tác dụng cũng như ứng dụng của chúng.

Astilbin là một chất tự nhiên chính thuộc nhóm flavonoid trong cây thuốc Thổ phục Linh (*Smilax glabra* Roxb). Nó có hoạt tính ức chế enzym alpha glucosidaza và alpha amylaza. Ngoài ra, chất này cũng đã được phát hiện thấy có hoạt tính chống oxy hóa thông qua tác dụng ức chế sự oxy hóa của hợp chất hóa học hữu cơ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Một số nghiên cứu khác cho thấy astilbin có hoạt tính kháng khuẩn và ức chế sự phát triển của tế bào ung thư. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào đề cập đến tác dụng cảm ứng tái tạo xương của astilbin.

Trong giải pháp hữu ích này, chúng tôi đề cập đến quy trình phân lập astilbin có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ rễ cây thuốc Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Astilbin là một chất tự nhiên có trong một số thực vật, đặc biệt có hàm lượng cao ở cây thuốc Thổ phục linh. Các nghiên cứu trước đây đã phân lập chất này và chứng minh tác dụng kháng các vi khuẩn gây bệnh, chống oxy hóa, ức chế các enzym thủy phân tinh bột như alpha-glucosidaza và alpha-amylaza. Tuy nhiên, chất này hay chế phẩm chứa chất này hiện nay chưa được thương mại hóa để dùng làm thuốc hay thực phẩm chức năng. Giải pháp hữu ích này đề cập đến quy trình phân lập astilbin từ rễ cây thuốc Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb) và chứng minh tác dụng cảm ứng tái tạo xương của chất này trên tế bào nguyên bào xương osteoblast.

Chế phẩm thu nhận được có hàm lượng astilbin cao và được khẳng định có chứa astilbin thông qua phân tích các phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ khối (LC-MS). Hiện nay, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành nhằm phân lập chất này có thể kể đến là: Sáng chế có số đơn: No 1-2014-03769 (2015) ban hành theo Quyết định số 92/QĐ-SHTT ngày 05/01/2015 của các tác giả Nguyễn Quốc Vương, Trịnh Thị Thanh Vân, Vũ Văn Chiến,

Phạm Thị Hằng, Nguyễn Thị Huệ, Phạm Văn Cường, Châu Văn Minh đã đề cập đến “Quy trình điều chế chế phẩm chống oxy hóa từ rễ Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb.) và chế phẩm chống oxy hóa được điều chế bằng quy trình này”.

Bài báo: T. T. T. Van, V. V. Chien, P. T. Hang, P. V. Cuong, N. Q. Vuong (2015) “Antioxidant activity of extracts and astilbin from the root of *Smilax glabra* of Vietnam”, *Malaysian J Chem* 17, 12-19. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã phân lập astilbin sử dụng dịch chiết phân đoạn từ etanol, hexan và etyl axetat. Phân đoạn etyl axetat được chạy sắc ký trên cột silica gel (n-hexan/EtOAc, theo tỉ lệ 2/1, v/v) và kết tinh lại trong MeOH/H₂O (theo tỷ lệ 1/1, v/v) rồi tiếp tục sử dụng cột sắc ký đảo pha C18 để thu astilbin có độ sạch > 97% phân tích bằng HPLC. Các chất astilbin và phân đoạn giàu astilbin thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tốt khi sử dụng các phương pháp thử là DPPH (SC₅₀ đạt 24.9 µg/ml), và TBARS (IC₅₀ đạt 9.45).

Bài báo: Xinyu Zhao, Ruyi Chen, Yueyue Shi, Xiaoxi Zhang, Chongmei Tian and Daozong Xia (2020), “Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids from *Smilax glabra* Roxb.”, *Molecules*. 25, 5295. Trong công bố này, các tác giả đã phân lập được 6 chất flavonoid từ *Smilax glabra* trong đó có astilbin sử dụng cột sắc ký siêu lọc UPLC và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và kháng viêm *in vitro* của các chất này.

Bài báo: Nguyen Thi Mai Phuong, Ngo Van Quang, Nguyen Thi Hong Minh, Alan Maccarone, Stephen G. Pyne (2019), “ α -glucosidase inhibitory activity of the extracts and major phytochemical components of *Smilax glabra* Roxb.”, *Nat Prod J*. 10: 26-32. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã phân lập chất astilbin từ *Smilax glabra* Roxb sử dụng cột sắc ký silica gel với dung môi DCM : MeOH tỉ lệ 8 : 2 và tiến hành kết tinh phân đoạn nhiều lần để thu chất sạch. Chất astilbin thu được đã được đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidaza và cho thấy có khả năng ức chế hoạt tính enzyme này cao so với chất đối chứng dương.

Hiện nay, chưa có nghiên cứu nào đề cập đến tác dụng tái tạo xương của astilbin. Do đó, vẫn có nhu cầu về quy trình phân lập astilbin nhằm khai thác một cách hiệu quả nguồn nguyên liệu rễ cây thuốc Thổ phục linh vừa đơn giản, hiệu quả, có khả năng áp dụng được trong thực tiễn.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích này là đưa ra quy trình mới, đơn giản để thu nhận chất astilbin từ rễ cây thuốc Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb) có tác dụng cảm ứng tái tạo xương. Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập astilbin có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ rễ cây thuốc Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb), trong đó quy trình bao gồm các bước:

- a) thu cao chiết tổng số bằng cách xay nhỏ rễ cây Thổ Phục linh thành bột rồi ngâm chiết với etanol 03 lần ở nhiệt độ phòng, gộp các dịch chiết thu được dịch chiết tổng, cô quay chân không ở nhiệt độ 45°C, loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu cao chiết tổng;
- b) tạo phân đoạn chiết bằng cách cho cao chiết tổng hòa loãng với nước theo tỉ lệ 1:1 (v/v) rồi đem chiết phân đoạn với dung môi etyl axetat 03 lần, gộp các dịch chiết phân đoạn và cất để loại bỏ dung môi ở nhiệt độ 45°C dưới áp suất giảm để thu cao chiết phân đoạn;
- c) phân lập astilbin bằng cách cho cao chiết phân đoạn phân tách trên cột sắc ký sử dụng chất hấp phụ silicagel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh., Merck, tỉ lệ cao chiết/chất hấp phụ là 1:150, w/w), dung môi rửa giải là diclometan (DCM)-MeOH theo tỷ lệ 8:2 (v/v) etyl thu được 9 phân đoạn từ H1 đến H9, trong đó phân đoạn H6 giàu astilbin; và
- d) tinh chế astilbin bằng cách rửa nhanh từ 2 đến 3 lần phân đoạn H6 thu được dưới dạng chất kết tinh rắn, màu trắng ngà với dung môi n-hexan với 3 mL dung môi mỗi lần, loại bỏ dịch rửa và để bay hơi qua đêm thu được chất kết tủa màu trắng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là cấu trúc của astilbin from *S. glabra* ($C_{21}H_{22}O_{11}$; MW=450).

Hình 2 là lựa chọn hệ dung môi cho cột sắc ký silica gel phân tách chất astilbin, trong đó: A.EtOAc/Acetone (8:3); B. DCM/MeOH (5:3); C. DCM/MeOH(8:2).

Hình 3 là khả năng sống sót của tế bào tạo xương osteoblast MC3T3-E1 khi có mặt của astilbin và chế phẩm chứa astilbin, trong đó độc tính của chế phẩm chứa astilbin (A) và astilbin (B) trên tế bào nguyên bào xương MC3T3-E1.

Hình 4 là ảnh hưởng của chế phẩm (A) và Astilbin (B) lên hoạt tính ALP của tế bào nguyên xương MC3T3-E1.

Hình 5 là ảnh hưởng của chế phẩm chứa astilbin (A) và chất astilbin (B) lên hoạt tính khoáng hóa của tế bào tạo xương MC3T3-E1.

Hình 6 là quy trình phân lập astilbin có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích sẽ được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả giải pháp hữu ích chứ không nhằm làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Quy trình phân lập astilbin có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ rễ cây thuốc Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb), trong đó quy trình bao gồm các bước:

a) thu cao chiết tổng số bằng cách xay nhỏ rễ cây Thổ Phục linh thành bột rồi ngâm chiết với etanol 03 lần ở nhiệt độ phòng, gộp các dịch chiết thu được dịch chiết tổng, cô quay chân không ở nhiệt độ 45°C, loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu cao chiết tổng;

b) tạo phân đoạn chiết bằng cách cho cao chiết tổng hòa loãng với nước theo tỉ lệ 1:1 (v/v) rồi đem chiết phân đoạn với dung môi etyl axetat 03 lần, gộp các dịch chiết phân đoạn và cất để loại bỏ dung môi ở nhiệt độ 45°C dưới áp suất giảm để thu cao chiết phân đoạn;

c) phân lập astilbin bằng cách cho cao chiết phân đoạn phân tách trên cột sắc ký sử dụng chất hấp phụ silicagel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh., Merck, tỉ lệ cao chiết/chất hấp phụ là 1:150, w/w), dung môi rửa giải là diclometan (DCM)-MeOH theo tỷ lệ 8:2 (v/v) etyl thu được 9 phân đoạn từ H1 đến H9. Trong 9 phân đoạn từ H1 đến H9 có phân đoạn H6 giàu astilbin.

Các tác giả giải pháp hữu ích đã phát hiện được dung môi rửa giải DCM-MeOH là hệ dung môi có tính ưu nước cao và khi sử dụng dung môi này để rửa giải một cách trực tiếp mà không cần dùng gradient. Bằng các thực nghiệm các tác giả đã tìm ra tỷ lệ DCM-MeOH là 8:2 (v/v) là tỷ lệ tối ưu cho phép phân tách hiệu quả tốt nhất chất astilbin từ cao chiết etyl axetat và thành phần các chất được phân tách rõ ràng, chất astilbin có giá trị R_f phù hợp để chạy sắc ký cột và tách biệt rõ ràng với các chất khác.

d) tinh chế astilbin bằng cách rửa nhanh từ 2 đến 3 lần phân đoạn H6 thu được dưới dạng chất kết tinh rắn, màu trắng ngà với dung môi n-hexan với 3 mL dung môi mỗi lần, loại bỏ dịch rửa và để bay hơi qua đêm thu được chất kết tủa màu trắng.

Chất astilbin thu được đã được khẳng định cấu trúc bằng phổ NMR và HPLC-MS. Với quy trình này, hiệu suất thu hồi chất astilbin đạt khoảng 0,3% và hiệu suất thu hồi chế phẩm chứa astilbin đạt khoảng > 1%.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Quy trình phân lập astilbin từ rễ cây thuốc Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb)

Từ 1000 g bột rễ Thổ phục linh được ngâm trong etanol ở nhiệt độ phòng, sau khi loại dung môi dưới áp suất thấp bằng máy cô quay chân không ở nhiệt độ 45°C, mẫu cao còn tổng số thu được là 20 g. Sau đó, cao còn được tách chiết với dung môi etyl axetat bằng cách hòa tan vào nước theo tỉ lệ 1:1 rồi chiết lần lượt với dung môi này 3 lần để thu được 11,26 g cao phân đoạn etyl axetat. Đây chính là chế phẩm có chứa chất astilbin chủ yếu được xác định bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) và khối phổ.

Để tiến hành tinh sạch astilbin từ phân đoạn EtOAc, phương pháp sắc ký cột silica gel đã được sử dụng. Hệ dung môi phù hợp cho chạy cột sắc ký phân đoạn EtOAc đã được xác định dựa trên sắc ký đồ chạy TLC của mẫu trong các hệ dung môi khác nhau là EtOAc/Axeton tỉ lệ 8:3; DCM/MeOH tỉ lệ 5:3 và DCM/MeOH tỉ lệ 8:2. Kết quả chạy TLC trên Hình 2 cho thấy hệ dung môi DCM/MeOH tỉ lệ 8:2 là phù hợp nhất để phân tách chất quan tâm trong dịch chiết phân đoạn này vì thành phần các chất được phân tách rõ ràng, chất astilbin có giá trị R_f phù hợp để chạy sắc ký cột và tách biệt rõ ràng với các chất khác.

Cột chạy sắc ký có kích thước 6 x 80 cm, được rửa trong hệ dung môi 80% DCM : MeOH theo tỉ lệ 8:2. Các phân đoạn rửa chiết 5 ml được thu lại và chạy sắc ký lớp mỏng (TLC) để theo dõi sự xuất hiện của các chất phân tách ra khỏi cột. Các phân đoạn sắc ký sau đó được dồn lại dựa trên kết quả TLC thu được. Trong thí nghiệm này, 9 phân đoạn khác nhau ký hiệu là F1-F9 đã được thu lại. Tại phân đoạn F6, chất kết tinh rắn, màu trắng ngà đã được hình thành.

Chất kết tinh thu được sau đó được rửa nhanh với dung môi n-hexan và tiến hành chạy TLC sử dụng hệ dung môi DCM:MeOH (8:2) và EtOAc:MeOH:H₂O (8,5:1,0:0,5) để xác định độ sạch của chất thu được. Kết quả cho thấy chỉ còn một vạch duy nhất trên bản sắc ký chứng tỏ chất astilbin thu được đã tinh sạch (450 mg). Kết quả đo HPLC chất astilbin thu được sử dụng chất chuẩn (thương mại) cho thấy astilbin đã được tinh sạch với độ sạch đạt > 98%.

Để khẳng định cấu trúc của chất thu được là astilbin, phổ NMR ^1H , ^{13}C và các phổ 2D của chất này đã được đo, phân tích, đồng thời so sánh với tài liệu tham khảo. Kết quả phân tích đã khẳng định chất tinh sạch được là astilbin.

Ví dụ 2. Thu nhận chất astilbin và chế phẩm chứa chất astilbin từ rễ cây thuốc Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb)

1. Chuẩn bị phân đoạn chứa astilbin (chế phẩm chứa astilbin)

Nguyên liệu ở dạng bột mịn (3 kg) được chiết rút theo tỉ lệ 1 kg nguyên liệu: 3 lit dung môi etanol. Từ 3000 g bột rễ Thổ phục linh được ngâm trong etanol ở nhiệt độ phòng, sau khi loại dung môi ở nhiệt độ 45°C dưới áp suất thấp bằng máy cất quay chân không, mẫu cao còn tổng số thu được là 62 g. Sau đó, cao còn được tách chiết với dung môi etyl axetat bằng cách hòa tan vào nước rồi chiết lần lượt với dung môi này 3 lần để thu được 25,6 g cao phân đoạn etyl axetat có chứa chất astilbin chủ yếu được xác định bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) và khối phổ.

2. Phân tách chất trên cột sắc ký silica gel

Phân đoạn etyl axetat đã được đưa lên cột sắc ký silica gel có kích thước 10 x 70 cm. Hệ dung môi phù hợp để tách chất quan tâm trên cột silica gel này đã được thử nghiệm và lựa chọn là DCM: MeOH theo tỉ lệ 8:2. Các phân đoạn rửa chiết 5 ml được thu lại và chạy sắc ký lớp mỏng (TLC) sử dụng hệ dung môi chạy cột (DCM:MeOH với tỷ lệ 8:2) để theo dõi sự xuất hiện của các chất phân tách ra khỏi cột. Các phân đoạn sắc ký sau đó được dồn lại dựa trên kết quả TLC thu được. Trong thí nghiệm này, 9 phân đoạn khác nhau ký hiệu là F1-F9 đã được thu lại. Tại phân đoạn F6, chất kết tinh rắn, màu trắng ngà đã được hình thành.

3. Thu nhận chất astilbin sạch bằng kết tinh phân đoạn

Chất kết tinh thu được sau đó được rửa nhanh với dung môi metanol và tiến hành chạy TLC sử dụng hệ dung môi DCM:MeOH (8:2) và EtOAc:MeOH:H₂O (8,5:1,0:0,5) để xác định độ sạch của chất. Kết quả cho thấy chỉ còn một vạch duy nhất trên bản sắc ký chứng tỏ chất astilbin thu được đã tinh sạch (1,34 g). Kết quả đo HPLC chất astilbin thu được sử dụng chất chuẩn (thương mại) cho thấy astilbin đã được tinh sạch với độ sạch đạt > 98%.

Để khẳng định cấu trúc của chất thu được là astilbin, phổ NMR ^1H , ^{13}C và các phổ 2D của chất này đã được đo, phân tích, đồng thời so sánh với tài liệu tham khảo. Kết quả phân tích đã khẳng định chất tinh sạch được là astilbin.

Ví dụ 3. Đánh giá độc tính của astilbin và chế phẩm chứa astilbin trên dòng tế bào thường

Khả năng sống sót của tế bào tạo xương osteoblast MC3T3-E1 được đánh giá bằng phương pháp MTT. Từ kết quả này, nồng độ chất mà không làm ảnh hưởng đến sự sống sót của tế bào sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu *in vitro* tiếp theo để đánh giá ảnh hưởng của chất quan tâm đến sự biệt hóa tế bào tạo xương osteoblast MC3T3-E1. Tế bào MC3T3-E1 được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS (fetal bovine serum) trong bể ủ nhiệt 37°C và 5% CO_2 . Sự biệt hóa tế bào được thực hiện trong môi trường osteogenic differentiation medium (ODM) bao gồm DMEM chứa FBS 5%, penicillin-streptomycin 1%, ascorbic acid 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dexamethasone 10 nM và β -glycerophosphate 10 mM. Tế bào sau đó được xử lý bằng astilbin và chế phẩm chứa astilbin ở các nồng độ khác nhau. Sau khi ủ và xử lý trong 48 giờ, môi trường được loại bỏ và các tế bào được ủ với dung dịch 0,5 mg / mL MTT trong 4 giờ ở 37°C và 5% CO_2 . Các số liệu về khả năng sống sót của tế bào được tính theo phần trăm so với nhóm không được xử lý (đối chứng). Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD, $n = 3$, $p < 0.5$. Các kết quả thu được trong Hình 3 cho thấy các nồng độ astilbin và chế phẩm chứa astilbin 5, 10, 25 và 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ đều không ảnh hưởng đến độ sống của tế bào.

Ví dụ 4. Đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm chứa astilbin và chất astilbin lên hoạt tính ALP của tế bào tạo xương

ALP là chỉ thị quan trọng biểu hiện quá trình tái tạo xương. Vì thế, ảnh hưởng của chế phẩm và Astilbin lên hoạt tính ALP của tế bào nguyên xương MC3T3-E1 đã được đánh giá.

Để đánh giá hoạt tính ALP, tế bào MC3T3-E1 được nuôi cấy trong đĩa 24 giếng trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS. Môi trường nuôi cấy sau đó được thay thế bằng môi trường DMEM mới có bổ sung chất nghiên cứu, hoặc không bổ sung những chất này để làm đối chứng và ủ trong 48 giờ. Sau đó, tế bào được rửa với đệm PBS kết hợp với đệm cacbonat (pH 10.3) 25 mM có chứa 0.1% Triton X-100. Tiếp theo, tế bào được ủ trong 1 giờ ở 37°C với đệm cacbonat 250 mM có chứa 1,5 mM MgCl_2 và 15 mM p-NPP. Với sự hiện diện của ALP, chất p-NPP (para-nitrophenol phosphate) sẽ được chuyển đổi thành p-

nitrophenol (có màu vàng) và phosphat vô cơ. Sau đó, hoạt tính ALP trong các mẫu được đo ở bước sóng 405 nm bằng máy đo quang phổ. Hoạt tính ALP được xác định dựa theo công thức:

$$\text{Hoạt tính ALP (\%)} = \frac{A - A_o}{A_o} \times 100\%$$

Trong đó:

- A là độ hấp phụ của tế bào được bổ sung chất nghiên cứu,
- A_o là độ hấp phụ của tế bào không được bổ sung chất nghiên cứu

Trong thí nghiệm này, tế bào được xử lý với chế phẩm* và chất astilbin ở các nồng độ khác nhau. Số liệu về hoạt tính ALP được tính theo phần trăm so với mẫu không được xử lý (đối chứng)*. Kết quả minh họa ở hình Hình 4 cho thấy các mẫu nghiên cứu astilbin và chế phẩm chứa astilbin có tác dụng kích thích hoạt tính enzym này. Astilbin đã làm tăng 8%, 18%, 22% và 1% ở các nồng độ 5, 10, 25 và 50 µg/mL.

Ví dụ 5. Đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm chứa astilbin và chất astilbin lên hoạt tính khoáng hóa của tế bào tạo xương

Sự khoáng hóa nền là giai đoạn cuối cùng trong quá trình biệt hóa nguyên bào xương được đặc trưng bởi sự lắng đọng canxi. Trong thí nghiệm này, việc xác định mức độ khoáng hóa được thực hiện đối với chế phẩm chứa astilbin và hợp chất astilbin. Tế bào MC3T3-E1 được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS có chứa vitamin C (50 µg / ml) và β-glycerolphosphate (10 mM) trong 2 tuần có/không có chất nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau và sau đó nhuộm với 40 mM Alizarin red-S (pH 4,2) trong 1 giờ. Các tế bào bị phân hủy trong 15 phút với 10% xetylpyridi clorua trong dung dịch đệm natri phosphat 10 mM (pH 7,0). Sau đó sự hình thành canxi được quan sát và xác định bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng 562 nm. Số liệu về hoạt động khoáng hóa được tính theo tỷ lệ phần trăm so với mẫu không được xử lý (đối chứng). Số liệu trong **Hình 5** chỉ ra rằng cả hai mẫu đều tăng cường hoạt động khoáng hóa theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Đối với astilbin, hoạt tính được tăng cường lên đến 14%, 20%, 41% và 44% ở các nồng độ tương ứng là 5, 10, 25, 50 µg / mL.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình phân lập astilbin theo giải pháp hữu ích thu được astilbin có độ tinh sạch đạt trên 98% từ rễ cây thuốc Thổ phục linh.

Quy trình phân lập astilbin theo giải pháp hữu ích thực hiện đơn giản thích hợp sử dụng trong lĩnh vực thực phẩm hoặc y tế để nghiên cứu ứng dụng chúng trong điều trị các bệnh liên quan đến xương.

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép tận dụng được nguồn nguyên liệu là rễ cây thuốc Thổ phục linh, từ đó có thể phát triển được nguồn nguyên liệu theo hướng bền vững, kết hợp trồng rừng và khai thác có hiệu quả, nên còn có hiệu quả lâu dài về mặt kinh tế, xã hội.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình phân lập astilbin có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ rễ cây thuốc Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb), trong đó quy trình bao gồm các bước:

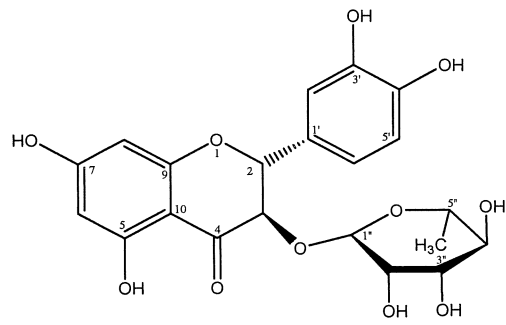
a) thu cao chiết tổng số bằng cách xay nhỏ rễ cây Thổ Phục linh thành bột rồi ngâm chiết với etanol 03 lần ở nhiệt độ phòng, gộp các dịch chiết thu được dịch chiết tổng, cô quay chân không ở nhiệt độ 45°C, loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu cao chiết tổng;

b) tạo phân đoạn chiết bằng cách cho cao chiết tổng hòa loãng với nước theo tỉ lệ 1:1 (v/v) rồi đem chiết phân đoạn với dung môi etyl axetat 03 lần, gộp các dịch chiết phân đoạn và cất để loại bỏ dung môi ở nhiệt độ 45°C dưới áp suất giảm để thu cao chiết phân đoạn;

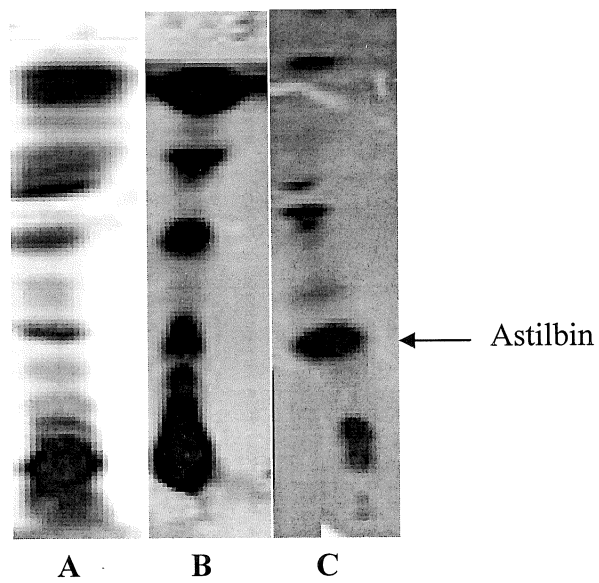
c) phân lập astilbin bằng cách cho cao chiết phân đoạn phân tách trên cột sắc ký sử dụng chất hấp phụ silicagel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh., Merck, tỉ lệ cao chiết/chất hấp phụ là 1:150, w/w), dung môi rửa giải là diclometan (DCM)-MeOH theo tỷ lệ 8:2 (v/v) etyl thu được 9 phân đoạn từ H1 đến H9, trong đó phân đoạn H6 giàu astilbin; và

d) tinh chế astilbin bằng cách rửa nhanh từ 2 đến 3 lần phân đoạn H6 thu được dưới dạng chất kết tinh rắn, màu trắng ngà với dung môi n-hexan với 3 mL dung môi mỗi lần, loại bỏ dịch rửa và để bay hơi qua đêm thu được chất kết tủa màu trắng.

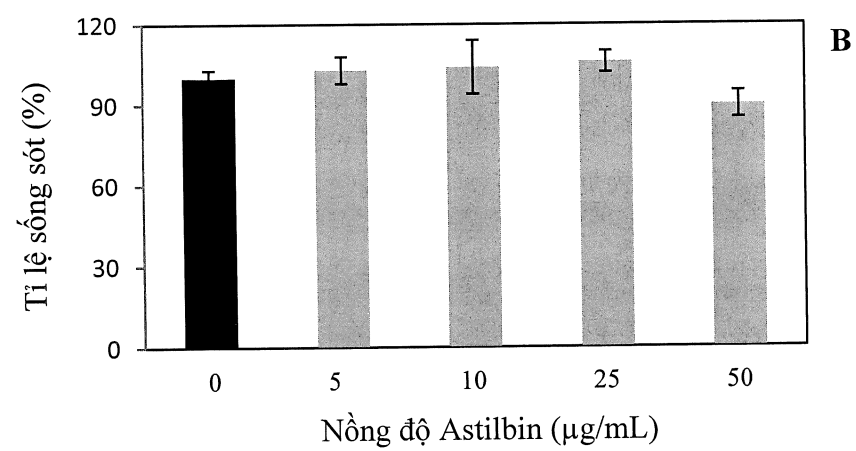
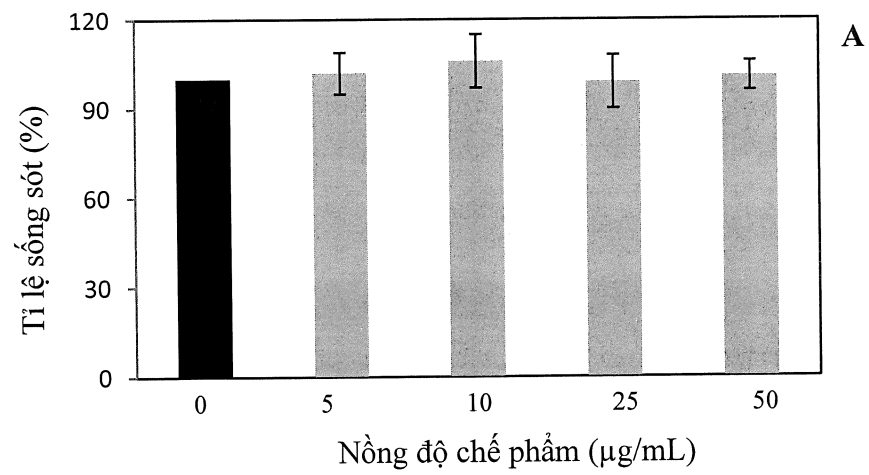
3456



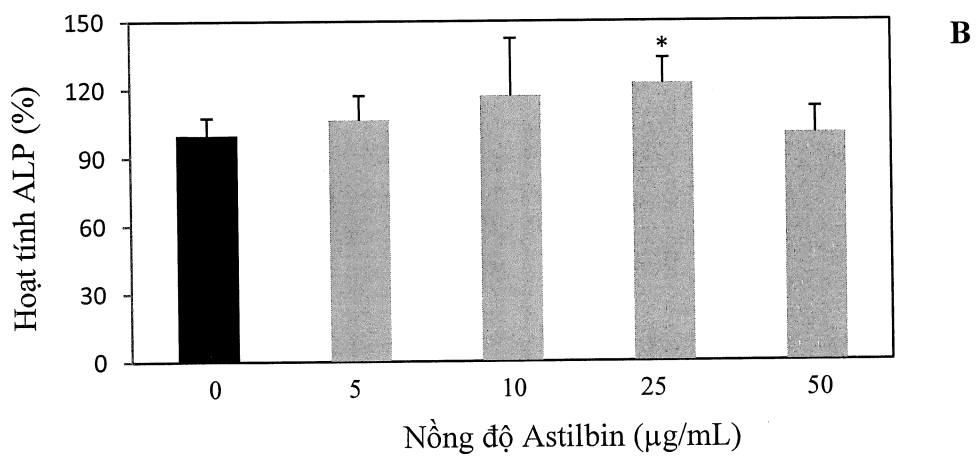
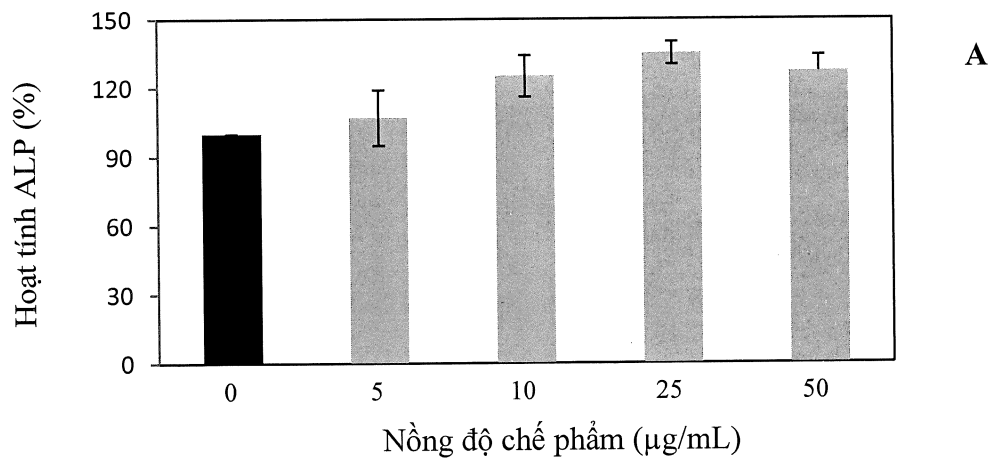
Hình 1



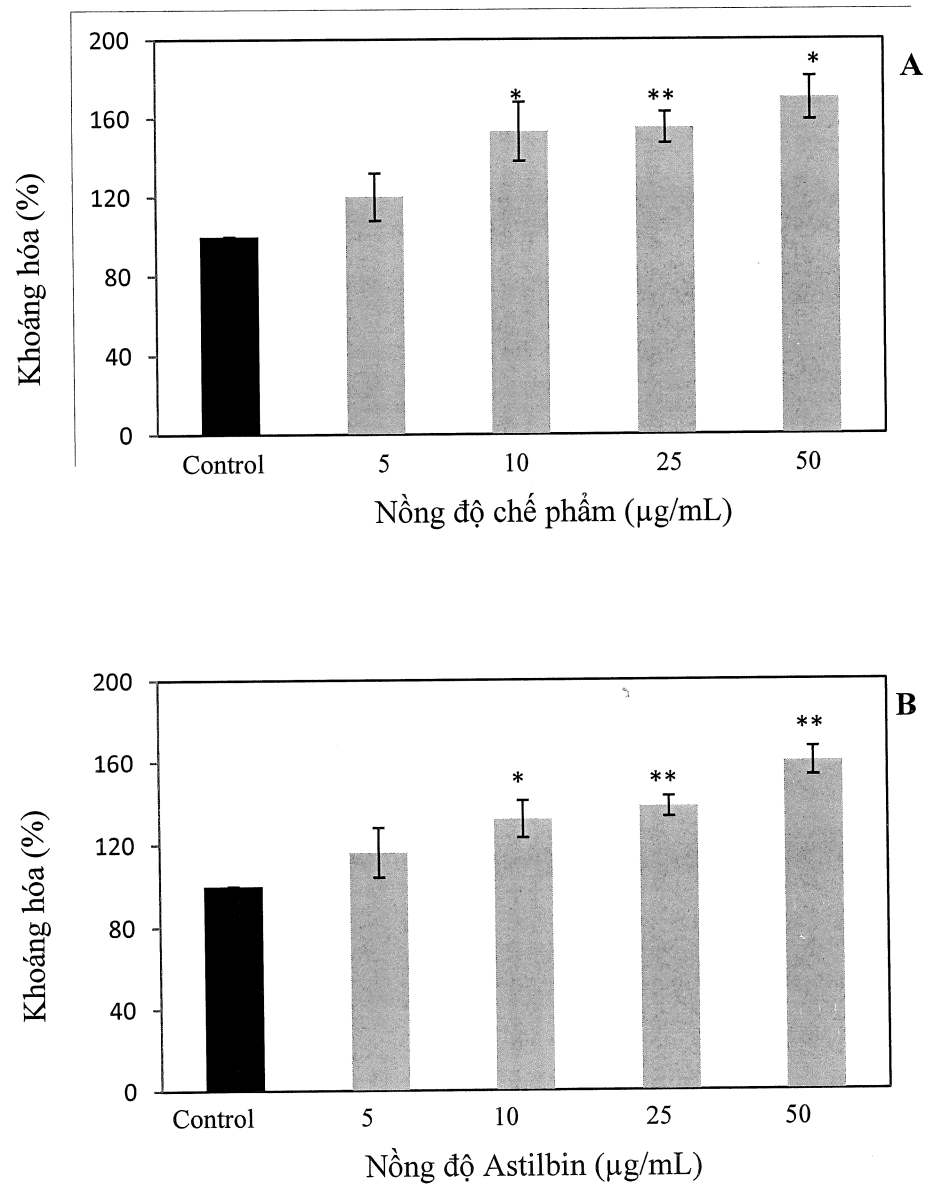
Hình 2



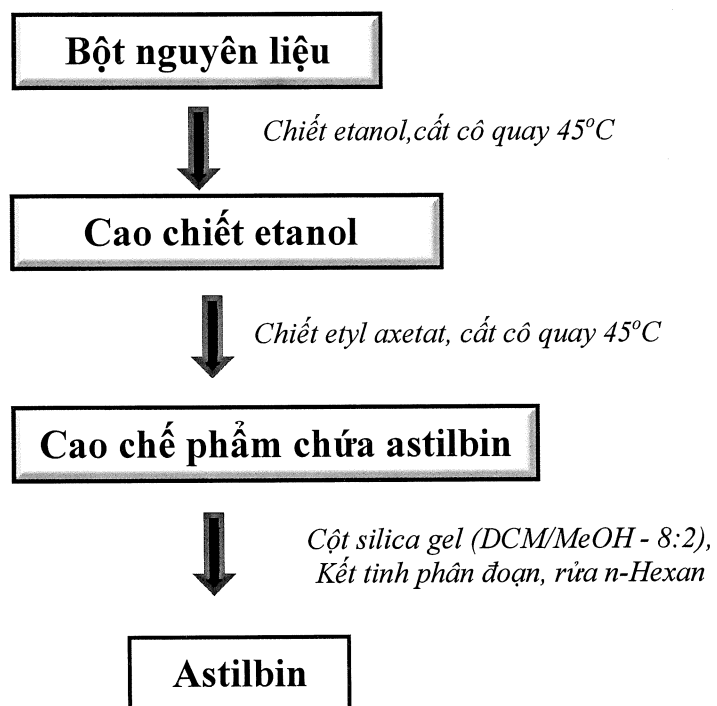
Hình 3



Hình 4



Hình 5



Hình 6