



(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)



2-0003890

(51) **A61K 31/575**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00311 (22) 20/07/2022
(45) 27/01/2025 442 (43) 25/11/2022 416
(73) Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
(72) Nguyễn Thị Mai Phương (VN); Nguyễn Thị Hồng Minh (VN); Ngô Văn Quang
(VN).

(54) **QUY TRÌNH PHÂN LẬP B-SITOSTEROL CÓ HOẠT TÍNH CẢM ỨNG TÁI TẠO
XƯƠNG TỪ CÂY BÌM BỊP (CLINACANTHUS NUTANS LINDAU)**

(21) 2-2022-00311

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình phân lập hợp chất β -sitosterol có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau). Bằng cách chiết bột cây Bìm Bịp trong etanol để thu cao chiết chứa β -sitosterol, sau đó sắc ký hai lần trên cột silica gel cỡ hạt khoảng 0,063 mm, cỡ lỗ từ 234 đến 400 mesh và rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan:axeton để thu phân đoạn giàu hợp chất β -sitosterol trên cơ sở sắc ký bản mỏng. Sau khi kết tinh qua đêm, phần tinh thể được rửa bằng hệ dung môi MeOH/H₂O tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích) thu được hợp chất β -sitosterol dạng tinh thể. Hợp chất β -sitosterol thu được có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương, cho phép phát triển được liệu pháp phát triển chế phẩm giúp tái tạo xương.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa dược và hoạt chất có nguồn gốc từ tự nhiên, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình phân lập hợp chất β -sitosterol có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh loãng xương đang là căn bệnh phổ biến toàn cầu, bệnh này khiến xương dễ gãy do tăng tính giòn của xương, vì thế ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe, cuộc sống của mỗi cá nhân cũng như cộng đồng xã hội. Tỷ lệ người bị loãng xương đang ngày một tăng lên ở cả các nước phát triển và đang phát triển, đặc biệt là với những người có tuổi. Các số liệu thống kê cho thấy khoảng trên 200 triệu người trên toàn thế giới bị bệnh này.

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

Các chất cảm ứng tái tạo xương có khả năng điều trị bệnh thông qua việc ức chế hoạt tính của tế bào hấp thụ xương osteoclast (bone-resorption cell) và kích thích biệt hóa tế bào tạo xương osteoblast (bone-forming cell). Hoạt tính này liên quan đến khả năng làm tăng hoạt tính enzym kiềm phosphatase (ALP) và sự khoáng hóa ở tế bào tạo xương. Đây là những chỉ thị quan trọng đầu tiên được dùng để sàng lọc hoạt tính cảm ứng tái tạo xương.

Cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau) là một loài thực vật có hoa trong họ Ô rô (*Acanthaceae*). Cây có nguồn gốc từ châu Á và còn gọi là cây Xương Khỉ, Mảnh Cội hay Bìm Bịp. Các chất phân lập từ cây Bìm Bịp cho thấy có các hoạt tính sinh

học khác nhau như chống oxy hóa, kháng virus, chống viêm, chống nhiễm trùng, chống angiogen và chống tiểu đường. Trong y học cổ truyền, cây Bìm Bịp đã được sử dụng làm thuốc để điều trị gãy xương, tuy nhiên cơ chế đặc tính tái tạo xương vẫn chưa rõ ràng. Do đó, cần có những nghiên cứu tìm kiếm các hoạt chất có đặc tính tái tạo xương từ cây Bìm Bịp để ứng dụng tác dụng trị liệu của loài thực vật này.

β -sitosterol ($C_{29}H_{51}O$) là một hợp chất tự nhiên xuất hiện trong nhiều loài thực vật và có nhiều trong trái cây, rau, quả và hạt. β -sitosterol là hoạt chất mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe, góp phần vào việc điều trị nhiều bệnh lý, ví dụ dị ứng, hen suyễn, đau cơ xơ, sỏi mật, đau nửa đầu, bệnh vẩy nến, viêm khớp dạng thấp và rối loạn kinh nguyệt. Bên cạnh đó, β -sitosterol còn giúp phòng ngừa bệnh tim mạch do có khả năng làm giảm mức cholesterol bằng cách hạn chế lượng cholesterol vào cơ thể và hạn chế một số dạng ung thư. Mặt khác, β -sitosterol còn có khả năng liên kết với tuyến tiền liệt giúp làm giảm sưng/viêm tuyến này.

Các nghiên cứu trước đây đã phân lập được hợp chất β -sitosterol và đã chứng minh nó có tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa, kháng viêm. Tuy nhiên, hoạt tính cảm ứng tái tạo xương cũng như ứng dụng hợp chất được phân lập từ cây Bìm Bịp để làm thuốc hay thực phẩm chức năng vẫn chưa được công bố.

Hiện đã có một số nghiên cứu về hợp chất β -sitosterol từ thực vật cũng như ứng dụng trong sản xuất thuốc. Bài báo Nicolas Panayotis et al., “ β -sitosterol reduces anxiety and synergizes with established anxiolytic drugs in mice”, 2021, *Cell Report Medicine* 2(5): 100281 đã cho thấy rằng khi sử dụng β -sitosterol tiêm vào chuột đã giúp làm giảm căng thẳng, phục hồi trí nhớ và hoạt hóa yếu tố c-Fos ở thùy trán cũn như đồi hải mã. Ngoài ra, sự giảm căng thẳng ở chuột cũng được quan sát thấy khi xử lý kết hợp liều thấp β -sitosterol với thuốc chống trầm cảm SSRI fluoxetine. Phát hiện tiền lâm sàng này gợi ý cho các nghiên cứu tiếp theo để phát triển chất này thành thuốc giảm căng thẳng ở dạng đơn hay kết hợp với các thuốc chống trầm cảm khác (SSRIs) ở liều thấp.

Tài liệu Alemany L. et al., “Plant sterols from foods in inflammation and risk of cardiovascular disease: A real threat”, 2014, *Food Chemistry Toxicology* 69: 140–149 đã cho thấy các sterol thực vật trong đó có β -sitosterol có thể làm giảm mức độ cholesterol trong máu thông qua việc hạn chế lượng cholesterol đi vào cơ thể nhờ đó làm giảm bệnh tim mạch, làm giảm viêm khớp cũng như ngăn ngừa sự tăng kích thước của tuyến tiền liệt.

Tài liệu Awad A. et al., “ β -sitosterol activates fas signaling in human breast cancer cells”, 2007, *Phytomedicine* 14: 747–754 đã chứng minh β -sitosterol có tác dụng hoạt hóa tín hiệu fas trong tế bào ung thư vú nhờ đó thúc đẩy quá trình chết theo chương trình của tế bào ung thư và có thể sử dụng chất này như liệu pháp phòng ngừa ung thư vú.

Tài liệu Chauhan S. et al., “*In-vitro* osteoblast proliferation and *in-vivo* anti-osteoporotic activity of *Bombax ceiba* with quantification of by HPTLC and HPLC”, *BMC Complement Alternative Medicine*, 2018 đã cho thấy dịch chiết vỏ cây *Bombax ceiba* chứa các chất lupeol, axit gallic và β -sitosterol có hoạt tính cảm ứng tế bào tạo xương trên dòng tế bào UMR-106 và trên mô hình *in vivo* trên chuột đã cắt bỏ buồng trứng dẫn đến loãng xương. Tuy nhiên, cơ chế tác dụng vẫn chưa được làm sáng tỏ.

Do đó, vẫn cần có quy trình phân lập hợp chất β -sitosterol có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau) để phát triển các dược chất nhằm phát triển.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm khắc phục các vấn đề nêu trên, cụ thể là sáng chế nhằm mục đích phân lập hợp chất β -sitosterol có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) thu cao chiết etyl axetat chứa β -sitosterol bằng cách ngâm chiết nguyên liệu bột cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau) trong dung môi etanol 96% theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/3 (khối lượng/thể tích), mỗi lần chiết trong thời gian 3 ngày, lặp lại 3 lần, phần dịch chiết được gộp và cất loại dung môi bằng cách cô quay ở 50°C, áp suất 50 kPa thu được cao chiết etanol rồi hòa tan với nước và chiết bằng etyl axetat ba lần, sau khi cô loại dung môi thu được cao chiết etyl axetat chứa β -sitosterol;

b) thu phân đoạn giàu β -sitosterol bằng cách nhồi cao chiết etyl axetat chứa β -sitosterol thu được lên cột sắc ký silica gel, cỡ hạt khoảng 0,063 mm, cỡ lỗ từ 234 đến 400 mesh và rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan:axeton tỷ lệ 5:1 (thể tích/thể tích), thu các phân đoạn chứa β -sitosterol trên cơ sở kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng, sau đó phân đoạn này được nhồi tiếp lên cột sắc ký silica gel, cỡ hạt khoảng 0,063 mm, cỡ lỗ từ 234 đến 400 mesh và rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan:axeton tỷ lệ 7:1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn giàu β -sitosterol trên cơ sở kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng; và

c) thu nhận hợp chất β -sitosterol bằng cách để phân đoạn giàu β -sitosterol thu

được qua đêm để β -sitosterol kết tinh, tiếp đó rửa nhanh phần kết tinh này với hệ dung môi MeOH/H₂O tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích) thu được hợp chất β -sitosterol dạng tinh thể.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình vẽ cấu trúc hóa học của hợp chất β -sitosterol thu được từ cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau), hợp chất β -sitosterol có công thức C₂₉H₅₁O, trọng lượng phân tử MW = 415.

Hình 2 là biểu đồ kết quả thử nghiệm đánh giá khả năng sinh trưởng của tế bào tạo xương MC3T3-E1 trong điều kiện có bổ sung hợp chất β -sitosterol thu được từ cây Bìm Bịp.

Hình 3 là biểu đồ kết quả thử nghiệm tác dụng của hợp chất β -sitosterol lên hoạt tính ALP của tế bào tạo xương MC3T3-E1.

Hình 4 là biểu đồ kết quả thử nghiệm tác dụng của β -sitosterol lên hoạt tính khoáng hóa của tế bào tạo xương MC3T3-E1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình phân lập hợp chất β -sitosterol có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau), trong đó quy trình này bao gồm các bước thu cao chiết etanol chứa β -sitosterol, thu phân đoạn giàu β -sitosterol, và thu nhận hợp chất β -sitosterol.

Nguyên liệu được sử dụng theo sáng chế là bột thu được từ cây Bìm Bịp có tên khoa học là *Clinacanthus nutans* Lindau.

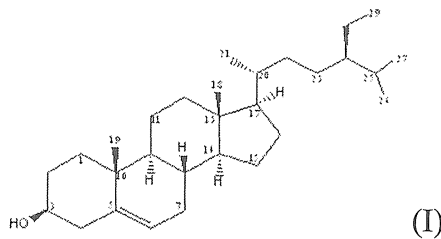
Trong bước thu cao chiết etyl axetat chứa β -sitosterol, tiến hành ngâm chiết nguyên liệu bột cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau) trong dung môi etanol 96%. Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/3 trọng lượng/thể tích (w/v). Mỗi lần chiết nguyên liệu được thực hiện trong thời gian 3 ngày. Quá trình chiết được lặp lại 3 lần, phần dịch chiết được gộp và cất loại dung môi bằng cách cô quay ở 50°C, áp suất 50 kPa (0,5 atm) thu được cao chiết etanol. Tiếp đó hòa cao chiết etanol với nước và chiết phân đoạn bằng etyl axetat ba lần, sau khi cô loại dung môi thu được cao chiết etyl axetat chứa β -sitosterol.

Trong bước thu phân đoạn giàu β -sitosterol, tiến hành nhồi cao chiết etanol chứa β -sitosterol thu được lên cột sắc ký silica gel. Cột được sử dụng hạt silica gel cỡ hạt

khoảng 0,063 mm có cỡ lỗ từ 234 đến 400 mesh. Hệ dung môi rửa giải được sử dụng là hệ dung môi *n*-hexan:axeton tỷ lệ 5:1 (thể tích/thể tích). Các phân đoạn chứa β -sitosterol được thu gom trên cơ sở kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng. Sau đó phân đoạn này được nhồi tiếp lên cột sắc ký silica gel, cỡ hạt khoảng 0,063 mm, cỡ lỗ từ 234 đến 400 mesh và rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan:axeton tỷ lệ 7:1 (thể tích/thể tích). Các phân đoạn giàu β -sitosterol được thu gom trên cơ sở kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng.

Trong bước thu nhận hợp chất β -sitosterol, sau khi thu được phân đoạn giàu β -sitosterol, phần dịch phân đoạn giàu β -sitosterol thu được ở trên được qua đêm để β -sitosterol kết tinh. Tiếp đó rửa nhanh phần kết tinh này với hệ dung môi MeOH/H₂O, tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích) thu được hợp chất β -sitosterol dạng tinh thể.

Hợp chất β -sitosterol có công thức C₂₉H₅₁O₁, khối lượng phân tử 415, có công thức (I) sau:



Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập hợp chất β -sitosterol từ cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau)

Chuyên 3 kg bột cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau) vào thiết bị ngâm chiết, bổ sung 9 lít dung môi etanol 96% và tiến hành ngâm chiết trong 3 ngày. Sau khi rút kiệt, tiến hành chiết lặp lại đủ 3 lần. Phần dịch chiết được gộp chung và cất loại dung môi bằng cách cô quay ở 50°C, áp suất 50 kPa (0,5 atm) thu được 47,65g cao chiết etanol. Tiếp đó hòa tan cao chiết với một lượng nước vừa đủ và bổ sung một lượng etyl axetat tương đương. Tiến hành chiết phân đoạn bằng cách lắc đều và để yên để tách phân đoạn. Lặp lại ba lần thu phân đoạn etyl axetat. Cô loại dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được 11,26 g cao chiết etyl axetat chứa hợp chất β -sitosterol.

Cao etyl axetat chứa hợp chất β -sitosterol được nhồi lên cột sắc ký silica gel. Kích thước cột 6x80 cm, được nhồi hạt silica gel cỡ hạt khoảng 0,063 mm, cỡ lỗ từ

234 đến 400 mesh. Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan:axeton tỷ lệ 5:1 (thể tích/thể tích). Mỗi phân đoạn rửa 5ml, thu được 6 phân đoạn (F1.1 – F1.6). Kiểm tra các phân đoạn này bằng sắc ký lớp mỏng, thu được phân đoạn thứ hai (F1.2) xuất hiện β -sitosterol.

Phân đoạn thứ hai chứa hợp chất β -sitosterol được nhồi tiếp lên cột sắc ký silica gel kích thước 6x80 cm được nhồi hạt silica gel cỡ hạt khoảng 0,063 mm, cỡ lỗ từ 234 đến 400 mesh. Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan:axeton tỷ lệ 7:1 (thể tích/thể tích). Mỗi phân đoạn rửa giải 5ml. Thu phân đoạn giàu β -sitosterol trên cơ sở kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng thu được bốn phân đoạn giàu β -sitosterol (F2.1 – F2.4). Các phân đoạn này được để qua đêm ở nhiệt độ phòng để kết tinh. Sau khi kết tinh xuất hiện các tinh thể màu trắng ngà.

Chất kết tinh thu được sau đó được rửa nhanh với dung môi MeOH:H₂O theo tỉ lệ 1:1 (thể tích/thể tích) thu được 450 mg chất rắn dạng tinh thể.

Tiến hành chạy TLC sử dụng hệ dung môi *n*-hexan:etyl axetat theo tỉ lệ 7:1 (thể tích/thể tích) để xác định độ sạch của chất thu được. Kết quả cho thấy chỉ còn một vạch duy nhất trên bản sắc ký chứng tỏ chất β -sitosterol thu được đã tinh sạch. Kết quả phân tích HPLC cho thấy chất này có độ sạch 97%.

Để khẳng định cấu trúc của chất thu được là β -sitosterol, phổ NMR ¹H, ¹³C và các phổ 2D của chất này đã được đo, phân tích, kết quả cho thấy tinh thể thu được là hợp chất β -sitosterol.

Ví dụ 2. Thử nghiệm độc tính của β -sitosterol lên dòng tế bào tạo xương osteoblast

Khả năng sống sót của tế bào tạo xương osteoblast MC3T3-E1 được đánh giá bằng phương pháp MTT. Từ kết quả này, nồng độ chất mà không làm ảnh hưởng đến sự sống sót của tế bào sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu *in vitro* tiếp theo để đánh giá ảnh hưởng của chất quan tâm đến sự biệt hóa tế bào tạo xương osteoblast MC3T3-E1.

Tế bào MC3T3-E1 được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS (fetal bovine serum) trong bể ủ nhiệt 37°C và 5% CO₂. Sự biệt hóa tế bào được thực hiện trong môi trường biệt hóa ODM (osteogenic differentiation medium: ODM) bao gồm DMEM bổ sung FBS 5%, penicillin-streptomycin 1%, axit ascorbic 100 µg/mL, dexamethason 10 nM và β - glycerophosphat 10 mM. Tế bào sau đó được xử lý với β -sitosterol ở các nồng độ khác nhau. Sau khi ủ và xử lý trong 48 giờ, môi trường được

loại bỏ và các tế bào được ủ với dung dịch 0,5 mg/mL MTT trong 4 giờ ở 37 °C và 5% CO₂.

Số liệu đánh giá về khả năng sinh trưởng của tế bào được tính theo tỷ lệ phần trăm so với nhóm đối chứng (không xử lý). Số liệu dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD, n = 3, p < 0,5. Kết quả được thể hiện trên Hình 2 cho thấy các nồng độ β -sitosterol 5 và 10 μ g/mL đều không ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của tế bào tạo xương.

Ví dụ 3. Thử nghiệm tác dụng β -sitosterol lên hoạt tính ALP của tế bào tạo xương osteoblast

ALP là một chỉ thị quan trọng biểu hiện quá trình tái tạo xương. Do đó, tiến hành đánh giá tác dụng của β -sitosterol lên hoạt tính ALP của tế bào nguyên xương MC3T3-E1.

Để đánh giá hoạt tính ALP, tế bào MC3T3-E1 được nuôi cấy trong đĩa 24 giếng trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS. Môi trường nuôi cấy sau đó được thay thế bằng môi trường DMEM mới có bổ sung chất thu được từ Ví dụ 1, hoặc không bổ sung (đối chứng) và ủ trong 48 giờ. Sau đó, tế bào được rửa với đệm PBS kết hợp với đệm carbonat (pH=10,3) 25 mM có chứa 0,1% Triton X-100. Tiếp theo, tế bào được ủ trong 1 giờ ở 37°C với đệm carbonat 250 mM chứa 1,5 mM MgCl₂ và 15 mM p-NPP. Với sự xuất hiện của ALP, chất p-NPP (para-nitrophenol phosphat) sẽ được chuyển đổi thành p-nitrophenol (có màu vàng) và phosphat vô cơ. Sau đó, hoạt tính ALP trong các mẫu được đo ở bước sóng 405 nm bằng máy đo quang phổ. Hoạt tính ALP được xác định dựa theo công thức:

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

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

Trong thử nghiệm này, tế bào được xử lý với β -sitosterol ở các nồng độ khác nhau. Số liệu về hoạt tính ALP được tính theo phần trăm so với mẫu không được xử lý (đối chứng). Kết quả thể hiện trên Hình 3 cho thấy β -sitosterol có tác dụng kích thích mạnh hoạt tính enzym ALP. β -sitosterol đã làm tăng lần lượt 110 và 104,6 % hoạt tính enzym ở các nồng độ 5 và 10 μ g/mL.

Ví dụ 4. Thử nghiệm tác dụng β -sitosterol lên hoạt tính khoáng hóa của tế bào tạo xương

Sự khoáng hóa nền là giai đoạn cuối cùng trong quá trình biệt hóa nguyên bào xương được đặc trưng bởi sự lắng đọng canxi. Trong thử nghiệm này, việc xác định mức độ khoáng hóa được thực hiện đối với chế phẩm chứa astilbin và hợp chất astilbin. Tế bào MC3T3-E1 được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS có chứa vitamin C (50 μg / ml) và β -glycerolphosphate (10 mM) trong 2 tuần có/không có chất nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau và sau đó nhuộm với 40 mM Alizarin red-S (pH 4,2) trong 1 giờ. Các tế bào bị phân hủy trong 15 phút với 10% cetylpyridi clorua trong dung dịch đệm natri phosphat 10 mM (pH 7,0). Sau đó, sự hình thành canxi được quan sát và xác định bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng 562 nm. Tác dụng khoáng hóa được tính theo tỷ lệ phần trăm so với mẫu đối chứng (không xử lý). Số liệu được thể hiện trên Hình 4 cho thấy β -sitosterol đã làm tăng hoạt tính khoáng hóa của tế bào lên 134, 168 và 118% ở các nồng độ tương ứng là 2,5, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình phân lập hợp chất β -sitosterol có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau) có thể chủ động điều chế β -sitosterol từ thực vật. Bằng quy trình đơn giản, quy trình cho phép phân lập được hợp chất β -sitosterol có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương với độ tinh sạch lên tới 97% thích hợp phát triển nguồn dược liệu cũng như những nghiên cứu ứng dụng trong điều trị các bệnh liên quan đến xương.

YÊU CẦU BẢO HỘ

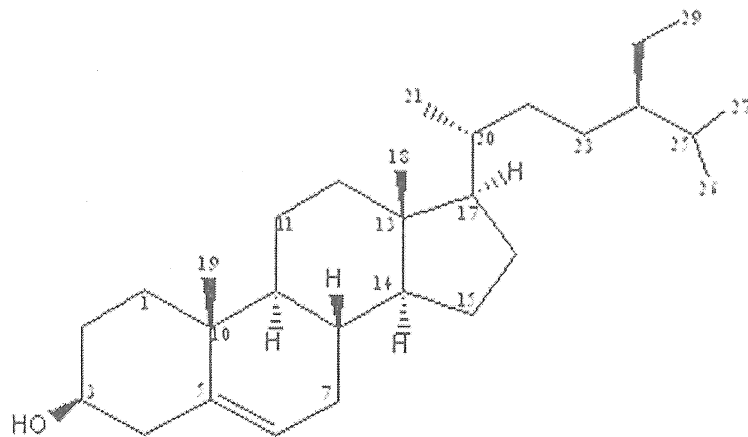
1. Quy trình phân lập hợp chất β -sitosterol có hoạt tính cảm ứng tái tạo xương từ cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) thu cao chiết etyl axetat chứa β -sitosterol: ngâm chiết nguyên liệu bột cây Bìm Bịp (*Clinacanthus nutans* Lindau) trong dung môi etanol 96% theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/3 (khối lượng/thể tích), mỗi lần chiết trong thời gian 3 ngày, lặp lại 3 lần, phần dịch chiết được gộp và cất loại dung môi bằng cách cô quay ở 50°C, áp suất 50 kPa thu được cao chiết etanol rồi hòa tan với nước và chiết ba lần bằng etyl axetat, sau khi cô loại dung môi thu được cao chiết etyl axetat chứa β -sitosterol;

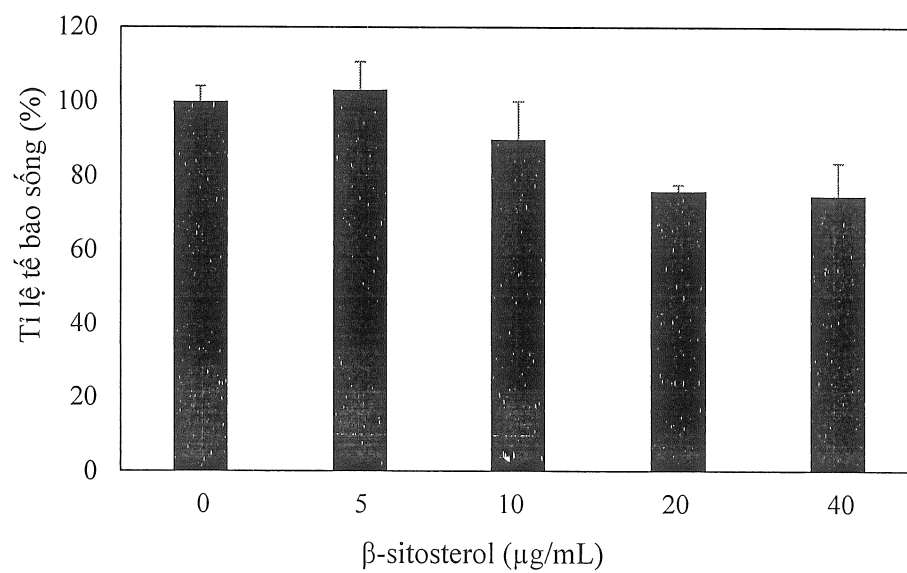
b) thu phân đoạn giàu β -sitosterol: nhồi cao chiết etyl axetat chứa β -sitosterol thu được lên cột sắc ký silica gel, cỡ hạt khoảng 0,063 mm, cỡ lỗ từ 234 đến 400 mesh và rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan:axeton tỷ lệ 5:1 (thể tích/thể tích), thu các phân đoạn chứa β -sitosterol trên cơ sở kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng, sau đó phân đoạn này được nhồi tiếp lên cột sắc ký silica gel, cỡ hạt khoảng 0,063 mm, cỡ lỗ từ 234 đến 400 mesh và rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan:axeton tỷ lệ 7:1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn giàu β -sitosterol trên cơ sở kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng; và

c) thu nhận hợp chất β -sitosterol bằng cách để phân đoạn giàu β -sitosterol (F2.1 - F2.4) thu được qua đêm để β -sitosterol kết tinh, tiếp đó rửa nhanh phần kết tinh này với hệ dung môi MeOH/H₂O tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích) thu được chất β -sitosterol dạng tinh thể.

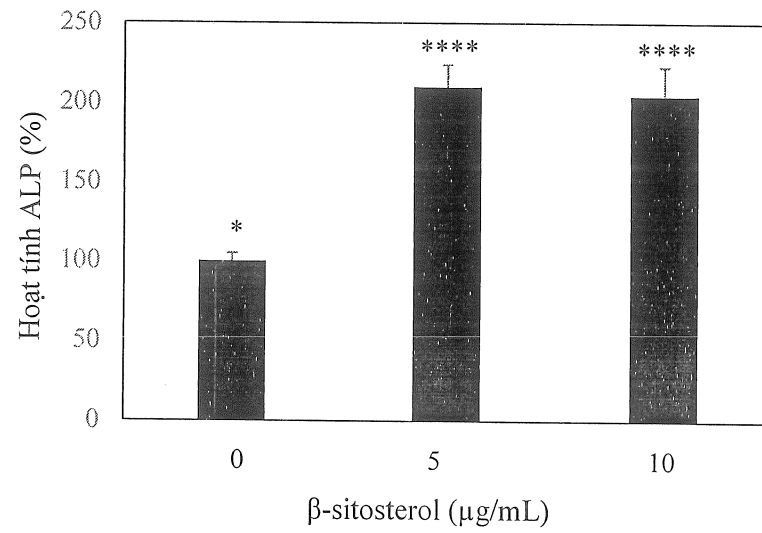
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4

