



(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)



2-0003588

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

(13) **Y**

(21) 2-2022-00163

(22) 19/04/2022

(45) 25/04/2024 433

(43) 27/06/2022 411

(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 3,7-DIHYDROXY-4'-
METOXYFLAVON CÓ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM TỪ GỖ CÂY CẨM LAI
(DALBERGIA OLIVERI GAMBLE EX PRAIN)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tính chế hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon có tác dụng điều trị viêm từ lõi gỗ cây Cẩm lai (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain). Quy trình theo giải pháp bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột lõi gỗ cây Cẩm lai; c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon; d) thu hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon thô; và e) tinh chế hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon. Quy trình theo giải pháp thu được hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon có công thức (1). Hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon 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 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon từ lõi gỗ cây Cẩm lai (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain). Hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon 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 kháng-histamin, các lớp chất không steroid, decongestant, chất kháng cholinergic, chất ổn định tế bào Mast, v/v. (xem tài liệu của C. A. Kontogiorgis và 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 clorpheniramin, cetirizin, levocetirizin, diclofenac, acuvall, bromfenac, nevanac, v/v. (xem tài liệu của 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 Trắc (*Dalbergia*), các tác giả đã phát hiện ra tác dụng kháng viêm của các cao chiết và hợp chất phân lập được (xem tài liệu của D. S. Lee, K. S. Kim, W. M. Ko, B. Li, S. Keo, G. S. Jeong, H. C. Oh, Y. C. Kim, “The Neoflavonoid Latifolin Isolated from MeOH Extract of *Dalbergia odorifera* Attenuates Inflammatory Responses by Inhibiting NF- κ B Activation via Nrf2-Mediated Heme Oxygenase-1 Expression”, *Phytotherapy Research*, 2014, 28(8), 1216-1223; S. H. Lee, J. Y. Kim, G. S. Seo, Y. C. Kim, D. H. Sohn, “Isoliquiritigenin, from *Dalbergia odorifera*, up-regulates anti-inflammatory heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages”, *Inflammation Research*, 2009, 58(5), 257-262; S. P. Shrestha, Y. Amano, Y. Narukawa, T. Takeda, “Nitric Oxide Production Inhibitory Activity of Flavonoids Contained in Trunk Exudates of *Dalbergia sissoo*” *Journal of Natural Products*, 2008, 71(1), 9-101; D. S. Lee, B. Li, N. K. Im, Y. C. Kim, G. S. Jeong, Gil-Saeng, “4,2',5'-Trihydroxy-4'-methoxychalcone from *Dalbergia odorifera* exhibits anti-inflammatory properties by inducing heme oxygenase-1 in murine macrophages”, *International Immunopharmacology*, 2013, 16(1), 114-121; X. S. Zhao, C. H. Wang, H. Meng, Z. X. Yu, M. H. Yang, J. H. Wei, “*Dalbergia odorifera*: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and quality control” *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 248, 112328; D. S. Lee, G. S. Jeong, “Arylbenzofuran isolated from *Dalbergia odorifera* suppresses lipopolysaccharide-induced mouse BV2 microglial cell activation, which protects mouse hippocampal HT22 cells death from neuroinflammation-mediated toxicity”, *European Journal of Pharmacology*, 2014, 728, 1-8; D. C. Kim, D. S. Lee, W. M. Ko, K. W. Kim, H. J. Kim, C. S. Yoon, H. C. Oh, Hyuncheol; Y. C. Kim, “Heme Oxygenase-1-Inducing Activity of 4-Methoxydalbergione and 4'-Hydroxy-4-methoxydalbergione from *Dalbergia odorifera* and Their Anti-inflammatory and Cytoprotective Effects in Murine Hippocampal and BV2 Microglial Cell Line and Primary Rat Microglial Cells”, *Neurotoxicity Research*, 2018, 33(2), 337-352; H. S. Choi, J. A. Park, J. S. Hwang, S. A. Ham, T. S. Yoo, W. J. Lee, K. S. Paek, H. C. Shin, C. H. Lee, H. G. Seo, “A *Dalbergia odorifera* extract improves the survival of endotoxemia model mice by inhibiting Hmgb1 release”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017,

17(212), 1-12; R. H. Liu, S. Lin, P. Z. Zhang, L. Y. Chen, H. L. Huang, D. Y. Mei, "Neoflavonoids and their pharmacological activities in *Dalbergia* genus", *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2017, 42(24), 4707-4715; M. C. Narayanan, P. R. Rao, N. N. Shanmugam, N. N. Gopalakrishnan, M. Sethuraman, K. Devi, "Isolation and characterisation of bioactive isoflavonoids from the roots of *Dalbergia horrida*", *Natural Product Research*, 2007, 21(10), 903-909; M. Kale, A. V. Misar, V. Dave, M. Joshi, A. M. Mujumdar, "Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats", *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 112(2), 300-304; J. Wang, W. Jiang, Y. Wang, "Anti-inflammation of flavonoid compounds from *Dalbergia odorifera* T. Chen in lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 macrophages", *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi*, 2013, 29(7), 681-684; R. B. Ganga, K. P. Madhu, R. A. D. Vijaya, "Investigation of antioxidant and anti-inflammatory activity of leaves of *Dalbergia paniculata* (Roxb)", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2012, 5(6), 455-458; N. Vasudeva, M. Vats, S. K. Sharma, S. Sardana, "Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia* - a review", *Pharmacognosy Reviews*, 2009, 3(6), 307-319; S. C. Zheng, Z. Z. Ren, Y. L. Zhang, Y. J. Qiao, "Anti-inflammatory mechanism research of flavonoid compounds in *Dalbergiae odoriferae* Lignum by module-based network analysis", *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, 40(8), 1565-1569; S. W. Hajare, S. Chandra, J. Sharma, S. K. Tandan, J. Lal, A. G. Telang, "Anti-inflammatory activity of *Dalbergia sissoo* leaves", *Fitoterapia*, 2001, 72(2), 131-139; S. C. Chan, Y. S. Chang, J. P. Wang, S. C. Chen, S. C. Kuo, "Three new flavonoids and antiallergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera*", *Planta Medica*, 1998, 64(2), 153-158). Tuy nhiên, tác dụng kháng viêm của các cao chiết cũng như các hoạt chất phân lập được từ loài Cẩm lai (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain) lại chưa được nghiên cứu. Do đó, giải pháp sau đây đưa ra quy trình phân lập và tinh chế hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon có tác dụng kháng viêm từ gỗ cây Cẩm lai (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain). Dựa vào kết quả sàng lọc hoạt tính kháng viêm, cao chiết etyl axetat được lựa chọn để tách và tinh chế hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon có hoạt tính sinh học, cụ thể là có tác dụng điều trị viêm thông qua ức chế sự sản sinh oxit nitric (NO).

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 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon từ lõi gỗ cây Cẩm lai (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain) có tác dụng điều trị viêm và hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề xuất quy trình phân lập và tinh chế hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon có tác dụng ức chế sự sản sinh NO từ lõi gỗ cây Cẩm lai (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu lõi gỗ của cây Cẩm lai, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ 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 0,5 mm thu được nguyên liệu bột lõi gỗ cây Cẩm lai;

b) chiết nguyên liệu bằng cách chiết nguyên liệu bột lõi gỗ cây Cẩm lai với etanol theo tỷ lệ 1/3 (khối lượng/thể tích) sử dụng thiết bị chiết hồi lưu, thời gian chiết từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 80°C, sau khi thu dịch chiết, loại dung môi thu cao chiết etanol (DOE);

c) hòa tan cao chiết DOE bằng cách hòa tan cao chiết DOE vào nước nóng theo tỷ lệ 1/2 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết DOE thu được hỗn hợp dạng lỏng;

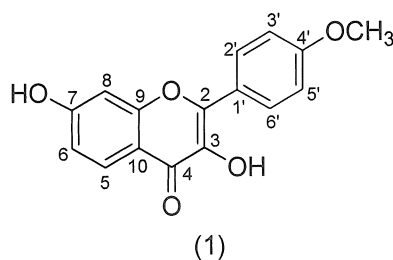
d) chiết bằng etyl axetat bằng cách bổ sung etyl axetat vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước c) theo tỷ lệ 1/3 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi etyl axetat và cô quay loại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

e) thu phân đoạn chứa hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon bằng cách nhồi phân cao chiết etyl axetat (DOEE) thu được ở bước d) 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 100/1, 50/1, 30/1, 15/1, 10/1, 7/1, 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/metanol tỷ lệ 3/1 và có kí hiệu DOEE-8;

f) thu hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon thô bằng cách nhồi phân đoạn có kí hiệu DOEE-8 thu được ở bước e) lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh, tiến hành rửa giải với hệ dung môi diclometan/axeton lần lượt theo tỷ lệ

3/1, 2/1 và 1/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/axeton tỷ lệ 1/1 và có kí hiệu DOEE-8-3;

g) tinh chế hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon bằng cách nhồi phân đoạn có kí hiệu DOEE-7-3 thu được ở bước f) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Sephadex LH-20 có kích cỡ hạt 25 đến 100 μm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (tỷ lệ 1/1, thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon dạng bột, màu vàng và có công thức (1) sau:



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

Theo một phương án ưu tiên, trong đó còn có bước tinh sạch hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi axetonitril/nước để thu hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon 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 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon có tác dụng điều trị viêm từ lõi gỗ cây Cẩm lai (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain) và hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon 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 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon có tác dụng điều trị viêm từ lõi gỗ cây Cẩm lai (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột lõi gỗ cây Cẩm lai; c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa

hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon; d) chiết hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon; e) thu hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon thô; và f) tinh chế hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, thu lõi gỗ của cây Cẩm lai, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, sau đó sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 60°C và xay nhỏ (đến kích thước 0,5mm) thu được nguyên liệu bột lõi gỗ cây Cẩm lai.

Trong bước chiết nguyên liệu bột lõi gỗ cây Cẩm lai, tiến hành chiết ba lần phần bột thu được ở trên bằng etanol theo tỷ lệ 1/3 (khối lượng/thể tích) sử dụng thiết bị chiết hồi lưu với thời gian chiết từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 80°C. Sau khi thu dịch chiết, loại dung môi dưới áp suất giảm thu cao chiết etanol (DOE).

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

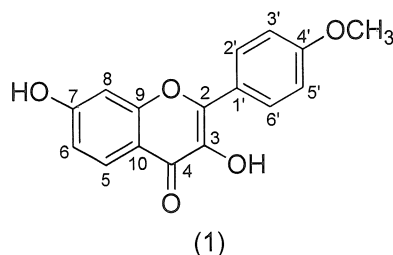
Trong bước thu cao chiết etyl axetat, bổ sung etyl axetat vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở trên, sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi etyl axetat và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu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

Trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon, đưa cao chiết DOEE 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 100/1, 50/1, 30/1, 15/1, 10/1, 7/1, 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/metanol tỷ lệ 3/1 và có kí hiệu DOEE-8.

Trong bước thu hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon thô, đưa phân đoạn có kí hiệu có kí hiệu DOEE-8 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/axeton lần lượt theo tỷ lệ 3/1, 2/1 và 1/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/axeton tỷ lệ 1/1 và có kí hiệu DOEE-8-3.

Trong bước thu hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon tinh, đưa phân đoạn có kí hiệu DOEE-8-3 thu được ở bước trên lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Sephadex LH-20 có kích cỡ hạt 25 đến 100 µm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (tỷ lệ 1/1, thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung

môi, thu được hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon dạng bột, màu vàng và có công thức (1) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó còn có bước tinh sạch hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi axetonitril/nước để thu hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon thu được bằng quy trình theo giải pháp, trong đó hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon 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 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon từ lõi gỗ cây Cẩm lai (Dalbergia oliveri Gamble ex Prain).

Thu lõi gỗ cây Cẩm lai, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ khoảng 60°C đến khối lượng không đổi sau đó nghiền nhỏ thành bột (có kích thước 0,5mm) và thu được 4kg bột. Phần bột này được chiết ba lần bằng etanol (3 x 12L) sử dụng thiết bị chiết hồi lưu với thời gian chiết khoảng 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng 75°C, sau khi cô quay loại bỏ dung môi thu được cao etanol (DOE 150g). Cao chiết DOE được hòa tan vào 300 mL nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết DOE thu được hỗn hợp dạng lỏng. Bổ sung 900 mL etyl axetat (3 x 900 mL) 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 (DOEE; 120g). Cao chiết DOEE (120g) 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/metanol lần lượt theo tỷ lệ 100/1, 50/1, 30/1, 15/1, 10/1, 7/1, 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclometan/metanol là 3/1 và có kí hiệu là DOEE-8 (2,5g). Phân đoạn DOEE-8 (2,5g) 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/axeton theo tỷ lệ 3/1, 2/1 và 1/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclometan/axeton là 1/1 và có kí hiệu là DOEE-8-3 (250mg). Hòa tan phân đoạn có kí hiệu DOEE-8-3 (250mg) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Sephadex LH-20 (có kích cỡ hạt 25 đến 100 μ m) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (tỷ lệ 1/1, thể tích/thể tích) thu được hợp chất có tên là 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon (10,5 mg) có công thức (1) dạng bột, màu vàng.

Ví dụ 2: Định tính và định lượng hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon được phân lập và tinh chế từ lõi gỗ cây Cẩm lai (Dalbergia oliveri Gamble ex Prain).

Hợp chất dạng bột, 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 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon có công thức (1)

- Tên theo IUPAC: 3,7-dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-on.
- Mô tả: Hợp chất dạng bột, màu vàng, tan tốt trong dung môi metanol. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo trắng sẵn 60 RP-18 F_{254S} (Merck), dung môi triển khai là metanol/nước = 1/1 (v/v); $R_f = 0,50$.
- CTPT: C₁₆H₁₂O₅ (M=284).
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H (ppm): 7,97 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5); 6,94 (1H, dd, $J = 9,0; 2,0$ Hz, H-6); 6,86 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8); 7,50 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2'/H-6'); 6,98 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3'/H-5'); 3,78 (3H, s, 4'-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C (ppm): 175,1 (C-4); 163,0 (C-7); 159,4 (C-4'); 157,9 (C-9); 153,6 (C-2); 130,5 (C-2'/C-6'); 127,8 (C-5); 124,7 (C-3); 123,6 (C-1'); 117,1 (C-10); 115,7 (C-6); 114,1 (C-3'/C-5'); 102,6 (C-8); 55,6 (4'-OCH₃).

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 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon.

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon phân lập từ lõi gỗ cây Cẩm lai (Dalbergia oliveri Gamble ex Prain) 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 vào 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, 50µL 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 50µL thuốc thử Griess, ủ 10 phút. Đo OD bước sóng 550nm.

+ Phương pháp xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon phân lập từ lõi gỗ cây Cẩm lai (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain).

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% CO₂. 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 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon (hoặc đối chứng dương-Celastrol) ở các nồng độ khác nhau và LPS nồng độ 0,5µg/mL, ủ 24 giờ. Hút 50µL dịch nổi trong mỗi giếng sang đĩa 96 giếng khác và bổ sung 50µL thuốc thử Griess, ủ 10 phút. Đo OD tại bước sóng 550nm. 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 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon phân lập từ lõi gỗ cây Cẩm lai (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain)

Hợp chất	IC ₅₀ (µM)
3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon	24,8 ± 1,9
Celastrol	1,0 ± 0,1

Tác dụng ức chế sự sản sinh NO của hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon được thể hiện ở bảng 1. Hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon có tác dụng ức chế trung bình sự sản sinh NO với giá trị IC₅₀ = 24,8 ± 1,9 (µM) so với chất đối chứng dương-Celastrol (IC₅₀ = 1,0 ± 0,1 µM). Với tác dụng ức chế trung bình sự sản sinh NO, hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon có tiềm năng trong điều trị viêm, từ đó

định hướng hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon 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 phép phân lập và tinh chế hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon với độ tinh khiết > 95% từ lõi gỗ cây Cẩm lai (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain) với hiệu suất chiết cao và có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế tốt 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 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon 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 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon có tác dụng kháng viêm từ lõi gỗ cây Cẩm lai (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu lõi gỗ của cây Cẩm lai, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ 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 0,5mm thu được nguyên liệu bột lõi gỗ cây Cẩm lai;

b) chiết nguyên liệu bằng cách chiết nguyên liệu bột lõi gỗ cây Cẩm lai với etanol theo tỷ lệ 1/3 (khối lượng/thể tích) sử dụng thiết bị chiết chiết hồi lưu, thời gian chiết từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 80°C, sau khi cất loại dung môi thu được phần cao chiết;

c) hòa tan cao chiết bằng cách hòa tan cao chiết thu được ở bước b) vào nước nóng theo tỉ lệ 1/2 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết 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 1/3 (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;

e) thu phân đoạn chứa hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon bằng cách nhồi phần cao chiết thu được ở bước d) lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh, tiến hành rửa giải với hệ dung môi diclometan/metanol theo tỷ lệ 100/1, 50/1, 30/1, 15/1, 10/1, 7/1, 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclometan/metanol là 3/1;

f) thu hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-metoxyflavon thô bằng cách nhồi phân đoạn diclometan/metanol là 3/1 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/axeton lần lượt theo tỷ lệ 3/1, 2/1 và 1/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclometan/axeton là 1/1; và

e) tinh chế hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-methoxyflavon bằng cách nhồi phân đoạn có tỷ lệ diclometan/axeton là 1/1 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là Sephadex LH-20 có kích cỡ hạt 25 đến 100 μ m theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (tỷ lệ 1/1, thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất 3,7-dihydroxy-4'-methoxyflavon dạng bột, màu vàng và có công thức (1):

