



(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)



2-0002918

(51) **C07D 311/02; A61K 36/48**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00284

(22) 23/06/2020

(45) 25/06/2022 411

(43) 25/08/2020 389AHI

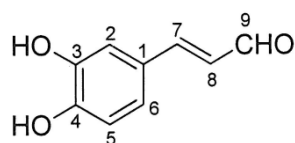
(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC PHENIKAA (VN)**

Phường Yên Nghĩa, Quận Hà Đông, Thành Phố Hà Nội

(72) Tô Đạo Cường (VN); Nguyễn Phi Hùng (VN); Trần Mạnh Hùng (VN); Dương Anh Tuấn (VN).

(54) **QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ HỢP CHẤT CAFOYL ALDEHYT CÓ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM TỪ CÂY TIÊU LÁ MỎNG (PIPER HYMENOPHYLLUM MIQ.)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế hợp chất cafeoyl aldehyt có tác dụng điều trị viêm từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq.). Quy trình theo giải pháp bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng; c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất cafeoyl aldehyt; d) thu hợp chất cafeoyl aldehyt thô; và e) tinh chế hợp chất cafeoyl aldehyt. Quy trình theo giải pháp thu được hợp chất cafeoyl aldehyt có công thức (1). Hợp chất cafeoyl aldehyt thu được từ quy trình theo giải pháp có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế mạnh sự sản sinh NO.



(1)

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 cafeoyl aldehyt từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq.). Hợp chất cafeoyl aldehyt 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

Các bệnh viêm là nguyên nhân hàng đầu gây ra bệnh ung thư, tim mạch, Alzheimer, tiểu đường typ II, xương khớp, tự miễn dịch, thần kinh, các bệnh về phổi. Tỷ lệ nhiễm, mức độ nghiêm trọng và sự phức tạp của các bệnh này đang gia tăng nhanh chóng, từ đó làm tăng đáng kể gánh nặng chi phí về chăm sóc sức khỏe.

Có nhiều phương pháp để điều trị viêm và một trong những phương pháp hay được sử dụng phổ biến hiện nay là sử dụng thuốc. Các loại thuốc phổ biến nhất hiện nay được sử dụng để điều trị các bệnh viêm là các lớp thuốc corticosteroid, các lớp chất kháng histamin, các lớp chất không steroid, decongestant, chất kháng cholinergic, chất ổn định tế bào Mast, v.v. (xem tài liệu của C. A. Kontogiorgis và D. J. Hadjipavlou-Litina, “Non Steroidal Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents”, *Current Medicinal Chemistry*, 2002, 9, 89–98). Ngoài ra, các thuốc thay thế như thuốc kháng viêm/dị ứng không steroid (Non-steroidal alternative inflammatory drugs - NSAID) có nguồn gốc tổng hợp như clorpheniramin, cetirizin, levocetirizin, diclofenac, acuvall, bromfenac, nevanac, v.v. (xem tài liệu của W. Xiao, O. A. Oreoluwa, M. M. Heidi, “Pulmonary and Nasal Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Inhalation Aerosol Delivery Systems”, *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 2011, 10, 215–229) tuy đã thành công về mặt thương mại nhưng có tác dụng phụ như rối loạn tim mạch, xuất huyết dạ dày và rối loạn hô hấp.

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 đã được quan tâm và đầu tư nghiên cứu. Đối với cây Tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq.), các tác

giả đã phát hiện ra tác dụng điều trị bệnh Alzheimer tốt thông qua ức chế mạnh enzym cholinesteraza của các hợp chất phân lập được (H. V. Dung, T. D. Cuong, N. M. Chinh, D. Quyen, J. S. Byeon, J. A. Kim, M. H. Woo, J. S. Choi, and B. S. Min. Cholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Piper hymenophyllum*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2014, 35, 655–658). Muốn điều trị tận gốc bệnh Alzheimer thì trước tiên phải điều trị các bệnh viêm. Bởi vì các bệnh viêm là nguyên nhân hàng đầu gây ra bệnh ung thư, tim mạch, tiểu đường typ II, xương khớp, tự miễn dịch, thần kinh, các bệnh về phổi và Alzheimer. Tuy nhiên, tác dụng kháng viêm thông qua ức chế sự sản sinh nitric oxide (NO) của các cao chiết và các hợp chất, đặc biệt là hợp chất cafeoyl aldehyt có mặt trong cây Tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq.) lại chưa được nghiên cứu.

Hợp chất cafeoyl aldehyt được phân lập từ cây Tiêu lá mỏng ban đầu sử dụng cao chiết tổng, chiết phân đoạn, sau đó sử dụng cột sắc ký được nhồi hạt silica gel pha thuận kết hợp dung môi để tách thành các phân đoạn nhỏ và cuối cùng sử dụng hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để thu được hợp chất này (H. V. Dung, T. D. Cuong, N. M. Chinh, D. Quyen, J. S. Byeon, J. A. Kim, M. H. Woo, J. S. Choi, and B. S. Min. Cholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Piper hymenophyllum*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2014, 35, 655-658). Ưu điểm của phương pháp này là sử dụng HPLC để tách lấy hợp chất cafeoyl aldehyt có độ tinh sạch cao. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp chiết này là các tác giả vẫn chưa tìm ra hệ dung môi thích hợp để rút ngắn quá trình tách, dung môi sử dụng trong HPLC lại đắt và thời gian tách bằng HPLC lâu vì phải lặp lại quá trình tách nhiều lần, và đặc biệt thu được hợp chất cafeoyl aldehyt có khối lượng thấp hơn nhiều so với khối lượng thật của hợp chất này trong cao chiết phân đoạn tổng do bị hao hụt trong quá trình sử dụng nhiều công đoạn để tách hợp chất thô này. Do đó, giải pháp sau đây đưa ra quy trình phân lập và tinh chế hợp chất cafeoyl aldehyt có hiệu suất và độ tinh khiết cao hơn định hướng theo phương pháp dẫn đường sinh học từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq.) khi sử dụng hệ dung môi hợp lý hơn để rút ngắn thời gian và công đoạn tách dù chỉ sử dụng các dung môi thông thường. Dựa vào kết quả sàng lọc hoạt tính kháng viêm, cao chiết etyl axetat được lựa chọn để tách, tinh chế hợp chất này có hoạt tính sinh học, cụ thể là có tác dụng điều trị viêm (thông qua ức chế sự sản sinh oxit nitric - NO).

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế hợp chất cafeoyl aldehyt từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq.) có tác dụng điều trị viêm và hợp chất cafeoyl aldehyt thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề xuất quy trình phân lập và tinh chế hợp chất cafeoyl aldehyt có tác dụng ức chế sự sản sinh NO từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq.), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

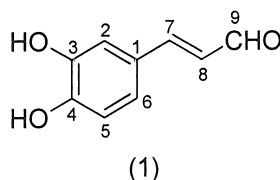
a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu phần trên mặt đất của cây Tiêu lá mỏng, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch và sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,2 mm thu được nguyên liệu bột cây Tiêu lá mỏng;

b) chiết nguyên liệu bằng cách chiết nguyên liệu bột cây Tiêu lá mỏng với metanol theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện hồi lưu, thời gian chiết từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 đến 65°C, sau khi thu dịch chiết, loại dung môi thu cao chiết metanol (PHM), sau đó hòa tan trong nước nóng theo tỷ lệ 1/1 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu âm thu được hỗn hợp chiết dạng lỏng (PHW);

c) chiết loại tạp chất bằng cách bổ sung *n*-hexan vào hỗn hợp chiết PHW thu được ở bước b) theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), khuấy và lắc đều trong 30 phút, sau đó để lắng trong vòng 1 giờ để thu phân đoạn nước, sau đó phân đoạn nước được bổ sung clorofom theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sau khi khuấy để chiết phân đoạn trong 30 phút, phần dịch được để lắng trong vòng 1 giờ để thu phân đoạn nước, sau đó phân đoạn nước tiếp tục được bổ sung etyl axetat theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sau khi khuấy để chiết phân đoạn trong 30 phút, phần dịch được để lắng trong vòng 1 giờ rồi thu phân đoạn etyl axetat, sau khi cất loại dung môi thu được phần cao chiết etyl axetat (PHE);

d) thu phân đoạn chứa hợp chất cafeoyl aldehyt bằng cách nhồi phần cao chiết etyl axetat (PHE) thu được ở bước c) 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 100/1, 50/1, 20/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/axeton tỷ lệ 20/1 và có kí hiệu PHE-3;

e) thu hợp chất cafeoyl aldehyt bằng cách nhồi phân đoạn có kí hiệu PHE-3 thu được ở bước d) lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là axetonitril/nước (lần lượt theo tỷ lệ 1/2 và 1/1, thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất cafeoyl aldehyt dạng rắn, màu trắng và có công thức (1) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết bằng 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 cafeoyl aldehyt thô là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ axeton tăng dần từ 0 đến 100%.

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

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất cafeoyl aldehyt 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 cafeoyl aldehyt có tác dụng điều trị viêm từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq.) và hợp chất cafeoyl aldehyt 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 cafeoyl aldehyt có tác dụng điều trị viêm từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq.), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng; c) thu các cao chiết và phân đoạn

chứa hợp chất cafeoyl aldehyt; d) chiết hợp chất cafeoyl aldehyt; e) thu hợp chất cafeoyl aldehyt thô; và f) tinh chế hợp chất cafeoyl aldehyt.

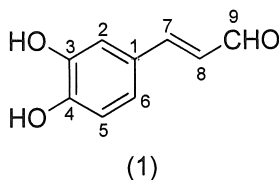
Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, thu phần trên mặt đất của cây Tiêu lá mỏng, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch, sau đó sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C và xay nhỏ (đến kích thước 0,2 mm) thu được nguyên liệu bột cây Tiêu lá mỏng.

Trong bước chiết nguyên liệu bột cây Tiêu lá mỏng, tiến hành chiết ba lần phần bột thu được ở trên bằng metanol theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện hồi lưu với thời gian chiết từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 đến 65°C. Sau khi thu dịch chiết, loại dung môi dưới áp suất giảm thu cao chiết metanol (PHM), sau đó hòa tan cao chiết PHM vào nước nóng theo tỉ lệ 1/1 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu và thu được hỗn hợp chiết dạng lỏng (PHW).

Trong bước chiết loại tạp chất và thu cao chiết etyl axetat, bổ sung *n*-hexan vào hỗn hợp chiết PHW thu được ở bước trên theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), khuấy và lắc đều trong 30 phút, sau đó để lắng trong vòng 1 giờ để thu phân đoạn nước, sau đó phân đoạn nước được bổ sung clorofom theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sau khi khuấy để chiết phân đoạn trong 30 phút, phần dịch được để lắng trong vòng 1 giờ rồi thu phân đoạn nước, sau đó phân đoạn nước được bổ sung etyl axetat theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sau khi khuấy để chiết phân đoạn trong 30 phút, phần dịch được để lắng trong vòng 1 giờ rồi thu phân đoạn etyl axetat, sau khi cất loại dung môi thu được phần cao chiết etyl axetat (PHE). Bước chiết loại tạp chất bằng *n*-hexan, clorofom và bước chiết bằng etyl axetat được thực hiện 3 lần.

Trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất cafeoyl aldehyt, đưa cao chiết PHE thu được ở bước trên 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 100/1, 50/1, 20/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/axeton tỷ lệ 20/1 và có kí hiệu PHE-3.

Trong bước thu hợp chất cafeoyl aldehyt, đưa phân đoạn có kí hiệu có kí hiệu PHE-3 thu được ở bước trên lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là axetonitril/nước (lần lượt theo tỷ lệ 1/2 và 1/1, thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất cafeoyl aldehyt dạng rắn, màu trắng và có công thức (1) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó hệ dung môi rửa giải trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất cafeoyl aldehyt thô là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ axeton tăng dần từ 0 đến 100%.

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

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất cafeoyl aldehyt thu được bằng quy trình theo giải pháp, trong đó hợp chất cafeoyl aldehyt 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 cafeoyl aldehyt từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng (Piper hymenophyllum Miq.).

Thu phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ 60°C đến khối lượng không đổi sau đó nghiền nhỏ thành bột (có kích thước 0,2mm) và thu được 15kg bột. Phần bột này được chiết ba lần bằng metanol (3 x 75,0L) trong điều kiện hồi lưu với thời gian chiết là 50 phút ở nhiệt độ 60°C, sau khi cô quay loại bỏ dung môi thu được cao metanol (PHM; 1,5kg). Cao chiết PHM được hòa tan vào 1,5L nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết PHM thu được hỗn hợp dạng lỏng. Bổ sung 4,5L *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, loại bỏ phần tan trong *n*-hexan và thu phân đoạn nước (PHW; 2,0L). Bổ sung 6,0L clorofom vào phân đoạn PHW, sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, để lắng trong vòng 1 giờ, loại bỏ phần tan trong clorofom và thu phân đoạn nước (PHW; 1,8L). Bổ sung 5,4L etyl axetat vào phân đoạn PHW, sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phân đoạn etyl axetat và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etyl axetat (PHE, 19,3g). Cao chiết PHE (19,3g) được đưa

lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là diclometan/axeton theo tỷ lệ 100/1, 50/1 và 20/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclometan/axeton là 20/1 và có kí hiệu là PHE-3 (530mg). Hòa tan phân đoạn có kí hiệu PHE-3 (530mg) lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 (có kích cỡ hạt 40 đến 63 μ m) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là axetonitril/nước (lần lượt theo tỷ lệ 1/2 và 1/1, thể tích/thể tích) thu được hợp chất có tên là cafeoyl aldehyt (80,2mg) có công thức (1) dạng rắn, màu trắng.

Ví dụ 2: Định tính và định lượng hợp chất cafeoyl aldehyt được phân lập và tinh chế từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng.

Hợp chất dạng rắn, màu trắng 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 cafeoyl aldehyt có công thức (1)

- Tên theo IUPAC: (E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylaldehyt.

- Mô tả: Chất dạng rắn, màu trắng, 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 F₂₅₄S (Merck), dung môi triển khai là metanol/nước = 1/1 (v/v); $R_f = 0,40$.

- CTPT: C₉H₈O₃ (M=164).

- Phổ khối phân giải cao HREIMS m/z 164.0473 [M]⁺.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, Metanol-*d*₄) δ_H (ppm): 7,10 (1H, s, H-2); 7,03 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5); 6,81 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6); 7,51 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-7); 6,54 (1H, dd, $J = 8,0; 15,6$ Hz, H-8); 9,54 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-9); ¹³C-NMR (100 MHz, Metanol-*d*₄) δ_C (ppm): 127,7 (C-1); 115,7 (C-2); 150,8 (C-3); 156,5 (C-4); 116,7 (C-5); 124,1 (C-6); 147,1 (C-7); 126,1 (C-8); 196,3 (C-9).

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 cafeoyl aldehyt.

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất cafeoyl aldehyt phân lập từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng (Piper hymenophyllum Miq.) 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 qua trong đĩa 96 giếng để thực hiện thí nghiệm với các thay đổi về nồng độ 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 550 nm.

+ Phương pháp xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất cafeoyl aldehyt phân lập từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq.).

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 cafeoyl aldehyt (hoặc đối chứng dương - Celastrol) 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 cafeoyl aldehyt phân lập từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng.

Hợp chất	IC ₅₀ (μ M)
Cafeoyl aldehyt	9,3 $\pm$ 1,2
Celastrol	1,0 $\pm$ 0,1

Tác dụng ức chế sự sản sinh NO của hợp chất cafeoyl aldehyt được thể hiện ở bảng 1. Hợp chất cafeoyl aldehyt có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO với giá trị IC₅₀ = 9,3 $\pm$ 1,2 (μ M). Với tác dụng ức mạnh sự sản sinh NO, hợp chất cafeoyl aldehyt rất tiềm năng trong điều trị viêm, từ đó định hướng hợp chất cafeoyl aldehyt 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 cafeoyl aldehyt với độ tinh khiết > 95% với hiệu suất chiết cao và có tác dụng điều trị viêm, trên cơ sở ức chế mạnh sự sản sinh NO từ phần trên mặt đất cây Tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq.). Bằng cách sử dụng sắc ký cột và điều chỉnh hệ dung môi tối ưu, quy trình cho phép chiết được hoạt chất với hai lần chiết duy nhất mà lại thu được hiệu suất chiết cao, 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 cafeoyl aldehyt thu được từ quy trình theo giải pháp đã được chứng minh có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế mạnh sự sản sinh NO. Bằng cách sử dụng sắc ký cột kết hợp với hệ dung môi tối ưu, quy trình theo giải pháp cho phép thu được hoạt chất cafeoyl aldehyt có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO. Hợp chất cafeoyl aldehyt 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 cafeoyl aldehyt có tác dụng kháng viêm từ cây Tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum* Miq.), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu phần trên mặt đất của cây Tiêu lá mỏng, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ và sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,2mm thu được nguyên liệu bột cây Tiêu lá mỏng;

b) chiết nguyên liệu bằng cách chiết nguyên liệu bột cây Tiêu lá mỏng với metanol theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện hồi lưu, thời gian chiết từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 đến 65°C, sau khi thu dịch chiết, loại dung môi, hòa tan trong nước nóng theo tỉ lệ 1/1 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu âm thu được hỗn hợp chiết dạng lỏng;

c) chiết loại tạp chất bằng cách bổ sung *n*-hexan vào hỗn hợp chiết theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), khuấy và lắc đều trong 30 phút, để lắng trong vòng 1 giờ thu phần đoạn nước, sau đó phần đoạn nước được bổ sung clorofom theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), khuấy và lắc đều trong 30 phút, để lắng trong vòng 1 giờ thu phần đoạn nước, sau đó phần đoạn nước tiếp tục được bổ sung etyl axetat theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sau khi khuấy để chiết phần đoạn trong 30 phút, phần dịch được để lắng trong vòng 1 giờ thu phần đoạn etyl axetat, sau khi cất loại dung môi thu được phần cao chiết etyl axetat;

d) thu phần đoạn chứa hợp chất cafeoyl aldehyt bằng cách nhồi phần cao chiết etyl axetat thu được ở bước c) 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 100/1, 50/1 và 20/1 (thể tích/thể tích) thu phần đoạn diclometan/axeton tỷ lệ là 20/1; và

e) thu hợp chất cafeoyl aldehyt bằng cách nhồi phần đoạn diclometan/axeton tỷ lệ là 20/1 thu được ở bước d) lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 có kích cỡ hạt 40 đến 63µm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là axetonitril/nước theo tỷ lệ 1/2 và 1/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất cafeoyl aldehyt dạng rắn, màu trắng và có công thức (1):

