(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) **2-0004273**

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

(13) **Y**

(21) 2-2024-00008
(22) 03/01/2024
(45) 25/08/2025 449
(43) 26/02/2024 431
(73) Trường Đại học Phenikaa (VN)
Phố Nguyễn Trác, Phường Yên Nghĩa, Quận Hà Đông, thành phố Hà Nội
(72) Tô Đạo Cường (VN); Trần Mạnh Hùng (VN); Hoàng Lê Minh (VN); Nguyễn Phi Hùng (VN); Trương Thị Thùy Nhung (VN); Nguyễn Thị Hoa (VN); Trương Thị Việt Hòa (VN); Khúc Đăng Duy Anh (VN); Nguyễn Chính Nam Khánh (VN).

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ HỢP CHẤT 2-[4-(3-HYDROXYPROPYL)-2-METHOXYPHENOXY]PROPANE-1,3-DIOL CÓ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM TỪ CÂY MÁU CHÓ (KNEMA CORTICOSA)

(21) 2-2024-00008

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol có tác dụng điều trị viêm từ vỏ thân cây Máu chó (*Knema corticosa*). Quy trình theo giải pháp bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột vỏ thân cây Máu chó (*Knema corticosa*); c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol; d) thu hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol thô; và e) tinh chế hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol. Hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol 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 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol từ cây Máu chó (*Knema corticosa*). Hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol thu được từ quy trình theo giải pháp 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 liên quan đến viêm.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Viêm là một phần của phản ứng sinh học phức tạp của các mô cơ thể đối với các kích thích có hại, chẳng hạn như mầm bệnh, tế bào bị tổn thương hoặc chất kích thích và là phản ứng bảo vệ liên quan đến tế bào miễn dịch, mạch máu và chất trung gian. Viêm là một trong những phản ứng điển hình của hệ thống miễn dịch đối với sự tấn công từ bên ngoài (nhiễm trùng, chấn thương, bỏng, dị ứng, v.v.) hoặc bên trong (tế bào ung thư) lên các mô (Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature, 2008; 454:428-435). Đó là một quá trình có thể xuất hiện ở tất cả các bộ phận trong cơ thể, liên quan đến khả năng miễn dịch bẩm sinh và khả năng miễn dịch thích ứng. Tuy nhiên, nó bị ức chế trong hệ thống miễn dịch niêm mạc, có cơ chế hoạt động đặc hiệu. Các triệu chứng liên quan đến viêm được mô tả gồm đau, nóng, đỏ và phù nề. Vấn đề lớn nhất nảy sinh từ tình trạng viêm là cơ chế phòng vệ của cơ thể tấn công cả tác nhân có hại và có lợi từ đó làm tổn thương các mô hoặc cơ quan khỏe mạnh. Viêm mãn tính hiện ngày càng phổ biến trong môi trường hiện đại với lối sống ít vận động, vệ sinh thực phẩm kém, ô nhiễm và là yếu tố quan trọng trong sự phát triển các "bệnh tật của nền văn minh" chẳng hạn như kháng insulin, béo phì, bệnh tim mạch, bệnh miễn dịch và thậm chí cả rối loạn tâm trạng và hành vi (Prescott SL. Early-life environmental determinants of allergic diseases and the wider pandemic of inflammatory noncommunicable diseases. J Allergy Clin Immunol, 2013; 131:23-30). Chức năng của viêm là loại bỏ nguyên nhân ban đầu gây tổn thương tế bào, loại bỏ các tế bào hoại tử và các mô bị tổn thương do tổn thương ban đầu và quá trình

viêm, đồng thời bắt đầu quá trình sửa chữa mô. Viêm ít có thể dẫn đến sự phá hủy mô từ từ bởi các yếu tố có hại (ví dụ: vi khuẩn) và làm tổn hại đến sự sống sót của sinh vật. Ngược lại, viêm quá nhiều, ở dạng viêm mãn tính, có liên quan đến nhiều bệnh khác nhau, chẳng hạn như sốt, bệnh nha chu, xơ vữa động mạch và viêm xương khớp (Chen L, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. Oncotarget, 2017; 9: 7204-7218).

Sử dụng thuốc điều trị là phương pháp điều trị viêm phổ biến nhất hiện nay. Các loại thuốc phổ biến nhất hiện nay được sử dụng để điều trị các bệnh viêm là các lớp thuốc corticosteroit, các thuốc kháng-histamin (Anti-histamine), các thuốc không steroit (NSAID), decongestant, kháng cholinergic, ổn định tế bào Mast, v/v (NSAIDs, Steroids từ cơ quan y tế quốc gia Anh – NHS). Các loại thuốc này khi được sử dụng rộng rãi đã phát hiện rất nhiều tác dụng phụ thậm chí nguy hiểm đến tính mạng, điển hình như trong năm 2004 - 2005 Rofecoxib và Valdecoxib đã bị thu hồi do có các tác dụng phụ liên quan đến rối loạn tim mạch, dị ứng có thể gây tử vong (Kim PS and Reicin AS. Rofecoxib, Merck, and the FDA. N Engl J Med, 2004; 351: 2875-2878). Do đó việc tìm kiếm các hợp chất mới có tác dụng điều trị viêm từ nguồn thiên nhiên, đặc biệt là nguồn dược thay thế cho các loại thuốc tổng hợp rất cần được quan tâm và đầu tư nghiên cứu. Đối với chi *Knema*, gần đây nhiều tác giả đã nghiên cứu và phát hiện ra tác dụng kháng viêm (Hop NQ and Son NT. Genus *Knema*: An Extensive Review on Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. Curr Pharm Biotechnol, 2023; 24:1524-1553; Wang CF, et al. Phenolic compounds with anti-inflammatory effects from *Knema furfuracea*. Results Chem, 2021; 3:100175). Tuy nhiên, trong số các hợp chất có trong cây Máu chó (*Knema corticosa*) thì hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol có tác dụng kháng viêm là hợp chất được phát hiện lần đầu tiên tiên từ cây này. Vấn đề tồn tại ở đây là chưa có báo cáo nào đưa ra phương pháp tách chiết và tinh chế hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol từ cây Máu chó (*Knema corticosa*), từ đó có thể sử dụng trực tiếp hợp chất này hoặc phối hợp với các thảo dược khác để sản xuất sản phẩm có tác dụng điều trị các bệnh liên quan đến viêm.

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 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-

methoxyphenoxy]propane-1,3-diol từ cây Máu chó (*Knema corticosa*) có tác dụng điều trị viêm (ức chế sự sản sinh nitric oxit - NO) và hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề xuất quy trình phân lập và tinh chế hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol có tác dụng ức chế sự sản sinh nitric oxit (NO) từ vỏ thân cây Máu chó (*Knema corticosa*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu vỏ thân cây Máu chó, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, chặt nhỏ, sau đó phơi khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ phòng rồi nghiền nhỏ đến kích thước khoảng 0,5 - 1,0 mm thu được nguyên liệu dạng bột;

b) chiết bột vỏ thân cây Máu chó bằng cách bổ sung phần bột thu được ở bước a) vào dung môi metanol theo tỷ lệ 1/4 (khối lượng/thể tích), tiến hành chiết bột vỏ thân cây bằng thiết bị chiết hồi lưu, thời gian chiết từ 50 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 70^0C, sau đó thu dịch chiết, lọc và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết metanol (KCM);

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

d) chiết bằng *n*-hexan bằng cách bổ sung *n*-hexan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước c) theo tỷ lệ 2/1 (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 *n*-hexan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết *n*-hexan, dịch nước còn lại được sử dụng để chiết bằng etyl axetat;

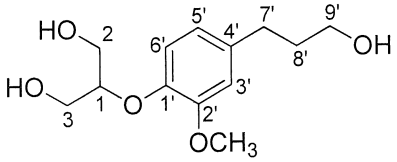
e) chiết bằng etyl axetat bằng cách bổ sung dung môi etyl axetat vào dịch nước còn lại thu được ở bước d) theo tỷ lệ 2/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi etyl axetat và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết etyl axetat (KCE);

f) thu phân đoạn chứa hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol bằng cách đưa cao chiết KCE thu được ở bước e) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh) rồi tiến hành rửa giải với hệ dung môi diclometan/metanol lần lượt theo tỷ lệ 100/1, 50/1,

30/1, 20/1, 10/1 và 8/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/metanol có tỷ lệ 8/1 và có kí hiệu là KCE17;

g) thu hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol thô bằng cách nhồi phần cao chiết có kí hiệu KCE17 thu được ở bước f) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh), tiến hành rửa giải với hệ dung môi diclometan/etyl axetat theo tỷ lệ 10/1, 8/1, 6/1 và 4/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/etyl axetat có tỷ lệ 4/1 và có kí hiệu là KCE17.2, sau đó phân đoạn KCE17.2 tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh), rửa giải với hệ dung môi là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn *n*-hexan/axeton có tỷ lệ 3/1 và có kí hiệu là KCE17.2.2; và

h) tinh chế hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol bằng cách nhồi phân đoạn có kí hiệu KCE17.2.2 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 63μm) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) và rửa giải với hệ dung môi metanol/nước theo tỷ lệ 1/3, 1/2, 1/1 và 2/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol dạng rắn, không màu và có công thức (1):



(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 khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol 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 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol có tác dụng điều trị viêm từ vỏ thân cây Máu chó

(*Knema corticosa*) và hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol thu được từ quy trình này cùng với các ví dụ minh họa cụ thể. Tuy nhiên, các ví dụ minh họa này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề cập đến quy trình sản xuất hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol có tác dụng điều trị viêm từ vỏ thân cây Máu chó (*Knema corticosa*), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột vỏ thân cây Máu chó (*Knema corticosa*); c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol; d) thu hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol thô; và e) tinh chế hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, thu vỏ thân cây Máu chó (*Knema corticosa*), loại bỏ tạp chất, rửa sạch, chặt nhỏ, sau đó phơi khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ phòng rồi nghiền nhỏ đến kích thước 0,5 - 1,0 mm thu được nguyên liệu dạng bột vỏ thân cây Máu chó (*Knema corticosa*).

Trong bước chiết nguyên liệu bột cây Máu chó, tiến hành chiết phần bột thu được ở trên bằng metanol theo tỷ lệ 1/4 (khối lượng/thể tích) bằng thiết bị chiết hồi lưu với thời gian chiết từ 50 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 70^0C. Sau khi chiết, dịch chiết được đem đi lọc và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết metanol (KCM). Bước chiết bằng metanol được thực hiện 3 lần.

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

Trong bước thu cao chiết *n*-hexan, bổ sung dung môi *n*-hexan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước trên theo tỷ lệ 2/1 (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 *n*-hexan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết *n*-hexan. Bước chiết bằng *n*-hexan được thực hiện 3 lần và dịch nước còn lại được sử dụng để chiết bằng etyl axetat.

Trong bước thu cao chiết etyl axetat, bổ sung dung môi etyl axetat vào dịch nước còn lại thu được ở bước trên theo tỷ lệ 2/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để

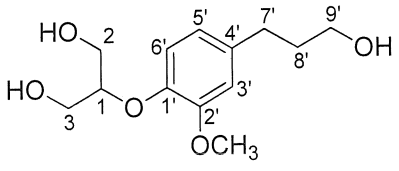
khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi etyl axetat và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết etyl axetat (KCE). Bước chiết bằng etyl axetat được thực hiện 3 lần.

Trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol, đưa phân đoạn chứa cao chiết KCE lên cột sắc ký với chất hấp phụ là 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, 20/1, 10/1 và 8/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn diclometan/metanol có tỷ lệ 8/1 và có kí hiệu là KCE17.

Trong bước thu hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol thô, đưa phân đoạn KCE17 thu được ở bước trên lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh), tiến hành rửa giải với hệ dung môi diclometan/etyl axetat theo tỷ lệ 10/1, 8/1, 6/1 và 4/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/etyl axetat có tỷ lệ 4/1 và có kí hiệu là KCE17.2. Sau đó phân đoạn KCE17.2 tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh), rửa giải với hệ dung môi là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn *n*-hexan/axeton có tỷ lệ 3/1 và có kí hiệu là KCE17.2.2.

Trong bước tinh chế hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol, hòa tan phân đoạn có kí hiệu KCE17.2.2 thu được ở bước trên lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-C18 (có kích cỡ hạt 40 đến 63μm) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) và rửa giải với hệ dung môi metanol/nước theo tỷ lệ 1/3, 1/2, 1/1 và 2/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol dạng rắn, không màu.

Hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol thu được từ quy trình theo giải pháp 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 khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol 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 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol từ vỏ thân cây Máu chó (Knema corticosa).

Thu vỏ thân cây Máu chó (*Knema corticosa*), loại bỏ tạp chất, rửa sạch, chặt nhỏ, phơi khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ phòng sau đó nghiền nhỏ thành bột (kích thước 1,0mm) và thu được 2,0 kg bột. Phần bột này được chiết hồi lưu 3 lần bằng metanol (3 × 8,0 L) với thời gian chiết mỗi lần là 1 giờ ở nhiệt độ 70°C, sau khi cô quay loại bỏ dung môi thu được cao metanol (KCM; 145 g). Cao chiết KCM (145 g) được hòa tan vào 150 mL nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết KCM thu được hỗn hợp dạng lỏng. Bổ sung 600 mL *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 hòa tan trong dung môi *n*-hexan và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết *n*-hexan (KCH; 22 g) và dịch nước còn lại. Bước chiết bằng *n*-hexan được thực hiện 3 lần. Dịch nước còn lại tiếp tục được bổ sung 600 mL dung môi etyl axetat, 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 rồi cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết etyl axetat (KCE; 75 g). Bước chiết bằng etyl axetat cũng được thực hiện 3 lần. Cao chiết KCE (75 g) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là 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, 20/1, 10/1 và 8/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn diclometan/metanol có tỷ lệ 8/1 và có kí hiệu là KCE17 (5,2 g). Phân đoạn KCE17 (5,2 g) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh), rửa giải với hệ dung môi là diclometan/etyl axetat theo tỷ lệ 10/1, 8/1, 6/1 và 4/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/etyl axetat có tỷ lệ 4/1 và có kí hiệu là KCE17.2 (715 mg). Phân đoạn KCE17.2 (715 mg) tiếp tục được đưa lên cột

sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh) và rửa giải với hệ dung môi là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn *n*-hexan/axeton có tỷ lệ 3/1 và có kí hiệu là KCE17.2.2 (95 mg). Hòa tan phân đoạn có kí hiệu KCE17.2.2 (95 mg) lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-C18 (có kích cỡ hạt 40 đến 63µm) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) và rửa giải với hệ dung môi là metanol/nước theo tỷ lệ 1/3, 1/2, 1/1 và 2/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol (8,6 mg) có công thức (1) dạng rắn, không màu.

Ví dụ 2: Định tính và định lượng hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol thu được ở Ví dụ 1.

Hợp chất có công thức (1) dạng rắn, không màu thu được ở Ví dụ 1 được xác định về mặt định tính và định lượng bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kết quả như sau:

Đặc tính của hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol có công thức (1)

- Tên theo IUPAC: 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol.

- Mô tả: Hợp chất dạng rắn, không màu, 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-18 F_{254S} (Merck), dung môi triển khai là metanol/nước = 1/2 (v/v); R_f = 0,40.

- CTPT: $C_{13}H_{20}O_5$ (M = 256).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ^{1}H-NMR (400 MHz, Methanol-d_4) δ_H (ppm): 7,00 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-6′); 6,86 (1H, s, H-3′); 6,74 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-5′); 4,16 (1H, q, J = 4,8 Hz, H-2); 3,85 (3H, s, 2′-OCH_3); 3,78 (4H, d, J = 4,8 Hz, H-1/H-3); 3,57 (2H, t, J = 6,4 Hz, H-9′); 2,64 (2H, t, J = 7,6 Hz, H-7′); 1,82 (2H, q, J = 7,6 Hz, H-8′); ^{13}C-NMR (100 MHz, Methanol-d_4) δ_C (ppm): 152,1 (C-2′); 146,9 (C-1′); 138,4 (C-4′); 122,0 (C-5′); 119,6 (C-6′); 114,2 (C-3′); 83,4 (C-2); 62,3 (C-9′); 62,1 (C-1/C-3); 56,6 (2′-OCH_3); 35,7 (C-7′); 32,8 (C-8′).

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 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol.

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol thu được ở Ví dụ 1. 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 đói tế bào, thời gian ủ với LPS. Sau đó, 50µL dịch nổi trong đĩa 96 giếng nuôi tế bào (sau khi đã ủ với LPS và đạt được các chỉ tiêu về thời gian và thành phần thí nghiệm) được chuyển sang đĩa 96 giếng khác và bổ sung một thể tích 50µL thuốc thử Griess, ủ 10 phút. Đo OD bước sóng 550nm.

+ Phương pháp xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol phân lập từ vỏ thân cây Máu chó (*Knema corticosa*).

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% CO_2. 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 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol (hoặc đối chứng dương-Sappanone A) ở các nồng độ khác nhau và LPS nồng độ 0,5µg/mL, ủ 24 giờ. Hút 50µL dịch nổi trong mỗi giếng sang đĩa 96 giếng khác và bổ sung 50µL thuốc thử Griess, ủ 10 phút. Đo OD tại bước sóng 550nm. Khả năng ức chế sự sản sinh NO được tính bằng công thức:

$$\text{Khả năng ức chế} = \frac{OD_{550nm} \text{ kích thích LPS không trị liệu} - OD_{550nm} \text{ kích thích được trị liệu}}{OD_{550nm} \text{ kích thích LPS không trị liệu} - OD_{550nm} \text{ không kích thích LPS}} \times 100\ (\%)$$

Bảng 1. Hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol phân lập từ cây Máu chó (*Knema corticosa*).

Hợp chất	**IC_{50}** (µM)
2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol	38,12 ± 3,16
Sappanone A	8,32 ± 0,04

Tác dụng ức chế sự sản sinh NO của hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol được thể hiện ở bảng 1. Hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol có tác dụng ức chế trung bình sự sản sinh NO với giá trị IC_{50} = 38,12 ± 3,16 (μM). Với tác dụng ức chế trung bình sự sản sinh NO, hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol vẫn có tiềm năng trong điều trị viêm, từ đó định hướng hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol có/hoặc không phối hợp với các thảo dược khác làm nguyên liệu sản xuất sản phẩm có tác dụng điều trị bệnh viêm.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình của giải pháp hữu ích cho phép phân lập và tinh chế hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol từ vỏ thân cây Máu chó (*Knema corticosa*) có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế sự sản sinh NO. Quy trình phân lập và tinh chế hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol là quy trình mới vì đây là hợp chất lần đầu tiên được tìm thấy trong cây Máu chó (*Knema corticosa*). Bằng cách sử dụng sắc ký cột và điều chỉnh hệ dung môi tối ưu, quy trình cho phép chiết được hợp chất có hiệu suất 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.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập và tinh chế hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol có tác dụng kháng viêm từ vỏ thân cây Máu chó (*Knema corticosa*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu vỏ thân cây Máu chó, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, chặt nhỏ, sau đó phơi khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ phòng rồi nghiền nhỏ đến kích thước khoảng 0,5 - 1,0mm thu được nguyên liệu dạng bột vỏ thân cây Máu chó;

b) chiết bột vỏ thân cây Máu chó bằng cách bổ sung phần bột thu được ở bước a) vào dung môi metanol theo tỷ lệ 1/4 (khối lượng/thể tích), sau đó tiến hành chiết bột vỏ thân cây bằng thiết bị chiết hồi lưu, thời gian chiết từ 50 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 70^0C, thu dịch chiết, lọc và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết metanol và có kí hiệu là KCM;

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

d) chiết bằng *n*-hexan bằng cách bổ sung dung môi *n*-hexan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước c) theo tỷ lệ 2/1 (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 *n*-hexan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết *n*-hexan, dịch nước còn lại được sử dụng để chiết bằng dung môi etyl axetat;

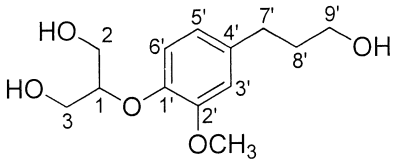
e) thu cao chiết etyl axetat bằng cách bổ sung dung môi etyl axetat vào dịch nước còn lại thu được ở bước d) theo tỷ lệ 2/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi etyl axetat và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết etyl axetat và có kí hiệu là KCE;

f) thu phân đoạn chứa hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol bằng cách đưa cao chiết KCE thu được ở bước e) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là 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, 20/1, 10/1 và 8/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/metanol có tỷ lệ 8/1 và có kí hiệu là KCE17;

g) thu hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol thô bằng cách nhồi phần cao chiết có kí hiệu KCE17 thu được ở bước f) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh), rửa giải với hệ dung môi là diclometan/etyl axetat theo tỷ lệ 10/1, 8/1, 6/1 và 4/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/etyl axetat có tỷ lệ 4/1 và có kí hiệu là KCE17.2, sau đó phân đoạn KCE17.2 tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh), rửa giải với hệ dung môi là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn *n*-hexan/axeton có tỷ lệ 3/1 và có kí hiệu là KCE17.2.2; và

h) tinh chế hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol bằng cách nhồi phân đoạn có kí hiệu KCE17.2.2 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 63μm) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng), tiến hành rửa giải với hệ dung môi là metanol/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/3, 1/2, 1/1 và 2/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hợp chất 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]propane-1,3-diol dạng rắn, không màu và có công thức (1) sau:



(1)