



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0023307

(51)⁷ C07C 45/86; C07C 49/84; C07C 45/79; (13) B
C07C 45/85

(21) 1-2016-01532 (22) 16/09/2014
(86) PCT/IB2014/001872 16/09/2014 (87) WO2015/049561 09/04/2015
(30) p. 405540 04/10/2013 PL
(45) 27/04/2020 385 (43) 25/07/2016 340A
(73) AXEN BIO GROUP SP. Z O.O. (PL)
Ul. Armii Krajowej 116/19 PL-81-824 Sopot, Poland
(72) GAGOŚ, Mariusz (PL)
(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT XANTHOTHUMOL

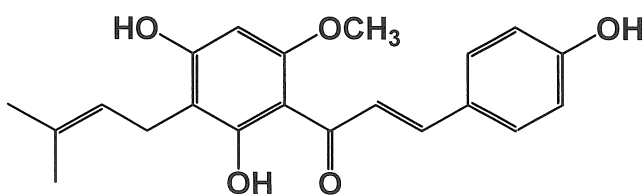
(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất xanthohumol, trong đó dịch chiết chứa xanthohumol được trộn với nước, muối kim loại chuyển tiếp được bổ sung vào hỗn hợp thu được, rồi tiếp đó phân tách kết tủa xanthohumol thu được và sấy khô để thu được xanthohumol có độ tinh khiết trên 90%.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất xanthohumol độ tinh khiết cao từ hoa bia đã qua chiết xuất, cây hoa bia hoặc hoa bia nghiền. Do xanthohumol có độ tinh khiết cao, nó có thể được sử dụng trong thực phẩm bổ sung, đồ uống và làm thành phần trong sản phẩm điều trị.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Xanthohumol (Xn), hay ((*E*)-1-[2,4-dihydroxy-6-methoxy-3-(3-methylbut-2-enyl)-phenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)-prop-2-en-1-on) là hợp chất có nguồn gốc tự nhiên thuộc nhóm chalcon prenylat hóa, nguồn chính của hợp chất này là cụm hoa cái của *Humulus lupulus* (hoa bia). Nó chỉ có trong bia với hàm lượng rất nhỏ. Hợp chất gồm hai vòng benzen được liên kết bởi nhóm chức cacbonyl chưa no α,β :



Xanthohumol (Xn)

Sự có mặt của nhóm hydroxy tự do trong phân tử làm cho phân tử có thể đồng phân hóa dễ dàng thành flavanon thích hợp - dạng trung gian của con đường sinh tổng hợp flavonoid. Trái ngược với các thành phần của hoa bia, xanthohumol ưa mỡ hơn, đặc điểm có liên quan đến sự có mặt của nhóm thế prenylat trong cấu trúc của nó. Lưu ý rằng trong các hệ thống sinh học sống, các nhóm chức prenylat (farnesyl hoặc geranylgeranyl) tạo điều kiện thuận lợi cho sự liên kết của nhiều tử nội bào với màng tế bào, xác định hoạt tính thích hợp của chúng. Tương tự như vậy, trong trường hợp xanthohumol, các nhóm chức như vậy có thể điều chỉnh hoạt tính sinh học của hợp chất, cụ thể hơn là ảnh hưởng đến đặc tính lý-hóa và sự phân bố dưới mức tế bào.

Các nghiên cứu trong ống nghiệm (*in vitro*) và trong cơ thể (*in vivo*) cũng cho thấy rằng xanthohumol làm giảm viêm và giảm oxy hóa bằng nhiều cơ chế khác nhau. Các cơ

chế chủ yếu gồm: loại bỏ gốc oxy hóa tự do và dạng phản ứng (RTF) của chúng, ức chế hoạt tính của xyclooxygenaza (COX I và COX II), làm giảm sự sản xuất prostaglandin, NO, yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF α), NF κ B (một yếu tố phiên mã), và trung hòa sự peroxy hóa phospholipit màng.

Hoạt tính chống oxy hóa và chống viêm của xanthohumol có liên quan đến sự có mặt của nhóm hydroxy và nhóm thế prenylat trong phân tử. Nhóm chức α , β -cacbonyl chưa no cũng có vai trò quan trọng. Nhóm chức tham gia vào phản ứng Michael cùng với tác nhân ái nhân (tác nhân thân hạch, nucleophile) quan trọng về mặt sinh học, cụ thể như: L-xistein trong protein và các phân tử chứa nhóm sulfhydryl (-SH). Theo cách này, sản phẩm cộng hóa trị mà gây ra mất hoạt tính sinh học của liên kết phân tử bởi xanthohumol được thu nhận.

Phổ rộng hoạt tính xanthohumol cơ bản bắt nguồn từ khả năng liên kết với các phân tử sinh học quan trọng của hợp chất. Ví dụ tiêu biểu là ảnh hưởng của xanthohumol đối với polymeraza, α -synthetaza, topoisomeraza I, phosphataza kiềm, aromataza, diaxylglyxerol axyltransferaza, protein đường truyền tín hiệu protein kinaza hoạt hóa phân bào (MAPK), FAK (Focal adhesion kinase) kinaza, Akt và STAT hoặc các yếu tố phiên mã NF- κ B. Xn làm giảm hoạt tính của protein gây ra hiệu ứng tế bào nhiều hướng như là hệ quả của sự phát triển, chu kỳ tế bào, sự kết dính và rối loạn di căn ở tế bào khối u.

Đáng chú ý là thông tin liên quan đến đặc tính bảo vệ thần kinh. Trên mẫu chuột bị tắc động mạch não giữa (MCAO) gây ra bởi thiếu máu cục bộ, là mẫu thiếu máu não cục bộ *in vivo*, xanthohumol làm giảm đáng kể vùng hoại tử do thiếu máu não cục bộ. Như vậy, xanthohumol cũng được đề xuất để làm giảm hiệu ứng ngộ độc thần kinh gây ra bởi peptit β -amyloid ($A\beta$). $A\beta$ được biết đến là có liên quan đến cơ chế sản sinh gốc tự do và là một trong các nguyên nhân chính của bệnh Alzheimer, bằng cách làm tăng sự sản sinh gốc tự do và peroxy hóa lipid trong tế bào thần kinh, và tiếp đó dẫn đến sự chết theo chương trình của tế bào thần kinh.

Hơn nữa, ngoài tác động của xanthohumol lên các thụ thể, cơ chế hoạt động của xanthohumol có thể liên quan đến hoạt tính chọn lọc của nó đối với màng lipid. Các nghiên cứu về cơ chế tương tác của xanthohumol với màng lipid mẫu chỉ ra sự biến đổi

chủ yếu về đặc tính động và cấu trúc của tế bào. Ngay cả khi nồng độ rất thấp, xanthohumol vẫn tương tác mạnh mẽ với các mảnh ưa nước của màng lipid ảnh hưởng đến sự thay đổi độ dày của lớp lipid kép. Cũng cần biết rằng, do tính kỵ nước cao, các hợp chất tương tự loại nicotin trừ sâu tự nhiên (neonicotinoit) đi vào màng lipid rất dễ dàng. Sự tương tác của xanthohumol với màng lipid có thể làm giảm đáng kể sự thâm nhập của các hợp chất tương tự loại nicotin trừ sâu tự nhiên vào màng lipid, điều đó có thể giải thích hoạt tính mạnh mẽ của xanthohumol ngoài việc vô hiệu các thụ thể nicotin.

Về mặt cấu trúc, xanthohumol là một polyphenol, tuy nhiên trái với polyphenol, xanthohumol hầu như không tan trong nước nóng, nhưng dễ dàng hòa tan trong rượu hoặc hỗn hợp nước/rượu.

Nguồn xanthohumol tốt là hoa bia đã qua chiết xuất vốn bao gồm các chất thải từ quá trình sản xuất sản phẩm chiết hoa bia được sử dụng trong công nghiệp sản xuất bia. Theo ước tính, hoa bia đã qua chiết xuất chứa lượng xanthohumol lên đến 1%, tùy thuộc vào loài của cây hoa bia.

Có nhiều công nghệ được sử dụng để sản xuất xanthohumol. Đơn sáng chế Đức số DE 19939350 A1 mô tả quy trình sản xuất sản phẩm chiết hoa bia làm giàu xanthohumol, trong đó hỗn hợp nước và etanol được sử dụng để chiết. Sản phẩm chiết thu được chứa 5-15% xanthohumol.

Bằng sáng chế châu Âu số EP 1424385 B1 đề cập tới phương pháp chiết xanthohumol từ nguyên liệu chứa xanthohumol thô bằng cách sử dụng CO₂ nén làm dung môi dưới áp suất trên 500 bar ở nhiệt độ trên 60°C.

Đơn sáng chế Trung Quốc số CN 101440029 đề cập tới phương pháp chiết xanthohumol từ cây hoa bia và các sản phẩm chứa xanthohumol, trong đó việc chiết xuất với dung môi hữu cơ được hỗ trợ bằng siêu âm được thực hiện, tiếp đó sản phẩm được trộn với diatomit, được lọc, được rửa bằng hỗn hợp nước/etanol, được cô đặc, được kết tủa và sấy khô để thu được xanthohumol tinh khiết 86%.

Bằng sáng chế châu Âu số EP 2187899 B1 đề cập tới quy trình sản xuất hỗn hợp chứa thành phần xanthohumol từ cây hoa bia, trong đó muối được bổ sung vào dung dịch chứa xanthohumol để cô đặc đến nồng độ xanthohumol khoảng 0,05-5,0 M, tiếp đó sản

phẩm cô đặc được nâng pH lên đến 10,5-12,0, rồi lọc kết tủa thu được, axit hóa dịch lọc xuống 7-8 để thu được kết tủa xanthohumol tinh khiết 40-95%.

Đơn sáng chế Mỹ số US 11/790,365 đề cập tới quy trình sản xuất bột chứa hàm lượng cao (60-90%) xanthohumol, bao gồm huyền phù hóa sản phẩm chiết được làm giàu xanthohumol trong dung dịch kiềm, tách sản phẩm không hòa tan, trung hòa và kết tủa xanthohumol hòa tan bằng axit và cô lập sản phẩm.

Bằng sáng chế Trung Quốc số CN 101433592 đề cập tới việc sử dụng các loại nhựa hấp phụ khác nhau để sản xuất xanthohumol có độ tinh khiết cao.

Tuy nhiên, yêu cầu đặt ra là cần có quy trình sản xuất đơn giản hơn, chi phí thấp hơn để sản xuất xanthohumol có độ tinh khiết cao hơn so với giải pháp kỹ thuật hiện có được nêu ra trên đây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Hạn chế của các quy trình trước đó sẽ được khắc phục nhờ quy trình sản xuất mới được phát triển để sản xuất xanthohumol từ hoa bia đã qua chiết xuất, cây hoa bia nghiền hoặc hoa bia.

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình sản xuất xanthohumol, trong đó:

- a) sản phẩm chiết chứa xanthohumol được trộn với nước;
- b) dung dịch muối kim loại chuyển tiếp được thêm vào hỗn hợp thu được;
- c) kết tủa xanthohumol thu được, phân tách và sấy khô để thu được xanthohumol có độ tinh khiết trên 90%.

Tốt hơn là, trong bước b), nồng độ muối trong hỗn hợp nên được điều chỉnh trong khoảng 0,001-10 M, tốt nhất là trong bước b), nồng độ muối trong hỗn hợp được điều chỉnh trong khoảng 0,001-0,05 M hoặc trên 5 M.

Tốt nhất là, có thêm công đoạn sau khi muối được bổ sung trong bước b):

- b1) dung dịch được kiềm hóa đến mức pH trên 7;

b2) kết tủa lần thứ nhất được lọc bỏ, và dịch lọc được axit hóa đến mức pH dưới 7;

b3) dịch lọc đã axit hóa được cô đặc để thu được kết tủa xanthohumol.

Tốt nhất là, trong bước b1), dung dịch được kiềm hóa đến mức pH trong khoảng 7,5-10,5 hoặc trên 12.

Tốt nhất là, sản phẩm chiết chứa xanthohumol thu được bằng cách chiết hoa bia đã qua chiết xuất, hoa bia, cây hoa bia nghiền hoặc hỗn hợp của chúng trong dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước, dung môi được sử dụng với lượng khoảng 0,1-10 lít/kg nguyên liệu thô.

Tốt hơn là, dung môi có thể trộn lẫn với nước được sử dụng là keton, rượu hoặc hỗn hợp của chúng, tốt nhất là, dung môi có thể trộn lẫn với nước được sử dụng là axeton, metanol, etanol, propanol hoặc hỗn hợp của chúng.

Tốt nhất là, việc chiết được thực hiện ở nhiệt độ trong khoảng 5-65°C.

Tốt hơn là, dịch chiết chứa xanthohumol được trộn với nước theo tỉ lệ trong khoảng 0,1-5 lít nước trên 1 lít dịch chiết, tốt nhất là, dịch chiết chứa xanthohumol được trộn với nước theo tỉ lệ trong khoảng 1-3 lít nước trên 1 lít dịch chiết.

Tốt nhất là, trong bước b), nồng độ muối kim loại chuyển tiếp được cung cấp nằm trong khoảng 0,01-0,05 M.

Tốt nhất là, muối kim loại chuyển tiếp được sử dụng là muối đồng (II) hoặc muối kẽm (II).

Tốt nhất là, muối kim loại chuyển tiếp được sử dụng là muối clorua, muối nitrat, hoặc muối sulfat.

Tốt nhất là, muối kim loại chuyển tiếp được sử dụng là muối đồng (II) clorua, đồng (II) sulfat hoặc kẽm (II) clorua hoặc kẽm (II) sulfat.

Quy trình sản xuất theo sáng chế cho phép thu được xanthohumol có độ tinh khiết ít nhất 90% (thường trên 95%) với sản lượng thu hồi tốt. Quy trình sản xuất theo sáng chế không đòi hỏi hệ thống sắc ký phức tạp hoặc nhựa hỗ trợ.

Việc tinh sạch xanthohumol thu được được xác định bằng kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp (HPLC) trên cột SUPELCOSIL LC-PAH có kích thước 15 cm × 4,6 cm, kích thước hạt 5 µm, nhiệt độ cột 20°C, pha A: 95% axetonitrin và 0,3% HCOOH; pha B: 2% axetonitrin và 0,3% HCOOH, tốc độ dòng 2 ml/phút, lượng tiêm mẫu 20 µl, phát hiện bằng bước sóng 370 nm và 290 nm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được bộc lộ rõ hơn thông qua việc mô tả chi tiết các thí nghiệm sau đây.

Thí nghiệm 1

250 g hoa bia đã qua chiết xuất được đổ ngập bằng axeton (0,75 lít). Sau khi khuấy cơ học trong 1 giờ, chất chiết được lọc qua giấy lọc. Sản phẩm chiết thu được (0,65 lít) được hòa với nước (1,3 lít). Tiếp đó, bổ sung dung dịch CuCl_2 trong nước (nồng độ 10g/l) vào dung dịch thu được với lượng 300 ml/l dịch lọc (nồng độ cuối cùng bằng 0,022 M). Sau khi bổ sung đồng clorua, pH của dung dịch được ổn định ở khoảng 4,5. Ngay sau khi đồng clorua được rót vào, sự kết tủa xảy ra trong dịch chiết, kết tủa là chất kết tụ gồm tạp chất hoa bia còn sót lại và diệp lục, chất kết tụ được tách ra khỏi dung dịch màu vàng là dung dịch có chứa xanthohumol. Sau 1 giờ, NaOH được bổ sung vào dung dịch để kết tủa đồng dư bằng cách nâng pH đến 10. Sau 1 giờ, kết tủa gồm bùn nhão và đồng hydroxit tích tụ ở đáy bình. Kết tủa được lọc bỏ nhờ giấy lọc. Dịch lọc thu được được axit hóa bằng HCl đến pH 6 và được cô đặc bằng máy cô hút chất không quay để thu được kết tủa xanthohumol tinh thể. Cuối cùng, kết tủa xanthohumol tinh thể được lọc và sấy khô trong tủ sấy (nhiệt độ 50-60°C), được tinh sạch bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC) để thu được 206 mg xanthohumol có độ tinh khiết 97,8%. Sản lượng xanthohumol thu được bằng quy trình chiết xuất như trên đạt 82% so với tổng lượng xanthohumol có trong lượng hoa bia đã sử dụng.

Thí nghiệm 2

Xanthohumol được thu hồi giống như trong thí nghiệm 1, khác biệt ở chỗ: sau khi bổ sung đồng clorua, kết tủa dạng bùn nhão màu xanh lục được lọc bỏ và dịch lọc được

cô đặc bằng máy cô hút chân không quay, được tinh sạch bằng HPLC để thu được xanthohumol tinh thể có độ tinh khiết 90,8%.

Thí nghiệm 3

Xanthohumol được thu hồi giống như trong thí nghiệm 1, khác biệt ở chỗ: đồng clorua được thay thế bằng dung dịch kẽm sulfat (ZnSO_4) nồng độ 10 g/l. Sau khi bổ sung dung dịch muối kẽm, pH của dung dịch được ổn định ở khoảng 6, quá trình kết tủa xảy ra. Sau khoảng 1 giờ, NaOH được thêm vào để nâng pH lên khoảng 10. Sau 1 giờ sự kết tủa tiếp tục được quan sát thấy ở đáy bình. Kết tủa được lọc bỏ nhờ giấy lọc. Dịch lọc thu được được axit hóa bằng HCl đến pH 6 và được cô đặc bằng máy cô hút chất không quay để thu được kết tủa xanthohumol tinh thể. Cuối cùng, kết tủa xanthohumol tinh thể được lọc và sấy khô trong tủ sấy (nhiệt độ 50-60°C), được tinh sạch bằng HPLC để thu được xanthohumol có độ tinh khiết 97,8%. Sản lượng xanthohumol thu được đạt 79% so với tổng lượng xanthohumol có trong lượng hoa bia đã sử dụng.

Thí nghiệm 4

250 g hoa bia đã qua chiết xuất được đổ ngập bằng 0,75 lít metanol. Sau khi khuấy cơ học trong 1 giờ, chất chiết được lọc qua giấy lọc. Sản phẩm chiết thu được được pha với nước theo tỉ lệ thể tích 1:2 (một phần dịch lọc pha vào hai phần nước). Tiếp đó, bổ sung dung dịch CuCl_2 trong nước (nồng độ 10g/l) vào dung dịch thu được với lượng 300 ml/l dịch lọc (nồng độ cuối cùng bằng 0,022 M). Sau 1 giờ, kết tủa được quan sát thấy là chất kết tủa có màu xanh lục, chất kết tủa được tách ra khỏi dung dịch màu vàng. Tiếp đó, NaOH được bổ sung vào dung dịch để nâng pH đến 10. Sau 1 giờ, kết tủa dạng bùn nhão màu xanh lục được quan sát thấy ở đáy bình. Sản phẩm chiết tạo thành được lọc qua giấy lọc. Dịch lọc được axit hóa bằng HCl đến pH 6. Dung môi còn lại được loại bỏ bằng máy cô hút chất không quay để thu được dịch huyền phù chứa tinh thể xanthohumol. Dịch huyền phù được lọc qua giấy lọc để thu được xanthohumol, tiếp đó xanthohumol được sấy khô trong tủ sấy ở 55°C để thu được 196 mg xanthohumol có độ tinh khiết 95,8%. Sản lượng xanthohumol thu được đạt 78% so với tổng lượng xanthohumol có trong lượng hoa bia đã sử dụng.

Thí nghiệm 5

Xanthohumol được thu hồi giống như trong thí nghiệm 4, khác biệt ở chỗ: thay vì đồng (II) clorua, đồng (II) sulfat (CuSO_4) được sử dụng ở nồng độ 10 g/l. Xanthohumol thu được có độ tinh khiết 94,8%.

Thí nghiệm 6

Xanthohumol được thu hồi giống như trong thí nghiệm 1, khác biệt ở chỗ: đồng (II) clorua được sử dụng ở nồng độ cao hơn, trong khoảng 0,022-0,044 M. Xanthohumol thu được có độ tinh khiết 96,3-97,8%.

Thí nghiệm 7

Xanthohumol được thu hồi giống như trong thí nghiệm 1, khác biệt ở chỗ: dịch chiết từ bước thứ nhất được hòa với nước theo tỉ lệ 1:1, và nồng độ CuCl_2 được sử dụng là 0,022 M. Xanthohumol thu được có độ tinh khiết 96,8%.

Thí nghiệm 8

Xanthohumol được thu hồi giống như trong thí nghiệm 1, khác biệt ở chỗ: axeton được thay thế bằng 2-propanol và nồng độ CuCl_2 được sử dụng là 0,022 M. Xanthohumol thu được có độ tinh khiết 93,8%.

Thí nghiệm so sánh 1

250 g hoa bia đã qua chiết xuất được đổ ngập bằng axeton (0,75 lít). Sau khi khuấy cơ học trong 1 giờ, sản phẩm chiết tạo thành được lọc qua giấy lọc. Dịch lọc được cô đặc để thu được xanthohumol có độ tinh khiết 32,8%.

Thí nghiệm so sánh 2

250 g hoa bia đã qua chiết xuất được đổ ngập bằng axeton (0,75 lít). Sau khi khuấy cơ học trong 1 giờ, sản phẩm chiết tạo thành được lọc qua giấy lọc. Dịch lọc thu được (0,65 lít) được rót vào nước (1,3 lít). Tiếp đó, dung dịch được bổ sung bằng dung dịch NaCl trong nước (nồng độ 30 g/l) với tỉ lệ 300 ml dung dịch NaCl trên 1 lít dịch lọc. Tiếp đó, NaOH được bổ sung để nâng pH lên khoảng 12. Kết tủa tạo thành được lọc bỏ bằng giấy lọc. Dịch lọc còn lại được axit hóa bằng HCl đến pH5 và được cô đặc bằng máy cô hút chân không quay để thu được kết tủa xanthohumol, kết tủa xanthohumol được

lọc lấy và được sấy khô trong tủ sấy (nhiệt độ 50-60°C), được tinh sạch bằng HPLC để thu được xanthohumol có độ tinh khiết 84,8%.

Thí nghiệm so sánh 3

Xanthohumol được thu hồi giống như trong thí nghiệm so sánh 2, khác biệt ở chỗ: NaCl không được sử dụng. Xanthohumol được tinh sạch bằng HPLC để thu được xanthohumol có độ tinh khiết 58%, là kết quả của sự kiềm hóa đến pH 12.

Dựa vào phần mô tả phương án thực hiện trên, có thể khẳng định chắc chắn rằng quy trình theo sáng chế cho phép thu được xanthohumol có độ tinh khiết cao nhờ các bước thực hiện rất đơn giản và có chi phí không cao. Quy trình theo sáng chế có thể được thực hiện bởi người có kỹ năng bình thường trong cùng lĩnh vực, và xanthohumol thu được nhờ quy trình theo sáng chế có thể được tinh sạch hơn nữa bằng các kỹ thuật đã biết.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất xanthohumol, trong đó bao gồm các bước sau:
 - a) trộn sản phẩm chiết chứa xanthohumol với nước;
 - b) thêm dung dịch muối kim loại chuyển tiếp vào hỗn hợp thu được;
 - c) phân tách kết tủa xanthohumol thu được và sấy khô để thu được xanthohumol có độ tinh khiết trên 90%.
2. Quy trình theo điểm 1, đặc trưng ở chỗ, trong bước b), nồng độ muối trong hỗn hợp được điều chỉnh trong khoảng từ 0,001 đến 10 M.
3. Quy trình theo điểm 2, đặc trưng ở chỗ, trong bước b), nồng độ muối trong hỗn hợp được điều chỉnh trong khoảng từ 0,001 đến 0,05 M.
4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, đặc trưng ở chỗ, sau khi muối được bổ sung trong bước b):
 - b1) dung dịch được kiểm hóa đến mức pH trên 7;
 - b2) kết tủa lần thứ nhất được lọc bỏ, và dịch lọc được axit hóa đến mức pH dưới 7;
 - b3) dịch lọc đã axit hóa được cô đặc để thu được kết tủa xanthohumol.
5. Quy trình theo điểm 4, đặc trưng ở chỗ, trong bước b1), dung dịch được kiểm hóa đến mức pH trong khoảng từ 7,5 đến 10,5.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, đặc trưng ở chỗ, sản phẩm chiết chứa xanthohumol thu được bằng cách chiết hoa bia đã qua chiết xuất, hoa bia, cây hoa bia nghiền hoặc hỗn hợp của chúng trong dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước, dung môi được sử dụng với lượng khoảng từ 0,1 đến 10 lít/kg nguyên liệu thô.
7. Quy trình theo điểm 6, đặc trưng ở chỗ, dung môi có thể trộn lẫn với nước được sử dụng là keton, rượu hoặc hỗn hợp của chúng.
8. Quy trình theo điểm 7, đặc trưng ở chỗ, dung môi có thể trộn lẫn với nước được sử dụng là axeton, metanol, etanol, propanol hoặc hỗn hợp của chúng.

9. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, đặc trưng ở chỗ, việc chiết được thực hiện ở nhiệt độ trong khoảng từ 5 đến 65°C.

10. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, đặc trưng ở chỗ, dịch chiết chứa xanthohumol được trộn với nước theo tỉ lệ trong khoảng từ 0,1 đến 5 lít nước trên 1 lít dịch chiết.

11. Quy trình theo điểm 10, đặc trưng ở chỗ, dịch chiết chứa xanthohumol được trộn với nước theo tỉ lệ trong khoảng từ 1 đến 3 lít nước trên 1 lít dịch chiết.

12. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, đặc trưng ở chỗ, trong bước b), nồng độ muối kim loại chuyển tiếp được cung cấp nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,05 M.

13. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, đặc trưng ở chỗ, muối kim loại chuyển tiếp được sử dụng là muối đồng (II) hoặc muối kẽm (II).

14. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, đặc trưng ở chỗ, muối kim loại chuyển tiếp được sử dụng là muối clorua, muối nitrat, hoặc muối sulfat.

15. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, đặc trưng ở chỗ, muối kim loại chuyển tiếp được sử dụng là muối đồng (II) clorua, đồng (II) sulfat hoặc kẽm (II) clorua hoặc kẽm (II) sulfat.