



(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)



2-0003581

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

(13) **Y**

(21) 2-2022-00105

(22) 15/03/2022

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/05/2022 410

(73) Trường Đại học Phenikaa (VN)

Đường Nguyễn Văn Trác, Phường Yên Nghĩa, Quận Hà Đông, Thành phố Hà Nội

(72) Tô Đạo Cường (VN); Nguyễn Phi Hùng (VN); Bùi Quang Thành (VN); Nguyễn Thị Ái Nhung (VN); Trần Quốc Toàn (VN); Đỗ Thị Thúy (VN); Trần Mạnh Hùng (VN); Phan Phước Hiền (VN); Ngũ Trường Nhân (VN); Phan Tứ Quý (VN); Nguyễn Thế Hùng (VN); Nguyễn Hữu Thọ (VN); Nguyễn Tiến Dũng (VN).

(54) **QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ TÍNH CHẾ HỢP CHẤT INTEGRIFOLIIDIOL TỪ NỤ
NGÔ THÙ DU (TETRADIUM RUTICARPUM) CÓ TÁC DỤNG ĐIỀU TRỊ BỆNH TIỂU
ĐƯỜNG**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tính chế hợp chất Integrifoliodiol có tác dụng điều trị bệnh tiểu đường từ nụ Ngô thù du (*Tetradium ruticarpum*). Quy trình theo giải pháp bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột nụ Ngô thù du; c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất Integrifoliodiol; d) chiết hợp chất Integrifoliodiol; e) thu hợp chất Integrifoliodiol thô; và f) tinh chế hợp chất Integrifoliodiol. Quy trình theo giải pháp thu được hợp chất Integrifoliodiol có công thức (1). Hợp chất Integrifoliodiol thu được từ quy trình theo giải pháp có tác dụng điều trị tiểu đường trên cơ sở ức chế enzym α -glucosidaza.

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 Integrifoliodiol từ nụ Ngõ thù du (*Tetradium ruticarpum* hoặc *Evodia rutaecarpa*). Hợp chất Integrifoliodiol 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 tiểu đường.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Bệnh tiểu đường là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trên toàn cầu. Theo ước tính của Hiệp hội đái tháo đường thế giới, hiện nay trên thế giới có khoảng 425 triệu người mắc bệnh tiểu đường, nghĩa là cứ 11 người thì có 1 người mắc bệnh tiểu đường. Trong đó, cứ 2 người mắc bệnh tiểu đường thì 1 người không biết mình bị bệnh (không đi kiểm tra chẩn đoán bệnh tiểu đường). Tại Việt Nam, tỷ lệ bệnh nhân tiểu đường đang gia tăng nhanh chóng, số người mắc bệnh tăng gấp đôi trong 10 năm qua. Năm 2017, thực trạng bệnh tiểu đường hiện nay ở Việt Nam với số bệnh nhân tiểu đường là 3,54 triệu người (chiếm tỷ lệ 5,5% dân số). Nhóm bệnh nhân tiền tiểu đường (bị rối loạn dung nạp glucose) là 4,79 triệu người (chiếm 7,4% dân số) (https://kienthuctieuduong.vn/kttdd_faq/thuc-trang-benh-tieu-duong-hien-nay-dang-duoc-canh-bao-nhu-the-nao/). Như vậy, cứ trong 7,5 người thì có một người mắc bệnh tiểu đường hoặc tiền tiểu đường. Con số bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường ở Việt Nam dự đoán sẽ tăng lên chiếm 7,7% dân số vào năm 2045. Có nhiều phương pháp để điều trị bệnh tiểu đường và một trong những phương pháp hay được sử dụng phổ biến hiện nay là sử dụng thuốc (Glucophage, Diamicron, Foxiga, v/v.). Tuy nhiên, thuốc điều trị tiểu đường 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 nụ Ngõ thù du (*Tetradium ruticarpum*), các tác giả đã phát hiện ra tác dụng điều trị bệnh tiểu đường tốt của dịch chiết nước và hợp chất rhetsinin được phân lập từ Ngõ thù du (Kato, A.; Yasuko, H.; Goto, H.; Hollinshead, J.; Nash, R.J.; Adachi, I. Inhibitory Effect of Rhetsinine

Isolated from *Evodia rutaecarpa* on Aldose Reductase Activity. *Phytomedicine* 2009, 16, 258–261). Ngoài ra, Evodiamine, một hoạt chất chính được tìm thấy trong loài Ngô Thù du có tác dụng chống béo phì và kháng insulin trên chuột (Wang, T.; Kusudo, T.; Takeuchi, T.; Yamashita, Y.; Kontani, Y.; Okamatsu, Y.; Saito, M.; Mori, N.; Yamashita, H. Evodiamine Inhibits Insulin-Stimulated MTOR-S6K Activation and IRS1 Serine Phosphorylation in Adipocytes and Improves Glucose Tolerance in Obese/Diabetic Mice. *PLoS ONE* 2013, 8, e83264). Tuy nhiên, tác dụng điều trị bệnh tiểu đường của các dịch chiết và hợp chất khác trong cây Ngô thù du lại chưa được nghiên cứu, trong đó có hợp chất Integrifoliodiol.

Integrifoliodiol là một phenol tự nhiên và thuộc khung phenylpropanoit. Phân tử này bao gồm một khung chính phenylpropanoit liên kết với một nhóm *trans*-3-hydroxy-1-propenyl ở vị trí C-4. Integrifoliodiol ngoài sản xuất từ con đường tổng hợp thì nó còn được sản xuất từ một số loài thực vật và được liệu thuộc chi Xuyên tiêu (*Zanthoxylum schinifolium*, *Zanthoxylum integrifoliolum*, *Zanthoxylum tessmannii*, v/v.). Hợp chất Integrifoliodiol 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 etyl 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 Integrifoliodiol từ nụ Ngô thù du. Do đó, giải pháp này đưa ra quy trình phân lập và tinh chế hợp chất Integrifoliodiol có hoạt tính sinh học, cụ thể là có tác dụng điều trị tiểu đường từ nụ Ngô thù du (*Tetradium ruticarpum*). Sử dụng nụ Ngô thù du (*Tetradium ruticarpum*), quy trình phân lập và tinh chế tối ưu hợp chất Integrifoliodiol bằng sắc ký cột cho hiệu suất cao, độ tinh sạch của sản phẩm > 95%, chi phí thấp và có tác dụng sinh học (ức chế enzyme α -glucosidaza) 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 Integrifoliodiol từ nụ Ngô thù du (*Tetradium ruticarpum*) có tác dụng điều trị bệnh tiểu đường và hợp chất Integrifoliodiol thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề xuất quy trình phân lập và tinh chế hợp chất Integrifoliodiol có tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza từ nụ Ngô thù du (*Tetradium ruticarpum*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu nụ Ngô thù du (*Tetradium ruticarpum*), 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 nụ thành bột;

b) chiết bột nụ Ngô thù du bằng cách bổ sung phần bột thu được ở bước a) vào dung môi metanol theo tỷ lệ 1/4 (khối lượng/thể tích), tiến hành chiết bột nụ trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 80 đến 100 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, sau đó thu dịch chiết và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết metanol (TRM);

c) hòa tan cao chiết TRM bằng cách hòa tan cao chiết TRM vào nước nóng theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết TRM thu được hỗn hợp dạng lỏng;

d) chiết bằng etyl axetat bằng cách bổ sung etyl axetat vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước c) theo tỷ lệ 1/1 (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 (TRE);

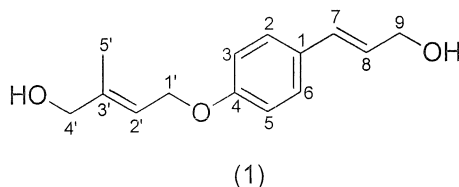
e) thu phân đoạn chứa hợp chất phenylpropanoit bằng cách đưa phân đoạn chứa cao chiết TRE thu được ở bước d) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 63 đến 200 mesh) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 20/1, 15/1, 10/1, 7/1, 5/1, 4/1, 3/1, 2/1, 1/1 và 0/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 15/1 và có kí hiệu là TRE-2;

f) thu hợp chất phenylpropanoit thô bằng cách hòa tan phân đoạn TRE-2 thu được ở bước e) bằng metanol cho đến khi bão hòa, để lạnh qua đêm ở -4°C tạo kết tủa, loại kết tủa, thu phần hòa tan trong dung môi metanol và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được phân đoạn chứa hợp chất phenylpropanoit thô (TRE-2S);

g) tinh chế hợp chất phenylpropanoit bằng cách hòa tan phân đoạn có kí hiệu TRE-2S lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 40 đến 63 mesh) theo tỷ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/etyl axetat theo

tỷ lệ 10/1 thu được hợp chất phenylpropanoit có công thức (1) dạng tinh thể hình kim không màu.

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



Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết bằng metanol được thực hiện 3 lần và bước chiết bằng etyl axetat được thực hiện 4 lần.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hệ dung môi rửa giải trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất Integrifoliodiol 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 Integrifoliodiol bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi diclorometan/axeton hoặc diclorometan/metanol để thu hợp chất Integrifoliodiol tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất Integrifoliodiol 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 tiểu đường.

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 Integrifoliodiol có tác dụng điều trị bệnh tiểu đường từ nụ Ngô thù du (*Tetradium ruticarpum*) và hợp chất Integrifoliodiol 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 Integrifoliodiol có tác dụng điều trị bệnh tiểu đường từ nụ Ngô thù du (*Tetradium ruticarpum*), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột nụ Ngô thù du; c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất

Integrifoliodiol; d) thu hợp chất Integrifoliodiol thô; và e) tinh chế hợp chất Integrifoliodiol.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, thu nụ Ngô thù du, 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 nụ Ngô thù du.

Trong bước chiết bột nụ Ngô thù du, tiến hành chiết ba lần phần bột thu được ở trên bằng metanol theo tỷ lệ 1/4 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 80 đến 100 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 40 đến 60°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 metanol (TRM).

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

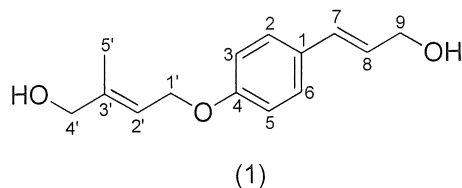
Trong bước thu cao chiết etyl axetat, bổ sung etyl axetat vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở trên, sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi etyl axetat và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etyl axetat (TRE).

Trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất phenylpropanoit, đưa phân đoạn chứa cao chiết TRE lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 63 đến 200 mesh) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 20/1, 15/1, 10/1, 7/1, 5/1, 4/1, 3/1, 2/1, 1/1 và 0/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 15/1 và có kí hiệu là TRE-2.

Trong bước thu hợp chất phenylpropanoit, hòa tan phân đoạn TRE-2 bằng metanol cho đến khi bão hòa, để lạnh qua đêm ở -4°C tạo kết tủa, loại kết tủa, thu phần hòa tan trong dung môi metanol và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được phân đoạn chứa hợp chất phenylpropanoit thô (TRE-2S).

Trong bước tinh chế hợp chất phenylpropanoit, hòa tan phân đoạn có kí hiệu TRE-2S lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 40 đến 63 mesh) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ 10/1 thu được hợp chất phenylpropanoit có công thức (1) dạng tinh thể hình kim không màu.

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



Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết bằng metanol được thực hiện 3 lần và bước chiết bằng etyl axetat được thực hiện 4 lần.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hệ dung môi rửa giải trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất Integrifoliodiol 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 Integrifoliodiol bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi diclorometan/axeton hoặc diclorometan/metanol để thu hợp chất Integrifoliodiol tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất Integrifoliodiol 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 tiểu đường.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích ✓

Ví dụ 1: Phân lập và tinh chế hợp chất phenylpropanoit từ nụ Ngô thù du (Tetradium ruticarpum).

Thu hạt Ngô thù du, loại bỏ tạp chất, rửa sạch bằng nước cất, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C đến khối lượng không đổi sau đó nghiền nhỏ thành bột (có kích thước 0,2 mm) và thu được 1,2 kg bột. Phần bột này được chiết ba lần bằng metanol (3 x 5,0 L) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 80 đến 100 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, sau khi cô quay loại bỏ dung môi thu được cao metanol (TRM; 200 g). Cao chiết TRM được hòa tan vào 1,0 L nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết TRM thu được hỗn hợp dạng lỏng. Bổ sung 1,0 L etyl axetat (4 x 1,0 L) 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 etyl axetat và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết etyl axetat (TRE; 65,2 g). Cao chiết TRE (65,2 g) được đưa lên cột sắc ký

với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 63 đến 200 mesh) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 20/1, 15/1, 10/1, 7/1, 5/1, 4/1, 3/1, 2/1, 1/1 và 0/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 15/1 và có kí hiệu là TRE-2 (420 mg). Phân đoạn TRE-2 (420 mg) tiếp tục được hòa tan bằng metanol cho đến khi bão hòa, để lạnh qua đêm ở -4°C tạo kết tủa, loại kết tủa, thu phần hòa tan trong dung môi metanol và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu phân đoạn chứa hợp chất phenylpropanoit thô và có kí hiệu là TRE-2S (95 mg). Hòa tan phân đoạn có kí hiệu TRE-2S (85 mg) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 40 đến 63 mesh) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ 10/1 thu được hợp chất phenylpropanoit có tên là Integrifoliodiol (19,5 mg) có công thức (1) dạng tinh thể hình kim không màu.

Ví dụ 2: Định tính và định lượng hợp chất phenylpropanoit được phân lập và tinh chế từ nụ Ngô thù du (Tetradium ruticarpum).

Hợp chất tinh thể hình kim, không màu 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 phenylpropanoit có công thức (1)

- Tên theo IUPAC: (*E*)-4-(4-((*E*)-3-hydroxyprop-1-en-1-yl)phenoxy)-2-methylbut-2-en-1-ol.

- Mô tả: Chất dạng tinh thể hình kim, không màu, tan tốt trong dung môi clorofoc. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha thuận trắng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), dung môi triển khai là *n*-hexan/axeton = 5/1 (v/v); $R_f = 0,45$.

- CTPT: C₁₄H₁₈O₃ (M = 234).

- Phổ khối phân giải thấp FAB-MS m/z : 257.03 [M + Na]⁺ (C₁₄H₁₈O₃Na).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR ((400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7,32 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2/H-6); 6,87 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-3/H-5); 6,55 (1H, br d, $J = 16,0$ Hz, H-7); 6,21 (1H, dt, $J = 16,0$; 6,0 Hz, H-8); 4,30 (2H, dd, $J = 6,0$; 1,2 Hz, H-9); 4,59 (2H, br d, $J = 6,4$ Hz, H-1'); 5,77 (1H, m, H-2'); 4,09 (2H, s, H-4'); 1,77 (3H, s, H-5').

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_c (ppm): 129,5 (C-1); 127,6 (C-2/C-6); 114,9 (C-3/C-5); 158,4 (C-4); 130,9 (C-7); 126,2 (C-8); 63,9 (C-9); 64,3 (C-1'); 119,7 (C-2'); 140,1 (C-3'); 67,8 (C-4'); 14,0 (C-5').

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

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza của hợp chất Integrifoliodiol phân lập từ nụ Ngô thù du (Tetradium ruticarpum).

Để xác định hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza của hợp chất Integrifoliodiol phân lập từ nụ Ngô thù du thu được từ Ví dụ 1, tiến hành thử nghiệm theo phương pháp của Hogan và cộng sự (Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Sun, S., Canning, C., Zhou, K. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutrition & Metabolism*, 2010, 7, 71-79). 50 μL dung dịch mẫu thử được pha trong đệm sodium phosphate 100 mM, (pH 6,8), DMSO 5 % được nạp lên đĩa 96 giếng, 40 μL dung dịch enzym α -glucosidaza 0,2 U/mL, hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng 20 phút. Tiếp tục bổ sung 40 μL cơ chất p-NPG (*p*-nitrophenyl glucopyranoside) 5 mM, ủ 20 phút ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng 130 μL dung dịch Na_2CO_3 0,2 M được đặt vào giếng để dừng phản ứng. Tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 405 nm. Mẫu trắng là mẫu không chứa enzym, mẫu chứng âm là mẫu không chứa mẫu thử. Mẫu chứng dương là acarbose. Phần trăm ức chế được tính theo công thức $\% \text{IC} = [1 - (\text{OD mẫu thử} - \text{OD mẫu trắng}) / (\text{OD đối chứng âm} - \text{OD mẫu trắng âm})] \times 100$.

Bảng 1. Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza của hợp chất Integrifoliodiol tách từ phân đoạn phụ TRE-2S.

Hợp chất	IC_{50} (μM)
Integrifoliodiol	$167,4 \pm 1,4$
Acarbose	$152,4 \pm 0,6$

Kết quả bảng 1 cho thấy hợp chất Integrifoliodiol ức chế enzym α -glucosidaza với giá trị $167,4 \pm 1,4$ μM và mạnh tương đương so với chất đối chứng dương Acarbose ($152,4 \pm 0,6$ μM). Như vậy, Integrifoliodiol được coi là hợp chất tiềm năng

ức chế mạnh enzym α -glucosidaza, từ đó định hướng hợp chất Integrifoliodiol có/hoặc không phối hợp với các thảo dược khác làm nguyên liệu sản xuất sản phẩm có tác dụng điều trị tiểu đường.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình của giải pháp hữu ích cho phân lập và tinh chế hợp chất Integrifoliodiol với độ tinh khiết $> 95\%$ có tác dụng điều trị tiểu đường, trên cơ sở ức chế enzym α -glucosidaza từ nụ Ngô thù du (*Tetradium ruticarpum*). Bằng cách sử dụng sắc ký cột và điều chỉnh hệ dung môi tối ưu, quy trình cho phép chiết được hoạt chất với một lần chiết duy nhất mà vẫn thu được hiệu suất chiết cao và hoạt tính sinh học mạnh, 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 Integrifoliodiol thu được từ quy trình theo giải pháp đã được chứng minh có tác dụng điều trị tiểu đường trên cơ sở ức chế mạnh enzym α -glucosidaza. Hợp chất Integrifoliodiol 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 tiểu đường.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập và tinh chế hợp chất Integrifoliodiol từ nụ Ngô thù du (*Tetradium ruticarpum*) có tác dụng điều trị bệnh tiểu đường, quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu nụ Ngô thù du, 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 nụ Ngô thù du;

b) chiết bột nụ Ngô thù du bằng cách chiết phần bột thu được ở bước a) với metanol ba lần theo tỷ lệ 1/4 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 80 đến 100 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, sau đó thu dịch chiết và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết metanol (TRM);

c) hòa tan cao chiết TRM bằng cách hòa tan cao chiết TRM thu được ở bước b) vào nước nóng theo tỉ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết TRM thu được hỗn hợp dạng lỏng;

d) chiết bằng etyl axetat bằng cách bổ sung etyl axetat vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước c) theo tỷ lệ 1/1 (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 (TRE);

e) thu phân đoạn chứa hợp chất Integrifoliodiol bằng cách đưa phân đoạn chứa cao chiết TRE thu được ở bước d) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 63 đến 200 mesh) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 20/1, 15/1, 10/1, 7/1, 5/1, 4/1, 3/1, 2/1, 1/1 và 0/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 15/1 và có kí hiệu là TRE-2;

f) thu hợp chất Integrifoliodiol thô bằng cách hòa tan phân đoạn TRE-2 thu được ở bước e) bằng metanol cho đến khi bão hòa, để lạnh qua đêm ở -4°C tạo kết tủa, loại kết tủa, thu phần hòa tan trong dung môi metanol và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu hợp chất Integrifoliodiol thô và có kí hiệu là TRE-2S; và

g) tinh chế hợp chất Integrifoliodiol bằng cách hòa tan phân đoạn có kí hiệu TRE-2S lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 40 đến 63 mesh) theo

tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ 10/1 (thể tích/thể tích) thu được hợp chất Integrifoliodiol dạng tinh thể hình kim không màu và có công thức (1):

