



(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)



2-0002974

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

(13) **Y**

(21) 2-2020-00238

(22) 28/05/2020

(45) 25/08/2022 413

(43) 27/07/2020 388AHI

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC PHENIKAA (VN)**

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

(72) **Tô Đạo Cường (VN); Hoàng Việt Dũng (VN); Nguyễn Phi Hùng (VN); Trần Mạnh Hùng (VN); Nguyễn Hữu Tùng (VN); Dương Anh Tuấn (VN).**

(54) **QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ TÍNH CHẾ HỢP CHẤT (-)-(6AR,7R)-N-AXETYLNORUSHINSUNIN CÓ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM TỪ CÂY TIÊU LÁ MỎNG (PIPER HYMENOPHYLLUM)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tính chế hợp chất (-)-(6aR,7R)-N-axetylnorushinsunin có tác dụng điều trị viêm từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*). 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 (-)-(6aR,7R)-N-axetylnorushinsunin; d) chiết hợp chất (-)-(6aR,7R)-N-axetylnorushinsunin; e) thu (-)-(6aR,7R)-N-axetylnorushinsunin thô; và f) tính chế hợp chất (-)-(6aR,7R)-N-axetylnorushinsunin. Quy trình theo giải pháp thu được hợp chất (-)-(6aR,7R)-N-axetylnorushinsunin có công thức (1). Hợp chất (-)-(6aR,7R)-N-axetylnorushinsunin 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 $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*). Hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin 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 antihistamin, các lớp chất không steroid, thuốc làm thông mũi (decongestants), tác nhân kháng cholinergic, Mast cell stabilizer, v/v. (C. A. Kontogiorgis and 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 clopheniramin, cetirizin, levocetirizin, diclofenac, acuvall, bromfenac, nevanac, v/v. (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). Các loại thuốc này 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*), 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 oxit (NO) của các cao chiết và các hợp chất, đặc biệt là các hợp chất alkaloit (có khung aporphin) có mặt trong cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) lại chưa được nghiên cứu.

Các hợp chất alkaloit có khung aporphin tạo thành lõi của một nhóm các alcaloit quinolin. Nó có thể tồn tại ở một trong hai dạng đồng phân đối quang, (*R*)-aporphin và (*S*)-aporphin. Nhiều dẫn xuất có khung aporphin đã được phân lập từ một số loài thực vật, được liệt kê như loài *Alseodaphne semicarpifolia* (thuộc chi Sù), Nam thiên trúc (*Nandina domestica*), *Litsea gardneri* (thuộc chi Bời lời), *Artabotrys zeylanicus* (thuộc chi Móng rồng), Mao phòng kỷ (*Sinomenium acutum*), *Goniiothalamus amuyon* (chi Giác đế), v/v. Các alkaloit tồn tại trong các loài dược liệu liệt kê ở trên được phân lập và tinh chế không có định hướng từ trước, cụ thể là không sử dụng phương pháp dẫn đường sinh học để lựa chọn ra các cao chiết tiềm năng rồi mới phân lập và tinh chế các hoạt chất sinh học (P. Pachaly, A. Z. Adnan, G. Will. NMR-assignments of *N*-acylaporphine alkaloids from *Tinospora crispa*. *Planta Medica*, 1992, 58, 184-187; E. D. Coy Barrera, L. E. Cuca Suárez. *In vitro* inhibitory activities of Lauraceae aporphine alkaloids. *Natural Product Communications*, 2010, 5, 383-386; J. J. Chen, H. C. Hung, P. J. Sung, I. S. Chen, W. L. Kuo. Aporphine alkaloids and cytotoxic lignans from the roots of *Illigera luzonensis*. *Phytochemistry*, 2011, 72, 523-532; N. Brihi, F. Algieri, A. Rodriguez-Nogales, J. Garrido-Mesa, T. Vezza, F. Maiza, M. P. Utrilla, M. E. Rodriguez-Cabezas, J. Galvez. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Total Alkaloid Extract from *Fumaria capreolata*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 2015, Article ID 736895; Y. C. Ge, K. W. Wang. New Analogues of Aporphine Alkaloids. *Mini-Reviews in Medicinal*

Chemistry, 2018, 18, 1590-1602). Do đó, giải pháp sau đây đưa ra quy trình phân lập và tinh chế hợp chất aporphin alkaloid mới $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin được định hướng theo phương pháp dẫn đường sinh học từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*). Dựa vào kết quả sàng lọc hoạt tính kháng viêm, cao chiết clorofom được lựa chọn để tách, tinh chế hợp chất này và có hoạt tính sinh học, cụ thể là có tác dụng điều trị viêm (thông qua ức chế sự sản sinh NO).

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) có tác dụng điều trị bệnh viêm và hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề xuất quy trình phân lập và tinh chế hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin có tác dụng ức chế sự sản sinh NO từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

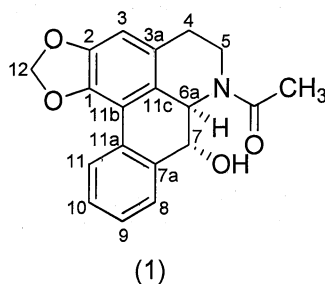
a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu phần trên mặt đất của cây tiêu lá mỏng, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch và sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,2 mm thu được nguyên liệu bột cây tiêu lá mỏng;

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 rồi thu phân đoạn clorofom, sau khi cất loại dung môi thu được phần cao chiết clorofom (PHC);

d) thu phân đoạn chứa hợp chất aporphin alkaloit bằng cách nhồi phần cao chiết clorofom (PHC) 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 *n*-hexan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 15/1, 12/1, 10/1, 8/1, 5/1, 4/1, 3/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn *n*-hexan/axeton tỷ lệ 3/1 có kí hiệu PHC-7, sau đó phân đoạn này tiếp tục được nhồi lên cột sắc ký silica gel kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 10/1, 8/1, 6/1, 5/1, 4/1, 3/1, 2/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn *n*-hexan/axeton tỷ lệ là 2/1 và có kí hiệu PHC-7-7;

e) thu hợp chất aporphin alkaloit bằng cách nhồi phân đoạn có kí hiệu PHC-7-7 thu được ở bước d) lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 3/1, 2/1, 1/1, 1/2 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 1/2 và có kí hiệu PHC-7-7-12, sau đó phân đoạn có kí hiệu PHC-7-7-12 tiếp tục được chuyển 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 tỷ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (theo tỷ lệ 2/1, thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất aporphin alkaloit tinh thể hình kim, không màu và có công thức (1) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết bằng clorofom 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 $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin thô là *n*-hexan/etyl axetat hoặc diclometan/etyl axetat theo tỷ lệ etyl axetat tăng dần từ 0 đến 100%.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó còn có bước tinh sạch hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi axetonitril/nước để thu hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin 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 $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin có tác dụng điều trị viêm từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) và hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin 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 $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin có tác dụng điều trị viêm từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*), 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 $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin; d) chiết hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin; e) thu hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin thô; và f) tinh chế hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin.

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.

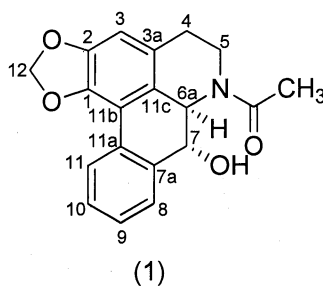
Trong bước chiết nguyên liệu bột cây tiêu lá mỏng, tiến hành chiết ba lần phần bột thu được ở trên bằng metanol theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện hồi lưu với thời gian chiết từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 đến 65°C. Sau khi thu dịch chiết, loại dung môi dưới áp suất giảm thu cao chiết metanol (PHM), sau đó hòa tan cao chiết PHM vào nước nóng theo tỷ 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 clorofom, 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 clorofom, sau khi cất loại dung môi thu được phần cao chiết clorofom (PHC). Bước chiết loại tạp chất bằng *n*-hexan và bước chiết bằng chloroform được thực hiện 3 lần.

Trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất aporphin alkaloit, đưa cao chiết PHC 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 *n*-hexan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 15/1, 12/1, 10/1, 8/1, 5/1, 4/1, 3/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn *n*-hexan/axeton tỷ lệ 3/1 có kí hiệu PHC-7, sau đó phân đoạn này tiếp tục được nhồi lên cột sắc ký silica gel kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 10/1, 8/1, 6/1, 5/1, 4/1, 3/1, 2/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn *n*-hexan/axeton tỷ lệ là 2/1 và có kí hiệu PHC-7-7.

Trong bước thu hợp chất aporphin alkaloit, đưa phân đoạn có kí hiệu PHC-7-7 thu được ở bước trên lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 3/1, 2/1, 1/1, 1/2 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 1/2 và có kí hiệu PHC-7-7-12, sau đó phân đoạn có kí hiệu PHC-7-7-12 tiếp tục được chuyển 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 tỷ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (theo tỷ lệ 2/1, thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất aporphin alkaloit có tên là $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin tinh thể hình kim, không màu 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 $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin thô là *n*-hexan/etyl axetat hoặc diclometan/etyl axetat theo tỷ lệ etyl axetat tăng dần từ 0 đến 100%.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó còn có bước tinh sạch hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi axetonitril/nước để thu hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin thu được bằng quy trình theo giải pháp, trong đó hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin 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 aporphin alkaloit từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*).

Thu phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C đến khối lượng không đổi sau đó nghiền nhỏ thành bột (có kích thước 0,2 mm) và thu được 15 kg bột. Phần bột này được chiết ba lần bằng metanol (3 x 75,0 L) 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 cô quay loại bỏ dung môi thu được cao chiết metanol (PHM; 1,5 kg). Cao chiết PHM được hòa tan vào 1,5 L nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết PHM thu được hỗn hợp dạng lỏng. Bổ sung 4,5 L *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; 2,0 L). Bổ sung 6,0 L 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, thu dịch chiết clorofom và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết clorofom (PHC, 110 g). Cao chiết PHC (110 g) 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 *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 15/1, 12/1, 10/1, 8/1, 5/1, 4/1, 3/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 3/1 và có ký hiệu là PHC-7 (18,3 g). Phân đoạn PHC-7 (18,3 g) tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 40 đến 60 mesh) với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 10/1, 8/1, 6/1, 5/1, 4/1, 3/1, 2/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 2/1 và có ký hiệu là PHC-7-7 (1,2 g). Phân đoạn PHC-7-7 (1,2 g) tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 40 đến 60 mesh) với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 3/1, 2/1, 1/1, 1/2 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 1/2 và có ký hiệu là PHC-7-7-12 (65 mg). Hòa tan phân đoạn có ký hiệu PHC-7-7-12 (65 g) 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 tỷ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (theo tỷ lệ 2/1, thể tích/thể tích) thu được hợp chất aporphin alkaloit có tên là (-)-(6a*R*,7*R*)-*N*-axetylnorushinsunin (18 mg) có công thức (1) tinh thể hình kim, không màu.

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

Tinh thể hình kim, 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 aporphin alkaloit có công thức (1)

- Tên theo IUPAC: 1-((6a*R*,7*R*)-7-hydroxy-6a,7-dihydro-4*H*-[1,2]dioxolo[3a,11c:7a,11a]benzo[1,3,12-de]benzo[*g*]quinolin-6(5*H*)-yl)etanon.

- Mô tả: Chất dạng tinh thể hình kim, không màu, tan tốt trong dung môi chloroform và metanol. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo trắng sẵn 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck), dung môi triển khai là metanol/nước = 3/1 (v/v); $R_f = 0,40$.

- CTPT: C₁₉H₁₇NO₄ (M=323).

- Phổ khối phân giải cao HRESIMS m/z 324.1240 [M + H]⁺; 346.1035 [M + Na]⁺.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 6,56 (1H, s, H-3); 2,85 (1H, t, $J = 13,2$ Hz, H-4a); 2,68 (1H, m, H-4b); 4,03 (1H, br d, $J = 13,2$ Hz, H-5a); 3,41 (1H, t, $J = 13,2$ Hz, H-5b); 5,41 (1H, d, $J = 12,8$ Hz, H-6a); 4,81 (1H, d, $J = 12,8$ Hz, H-7); 7,82 (1H, d, $J = 6,8$ Hz, H-8); 7,39 (2H, t, $J = 6,8$ Hz, H-9/H-10); 8,04 (1H, d, $J = 6,8$ Hz, H-11); 6,09 (1H, s, H-12a); 5,97 (1H, s, H-12b); 2,28 (3H, s, NCOCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 143,08 (C-1); 147,31 (C-2); 107,47 (C-3); 128,37 (C-3a); 30,23 (C-4); 42,44 (C-5); 56,21 (C-6a); 72,74 (C-7); 140,17 (C-7a); 125,01 (C-8); 127,58 (C-9); 128,37 (C-10); 126,73 (C-11); 128,62 (C-11a); 116,92 (C-11b); 122,75 (C-11c); 101,11 (C-12); 173,41 (NCOCH₃); 22,30 (NCOCH₃).

Cấu trúc hóa học của hợp chất aporphin alkaloit có công thức (1) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hợp chất hóa học và khẳng định rằng hợp chất aporphin alkaloit

có công thức (1) là hợp chất có tên $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin và là hợp chất mới.

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin phân lập từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) 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 đói 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 $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin phân lập từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*).

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 $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin (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 550 nm. 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 $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin phân lập từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng.

Hợp chất	IC ₅₀ (μ M)
$(-)-(6aR,7R)$ - <i>N</i> -axetylnorushinsunin	> 30
Celastrol	1,0 $\pm$ 0,1

Tác dụng ức chế sự sản sinh NO của hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetyl norushinsunin được thể hiện ở bảng 1. Hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetyl norushinsunin có tác dụng ức chế yếu sự sản sinh NO với giá trị $IC_{50} > 30$ (μM) so với chất đối chứng dương-Celastrol ($IC_{50} = 1,0 \pm 0,1$ μM).

Mặc dù tác dụng ức chế sự sản sinh NO của hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetyl norushinsunin là yếu nhưng hợp chất này vẫn có thể được coi là hợp chất tiềm năng có tác dụng kháng viêm. Lí do hợp chất này có thể có tác dụng ức chế các tác nhân tiền gây viêm như TNF- α , IL-1 β và IL-6, từ đó định hướng hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetyl norushinsunin có/hoặc không phối hợp với các thảo dược khác làm nguyên liệu sản xuất sản phẩm có tác dụng điều trị bệnh viêm.

Những lợi ích (hiệu quả) có thể đạt được

Quy trình của giải pháp hữu ích cho phân lập và tinh chế hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetyl norushinsunin với độ tinh khiết $> 95\%$ với hiệu suất chiết cao và có tác dụng điều trị bệnh viêm, trên cơ sở ức chế sự sản sinh NO từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*). Bằng cách sử dụng sắc ký cột và điều chỉnh hệ dung môi tối ưu, quy trình cho phép chiết được hoạt chất với một lần chiết duy nhất mà vẫn 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 $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetyl norushinsunin thu được từ quy trình theo giải pháp đã được chứng minh có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế 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 $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetyl norushinsunin có tác dụng ức chế sự sản sinh NO. Hợp chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetyl norushinsunin 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 $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin có tác dụng kháng viêm từ cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*), 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 0,2 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, 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;

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, sau đó để lắng trong vòng 1 giờ, 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 thu phân đoạn clorofom, sau khi cất loại dung môi thu được phần cao chiết;

d) thu phân đoạn chứa hợp chất aporphin alkaloit bằng cách nhồi phần cao chiết 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 *n*-hexan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 15/1, 12/1, 10/1, 8/1, 5/1, 4/1, 3/1 (thể tích/thể tích), phân đoạn *n*-hexan/axeton tỷ lệ 3/1 tiếp tục được nhồi lên cột sắc ký silica gel kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 10/1, 8/1, 6/1, 5/1, 4/1, 3/1, 2/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn *n*-hexan/axeton tỷ lệ là 2/1;

e) thu hợp chất aporphin alkaloit bằng cách nhồi phân đoạn *n*-hexan/axeton tỷ lệ là 2/1 thu được ở trên lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 3/1, 2/1, 1/1 và 1/2 (thể tích/thể tích) phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 1/2 được thu hồi và chuyển 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 tỷ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (theo tỷ lệ 2/1,

thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất aporphin alkaloit tinh thể hình kim, không màu và có công thức (1):

