



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

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

(11)



1-0047508

(51)<sup>2022.01</sup> C07D 307/00; C07D 307/77; A61K  
31/343; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2023-00973

(22) 17/02/2023

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/05/2023 422A

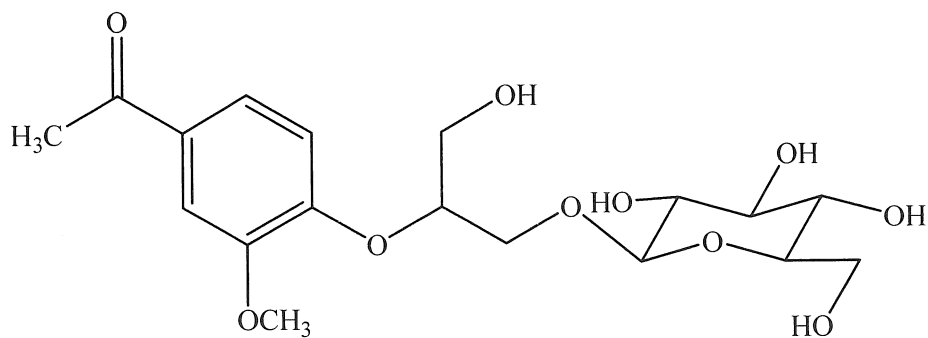
(73) Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội (VN)  
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, thành phố Hà Nội, Việt Nam

(72) Lê Thị Huyền (VN).

(54) HỢP CHẤT PIPERLONGOSIDE C CÓ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM VÀ  
PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI TIÊU LỐT PIPER  
LONGUM L.

(21) 1-2023-00973

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất piperlongoside C có công thức (I) và phương pháp phân lập hợp chất này từ phần trên mặt đất loài *P. longum* thu hái tại Mê Linh, Vĩnh Phúc. Hợp chất piperlongoside C và phương pháp phân lập các hợp chất theo sáng chế rất hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các sản phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị các triệu chứng viêm.



I

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên có tác dụng kháng viêm nhằm nghiên cứu ứng dụng để ức chế, điều trị các triệu chứng viêm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập và tác dụng kháng viêm của hợp chất piperlongoside C mới phân trên mặt đất loài tiêu lốt *Piper longum* L. ở Việt Nam.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

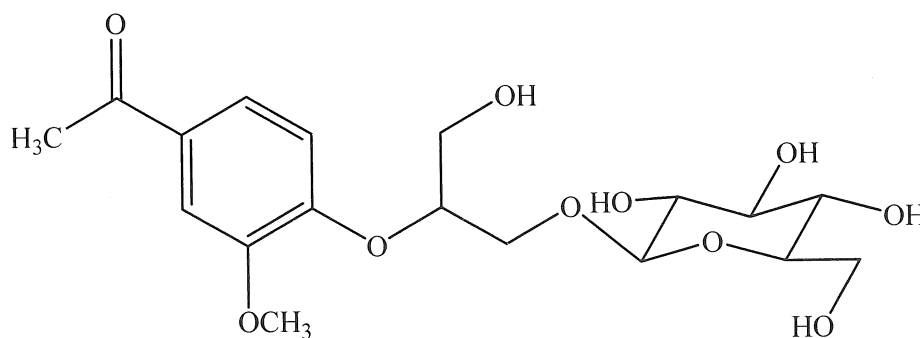
Việc nghiên cứu, phát hiện các hợp chất mới có hoạt tính sinh học từ thiên nhiên nhằm bảo vệ sức khỏe của con người là một trong những nhiệm vụ quan trọng đặt ra cho các nhà khoa học. Viêm là căn bệnh rất phổ biến ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Viêm là một chuỗi các hiện tượng do nhiều tác nhân như nhiễm trùng, các phản ứng miễn dịch, tổn thương do nhiệt hoặc vật lý gây ra các dấu hiệu lâm sàng đặc trưng: sưng, nóng, đỏ, và đau, do các mạch máu giãn nở, đưa nhiều máu đến nơi tổn thương. Các bạch cầu cũng theo mạch máu xâm nhập vào mô, tiết các chất nhằm tiêu diệt hoặc trung hòa các tác nhân gây tổn thương. Khi viêm không lành sẽ có thể trở thành viêm mạn tính. Trái ngược với các thuốc điều trị viêm theo con đường tổng hợp, các dược phẩm có nguồn gốc thiên nhiên dùng trong phác đồ điều trị viêm lại không xuất hiện các tác dụng phụ cho người bệnh. Đã từ lâu chúng được sử dụng để chữa các bệnh về viêm như: sốt, đau dạ dày, viêm khớp,... Theo tổng kết của một số công bố về hóa dược cho thấy các phenol và polyphenolic, terpenoid, flavonoid, saponin là các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên có hoạt tính chống viêm. Loài tiêu lốt *Piper longum* (*P. longum*) cũng thường được sử dụng để điều trị viêm. Do vậy, việc điều tra, nghiên cứu về thành phần loài tiêu lốt *P. longum*, đặc biệt là phát hiện ra hợp chất piperlongoside C mới từ phân trên mặt đất loài *P. longum* sẽ có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao. Nghiên cứu này sẽ góp phần làm rõ giá trị cũng như công dụng của loài tiêu lốt *P. longum*. Vì vậy, sẽ góp phần tích cực vào việc khai thác và sử dụng một cách hợp lý nguồn tài nguyên thiên nhiên của đất nước.

Trong khuôn khổ nghiên cứu, tập thể tác giả sáng chế đã đi sâu nghiên cứu thành phần hóa học của loài tiêu lốt *P. longum* và đã phân lập được hợp chất phenolic có cấu trúc hóa học mới là piperlongoside C. Đây là một phát hiện hoàn toàn mới, hợp chất này thuộc lớp

chất thiên nhiên có tác dụng kháng viêm nhằm nghiên cứu ứng dụng để ức chế, điều trị các triệu chứng viêm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập và tác dụng kháng viêm của hợp chất piperlongoside C chưa được phát hiện từ trước đến nay trên thế giới. Hợp chất này cũng được đánh giá tác dụng kháng viêm.

### Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp phân lập hợp chất piperlongoside C có công thức (I) từ phần trên mặt đất loài *P. Longum*:



I

trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) thái nhỏ mẫu là phần trên mặt đất loài *P. longum*, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó ngâm chiết siêu âm bột này với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C;

(ii) gom các dịch chiết ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol;

(iii) hòa tan cặn chiết metanol thu được ở trên với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, tiến hành loại bỏ dung môi các dịch chiết dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết *n*-hexan (PL-1), diclometan (PL-2), etyl axetat (PL-3) và dịch chiết nước (PL-4);

(iv) phân tách dịch chiết nước (PL-4) trên cột sắc ký diaion với chất hấp phụ là copolymer styrene-divinylbenzene (loại HP-20, đường kính 0,5 mm, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol (M) trong nước (W) là M/W tỉ lệ 25/75, 50/50, 75/25, 100/0 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ PL-4A đến PL-4D;

(v) gộp hai phân đoạn PL-4B và PL-4C với nhau, hòa tan hai phân đoạn này bằng lượng tối thiểu rượu metylic và được phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), hệ dung môi rửa giải diclometan/rượu metylic (tăng dần từ 40/1 đến 0/100, v/v) thu được 6 phân đoạn ký hiệu là PL-4E1 đến PL-4E6;

(vi) hòa tan phân đoạn phân đoạn PL-4E4 bằng lượng tối thiểu rượu metylic rồi tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50  $\mu\text{m}$ , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải rượu metylic/nước cất tỉ lệ 1/1 về thể tích, tạo ra bốn phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ PL-4E4A đến PL-4E4D;

(vii) phân tách phân đoạn PL-4E4A trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), hệ dung môi rửa giải diclometan/rượu metylic/nước cất tỉ lệ 5/1/0,1 về thể tích nhằm thu được 3 phân đoạn nhỏ hơn kí hiệu là PL-4E4A1 đến PL-4E4A3;

(viii) thu hợp chất piperlongoside C ở dạng chất rắn không màu từ phân đoạn PL-4E4A1 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (150  $\times$  200 mm), điều kiện dung môi axetonitril 16% trong nước.

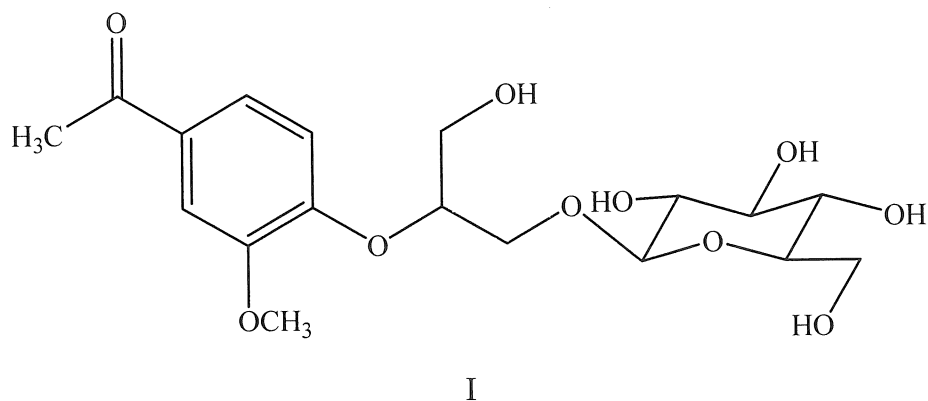
Mục đích khác của sáng chế là đề cập đến hợp chất piperlongoside C có công thức (I). Hợp chất piperlongoside C theo sáng chế thể hiện tác dụng kháng viêm có thể sử dụng để phát triển thành các sản phẩm hỗ trợ điều trị các bệnh có tác nhân gây viêm.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Mẫu trên mặt đất *P. longum* được thu tại Mê Linh, Vĩnh Phúc tháng 11 năm 2021. Tên khoa học được giám định bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Mẫu tiêu bản (NCCT-P136) được lưu giữ tại Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Mẫu *P. longum* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm 3 lần, mỗi lần 60 phút, với metanol ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần 20 lít, sau đó tiến hành chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hóa học theo các phương pháp mô tả dưới đây: Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn (loại DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715) hoặc RP18 F254s (Merck)). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng từ từ đến khi hiện màu. Sắc ký cột được

tiến hành với chất hấp phụ là silica gel hoặc pha đảo. Silica gel có cỡ hạt là 40-63  $\mu\text{m}$  (230-400 mesh, Merck). Pha đảo RP-18 (30 - 50  $\mu\text{m}$ , Fuji silysia Chemical Ltd). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruker AM600 FT NMR. Phổ khối lượng phân giải cao được đo trên máy Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hợp chất piperlongoside C có công thức (I):



Hợp chất piperlongoside C là hợp chất có cấu trúc hóa học mới. Các thông số hóa lý của các hợp chất này như sau:

Hợp chất piperlongoside C:

+ Công thức phân tử:  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ ;

+ Khối lượng phân tử:  $M = 402$ ;

Các thông số vật lý:

+ Chất rắn không màu;

+ Độ quay cực  $[\alpha]_D^{25} : +12,9^\circ$  ( $c$  0,03, MeOH);

+ UV (MeOH,  $c$  0,1 mg/mL)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ): 227 (1,80), 275 (1,68), 308 (1,54);

+ IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 3428, 2935, 1712, 1650, 1078  $\text{cm}^{-1}$ ;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại  $m/z$  420,1872  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  tính toán lý thuyết cho công thức  $[\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NO}_{10}]^+$ , tại  $m/z$  403,1596  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , tính toán lý thuyết cho công thức  $[\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{O}_{10}]^+$ , tại  $m/z$  425,1417  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , tính toán lý thuyết cho công thức  $[\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_{10}\text{Na}]^+$ .

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất piperlongoside C có công thức (I) từ phần trên mặt đất của cây *P. longum* như sau:

(i) thái nhỏ mẫu là phần trên mặt đất loài *P. longum*, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó ngâm chiết siêu âm bột này với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C;

(ii) gom các dịch chiết ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol;

(iii) hòa tan cặn chiết metanol thu được ở trên với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, tiến hành loại bỏ dung môi các dịch chiết dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết *n*-hexan (PL-1), diclometan (PL-2), etyl axetat (PL-3) và dịch chiết nước (PL-4);

(iv) phân tách dịch chiết nước (PL-4) trên cột sắc ký diaion với chất hấp phụ là copolymer styrene-divinylbenzene (loại HP-20, đường kính 0,5 mm, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ methanol (M) trong nước (W) là M/W tỉ lệ 25/75, 50/50, 75/25, 100/0 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ PL-4A đến PL-4D;

(v) gộp hai phân đoạn PL-4B và PL-4C với nhau, hòa tan hai phân đoạn này bằng lượng tối thiểu rượu metylic và được phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), hệ dung môi rửa giải diclometan/rượu metylic (tăng dần từ 40/1 đến 0/100, v/v) thu được 6 phân đoạn ký hiệu là PL-4E1 đến PL-4E6;

(vi) hòa tan phân đoạn phân đoạn PL-4E4 bằng lượng tối thiểu rượu metylic rồi tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50  $\mu$ m, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải rượu metylic/nước cất tỉ lệ 1/1 về thể tích, tạo ra bốn phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ PL-4E4A đến PL-4E4D;

(vii) phân tách phân đoạn PL-4E4A trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), hệ dung môi rửa giải diclometan/rượu metylic/nước cất tỉ lệ 5/1/0,1 về thể tích nhằm thu được 3 phân đoạn nhỏ hơn kí hiệu là PL-4E4A1 đến PL-4E4A3;

(viii) thu hợp chất piperlongoside C ở dạng chất rắn không màu từ phân đoạn PL-4E4A1 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (150  $\times$  200 mm), điều kiện dung môi axetonitril 16% trong nước.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập hợp chất piperlongoside C từ phần trên mặt đất của cây *P. longum*

Mẫu trên mặt đất cây *P. longum* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần 20 lít trong 60 phút.

Các dịch chiết ở bước (i) được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol.

Cặn chiết metanol được hòa tan với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích. Các dịch chiết được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết *n*-hexan (PL-1), diclometan (PL-2), etyl axetat (PL-3) và dịch chiết nước (PL-4).

Dịch chiết nước (PL-4) được tiến hành phân tách trên cột sắc ký diaion với chất hấp phụ là copolymer styrene-divynilbenzene (loại HP-20, đường kính 0,5 mm, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ methanol (M) trong nước (W) là M/W tỉ lệ 25/75, 50/50, 75/25, 100/0 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ PL-4A đến PL-4D.

Hai phân đoạn PL-4B (38g) và PL-4C (29g) được gộp lại với nhau, hòa tan hai phân đoạn này bằng lượng tối thiểu rượu metylic và được phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), hệ dung môi rửa giải diclometan/rượu metylic (tăng dần từ 40/1 đến 0/100, v/v) thu được 6 phân đoạn ký hiệu là PL-4E1 đến PL-4E6.

Hòa tan phân đoạn PL-4E4 (20g) bằng lượng tối thiểu rượu metylic rồi tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50  $\mu$ m, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải rượu metylic/nước cất tỉ lệ 1/1 về thể tích, tạo ra bốn phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ PL-4E4A đến PL-4E4D.

Phân đoạn PL-4E4A (1,9g) được tiếp tục phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), hệ

dung môi rửa giải diclometan/rượu metylic/nước cất tỉ lệ 5/1/0,1 về thể tích nhằm thu được 3 phân đoạn nhỏ hơn kí hiệu là PL-4E4A1 đến PL-4E4A3.

Hợp chất piperlongoside C thu được ở dạng chất rắn không màu từ phân đoạn PL-4E4A1 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (150 × 200 mm), điều kiện dung môi axetonitril 16% trong nước.

Hợp chất piperlongoside C có công thức (I):

+ Công thức phân tử:  $C_{18}H_{26}O_{10}$ ;

+ Khối lượng phân tử:  $M = 402$ ;

Các thông số vật lý:

+ Chất rắn không màu;

+ Độ quay cực  $[\alpha]_D^{25}$ : + 12,9° ( $c$  0,03, MeOH);

+ UV (MeOH,  $c$  0,1 mg/mL)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 227 (1,80), 275 (1,68), 308 (1,54);

+ IR  $\nu_{max}$  (KBr): 3428, 2935, 1712, 1650, 1078  $cm^{-1}$ ;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại  $m/z$  420,1872  $[M + NH_4]^+$  tính toán lý thuyết cho công thức  $[C_{18}H_{30}NO_{10}]^+$ , tại  $m/z$  403,1596  $[M + H]^+$ , tính toán lý thuyết cho công thức  $[C_{18}H_{27}O_{10}]^+$ , tại  $m/z$  425,1417  $[M + Na]^+$ , tính toán lý thuyết cho công thức  $[C_{18}H_{26}O_{10}Na]^+$ ;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Số liệu phổ  $^1H$ - và  $^{13}C$ -NMR ( $\delta$ , ppm) của hợp chất piperlongoside C

| C   | $\delta_C^a)$ | $\delta_H^a)$ (độ bội, $J = Hz$ ) |
|-----|---------------|-----------------------------------|
| 1   | 68,9          | 4,09 (dd, 11,4, 4,8)<br>3,90*     |
| 2   | 80,3          | 4,69 (m)                          |
| 3   | 62,1          | 3,86*/3,90*                       |
| 1'  | 104,9         | 4,36 (d, 7,8)                     |
| 2'  | 75,1          | 3,22 (dd, 9,0, 7,8)               |
| 3'  | 78,0          | 3,37 (t, 9,0)                     |
| 4'  | 71,6          | 3,21 (t, 9,0)                     |
| 5'  | 78,0          | 3,29 (m)                          |
| 6'  | 62,7          | 3,67 (dd, 12,0, 5,4)<br>3,84*     |
| 1'' | 153,6         | -                                 |
| 2'' | 151,3         | -                                 |

|                  |       |                     |
|------------------|-------|---------------------|
| 3"               | 112,5 | 7,58 (d, 1,8)       |
| 4"               | 132,2 | -                   |
| 5"               | 124,6 | 6,76 (dd, 8,4, 1,8) |
| 6"               | 115,7 | 7,23 (d, 8,4)       |
| 7"               | 199,4 | -                   |
| 8"               | 26,3  | 2,58 (s)            |
| OCH <sub>3</sub> | 56,5  | 3,91 (s)            |

<sup>a)</sup> Đo trong dung môi CD<sub>3</sub>OD, \*tín hiệu bị chồng chập

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác dụng dược lý của hợp chất piperlongoside C

Hợp chất piperlongoside C theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính kháng viêm như sau:

Xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào macrophage RAW 264.7

Tế bào RAW 264.7 được đưa vào đĩa 96 giếng ở nồng độ  $2 \times 10^5$  tb/giếng và nuôi trong tủ ẩm ở 37°C và 5% CO<sub>2</sub> trong 24h.

Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3h.

Tế bào sau đó được ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2h trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (1 µg/mL) trong 24h.

Một số giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm. Trong khi đối chứng dương được sử dụng là N<sup>G</sup>-Metyl-L-arginine axetat (L-NMMA) (Hãng Sigma) ở các nồng độ 100; 20; 4 và 0,8 µg/mL.

Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), được xem là chỉ thị cho việc tạo NO, sẽ được xác định nhờ bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể là, 100 µL môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 µL Griess reagent: 50 µL of 1% (w/v) sulfanilamide trong 5% (v/v) phosphoric acid và 50 µL 0,1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước.

Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrite sẽ được đo bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank).

Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO<sub>2</sub> và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).

Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định nhờ công thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{sample}} / \text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] * 100$$

Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC<sub>50</sub> (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

Phép thử sinh học xác định khả năng gây độc tế bào bằng MTT.

Chất thử (20 µl) được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ tương tự nồng độ của thí nghiệm NO.

Sau khi điều chỉnh để có mật độ tế bào phù hợp, hút 180 µL tế bào vào các giếng của khay 96 giếng đã có chất thử. Trên cùng một đĩa thử, bố trí một số giếng để làm đối chứng không có mẫu thử, chỉ có dung môi pha mẫu là DMSO 10%.

Đĩa nuôi cấy vào trong tủ ấm CO<sub>2</sub> ở điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, nuôi trong thời gian 72 giờ.

Sau 72 giờ, 10 µl MTT (nồng độ cuối cùng là 5 mg/mL) được cho vào mỗi giếng. Sau 4h, loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 50 µl (DMSO) 100%.

Giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm bằng máy quang phổ.

Lượng tế bào sống sót sẽ được tính theo công thức:

$$\% \text{ tế bào sống} = \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{blank})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{blank})}$$

Kết quả được biểu thị trên Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Kết quả hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất piperlongoside C trên tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS

| Hợp chất            | IC <sub>50</sub> (µM) | % sống sót tế bào (%) <sup>b</sup> |
|---------------------|-----------------------|------------------------------------|
| piperlongoside C    | 33,46 ± 2,13          | 95,13                              |
| L-NMMA <sup>a</sup> | 32,51 ± 3,70          | 91,50                              |

<sup>a</sup>) NG-Metyl-L-arginine axetat (L-NMMA) là chất đối chứng dương, <sup>b</sup>) tại nồng độ 100 µM

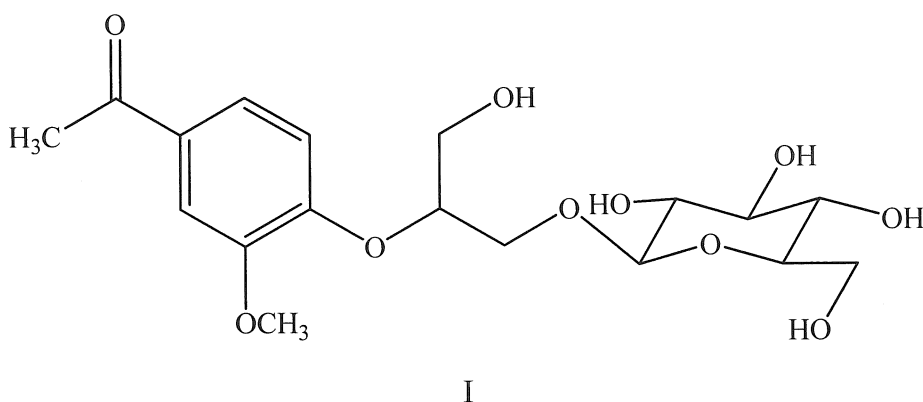
### Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất mới piperlongoside C từ phần trên mặt đất loài *P. longum* thu hái tại Mê Linh, Vĩnh Phúc. Hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng viêm tốt so với chất đối chứng L-NMMA. Sáng chế này tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng

hỗ trợ điều trị viêm dựa trên việc khai thác nguồn dược liệu quý, sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất piperlongoside C có công thức (I):



2. Phương pháp phân lập hợp chất piperlongoside C có công thức (I) theo điểm 1 từ phần trên mặt đất loài *P. longum*, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) thái nhỏ mẫu là phần trên mặt đất loài *P. longum*, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó ngâm chiết siêu âm bột này với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C;

(ii) gom các dịch chiết ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol;

(iii) hòa tan cặn chiết metanol thu được ở trên với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, tiến hành loại bỏ dung môi các dịch chiết dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết *n*-hexan (PL-1), diclometan (PL-2), etyl axetat (PL-3) và dịch chiết nước (PL-4);

(iv) phân tách dịch chiết nước (PL-4) trên cột sắc ký diaion với chất hấp phụ là copolymer styrene-divinylbenzene (loại HP-20, đường kính 0,5 mm, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol (M) trong nước (W) là M/W tỷ lệ 25/75, 50/50, 75/25, 100/0 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ PL-4A đến PL-4D;

(v) gộp hai phân đoạn PL-4B và PL-4C với nhau, hòa tan hai phân đoạn này bằng lượng tối thiểu rượu metylic và được phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), hệ dung môi rửa giải diclometan/rượu metylic (tăng dần từ 40/1 đến 0/100, v/v) thu được 6 phân đoạn ký hiệu là PL-4E1 đến PL-4E6;

(vi) hòa tan phân đoạn PL-4E4 bằng lượng tối thiểu rượu metylic rồi tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50  $\mu\text{m}$ , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải rượu metylic/nước cất tỉ lệ 1/1 về thể tích, tạo ra bốn phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ PL-4E4A đến PL-4E4D;

(vii) phân tách phân đoạn PL-4E4A trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), hệ dung môi rửa giải diclometan/rượu metylic/nước cất tỉ lệ 5/1/0,1 về thể tích nhằm thu được 3 phân đoạn nhỏ hơn kí hiệu là PL-4E4A1 đến PL-4E4A3;

(viii) thu hợp chất piperlongoside C ở dạng chất rắn không màu từ phân đoạn PL-4E4A1 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (150  $\times$  200 mm), điều kiện dung môi axetonitril 16% trong nước.