



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

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

(11)



1-0024390

(51)⁷ C07C 39/00; C07C 39/14; A61K 35/00 (13) B

(21) 1-2017-04992

(22) 11/12/2017

(45) 27/07/2020 388

(43) 26/02/2018 359A

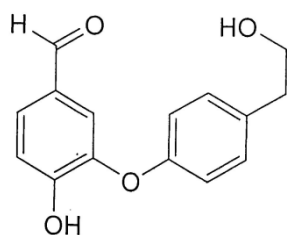
(73) SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ TỈNH HÒA BÌNH (VN)

Số 562 đường Trần Hưng Đạo, phường Phương Lâm, thành phố Hòa Bình, tỉnh Hòa Bình

(72) Đặng Đình Kim (VN); Nguyễn Tiến Đạt (VN); Lê Mai Hương (VN); Vũ Thị Nguyệt (VN); Trần Thị Hồng Hà (VN); Nguyễn Quang Dương (VN).

(54) HỢP CHẤT 4-HYDROXY-3-[4-(2-HYDROXYETYL)-PHENOXY]-
BENZALDEHYT VÀ PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT HỢP CHẤT NÀY TỪ LÁ
CÂY XẠ ĐEN EHRETIA ASPERULA ZOLL. & MOR.

(57) Sáng chế được đề cập đến hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt có công thức (I) được tách chiết từ lá cây xạ đen Ehretia asperula Zoll. & Mor. và phương pháp tách chiết hợp chất này từ lá cây xạ đen. Hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt có tác dụng chống oxy hoá, thu dọn gốc tế bào tự do và gây độc tế bào ung thư mạnh, có thể được sử dụng để làm chất chống oxy hoá, tăng cường sức khỏe, chống lão hoá và kháng ung thư.



(I)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất mới 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt được tách chiết lá cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. & Mor.. Hợp chất này có tác dụng thu dọn gốc tự do và gây độc tế bào ung thư mạnh. Vì vậy, hợp chất này có thể được sử dụng trong các dược phẩm có tác dụng chống oxi hoá, kháng ung thư. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tách chiết hợp chất này từ lá cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. & Mor.. Lĩnh vực trong đó sáng chế được ứng dụng hoặc có liên quan bao gồm Y – Dược học và Hóa sinh học.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

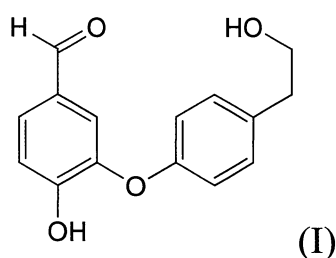
Cây xạ đen có tên khoa học là *Ehretia asperula* Zoll. & Mor., là một dược liệu được trồng tại một số địa phương ở Việt Nam. Theo kinh nghiệm dân gian, cây xạ đen có công dụng mát gan, thanh nhiệt, thanh lọc độc tố trong cơ thể, chữa dị ứng, giảm mỡ máu, trị mụn nhọt, cân bằng huyết áp, kháng viêm, kháng u. Gần đây, cây này được dư luận chú ý và được sử dụng để chữa bệnh ung thư. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng cây này chứa một số triterpen, nitril glucosit, flavonoit và axit phenolic [Phan Văn Kiệm và cộng sự, Kỷ yếu Hội nghị Khoa học và Công nghệ Hoá học hữu cơ toàn quốc lần thứ III, trang 375-379, năm 2005; Trịnh Thị Thuỷ và cộng sự, Tạp chí Hoá học, tập 45, số 2, trang 228-232, năm 2007; Nguyễn Huy Cường, Luận án Tiến sĩ Hoá học, Viện Hoá học, 2008]. GS.TSKH Lê Thế Trung (Viện Quân y 103) đã chứng minh được tác dụng ức chế sự phát triển của khối u ác tính trên động vật thực nghiệm của cây xạ đen thu hái tại Hoà Bình. Nhìn chung, các nghiên cứu về cây xạ đen vẫn còn rất hạn chế và chưa bao quát hết được các thành phần hóa học và tác dụng sinh học của dược liệu này.

Do đó, có nhu cầu về việc phân lập và xác định hoạt tính của các hợp chất trong xạ đen, nhờ thế giúp sử dụng cây xạ đen được sử dụng một cách hiệu quả hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tìm hợp chất mới, xác định hoạt tính hoạt tính thu dọn gốc tế bào tự do và gây độc tế bào ung thư. Cụ thể, mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt và phương pháp tách chiết hợp chất này từ lá cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. & Mor..

Hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt theo sáng chế có công thức cấu tạo (I) có tác dụng thu dọn gốc tự do DPPH và gây độc tế bào ung thư.



Hợp chất nêu trên thu được từ phương pháp tách chiết lá cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. & Mor, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) thu gom phần lá cây xạ đen, sau đó thái nhỏ, phơi khô dưới bóng râm và xay thành bột;

(b) ngâm chiết phần bột bằng dung môi theo tỷ lệ trọng lượng bột/thể tích dung môi nằm trong khoảng từ 1/2 đến 1/4, từ 1 đến 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 16 đến 20 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó gộp các phần dịch chiết metanol thu được và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được dạng cao cô đặc I, trong đó dung môi được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol và nước;

(c) hòa tan cao cô đặc I trong nước cất theo tỷ lệ trong khoảng 1/10 đến 1/15 (theo trọng lượng/thể tích) để thu được dung dịch IA, rồi chiết phân bố

bằng dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp theo tỷ lệ thể tích dung môi hữu cơ/dung dịch IA là 1/2 đến 1/3, từ 1 đến 5 lần, sau đó tách loại phần dung môi hữu cơ nằm bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới, trong đó dung môi hữu cơ này được chọn từ nhóm bao gồm ete dầu hỏa, *n*-hexan, xăng công nghiệp và dietyl ete;

(d) chiết phân bố phần dung dịch nước thu được ở bước (c) bằng dung môi etyl axetat theo tỷ lệ thể tích dung môi hữu cơ/dung dịch nước là 1/2 đến 1/3, từ 1 đến 5 lần, sau đó tách lấy phần dung môi nằm bên trên, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao cô đặc II;

(e) tách phân đoạn cao cô đặc II thu được ở bước (d) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha thường theo tỷ lệ trọng lượng cao cô đặc/chất hấp phụ là 1/10 đến 1/20, rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/metanol theo các tỷ lệ 100/1, 50/1, 10/1, 5/1, 1/1 và 1/100; thu gom phân đoạn được rửa giải từ hệ dung môi điclorometan/metanol ở tỷ lệ 50/1 rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao cô đặc III;

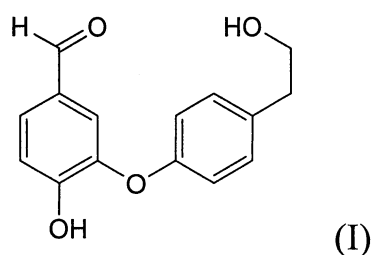
(f) tách phân đoạn cao cô đặc III thu được ở bước (e) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha thường theo tỷ lệ khối lượng cao cô đặc/chất hấp phụ là 1/30 đến 1/50, rửa giải bằng hệ dung môi hexan/điclorometan/metanol theo tỷ lệ thể tích là 5/15/1, tiếp đó tiến hành sắc ký lớp mỏng silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải điclorometan/metanol có tỷ lệ thể tích là 10/1, thu gom các phân đoạn có vết chất ở khoảng $R_f=0,42$, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao cô đặc IV;

(g) tách phân đoạn cao cô đặc IV thu được ở bước (f) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha thường theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/50 đến 1/70 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/metanol theo tỷ lệ 5/1 (theo thể tích), tiến hành sắc ký lớp mỏng silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải điclorometan/metanol có tỷ lệ thể tích là 10/1, thu gom các phân đoạn có vết chất ở khoảng $R_f=0,42$, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao cô đặc V; và

(h) tinh chế cao cô đặc V thu được ở bước (g) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha đảo theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/50 đến 1/70 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi metanol/nước theo tỷ lệ thể tích là 1/2, cuối cùng cất loại dung môi để thu được hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt dưới dạng chất bột màu trắng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt thu được từ lá cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. & Mor. có công thức cấu tạo (I):



Hợp chất (I) có các tính chất như sau:

- Dạng bột màu trắng;
- Công thức phân tử: $C_{15}H_{14}O_4$;
- Trọng lượng phân tử 258 g/mol.

Phương pháp tách chiết hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt thu được từ lá cây xạ đen gồm các bước được mô tả dưới đây.

Phần lá cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. & Mor. được thu gom, sơ chế loại tạp chất, phơi khô trong bóng râm và xay thành bột. Việc xay thành bột nhằm tạo thuận lợi cho quá trình ngâm chiết, vì vậy, nó không bị hạn chế bởi kích thước bột, miễn sao quá trình ngâm chiết diễn ra thuận lợi và hiệu quả.

Tiến hành ngâm chiết phần bột này bằng dung môi theo tỷ lệ từ 1/2 đến 1/6 (theo trọng lượng bột/thể tích dung môi) từ 1 đến 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 16 đến 20 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung môi thường được sử dụng là metanol, etanol hoặc nước. Sau đó, gộp các phần dịch chiết thu được và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được dạng cao cô đặc I.

Cao cô đặc I được hoà trong nước cất theo tỷ lệ trong khoảng 1/10 đến 1/15 (theo trọng lượng/thể tích) để thu được dung dịch IA, rồi chiết phân bố bằng dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp, không tan hoặc ít tan trong nước theo tỷ lệ thể tích dung môi hữu cơ/thể tích dung dịch IA là 1/2 đến 1/3 từ 1 đến 5 lần. Dung môi thường được sử dụng là ete dầu hỏa, *n*-hexan, xăng công nghiệp và dietyl ete. Sau đó, tách bỏ phần dung môi nằm phía bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm phía bên dưới.

Tiến hành chiết phân bố phần dung dịch nước thu được ở bước trên bằng dung môi etyl axetat theo tỷ lệ thể tích dung môi hữu cơ/thể tích dịch nước là 1/2 đến 1/3 từ 1 đến 5 lần, tách phần dung môi nằm bên trên, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao cô đặc II.

Tiến hành tách phân đoạn cao cô đặc II thu được trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha thường cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm , theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/10 đến 1/20 (theo khối lượng). Cột nhồi có đường kính trong là 10 cm. Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol theo các tỷ lệ 100/1, 50/1, 10/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 (theo thể tích), sau đó thu gom phân đoạn được rửa giải từ hệ dung môi diclometan/metanol tỷ lệ 50/1, rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao cô đặc III.

Cao cô đặc III thu được ở trên tiếp tục được tách phân đoạn trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha thường với cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm , theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/30 đến 1/50 (theo khối lượng). Cột nhồi có đường kính trong là 2,0 cm, rửa giải bằng hệ dung môi hexan/diclometan/metanol theo tỷ lệ 5/15/1 (theo thể tích). Dựa trên sắc ký lớp mỏng silica gel pha thường với hệ dung môi diclometan-metanol 10/1 (theo thể tích), thu gom các phân đoạn có vết chất ở khoảng $R_f=0,42$, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao cô đặc IV.

Cao cô đặc IV thu được ở trên tiếp tục được tách phân đoạn trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha thường với cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm , theo tỷ lệ cao cô đặc/chất hấp phụ là 1/50 đến 1/70 (theo khối lượng). Cột nhồi

có đường kính trong là 1,5 cm, rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol theo tỷ lệ 5/1 (theo thể tích). Sử dụng sắc ký lớp mỏng silica gel pha thường với hệ dung môi diclometan-metanol 10/1 (theo thể tích), thu gom các phân đoạn có vết chất ở khoảng $R_f=0,42$, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao cô đặc V.

Bước cuối cùng là tinh chế cao cô đặc V thu được trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha đảo. Tốt hơn nếu bước tinh chế này được thực hiện trên cột sắc ký C18 với cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm , đường kính trong là 1,5cm, có bán sẵn trên thị trường, theo tỷ lệ cao cô đặc/chất hấp phụ là 1/50 đến 1/70 (theo khối lượng). Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi metanol/nước theo tỷ lệ 1/2 (theo thể tích), cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được hợp chất sạch 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt dưới dạng chất bột màu trắng.

Thiết bị được dùng để cất loại dung môi dưới áp suất giảm là thiết bị cất quay thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp sắc ký cột và sắc ký lớp mỏng sử dụng các vật liệu hấp phụ silicagel pha thường và pha đảo C18, các dung môi hữu cơ phổ biến đều đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phương pháp tách chiết hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt theo sáng chế từ lá cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. & Mor. cho phép tách chiết được hợp chất này một cách tinh khiết từ hỗn hợp nhiều hợp chất có trong mẫu lá cây xạ đen. Hoạt chất đã được thử nghiệm và cho thấy tác dụng thu dọn gốc tự do và gây độc tế bào ung thư mạnh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được giải thích tiếp bằng các ví dụ và phương án minh họa sau. Tuy nhiên các ví dụ này không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các cải biến sẽ dễ dàng thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và chúng sẽ nằm trong phạm vi ý tưởng của sáng chế và của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Tách chiết hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt

Phần lá cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. & Mor được sơ chế loại tạp chất, phơi khô dưới bóng râm và xay thành bột. Ngâm chiết 5 kg bột này bằng 20 lít dung môi metanol thực hiện lặp lại 3 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 20 giờ ở nhiệt độ phòng, sau khi gộp các phần dịch chiết metanol, cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được 320 g dạng cao cô đặc I;

Hòa tan cao cô đặc I trong 3,5 lít nước cất, rồi chiết phân bố bằng 1,5 lít dung môi *n*-hexan 3 lần, sau đó tách loại phần dung môi hexan nằm bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới và tiếp tục chiết phân bố bằng dung môi etyl axetat 3 lần, mỗi lần chiết với 1,5 lít. Sau khi tách lớp dung môi etyl axetat nằm bên trên, gộp chúng lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được 34,4 g cao cô đặc II;

Tách phân đoạn cao cô đặc II thu được trên cột sắc ký với 500g chất hấp phụ silicagel pha thường cỡ hạt khoảng 40 μm , cột nhồi có đường kính trong 10 cm. Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol theo các tỷ lệ 100/1, 50/1, 10/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 (theo thể tích), sau đó thu gom phân đoạn được rửa giải từ hệ dung môi diclometan/metanol ở tỷ lệ 50/1, cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được 1,6 g cao cô đặc III;

Tách phân đoạn cao cô đặc III trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha thường (80 g) với cỡ hạt nằm khoảng 40 μm , cột nhồi có đường kính trong là 2 cm. Rửa giải bằng hệ dung môi hexan/diclometan/metanol theo tỷ lệ thể tích là 5/15/1. Dựa trên sắc ký lớp mỏng silica gel pha thường với hệ dung môi diclometan/metanol có tỷ lệ thể tích 10/1, thu gom các phân đoạn có vết chất ở khoảng $R_f=0,42$, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 488 mg cao cô đặc IV;

Cao cô đặc IV thu được ở trên tiếp tục được tách phân đoạn trên cột sắc ký với 30 g chất hấp phụ silicagel pha thường với cỡ hạt nằm trong khoảng 40 μm . Cột nhồi có đường kính trong là 1,5 cm. Thực hiện rửa giải bằng hệ dung môi

diclometan/metanol theo tỷ lệ thể tích là 5/1. Dựa trên sắc ký lớp mỏng silicagel pha thường với hệ dung môi rửa giải là diclometan/metanol có tỷ lệ thể tích 1/1, thu gom các phân đoạn có vết chất ở khoảng $R_f=0,42$, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 98 mg cao cô đặc V;

Tinh chế cao cô đặc V trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha đảo C18 (5g) với kích thước hạt khoảng 40 μm , cột nhồi có đường kính trong là 1,0 cm. Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi metanol/nước theo tỷ lệ thể tích là 1/2, sau đó cất loại dung môi để thu được 7,1 mg hợp chất sạch 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt dưới dạng chất bột màu trắng.

Cấu trúc hóa học của 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt (I) được xác định bằng các số liệu phổ trọng lượng và phổ cộng hưởng từ hạt nhân như sau:

- Phổ trọng lượng HR-ESI-MS m/z : 259,0975 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- Phổ ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 9,71; 7,33; 7,31; 7,15; 7,03; 6,83; 3,70; 2,73.
- Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): δ_{C} 193,0; 158,5; 151,7; 147,2; 133,6; 131,1; 131,0; 128,8; 119,4; 118,2; 116,1; 64,5; 39,4.

Ví dụ 2: Thử nghiệm tác dụng thu dọn gốc tự do DPPH

Tác dụng thu dọn gốc tự do được đánh giá qua việc thu dọn gốc tự do điển hình 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) là phương pháp đã được công nhận để xác định nhanh hoạt tính chống oxy hóa. DPPH được pha trong etanol 96% thành dung dịch có nồng độ 150 μM . Hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt được pha trong dung môi dimetyl sulfoxit (DMSO) thành dãy các dung dịch có nồng độ 2000, 600, 200, 60, và 20 $\mu\text{g/ml}$. Tiếp đó, 10 μl mẫu pha trong DMSO (dimetyl sulfoxit) được cho vào các giếng của phiên 96 giếng chứa 190 μl dung dịch DPPH. Sau 30 phút ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng, độ hấp thụ của các dung dịch phản ứng được đo trên thiết bị đọc phiên vi lượng ở bước sóng 517nm. Hoạt chất axit ascorbic (vitamin C) được sử dụng làm

đối chứng dương. Kết quả hoạt tính được thể hiện qua giá trị tác dụng thu dọn bán phân (SC_{50}).

Kết quả được chỉ ra trong bảng sau:

Nồng độ chất thử	SC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
4-Hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt	12,7
Axit ascorbic (vitamin C)	20,6

Kết quả này cho thấy hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt tách được từ lá cây xạ đen có tác dụng chống oxy hoá mạnh hơn vitamin C.

Ví dụ 3: Thử nghiệm tác dụng gây độc tế bào ung thư

Tế bào ung thư gan HepG2, ung thư phổi LU-1, ung thư vú MCF-7 và ung thư cổ tử cung HeLa được nuôi giữ trong môi trường DMEM[®] mua từ Wako pure chemicals Ind., Ltd., Osaka, Japan ở tủ ấm 37°C, 5% CO₂, có bổ sung 10% huyết thanh bê BCS, penicillin (100 đơn vị/ml) và streptomycin sulfat (100 $\mu\text{g/ml}$). Sau đó chúng được cấy chuyển vào phiên 96 giếng với mật độ 2×10^5 tế bào/198 μl /giếng và ủ trong 4 giờ. Hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt được pha trong dung môi dimetyl sulfoxit (DMSO) thành dãy các dung dịch có nồng độ 3000, 1000, 300, 100 và 30 $\mu\text{g/ml}$.

Tiếp đó, 2 μl dung dịch mẫu này được cho vào các giếng của phiên 96 giếng chứa tế bào ung thư đã chuẩn bị ở trên. Sau khi tiếp tục ủ trong 72 giờ, các tế bào được cố định bằng axit tricloaxetic và nhuộm với sulforhodamin B trong 1 giờ. Hút cạn môi trường nuôi cấy, rửa tế bào bằng axit axetic 5% rồi thêm vào 100 μl dung dịch Tris base 10 mM (nhãn hiệu đã đăng ký) và lắc nhẹ trong 10 phút. Độ hấp thụ của các dung dịch phản ứng được đo trên thiết bị đọc phiên vi

lượng ở bước sóng 515nm. Kết quả hoạt tính được thể hiện qua giá trị ức chế bán phần (IC_{50}).

Kết quả được chỉ ra trong bảng sau:

Chất thử	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			
	HepG2	LU-1	MCF-7	HeLa
4-Hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt	1,84	2,20	1,68	2,64
Cao chiết bột lá xạ đen trong metanol (Cao cô đặc I)	77,36	(không xác định được)	9,98	75,28

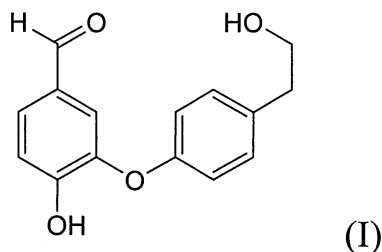
Kết quả này cho thấy hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt tách được từ lá cây xạ đen có tác dụng gây độc tế bào ung thư mạnh và mạnh hơn so với cao chiết metanol từ lá cây xạ đen vốn chứa nhiều thành phần hoá học khác nhau.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đã đề xuất thành công phương pháp tách chiết hợp chất mới từ lá cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. & Mor.. Hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt theo sáng chế có tác dụng diệt, thu dọn gốc tự do mạnh, có thể được sử dụng để làm chất chống oxy hoá, tăng cường sức khoẻ, chống lão hoá. Ngoài ra hợp chất này còn có tác dụng gây độc tế bào ung thư mạnh trên các dòng tế bào ung thư gan, phổi, vú và cổ tử cung nên có thể được sử dụng trong điều trị ung thư. Sáng chế này tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng phòng và điều trị một số bệnh theo hướng chống oxy hoá và kháng ung thư dựa trên việc khai thác bền vững nguồn dược liệu quý, sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt được tách chiết từ lá cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. & Mor. có công thức (I):



2. Phương pháp tách chiết hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt từ lá cây xạ đen *Ehretia asperula* Zoll. & Mor., phương pháp này bao gồm các bước:

(a) thu gom phần lá cây xạ đen, sau đó thái nhỏ, phơi khô dưới bóng râm và xay thành bột;

(b) ngâm chiết phần bột bằng dung môi theo tỷ lệ trọng lượng bột/thể tích dung môi nằm trong khoảng từ 1/2 đến 1/4, từ 1 đến 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 16 đến 20 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó gộp các phần dịch chiết metanol thu được và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được dạng cao cô đặc I, trong đó dung môi được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol và nước;

(c) hòa tan cao cô đặc I trong nước cất theo tỷ lệ trong khoảng 1/10 đến 1/15 (theo trọng lượng/thể tích) để thu được dung dịch IA, rồi chiết phân bố bằng dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp theo tỷ lệ thể tích dung môi hữu cơ/dung dịch IA là 1/2 đến 1/3, từ 1 đến 5 lần, sau đó tách loại phần dung môi hữu cơ nằm bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới, trong đó dung môi hữu cơ này được chọn từ nhóm bao gồm ete dầu hỏa, *n*-hexan, xăng công nghiệp và dietyl ete;

(d) chiết phân bố phần dung dịch nước thu được ở bước (c) bằng dung môi etyl axetat theo tỷ lệ thể tích dung môi hữu cơ/dung dịch nước là 1/2 đến 1/3, từ

1 đến 5 lần, sau đó tách lấy phần dung môi nằm bên trên, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao cô đặc II;

(e) tách phân đoạn cao cô đặc II thu được ở bước (d) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha thường theo tỷ lệ trọng lượng cao cô đặc/chất hấp phụ là 1/10 đến 1/20, rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol theo các tỷ lệ 100/1, 50/1, 10/1, 5/1, 1/1 và 1/100; thu gom phân đoạn được rửa giải từ hệ dung môi diclometan/metanol ở tỷ lệ 50/1 rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao cô đặc III;

(f) tách phân đoạn cao cô đặc III thu được ở bước (e) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha thường theo tỷ lệ khối lượng cao cô đặc/chất hấp phụ là 1/30 đến 1/50, rửa giải bằng hệ dung môi hexan/diclometan/metanol theo tỷ lệ thể tích là 5/15/1, tiếp đó tiến hành sắc ký lớp mỏng silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải diclometan/metanol có tỷ lệ thể tích là 10/1, thu gom các phân đoạn có vết chất ở khoảng $R_f=0,42$, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao cô đặc IV;

(g) tách phân đoạn cao cô đặc IV thu được ở bước (f) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha thường theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/50 đến 1/70 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol theo tỷ lệ 5/1 (theo thể tích), tiến hành sắc ký lớp mỏng silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải diclometan/metanol có tỷ lệ thể tích là 10/1, thu gom các phân đoạn có vết chất ở khoảng $R_f=0,42$, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao cô đặc V; và

(h) tinh chế cao cô đặc V thu được ở bước (g) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silicagel pha đảo theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/50 đến 1/70 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi metanol/nước theo tỷ lệ thể tích là 1/2, cuối cùng cất loại dung môi để thu được hợp chất 4-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyetyl)-phenoxy]-benzaldehyt dưới dạng chất bột màu trắng.