



(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)



2-0004458

(51) **C07D 311/02; A61K 36/48**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00516

(22) 24/11/2022

(45) 25/11/2025 452

(43) 27/05/2024 434

(73) Trường Đại học Phenikaa (VN)

Đường Nguyễn Văn Trác, Phường Yên Nghĩa, Quận Hà Đông, Thành Phố Hà Nội

(72) Hoàng Lê Minh (VN); Tô Đạo Cường (VN); Nguyễn Thị Ái Nhung (VN); Ngũ
Trường Nhân (VN).

(54) **QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ TÍNH CHẾ HỢP CHẤT SAPPANCHALCONE 3' -
METYL ETE CÓ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM TỪ CÂY CAESALPINIA
DECAPETALA VAR. JAPONICA**

(21) 2-2022-00516

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế hợp chất sappanchalcone 3'-methyl ete có tác dụng điều trị viêm từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*. Quy trình theo giải pháp bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*; c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất sappanchalcone 3'-methyl ete ; d) thu hợp chất sappanchalcone 3'-methyl ete thô; và e) tinh chế hợp chất sappanchalcone 3'-methyl ete. Hợp chất sappanchalcone 3'-methyl ete thu được từ quy trình theo giải pháp có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế sự sản sinh NO.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ hóa sinh và các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là giải pháp đề cập đến quy trình phân lập hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete lần đầu tiên từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*. Hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete thu được từ quy trình theo giải pháp này có thể được sử dụng trực tiếp hoặc phối hợp với các thảo dược khác để sản xuất sản phẩm có tác dụng điều trị các bệnh liên quan đến viêm.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Viêm là một phần của phản ứng sinh học phức tạp của cơ thể đối với các yếu tố bên ngoài gây hại ví dụ như: tế bào bị tổn thương vật lý, nhiễm mầm bệnh hoặc hấp thụ chất kích thích, phản ứng này liên quan đến rất nhiều bệnh như ung thư, tim mạch, bệnh phổi, tiểu đường type II, bệnh tự miễn, v.v.. Chức năng của phản ứng viêm là làm sạch các tế bào và mô hoại tử bị hư hại của tổn thương thứ cấp, loại bỏ nguyên nhân chấn thương sơ cấp để bắt đầu quá trình hồi phục cân bằng nội mô (Xem tài liệu của Medzhitov R. *Origin and physiological roles of inflammation*. *Nature*, 2008; 454: 428-435). Bốn dấu hiệu kinh điển của chứng viêm là sưng, nóng, đỏ, đau.

Viêm được phân loại là một cơ chế miễn dịch bẩm sinh. Phản ứng viêm kém sẽ dẫn đến các yếu tố có hại (ví dụ: vi khuẩn, dị vật) không được loại bỏ kịp thời và gây nguy cơ tử vong. Mặt khác, viêm mãn tính (phản ứng viêm kéo dài quá mức) lại liên quan đến nguyên nhân các chứng bệnh khác nhau, ví dụ: sốt cao co giật, xơ vữa động mạch, bệnh nha chu, viêm xương khớp, viêm cơ và màng ngoài tim.

Sử dụng thuốc điều trị là phương pháp chống viêm phổ biến nhất hiện nay. Các loại thuốc phổ biến nhất hiện nay được sử dụng để điều trị các bệnh viêm là các lớp thuốc corticosteroid, các thuốc kháng-histamin (Anti-histamine), các thuốc không steroid (NSAID), decongestant, kháng cholinergic, ổn định tế bào Mast, v/v (Đọc thêm NSAIDs, Steroids từ cơ quan y tế quốc gia Anh – NHS). Các loại thuốc này khi được sử dụng rộng rãi đã phát hiện rất nhiều tác dụng phụ thậm chí nguy hiểm đến tính mạng, điển hình như trong năm 2004 - 2005 Rofecoxib và Valdecoxib đã bị thu hồi do

có các tác dụng phụ liên quan đến như rối loạn tim mạch, phản ứng dị ứng có thể gây tử vong.

Do đó việc tìm kiếm các hợp chất mới có tác dụng điều trị viêm từ nguồn thiên nhiên, đặc biệt là nguồn được thay thế cho các loại thuốc tổng hợp rất cần được quan tâm và đầu tư nghiên cứu. Đối với chi *Caesalpinia*, các tác giả đã phát hiện ra tác dụng kháng viêm và chống ung thư (xem tài liệu của Muhammad S., Gilani U., Ahmed S., Baig S. G., Hasan M. M. *Ethnopharmacognosy, phytochemistry and pharmacology of genus Caesalpinia: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2019; 8: 2222-2229), chống oxi hóa (xem tài liệu của Pawar C.R., Surana S.J. *Antioxidant properties of the MeOH extract of the wood and pericarp of Caesalpinia decapetala. Journal of Young Pharmacists*, 2010; 2: 45-49), kháng virus (xem Zhang L., Chen J., Ke C., Zhang H., Zhang S., Tang W., Chen, X. *Ethanol extract of Caesalpinia decapetala inhibits influenza virus infection in vitro and in vivo. Viruses*, 2020; 12: 557; Xu J., Cao X., Liu F., Ma J., Liu X., Tong Guo Y. *Characterization of diterpenoids from Caesalpinia decapetala and their anti-TMV activities. Fitoterapia*, 2016; 113: 144-150), giảm đau-hạ sốt (xem Parveen A., Akash M. S. H., Rehman K., Mahmood Q., Qadir M. I. *Analgesic, anti-inflammatory and anti-pyretic activities of Caesalpinia decapetala. Bio Impacts* 2014; 4: 43-48) của các cao chiết và hợp chất phân lập được. Tuy nhiên, trong số các hợp chất có trong cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica* thì hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete thuộc khung chalcone có tác dụng kháng viêm là hợp chất mới được phát hiện lần đầu tiên từ cây này. Vấn đề tồn tại ở đây là chưa có phương pháp tách chiết và tinh chế hợp chất này từ cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*, từ đó có thể sử dụng trực tiếp hợp chất này hoặc phối hợp với các thảo dược khác để sản xuất sản phẩm có tác dụng điều trị các bệnh liên quan đến viêm.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete lần đầu tiên từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica* có tác dụng điều trị viêm và hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề xuất quy trình phân lập và tinh chế hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete có tác dụng ức chế sự sản sinh nitric oxit (NO) từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch, phơi khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ phòng và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,2 mm thu được nguyên liệu dạng bột;

b) chiết bột thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica* bằng cách bổ sung phần bột thu được ở bước a) vào dung môi metanol theo tỷ lệ 1/1,25 (khối lượng/thể tích), tiến hành chiết hồi lưu bột thân cây, thời gian chiết khoảng 4 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 75 đến 80°C, sau đó thu dịch chiết và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết metanol (CJM);

c) hòa tan cao chiết CJM bằng cách hòa tan cao chiết CJM vào nước nóng theo tỷ lệ 1/0,75 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết CJM thu được hỗn hợp dạng lỏng;

d) chiết bằng *n*-hexan bằng cách bổ sung *n*-hexan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước c) theo tỷ lệ 2/1 (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 *n*-hexan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết *n*-hexan (CJH), dịch nước còn lại được sử dụng để chiết bằng diclorometan;

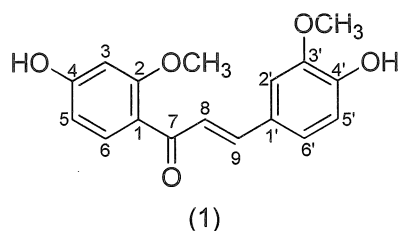
e) chiết bằng diclorometan bằng cách bổ sung diclorometan vào dịch nước còn lại thu được ở bước d) theo tỷ lệ 2/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi diclorometan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết diclorometan (CJD);

f) thu phân đoạn chứa hợp chất chalcone thô bằng cách đưa cao chiết CJD thu được ở bước e) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 74 đến 250 μm) và hệ dung môi rửa giải là diclorometan/metanol theo tỷ lệ 100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclorometan/metanol là 3/1 và có kí hiệu là CJD-6;

g) thu hợp chất chalcone thô bằng cách đưa phân đoạn CJD-6 thu được ở bước f) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 40 đến 63 μm) và hệ dung môi rửa giải là diclorometan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 2/1 và 1/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có kí hiệu là CJD-6.2;

i) tinh chế hợp chất chalcone bằng cách hòa tan phân đoạn có kí hiệu CJD-6.2 lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 (có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm) theo tỷ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (tỷ lệ 1/3 và 1/2, thể tích/thể tích) thu được hợp chất có công thức (1) dạng dầu, không màu.

Hợp chất chalcone thu được từ quy trình theo giải pháp có tên là sappanchalcone 3'-metyl ete và có công thức (1) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết bằng metanol đều được thực hiện 5 lần.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete có công thức (1) được sử dụng trực tiếp hoặc phối hợp với các thảo dược khác làm nguyên liệu sản xuất sản phẩm điều trị bệnh viêm.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp được mô tả một cách chi tiết với các phương án thực hiện quy trình phân lập và tinh chế hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete có tác dụng điều trị viêm từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica* và hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete 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 sappanchalcone 3'-metyl ete có tác dụng điều trị viêm từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*; c) thu các cao

chiết và phân đoạn chứa hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete; d) thu hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete thô; và e) tinh chế hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, thu thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch, sau đó phơi khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ phòng và xay nhỏ (đến kích thước 0,2mm) thu được nguyên liệu bột thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*.

Trong bước chiết nguyên liệu bột thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*, tiến hành chiết ba lần phần bột thu được ở trên bằng metanol theo tỷ lệ 1/1,25 (khối lượng/thể tích) bằng thiết bị chiết hồi lưu với thời gian chiết khoảng 4 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 75 đến 80°C. Sau khi chiết, dịch chiết được cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết metanol (CJM).

Trong bước hòa tan cao chiết CJM, hòa tan cao chiết CJM vào nước nóng theo tỷ lệ 1/0,75 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết CJM thu được hỗn hợp dạng lỏng.

Trong bước thu cao chiết *n*-hexan, bổ sung *n*-hexan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở trên theo tỷ lệ 2/1 (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 *n*-hexan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết *n*-hexan (CJH). Bước chiết bằng *n*-hexan được thực hiện 5 lần và dịch nước còn lại được sử dụng để chiết bằng diclorometan.

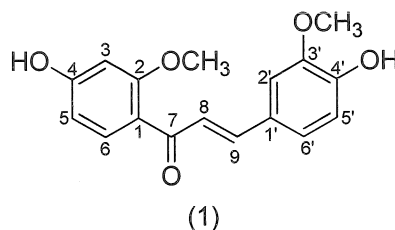
Trong bước thu cao chiết diclorometan, bổ sung diclorometan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở trên theo tỷ lệ 2/1 (thể tích/thể tích), sử dụng máy khuấy để khuấy đều hỗn hợp, sau đó bổ sung vào bình phân pha, lắc đều, để lắng trong vòng 1 giờ, thu phần hòa tan trong dung môi diclorometan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết diclorometan (CJD). Bước chiết bằng diclorometan được thực hiện 5 lần.

Trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất chalcone, đưa phân đoạn chứa cao chiết CJD lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 74 đến 250 μm) và hệ dung môi rửa giải là diclorometan/metanol theo tỷ lệ 100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ diclorometan/metanol là 3/1 và có kí hiệu là CJD-6.

Trong bước thu hợp chất chalcone thô, đưa phân đoạn CJD-6 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 40 đến 63 μm) và hệ dung môi rửa giải là diclorometan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 2/1 và 1/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có kí hiệu là CJD-6.2.

Trong bước tinh chế hợp chất chalcone, hòa tan phân đoạn có kí hiệu CJD-6.2 lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 (có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm) theo tỷ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (tỷ lệ 1/3 và 1/2, thể tích/thể tích) thu được hợp chất chalcone có công thức (1) dạng dầu, không màu.

Hợp chất chalcone thu được từ quy trình theo giải pháp có tên là sappanchalcone 3'-metyl ete và công thức (1) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết bằng metanol đều được thực hiện 5 lần.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete thu được bằng quy trình theo giải pháp, trong đó hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete 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 từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*.

Thu thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, rửa sạch, phơi khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ phòng sau đó nghiền nhỏ thành bột (có kích thước 0,2mm) và thu được 16 kg bột. Phần bột này được chiết 5 lần bằng metanol (5 x 20 L) bằng thiết bị chiết hồi lưu với thời gian chiết khoảng 4 giờ ở nhiệt độ 80°C, sau khi cô quay loại bỏ dung môi thu được cao metanol (CJM; 4 kg). Cao chiết CJM (4 kg) được hòa tan vào 3 L nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết CJM thu được hỗn hợp dạng lỏng. Bổ sung 14 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, thu phần hòa tan trong dung môi *n*-hexan và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết *n*-hexan (CJH; 715,1 g) và dịch nước còn lại. Bước chiết bằng *n*-hexan được thực hiện 5 lần. Dịch nước lại tiếp tục được bổ sung 12 L dung môi diclorometan, 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, cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết diclorometan (CJD; 408,5 g). Bước chiết bằng diclorometan được thực hiện 5 lần. Cao chiết CJD (408,5 g) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 74 đến 250 μm) và hệ dung môi rửa giải là diclorometan/metanol theo tỷ lệ 100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có tỷ lệ diclorometan/metanol là 3/1 và kí hiệu là CJD-6 (500 mg). Phân đoạn CJD-6.1 (500 mg) tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 40 đến 63 μm) và hệ dung môi rửa giải là diclorometan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 2/1 và 1/1 (thể tích/thể tích) thu phân đoạn có kí hiệu là CJD-6.2 (40 mg). Hòa tan phân đoạn có kí hiệu CJD-6.2 (40 mg) 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 (tỷ lệ 1/3 và 1/2, thể tích/thể tích) thu được hợp chất chalcone có tên là sappanchalcone 3'-metyl ete (5 mg) và có công thức (1) dạng dầu, không màu.

Ví dụ 2: Định tính và định lượng hợp chất chalcone được phân lập và tinh chế từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*.

Hợp chất dạng 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 có công thức (1)

- Tên theo IUPAC: (*E*)-1-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one.

- Mô tả: Hợp chất dạng dầu không màu, 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 F_{254S} (Merck), dung môi triển khai là metanol/nước = 1/2 (v/v); $R_f = 0,50$.

- CTPT: C₁₇H₁₆O₅ (M = 300).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4) δ_{H} (ppm): 7,90 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6'), 7,68 (1H, d, $J = 14,8$ Hz, H-9), 7,49 (1H, d, $J = 14,8$ Hz, H-8), 7,14 (1H, s, H-2'), 7,07 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6'), 6,78 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,38 (1H, dd, $J = 8,0$ Hz, H-5), 6,25 (1H, s, H-3), 3,78 (6H, s, 2,3'-OCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4) δ_{C} (ppm): 193,7 (C-7), 167,6 (C-4), 166,4 (C-2), 150,5 (C-4'), 146,9 (C-3'), 146,1 (C-9), 133,4 (C-6), 128,5 (C-1), 123,7 (C-6'), 118,4 (C-2'), 116,7 (C-8), 115,9 (C1'), 114,8 (C-5'), 109,2 (C-5), 103,9 (C-3), 56,8 (2,4'-OCH₃).

Cấu trúc hóa học của hợp chất có công thức (1) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hợp chất hóa học và khẳng định rằng hợp chất có công thức (1) là hợp chất có tên sappanchalcone 3'-metyl ete.

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete phân lập từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica* 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 vào 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 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 sappanchalcone 3'-metyl ete phân lập từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*.

Tế bào RAW 264,7 được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ 10^4 tế bào/giếng, ủ trong 12 giờ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Hút bỏ môi trường cũ và thay thế bằng môi trường chứa 1% FBS, ủ trong 6 giờ. Sau đó, thay môi trường cũ bằng môi trường có chứa hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete (hoặc đối chứng dương-Sappanone A) ở các nồng độ khác nhau và LPS nồng độ 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 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 isolariciresinol phân lập từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*.

Hợp chất	IC ₅₀ (μM)
Sappanchalcone 3'-metyl eter	10,89 ± 0,55
Sappanone A	8,32 ± 0,04

Tác dụng ức chế sự sản sinh NO của hợp chất sappanchalcone 3'-metyl eter được thể hiện ở bảng 1. Hợp chất sappanchalcone 3'-metyl eter có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO với giá trị IC₅₀ = 10,89 ± 0,55 (μM) và mạnh tương đương so với chất đối chứng dương-Sappanone A (IC₅₀ = 8,32 ± 0,04 μM). Với tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO, hợp chất sappanchalcone 3'-metyl eter rất có tiềm năng trong điều trị viêm, từ đó định hướng hợp chất này 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 phép phân lập và tinh chế hợp chất sappanchalcone 3'-metyl eter từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica* có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế mạnh sự sản sinh NO. Quy trình phân lập và tinh chế hợp chất sappanchalcone 3'-metyl eter là quy trình mới vì đây là hợp chất lần đầu tiên được tìm thấy trong thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*. Bằng cách sử dụng sắc ký cột và điều chỉnh hệ dung môi tối ưu, quy trình cho phép chiết được hoạt chất có hiệu suất chiết cao, từ đó 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.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập và tinh chế hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete có tác dụng kháng viêm từ thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ, phơi khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ phòng và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,2mm thu được nguyên liệu bột thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*;

b) chiết nguyên liệu bằng cách bổ sung phần bột thân cây *Caesalpinia decapetala* var. *japonica* vào dung môi metanol theo tỷ lệ 1/1,25 (khối lượng/thể tích), tiến hành chiết hồi lưu, thời gian chiết khoảng 4 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 75 đến 80°C, sau đó thu dịch chiết và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết metanol (CJM);

c) hòa tan cao chiết CJM bằng cách hòa tan cao chiết CJM thu được ở bước b) vào nước nóng theo tỉ lệ 1/0,75 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết CJM thu được hỗn hợp dạng lỏng;

d) chiết bằng *n*-hexan bằng cách bổ sung *n*-hexan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước c) theo tỷ lệ 2/1 (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 *n*-hexan và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết *n*-hexan (CJH), dịch nước còn lại được sử dụng để chiết bằng diclorometan;

e) chiết bằng diclorometan bằng cách bổ sung diclorometan vào dịch nước còn lại thu được ở bước d) theo tỷ lệ 2/1 (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 thu được cao chiết diclorometan (CJD);

f) thu phân đoạn chứa hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete thô bằng cách đưa cao chiết CJD thu được ở bước e) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 74 đến 250 μm) và hệ dung môi rửa giải là diclorometan/metanol theo tỷ lệ 100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclorometan/metanol là 3/1 có kí hiệu là CJD-6;

g) thu hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete thô bằng cách đưa phân đoạn CJD-6 thu được ở bước f) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ 40 đến 63 μm) và hệ dung môi rửa giải là diclorometan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 2/1 và 1/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có kí hiệu là CJD-6.2; và

h) tinh chế hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete bằng cách hòa tan phân đoạn có kí hiệu CJD-6.2 lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18 (có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm) theo tỷ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (tỷ lệ 1/3 và 1/2, thể tích/thể tích) thu được hợp chất sappanchalcone 3'-metyl ete dạng dầu, không màu và có công thức (1):

