



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003135

(51)⁷ **C07D 311/02; A61K 36/48**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00548

(22) 06/12/2019

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/02/2020 383A

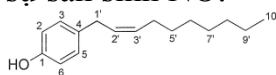
(73) Trường Đại học Phenikaa (VN)

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

(72) Tô Đạo Cường (VN); Nguyễn Phi Hùng (VN); Trần Mạnh Hùng (VN); Nguyễn Minh Ngọc (VN); Nguyễn Phương Minh (VN).

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ TÍNH CHẾ HỢP CHẤT BAVINOL A TỪ PHẦN TRÊN
MẶT ĐẤT LOÀI TIÊU BA VÌ (PIPER BAVINUM) CÓ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tính chế hợp chất bavinol A có tác dụng điều trị bệnh viêm từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*). Quy trình theo giải pháp bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì để thu được cao chiết etanol (PBE); c) hòa tan cao chiết PBE; d) chiết bằng diclorometan; e) thu phân đoạn chứa hợp chất bavinol A; f) thu hợp chất bavinol A thô; và g) tinh chế hợp chất bavinol A. Quy trình theo giải pháp thu được hợp chất bavinol A có công thức (1). Hợp chất bavinol A thu được từ quy trình theo giải pháp có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế 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 bavinol A từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*). Hợp chất bavinol A thu được từ quy trình theo giải pháp này 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, decongestants, chất kháng cholinergic, Mast cellstabilizer, 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 chlopheniramin, 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 nguồn dược liệu có nguồn gốc thảo dược thay thế cho các loại thuốc tổng hợp đã được quan tâm và đầu tư nghiên cứu. Đối với loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*), các tác giả đã phát hiện ra tác dụng điều trị bệnh Alzheimer tốt

thông qua ức chế mạnh các enzym cholinesteraza của các hợp chất phân lập được, điển hình là hợp chất bavinol A (H. V. Dung, T. D. Cuong, N. M. Chinh, D. Quyen, J. S. Byeon, J. A. Kim, M. H. Woo, J. S. Choi, B. S. Min. Compounds from aerial parts of *Piper bavinum* and their anti-cholinesterase activity. *Archives of Pharmacal Research*, 2015, 38, 677-682). 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 oxit nitric (NO) của hợp chất bavinol lại chưa được nghiên cứu.

Hợp chất bavinol A là một alkenylphenol - một phenol tự nhiên gồm một vòng phenol nối với một alken mạch dài. Các alkenylphenol ngoài sản xuất từ con đường tổng hợp thì nó còn được sản xuất từ một số loài thực vật, được liệu như loài *Ardisia iwahigensis* (thuộc Chi Trọng đũa), *Piper malacophyllum* (thuộc Chi Hồ tiêu), Rau mác bao (*Monochoria vaginalis*) và côn trùng như Ong dú (*Trigona minor*), v.v.. Hợp chất bavinol A công bố được chiết hồi lưu, sau đó được phân lập và tinh chế bằng sắc ký cột hử silica gel pha thuận và cuối cùng sử dụng silica gel pha đảo với các dung môi hữu cơ như cloroform, axeton, metanol và nước từ phần trên mặt đất loài tiêu Ba Vì (H. V. Dung, T. D. Cuong, N. M. Chinh, D. Quyen, J. S. Byeon, J. A. Kim, M. H. Woo, J. S. Choi, B. S. Min. Compounds from aerial parts of *Piper bavinum* and their anti-cholinesterase activity. *Archives of Pharmacal Research*, 2015, 38, 677-682). Ưu điểm của phương pháp phân lập và tinh chế trên là thu được hợp chất bavinol A có độ tinh khiết cao khi sử dụng phương pháp phân lập thông thường nhưng nhược điểm là hiệu suất thu hồi hợp chất bavinol A không cao (0,0011%) và sử dụng dung môi rất độc hại, đó là cloroform và metanol.

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 bavinol A từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*) có tác dụng điều trị bệnh viêm và hợp chất bavinol A thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề xuất quy trình phân lập và tinh chế hợp chất bavinol A có tác dụng ức chế sự sản sinh NO từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*), loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch bằng nước cất, sau đó sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C và xay phần trên mặt đất thành bột;

b) chiết bột phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì bằng cách bổ sung phần bột thu được ở bước a) vào etanol 96° theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết bột trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C, sau đó thu dịch chiết và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etanol (PBE);

c) hòa tan cao chiết PBE bằng cách hòa tan cao chiết PBE vào nước nóng theo tỷ lệ 1/3 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết PBE thu được hỗn hợp dạng lỏng;

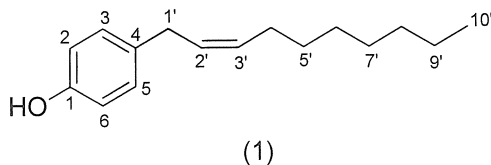
d) chiết bằng diclorometan bằng cách bổ sung diclorometan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước c) theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi diclorometan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết diclorometan (PBE-1);

e) thu phân đoạn chứa hợp chất alkenylphenol bằng cách đưa phân đoạn chứa cao chiết PBE-1 thu được ở bước d) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 20/1 và 10/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 10/1 và có ký hiệu là PBE-1.2;

f) thu hợp chất alkenylphenol thô bằng cách đưa phân đoạn PBE-1.2 thu được ở bước e) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ 15/1, 10/1 và 7/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/etyl axetat là 7/1 và có ký hiệu là PBE-1.2.3; và

g) tinh chế hợp chất alkenylphenol bằng cách hòa tan phân đoạn có ký hiệu PBE-1.2.3 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-C18 (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) theo tỷ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là axeton/nước (theo tỷ lệ 3/1 và 4/1, thể tích/thể tích) thu được hợp chất alkenylphenol có công thức (1) dạng dầu không màu.

Hợp chất alkenylphenol thu được từ quy trình theo giải pháp có tên là Bavinol A và có công thức (1) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết bằng diclorometan 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 bavinol A thô là *n*-hexan/etyl axetat hoặc diclorometan/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 bavinol A bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi axetonitril/nước để thu hợp chất bavinol A tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất bavinol A 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 vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là đồ thị thể hiện tác dụng ức chế sự sản sinh NO (%) của hợp chất bavinol A và chất đối chứng dương-Celastrol.

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 bavinol A có tác dụng điều trị bệnh viêm từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*) và hợp chất bavinol A 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 bavinol A có tác dụng điều trị bệnh viêm từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì để thu được cao chiết etanol (PBE); c) hòa tan cao chiết PBE; d) chiết bằng diclorometan; e) thu phân đoạn chứa hợp chất bavinol A; f) thu hợp chất bavinol A thô; và g) tinh chế hợp chất bavinol A.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, thu phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch bằng nước cất, sau đó sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C và xay nhỏ (đến kích thước 0,2mm) để tạo ra bột phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì.

Trong bước chiết bột phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì, tiến hành chiết ba lần phần bột thu được ở trên bằng etanol 96° theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 40 đến 60 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C. Sau khi chiết, phần dịch chiết được thu gom và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etanol (PBE).

Trong bước hòa tan cao chiết PBE, hòa tan cao chiết PBE vào nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết PBE thu được hỗn hợp dạng lỏng.

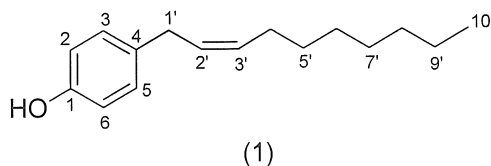
Trong bước chiết bằng diclorometan, bổ sung diclorometan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở trên, sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi diclorometan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết diclorometan (PBE-1). Bước chiết bằng diclorometan được thực hiện 3 lần.

Trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất bavinol A, đưa phân đoạn chứa cao chiết PBE-1 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 20/1 và 10/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 10/1 và có kí hiệu là PBE-1.2.

Trong bước thu hợp chất bavinol A thô, đưa phân đoạn PBE-1.2 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/etyl axetat là 15/1, 10/1 và 7/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/etyl axetat là 7/1 và có kí hiệu là PBE-1.2.3.

Trong bước tinh chế hợp chất bavinol A, hòa tan phân đoạn có kí hiệu PBE-1.2.3 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-C18 (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là axeton/nước (theo tỷ lệ 3/1 và 4/1, thể tích/thể tích) thu được hợp chất bavinol A có công thức (1) dạng dầu không màu.

Hợp chất Bavinol A thu được từ quy trình theo giải pháp 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 bavinal A thô là *n*-hexan/etyl axetat hoặc diclorometan/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 bavinal A bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi axetonitril/nước để thu hợp chất bavinal A tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất bavinal A thu được bằng quy trình theo giải pháp, trong đó hợp chất bavinal A 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 alkenylphenol từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vi (*Piper bavinum*).

Thu phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vi, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch bằng nước cất, 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 0,2mm) và thu được 1,0kg bột. Phần bột này được chiết ba lần bằng etanol 96° (3 x 5,0 L) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C, sau khi cô quay loại bỏ dung môi thu được cao etanol (PBE; 110g). Cao chiết PBE được hòa tan vào 360mL nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết PBE thu được hỗn hợp dạng lỏng. Bổ sung 1,1L diclorometan vào hỗn hợp dạng lỏng, sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi diclorometan và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết diclorometan (PBE-1; 50g). Cao chiết PBE-1 (50g) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 20/1 và 10/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 10/1 và có kí hiệu là PBE-1.2 (2,5g). Phân đoạn PBE-1.2 (2,5g) tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 40 đến 60 mesh) với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ 15/1,

10/1 và 7/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/ethyl axetat là 7/1 và có kí hiệu là PBE-1.2.3 (0,5g). Hòa tan phân đoạn có kí hiệu PBE-1.2.3 (0,5g) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-C18 (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là axeton/nước (tỷ lệ 3/1 và 4/1, thể tích/thể tích) thu được hợp chất alkenylphenol có tên là bavinol A (105mg) có công thức (1) dạng dầu không màu.

Như vậy, quy trình phân lập và tinh chế hợp chất bavinol A sử dụng sắc ký cột hở với kích thước cột và hệ dung môi tối ưu cho phép chiết hợp chất bavinol A hiệu suất cao gấp 9,5 lần so với phương pháp chiết đã công bố trước đó (H. V. Dung, T. D. Cuong, N. M. Chinh, D. Quyen, J. S. Byeon, J. A. Kim, M. H. Woo, J. S. Choi, B. S. Min. Compounds from aerial parts of *Piper bavinum* and their anti-cholinesterase activity. *Archives of Pharmacal Research*, 2015, 38, 677-682) mà vẫn có tác dụng sinh học mạnh.

Ví dụ 2: Định tính và định lượng hợp chất alkenylphenol được phân lập và tinh chế từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì.

Phần dầu 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 alkenylphenol có công thức (1)

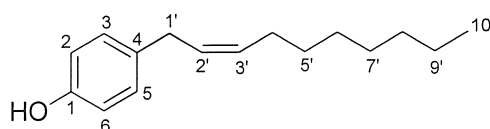
- Tên theo IUPAC: 4-(2'-(*Z*)-decenyl)phenol.

- Mô tả: Chất dạng dầu không màu, tan tốt trong dung môi cloroform và diclorometan. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo tráng sẵn 60 RP-18 F_{254S} (Merck), dung môi triển khai là axeton/nước = 5/1 (v/v); $R_f = 0,45$.

- CTPT: C₁₆H₂₄O (M=232).

- Phổ khối phân giải thấp ESI-MS m/z : 233 [M + H]⁺ (C₁₆H₂₅O).

- Cấu trúc hóa học:



(1)

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 6,83 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2/H-6), 7,11 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-3/H-5), 3,40 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-1'), 5,58 (2H, m, H-2'/H-3'), 2,21 (2H, m, H-4'), 1,48 (2H, m, H-5'), 1,39 (8H, m, H-

6'/H-7'/H-8'/H-9'), 0,98 (3H, t, $J = 6,8$ Hz, H-10'), 5,91 (1H, br s, 1-OH); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_c (ppm): 153,5 (C-1), 115,5 (C-2/C-6), 129,6 (C-3/C-5), 133,7 (C-4), 32,7 (C-1'), 128,5 (C-2'), 130,9 (C-3'), 27,2 (C-4'), 29,9 (C-5'), 29,4 (C-6'/C-7'), 32,0 (C-8'), 22,8 (C-9'), 14,2 (C-10').

Cấu trúc hóa học của hợp chất alkenylphenol có công thức (1) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hợp chất hóa học và khẳng định rằng hợp chất alkenylphenol có công thức (1) là hợp chất có tên bavinol A.

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất bavinol A phân lập từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*) 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 μL 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 μL thuốc thử Griess, ủ 10 phút. Đo OD bước sóng 550nm.

+ Phương pháp xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất bavinol A phân lập từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*).

Tế bào RAW 264,7 được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ 10^4 tế bào/giếng, ủ trong 12 giờ ở điều kiện 37°C , 5 % CO_2 . Hút bỏ môi trường cũ và thay thế bằng môi trường chứa 1 % FBS, ủ trong 6 giờ. Sau đó, thay môi trường cũ bằng môi trường có chứa hợp chất bavinol A (hoặc đối chứng dương-Celastrol) ở các nồng độ khác nhau và LPS nồng độ 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ủ 24 giờ. Hút 50 μL dịch nổi trong mỗi giếng sang đĩa 96 giếng khác và bổ sung 50 μL 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 Bavinol A phân lập từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*).

Hợp chất	% ức chế*
----------	-----------

	3 μ M	10 μ M	30 μ M
Bavinol A	73,8	82,4	96,4
Celastrol	77,9	89,2	100

(*): hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất bavinol A được thực hiện ở các nồng độ 3, 10 và 30 μ M. Tác dụng ức chế sự sản sinh NO của hợp chất bavinol A được thể hiện ở bảng 1. Hợp chất bavinol A có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO ở cả 3 nồng độ (3, 10 và 30 μ M) với các giá trị tương ứng là 73,8, 82,4 và 96,4% và mạnh tương đương với chất đối chứng dương-Celastrol (77,9, 89,2 và 100% tương ứng với các nồng độ 3, 10, và 30 μ M).

Như vậy, bavinol A được coi là hợp chất tiềm năng ức chế mạnh sự sản sinh NO, từ đó định hướng hợp chất bavinol A 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 bavinol A với độ tinh khiết > 95% có tác dụng điều trị bệnh viêm, trên cơ sở ức chế sự sản sinh NO từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*) với hiệu suất chiết cao và có tác dụng sinh học mạnh. 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 bavinol A 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 bavinol A có hiệu quả ức chế mạnh sự sản sinh NO. Hợp chất bavinol A 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 bavinol A từ phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì (*Piper bavinum*) có tác dụng kháng viêm, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch bằng nước cất, sau đó 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 để tạo ra bột phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì;

b) chiết bột phần trên mặt đất loài Tiêu Ba Vì bằng cách chiết phần bột thu được ở bước a) với etanol 96° ba lần theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 40 đến 60 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C, sau đó thu dịch chiết và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etanol (PBE);

c) hòa tan cao chiết PBE bằng cách hòa tan cao chiết PBE thu được ở bước c) vào nước nóng theo tỉ lệ 1/3 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết PBE thu được hỗn hợp dạng lỏng;

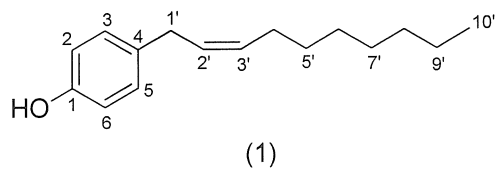
d) chiết bằng diclorometan bằng cách bổ sung diclorometan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước d) theo tỷ lệ 3/1 (thể tích/thể tích), khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi diclorometan và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết diclorometan (PBE-1);

e) thu phân đoạn chứa hợp chất bavinol A bằng cách đưa phân đoạn chứa cao chiết PBE-1 thu được ở bước d) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 20/1 và 10/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 10/1 và có kí hiệu là PBE-1.2;

f) thu hợp chất bavinol A thô bằng cách đưa phân đoạn PBE-1.2 thu được ở bước e) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 40 đến 60 mesh) với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ 15/1, 10/1 và 7/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/etyl axetat là 7/1 và có kí hiệu là PBE-1.2.3; và

g) tinh chế hợp chất bavinol A bằng cách hòa tan phân đoạn có kí hiệu PBE-1.2.3 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-C18 (có kích cỡ 230 đến 400

mesh) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là axeton/nước (theo tỷ lệ 3/1 và 4/1, thể tích/thể tích) thu được hợp chất bavinol A dạng dầu không màu và có công thức (1):



HÌNH 1

