



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0042038

(51)⁷ A61K 31/221; A61K 31/19; A61K 31/194; A61K 31/197; A61K 31/198; A61P 9/12; A61K 36/70; A61P 43/00; A61P 9/08; A23L 1/29; A61K 31/205 (13) B

(21) 1-2016-04084

(22) 27/03/2015

(86) PCT/JP2015/059578 27/03/2015

(87) WO 2015/147251 A1 01/10/2015

(30) 2014-070226 28/03/2014 JP

(45) 25/12/2024 441

(43) 25/01/2017 346A

(73) Shinshu University (JP)

3-1-1, Asahi, Matsumoto-shi, Nagano 3908621, Japan

(72) NAKAMURA, Kozo (JP).

(74) Công ty TNHH Lê & Lê (LE & LE)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM DỊCH CHIẾT TỪ THỰC PHẨM LÊN MEN

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm dịch chiết từ thực phẩm lên men có tác dụng hạ huyết áp và hữu dụng làm thực phẩm chức năng hoặc dược phẩm. Chế phẩm này thu được bằng cách: chiết thực phẩm lên men, tốt nhất là chất đông khô kiểu mạch lên men, bằng axeton; rửa giải dịch chiết axeton của kiểu mạch lên men sử dụng cột chiết pha rắn được nạp đầy nhựa mà nhóm phenyl được liên kết, dung môi rửa giải là nước chứa axit; và cất phân đoạn và tinh chế dung dịch rửa giải sử dụng cột (cột PFP) được nạp đầy chất mang mà nhóm pentaflorophenyl được liên kết, pha động là nước chứa axit formic/metanol. Sáng chế còn đề cập đến thực phẩm chức năng hoặc dược phẩm chứa dịch chiết này hoặc ít nhất một phần của nó là hoạt chất.

Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm dịch chiết từ thực phẩm lên men, v.v., ví dụ, kiều mạch lên men, v.v. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm dịch chiết từ thực phẩm lên men chứa ít nhất axetylcholin và propionylcholin, cho thấy tác dụng hạ huyết áp và tác dụng giãn mạch khi dùng qua đường miệng, cũng như là phương pháp chiết chúng.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến thực phẩm hoặc dược phẩm có thành phần hoạt chất là các chế phẩm dịch chiết này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã thúc đẩy nghiên cứu về thực phẩm lên men, đặc biệt là sản phẩm lên men của nước ép kiều mạch đã nảy mầm, và phát hiện ra rằng bột đông khô của sản phẩm lên men nêu trên thể hiện tác dụng ức chế ACE; và họ đã báo cáo về các thực phẩm chức năng và đồ uống chức năng chứa bột này (Tài liệu Patent 1), và còn báo cáo về phương pháp cất phân đoạn chất ức chế ACE này và các phân đoạn được tách ra bằng phương pháp này (Tài liệu Patent 2).

Sau đó, các tác giả sáng chế đã phát triển sản phẩm lên men nhờ axit lactic của các sản phẩm kiều mạch được nghiền thành bột có chức năng cao hơn (kiều mạch lên men), và họ còn thúc đẩy nghiên cứu với mục đích tách và tinh chế các thành phần hoạt chất có tác dụng hạ huyết áp và tác dụng giãn mạch chứa các sản phẩm lên men nói trên, và đã thành công trong việc tìm ra dịch chiết kiều mạch lên men chứa một số peptit mới, và đã nộp đơn xin cấp bằng sáng chế cho sản phẩm này (Tài liệu Patent 3).

Trong khi đó, đến nay, đã có một số báo cáo về các hợp chất được dẫn xuất từ kiểu mạch có tác dụng giãn mạch, và các chế phẩm chứa chúng (các tài liệu Patent 4-7).

Các tác giả sáng chế tiếp tục thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu về các thành phần hoạt chất có tác dụng hạ huyết áp và tác dụng giãn mạch có chứa trong kiểu mạch lên men, và đã cắt phân đoạn một thành phần có tác dụng giãn mạch khác với các thành phần hoạt chất được báo cáo trong tài liệu Patent 3 nêu trên.

Sau đó, do kết quả về việc xác định nhận dạng của thành phần chứa trong phân đoạn nêu trên, họ đã tìm ra rằng thành phần này bao gồm một hợp chất alkylamoni bậc bốn chủ yếu bao gồm nhiều cholin este chứa ít nhất axetylcholin và propionylcholin.

Trong số các cholin este, axetylcholin được biết đến là một chất cần thiết cho hoạt động đời sống như là một chất dẫn truyền thần kinh ở động vật có vú. Ngoài ra, vào năm 1929, một chất hạ huyết áp khác với histamin đã được tách ra từ lá lách của ngựa, và chất hoạt động này được xác định về mặt hóa học là axetylcholin (Tài liệu không thuộc Patent 1).

Do đó, sự có mặt của axetylcholin trong mô của động vật đã được biết đến trong một thời gian dài. Hơn nữa, một chất hạ huyết áp trong nấm cựa gà đã được tiết lộ chính là axetylcholin, và nấm này đã được xác nhận là để sản xuất axetylcholin (Tài liệu không thuộc Patent 2).

Axetylcholin có chứa trong các thực vật ăn được, nấm ăn được, sữa ong chúa và sữa, v.v., và axetylcholin cũng có mặt trong *Bacillus subtilis* và nấm men; cũng có báo cáo rằng việc sản xuất axetylcholin bằng *Lactobacillus plantarum*, tức là, một loại vi khuẩn axit lactic, được xác định bởi các xét nghiệm sinh học (các tài liệu không thuộc Patent 3-7).

Ngoài axetylcholin, một vài cholin este cũng được phát hiện. Propionylcholin mà có nhóm propionyl với mạch cacbon dài hơn mạch cacbon của nhóm axetyl bởi một cacbon đã được tìm thấy từ lá lách của bò vào năm 1953 (các tài liệu không thuộc Patent 8 và 9).

Sau đó, việc sản xuất propionylcholin đã được xác định trong tinh dịch của bò, trong các hạch bạch huyết hermal và các cơ trơn của tôm càng châu Âu, cua hình móng ngựa ở Mỹ, sò ở cộng đồng chung châu Âu, con trai vỏ mềm, con trai, con trai Swan (*Anodonta cygnea*), và ốc sên Bourgogne (*Helix pomatia*), trong việc nuôi cấy mô sản sinh điện của Torpedo, cũng như là trong cây khở sâm, đậu xanh, cây mã đề Trung Quốc, cây bạch dương, và cây phong (các tài liệu không thuộc Patent 10-13).

Tuy nhiên, cho đến nay, sự có mặt của propionylcholin trong các thực phẩm được lên men chưa được báo cáo hoặc thậm chí chưa được đề xuất.

Về phần butyrylcholin, nó đã được phát hiện từ dịch chiết của não vào năm 1954 (Tài liệu không thuộc Patent 14), và được chỉ ra là có mặt trong động vật chân đốt và động vật thân mềm cùng với axetylcholin và propionylcholin (Tài liệu không thuộc Patent 11).

Hơn nữa, ngoài propionylcholin và butyrylcholin, một vài cholin este đã được xác định từ động vật thân mềm. Ví dụ, việc xác định cấu tạo được thực hiện trên urocanoyl cholin từ một loại ốc gai Troschel, $\beta\beta$ -dimetyl acroyl cholin (seneciroyl cholin) từ một loại *Thais (Reishia) bronni*, acroyl cholin từ một loại Buccinidae, và imidazol propionylcholin từ một loại *Thais (Reishia) bronni* (Các tài liệu không thuộc Patent 15-18).

Tuy nhiên, cho đến nay, sự có mặt của cholin este trong các thực phẩm được lên men đã không được xác định về mặt hóa học, và các phương pháp chiết và cất phân đoạn của nó chưa được báo cáo hoặc thậm chí chưa được đề xuất.

Các tài liệu Patent

Tài liệu Patent 1: JP A 2005-304355

Tài liệu Patent 2: JP A 2008-239498

Tài liệu Patent 3: JP A 2012-162503

Tài liệu Patent 4: JP A 2007-254410

Tài liệu Patent 5: JP A 2006-76903

Tài liệu Patent 6: JP A 2006-76904

Tài liệu Patent 7: JP A 5-97798

Các tài liệu không thuộc Patent

Tài liệu không thuộc Patent 1: Dale HH, Dudley HW. The presence of histamin and axetylcholin in the spleen of the ox and the horse. J Physiol 68:97-123, 1929.

Tài liệu không thuộc Patent 2: Ewins AJ. Axetylcholin, a new active principle of ergot. Biochem J 8:44-49, 1914.

Tài liệu không thuộc Patent 3: Yoshie Momonoki: Axetylcholin in plants, Chemical Regulation in Plants 30(1), 49-61 (1995) (In Japanese).

Tài liệu không thuộc Patent 4: Koichiro Kawashima: Roots of axetylcholin and non-neuronal axetylcholin, Basic Aging Research 34(4), 12-24 (2010) (In Japanese).

Tài liệu không thuộc Patent 5: Masato Shinoda et al.: Blood flow-increasing factor in royal jelly, Pharmaceutical Journal 98(2), 139-145 (1978) (In Japanese).

Tài liệu không thuộc Patent 6: Whittaker VP. Axetylcholin in Milk. Nature 181:856-857, 1958.

Tài liệu không thuộc Patent 7: Stephenson M, Rowatt E. The production of axetylcholin by a strain of Lactobacillus plantarum. J Gen Microbiol 1(3):279-298, 1947.

Tài liệu không thuộc Patent 8: Banister J, Whittaker VP, Wijesundera S. The occurrence of homologues of axetylcholin in ox spleen. J Physiol 121(1):55-71, 1953.

Tài liệu không thuộc Patent 9: Gardiner JE, Whittaker VP. The identification of

propionylcholin as a constituent of ox spleen. *Biochem J* 58(1):24-29, 1954.

Tài liệu không thuộc Patent 10: Bishop MR, Sastry BV, Stavinocha WB. Identification of axetylcholin and propionylcholin in bull spermatozoa by integrated pyrolysis, gas chromatography and mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 500(2):440-444, 1977.

Tài liệu không thuộc Patent 11: Wolfgang W, Jutta N, Dettmar W. Distribution of cholinesters and cholinesterases in haemolymphs and smooth muscles of molluscs. *Comp Biochem Phys C* 61(1):121-131, 1978.

Tài liệu không thuộc Patent 12: O'Regan S. The synthesis, storage, and release of propionylcholin by the electric organ of *Torpedo marmorata*. *J Neurochem* 39(3):764-772, 1982.

Tài liệu không thuộc Patent 13: Miural GA, Shin TM. Identification of propionylcholin in higher plants. *Physiol Plant* 62:341-343, 1984.

Tài liệu không thuộc Patent 14: Holtz P, Schumann HJ. Butyrylcholin in brain extracts. *Naturwissenschaften* 41:306, 1954.

Tài liệu không thuộc Patent 15: Erspamer V, Benati O. Identification of murexine as β -[imidazolyl-(4)]acrylcholin. *Science* 117:161-162, 1953.

Tài liệu không thuộc Patent 16: Keyl MJ, Michaelson IA, Whittaker VP. Physiologically active cholin esters in certain marine gastropods and other invertebrates. *J Physiol* 139:434, 1957.

Tài liệu không thuộc Patent 17: Whittaker VP. Acrylylcholin: a new naturally occurring pharmacologically active cholin ester from *Buccinum undatum*. *Biochem Pharmacol* 1(4):342-346, 1959.

Tài liệu không thuộc Patent 18: Roseghini M. Occurrence of dihydromurexine (imidazole propionylcholin) in the hypobranchial gland of *Thais (purpura)* haemastoma. *Experientia* 27(9):1008-1009, 1971.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Sáng chế đề xuất dịch chiết thực phẩm được lên men có tác dụng hạ huyết áp và tác dụng giãn mạch có thể sử dụng làm các thực phẩm chức năng và dược phẩm, và thực phẩm chức năng hoặc dược phẩm chứa dịch chiết này hoặc ít nhất một thành phần hoạt chất chứa trong dịch chiết này là hoạt chất.

Biện pháp giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết các vấn đề nêu trên, và đã hoàn thành sáng chế này. Cụ thể, các tác giả sáng chế đã thành công trong việc tách các hoạt chất mà có tác dụng hạ huyết áp và tác dụng giãn mạch rất đáng kể, là kết quả của việc nghiên cứu chuyên sâu trên các thành phần chứa trong thực phẩm lên men, đặc biệt, trong sản phẩm lên men bằng axit lactic của cây kiệu mạch (kiệu mạch được lên men), và cũng thành công trong việc xác định một số hoạt chất, và do đó hoàn thành sáng chế này.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến:

- [1] chế phẩm dịch chiết thực phẩm lên men chứa ít nhất axetylcholin và propionylcholin, cho thấy tác dụng hạ huyết áp và tác dụng giãn mạch khi dùng qua đường miệng,
 - [2] chế phẩm dịch chiết theo điểm [1], trong đó thực phẩm được lên men là một loại được lựa chọn từ nhóm gồm có kiệu mạch được lên men, giấm đen, sữa chua, đậu nành lên men của Nhật, và rượu sake Nhật bản,
 - [3] chế phẩm dịch chiết theo điểm [2], trong đó thực phẩm được lên men là kiệu mạch được lên men,
- và

[4] chế phẩm dịch chiết theo điểm [1], còn chứa ít nhất một loại được chọn từ nhóm gồm butyrylcholin, lactylcholin, levulinylncholin, carnitin, metyl carnitin, trimetyl glyxin (betain), metyl trimetyl glyxin, etyl trimetyl glyxin, propionyl trimetyl glyxin và phosphocholin.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến:

[5] thực phẩm hoặc dược phẩm chứa chế phẩm dịch chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [4] làm hoạt chất,

[6] thực phẩm hoặc dược phẩm theo điểm [5], còn chứa ít nhất một loại được chọn từ nhóm gồm tyrosin và axit γ -aminobutyric (GABA) làm hoạt chất, và

[7] thực phẩm hoặc dược phẩm theo điểm [5] hoặc [6], còn chứa ít nhất một loại được chọn từ nhóm gồm axit lactic, axit axetic, và axit xitric.

Hơn nữa, sáng chế còn đề cập đến:

[8] phương pháp sản xuất chế phẩm dịch chiết thực phẩm được lên men theo điểm [1], được đặc trưng ở chỗ phương pháp này bao gồm các bước:

(1) bước trong đó chất đông khô hoặc chất cô đặc của kiểu mạch lên men được tạo huyền phù trong axeton, khuấy bằng cách lắc, sau đó quay ly tâm để thu được chất nổi bên trên, chất này sau đó được cô cạn trong chân không (bước 1),

(2) bước trong đó chất cô đặc trong chân không nêu trên được rửa giải bằng cách sử dụng một cột chiết pha rắn được nạp đầy chất mang mà nhóm phenyl được liên kết vào đó, với chất rửa giải là nước chứa axit (bước 2),

(3) bước trong đó dung dịch sau rửa giải nêu trên được cất phân đoạn và được tinh chế bằng cách sử dụng một cột (cột PFP) được nạp đầy chất mang mà nhóm pentafluorophenyl liên kết vào đó, với pha động là nước chứa metanol có tính axit (bước 3),

và

[9] phương pháp sản xuất theo điểm [8], được đặc trưng ở chỗ:

- (1) trong bước 2, cột chiết pha rắn (GL Science InertSep® PH) được sử dụng làm cột chiết pha rắn, và nước chứa 0,01% axit formic được sử dụng làm chất rửa giải,
- (2) trong bước 3, cột PFP (YMC-Triart PFP) được sử dụng làm cột pha đảo, và nước chứa 0,01% axit formic -33% metanol được sử dụng làm pha động.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến:

[10] chế phẩm dịch chiết thực phẩm được lên men được sản xuất bằng phương pháp sản xuất theo điểm [8] hoặc [9], được đặc trưng ở chỗ chế phẩm này chứa ít nhất axetylcholin và propionylcholin, và cho thấy tác dụng hạ huyết áp và tác dụng giãn mạch khi được dùng qua đường miệng.

Các tác dụng có lợi của sáng chế

Chế phẩm dịch chiết thực phẩm được lên men của sáng chế có tác dụng hạ huyết áp và tác dụng giãn mạch đáng kể, có thể sử dụng làm hoạt chất của các thực phẩm chức năng hoặc dược phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là đồ thị các đỉnh phát hiện biểu thị sự thay đổi hoạt động rửa giải của axetylcholin với sự thay đổi về hàm lượng metanol, trong thí nghiệm kiểm tra các điều kiện tách thành phần đối với việc chiết pha rắn kiểu mạch lên men sử dụng cột PFP.

Fig. 2 là đồ thị các đỉnh phát hiện biểu thị sự thay đổi hoạt động rửa giải của axetylcholin với sự thay đổi về hàm lượng axit, trong thí nghiệm kiểm tra các điều kiện tách thành phần đối với việc chiết pha rắn kiểu mạch lên men sử dụng cột PFP.

Fig. 3 là đồ thị các đỉnh phát hiện tương tự biểu thị sự thay đổi hoạt động rửa giải của

axetylcholin trong các sản phẩm kiểu mạch lên men đã được tinh chế với sự thay đổi về hàm lượng metanol dưới điều kiện về hàm lượng axit cố định (0,01%), trong thí nghiệm kiểm tra các điều kiện tách thành phần đối với việc chiết pha rắn kiểu mạch lên men.

Fig. 4 là đồ thị các đỉnh phát hiện tương tự biểu thị sự thay đổi hoạt động rửa giải của axetylcholin trong các sản phẩm kiểu mạch lên men đã được tinh chế với sự thay đổi về hàm lượng metanol dưới điều kiện về hàm lượng axit cố định (0,01%), khi hàm lượng metanol thay đổi nhẹ (38%, 36%, 33%) trong thí nghiệm kiểm tra các điều kiện tách thành phần đối với việc chiết pha rắn kiểu mạch lên men.

Fig. 5 là đồ thị các đỉnh phát hiện tương tự biểu thị sự thay đổi hoạt động rửa giải của axetylcholin trong các sản phẩm kiểu mạch lên men đã được tinh chế với sự thay đổi về nhiệt độ tách, khi sự tách được kiểm tra bởi cách thiết lập nhiệt độ tách trong nước chứa 0,01% axit formic -33% metanol ở nhiệt độ 30°C và 40°C trong thí nghiệm kiểm tra các điều kiện tách thành phần đối với việc chiết pha rắn kiểu mạch lên men.

Fig. 6 là đồ thị biểu thị kết quả của thử nghiệm đo sức căng đẳng trương trong các mạch máu sử dụng các hợp chất cholin xác định.

Fig. 7 là đồ thị biểu thị sự thay đổi huyết áp tâm thu sau khi dùng các hợp chất cholin xác định.

Fig. 8-1 là phổ khối lượng của lactylcholin trong phân tích LC-MS các sản phẩm lọc gel.

Fig. 8-2 là phổ khối lượng của lactylcholin trong phân tích LC-MS/MS các sản phẩm lọc gel.

Fig. 9-1 là phổ khối lượng tương tự của levulinylocholin trong phân tích LC-MS các sản phẩm lọc gel.

Fig. 9-2 là phổ khối lượng tương tự của levulinylcholin trong phân tích LC-MS/MS các sản phẩm lọc gel.

Mô tả chi tiết phương thức thực hiện sáng chế

“Kiều mạch lên men”, là cây kiều mạch đã được lên men bằng axit lactic, có tác dụng hạ huyết áp tuyệt vời đối với chuột bị tăng huyết áp một cách tự phát (SHR).

Các tác giả sáng chế đã thực hiện nghiên cứu về các chất hạ huyết áp trong kiều mạch lên men, và tìm thấy ở dịch chiết kiều mạch lên men chứa một số peptit mới, và đã nộp đơn đăng ký sáng chế cho phát hiện này (Tài liệu Patent 3).

Các tác giả sáng chế còn thúc đẩy nghiên cứu trên các thành phần làm giãn mạch trong kiều mạch lên men, đã phát triển một phương pháp mới về việc cất phân đoạn và tinh chế, và đã thành công trong việc cất phân đoạn và tinh chế các thành phần làm giãn mạch trong kiều mạch lên men nói trên.

Kiều mạch lên men được sử dụng trong quá trình cất phân đoạn và tinh chế của sáng chế là có tính axit với độ pH bằng 3,6, và nó cho thấy tác dụng giãn mạch từ 0,5µg/mL đối với các mẫu mạch máu của động mạch chủ ngực của chuột đực 12 tuần tuổi bị tăng huyết áp một cách tự phát, với EC50 bằng 8,30µg/mL.

Khi dung dịch natri hydroxit được bổ sung vào kiều mạch lên men này và để yên ở nhiệt độ phòng và độ pH = 12, hoạt tính làm giãn mạch bị mất trong vòng 0,5 giờ.

Ngoài ra, khi tác dụng giãn mạch của các dịch chiết của chất đông khô kiều mạch lên men bằng các dung môi hữu cơ được kiểm tra, dịch chiết bằng etyl axetat không có tác dụng giãn mạch, và các dịch chiết bằng etanol và axeton có tác dụng giãn mạch, và dịch chiết bằng axeton có tác dụng giãn mạch mạnh nhất.

Từ các kết quả trên, đã phát hiện được rằng các thành phần làm giãn mạch của

kiểu mạch lên men cần được tinh chế và cho dùng dưới các điều kiện axit hoặc trung tính, và chúng có thể được chiết hiệu quả bằng axeton.

Tiếp theo, các điều kiện tinh chế các thành phần làm giãn mạch bằng sắc ký được nghiên cứu. Đầu tiên, các tác giả so sánh hoạt tính của các dịch chiết thô bằng axeton của chất đông khô kiểu mạch lên men được tinh chế bằng sắc ký lọc gel. Kết quả là, tác dụng giãn mạch quan sát được trong các phân đoạn chứa một chất có khối lượng phân tử tương đối thấp được xác định từ thời gian rửa giải.

Vì các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men không hoạt động dưới các điều kiện bazơ, các tác giả đã nghiên cứu việc tinh chế bằng nhựa trao đổi cation được thực hiện dưới các điều kiện axit. Kết quả là, tác dụng giãn mạch tương đối mạnh được quan sát thấy trong phân đoạn rửa giải axit clohydric khi xử lý bằng nhựa trao đổi cation axit mạnh. Kết quả này có thể là do sự tương tác của các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men có điện tích dương với các nhóm sulfonat là nhóm trao đổi có điện tích âm trên nhựa.

Tuy nhiên, sự hấp phụ của các thành phần làm giãn mạch vào nhựa trao đổi cation là khá mạnh, và quá trình hoạt động để loại bỏ axit clohydric và dung môi ra khỏi một lượng lớn chất rửa giải phát sinh bởi quá trình hoạt động lặp lại của sự rửa giải axit clohydric để thu hồi một lượng vừa đủ các thành phần làm giãn mạch là rất phức tạp. Do đó, các tác giả cho rằng quá trình tách sử dụng sự tương tác cation- π giữa điện tích dương của các thành phần làm giãn mạch và các nhóm phenyl có các electron π có thể hiệu quả, và đã thực hiện chiết pha rắn sử dụng một chất mang liên kết nhóm phenyl group, đã thành công trong việc tách các phân đoạn mà riêng các thành phần làm giãn mạch được cô đặc lại.

Các tác giả đã cho rằng lý do của việc này là do các chất giãn mạch tạo ra một sự tương tác cation- π đặc biệt mạnh hơn so với các hợp chất cùng tồn tại khác; do đó

các tác giả đã thử nghiệm các điều kiện tách HPLC sử dụng một cột (cột PFP) được nạp đầy chất mang mà các nhóm pentafluorophenyl, được kỳ vọng là cho thấy sự tương tác cation- π mạnh hơn, được liên kết vào, và đã thành công tiếp trong việc cô đặc và tách các thành phần làm giãn mạch.

Dựa trên các phát hiện trên, các tác giả đã thiết lập một phương pháp để sản xuất dịch chiết thực phẩm được lên men của sáng chế.

Tức là, ví dụ, chế phẩm dịch chiết thực phẩm được lên men cho thấy tác dụng hạ huyết áp và tác dụng giãn mạch khi dùng qua đường miệng được sản xuất theo các bước sau:

Bước 1: chất đông khô hoặc chất cô đặc của kiểu mạch lên men được tạo huyền phù trong axeton, được khuấy bằng cách lắc, sau đó được ly tâm để thu được chất nổi trên mặt, và chất nổi trên mặt này được cô đặc trong chân không,

Bước 2: chất cô đặc trong chân không được rửa giải bằng cách sử dụng cột chiết pha rắn được nạp đầy chất mang mà nhóm phenyl liên kết với nó, với chất rửa giải là nước chứa axit,

Bước 3: sản phẩm rửa giải được cất phân đoạn và tinh chế sử dụng một cột (cột PFP) được nạp đầy chất mang mà nhóm pentafluorophenyl được liên kết vào nó, với pha động là nước chứa methanol có tính axit.

Kiểu mạch lên men được sử dụng trong phương pháp sản xuất của sáng chế có thể được sản xuất theo phương pháp sản xuất nêu trong tài liệu JP A 2012-162503 (Tài liệu Patent 3). Cụ thể, mầm kiểu mạch mà đã loại bỏ nền gieo trồng và vỏ hạt được nhúng vào trong natri hypoclorit 100-ppm trong 10 phút để khử trùng, được cất và nghiền thành bột, và sản phẩm bột tạo thành được đặt trong một thùng chứa kín, vi khuẩn axit lactic khởi xướng (*Lactobacillus plantarum*) được bổ sung với nồng độ 25mL trên mỗi 1,0 kg sản phẩm đã nghiền thành bột; sau đó, sau khi thay thế nito,

mẫu tạo thành được lên men ở trạng thái tĩnh ở nhiệt độ phòng trong 6 ngày, được lọc và ly tâm để thu kiểu mạch lên men dưới dạng một chất lỏng có màu nâu đỏ, chất lỏng này sau đó được làm đông khô hoặc cô đặc trong chân không để thu được chất đông khô hoặc chất cô đặc trong chân không của kiểu mạch lên men.

Các ví dụ về cột chiết pha rắn được sử dụng trong bước 2 bao gồm cột chiết pha rắn (HyperSep Phenyl SPE Columns, Shimadzu STRATA Phenyl, Agilent Bond Elut PH) và các cột khác, và cột chiết pha rắn (GL Science InertSep®) là được ưa thích nhất. Ví dụ về nước chứa axit được sử dụng làm chất rửa giải bao gồm nước chứa axit clohydric, nước chứa axit axetic, nước chứa axit trifloaxetic (TFA), và nước chứa axit phosphoric hoặc các ví dụ tương tự; và nước chứa axit formic là được ưu tiên, và nước chứa 0,01% axit formic là được ưu tiên nhất.

Ví dụ về cột pha đảo được sử dụng trong bước 3 bao gồm cột phenyl (Imtakt Unison UK-Phenyl, GL Science InertSustain Phenyl, GL Science Inertsil Ph-3, COSMOSIL 5PFP Packed Column) và các cột tương tự, và cột PFP (YMC-Triart PFP) là được ưu tiên nhất. Ví dụ về nước chứa methanol có tính axit được sử dụng làm pha động bao gồm nước chứa axit clohydric-metanol, nước chứa axit axetic-metanol, nước chứa TFA-metanol, và nước chứa axit phosphoric -metanol; và nước chứa axit formic-metanol là được ưu tiên, và nước chứa 0,01% axit formic -33% metanol là được ưu tiên nhất.

Các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men được tách bằng phương pháp cất phân đoạn và tính chế như mô tả ở trên; kết quả là, axetylcholin, propionylcholin, và butyrylcholin có thể được tách với độ tinh khiết cao, và cấu tạo của chúng được xác định bằng phương pháp phổ NMR và phổ khối lượng.

Hơn nữa, bằng việc phân tích LC-MS/MS sử dụng cột PFP, ngoài 3 loại cholin nêu trên, các tác giả đã xác định được lactylcholin, levulinylcholin, carnitin và

metyl este của nó, trimethylglyxin (betain) và metyl este, etyl este và propionyl este của nó, và phosphocholin.

Phát hiện này là trường hợp đầu tiên mà trong đó lactylcholin được xác định dưới dạng sản phẩm tự nhiên; hơn nữa, levulinylocholin được tách bằng phương pháp cất phân đoạn và tinh chế của sáng chế chưa được báo cáo hoặc đề xuất.

Bằng cách sử dụng các muối hydroclorua của axetylcholin, propionylcholin, và butyrylcholin đã được tách và tinh chế bằng phương pháp của sáng chế, một thử nghiệm về sức căng đẳng trương của các mạch máu sử dụng các mẫu động mạch chủ ngực của chuột bị tăng huyết áp tự phát, và thử nghiệm với duy nhất cách dùng qua đường miệng với chuột bị tăng huyết áp tự phát đã được thực hiện.

Về sức căng đẳng trương của các mạch máu, axetylcholin chỉ ra tác dụng giãn mạch từ 10^{-9} M, và tỉ lệ giãn tối đa bằng 89,9% ở 10^{-6} M, và EC_{50} bằng $2,72 \times 10^{-8}$ M.

Propionylcholin chỉ ra phản ứng giãn từ 10^{-7} M, và tỉ lệ giãn tối đa bằng 95,2% ở 10^{-4} M, và EC_{50} bằng $2,27 \times 10^{-6}$ M.

Butyrylcholin cho thấy tác dụng giãn mạch yếu bằng tỉ lệ giãn 7,14% khi bổ sung 10^{-4} M.

Thử nghiệm dùng bằng đường miệng duy nhất được thực hiện với liều lượng bằng 10^{-11} mol/kg, với vấn đề xem xét dành cho các kết quả thử nghiệm đường uống duy nhất và hàm lượng trong kiềng mạch lên men.

Kết quả là, trong nhóm dùng axetylcholin và nhóm dùng propionylcholin, thu được tác dụng giãn mạch đáng kể khi được so sánh với nhóm đối chứng sau 9 giờ dùng.

Kết quả này đã làm đảo lộn lý thuyết lập rằng axetylcholin không gây ra hoạt

động sinh lý bằng đường uống.

Hơn nữa, phát hiện rằng propionylcholin gây ra hoạt động sinh lý bằng đường uống chưa được báo cáo hoặc đề xuất.

Trong kiểu mạch lên men, người ta đã nghiên cứu rằng các hợp chất alkylamoni bậc bốn khác (butyrylcholin, lactylcholin, levulinylncholin, phosphocholin, carnitin và metyl este của nó, trimetyl glyxin (betain) và metyl este, etyl este và propionyl este của nó) có mặt ở trạng thái hỗn hợp, bao gồm tác dụng giãn mạch và tác dụng hạ huyết áp tuyệt vời; do đó, thậm chí khi một mình các hợp chất này chỉ có tác dụng giãn mạch và tác dụng hạ huyết áp yếu, người ta vẫn cho rằng các hợp chất này cùng với axetylcholin và propionylcholin đóng góp hiệp đồng vào tác dụng hạ huyết áp.

Ngoài ra, các axit hữu cơ chứa trong kiểu mạch lên men (axit lactic, axit axetic, axit xitric) góp phần làm ổn định các cholin este chẳng hạn axetylcholin và propionylcholin bằng cách duy trì tính axit của dung dịch, nhờ đó đem lại các tác dụng bằng việc dùng đường uống; do đó, các thành phần hạ huyết áp đã biết chẳng hạn các axit amin (tyrosin, GABA) cũng được cho là đóng góp vào tác dụng hạ huyết áp cùng với axetylcholin và propionylcholin.

Ví dụ về các nguyên liệu thô đối với thực phẩm lên men của sáng chế không bị giới hạn đặc biệt miễn là chúng có thể ăn được, và bao gồm thân cây, lá và hạt (ngũ cốc, đậu) từ thực vật, và sữa có nguồn gốc từ động vật. Vi khuẩn được sử dụng để lên men thực phẩm được lên men của sáng chế không bị giới hạn đặc biệt, và có thể là loại bất kỳ miễn là chúng không gây bệnh.

Các tác giả sáng chế đã kiểm tra đối với thực phẩm được lên men khác ngoài kiểu mạch lên men bằng quá trình cất phân đoạn và tinh chế tương tự, và phát hiện ra rằng các chất sau chứa trong các thực phẩm được lên men khác nhau chẳng hạn sữa

chua, giấm đen, đậu nành lên men của Nhật và rượu sake Nhật Bản: axetylcholin, propionylcholin, lactylcholin, phosphocholin, carnitin, trimetyl glyxin và metyl este và etyl este của nó.

Đặc biệt, các tác giả đã khẳng định rằng hàm lượng propionylcholin khá cao có mặt trong các thực phẩm lên men nêu trên. Phát hiện này là một phát hiện mới chưa từng được báo cáo hoặc đề xuất.

Ngoài ra, các tác giả đã tìm ra rằng giấm đen chứa butyrylcholin, lactylcholin, phosphocholin, carnitin, trimetyl glyxin (betain) và metyl este và etyl este của nó; sữa chua chứa lactylcholin, phosphocholin, carnitin và metyl este của nó, trimetyl glyxin (betain) và metyl este, etyl este và propionyl este của nó; đậu nành lên men của Nhật chứa butyrylcholin, lactylcholin, phosphocholin, carnitin và metyl este của nó, trimetyl glyxin (betain) và metyl este, etyl este và propionyl este của nó; rượu sake Nhật Bản chứa butyrylcholin, lactylcholin, phosphocholin, carnitin và metyl este của nó, trimetyl glyxin (betain) và metyl este và etyl este của nó.

Từ phát hiện này, các tác giả có thể suy đoán rằng ít nhất trong các thực phẩm lên men nêu trên chẳng hạn sữa chua, giấm đen, đậu nành lên men của Nhật và Rượu sake Nhật Bản, có thể thu được các chế phẩm dịch chiết mà biểu hiện các hoạt tính tương tự với chế phẩm dịch chiết kiểu mạch lên men, bằng cách thực hiện cất phân đoạn và tinh chế các hoạt chất theo như phương pháp sản xuất của chế phẩm dịch chiết kiểu mạch lên men của sáng chế.

Các chế phẩm dịch chiết của sáng chế có thể được sử dụng làm hoạt chất của các thực phẩm chức năng và dược phẩm khác nhau.

Trong trường hợp thực phẩm, chúng có thể được sử dụng làm một chế phẩm thực phẩm, kết hợp với các chất phụ gia thực phẩm thích hợp. Ngoài ra chế phẩm thực phẩm, chúng có thể được cung cấp ở dạng tiêu hóa được thông thường, ví dụ, được sử

dụng như đồ uống bằng cách trộn lẫn trong trà xanh, trà đen, trà ô long, và zakkoku-cha (trà được làm từ các loại ngũ cốc khác nhau), v.v., và ở dạng các sản phẩm thực phẩm bằng cách trộn lẫn trong bánh quy, bánh mì, kẹo, v.v. Hơn nữa, có thể sử dụng chúng trong cái gọi là các chất bổ sung, ở dạng liều lượng thích hợp theo các công thức dược phẩm dưới đây.

Khi một dược phẩm được dự định, chế phẩm dịch chiết của sáng chế kết hợp với các chất phụ gia dược phẩm thích hợp có thể được sử dụng với các dạng theo liều lượng khác nhau theo quy trình điều chế dược phẩm chung. Ví dụ về các dạng theo liều lượng này bao gồm các chế phẩm dùng đường miệng gồm các chế phẩm rắn chẳng hạn bột, hạt, viên nang, viên thuốc tròn và viên nén, và các chế phẩm lỏng chẳng hạn các dung dịch, huyền phù và nhũ tương.

Khi dịch chiết của sáng chế được sử dụng làm thực phẩm, ví dụ về việc sử dụng này bao gồm không chỉ ở thực phẩm và đồ uống thông thường, mà còn ở các thực phẩm chức năng để tăng cường sức khỏe bằng cách dùng các chức năng cụ thể.

Ví dụ về các dạng cụ thể trong các trường hợp này bao gồm các chất bổ sung gồm có các viên nang, viên nén, bột và hạt, v.v., các thực phẩm bánh chẳng hạn bánh mì, bánh ngọt và bánh quy, v.v., các gia vị chẳng hạn nguồn, súp, nước sốt, mayonnaise, v.v., các sản phẩm từ sữa chẳng hạn sữa, sữa chua, kem, v.v., bánh kẹo chẳng hạn socola, kẹo, v.v., hoặc các đồ uống khác nhau chẳng hạn trà xanh, trà đen, trà ô long, trà lúa mạch, zakkoku-cha, nước trái cây, rau quả, đồ uống có sữa, đồ uống không có rượu và đồ uống có ga, v.v., tất cả chứa thành phần hoạt chất là chế phẩm của sáng chế.

Khi chế phẩm dịch chiết của sáng chế được sử dụng làm hoạt chất của dược phẩm, liều lượng của nó thay đổi phụ thuộc vào tỉ lệ của mỗi thành phần, và nhiều yếu tố khác chẳng hạn tuổi của bệnh nhân, thể trọng, giới tính, triệu chứng, và phương

pháp cấp thuốc; trong trường hợp của người lớn dùng qua đường miệng, liều lượng mỗi ngày có thể được lựa chọn thường nằm trong khoảng từ 0,1mg-100g, và trong trường hợp dùng qua đường ngoài ruột, liều lượng được lựa chọn thường nằm trong khoảng từ 0,1mg-1000mg. Liều lượng có thể tăng hoặc giảm khi thích hợp phụ thuộc vào mức độ cải thiện của triệu chứng. Về tần xuất dùng thuốc, có thể dùng một đến vài lần một ngày.

Khi chế phẩm dịch chiết của sáng chế được sử dụng làm thực phẩm, lượng hấp thu của nó có thể được chọn theo trường hợp của dược phẩm dùng đường uống nêu trên. Tuy nhiên, trong trường hợp đồ ăn và đồ uống, vì lượng và tần xuất dùng không bị giới hạn đặc biệt khác với dược phẩm, lượng hấp thu có thể được lựa chọn mà không bị giới hạn đến phạm vi nêu trên miễn là không có các triệu chứng đặc biệt nghiêm trọng, có tính đến mục đích của việc duy trì sức khỏe, cũng như là hương vị và vị ngon.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, các phương án của sáng chế sẽ được mô tả bằng cách ví dụ và ví dụ thử nghiệm; tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ sau.

Ví dụ 1

Sản xuất kiểu mạch lên men

Kiểu mạch lên men được sản xuất theo phương pháp sản xuất trong tài liệu JP A 2012-162503 (Tài liệu Patent 3).

Đối với mầm kiểu mạch, chúng được phát triển trong khoảng 10 ngày kể từ ngày gieo và được thu hoạch được mua từ công ty Salad Cosmo Co., Ltd. các mầm lúa mạch đã loại bỏ nền gieo cấy và vỏ hạt (10kg) được nhúng trong natri hypoclorit 100-ppm (20L) trong 10 phút để khử trùng, được cắt thành các chiều dài khoảng

2,0cm, và được nghiền thành bột mịn.

Sản phẩm đã nghiền thành bột mịn thu được được đặt trong một thùng chứa kín (10L), vi khuẩn axit lactic khởi xướng (*Lactobacillus plantarum*) được bổ sung vào đó ở nồng độ 25mL trên mỗi 1,0kg sản phẩm đã nghiền thành bột; sau đó, sau khi thay thế nitơ, mẫu tạo thành được lên men ở trạng thái tĩnh ở nhiệt độ phòng trong 6 ngày, được lọc và ly tâm để thu kiểu mạch lên men (6,8kg) dưới dạng chất lỏng màu nâu đỏ. Chất lỏng này sau đó được đông khô lạnh hoặc được cô đặc trong chân không theo phương pháp thông thường để thu được chất đông khô hoặc chất cô đặc trong chân không của kiểu mạch lên men, các sản phẩm này được đưa vào tách và tinh chế các thành phần làm giãn mạch.

Ví dụ 2

Cát phân đoạn các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men

Ví dụ thử nghiệm 1

Khảo sát các điều kiện tinh chế các thành phần làm giãn mạch

Đầu tiên, sử dụng chất đông khô thu được từ 2kg kiểu mạch lên men, các tác giả đã phát hiện ra các tính chất hóa học của các chất làm giãn mạch của kiểu mạch lên men và đã khảo sát các điều kiện tinh chế. Sau khi quay ly tâm kiểu mạch lên men (2kg) (3220g, 30 phút, 4°C), phần cặn được loại bỏ và chất nổi trên mặt được đông khô lạnh để thu được một chất đông khô màu đỏ sậm và hút ẩm của kiểu mạch lên men (hiệu suất 2,05%).

Trong khi khảo sát mỗi điều kiện, nồng độ của thành phần hoạt chất được kiểm tra bằng cách xác định các phân đoạn cho thấy tác dụng giãn mạch bằng thử nghiệm đo sức căng đẳng trương trong các mạch máu ở mỗi giai đoạn tinh chế.

Thử nghiệm độ ổn định pH

Kiêu mạch lên men (chất lỏng) được sử dụng trong thử nghiệm khả sát các điều kiện này là có tính axit với độ pH bằng 3,6, và đã cho thấy tác dụng giãn mạch từ 0,50µg/mL đối với các mẫu mạch máu của động mạch chủ ngực của chuột đực 12 tuần tuổi bị tăng huyết áp tự phát, với EC₅₀ bằng 8,30µg/mL.

Để thử nghiệm độ ổn định pH của kiểu mạch lên men, chất đông khô của kiểu mạch lên men (10mg) được hòa tan trong nước tinh khiết, và được điều chỉnh đến độ pH bằng 7,0, pH bằng 9,0, và pH bằng 12,0 bằng cách bổ sung natri hydroxit 1N, nước tinh khiết được thêm vào đó để đạt thể tích 1mL. Chất đông khô kiểu mạch lên men (10mg) được hòa tan trong nước tinh khiết (1mL) được sử dụng làm mẫu đối chứng (pH bằng 4,0). Sau khi được để đứng yên trong 0,5, 1, 3, 6, 12, và 24 giờ ở nhiệt độ phòng, tác dụng giãn mạch của mỗi dung dịch với nồng độ kiểu mạch lên men bằng 50µg/mL được xác định bằng cách đo sức căng đẳng trương trong các mạch máu. Kết quả là, trong khi tác dụng giãn mạch được duy trì đối với mẫu đối chứng và mẫu có độ pH bằng 7,0 thậm chí sau 24 giờ, tác dụng giãn mạch bị mất đối với mẫu có độ pH bằng 9,0 sau 6 giờ, và đối với mẫu có độ pH bằng 12,0 sau 0,5 giờ.

Thử nghiệm chiết bằng dung môi hữu cơ

Chất đông khô kiểu mạch lên men (100mg) được tạo huyền phù trong mỗi 1mL các dung môi ethanol, axeton, và etyl axetat, và các mẫu được lắc trong tủ áp có lắc (1811g, 6 giờ, nhiệt độ phòng), sau đó được quay ly tâm (3220g, 30 phút, 4°C) để tách chất nổi trên mặt và chất kết tủa.

Chất kết tủa lại được tạo huyền phù trong mỗi dung môi hữu cơ, và được tách tương tự thành chất nổi trên mặt và chất kết tủa bằng cách quay ly tâm. Chất nổi trên mặt kết hợp được cô đặc trong chân không, các dung môi được loại bỏ hoàn toàn từ đó bằng một máy bơm chân không.

Hiệu suất của mỗi phân chiết bằng dung môi hữu cơ là 975 μ g (0,98%) đối với phân chiết bằng etanol, 512 μ g (0,51%) đối với phân chiết bằng axeton, và 210 μ g (0,21%) đối với phân chiết bằng etyl axetat.

Trong thử nghiệm đo sức căng đẳng trường trong các mạch máu, tác dụng giãn mạch của mỗi dung dịch ở nồng độ dịch chiết 50 μ g/mL được xác định. Kết quả là, tỉ lệ làm giãn mạch bằng dịch chiết etanol, dịch chiết axeton, và dịch chiết etyl axetat lần lượt là 22%, 49% và 0%.

Sắc ký lọc gel

Chất đông khô kiểu mạch lên men (1,25g) được hòa tan trong nước tinh khiết (10mL), và được bơm vào một cột hở (4,2cm $\times$ 50cm) nạp đầy Sephadex G-15 (30g) với khối lượng phân tử cắt phân đoạn nằm trong khoảng 700-1500. Sau khi loại bỏ 300mL thể tích trống, mỗi 50mL được cắt phân đoạn để thu được các phân đoạn lọc gel 1-8. Mỗi phân đoạn được cắt ra được đông khô lạnh, và chất đông khô được đưa vào thử nghiệm đo sức căng đẳng trường trong các mạch máu. Số lượng và hiệu suất của mỗi phân đoạn được cắt phân đoạn bằng sắc ký lọc gel được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Hiệu suất của các phân đoạn lọc gel

Phân đoạn	1	2	3	4	5	6	7	8	Tổng
Lượng (mg)	77,2	109,0	160,1	238,0	192,9	136,1	116,2	36,2	1103,3
Hiệu suất (%)	6,2	8,7	12,8	19,0	15,4	10,9	9,3	2,9	88,3

Tác dụng giãn mạch trong mỗi phân đoạn 25 μ g/mL được xác định trong thử nghiệm đo sức căng đẳng trường trong các mạch máu, và tác dụng giãn mạch được quan sát thấy trong các phân đoạn lọc gel 3 và 4. Như kết quả khảo sát tác dụng giãn mạch của các phân đoạn lọc gel 3-5 bằng việc bổ sung tích lũy, phân đoạn lọc gel 3 cho thấy tỉ lệ giãn bằng 4,80% bằng việc bổ sung 1,0ng/mL, xác nhận phản ứng giãn

mạch phụ thuộc vào liều lượng, và tỉ lệ giãn tối đa bằng 61,9% khi bổ sung 5,0 μ g/mL. Phân đoạn lọc gel 4 cho thấy tỉ lệ giãn bằng 2,74% bằng việc bổ sung 1,0ng/mL, và tỉ lệ giãn tối đa bằng 71,2% khi bổ sung 5,0 μ g/mL. Các phân đoạn lọc gel 3 và 4 cho thấy sự bắt đầu giãn mạch ở nồng độ thấp bằng 1/500 nồng độ của kiểu mạch lên men, chỉ ra rằng chúng chứa một hợp chất thể hiện tác dụng giãn mạch mạnh. Mặt khác, phân đoạn lọc gel 5 đã cho thấy phản ứng co mạch theo cách phụ thuộc liều lượng, và do đó kiểu mạch lên men cũng chứa các thành phần co mạch ngoài các thành phần làm giãn mạch. Người ta cho rằng bằng sắc ký lọc gel, các thành phần co mạch chứa trong phân đoạn lọc gel 5 được loại bỏ và các chất giãn mạch được cô đặc.

Xử lý bằng trao đổi ion

Xử lý bằng nhựa trao đổi cation axit mạnh

Chất đông khô kiểu mạch lên men (2000mg) được hòa tan trong nước tinh khiết (5mL), và độ pH được điều chỉnh đến 7 bằng NaOH 1N, sau đó mẫu được quay ly tâm (3220g, 4°C, 20 phút), và chất nổi trên mặt được thu hồi và được pha loãng trong một ống đo đến tổng thể tích 10mL. Chất nổi trên mặt thu được (2,5mL) được bổ sung vào một dung dịch huyền phù chứa nhựa trao đổi cation axit mạnh loại proton (Amberlite IR120B, 5mL) và nước tinh khiết (2mL), được xử lý ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ bằng việc khuấy nhẹ nhàng, và được lọc để tách dung dịch được xử lý và nhựa. Nhựa được rửa hai lần bằng nước tinh khiết (15mL), và được kết hợp với dung dịch đã xử lý. Dung dịch HCl 2N (30mL) được bổ sung vào nhựa đã rửa, được xử lý ở nhiệt độ phòng trong 30 phút bằng việc khuấy nhẹ nhàng để rửa giải các thành phần đã được hấp phụ, và được lọc để tách chất rửa giải axit clohydric và nhựa. Dung dịch đã xử lý thu được được xử lý với nhựa trao đổi, và quá trình này được lặp lại hai lần; tất cả dung môi rửa giải thu được trong mỗi quá trình được gom lại. Dung dịch đã xử lý (99mL) và dung môi rửa giải axit clohydric (90mL) mỗi dung dịch được pha loãng

trong một ống đo đến tổng thể tích 300mL, được pha loãng 4 lần, sau đó tác dụng giãn mạch được xác định bằng thử nghiệm đo sức căng đẳng trương trong các mạch máu. Kết quả là, tác dụng giãn mạch quan sát được trong các phân đoạn rửa giải bằng axit clohydric; tác dụng giãn mạch bằng 56,0% khi bổ sung 100 μ L phân đoạn rửa giải bằng axit clohydric. Giả sử rằng tất cả các thành phần làm giãn mạch trong kiểu mạch lên men được hấp phụ vào nhựa trao đổi ion, nồng độ của kiểu mạch lên men ở thời điểm này tương ứng với 10 μ g/mL. Không quan sát thấy tác dụng giãn mạch trong dung dịch được xử lý.

Xử lý bằng nhựa trao đổi cation axit yếu

Chất đông khô kiểu mạch lên men (2000mg) được hòa tan trong nước tinh khiết (5mL), và độ pH được điều chỉnh đến 7 bằng NaOH 1N, sau đó mẫu được quay ly tâm (3220g, 4°C, 20 phút), và chất nổi trên mặt được thu hồi và được pha loãng trong một ống đo đến tổng thể tích 10mL. Chất nổi trên mặt thu được (2,5mL) được bổ sung vào một dung dịch huyền phù chứa nhựa trao đổi cation axit yếu loại natri (Amberlite IRC76, 5mL) và nước tinh khiết (2mL), được xử lý ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ bằng việc khuấy nhẹ, và được lọc để tách dung dịch được xử lý và nhựa. Nhựa được rửa hai lần bằng nước tinh khiết (15mL), và được kết hợp với dung dịch đã xử lý. Dung dịch HCl 2N (30mL) được bổ sung vào nhựa đã rửa, được xử lý ở nhiệt độ phòng trong 30 phút bằng việc khuấy nhẹ nhàng để rửa giải thành phần đã được hấp phụ, và dung dịch thu được được lọc để tách dung môi rửa giải axit clohydric và nhựa. Dung dịch đã xử lý thu được được xử lý với nhựa trao đổi, và quá trình này được lặp lại hai lần; tất cả dung môi rửa giải thu được trong mỗi quá trình được gom lại. Dung dịch đã xử lý (94mL) và dung môi rửa giải axit clohydric (90mL) mỗi dung dịch được pha loãng trong một ống đo đến tổng thể tích 300mL, được pha loãng 4 lần, sau đó tác dụng giãn mạch được xác định bằng thử nghiệm đo sức căng đẳng trương trong các mạch máu. Kết quả là, tác dụng giãn mạch quan sát được trong dung dịch đã xử lý và

trong các phân đoạn rửa giải bằng axit clohydric; tác dụng giãn mạch bằng 7,3% khi bổ sung 100 μ L dung dịch đã xử lý và bằng 23,3% khi bổ sung 100 μ L phân đoạn rửa giải bằng axit clohydric. Sự hấp phụ của các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men vào nhựa trao đổi cation axit yếu được cho là không đủ.

Chiết pha rắn

Cột chiết pha rắn (GL Science InertSep® PH, 5 g) được hoạt hóa bằng metanol (30mL), được rửa bằng nước chứa 0,01% axit formic (30mL), và được làm cân bằng bằng nước tinh khiết (30mL), sau đó dịch chiết axeton của kiểu mạch lên men (1,0g) được hòa tan trong nước tinh khiết (2,5mL) được áp dụng vào cột này; quá trình rửa giải được thực hiện bằng nước tinh khiết (30mL) và nước chứa 0,01% axit formic (30mL). Các phân đoạn rửa giải bằng nước tinh khiết và các phân đoạn rửa giải bằng nước chứa 0,01% axit formic được đông khô lạnh, và tác dụng giãn mạch được xác định bằng thử nghiệm đo sức căng đẳng trương trong các mạch máu. Kết quả là, tác dụng giãn mạch được quan sát thấy trong các phân đoạn rửa giải bằng nước chứa 0,01% axit formic, và tỉ lệ giãn bằng 35,6% ở nồng độ 0,5 μ g/mL. Không quan sát thấy tác dụng giãn mạch trong các phân đoạn rửa giải bằng nước.

Các điều kiện tách bằng HPLC

Bằng cách sử dụng cột pha đảo (YMC-Triart PFP, 5 μ m, 4,6mm $\times$ 250mm) mà nhóm pentafluorophenyl được liên kết vào đó, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu các điều kiện tách các thành phần làm giãn mạch trong quá trình chiết pha rắn kiểu mạch lên men (1mg/mL). Đầu tiên, sử dụng một chế phẩm axetylcholin là một ứng cử viên thành phần làm giãn mạch, các điều kiện được nghiên cứu bằng cách thay đổi hàm lượng metanol và hàm lượng axit của dung môi rửa giải. Cụ thể, 60 μ L chế phẩm axetylcholin (0,1mg/mL) được bơm vào với tốc độ chảy bằng 0,5mL/phút, và nước chứa 0, 5, 15, 30, 50, và 60% methanol và nước chứa 50% metanol chứa 0,002, 0,004,

0,006, 0,008, 0,01, và 0,015% axit formic được sử dụng làm dung môi rửa giải, sự thay đổi hoạt động rửa giải của axetylcholin được khảo sát ở nhiệt độ tách bằng 30°C. Kết quả là, khi hàm lượng metanol tăng lên, thời gian rửa giải của axetylcholin tăng lên và hình dạng đỉnh cực đại trở nên tốt hơn. Ngoài ra, mặc dù hàm lượng axit formic không có nhiều ảnh hưởng đến thời gian lưu của axetylcholin, khi hàm lượng axit tăng, các đỉnh phát hiện giảm bởi sự gia tăng đường nền. Từ các kết quả trên, người ta đã phát hiện ra rằng nước chứa 0,01% axit formic -50% metanol là thích hợp chất để phân tích axetylcholin. Fig. 1 biểu thị sự thay đổi hoạt động rửa giải của axetylcholin với sự thay đổi hàm lượng metanol, và Fig. 2 biểu thị sự thay đổi hoạt động rửa giải của axetylcholin với sự thay đổi hàm lượng axit.

Tiếp theo, các điều kiện tách của quá trình chiết pha rắn kiểu mạch lên men đã được khảo sát. Dựa vào kết quả các điều kiện phân tích của axetylcholin, phép phân tích bằng HPLC được thực hiện với 0,01% axit formic bằng cách thay đổi hàm lượng metanol ở 25, 30, 35, 40, 45, và 50%. Kết quả là, quá trình tách với hàm lượng metanol bằng 35% là tốt nhất. Fig. 3 cho thấy hoạt động rửa giải của các sản phẩm đã được tinh chế của kiểu mạch lên men với sự thay đổi hàm lượng metanol dưới điều kiện hàm lượng axit cố định (0,01%).

Hơn nữa, khi hàm lượng metanol thay đổi nhẹ (38, 36, 33%), việc tách tốt nhất của nửa thứ hai của sắc ký đồ thu được với 33% metanol. Fig. 4 cho thấy hoạt động rửa giải của các sản phẩm đã được tinh chế của kiểu mạch lên men với sự thay đổi hàm lượng metanol dưới điều kiện hàm lượng axit cố định (0,01%).

Cuối cùng, quá trình tách với nước chứa 0,01% axit formic - 33% metanol được khảo sát bằng cách thiết lập nhiệt độ tách ở 30°C và 40°C; sự tách tốt hơn thu được ở nhiệt độ 40°C. Fig. 5 biểu thị sự thay đổi trong sắc ký đồ do sự thay đổi nhiệt độ tách.

Từ các kết quả trên, các điều kiện tách tối ưu được xác định như sau.

Cột: YMC-Triart® PFP, 5 μ m, 4,6mm $\times$ 250mm

Thể tích bơm mẫu: chiết pha rắn kiểu mạch lên men (0,1mg/mL) 60 μ L

Pha động: nước chứa 0,01% axit formic-33% metanol (đẳng thành phần pha động)

Tốc độ chảy: 0,5mL/phút

Nhiệt độ: 40°C

Ví dụ 3

Tinh chế các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men

100kg kiểu mạch lên men được cô đặc trong chân không, được đưa vào chiết bằng axeton, chiết pha rắn, sắc ký lọc gel, và HPLC để tinh chế các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men.

Chiết các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men bằng axeton

Kiểu mạch lên men được quay ly tâm (3220g, 30 phút, 4°C), và phần cặn được loại bỏ sau khi quay ly tâm. Chất nổi trên mặt thu được được cô đặc bằng cách sử dụng một thiết bị bay hơi quay dưới áp suất giảm để thu được chất cô đặc của kiểu mạch lên men. Chất cô đặc của kiểu mạch lên men (xấp xỉ 120g) và axeton (300mL) được bổ sung vào một cối giã 2-L, và các thành phần giãn mạch được chiết bằng cách nghiền mẫu bằng một cái chày trong 5 phút, và chất nổi trên mặt được thu hồi bằng một máy hút. Bổ sung tiếp axeton (300mL) vào phần cặn, và sau khi nghiền đủ trong 5 phút bằng chày, chất nổi trên mặt được thu hồi theo cách tương tự. Việc này được lặp đi lặp lại tổng cộng 12 lần. Dung dịch axeton thu được được cô đặc bằng cách sử dụng một thiết bị bay hơi quay dưới áp suất giảm để thu được dịch chiết thô axeton. Dịch chiết thô axeton (xấp xỉ 60g) và etyl axetat (xấp xỉ 200mL) được bổ sung vào một bình định mức có hình quả cà tím 500-mL, và sau khi khuấy đều bằng đũa thủy tinh trong 5 phút, chất nổi trên mặt được loại bỏ sau 10 phút làm lạnh bằng đá. Etyl

axetat (xấp xỉ 200mL) lại được bổ sung vào phần còn lại, được khuấy đều trong 5 phút bằng đũa thủy tinh, và chất nổi trên mặt được loại bỏ theo cách tương tự. Việc này được lặp đi lặp lại tổng cộng 12 lần, sau đó phần cặn thu được được sấy khô dưới áp suất giảm trong hơn 3 giờ trong một bình hút ẩm để thu được dịch chiết axeton.

Chiết pha rắn và tinh chế các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men và cắt phân đoạn bằng sắc ký lọc gel

Như là một sắc ký lọc gel được xử lý trước, một cột chiết pha rắn (GL Science InertSep® PH, 50 g) được hoạt hóa bằng metanol (300mL), được rửa bằng nước chứa 0,01% axit formic (300mL), và được làm cân bằng bằng nước tinh khiết (300mL); sau đó dịch chiết axeton của kiểu mạch lên men (10g) được hòa tan trong nước tinh khiết (20mL) và được áp dụng vào cột; sau khi rửa giải các tạp chất bằng nước tinh khiết (300mL), các thành phần làm giãn mạch được rửa giải bằng nước chứa 0,01% axit formic (300mL). Dung dịch rửa giải thu được được cô đặc bằng cách sử dụng một thiết bị bay hơi quay dưới áp suất giảm để thu được phần chiết pha rắn.

Tiếp theo, trong sắc ký lọc gel, một cột (4,2cm × 50cm) được nạp đầy Sephadex G-15 (230 g), và phần dịch chiết pha rắn (2mL) đã được chuẩn bị trong 500mg/mL nước tinh khiết được bơm vào, được rửa giải bằng nước tinh khiết để thu 410-485mL dung dịch rửa giải được cắt phân đoạn. Dung dịch rửa giải được cắt phân đoạn được cô đặc trong chân không và được đông khô lạnh để thu sản phẩm lọc gel.

Phân tích LC-MS và LC-MS/MS các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men

Phép phân tích LC-MS và LC-MS/MS các sản phẩm lọc gel được thực hiện. Sản phẩm lọc gel và dung môi phân tích được bổ sung vào một ống nhỏ thể tích 1,5mL để chuẩn bị dung dịch mẫu có nồng độ 1mg/mL, dung dịch được lọc qua bộ lọc Millex®-LH (0,45 µm) để thu được mẫu LC-MS. Đối với cột, cột pha đảo

YMC-Triart® PFP (5 μm , 4,6 mm $\times$ 250 mm) mà các nhóm PFP liên kết vào đó được sử dụng, và nước chứa 0,01% axit formic-33% metanol được sử dụng làm pha động. Phương thức ion hóa ESI⁺, tốc độ chảy: 0,5mL/phút (LC) và 0,3mL/phút (MS), nhiệt độ tách: 40°C, thể tích bơm mẫu: 10 μL , điện áp mao quản: 3500 V, dòng chảy khí N₂ (hình nón): 50 L/giờ, nhiệt độ nguồn N₂: 120°C, nhiệt độ khử solvat hóa N₂: 350°C. Ngoài ra, điện áp ion hóa được khảo sát trong khoảng 10-60 V đối với mỗi đỉnh cực đại được phân tích, và điều kiện ion hóa vượt trội nhất, tức là, điện áp hình nón bằng 10 V và điện áp va chạm bằng 30 V, được sử dụng. Đối với các đỉnh ion lớn quan sát được bằng phân tích LC-MS, việc quét làm mất tính trung tính được thực hiện để xác định các đỉnh có nhóm trimethylamoni (tỉ lệ khối lượng-điện tích bằng 59) là hợp chất alkylamoni bậc bốn. Sau đó, LC-MS/MS phép phân tích được thực hiện sử dụng tỉ lệ khối lượng-điện tích của hợp chất alkylamoni bậc bốn đã được xác định làm ion tiền chất. Kết quả là, đối với các hợp chất alkylamoni bậc bốn, các chất sau được xác định: axetylcholin, propionylcholin, butyrylcholin, lactylcholin, levulinylocholin, carnitin và metyl este của nó, trimetylglyxin (betain) và metyl este, etyl este và propionyl este của nó, và phosphocholin.

Ví dụ 4

Tách và tinh chế axetylcholin, propionylcholin, và butyrylcholin

Tinh chế bằng HPLC các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men

Dựa vào các kết quả phân tích LC-MS ở trên, các thành phần làm giãn mạch chứa trong sản phẩm lọc gel được tinh chế bằng HPLC để tách các thành phần làm giãn mạch. Sản phẩm lọc gel và dung môi phân tích HPLC được bổ sung vào một ống nhỏ có thể tích 1,5-mL để chuẩn bị dung dịch mẫu có nồng độ 100mg/mL, dung dịch này được lọc qua bộ lọc Millex®-LH (0,45 μm) để thu được một mẫu tách. Hệ thống HPLC Prominence được sử dụng làm hệ thống phân tích, và YMC-Triart® PFP (5 μm ,

20mm × 250mm) được sử dụng làm cột. Các điều kiện phân tích như sau: pha động: nước chứa 0,01% axit formic -33% metanol, tốc độ chảy: 5,671mL/phút, nhiệt độ tách: 40°C, bước sóng phát hiện: 215nm, thể tích bơm mẫu: 50µL sản phẩm lọc gel. Các phân đoạn chứa các thành phần làm giãn mạch được cất phân đoạn, và việc tinh chế tương tự được lặp đi lặp lại nếu cần thiết, để thu 3 loại thành phần tinh khiết. Sau khi bổ sung axit clohydric, sản phẩm tinh chế cuối cùng được cô đặc trong chân không và được đông khô lạnh để thu được hợp chất hydroclorua của sản phẩm tinh chế, được sử dụng để xác định cấu tạo và thử nghiệm.

Phân tích NMR các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men

Phép phân tích NMR được thực hiện đối với 3 loại sản phẩm đã tinh chế bằng HPLC. Đối với các sản phẩm cất phân đoạn thu được, mỗi chất đông khô (1,6mg) được hòa tan bằng cách bổ sung nước nặng (D₂O, 0,16mL) để chuẩn bị các mẫu đo NMR. Thiết bị NMR với tần số cộng hưởng ¹H bằng 500 MHz (ADVANCE DRX500, Bruker Biospin Co., Ltd., Yokohama) được sử dụng, với số lũy tích bằng 128 lần. Kết quả là, đồ thị NMR của 3 loại sản phẩm được tinh chế bằng HPLC là giống với axetylcholin hydroclorua, propionylcholin tổng hợp và butyrylcholin phẩm cấp đặc biệt có sẵn trên thị trường; theo đó, chúng được xác định là axetylcholin, propionylcholin, và butyrylcholin.

Phân tích khối lượng các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men

Phép phân tích MALDI-TOF/MS được thực hiện đối với 3 loại sản phẩm được tinh chế bằng HPLC. Đối với các sản phẩm cất phân đoạn thu được, mỗi chất đông khô (0,01mg) được hòa tan trong axetonitril 50% chứa TFA 0,1% (15µL) để chuẩn bị mẫu đo. 1µL mỗi mẫu và dung dịch axetonitril 50% chứa TFA 0,1% của axit 2,5-dihydroxybenzoic làm chất nền (7500, 1500, 750µg/mL) được trộn trên một đĩa và được sấy khô trong một bình hút ẩm. Trong phép phân tích MALDI-TOF MS, máy

quang phổ khối lượng MALDI-TOF MS (AB SCIEX TOF/TOF 5800, AB Sciex Japan Ltd., Tokyo) được sử dụng với hình thức gương phản xạ, khoảng quét 10-300 m/z, và cường độ tia laze bằng 5500 eV. Kết quả là, 146,1182 m/z (giá trị lý thuyết: 146,1176), 160,1337 m/z (giá trị lý thuyết: 160,1332), và 174,1497 m/z (giá trị lý thuyết: 174,1489) được quan sát, lần lượt, tương ứng với khối lượng chính xác của axetylcholin, propionylcholin, và butyrylcholin.

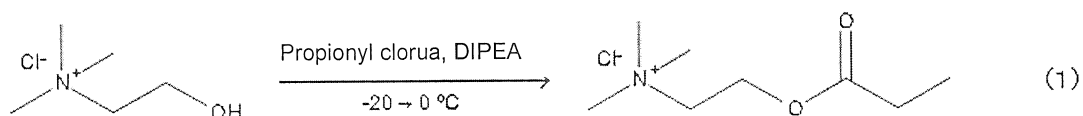
Đặc trưng của các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men

Tổng hợp chất chuẩn

Đối với chất chuẩn của mỗi muối hydroclorua của axetylcholin, propionylcholin và butyrylcholin đã được tách và tinh chế, axetylcholin hydroclorua phẩm cấp đặc biệt có sẵn trên thị trường được sử dụng đối với axetylcholin, và các chất mà đã được tổng hợp, được tinh chế bằng HPLC và được đông khô lạnh dạng muối hydroclorua trong phòng thí nghiệm của các tác giả được sử dụng đối với propionylcholin và butyrylcholin. Propionylcholin và butyrylcholin có thể được tổng hợp theo sơ đồ tổng hợp sau được biểu diễn bởi công thức (1) và (2).

Tổng hợp propionylcholin

Công thức 1

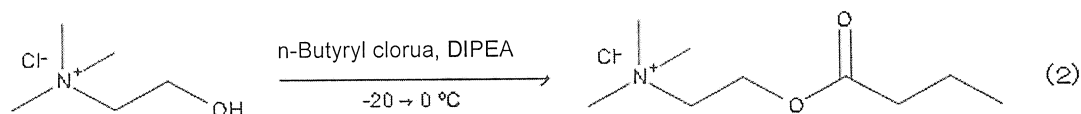


Tổng hợp propionylcholin: Hòa tan cholin hydroclorua (0,42g, 3,0mmol) trong N, N-dimetylformamit (DMF, 6,0mL), sau đó bổ sung propionyl clorua (0,56g, 6,0mmol) và diisopropyletylamin (DIPEA, 0,78g, 4,5mmol) và để mẫu đạt tới nhiệt độ phòng từ 0°C và cho phản ứng trong 1 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng, DMF được chưng cất ra, và sản phẩm được kết tủa bằng diclometan (DCM)-etyl axetat (1:1). Chất kết tủa

được kết tinh lại bằng DCM-ethyl axetat (5:1) và được kết tinh lại tiếp bằng DCM để thu được propionylcholin hydroclorua dưới dạng chất bột màu trắng. Hiệu suất: 92%, $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 0,96(3H, t, $J = 7,8$ Hz, CH_3), 2,32(2H, q, $J = 7,5$ Hz, CH_2), 3,08(9H, s, CH_3), 3,60(2H, t, $J = 2,5$ Hz, CH_2), 4,42(2H, t, $J = 2,3$ Hz, CH_2)

Tổng hợp butyrylcholin

Công thức 2



Tổng hợp butyrylcholin: Hòa tan cholin hydroclorua (0,42g, 3,0mmol) trong DMF (6,0mL), sau đó bổ sung butyryl clorua (0,62g, 6,0mmol) và DIPEA (0,78g, 4,5mmol) vào và để mẫu đạt tới nhiệt độ phòng từ 0°C và cho phản ứng trong 1 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng, DMF được chưng cất ra, và sản phẩm được kết tủa bằng DCM-ethyl axetat (1:1). Chất kết tủa được kết tinh lại bằng DCM-ethyl axetat (5:1) và được kết tinh lại tiếp bằng DCM để thu được butyrylcholin hydroclorua dưới dạng chất bột màu trắng. Hiệu suất: 89%, $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 0,78(3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3), 1,49(2H, q, $J = 7,5$ Hz, CH_2), 2,29 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_2), 3,08(9H, s, CH_3), 3,60(2H, t, $J = 2,3$ Hz, CH_2) , 4,43(2H, t, $J = 2,3$ Hz, CH_2)

Các động vật thí nghiệm được sử dụng

Các thử nghiệm trên động vật được thực hiện theo hướng dẫn thử nghiệm trên động vật của Đại học Shinshu. Trong nghiên cứu này, những con chuột đực từ 10-13 tuần tuổi bị tăng huyết áp tự phát (SHR/NCrIj, Charles River Laboratories Japan, Yokohama) được sử dụng làm động vật thí nghiệm. Chuột SHR được gây giống trong các lồng riêng rẽ trong phòng gây giống được kiểm soát với chu kỳ sáng tối 12 giờ và nhiệt độ phòng bằng $22-23^\circ\text{C}$. Trong khi gây giống thích nghi, chế độ ăn uống tiêu

chuẩn của chuột (MF; Charles River Laboratories) và nước máy được cung cấp tự do. Chuột SHR là một chủng chuột được phân tách vào năm 1963 bằng sự lựa chọn giao phối với chuột Wistar-Kyoto được gây giống trong trung tâm thử nghiệm động vật của đại học Kyoto. Chúng được gọi là chuột bị tăng huyết áp tự phát hay chuột bị tăng huyết áp về bản chất; trong khi huyết áp tâm thu của chuột Wistar-Kyoto tách biệt về bên mẹ bằng xấp xỉ 135mmHg đối với con đực trưởng thành và xấp xỉ 132mmHg đối với con cái trưởng thành, huyết áp của hầu hết tất cả chuột SHR trở thành 150 mmHg hoặc cao hơn sau 2 tháng kể từ khi sinh, và hầu hết đạt tới giá trị tối đa lúc 4-5 tháng, với nhiều giá trị trong khoảng 180-210mmHg. Nói chung, là một động vật mô hình về sự tăng huyết áp về bản chất mà được cho là chiếm xấp xỉ 90% sự tăng huyết áp ở người, chuột SHR được sử dụng để làm sáng tỏ các tác dụng dược lý và các chức năng của thực phẩm, và cơ chế của sự tăng huyết áp.

Thử nghiệm đo sức căng đẳng trường trong các mạch máu sử dụng các chất chứa các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men

Động mạch chủ ngực sử dụng để thí nghiệm được lấy ra khỏi chuột đực SHR 10-12 tuần tuổi; sau khi loại bỏ các mô liên kết, nó được cắt thành chiều dài 2-3 mm để tạo ra các mẫu hình vòng tròn. Các mẫu hình vòng tròn tạo thành được gắn vào một xe buýt bộ phận cơ thể được nạp đầy dung dịch Krebs ở nhiệt độ 37°C (119mM NaCl/4,7 mM KCl/1,1 mM KH₂PO₄/1,2 mM MgSO₄/25 mM NaHCO₃, pH 7,4) trong đó hỗn hợp khí chứa 95% O₂-5% CO₂ được làm thông, sau đó sức căng tĩnh của 1,5g được áp dụng (UFER UC-05A; Iwashiyama Kishimoto Ika Sangyo K.K., Kyoto). Sức căng mạch máu được đo bằng bộ chuyển đổi UFER UM-203 (Iwashiyama Kishimoto Ika Sangyo K.K.). Sau khi ủ 60 phút từ khi gắn, các mẫu hình vòng tròn được làm co lại sử dụng chất co mạch phenylephrin (nồng độ cuối cùng bằng 0,30μM). Bổ sung axetylcholin có sẵn thương mại, là một chất làm giãn mạch phụ thuộc vào lớp nội mạc (nồng độ cuối cùng bằng 100μM) vào các mẫu vòng tròn đã co lại, và sự có mặt/vắng

mặt của nội mạc mạch máu được xác định bởi sự có mặt/vắng mặt của tác dụng giãn mạch. Sau đó, các mẫu vòng tròn được rửa bằng dung dịch Krebs để loại bỏ thuốc, được ủ ở sức căng tĩnh trong 10 phút, và được làm co lại lần nữa bằng $0,30\mu\text{M}$ phenylephrin. Sau khi quá trình này được lặp lại hai lần, bổ sung tiếp $0,30\mu\text{M}$ phenylephrin vào để đảm bảo rằng sự co thắt đạt đến mức tối đa, sau đó mỗi mẫu đã hòa tan trong dung dịch được bổ sung vào theo cách lũy kế sao cho nồng độ cuối cùng của nó là 10^{-9} , 10^{-8} , $10^{-7,5}$, 10^{-7} , $10^{-6,5}$, 10^{-6} , 10^{-5} , và 10^{-4} M. Tác dụng giãn mạch (tỉ lệ giãn, %) được biểu thị bằng cách sử dụng sức căng mạch máu khi co thắt bằng phenylephrin là một tham khảo. Kết quả về thử nghiệm sức căng đẳng trường trong các mạch máu đối với axetylcholin, propionylcholin, và butyrylcholin đã tinh chế được chỉ ra trong Fig. 6.

Axetylcholin đã tinh chế cho thấy tỉ lệ giãn bằng 1,52% khi bổ sung 10^{-9} M, và sau đó cho thấy phản ứng giãn phụ thuộc vào liều lượng lên đến 10^{-6} M, sau đó có sự co thắt nhẹ ở những nồng độ cao hơn. Tỉ lệ giãn tối đa là 89,9% khi bổ sung 10^{-6} M, xác định sự giãn lớn ở liều lượng thấp. EC_{50} bằng $2,72 \times 10^{-8}$ M. Ngoài ra, propionylcholin đã tinh chế cho thấy phản ứng giãn từ 10^{-7} M, và tỉ lệ giãn tối đa bằng 95,2% ở 10^{-4} M, và EC_{50} bằng $2,27 \times 10^{-6}$ M. Trong khi đó, butyrylcholin đã tinh chế cho thấy tỉ lệ giãn bằng 7,14% khi bổ sung 10^{-4} M, chỉ ra tác dụng giãn yếu so với axetylcholin và propionylcholin. Axetylcholin có sẵn thương mại và propionylcholin và butyrylcholin tổng hợp cũng cho thấy tác dụng giãn mạch tương tự. Các kết quả trên cho thấy rằng axetylcholin và propionylcholin được tách và tinh chế từ kiểu mạch lên men có tác dụng giãn mạch rất mạnh.

Thử nghiệm dùng qua đường miệng duy nhất các hợp chất chứa các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men

Thử nghiệm dùng qua đường miệng duy nhất được thực hiện bằng cách sử

dụng chuột đực SHR 12 tuần tuổi với trọng lượng cơ thể nằm trong khoảng 280-320g. Sau khi được gây giống thích nghi trong 1 tuần, chuột được cho nhịn đói trong 12 giờ, và một mẫu được đưa cho chuột dùng bằng đường uống duy nhất. Mẫu được dùng được hòa tan trong nước tinh khiết, và bằng đường uống duy nhất với liều lượng bằng 10^{-11} mol/kg (trọng lượng cơ thể) cho mỗi 6 con chuột SHR. Các dung dịch mẫu chứa nước của axetylcholin, propionylcholin và butyrylcholin đã tinh chế có tính axit, với độ pH bằng 4,7, 4,3, và 4,4, tương ứng. Nước tinh khiết được cho dùng với nhóm đối chứng. Sự thay đổi về huyết áp tâm thu và huyết áp tâm trương được đo bằng dụng cụ đo huyết áp không xâm lấn Softron BP-98A (Softron Co., Ltd., Tokyo) bằng phương pháp buộc vào cổ tay, trước khi dùng và sau khi dùng 3, 6, 9, và 24 giờ. Kết quả thử nghiệm cho dùng đường uống duy nhất của axetylcholin, propionylcholin và butyrylcholin đã tinh chế được chỉ ra trong Fig. 7.

Kết quả là, trong nhóm cho dùng axetylcholin, tác dụng hạ huyết áp tâm thu đáng kể được tạo ra sau 9 giờ dùng thuốc ($p < 0,01$) so với nhóm đối chứng, và tác dụng giãn mạch tối đa ở thời điểm này là 24,7 mmHg. Ngoài ra, trong nhóm cho dùng propionylcholin, sự giảm đáng kể huyết áp tâm thu bằng tối đa 8,05 mmHg ($p < 0,05$) quan sát được sau 9 giờ dùng thuốc. mặt khác, trong nhóm cho dùng butyrylcholin, không quan sát thấy sự giảm đáng kể huyết áp ở liều lượng 10^{-11} mol/kg. Axetylcholin có sẵn thương mại và propionylcholin và butyrylcholin tổng hợp cũng cho thấy tác dụng hạ huyết áp tương tự.

Ví dụ 5

Tách và tinh chế lactylcholin và levulinylcholin

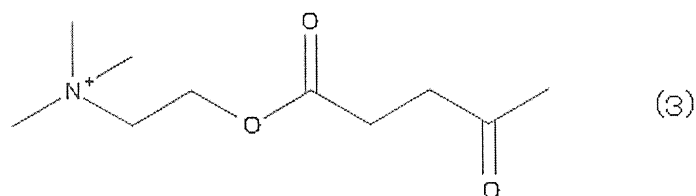
Theo phương pháp được mô tả trong ví dụ 3, lactylcholin được xác định là sản phẩm tự nhiên đối với lần đầu tiên.

Phổ khối lượng của lactylcholin bằng phép phân tích LC-MS được chỉ ra

trong Fig. 8-1, và phổ khối lượng của lactylcholin bằng phép phân tích LC-MS/MS được chỉ ra trong Fig. 8-2.

Hơn nữa, levulinylocholin được biểu diễn bởi công thức (3) dưới đây, được cho là một hợp chất mới, đã được tách và tinh chế.

Công thức 3



Phổ khối lượng của levulinylocholin bằng phép phân tích LC-MS được chỉ ra trong Fig. 9-1, và phổ khối lượng của levulinylocholin bằng phép phân tích LC-MS/MS được chỉ ra trong Fig. 9-2.

Phân tích LC-MS/MS các hợp chất alkylamoni bậc bốn trong kiểu mạch lên men và trong các thực phẩm lên men khác

Các hợp chất alkylamoni chứa trong kiểu mạch lên men, giấm đen, sữa chua, và Rượu sake Nhật Bản được đưa vào phân tích LC-MS. Mỗi chất đông khô được cân trong một khối (1g kiểu mạch lên men, 10g mỗi chất giấm đen, sữa chua, đậu nành lên men của Nhật và Rượu sake Nhật Bản) và 1mg carbachol được bổ sung như là chất chuẩn nội. Bổ sung 30mL axeton và khuấy trong phút, và chất nổi trên mặt được thu hồi vào một ống ly tâm thể tích 50mL và được quay ly tâm (4°C, 1811g, 10 phút) để thu chất nổi trên mặt. Bổ sung tiếp 30mL axeton vào phần còn lại và khuấy, quay ly tâm, và thu hồi chất nổi trên mặt; công việc này được lặp đi lặp lại nhiều hơn ba lần để thu dịch chiết axeton. Dịch chiết axeton được cô đặc trong chân không, đông khô lạnh và hòa tan trong nước tinh khiết (2,5mL), và được đưa vào chiết pha rắn sử dụng cột

chiết pha rắn (GL Science InertSep® PH, 5g). Trong quá trình chiết pha rắn, đầu tiên, cột được hoạt hóa bằng metanol (30mL), được rửa bằng nước chứa 0,01% axit formic (30mL), và được cân bằng bằng nước tinh khiết (30mL), sau đó bổ sung mẫu vào. Các tạp chất được loại bỏ bằng nước tinh khiết (30mL), và quá trình rửa giải được thực hiện bằng nước chứa 0,01% axit formic (30mL) để thu được dịch chiết pha rắn chứa các hợp chất alkylamoni bậc bốn. Dịch chiết pha rắn được cô đặc trong chân không, đông khô, và hòa tan trong dung môi phân tích (nước chứa 0,01% axit formic-33% metanol, 1mL) và được đưa vào phân tích LC-MS. Việc định lượng các hợp chất được thực hiện bằng cách định rõ tỉ lệ khối lượng-điện tích của các hợp chất alkylamoni bậc bốn được xác định trong kiểu mạch lên men theo cách thức kiểm soát ion đơn lẻ (SIM). Các tỉ lệ khối lượng-điện tích được xác định đối với các hợp chất như sau: axetylcholin: 146,1, propionylcholin: 160,1, butyrylcholin: 174,2, lactylcholin: 176,1, levulinylocholin: 202,1, phosphocholin: 184,1, carnitin: 162,1, metyl carnitin: 176,1, trimetylglyxin: 118,1, metyl trimetylglyxin: 132,1, etyl trimetylglyxin: 146,1, propionyl trimetylglyxin: 160,1. Các điều kiện phân tích khác tương tự như phép phân tích LC-MS được đề cập ở trên của các thành phần làm giãn mạch của kiểu mạch lên men. Bảng 2 cho thấy kết quả định lượng các hợp chất alkylamoni bậc bốn. Hàm lượng của mỗi hợp chất đã được hiệu chỉnh theo sự hao hụt vật chất trong quá trình tinh chế bằng cách sử dụng các kết quả định lượng của chất chuẩn nội, và được biểu thị bằng đương lượng axetylcholin của hàm lượng hợp chất alkylamoni bậc bốn trong 100g trọng lượng tươi (100g FW).

Bảng 2. Kết quả định lượng các hợp chất alkylamoni bậc bốn trong thực phẩm lên men (đương lượng axetylcholin $\mu\text{g}/100\text{g}$ trọng lượng tươi)

Các hợp chất alkylamoni bậc bốn	Kiêu mạch lên men	Giấm đen	Sữa chua	Đậu nành lên men của Nhật	Rượu sake Nhật Bản
Axetylcholin	295,8	11,8	5,8	1,1	41,7
Propionylcholin	457,9	27,3	1576,5	95,2	134,0
Butyrylcholin	94,4	24,1	N.D.	66,4	16,8
Lactylcholin	37,3	10,7	10,5	37,5	7,5
Levulinylcholin	31,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Phosphocholin	16,1	9,7	11,7	11,7	2,7
Carnitin	164,1	10,8	127,0	21,7	9,8
Metyl carnitin	9,4	N.D.	3,2	39,0	12,2
Trimetyl glyxin	23,8	30,8	98,6	3447,8	13,9
Metyl trimetyl glyxin	76,1	30,8	3,5	12622,1	20,7
Etyl trimetyl glyxin	147,7	6,78	3,1	33,2	48,2
Propionyl trimetyl glyxin	217,4	N.D.	4,2	88,1	N.D.

ND: không phát hiện được (dưới giới hạn phát hiện)

Khả năng áp dụng trong công nghiệp

Dịch chiết thực phẩm lên men của sáng chế có tác dụng giãn mạch đáng kể; bằng việc bao gồm dịch chiết này làm hoạt chất, có thể để sản xuất các thực phẩm chức năng hoặc dược phẩm điều trị bệnh cao huyết áp, v.v.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp sản xuất chế phẩm dịch chiết từ thực phẩm lên men bao gồm phần dịch chiết chứa ít nhất axetylcholin, và propionylcholin và/hoặc lactylcholin, được đặc trưng ở chỗ phương pháp bao gồm các bước sau:

- (1) chất đông khô hoặc chất cô đặc của thực phẩm lên men được chọn từ nhóm gồm kiều mạch giấm đen, sữa chua, đậu nành lên men của Nhật và rượu sake Nhật Bản được lên men được tạo huyền phù trong etanol hoặc axeton, được khuấy bằng cách lắc, sau đó được quay ly tâm để thu chất nổi trên mặt, chất này sau đó được cô đặc trong chân không (bước 1),
- (2) chất cô đặc trong chân không được rửa giải bằng cách sử dụng cột chiết pha rắn được nạp đầy chất mang mà nhóm phenyl được liên kết vào đó, với dung môi rửa giải là nước chứa axit (bước 2),
- (3) dung dịch rửa giải được cất phân đoạn và tinh chế sử dụng một cột (cột PFP) được nạp đầy chất mang mà nhóm pentaflophenyl được liên kết vào đó, với pha động là nước chứa methanol có tính axit (bước 3),
- (4) độ pH của phân đoạn đã tinh chế nêu trên được điều chỉnh trong khoảng từ 4.0 đến 7.0 (bước 4).

2. Phương pháp sản xuất theo điểm 1, được đặc trưng ở chỗ:

- (1) trong bước 2, cột chiết pha rắn (GL Science InertSep® PH) được sử dụng làm cột chiết pha rắn, và nước chứa 0,01% axit formic được sử dụng làm dung môi rửa giải,
- (2) trong bước 3, cột PFP (YMC-Triart PFP) được sử dụng làm cột pha đảo, và nước chứa 0,01% axit formic-33% metanol được sử dụng làm pha động.

Fig. 1

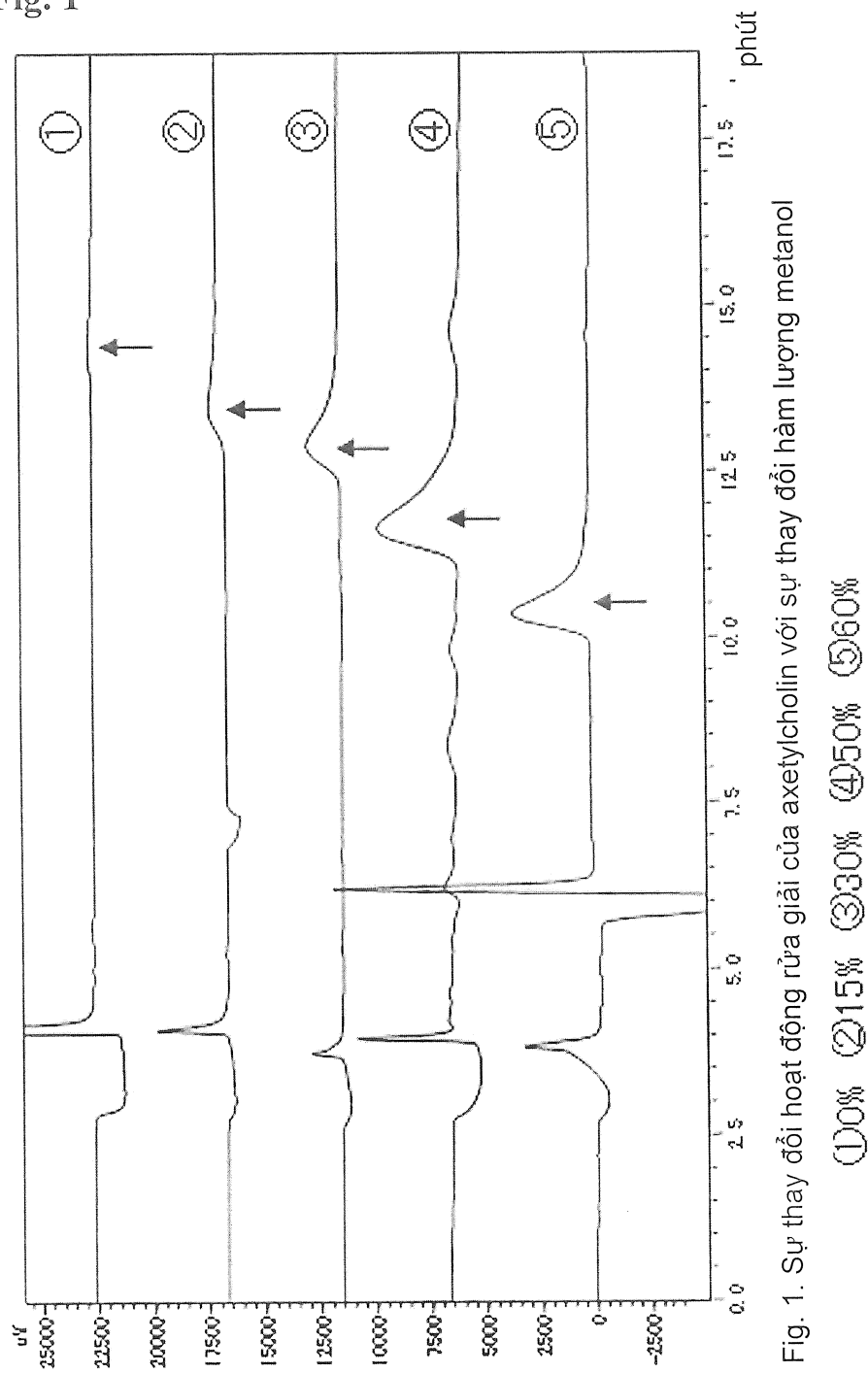


Fig. 1. Sự thay đổi hoạt động rửa giải của axetylcholin với sự thay đổi hàm lượng metanol

Fig. 2

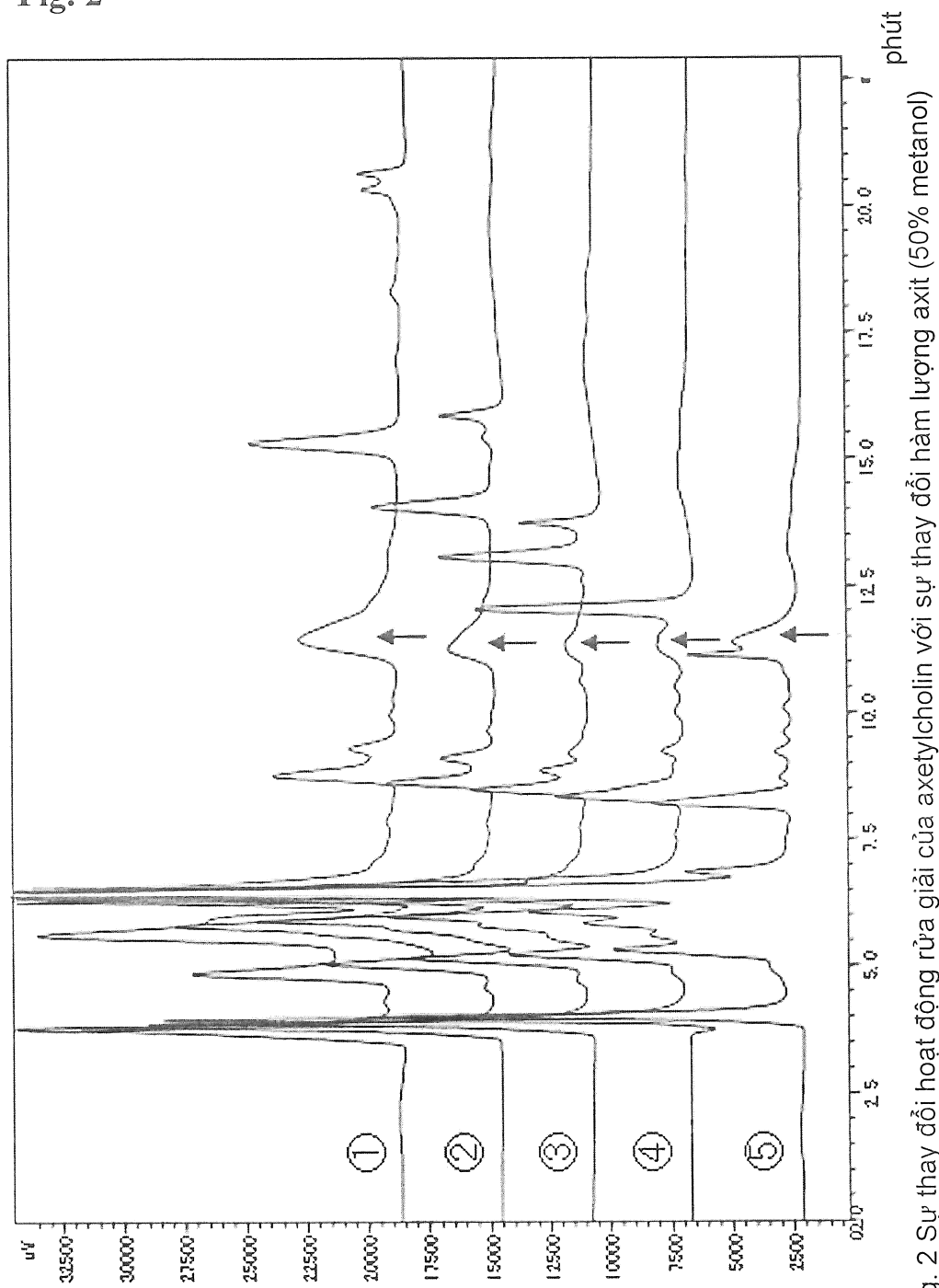


Fig. 2 Sự thay đổi hoạt động rửa giải của axetylcholin với sự thay đổi hàm lượng axit (50% metanol)

①0,002% ②0,004% ③0,006% ④0,008% ⑤0,01%

Fig. 3

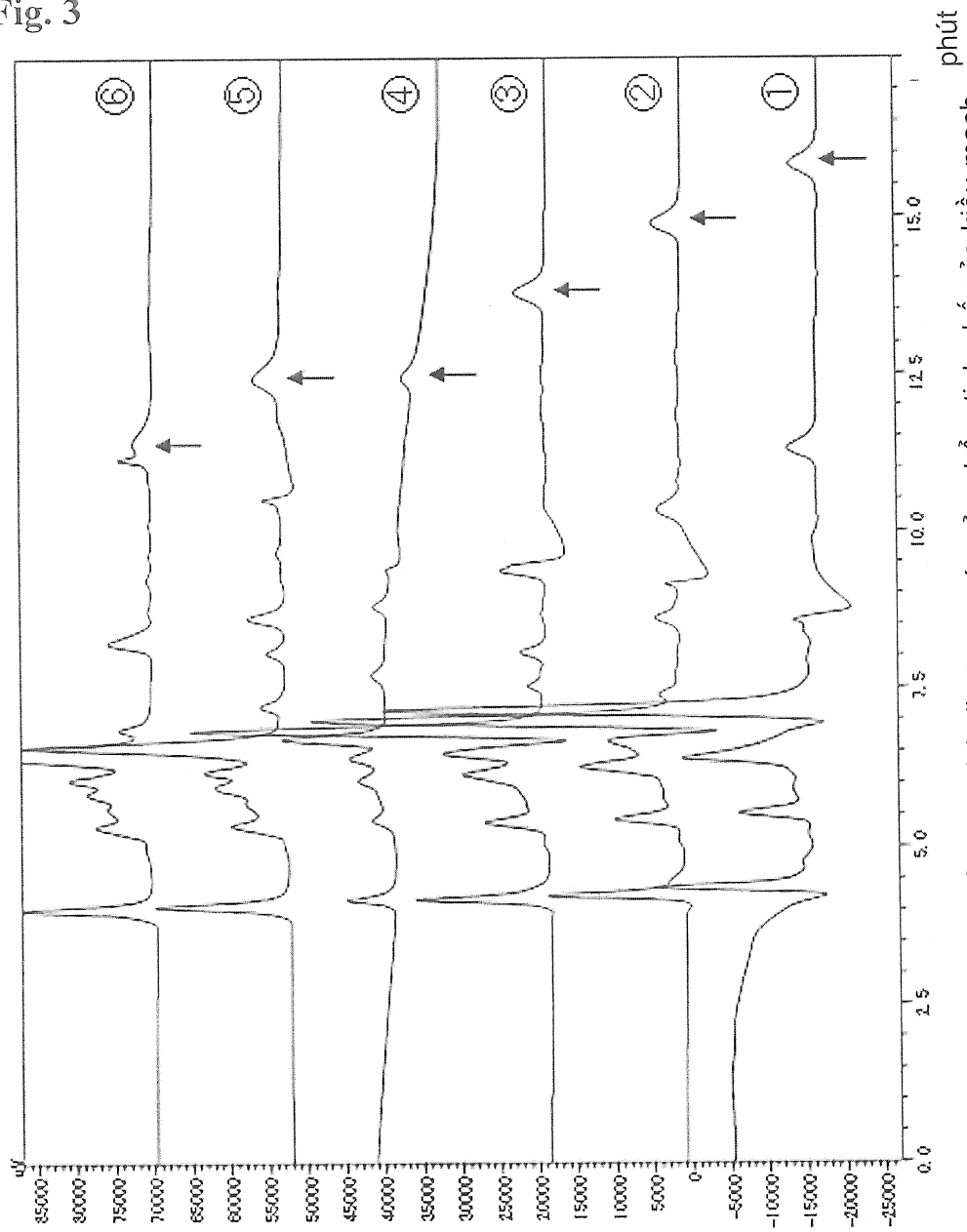


Fig. 3. Hoạt động rửa giải của axetylcholin trong các sản phẩm tinh chế của kiểu mạch lên men với sự thay đổi hàm lượng methanol (0,01% axit formic)

① 50% ② 45% ③ 40% ④ 35% ⑤ 30% ⑥ 25%

Fig. 4

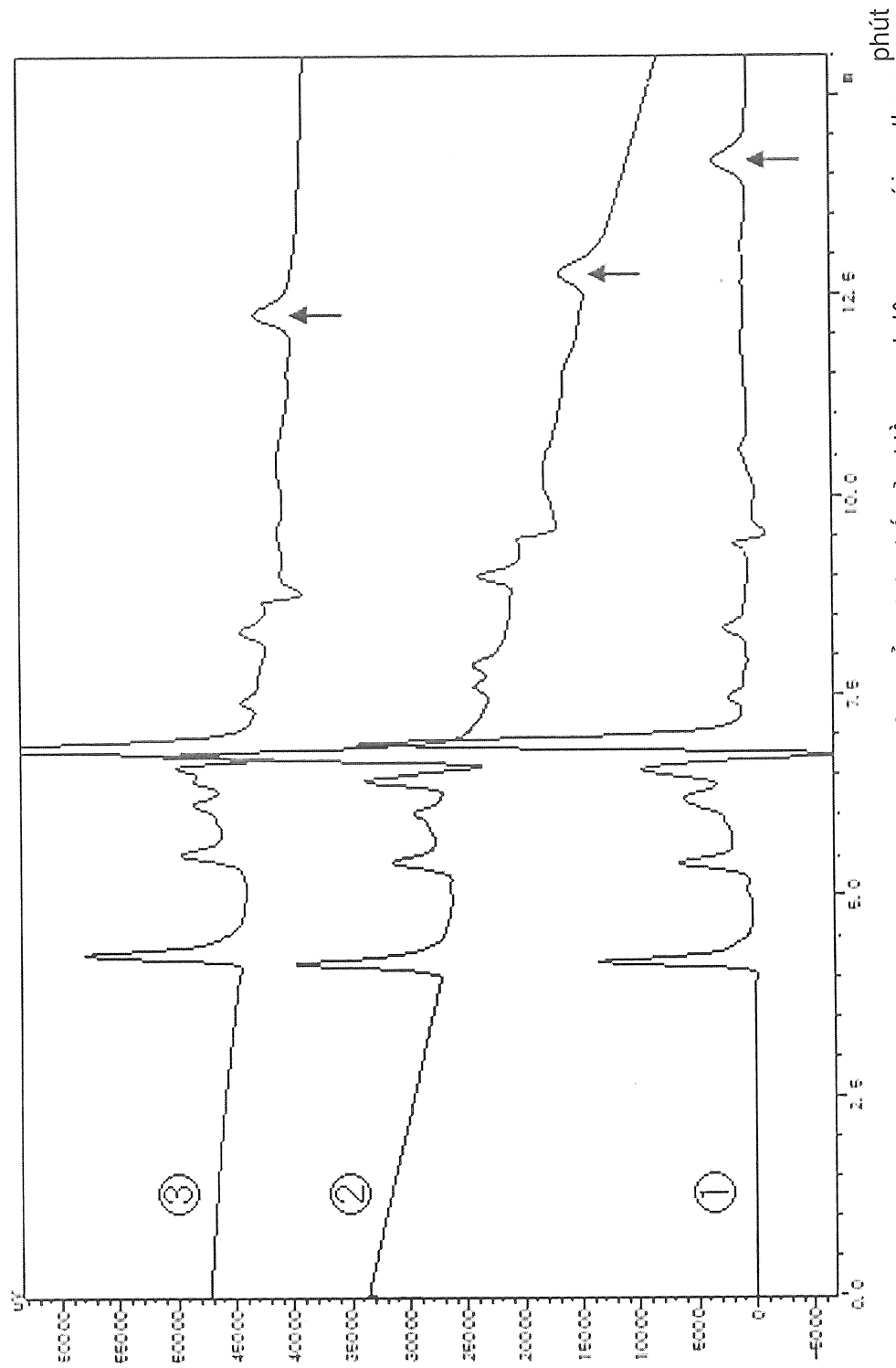


Fig. 4. Hoạt động rửa giải của axetylcholin trong các sản phẩm tinh chế của kiểu mạch lên men với sự thay đổi lượng nhỏ hàm lượng methanol (0,01% axit formic)
 ①38% ②36% ③33%

Fig. 5

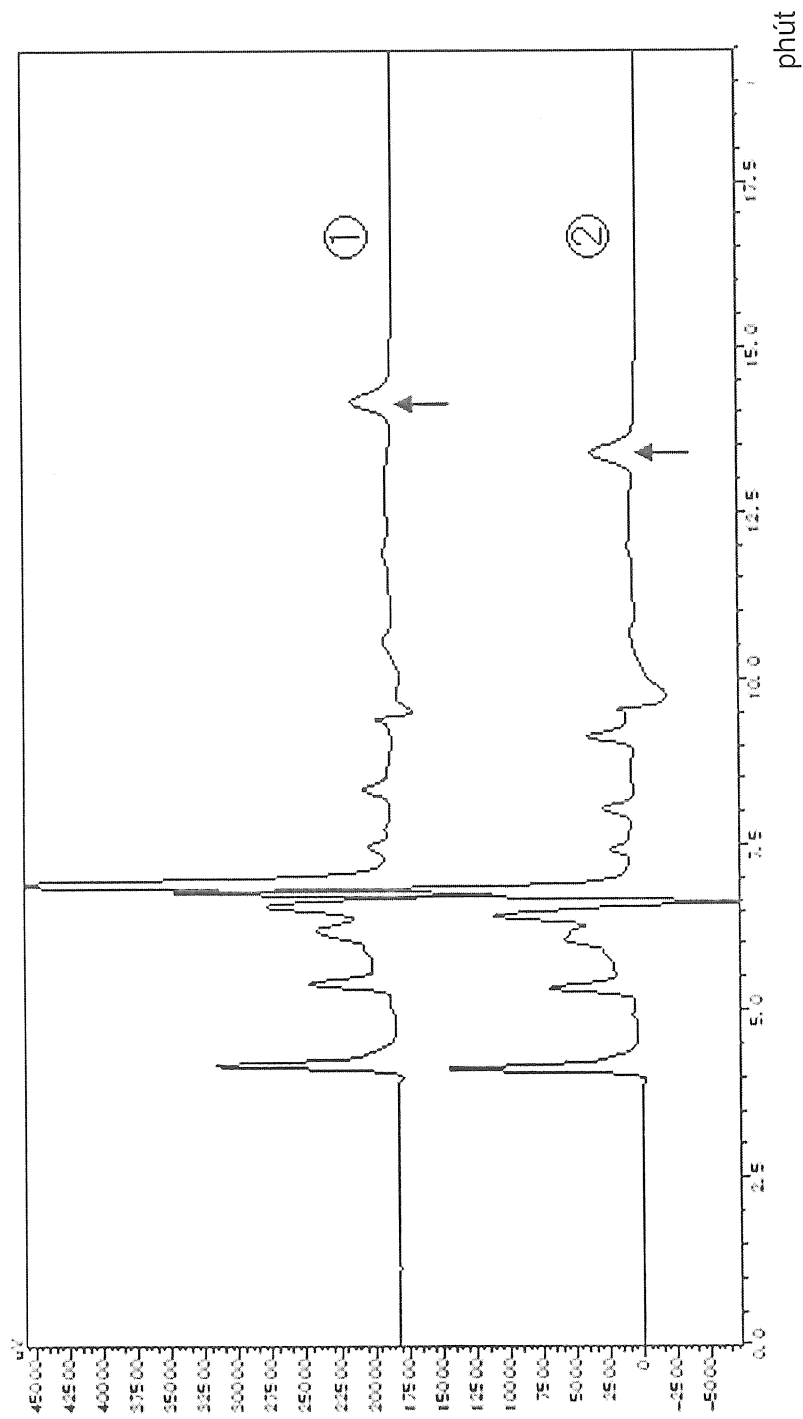


Fig. 5. Hoạt động rửa giải của axetylcholin trong các sản phẩm tinh chế của kiểu mạch lên men với sự thay đổi nhiệt độ tách (nước chứa 0,01% axit formic-33% metanol)
 ①30°C ②40°C

Fig. 6

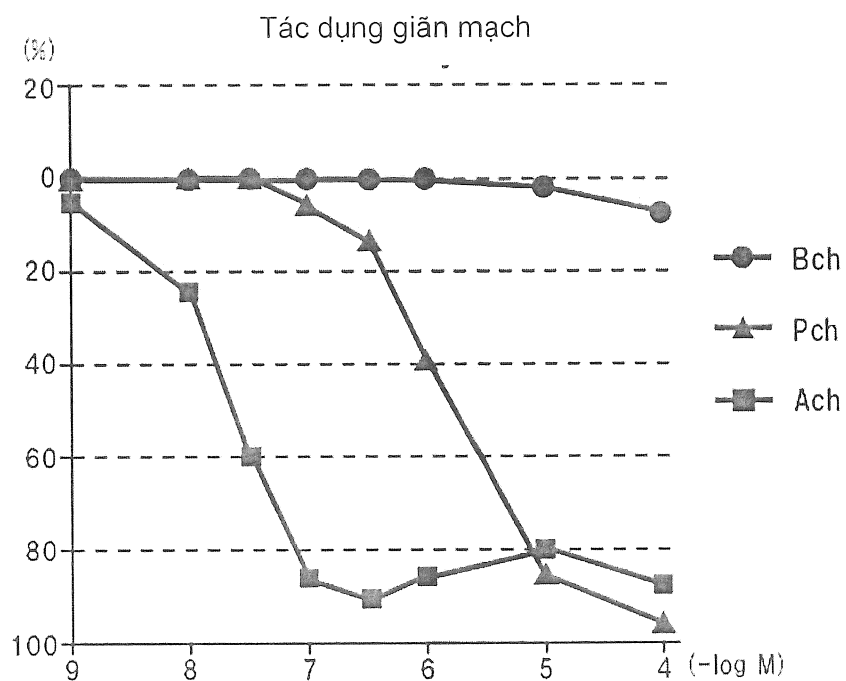


Fig. 6. Kết quả thử nghiệm đo sức căng đẳng trương trong các mạch máu sử dụng các hợp chất cholin đã xác định

Fig. 7

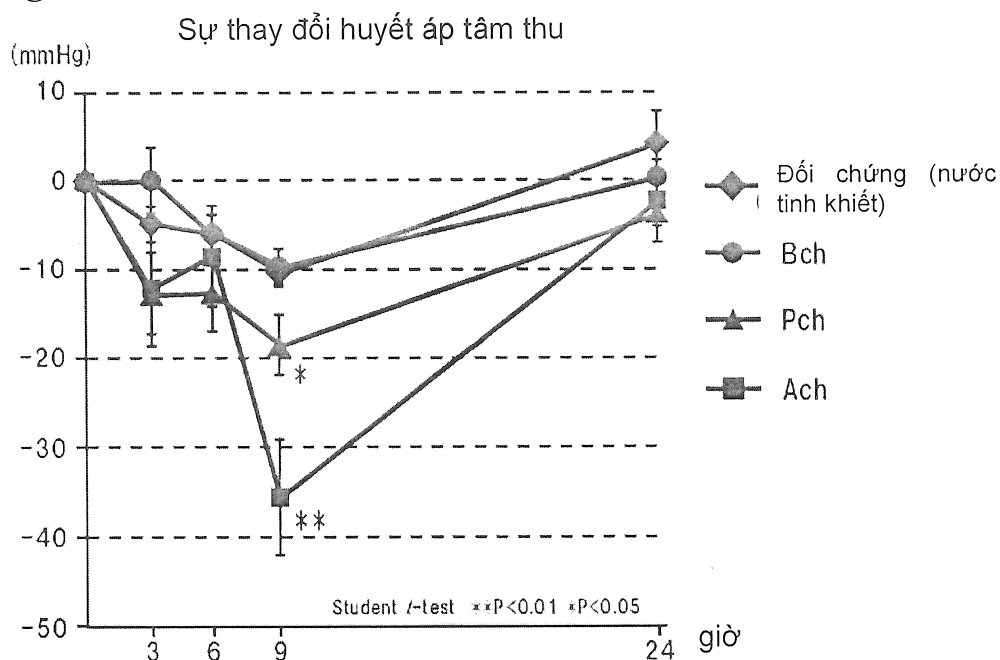


Fig. 7. Sự thay đổi huyết áp tâm thu sau khi dùng các hợp chất cholin đã xác định

Fig. 8-1

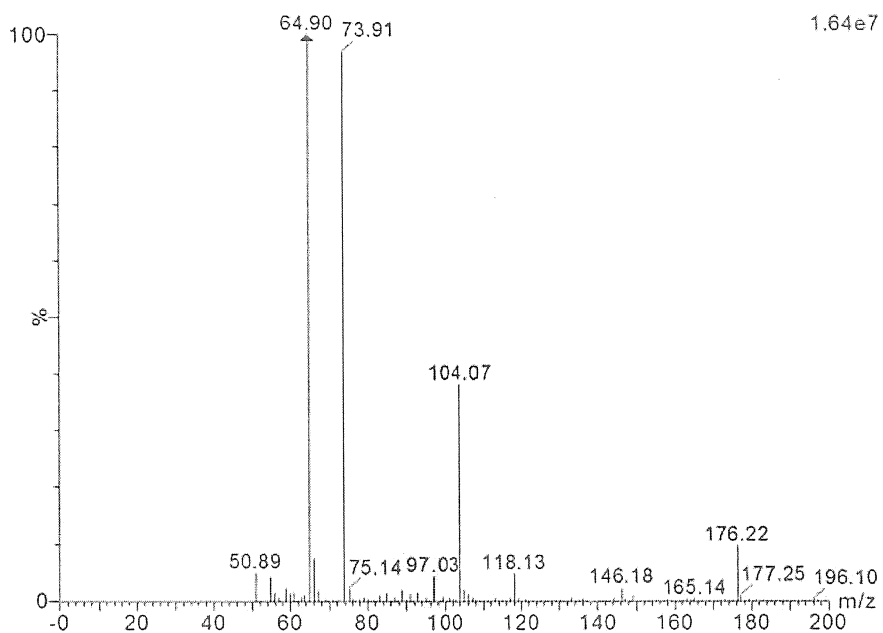


Fig. 8-1. Phổ LC-MS của lactylcholin

Fig. 8-2

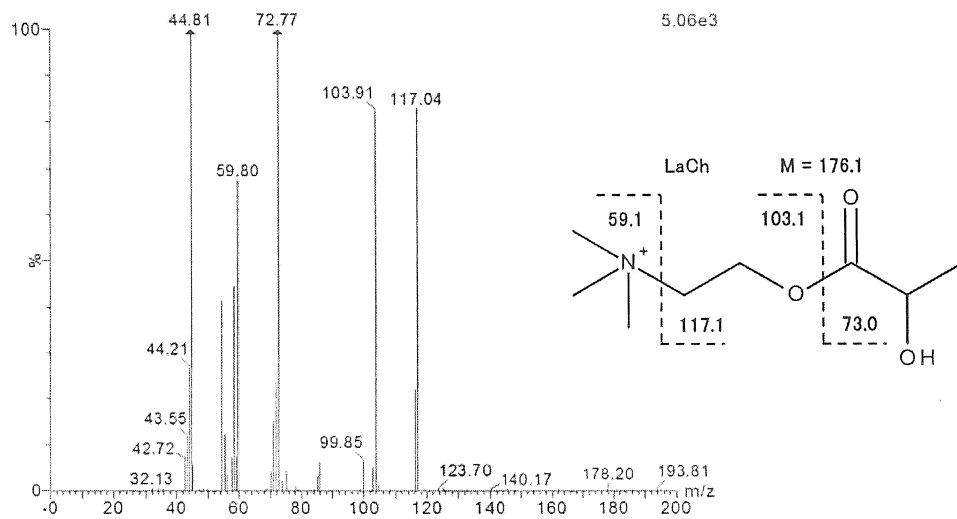


Fig. 8-2. Phổ LC-MS/MS của lactylcholin

Fig. 9-1

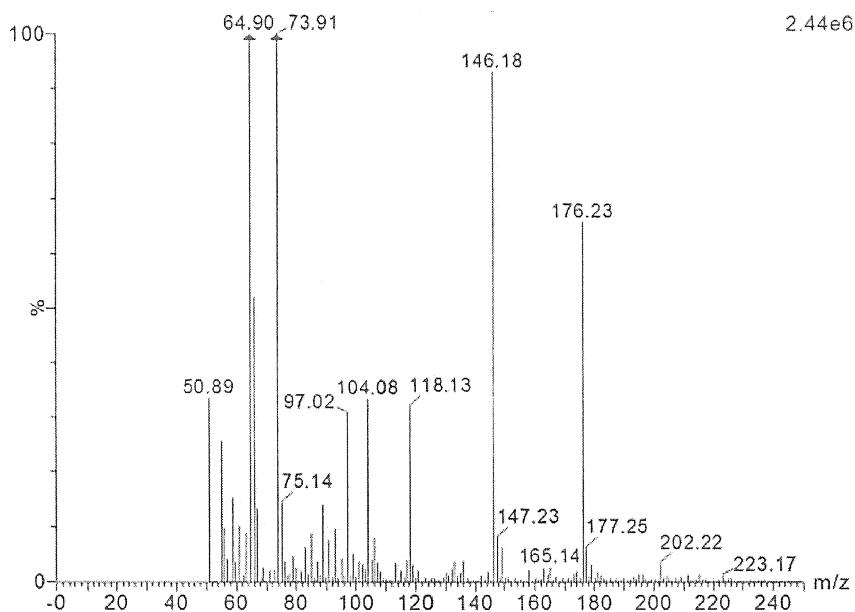


Fig. 9-1. Phổ LC-MS của levulinylcholin

Fig. 9-2

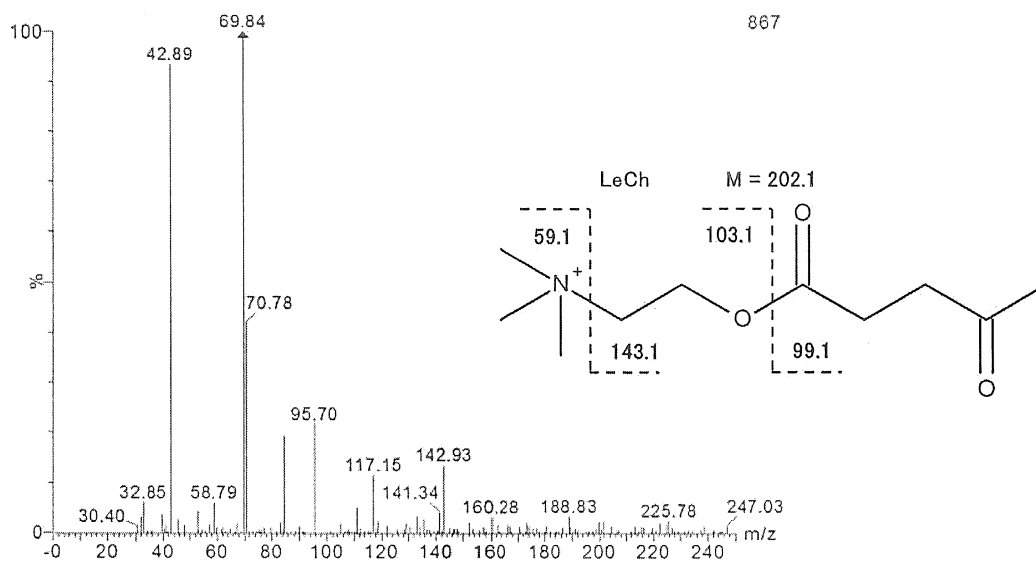


Fig. 9-2. Phổ LC-MS/MS của levulinylcholin