



(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)



2-0004008

(51) **C07D 311/02; A61K 36/48**
2024.01

(13) **Y**

(21) 2-2024-00757

(22) 26/01/2022

(67) 1-2022-00567

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/08/2022 413A

(71) Trường Đại học Phenikaa (VN)

Phường Yên Nghĩa, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

(72) Tô Đạo Cường (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT HỖN HỢP CÓ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM TỪ CÂY
TIÊU LÁ MỎNG (PIPER HYMENOPHYLLUM)**

(21) 2-2024-00757

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO bao gồm các hoạt chất có hoạt tính sinh học được tách từ cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) và hỗn hợp thu được từ quy trình này. Hỗn hợp theo giải pháp hữu ích cho phép ức chế hiệu quả sự sản sinh NO trên tế bào RAW264.7.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ hóa sinh và các hoạt chất thiên nhiên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp có tác dụng kháng viêm trên cơ sở ức chế mạnh sự sản sinh nitric oxit (NO) *in vitro* từ cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) và quy trình sản xuất chế phẩm hỗ trợ điều trị viêm chứa hỗn hợp này.

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 antihistamine, các lớp chất không steroid, decongestants, anticholinergic agent, 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 chlopheniramine, cetirizine, levocetirizine, 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 thảo dược thay thế cho các loại thuốc tổng hợp đã được quan tâm nghiên cứu. Đối với cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*), các tác giả đã phát hiện ra tác dụng kháng viêm tốt của dịch chiết cloroform, etyl axetat và các hoạt chất phân lập được từ cây tiêu lá mỏng (V. D. Hoang, P. H. Nguyen, M. H. Tran, N. T. Huynh, H. T. Nguyen, B. S. Min, D. C To. Identification of Anti-inflammatory Constituents from Vietnamese *Piper hymenophyllum*. *Revista Brasileira*

de *Farmacognosia*, 2020, 30, 312–316). Trong các công bố ở trên, các cao chiết phân đoạn có hoạt tính sinh học được phân tách thành các phân đoạn nhỏ rồi sau đó sử dụng các phương pháp sắc ký kết hợp các hệ dung môi bao gồm các thành phần *n*-hexane, chloroform, etyl axetat, axeton hoặc metanol để tách và tinh chế các hoạt chất có tác dụng kháng viêm thông qua ức chế mạnh sự sản sinh NO. Tuy nhiên, tác dụng kháng viêm của các hoạt chất này mới chỉ dừng lại ở mức đánh giá tác dụng sinh học đơn lẻ của các hoạt chất, trong khi đó khối lượng các hoạt chất này lại có giới hạn trong cây tiêu lá mỏng mà không thể có được lượng lớn đủ làm nguyên liệu sản xuất các sản phẩm dưới dạng thực phẩm chức năng (TPCN) hoặc thuốc ở quy mô công nghiệp để thương mại hóa sản phẩm. Do đó, giải pháp hữu ích này đưa ra quy trình sản xuất hỗn hợp chứa các hoạt chất hydroxychavicol, *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol, 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol, cafeoyl aldehyt và (–)-(6*aR*,7*R*)-*N*-axetylnorushinsunin được phối trộn theo tỉ lệ tối ưu cho tác dụng kháng viêm vượt trội thông qua ức chế mạnh sự sản sinh NO *in vitro* và quy trình sản xuất chế phẩm chứa hỗn hợp này hỗ trợ điều trị viêm thông qua làm giảm sự tăng thể tích phù viêm bàn chân chuột và giảm trọng lượng u hạt *in vivo*.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể giải pháp hữu ích đề cập đến hỗn hợp có hoạt tính sinh học được chiết từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) ức chế mạnh sự sản sinh NO *in vitro* và quy trình sản xuất hỗn hợp này. Ngoài ra, giải pháp hữu ích cũng đề cập đến chế phẩm hỗ trợ điều trị viêm thông qua làm giảm sự tăng thể tích phù viêm bàn chân chuột, giảm trọng lượng u hạt *in vivo* và quy trình sản xuất chế phẩm để hỗ trợ điều trị viêm.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế mạnh sự sản sinh NO *in vitro* theo giải pháp hữu ích, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu phần trên mặt đất 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 tỉ 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 cloroform 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 chloroform và cất loại dung môi thu được cao chiết chloroform (PHC), sau đó phân đoạn nước (không tan trong cloroform) 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 các hoạt chất của hỗn hợp bằng cách đưa cao chiết PHC thu được ở bước trên lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh, sau đó sử dụng hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 15/1, 12/1, 10/1, 8/1, 6/1, 4/1, 3/1 và 2/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn *n*-hexan/axeton có tỷ lệ 6/1, 3/1 và 2/1 có kí hiệu lần lượt là PHC-5, PHC-3 và PHC-2; cao chiết etyl axetat thu được ở bước trên cũng được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh, sau đó sử dụng hệ dung môi rửa giải là diclometan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 100/1, 50/1 và 20/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn có kí hiệu là PHE-3;

e) thu các hoạt chất của hỗn hợp bằng cách đưa phân đoạn có kí hiệu PHC-5 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 axeton/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/1, 2/1, 3/1 và 4/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất hydroxychavicol dạng dầu, không màu; phân đoạn có kí hiệu PHC-3 được nhồi 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 axeton/nước lần lượt theo tỷ lệ 2/1, 3/1 và 4/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất *N*-3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol dạng rắn vô định hình, màu vàng và hoạt chất (-)-(6*aR*,7*R*)-*N*-axetylnorushinsunin tinh thể hình kim, không màu; phân đoạn có kí hiệu PHC-2 được nhồi 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

metanol/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/1, 3/1, 5/1, 7/1 và 10/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất 4-(3-metoxyl-propen-1-yl)-1,2-benzendiol dạng rắn, màu vàng nhạt; phân đoạn có kí hiệu PHE-3 được nhồi 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 acetonitrile/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/2 và 1/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất cafeoyl aldehyt dạng rắn, màu trắng; và

f) thu hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO bằng cách hòa tan 5 hoạt chất thu được ở bước e) theo tỷ lệ % trọng lượng sau:

Hydroxychavicol:	20-40
<i>N</i> -3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol:	15-30
Cafeoyl aldehyt:	15-30
4-(3-metoxyl-propen-1-yl)-1,2-benzendiol:	8-20
(-)-(6a <i>R</i> ,7 <i>R</i>)- <i>N</i> -axetylnorushinsunin:	5-15

vào một lượng vừa đủ etanol, sau khi sấy khô trên thiết bị sấy tầng sôi, nghiền mịn thu được hỗn hợp dạng bột.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến hỗn hợp có tác dụng kháng viêm chứa các hoạt chất thu được từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO *in vitro*, trong đó hỗn hợp này bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % trọng lượng sau:

Hydroxychavicol:	20-40
<i>N</i> -3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol:	15-30
Cafeoyl aldehyt:	15-30
4-(3-metoxyl-propen-1-yl)-1,2-benzendiol:	8-20
(-)-(6a <i>R</i> ,7 <i>R</i>)- <i>N</i> -axetylnorushinsunin:	5-15.

Theo khía cạnh thứ ba, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm hỗ trợ điều trị viêm, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo ra hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO *in vitro* theo quy trình nêu trên,

b) nghiền mịn và rây hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO qua lưới cỡ lỗ 0,75mm, các tá được bao gồm canxi cacbonat, tinh bột mỳ, lactoza và magie stearat được nghiền và rây qua lưới cỡ lỗ 0,75mm;

b) thu bột khô bằng cách phối trộn lần lượt 65-80% hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO với 4-8% canxi cacbonat, 4-10% tinh bột mỳ, sau khi trộn đều, phối trộn tiếp với 5-10% lactoza, trộn đều thu được hỗn hợp bột khô; và

c) thu chế phẩm bằng cách phối trộn hỗn hợp bột khô thu được ở bước b) với 3-7% magie stearat, tiếp đó chuyển vào thiết bị xát để thu được chế phẩm dạng cốm tròn.

Theo khía cạnh thứ tư, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị viêm, trong đó chế phẩm này chứa hỗn hợp ức chế mạnh sự sản sinh NO *in vitro* và tá được.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả một cách chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ minh họa cụ thể, tuy nhiên các phương án thực hiện và các ví dụ minh họa cụ thể này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Cây tiêu lá mỏng có tên khoa học là *Piper hymenophyllum* Miq. thuộc họ Hồ tiêu (Piperaceae). Cây tiêu lá mỏng là cây thuốc Đông y và có nhiều tác dụng sinh học đáng quý như kháng khuẩn và kháng viêm (Y. Vaghasiya, R. Nair, S. Chanda. Investigation of some *Piper* species for anti-bacterial and anti-inflammatory property. *International Journal of Pharmacology*, 2007, 3, 400-405; V. D. Hoang, P. H. Nguyen, M. H. Tran, N. T. Huynh, H. T. Nguyen, B. S. Min, D. C To. Identification of Anti-inflammatory Constituents from Vietnamese *Piper hymenophyllum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2020, 30, 312-316) và điều trị bệnh Alzheimer (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). Thành phần được sử dụng làm nguyên liệu theo giải pháp hữu ích là phần trên mặt đất của cây tiêu lá mỏng.

Giải pháp hữu ích đề cập đến hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO bao gồm các hoạt chất có hoạt tính sinh học được tách từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) và quy trình sản xuất hỗn hợp này. Ngoài ra giải pháp hữu ích cũng đề cập đến chế phẩm hỗ trợ điều trị viêm và quy trình sản xuất chế phẩm hỗ trợ điều trị viêm.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp có tác dụng ức chế sự sản sinh NO theo giải pháp hữu ích, 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 các hoạt chất; d) chiết các hoạt chất; e) thu các hoạt chất thô; f) tinh chế các hoạt chất; và g) thu hỗn hợp chứa các hoạt chất.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu bằng cách 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, thu cao chiết chloroform và 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 cloroform 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 chloroform và cất loại dung môi thu được cao chiết chloroform (PHC), sau đó phân đoạn nước (không tan trong cloroform) 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). Bước chiết loại tạp chất bằng *n*-hexan, bước chiết bằng cloroform và etyl axetat được thực hiện 3 lần.

Trong bước thu phân đoạn chứa các hoạt chất của hỗn hợp, đưa cao chiết PHC thu được ở bước trên lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh, sau đó sử dụng hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 15/1, 12/1, 10/1, 8/1, 6/1, 4/1, 3/1 và 2/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn *n*-hexan/axeton có tỷ lệ 6/1, 3/1 và 2/1 có kí hiệu lần lượt là PHC-5, PHC-3 và PHC-2; cao chiết etyl axetat thu được ở bước trên cũng được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh,

sau đó sử dụng hệ dung môi rửa giải là diclometan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 100/1, 50/1 và 20/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn có kí hiệu là PHE-3.

Trong bước thu các hoạt chất của hỗn hợp, đưa phân đoạn có kí hiệu PHC-5 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 axeton/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/1, 2/1, 3/1 và 4/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất hydroxychavicol dạng dầu, không màu; phân đoạn có kí hiệu PHC-3 được nhồi 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 axeton/nước lần lượt theo tỷ lệ 2/1, 3/1 và 4/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinnamoylpyrrol dạng rắn vô định hình, màu vàng và hoạt chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin tinh thể hình kim, không màu; phân đoạn có kí hiệu PHC-2 được nhồi 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 metanol/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/1, 3/1, 5/1, 7/1 và 10/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol dạng rắn, màu vàng nhạt; phân đoạn có kí hiệu PHE-3 được nhồi 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 acetonitrile/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/2 và 1/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất cafeoyl aldehyd dạng rắn, màu trắng.

Trong bước thu hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO, tiến hành hòa tan lần lượt 5 hoạt chất theo tỷ lệ % trọng lượng sau:

Hydroxychavicol:	20-40
<i>N</i> -3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinnamoylpyrrol:	15-30
Cafeoyl aldehyd:	15-30
4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol:	8-20
$(-)-(6aR,7R)$ - <i>N</i> -axetylnorushinsunin:	5-15

vào một lượng vừa đủ etanol, sau khi sấy khô trên thiết bị sấy tầng sôi, nghiền mịn thu được hỗn hợp dạng bột.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO, trong đó hỗn hợp này bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % trọng lượng sau:

Hydroxychavicol:	20-40
<i>N</i> -3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol:	15-30
Cafeoyl aldehyt:	15-30
4-(3-metoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol:	8-20
(-)-(6a <i>R</i> ,7 <i>R</i>)- <i>N</i> -axetylnorushinsunin:	5-15.

Trong đó, hoạt chất hydroxychavicol được tách từ cao chiết chloroform của phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*). Quy trình tách hoạt chất hydroxychavicol được thực hiện bằng sắc ký cột silica gel pha thuận và pha đảo kết hợp với các dung môi rửa giải như *n*-hexan, axeton và nước. Trong hỗn hợp theo giải pháp hữu ích, thành phần hoạt chất hydroxychavicol nằm trong khoảng từ 20 đến 40% trọng lượng hỗn hợp, hoạt chất hydroxychavicol là thành phần chính trong việc ức chế sự sản sinh NO *in vitro* của hỗn hợp theo giải pháp hữu ích. Hoạt chất hydroxychavicol kết hợp với các hoạt chất *N*-3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol, cafeoyl aldehyt, 4-(3-metoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol và (-)-(6a*R*,7*R*)-*N*-axetylnorushinsunin giúp hiệp đồng tăng hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro*. Tỷ lệ trọng lượng hoạt chất hydroxychavicol nếu dưới 20% sẽ cho hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro* kém. Nếu tỷ lệ trọng lượng hoạt chất hydroxychavicol trên 40% thì lượng các thành phần hoạt chất khác sẽ giảm khiến hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro* giảm. Tỷ lệ trọng lượng hoạt chất hydroxychavicol theo giải pháp hữu ích nằm trong khoảng từ 20 đến 40% trọng lượng hỗn hợp, cụ thể là 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 hoặc 40%.

Hoạt chất *N*-3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol được tách từ cao chiết chloroform của phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*). Quy trình tách hoạt chất *N*-3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol được thực hiện bằng sắc ký cột silica gel pha thuận và pha đảo kết hợp với các dung môi rửa giải như *n*-hexan, axeton và nước. Trong hỗn hợp theo giải pháp hữu ích, thành phần hoạt chất *N*-3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol nằm trong khoảng từ 15 đến 30% trọng lượng hỗn hợp, hoạt chất *N*-3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol cũng đóng vai trò là thành phần chính trong việc ức chế sự sản sinh NO của hỗn hợp theo giải pháp hữu ích. Hoạt chất *N*-3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol kết hợp với các hoạt chất hydroxychavicol, cafeoyl aldehyt, 4-(3-metoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol và (-)-(6a*R*,7*R*)-*N*-axetylnorushinsunin giúp hiệp

đồng tăng hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro*. Tỷ lệ trọng lượng hoạt chất *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol nếu dưới 15% sẽ cho hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro* kém. Nếu tỷ lệ trọng lượng hoạt chất *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol trên 30% thì lượng các thành phần hoạt chất khác sẽ giảm khiến hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro* giảm. Tỷ lệ trọng lượng hoạt chất *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol theo giải pháp hữu ích nằm trong khoảng từ 15 đến 30% trọng lượng hỗn hợp, cụ thể là 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 hoặc 30%.

Hoạt chất cafeoyl aldehyt được tách từ cao chiết etyl axetat của phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*). Quy trình tách hoạt chất cafeoyl aldehyt được thực hiện bằng sắc ký cột silica gel pha thuận và pha đảo kết hợp với các dung môi rửa giải như diclorometan, axeton, acetonitrile và nước. Trong hỗn hợp theo giải pháp hữu ích, thành phần hoạt chất cafeoyl aldehyt nằm trong khoảng từ 15 đến 30% trọng lượng hỗn hợp, hoạt chất cafeoyl aldehyt cũng đóng vai trò là thành phần chính trong việc ức chế sự sản sinh NO *in vitro* của hỗn hợp theo giải pháp hữu ích. Hoạt chất cafeoyl aldehyt kết hợp với các hoạt chất hydroxychavicol, *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol, 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol và (-)-(6a*R*,7*R*)-*N*-axetylnorushinsunin giúp hiệp đồng tăng hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro*. Tỷ lệ trọng lượng hoạt chất cafeoyl aldehyt nếu dưới 15% sẽ cho hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro* kém. Nếu tỷ lệ trọng lượng hoạt chất cafeoyl aldehyt trên 30% thì lượng các thành phần hoạt chất khác sẽ giảm khiến hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro* giảm. Tỷ lệ trọng lượng hoạt chất cafeoyl aldehyt theo giải pháp hữu ích nằm trong khoảng từ 15 đến 30% trọng lượng hỗn hợp, cụ thể là 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 hoặc 30%.

Hoạt chất 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol được tách từ cao chiết chloroform của phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*). Quy trình tách hoạt chất 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol được thực hiện bằng sắc ký cột silica gel pha thuận và pha đảo kết hợp với các dung môi rửa giải như *n*-hexan, axeton, metanol và nước. Trong hỗn hợp theo giải pháp hữu ích, thành phần hoạt chất 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol nằm trong khoảng từ 8 đến 20% trọng lượng hỗn hợp, hoạt chất 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol đóng vai trò là thành phần chính, kết hợp với các hoạt chất hydroxychavicol, *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol, cafeoyl aldehyt và (-)-(6a*R*,7*R*)-*N*-axetylnorushinsunin có tác dụng ức chế sự sản sinh NO *in vitro* của hỗn hợp theo giải pháp hữu ích. Tỷ lệ trọng lượng hoạt chất 4-(3-methoxy-1-propen-1-

yl)-1,2-benzendiol nếu dưới 8% sẽ cho hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro* kém. Nếu tỷ lệ trọng lượng hoạt chất 4-(3-metoxyl-propen-1-yl)-1,2-benzendiol trên 20% thì lượng các thành phần hoạt chất khác sẽ giảm khiến hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro* giảm. Tỷ lệ trọng lượng hoạt chất 4-(3-metoxyl-propen-1-yl)-1,2-benzendiol theo giải pháp hữu ích nằm trong khoảng từ 8 đến 20% trọng lượng hỗn hợp, cụ thể là 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20%.

Hoạt chất (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin được tách từ cao chiết chloroform của phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*). Quy trình tách hoạt chất (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin được thực hiện bằng sắc ký cột silica gel pha thuận và pha đảo kết hợp với các dung môi rửa giải như *n*-hexan, axeton và nước. Trong hỗn hợp theo giải pháp hữu ích, thành phần hoạt chất (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin nằm trong khoảng từ 5 đến 15% trọng lượng hỗn hợp, hoạt chất (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin đóng vai trò là thành phần phụ trợ, kết hợp với các hoạt chất hydroxychavicol, *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol, cafeoyl aldehyt và 4-(3-metoxyl-propen-1-yl)-1,2-benzendiol giúp hiệp đồng tăng hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro*. Tỷ lệ trọng lượng hoạt chất (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin nếu dưới 5% sẽ cho hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro* kém. Nếu tỷ lệ trọng lượng hoạt chất (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin trên 15% thì lượng các thành phần hoạt chất khác sẽ giảm khiến hiệu quả ức chế sự sản sinh NO *in vitro* giảm. Tỷ lệ trọng lượng hoạt chất (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin theo giải pháp hữu ích nằm trong khoảng từ 5 đến 15% trọng lượng hỗn hợp, cụ thể là 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15%.

Bằng rất nhiều thử nghiệm, các tác giả đã phát hiện ra rằng, khi phối trộn 5 hoạt chất hydroxychavicol, *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol, 4-(3-metoxyl-propen-1-yl)-1,2-benzendiol, cafeoyl aldehyt và (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin tách được từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) lần lượt theo tỷ lệ 35/20/20/15/10 (w/w/w/w/w) thu được hỗn hợp có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO *in vitro*.

Theo khía cạnh thứ ba, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm hỗ trợ điều trị viêm, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) thu bột khô; và c) thu chế phẩm dạng cốm trơn.

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách tách 5 hoạt chất, như được mô tả ở trên, sau khi phối trộn 5 hoạt chất lần lượt theo tỷ lệ 35/20/20/15/10 (w/w/w/w/w) thu được hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO, như đã được mô tả ở trên. Hỗn hợp này được nghiền mịn và rây qua

lưới cỡ lỗ 0,75mm. Quá trình này nhằm tạo điều kiện cho quá trình phối trộn với các tá dược. Các thành phần tá dược bao gồm canxi cacbonat, tinh bột mỳ, lactoza và magie stearat được nghiền và rây qua lưới cỡ lỗ 0,75mm để thu các dạng bột mịn;

b) thu bột khô bằng cách phối trộn lần lượt hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO với 5% canxi cacbonat. Tiếp đó là phối trộn với 10% tinh bột mỳ. Sau khi trộn đều, phối trộn tiếp với 8% lactoza và trộn đều thu được hỗn hợp bột khô. Quá trình này có thể được thực hiện trong thiết bị trộn bất kỳ đã được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, miễn sao thu được hỗn hợp bột đồng đều; và

c) thu chế phẩm bằng cách phối trộn hỗn hợp bột khô với 5% magie stearat. Các thành phần tá dược nhằm tạo thuận lợi cho quá trình bào chế, tạo độ trơn, tăng độ phân rã cũng như giúp bảo quản hỗn hợp tốt hơn trong điều kiện lưu hành. Sau đó, hỗn hợp bột khô này được chuyển vào thiết bị xát để thu chế phẩm dạng cốm trơn.

Theo khía cạnh thứ tư, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị viêm, trong đó chế phẩm này chứa hỗn hợp ức chế mạnh sự sản sinh NO *in vitro* và tá dược.

Cụ thể, chế phẩm để hỗ trợ điều trị viêm theo giải pháp hữu ích chứa hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO và tá dược, trong đó hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO này bao gồm 5 hoạt chất hydroxychavicol, *N*-3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol, 4-(3-metoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol, cafeoyl aldehyt và (-)-(6a*R*,7*R*)-*N*-axetylnorushinsunin có hoạt tính sinh học được tách từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*). Trong đó, hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO có trong chế phẩm này chiếm ít nhất 60% trọng lượng của chế phẩm và tá dược chiếm tối đa 40% trọng lượng chế phẩm.

Tá dược có trong chế phẩm để hỗ trợ điều trị viêm theo giải pháp hữu ích tốt nhất được chọn từ nhóm bao gồm tinh bột mỳ, lactoza, magie stearat và/hoặc canxi cacbonat. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hoàn toàn có thể thay thế các loại tá dược tương đương để thu được chế phẩm có cùng tác dụng. Việc thay thế các tá dược này bằng các tá dược tương đương là thuộc phạm vi của giải pháp hữu ích.

Thành phần canxi cacbonat được sử dụng như một chất đệm và chất trợ hòa tan trong các hỗn hợp dược phẩm và thực phẩm chức năng. Trong hỗn hợp theo giải pháp hữu ích, thành phần canxi cacbonat đóng vai trò là thành phần tá dược, nó giúp tăng tính bền của hỗn hợp, thành phần canxi cacbonat giúp liên kết kết hợp các hoạt chất hydroxychavicol, *N*-3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol, cafeoyl aldehyt, 4-(3-metoxy-1-propen-1-yl)-1,2-

benzendiol, (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin và các tá dược độn, chất điều vị giúp làm cứng, tạo hình hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO theo giải pháp hữu ích. Tỷ lệ trọng lượng canxi cacbonat được sử dụng với lượng từ 4 đến 8%, cụ thể là 4, 5, 6, 7 hoặc 8%.

Thành phần tinh bột mỳ có tác dụng làm chất kết dính và chất độn, tăng cường khả năng hòa tan vào nước của các thành phần trong hỗn hợp thuốc và dược phẩm. Trong hỗn hợp theo giải pháp hữu ích, thành phần tinh bột mỳ đóng vai trò là tá dược độn, chúng giúp tăng độ dính của các thành phần trong hỗn hợp như các hoạt chất hydroxychavicol, *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol, cafeoyl aldehyt, 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol, (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin và các tá dược, chất điều vị hỗ trợ trong việc tạo hình hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO theo giải pháp hữu ích. Tỷ lệ tinh bột mỳ được sử dụng với lượng từ 4 đến 10%, cụ thể là 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10%.

Thành phần lactoza thường được sử dụng như một chất điều vị do vị ngọt của chúng. Trong hỗn hợp theo giải pháp hữu ích, thành phần lactoza đóng vai trò là chất điều vị. Lactoza trong hỗn hợp giúp giảm vị đắng của các hoạt chất *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol và (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin. Tỷ lệ lactoza được sử dụng với lượng từ 5 đến 10%, cụ thể là 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10%.

Thành phần magie stearat đóng vai trò như chất làm trơn giúp cải thiện đặc tính và chất lượng của hỗn hợp. Thành phần magie stearat còn giúp giải phóng chậm hoạt chất. Trong hỗn hợp theo giải pháp hữu ích, thành phần magie stearat đóng vai trò là tá dược tạo độ trơn và lâu tan cho hỗn hợp. Magie stearat được sử dụng trong hỗn hợp theo giải pháp hữu ích với lượng từ 3 đến 7%, cụ thể là 3, 4, 5, 6 hoặc 7%.

Theo phương án cụ thể chế phẩm để hỗ trợ điều trị viêm theo giải pháp hữu ích bao gồm 70% hỗn hợp và 30% tá dược (theo trọng lượng).

Theo các phương án cụ thể, hỗn hợp có trong chế phẩm theo giải pháp hữu ích được chiết từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) bao gồm 5 hoạt chất hydroxychavicol, *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol, 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol, cafeoyl aldehyt và (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin. Theo phương án cụ thể, tỷ lệ giữa các thành phần trong hỗn hợp này (theo % trọng lượng) bao gồm từ 20 đến 40% hydroxychavicol, từ 15 đến 30% *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol, từ 15 đến 30% cafeoyl aldehyt, từ 8 đến 20% 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol và từ 5 đến 15% (-)-(6aR,7R)-*N*-axetylnorushinsunin.

Theo các phương án ưu tiên, chế phẩm để hỗ trợ điều trị viêm theo giải pháp hữu ích được sử dụng để hỗ trợ điều trị các bệnh viêm do sung phù, u hạt và viêm khớp.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Sản xuất các hoạt chất 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 cloroform 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 cloroform và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết cloroform (PHC, 110 g). Bổ sung 5,4 L etyl axetat vào phân đoạn nước (1,8 L), 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 etyl axetat và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết cloroform (PHE, 193 g). Cao chiết PHC (110 g) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh, sau đó sử dụng hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 15/1, 12/1, 10/1, 8/1, 6/1, 4/1, 3/1 và 2/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn *n*-hexan/axeton có tỷ lệ 6/1, 3/1 và 2/1 có kí hiệu lần lượt là PHC-5 (15,3 g), PHC-3 (11,5 g) và PHC-2 (18,4 g). Cao chiết etyl axetat (193 g) cũng được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh, sau đó sử dụng hệ dung môi rửa giải là diclometan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 100/1, 50/1 và 20/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn có kí hiệu là PFE-3 (20,8 g).

Phân đoạn có kí hiệu PHC-5 được nhồi 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 axeton/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/1, 2/1, 3/1 và 4/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất hydroxychavicol dạng dầu, không màu và có

công thức (1). Phân đoạn có kí hiệu PHC-3 cũng được nhồi 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 axeton/nước lần lượt theo tỷ lệ 2/1, 3/1 và 4/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất *N*-3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol dạng rắn vô định hình, màu vàng có công thức (2) và hoạt chất (–)-(6*aR*,7*R*)-*N*-axetyl norushinsunin tinh thể hình kim, không màu có công thức (3). Phân đoạn có kí hiệu PHC-2 được nhồi 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 metanol/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/1, 3/1, 5/1, 7/1 và 10/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất 4-(3-metoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol dạng rắn, màu vàng nhạt và công thức (4). Phân đoạn có kí hiệu PHE-3 được nhồi 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 acetonitrile/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/2 và 1/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất cafeoyl aldehyt dạng rắn, màu trắng và có công thức (5).

Ví dụ 2: Định tính và định lượng các hoạt chất được tách và tinh chế từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*)

Đặc tính của hoạt chất có công thức (1)

- Tên theo IUPAC: 4-allylbenzene-1,2-diol.

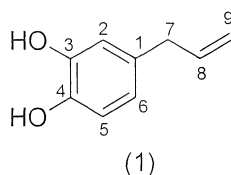
- Mô tả: Chất dạng dầu, không màu, tan tốt trong dung môi chloroform và axeton. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo trắng sẵn 60 RP-18 F_{254S} (Merck), dung môi triển khai là axeton/nước = 4/1 (v/v); $R_f = 0,50$.

- CTPT: C₉H₁₀O₂ (M=150).

- Phổ khối phân giải cao HREIMS m/z 150.0681 [M]⁺.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 6,73 (1H, d, $J = 1,6$ Hz, H-2); 6,81 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5); 6,64 (1H, dd, $J = 1,6; 8,0$ Hz, H-6); 2,28 (2H, d, $J = 6,8$ Hz, H-7); 5,93 (1H, m, H-8); 5,08 (1H, m, H-9a); 5,05 (1H, m, H-9b); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 137,7 (C-1); 115,8 (C-2); 141,7 (C-3); 143,3 (C-4); 116,0 (C-5); 121,3 (C-6); 39,6 (C-7); 133,6 (C-8); 115,7 (C-9).

- Cấu trúc hóa học:



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

Đặc tính của hoạt chất có công thức (2)

- Tên theo IUPAC: (*E*)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-(1*H*-pyrrol-1-yl)prop-2-en-1-one.

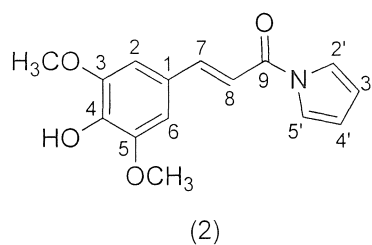
- Mô tả: Chất dạng rắn vô định hình, màu vàng, tan tốt trong dung môi axeton và metanol. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo trắng sẵn 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck), dung môi triển khai là metanol/nước = 3/1 (v/v); $R_f = 0,45$.

- CTPT: C₁₅H₁₅NO₄ (M=273).

- Phổ khối phân giải cao HREIMS m/z 273.1001 [M]⁺.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ_H (ppm): 7,21 (2H, s, H-2/H-6); 7,89 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-7); 7,45 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-8); 7,61 (2H, t, $J = 2,4$ Hz, H-2'/H-5'); 7,61 (2H, t, $J = 2,4$ Hz, H-3'/H-4'); 3,90 (6H, s, 3,5-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, Acetone-*d*₆) δ_C (ppm): 126,2 (C-1); 107,7 (C-2/C-6); 149,1 (C-3/C-5); 140,3 (C-4); 149,0 (C-7); 113,9 (C-8); 163,9 (C-9); 120,2 (C-2'/C-5'); 113,5 (C-3'/C-4'); 56,8 (3,5-OCH₃).

- Cấu trúc hóa học:



Cấu trúc hóa học của hoạt chất có công thức (2) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hoạt chất hóa học và khẳng định rằng hoạt chất có công thức (2) là hoạt chất có tên *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol.

Đặc tính của hoạt chất có công thức (3)

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

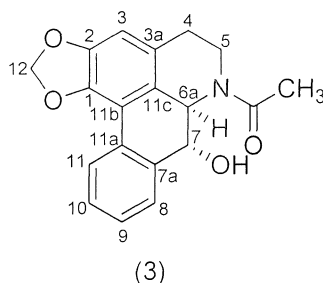
- Mô tả: Chất dạng tinh thể hình kim, không màu, tan tốt trong dung môi chloroform và metanol. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo trắng sẵn 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck), dung môi triển khai là metanol/nước = 3/1 (v/v); $R_f = 0,40$.

- 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:



Cấu trúc hóa học của hoạt chất có công thức (3) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hoạt chất hóa học và khẳng định rằng hoạt chất có công thức (3) là hoạt chất có tên (-)-(6aR,7R)-N-axetylnorushinsunin.

Đặc tính của hoạt chất có công thức (4)

- Tên theo IUPAC: 4-(3-metoxyl-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol.

- Mô tả: Chất dạng rắn, màu vàng nhạt, tan tốt trong dung môi 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 = 5/1 (v/v); $R_f = 0,50$.

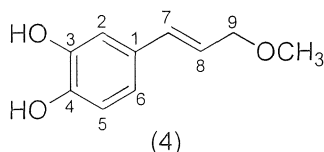
- CTPT: C₁₀H₁₂O₃ (M=180).

- Phổ khối phân giải thấp ESIMS m/z 181.1 [M + H]⁺.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ_H (ppm): 6,84 (1H, br s, H-2); 6,69 (1H, dd, $J = 1,2; 8,4$ Hz, H-6); 6,66 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5); 6,42 (1H, d, J

= 16,0 Hz, H-7); 6,01 (1H, td, $J = 6,4$; 16,0 Hz, H-8); 3,99 (2H, dd, $J = 1,2$; 6,4 Hz, H-9); 3,33 (3H, s, 9-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ_c (ppm): 130,4 (C-1); 114,0 (C-2); 146,7 (C-3); 146,5 (C-4); 116,4 (C-5); 120,1 (C-6); 134,6 (C-7); 123,4 (C-8); 74,5 (C-9); 58,0 (9-OCH₃).

- Cấu trúc hóa học:



Hoạt chất có công thức (4) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hoạt chất hóa học và khẳng định rằng hoạt chất có công thức (4) là hoạt chất có tên 4-(3-metoxyl-propen-1-yl)-1,2-benzendiol.

Đặc tính của hoạt chất có công thức (5)

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

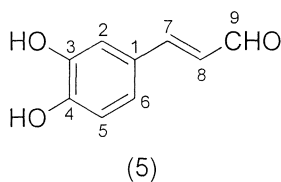
- Mô tả: Chất dạng rắn, màu trắng, tan tốt trong dung môi metanol. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo tráng sẵn 60 RP-18 F₂₅₄s (Merck), dung môi triển khai là metanol/nước = 1/1 (v/v); $R_f = 0,40$.

- 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:



Cấu trúc hóa học của hoạt chất có công thức (5) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hoạt chất hóa học và khẳng định rằng hoạt chất có công thức (5) là hoạt chất có tên cafeoyl aldehyt.

Ví dụ 3: Sản xuất hỗn hợp có tác dụng ức chế sự sản sinh NO

Để sản xuất hỗn hợp có tác dụng ức chế sự sản sinh NO, tiến hành cân lần lượt 350 mg hoạt chất hydroxychavicol, 200 mg hoạt chất *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol, 200 mg hoạt chất cafeoyl aldehyt, 150 mg hoạt chất 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol và 100 mg hoạt chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-acetylnorushinsunin thu được từ Ví dụ 1, tiến hành trộn đều trên thiết bị trộn đến khi thu được hỗn hợp đồng nhất, sau đó bổ sung một lượng vừa đủ ethanol để hòa tan hoàn toàn hỗn hợp. Sau khi sấy khô trên thiết bị sấy tầng sôi, nghiền mịn, thu được 1,0 g hỗn hợp dạng bột (bột PHCE).

Ví dụ 4: Xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hỗn hợp trên dòng tế 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:

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 $^{\circ}$ 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 hỗn hợp hoặc các hoạt chất (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 hỗn hợp và các hoạt chất thu được từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*)

STT	Hỗn hợp/hoạt chất	Ký hiệu	% ức chế (tại nồng độ 10 µg/mL)
1	Hỗn hợp	PHCE	115,2 ± 2,8
2	Hydroxychavicol	PH-1	90,2 ± 3,6
3	<i>N</i> -3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol	PH-2	84,1 ± 4,5
4	Cafeoyl aldehyt	PH-3	76,0 ± 1,2
5	4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol	PH-4	68,2 ± 2,4
6	(-)-(6a <i>R</i> ,7 <i>R</i>)- <i>N</i> -axetyl norushinsunin	PH-5	44,2 ± 3,2
7	Celastrol		116,8 ± 1,0

Kết quả bảng 1 cho thấy tại nồng độ 10 µg/mL, 03 hoạt chất PH-1, PH-2 và PH-3 đều thể hiện khả năng ức chế sự sản sinh NO với giá trị ức chế trong khoảng 76,0 – 90,2%. Hoạt chất PH-5 có tác dụng ức chế yếu nhất sự sản sinh NO (44,2%), tiếp đến là hoạt chất PH-4 với giá trị ức chế là 68,2%. Trong các mẫu thử, hỗn hợp PHCE có tác dụng ức chế sự sản sinh NO mạnh nhất (115,2%) và mạnh tương đương với chất đối chứng dương-Celastrol (116,8%). Hỗn hợp PHCE chứa 5 hoạt chất bao gồm hydroxychavicol, *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol, cafeoyl aldehyt, 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol và (-)-(6a*R*,7*R*)-*N*-axetyl norushinsunin, trong đó 4 hoạt chất bao gồm hydroxychavicol, *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol, cafeoyl aldehyt và 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol đã được chứng minh có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO và đóng vai trò quyết định đến hoạt tính sinh học của hỗn hợp (V. D. Hoang, P. H. Nguyen, M. H. Tran, N. T. Huynh, H. T. Nguyen, B. S. Min, D. C. To. Identification of Anti-inflammatory Constituents from Vietnamese *Piper hymenophyllum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2020, 30, 312–316). Hoạt chất còn lại, (-)-(6a*R*,7*R*)-*N*-axetyl norushinsunin được biết đến có tác dụng ức chế yếu sự sản sinh NO. Ba trong bốn hoạt chất chính trong hỗn hợp PHCE bao gồm hydroxychavicol, *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol và cafeoyl aldehyt ngoài chiếm 75% hỗn hợp (về khối lượng) thì chúng còn có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 4,5, 7,2 và 9,3 µM (V. D. Hoang, P. H. Nguyen, M. H. Tran, N. T. Huynh, H. T. Nguyen, B. S. Min, D. C. To. Identification of Anti-inflammatory Constituents from Vietnamese *Piper hymenophyllum*. *Revista Brasileira de*

Farmacognosia, 2020, 30, 312–316). Hoạt chất còn lại trong 4 hoạt chất chính, 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol ngoài chiếm 15% hỗn hợp PHCE (về khối lượng) thì còn có tác dụng ức chế trung bình sự sản sinh NO với giá trị $IC_{50} = 25,0 \mu M$ (V. D. Hoang, P. H. Nguyen, M. H. Tran, N. T. Huynh, H. T. Nguyen, B. S. Min, D. C To. Identification of Anti-inflammatory Constituents from Vietnamese *Piper hymenophyllum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2020, 30, 312–316). Những kết quả trên đã lí giải được 4 hoạt chất chính tạo nên hỗn hợp PHCE có tác dụng hiệp đồng rất mạnh ức chế sự sản sinh NO (116,2%).

Ví dụ 5: Sản xuất chế phẩm hỗ trợ điều trị bệnh viêm

Cân lấy 4 g hỗn hợp bột PHCE thu được từ Ví dụ 3, nghiền mịn và rây qua lưới cỡ lỗ 0,75mm. Các thành phần tá được bao gồm canxi cacbonat, tinh bột mỳ, lactoza và magie stearat được nghiền và rây qua lưới cỡ lỗ 0,75mm để thu các dạng bột mịn.

Phối trộn lần lượt 4 g hỗn hợp bột PHCE với 0,2 g canxi cacbonat. Tiếp đó là phối trộn với 0,4g tinh bột mỳ. Sau khi trộn đều, phối trộn tiếp với 0,32g lactoza và trộn đều thu được hỗn hợp bột khô. Quá trình này có thể được thực hiện trong thiết bị trộn trong 15 phút để thu được hỗn hợp bột đồng đều.

Trong bước thu chế phẩm dạng cốm trơn, tiến hành phối trộn 0,2g magie stearat với 4,92g hỗn hợp bột khô. Tiếp đó, hỗn hợp bột khô này được chuyển vào thiết bị xát để thu chế phẩm dạng cốm trơn (chế phẩm CPTV) hỗ trợ điều trị bệnh viêm.

Ví dụ 6: Tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột cống trắng bằng carrageenan của chế phẩm CPTV

Tác dụng chống viêm cấp được đánh giá trên mô hình gây phù chân chuột cống trắng bằng carrageenan, theo phương pháp của Winter và cộng sự (C.A. Winter, E.A. Risley, G.W. Nuss. Carrageenan induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti inflammatory drug. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1962, 111, 544-574). Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên làm 4 lô, mỗi lô 10 con: Lô 1 (lô chứng): uống nước cất; Lô 2 (tham chiếu): uống diclofenac sodium liều 15mg/kg/ngày; Lô 3 (lô trị 1): uống chế phẩm CPTV liều 17mg/kg/ngày; Lô 4 (Lô trị 2): uống chế phẩm CPTV liều 34mg/kg/ngày. Chuột được uống thuốc hoặc nước cất 5 ngày liên tục trước khi gây viêm. Ngày thứ 5, sau khi uống thuốc thử 1 giờ, chuột được gây viêm bằng cách tiêm carrageenan 1% (pha trong nước muối sinh lý, ngay trước khi tiêm) 0,1 mL/chuột vào gan bàn chân sau, bên phải của chuột. Chuột được nhin dõi qua đêm, nước uống tự do. Đo thể

tích chân chuột (đến khớp cổ chân) bằng máy đo thể tích bàn chân chuột (*Plethysmometer*) vào các thời điểm: Trước khi gây viêm (V_0); sau khi gây viêm 2 giờ (V_2), 4 giờ (V_4) và 6 giờ (V_6) và 24 giờ (V_{24}). Mức độ tăng thể tích chân chuột được tính theo công thức:

$$X\% = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Trong đó:

- + $X\%$ là tỷ lệ % tăng thể tích bàn chân chuột
- + V_0 là thể tích bàn chân chuột ngay sau khi tiêm carrageenan.
- + V_t là V_2 , V_4 , V_6 và V_{24} (thể tích bàn chân chuột ở các thời điểm sau 2, 4, 6 và 24 giờ sau khi tiêm carrageenan).

Tác dụng ức chế viêm cấp được biểu thị bằng % giảm mức độ tăng thể tích bàn chân chuột của lô dùng thuốc nghiên cứu so với mức độ tăng của lô chứng sinh lý và được tính theo công thức:

$$Y\% = \frac{M_c - M_t}{M_c} \times 100$$

Trong đó:

$Y\%$ là tỷ lệ % giảm mức độ phù bàn chân chuột;

M_c là tỷ lệ % tăng thể tích bàn chân chuột lô đối chứng và M_t là tỷ lệ % tăng thể tích bàn chân chuột ở lô dùng thuốc nghiên cứu.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chế phẩm CPTV tới tỷ lệ % tăng thể tích bàn chân chuột ở các thời điểm sau gây viêm ($n = 10$).

Các lô thí nghiệm	% tăng thể tích bàn chân chuột ở các thời điểm sau gây viêm			
	X2%	X4%	X6%	X24%
Lô chứng	53,05 ± 7,16	58,45 ± 5,41	50,25 ± 6,35	14,02 ± 4,01
Diclofenac	28,98 ± 5,15	32,25 ± 6,26	31,06 ± 8,05	7,99 ± 3,95
Lô trị 1	29,92 ± 5,06	32,27 ± 5,35	31,55 ± 6,19	8,12 ± 2,87
Lô trị 2	28,98 ± 5,98	31,92 ± 4,23	30,25 ± 6,11	8,01 ± 3,64

Kết quả bảng 2 cho thấy ở tất cả các lô, chân chuột phù to nhất tại thời điểm sau gây viêm phù 4 giờ và tại thời điểm sau gây viêm phù 6 giờ đo thấy giảm dần. So với lô chứng sinh lý, tỷ lệ % tăng thể tích bàn chân chuột của các lô dùng chế phẩm CPTV và lô dùng diclofenac giảm rõ (sau tiêm carrageenan). Chế phẩm CPTV ở cả 2 liều dùng đều thể hiện rõ tác dụng chống viêm trên mô hình gây phù viêm chân chuột cống bằng carrageenan. Tác

dụng chống viêm được đánh giá thông qua mức độ ức chế tăng thể tích phù viêm, do đó tác dụng chống viêm của chế phẩm CPTV có xu hướng đáp ứng tăng theo mức liều.

Bảng 3. Tỷ lệ % ức chế (I%) phù viêm cấp bàn chân chuột.

Thời điểm sau gây phù	Tỷ lệ % ức chế phù viêm cấp bàn chân chuột (I%)		
	Chế phẩm CPTV liều 1	Chế phẩm CPTV liều 2	Diclofenac
Sau 4 giờ	41,58	42,19	42,07
Sau 6 giờ	39,91	41,26	40,14
Sau 24 giờ	39,02	39,64	39,34
Giá trị trung bình $\pm$ SD	40,17 $\pm$ 0,53	41,03 $\pm$ 2,12	40,52 $\pm$ 2,21

Kết quả bảng 3 cho thấy tại các thời điểm 4 giờ, 6 giờ và 24 giờ sau gây phù viêm, các lô dùng chế phẩm CPTV cũng như lô dùng diclofenac đều thể hiện rõ tác dụng ức chế phù viêm. Trung bình tỷ lệ % ức chế phù viêm ở các lô dùng chế phẩm CPTV liều 1, liều 2 và diclofenac lần lượt là 40,17%, 41,03% và 40,52%.

Ví dụ 7: Tác dụng chống viêm mạn theo mô hình gây u hạt trên chuột cống trắng của chế phẩm CPTV

Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên làm 4 lô, mỗi lô 10 con: Lô 1 (lô chứng): uống nước cất; Lô 2 (tham chiếu): uống diclofenac liều 15mg/kg/ngày; Lô 3 (lô trị 1): uống chế phẩm CPTV liều 17mg/kg/ngày (liều dự kiến có tác dụng); Lô 4 (Lô trị 2): uống chế phẩm CPTV liều 34mg /kg/ngày (gấp đôi liều 1).

Gây viêm mạn bằng cách cấy hạt amiant vô khuẩn ($30 \pm 0,1$ mg) đã tiệt trùng (sấy ở nhiệt độ 120 °C trong 1 giờ) vào dưới da lưng hai bên của chuột. Sau khi cấy u hạt, chuột được uống nước cất hoặc chế phẩm CPTV liên tục trong 6 ngày. Ngày thứ 7 tiến hành giết chuột bằng cloroform, bóc tách khối u hạt, sấy khô ở nhiệt độ 56 °C trong 18 giờ. Cân trọng lượng u hạt sau khi đã được sấy khô.

Bảng 4. Tác dụng giảm trọng lượng u hạt (mg/100 g) của chế phẩm CPTV (n = 10).

Lô	Trọng lượng trung bình u hạt	Tỷ lệ giảm trọng lượng u hạt (%)
Lô chứng	37,02 $\pm$ 5,68	0
Diclofenac	27,85 $\pm$ 5,05	23,87
Lô trị 1	28,54 $\pm$ 4,21	22,85
Lô trị 2	27,91 $\pm$ 5,64	23,92

Kết quả bảng 4 cho thấy cả diclofenac và chế phẩm CPTV ở 2 liều đều làm giảm khối lượng u hạt khi so với lô chứng. Trọng lượng trung bình u hạt ở lô dùng chế phẩm CPTV liều 2 là 27,91 mg và giảm hơn so với lô dùng chế phẩm CPTV liều 1 (28,54 mg).

Như vậy, từ những kết quả trên cho thấy bằng cách phối trộn 5 hoạt chất theo tỉ lệ tối ưu cho phép tạo hỗn hợp có hiệu quả ức chế mạnh sự sản sinh NO *in vitro*. Chế phẩm được sản xuất từ hỗn hợp và tá dược có tác dụng làm giảm sự tăng thể tích phù viêm bàn chân chuột và giảm trọng lượng u hạt *in vivo*. Điều này chứng tỏ rằng chế phẩm thu được từ hỗn hợp và các tá dược phối trộn theo tỉ lệ tối ưu có tác dụng hỗ trợ điều trị viêm.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Hỗn hợp ức chế mạnh sự sản sinh NO theo giải pháp hữu ích được phối trộn một cách chọn lọc 5 hoạt chất hydroxychavicol, *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol, 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol, cafeoyl aldehyt và (-)-(6a*R*,7*R*)-*N*-axetylnorushinsunin được chiết chọn lọc từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*). Việc thử nghiệm thành công và chứng minh hiệu quả của hỗn hợp cho phép mở ra hướng phát triển nguồn dược chất trên cơ sở các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên để phát triển thuốc điều trị bệnh viêm.

Hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO theo giải pháp hữu ích có hiệu quả tác dụng theo cách hiệp đồng. Bằng thực nghiệm đã chứng tỏ rằng, khi kết hợp 5 hoạt chất hydroxychavicol, *N*-3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinamoylpyrrol, 4-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol, cafeoyl aldehyt và (-)-(6a*R*,7*R*)-*N*-axetylnorushinsunin thu được từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) theo tỷ lệ thành phần 35/20/20/15/10 (w/w/w/w/w) theo trọng lượng, hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO *in vitro* thu được có hiệu quả hiệp đồng, hiệu quả cho thấy có tác dụng ức chế lên tới 115,2% và mạnh tương đương với chất đối chứng dương-Celastrol (116,8%). Điều này cho thấy hiệu quả vượt trội của hỗn hợp theo giải pháp hữu ích khi thử nghiệm khả năng ức chế sự sản sinh NO *in vitro* trên tế bào RAW264.7.

Quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO theo giải pháp hữu ích cho phép chiết chọn lọc từng phân đoạn và các hoạt chất có hoạt tính sinh học từ phần trên mặt đất cây tiêu lá mỏng (*Piper hymenophyllum*) với độ tinh khiết của từng hợp chất lên tới 98%. Điều này cho phép phát triển nguồn hoạt chất phục vụ cho công nghiệp dược.

Chế phẩm hỗ trợ điều trị bệnh viêm theo giải pháp hữu ích được thử nghiệm trên động vật, khả năng làm giảm sự tăng thể tích phù viêm bàn chân chuột và giảm trọng lượng u hạt của chế phẩm cho phép phát triển và sản xuất sản phẩm dưới dạng thuốc hoặc thực phẩm chức năng trong hỗ trợ điều trị các bệnh viêm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO 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 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 tỉ 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 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 cloroform 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 chloroform và cất loại dung môi thu được cao chiết chloroform (PHC), sau đó phân đoạn nước (không tan trong cloroform) 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 các hoạt chất của hỗn hợp bằng cách đưa cao chiết PHC lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh, sau đó sử dụng hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 15/1, 12/1, 10/1, 8/1, 6/1, 4/1, 3/1 và 2/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn *n*-hexan/axeton có tỷ lệ 6/1, 3/1 và 2/1 có kí hiệu lần lượt là PHC-5, PHC-3 và PHC-2; cao chiết etyl axetat thu được ở bước trên cũng được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel có kích cỡ 230 đến 400 mesh, sau đó sử dụng hệ dung môi rửa giải là diclometan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 100/1, 50/1 và 20/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn có kí hiệu là PHE-3;

e) thu các hoạt chất của hỗn hợp bằng cách đưa phân đoạn có kí hiệu PHC-5 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 axeton/nước lần lượt theo tỷ

lệ 1/1, 2/1, 3/1 và 4/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất hydroxychavicol dạng dầu, không màu;

phân đoạn có kí hiệu PHC-3 được nhồi 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 axeton/nước lần lượt theo tỷ lệ 2/1, 3/1 và 4/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất *N*-3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol dạng rắn vô định hình, màu vàng và hoạt chất $(-)-(6aR,7R)$ -*N*-axetylnorushinsunin tinh thể hình kim, không màu;

phân đoạn có kí hiệu PHC-2 được nhồi 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 metanol/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/1, 3/1, 5/1, 7/1 và 10/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất 4-(3-metoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol dạng rắn, màu vàng nhạt;

phân đoạn có kí hiệu PHE-3 được nhồi 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 acetonitrile/nước lần lượt theo tỷ lệ 1/2 và 1/1 (thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất cafeoyl aldehyt dạng rắn, màu trắng; và

f) thu hỗn hợp ức chế sự sản sinh NO bằng cách hòa tan 5 hoạt chất thu được ở bước e) theo tỷ lệ % trọng lượng sau:

hydroxychavicol:	20-40
<i>N</i> -3,5-dimetoxy-4-hydroxyxinamoylpyrol:	15-30
cafeoyl aldehyt:	15-30
4-(3-metoxy-1-propen-1-yl)-1,2-benzendiol:	8-20
$(-)-(6aR,7R)$ - <i>N</i> -axetylnorushinsunin:	5-15

vào một lượng vừa đủ etanol, sau khi sấy khô trên thiết bị sấy tầng sôi, nghiền mịn thu được hỗn hợp dạng bột.