



(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)



2-0004271

(51) **C07D 311/02; A61K 36/48**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00478

(22) 25/08/2023

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/01/2024 430A

(73) Trường Đại học Phenikaa (VN)

Phó Nguyễn Trác, phường Yên Nghĩa, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

(72) Tô Đạo Cường (VN); Hoàng Lê Minh (VN); Nguyễn Thị Hoa (VN); Trương Thị
Thùy Nhung (VN); Trương Thị Việt Hòa (VN).

(54) **QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ HỢP CHẤT REYNOUTRIN CÓ TÁC
DỤNG KHÁNG VIÊM TỪ CÂY KHÁO VÀNG (MACHILUS THUNBERGII)**

(21) 2-2023-00478

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế hợp chất reynoutrin có tác dụng điều trị viêm từ lá cây Kháo vàng (*Machilus thunbergii*). Quy trình theo giải pháp bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột lá cây Kháo vàng; c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất reynoutrin; d) thu hợp chất reynoutrin thô; và e) tinh chế hợp chất reynoutrin. Quy trình theo giải pháp thu được hợp chất reynoutrin có công thức (1). Hợp chất reynoutrin 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 reynoutrin từ lá cây Kháo vàng (*Machilus thunbergii*). Hợp chất reynoutrin 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

Viêm là một phần của phản ứng sinh học bẩm sinh cơ thể khi bị nhiễm các yếu tố bên ngoài gây hại như mô bị tổn thương vật lý, sự xâm nhập của vi khuẩn, virus, nấm hoặc cơ thể bị tác động xâm nhập của các chất lạ đối với hệ miễn dịch, phản ứng viêm có mối tương quan với rất nhiều bệnh khác nhau như tim mạch, ung thư, bệnh phổi, bệnh tự miễn, tiểu đường type II, v/v. Phản ứng viêm ở cơ thể khỏe mạnh là cơ chế bảo vệ và làm sạch các tế bào, mô hoại tử, loại bỏ các phần cơ thể bị hư hại từ tổn thương sơ cấp và thứ cấp, loại bỏ các yếu tố ngoại lai có hại cho cơ thể và bắt đầu quá trình hồi phục cũng như thiết lập lại cân bằng nội mô (Medzhitov R. *Origin and physiological roles of inflammation. Nature*, 2008; 454: 428-435). Năm dấu hiệu kinh điển của chứng viêm là rối loạn chức năng, sưng, nóng, đỏ, đau.

Viêm là một cơ chế miễn dịch bẩm sinh, có thể là triệu chứng cấp tính hoặc mãn tính. Một cơ thể có hệ miễn dịch suy giảm sẽ có biểu hiện viêm kém, điều này dẫn đến các yếu tố nguy cơ gây hại cho cơ thể (ví dụ: virus, nấm, dị vật) không bị loại bỏ hoặc loại bỏ không kịp thời, điều này dễ dẫn đến nguy cơ tử vong hoặc tàn tật. Ngược lại, viêm mãn tính kéo dài quá mức cần thiết hoặc viêm cấp tính có thể gây phản ứng phản vệ nguy hiểm tính mạng. Rất nhiều nguyên nhân các chứng bệnh khác nhau có liên quan đến phản ứng viêm, đặc biệt là viêm mãn tính ví dụ như: viêm cơ và màng ngoài tim, xơ vữa động mạch, sốt cao co giật, bệnh răng miệng, viêm xương khớp tự miễn,.

Một họ các chất trung gian enzyme trong sản xuất oxit nitric từ L-arginine có vai trò quan trọng trong phản ứng viêm do tham gia trực tiếp vào quá trình tạo nitric oxit (NO) là oxit nitric tổng hợp (NOS). Những tác dụng của NO bao gồm tham gia vào quá trình bài tiết insulin, điều hòa trương lực mạch máu và cơ trơn, điều hòa trương

lực đường thở, điều hòa nhu động đường tiêu hóa, tham gia vào quá trình phát triển và hình thành mạch máu và phát triển sợi thần kinh. NO được tổng hợp ở mô của động vật có vú bởi NOS tế bào thần kinh và enzyme NOS. Enzym iNOS (enzym tổng hợp NO cảm ứng) đóng vai trò quan trọng trong phản ứng viêm, phản ứng miễn dịch của cơ thể và liên quan đến nhiều nguyên nhân trong các chứng rối loạn chức năng và bệnh tự miễn. Nồng độ NO cao quá mức có thể gây ra những hậu quả nghiêm trọng như sốc phản vệ trong trường hợp nhiễm trùng và khi mắc các bệnh viêm nhiễm.

Phương pháp chống viêm phổ biến nhất hiện nay là sử dụng thuốc tân dược trong điều trị. Các loại thuốc hiện nay được sử dụng phổ biến trong điều trị bệnh viêm bao gồm thuốc ổn định tế bào mast, thuốc kháng histamin (anti-histamine), kháng cholinergic, thuốc corticosteroid, thuốc giảm đau kháng viêm không steroid (NSAID), decongestant, v.v. (tham khảo NSAIDs, Steroids từ cơ quan y tế quốc gia Anh - NHS). Đặc điểm chung của các loại thuốc này là có rất nhiều tác dụng phụ như đau đầu, chóng mặt, hại cho đường tiêu hóa, làm loãng mật độ xương, ức chế miễn dịch, suy tuyến thượng thận, v.v. trong một số trường hợp phản ứng phụ nặng tới mức có thể gây nguy hiểm đến tính mạng. Ví dụ, các trường hợp năm 2004 - 2005 các tác dụng phụ liên quan đến như rối loạn tim mạch, phản ứng dị ứng, sốc phản vệ có thể gây tử vong của thuốc Rofecoxib và Valdecoxib dẫn đến việc phải thu hồi, nhưng những hậu quả về mặt sức khỏe cũng như tính mạng không thể nào bù đắp được.

Việc tìm kiếm các thuốc mới có tác dụng điều trị các bệnh liên quan đến viêm từ nguồn gốc tự nhiên, với điểm sáng là nguồn dược liệu với tiềm năng lớn để thay thế các hoạt chất tổng hợp đã và đang được nghiên cứu. Năm 1995, nhà khoa học Nhật Bản đã kết hợp cây Kháo vàng (*Machilus thunbergii*) và các cây thuốc khác để bào chế thành thuốc điều trị các bệnh do nhiều dòng vi rút gây ra, trong đó có viêm gan siêu vi A, bệnh tay chân miệng, bệnh truyền nhiễm đường hô hấp (Hozumi, Toyoharu; Matsumoto, Takao; Ooyama, Haruo; Namba, Tsuneo; Shiraki, Kimiyasu; Hattori, Masao; Kurokawa, Masahiko; Kadota, Shigetoshi. *Antiviral agent containing crude drug/Antiviral agent containing the rude drug for the treatment of polio, measles, varicella-zoster, CMV infection and DNA or RNA viruses infection United States, US5411733 A 1995-05-02*). Ngoài ra, một trong những ứng dụng được sử dụng thường thấy nhất của loại cây này đã được đề cập đến trong các công thức y học dân gian của Hàn Quốc để điều trị chứng khó tiêu, choáng váng và đau đầu. (Christian Bailly,

Anticancer butanolides and lignans from the Makko tree, Machilus thunbergii Siebold & Zucc. (Lauraceae). A review. Trends Phytochem. Res. 5(3) 2021 136-147). Một nghiên cứu khác của các khoa học Hàn Quốc cho thấy vỏ cây *M. thunbergii* có tiềm năng sử dụng như một chất chống vi trùng và chống oxy hóa. Các hoạt tính này có thể liên quan tới hoạt chất axit *meso*-dihydroguaiaretic (MDGA) - được biết đến là có nhiều tác dụng sinh học bao gồm tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa, kháng viêm và bảo vệ thần kinh (Jeon, Jang Su; Oh, Soo Jin; Lee, Ji-Yoon; Ryu, Chang Seon; Kim, Young-Mi; Lee, Byung Hoon; Kim, Sang Kyum. *Metabolic characterization of meso-dihydroguaiaretic acid in liver microsomes and in mice. Food and Chemical Toxicology* (2015), 76, 94-102; Seo, Kyoung-Sun; Yun, Kyeong Won. *Comparative evaluation of antimicrobial and antioxidant potential of bark and leaf of Magnolia obovata THUNB. and Machilus thunbergii S. et Z. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* (2018), 10(3), 528-531). Các nghiên cứu cũng cho thấy chiết xuất *M. thunbergii* có hoạt tính mạnh chống lại chất gây dị ứng do loài mạt bụi nhà tạo ra, do đó có thể sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh dị ứng khác nhau. (Ahn, Yong Jun; Kim, Hyeon Gyeong; Yang, Young Cheol; Kim, Sun Il; Jung, In Hong; Lee, Gyu Seok. *Mite allergen neutralizer comprising plant extract capable of neutralizing allergens produced by mites, allergen neutralizing composition comprising the same and method for producing allergy protein neutralizer. Korea, Republic of, KR2007065927 A 2007-06-27*). Mặt khác, các nhà nghiên cứu Trung Quốc đã tìm thấy một số công dụng thú vị của *M. thunbergii* trong điều trị viêm sụn khi kết hợp với các loại dược liệu khác (Jiang, Dazhi. *A traditional Chinese medicine preparation for treating costal chondritis and its making method. China, CN105434670 A 2016-03-30*). *M. thunbergii* kết hợp với các chế phẩm có nguồn gốc thảo dược thiên nhiên khác có tác dụng tiêu viêm, giảm đau, thúc đẩy tuần hoàn máu loại bỏ ứ đọng máu, giúp vết thương mau lành, nâng cao chất lượng cuộc sống người bệnh, an toàn khi sử dụng làm thuốc rửa vết thương và chất chữa bệnh (Sun, Hongmin. *Traditional Chinese medicine composition for wound cleaning and care. China, CN105833180 A 2016-08-10*). Các nhà nghiên cứu Trung Quốc thậm chí còn kết hợp *M. thunbergii* và các loại thảo mộc khác với các loại thuốc Tây để điều trị viêm xoang tận gốc và nhận thấy rằng chúng có tác dụng thuốc nhanh chóng, hiệu quả điều trị rõ ràng và ổn định, do đó đạt được tỷ lệ chữa khỏi bệnh cao (Ge, Fukui; Zhang, Chunli. *An Oral formulation containing*

traditional Chinese medicines and Western medicines for treating anal sinusitis, and preparation method thereof. China, CN105267796 2016-01-27)

Tuy nhiên, tác dụng kháng viêm của các hoạt chất phân lập được từ loài Kháo vàng (*Machilus thunbergii*) lại chưa được nghiên cứu nhiều. Giải pháp sau đây đưa ra quy trình phân lập và tinh chế hợp chất reynoutrin có tác dụng kháng viêm bằng phương pháp dẫn đường sinh học. Dựa vào kết quả sàng lọc hoạt tính kháng viêm, cao chiết etyl axetat (EtOAc) được lựa chọn để phân lập, tinh chế hợp chất reynoutrin có hoạt tính sinh học, cụ thể là có tác dụng kháng viêm thông qua ức chế sự sản sinh 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 reynoutrin từ lá cây Kháo vàng (*Machilus thunbergii*) có tác dụng kháng viêm và hợp chất reynoutrin thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề xuất quy trình phân lập và tinh chế hợp chất reynoutrin có tác dụng ức chế sự sản sinh NO từ lá cây Kháo vàng (*Machilus thunbergii*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu lá cây Kháo vàng, loại bỏ tạp chất, thái nhỏ, rửa sạch và sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 55°C và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,2 mm thu được nguyên liệu bột lá cây Kháo vàng;

b) chiết nguyên liệu bằng cách chiết hồi lưu nguyên liệu bột lá cây Kháo vàng với metanol theo tỷ lệ 1/4 (khối lượng/thể tích), thời gian chiết từ 50 đến 70 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 70°C, sau khi thu dịch chiết, loại dung môi thu cao chiết metanol (MTM);

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

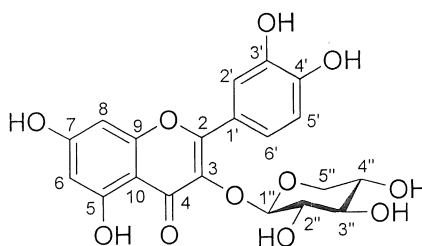
d) thu phần không tan trong dung môi *n*-hexan bằng cách bổ sung *n*-hexan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước c) theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu được hỗn hợp dạng lỏng không tan trong dung môi *n*-hexan và có ký hiệu MTW;

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

f) thu phân đoạn chứa hợp chất reynoutrin bằng cách nhồi phần cao chiết etyl axetat (MTet) 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/metanol lần lượt theo tỷ lệ 100/1, 50/1, 30/1, 10/1 và 7/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/metanol tỷ lệ 7/1 và có ký hiệu MTet-10;

g) thu hợp chất reynoutrin thô bằng cách nhồi phần cao chiết có ký hiệu MTet-10 thu được ở bước f) 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 10/1, 8/1, 6/1, 4/1, 3/1, 2/1 và 1/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/axeton tỷ lệ 1/1 và có ký hiệu MTet-10.14;

h) tinh chế hợp chất reynoutrin bằng cách nhồi phân đoạn có ký hiệu MTet-10.14 thu được ở bước g) lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel RP-C18 theo tỷ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) và hệ dung môi rửa giải là axetonitril/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/3, 1/2 và 1/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất reynoutrin dạng bột, màu vàng và có công thức (1) sau:



(1)

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết bằng metanol, *n*-hexan và etyl axetat đều được thực hiện 3 lần.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hệ dung môi rửa giải trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất reynoutrin thô là diclometan/metanol theo tỷ lệ metanol tăng dần từ 0 đến 100%.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó còn có bước tinh sạch hợp chất reynoutrin bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi metanol/nước để thu hợp chất reynoutrin tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất reynoutrin 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 reynoutrin có tác dụng điều trị viêm từ lá cây Kháo vàng (*Machilus thunbergii*) và hợp chất reynoutrin 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 phân lập và tinh chế hợp chất reynoutrin có tác dụng điều trị viêm từ lá cây Kháo vàng (*Machilus thunbergii*), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột lá cây Kháo vàng; c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất reynoutrin; d) chiết hợp chất reynoutrin; e) thu hợp chất reynoutrin thô; và f) tinh chế hợp chất reynoutrin.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, thu lá cây Kháo vàng, loại bỏ tạp chất, thái nhỏ, rửa sạch, sau đó sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 55°C và xay nhỏ (đến kích thước 0,2mm) thu được nguyên liệu bột lá cây Kháo vàng.

Trong bước chiết nguyên liệu bột lá cây Kháo vàng, tiến hành chiết hồi lưu ba lần phần bột thu được ở bước trên bằng metanol theo tỷ lệ 1/4 (khối lượng/thể tích) với thời gian chiết từ 50 đến 70 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 70°C. Sau khi thu dịch chiết, loại dung môi dưới áp suất giảm thu cao chiết metanol (MTM).

Trong bước hòa tan cao chiết MTM, hòa tan cao chiết MTM vào nước nóng theo tỷ lệ 1/2 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết MTM thu được hỗn hợp dạng lỏng.

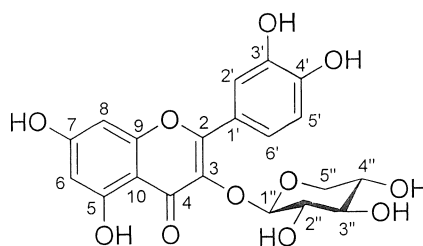
Trong bước thu phần không tan trong dung môi *n*-hexan, bổ sung *n*-hexan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước trên theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu được hỗn hợp dạng lỏng không tan trong dung môi *n*-hexan và có ký hiệu MTW.

Trong bước thu cao chiết etyl axetat, bổ sung etyl axetat vào hỗn hợp dạng lỏng không tan trong dung môi *n*-hexan và có ký hiệu MTW theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi etyl axetat và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etyl axetat (MTet);

Trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất reynoutrin, nhồi phân cao chiết etyl axetat (MTet) 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, 10/1 và 7/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/metanol tỷ lệ 7/1 và có ký hiệu MTet-10.

Trong bước thu hợp chất reynoutrin thô, nhồi phân cao chiết có ký hiệu MTet-10 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 10/1, 8/1, 6/1, 4/1, 3/1, 2/1 và 1/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/axeton tỷ lệ 1/1 và có ký hiệu MTet-10.14.

Trong bước tinh chế hợp chất reynoutrin, nhồi phân đoạn có ký hiệu MTet-10.14 lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel RP-C18 theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) và hệ dung môi rửa giải là axetonitril/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/3, 1/2 và 1/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất reynoutrin dạng bột, màu vàng và có công thức (1) sau:



(1)

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết bằng metanol, *n*-hexan và etyl axetat đều được thực hiện 3 lần.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hệ dung môi rửa giải trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất reynoutrin thô là diclometan/metanol theo tỷ lệ metanol tăng dần từ 0 đến 100%.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó còn có bước tinh sạch hợp chất reynoutrin bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi metanol/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/2 và 1/1 để thu hợp chất reynoutrin tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất reynoutrin thu được bằng quy trình theo giải pháp, trong đó hợp chất reynoutrin 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 reynoutrin từ lá cây Kháo vàng (Machilus thunbergii).

Thu lá cây Kháo vàng, loại bỏ tạp chất, thái nhỏ, rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ khoảng 50°C đến khối lượng không đổi sau đó nghiền nhỏ thành bột (có kích thước 0,2mm) và thu được 5kg bột. Phần bột này được chiết hồi lưu ba lần bằng metanol (3 x 20L) với thời gian chiết khoảng 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng 65°C, sau khi cô quay loại bỏ dung môi thu được cao metanol (MTM 195g). Cao MTM được hòa tan vào 400 mL nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết PBE thu được hỗn hợp dạng lỏng. Bổ sung 1,2 L dung môi *n*-hexan 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 không hòa tan trong dung môi *n*-hexan (MTW). Quá trình chiết bằng dung môi *n*-hexan được thực hiện 3 lần. Tiếp tục bổ sung 1,2 L etyl axetat vào hỗn hợp dạng lỏng có ký hiệu MTW, 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 (MTET; 95 g). Quá trình chiết bằng dung môi *n*-hexan được thực hiện 3 lần. Cao chiết MTET (95 g) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 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, 10/1 và 7/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/metanol tỷ lệ 7/1 và có ký hiệu MTET-10 (6,5g). Phân đoạn MTET-10 (6,5g) tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh), tiến hành rửa giải với hệ dung môi diclometan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 10/1, 8/1, 6/1, 4/1, 3/1, 2/1 và 1/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/axeton tỷ lệ 1/1 và có ký hiệu MTET-10.14 (150mg). Hòa tan phân đoạn có ký hiệu MTET-10.14 (150 mg) lên cột sắc

ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-C18 có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) và rửa giải với hệ dung môi là axetonitril/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/3, 1/2 và 1/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất reynoutrin có công thức (1) dạng bột vô định hình, màu vàng.

Ví dụ 2: Định tính và định lượng hợp chất reynoutrin

Hợp chất dạng bột vô định hình, 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 reynoutrin có công thức (1)

- Tên theo IUPAC: 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]oxychromen-4-one.

- 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 tráng sẵn 60 RP-C18 F_{254S} (Merck), dung môi triển khai là metanol/nước = 1,5/1 (v/v); $R_f = 0,50$.

- CTPT: C₂₀H₁₈O₁₁ (M = 434).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ_H (ppm): 7,65 (1H, s, H-2'); 7,63 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6'); 6,90 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5'); 6,44 (1H, s, H-8); 6,25 (1H, s, H-6); 5,22 (1H, d, $J = 6,4$ Hz, H-1''); 3,83 (1H, dd, $J = 5,2; 11,2$ Hz, H-5''a), 3.12-3.58 (4H, m, H-2''/H-3''/H-4''/H-5''b); ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ_C (ppm): 179,6 (C-4); 166,1 (C-7); 163,2 (C-5); 159,1 (C-9); 158,6 (C-2); 150,1 (C-4'); 146,2 (C-3'); 135,6 (C-3); 123,4 (C-6'); 123,2 (C-1'); 117,4 (C-5'); 116,2 (C-2'); 105,8 (C-10); 104,8 (C-1''); 100,0 (C-6); 94,9 (C-8); 77,7 (C-5''); 75,4 (C-3''); 71,2 (C-2''); 67,4 (C-4'').

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 reynoutrin.

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất reynoutrin 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 lipopolysaccharide (LPS), mật độ tế bào, các điều kiện

gây đối tế bào, thời gian ủ với LPS. Sau đó, 50 μ L 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 50 μ L thuốc thử Griess, ủ 10 phút. Đo OD bước sóng 550nm.

+ Phương pháp xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO.

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 reynoutrin (hoặc đối chứng dương - Sappanone A) ở các nồng độ khác nhau và LPS nồng độ 0,5 μ g/mL, ủ 24 giờ. Hút 50 μ L dịch nổi trong mỗi giếng sang đĩa 96 giếng khác và bổ sung 50 μ L 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 reynoutrin

Hợp chất	IC ₅₀ (μ M)
Reynoutrin	46,56 $\pm$ 2,77
Sappanone A	8,32 $\pm$ 0,04

Tác dụng ức chế sự sản sinh NO của hợp chất reynoutrin được thể hiện ở bảng 1. Hợp chất reynoutrin có tác dụng ức chế trung bình sự sản sinh NO với giá trị IC₅₀ = 46,56 $\pm$ 2,77 μ M so với chất đối chứng dương - Sappanone A (IC₅₀ = 8,32 $\pm$ 0,04 μ M). Với tác dụng ức chế trung bình sự sản sinh NO, hợp chất reynoutrin có tiềm năng trong điều trị viêm, từ đó định hướng hợp chất reynoutrin 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 phân lập và tinh chế hợp chất reynoutrin với độ tinh khiết > 95% từ lá cây Kháo vàng (*Machilus thunbergii*). 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 reynoutrin thu được từ quy trình theo giải pháp đã được chứng minh có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế trung bình sự sản sinh NO. Hợp chất reynoutrin 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 reynoutrin có tác dụng kháng viêm từ lá cây Kháo vàng (*Machilus thunbergii*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu lá cây Kháo vàng, loại bỏ tạp chất, thái nhỏ, rửa sạch, sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 55°C và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,2 mm thu được nguyên liệu bột lá cây Kháo vàng;

b) chiết nguyên liệu bằng cách chiết hồi lưu nguyên liệu bột lá cây Kháo vàng với metanol theo tỷ lệ 1/4 (khối lượng/thể tích), thời gian chiết từ 50 đến 70 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 70°C, sau khi thu dịch chiết, cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết metanol (MTM);

c) thu hỗn hợp dạng lỏng bằng cách hòa tan cao chiết MTM 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 MTM thu được hỗn hợp dạng lỏng;

d) thu hỗn hợp dạng lỏng không tan trong dung môi *n*-hexan bằng cách bổ sung dung môi *n*-hexan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước c) theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu được hỗn hợp dạng lỏng không tan trong dung môi *n*-hexan và có ký hiệu MTW;

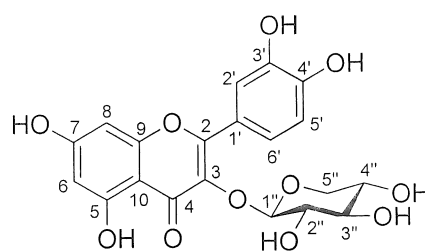
e) thu cao chiết etyl axetat bằng cách bổ sung dung môi etyl axetat vào hỗn hợp dạng lỏng không tan trong dung môi *n*-hexan và có ký hiệu MTW thu được ở bước d) theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1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

f) thu phân đoạn chứa hợp chất reynoutrin bằng cách nhồi phần cao chiết etyl axetat (MTet) 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/metanol lần lượt theo tỷ lệ 100/1, 50/1, 30/1, 10/1 và 7/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/metanol tỷ lệ 7/1 và có kí hiệu MTet-10;

g) thu hợp chất reynoutrin thô bằng cách nhồi phần cao chiết có kí hiệu MTet-10 thu được ở bước f) 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 10/1, 8/1, 6/1, 4/1, 3/1, 2/1 và 1/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/axeton tỷ lệ 1/1 và có kí hiệu MTet-10.14; và

h) tinh chế hợp chất reynoutrin bằng cách nhồi phân đoạn có kí hiệu MTet-10.14 thu được ở bước g) lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-C18 có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng), tiến hành rửa giải với hệ dung môi là axetonitril/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/3, 1/2 và 1/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất reynoutrin dạng bột, màu vàng và có công thức (1) sau:



(1)