



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0030863

(51)⁷ C07D 311/02; A61K 36/48 (13) B

(21) 1-2019-05594

(22) 11/10/2019

(45) 25/01/2022 406

(43) 25/12/2019 381A

(73) 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 HOẠT CHẤT CÓ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM TỪ GỖ CÂY TÔ MỘC (*CAESALPINIA SAPPAN L.*)

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm từ gỗ cây Tô Mộc (*Caesalpinia sappan L.*) thông qua ức chế sự sản sinh NO từ tế bào bị viêm nhiễm. Bằng cách sử dụng phức hệ dung môi bao gồm Tween 80 từ 5 đến 10% theo thể tích, etanol từ 70 đến 85% theo thể tích và nước từ 10 đến 25% theo thể tích và quá trình chiết được tiến hành trong điều kiện siêu âm với tần số nằm trong khoảng từ 40-60Hz trong thời gian từ 20 đến 40 phút cho phép chiết chọn lọc được hỗn hợp có tác dụng sinh học hiệp đồng. Bằng cách điều chỉnh điều kiện chiết, quy trình cho phép sản xuất được hỗn hợp hoạt chất tiềm năng phát triển thành dược phẩm và thực phẩm chức năng để trong hỗ trợ và điều trị các bệnh viêm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ hóa sinh và các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm từ gỗ Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.) và hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm trên cơ sở ức chế sự sản sinh NO trên tế bào.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các bệnh viêm là nguyên nhân hàng đầu gây ra bệnh ung thư, tim mạch, Alzheimer, tiểu đường typ II, xương khớp, tự miễn dịch, thần kinh, các bệnh về phổi. Tỷ lệ nhiễm, mức độ nghiêm trọng và sự phức tạp của các bệnh này đang gia tăng nhanh chóng, từ đó làm tăng đáng kể gánh nặng chi phí về chăm sóc sức khỏe.

Có nhiều phương pháp để điều trị viêm và một trong những phương pháp hay được sử dụng phổ biến hiện nay là sử dụng thuốc. Các loại thuốc phổ biến nhất hiện nay được sử dụng để điều trị các bệnh viêm là các lớp thuốc corticosteroid, các lớp chất antihistamin, các lớp chất không steroid, decongestants, chất kháng anticholinergic, chất ổn định tế bào Mast (C. A. Kontogiorgis and D. J. Hadjipavlou-Litina Non Steroidal Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 2002, 9, 89–98). Ngoài ra, các thuốc thay thế như thuốc kháng viêm/dị ứng không steroid (Non-steroidal alternative inflammatory drugs - NSAID) có nguồn gốc tổng hợp như clopheniramin, cetirizin, levocetirizin, diclofenac, acucali, bromfenac, nevanac cũng được sử dụng (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 Tô mộc (*Caesalpinia sappan*), các tác giả đã phát hiện ra tác dụng kháng viêm tốt của dịch chiết côn (S. Q. Wu, M. Otero, F. M. Unger, M. B. Goldring, A. Phrutivorapongkul, C. Chiari, A.

Kolb, H. Viernstein, S. Toegel. Anti-inflammatory activity of an ethanolic *Caesalpinia sappan* extract in human chondrocytes and macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 138, 364–372; M. A. Chowdhury, M. Choi, W. Ko, H. Lee, S. C. Kim, H. Oh, E. R. Woo, Y. C. Kim, D. S. Lee. Standardized microwave extract of *Sappan Lignum* exerts anti-inflammatory effects through inhibition of NF- κ B activation via regulation of heme oxygenase-1 expression. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 19, 1809–1816) và các hợp chất phân lập được từ gỗ Tô mộc (B. S. Min, T. D. Cuong, T. M. Hung, B. K. Min, B. S. Shin, M. H. Woo. Compounds from the heartwood of *Caesalpinia sappan* and their anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22, 7436–7439; T. D. Cuong, T. M. Hung, J. C. Kim, E. H. Kim, M. H. Woo, J. S. Choi, J. H. Lee, S. S. Min. Phenolic compounds from *Caesalpinia sappan* heartwood and their anti-inflammatory activity. *Journal of Natural Product*, 2012, 75, 2069–2075; B. S. Min, T. D. Cuong. Phenolic Compounds from *Caesalpinia sappan* and Their Inhibitory Effects on LPS-induced NO Production in RAW264.7 Cells. *Natural Product Sciences*, 2013, 19, 201–205). Trong các công bố ở trên, phương pháp chiết chủ yếu sử dụng các hệ dung môi hexan, cloroform, etyl axetat, axeton và metanol bằng cách ngâm, chiết hồi lưu, chiết soxhlet, chiết siêu tới hạn. Tuy nhiên, các phương pháp chiết này có nhược điểm là tiêu tốn năng lượng, thời gian chiết kéo dài, không chiết chọn lọc được các nhóm hoạt chất mong muốn và hiệu suất chiết rất thấp. Ngoài ra, các cao chiết/nhóm hoạt chất/hoạt chất của gỗ Tô mộc chủ yếu là các polyphenol, các polyphenol này khi chiết bằng các dung môi, ví dụ etyl axetat, axeton và metanol trong thời gian dài thì lại có khả năng bị biến đổi thành các hợp chất chuyển hóa khác, điều này không những ảnh hưởng đến hiệu suất chiết mà còn làm giảm tác dụng sinh học của các polyphenol thu được.

Trong những năm gần đây, có một số công bố liên quan đến tác dụng của các chất hoạt động bề mặt ảnh hưởng lớn đến hiệu suất chiết và tác dụng sinh học của các hợp chất polyphenol từ dược liệu. Cụ thể, chất hoạt động bề mặt Brij35 và Triton X-114 được chứng minh có hiệu suất chiết cao, hàm lượng tổng polyphenol cao và đặc biệt không làm mất hoạt tính sinh học của hoạt chất/nhóm hoạt chất thu được. (R. Hosseinzadeh, K. Khorsandi, S. Hemmaty. Study of the effect of surfactants on extraction and determination of polyphenolic compounds and antioxidant capacity of fruits extracts. *Plos one*, 2013, 8, 1–7).

Ngoài các chất hoạt động bề mặt kể trên, chất hoạt động bề mặt Tween 80 (ứng dụng nhiều trong thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm) có hoặc không kết hợp với các loại dung môi khác cũng được sử dụng để chiết các hợp chất polyphenol định hướng sản xuất chế phẩm với chi phí thấp, độc tính thấp và khả năng hòa tan cao. Li và cộng sự sử dụng Tween 80 kết hợp siêu âm để chiết polyphenol tổng (TPC) trong cây Trà mây với hiệu suất chiết lên đến 82,9% (F. Li, A. Raza, Y. W. Wang, X. Q. Xu, G. H. Chen. Optimization of surfactant-mediated, ultrasonic-assisted extraction of antioxidant polyphenols from Rattan tea (*Ampelopsis grossedentata*) using response surface methodology. *Pharmacognosy Magazine*, 2017, 13, 446–453). Một số công bố cũng đã sử dụng Tween 80 để chiết các hợp chất thơm từ các loài dược liệu cho hiệu suất cao, giá rẻ và thân thiện với môi trường (C. W. Jin, X. Y. Peng, X. Huang, S. C. Duan, X. Kong. Method for extracting flavone compounds from American ginseng leaves).

Các nghiên cứu trên đã chỉ ra đặc tính quý từ cây Tô mộc là khả năng kháng viêm, tuy nhiên hiện các kỹ thuật chiết polyphenol cho thấy hiệu suất chiết và hiệu quả kháng viêm thu được khá thấp. Do đó, cần có phương pháp chiết chọn lọc các hoạt chất polyphenol với hiệu suất cao cho phép dễ dàng chiết polyphenol từ gỗ cây Tô mộc nhằm phát triển nguồn nguyên liệu sản xuất dược phẩm để điều trị các bệnh viêm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là sáng chế đề xuất quy trình sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm từ gỗ cây Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.) và hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

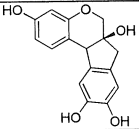
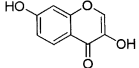
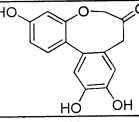
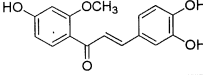
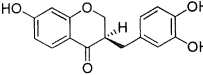
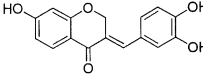
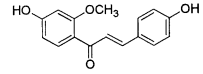
a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu gỗ cây Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.), tách bỏ phần vỏ, loại tạp chất và sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C rồi nghiền thu được bột gỗ Tô mộc;

b) chiết nguyên liệu bằng cách bổ sung phần bột gỗ Tô mộc vào phức hệ dung môi theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5 (khối lượng: thể tích), trong đó phức hệ

dung môi này có thành phần bao gồm Tween 80 từ 5 đến 10% theo thể tích, etanol từ 70 đến 85% theo thể tích và nước từ 10 đến 25% theo thể tích và quá trình chiết được tiến hành trong điều kiện siêu âm với tần số nằm trong khoảng từ 40-60Hz trong thời gian từ 20 đến 40 phút và nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 80 đến 100°C thu được phần dịch chiết;

c) loại bỏ tạp chất bằng cách cách ly tâm phần dịch chiết thu được với tốc độ ly tâm nằm trong khoảng từ 10.000 đến 15.000 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 10 đến 15 phút để loại bỏ hoàn toàn phần cặn, thu được phần dịch chiết; và

d) thu hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm bằng cách chuyển phần dịch chiết vào thiết bị cất quay đến khối lượng không đổi thu được hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm dạng bột mịn bao gồm các thành phần sau:

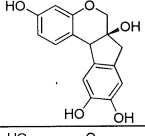
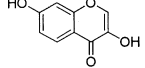
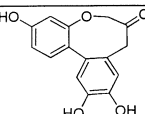
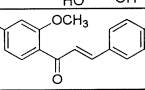
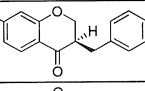
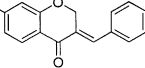
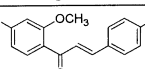
Thành phần	Công thức phân tử, MW)	Công thức cấu tạo	Tỷ lệ hàm lượng (%)
Brazilin	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		2-5
3,7-dihydroxychromen-4-on	$C_9H_6O_4$ (MW = 178)		25-30
Protosappanin A	$C_{15}H_{12}O_5$ (MW = 272)		30-35
Sapanchalcon	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		15-20
3-deoxysapanon B	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		10-12
Sapanon A	$C_{16}H_{12}O_5$ (MW = 284)		5-10
3-deoxysapanchalcon	$C_{16}H_{14}O_4$ (MW = 270)		0,3-1.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó trong đó phức hệ dung môi được sử dụng để chiết nguyên liệu là Tween 80:etanol:nước là 10:80:10 theo tỷ lệ % thể tích.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó nhiệt độ để chiết nguyên liệu là 90°C và tần số siêu âm là 50Hz, công suất siêu âm từ 180 đến 200W.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó thời gian chiết là 30 phút với nhiệt độ chiết là 90°C trong điều kiện siêu âm với tần số 50Hz và công suất siêu âm 195W.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm từ gỗ cây Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.) thu được từ quy trình sản xuất theo điểm 1, trong đó hỗn hợp này bao gồm các thành phần sau:

Thành phần	Công thức phân tử, (MW)	Công thức cấu tạo	Tỷ lệ hàm lượng (%)
Brazilin	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		2-5
3,7-dihydroxychromen-4-on	$C_9H_6O_4$ (MW = 178)		25-30
Protosappanin A	$C_{15}H_{12}O_5$ (MW = 272)		30-35
Sapanchalcon	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		15-20
3-deoxysapanon B	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		10-12
Sapanon A	$C_{16}H_{12}O_5$ (MW = 284)		5-10
3-deoxysapanchalcon	$C_{16}H_{14}O_4$ (MW = 270)		0,3-1.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Sắc ký đồ hỗn hợp thu được từ Ví dụ 1 sau khi phân tích bằng sắc ký lỏng ghép nối phổ khối (LC-MS) tại bước sóng $\lambda = 254$ nm.

Hình 2: Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất chiết hỗn hợp hoạt chất CSB-1.

Hình 3: Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng polyphenol tổng của hỗn hợp hoạt chất CSB-1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế 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 sáng chế chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Cây Tô mộc có tên khoa học là *Caesalpinia sappan* L. thuộc họ Vang (Caesalpinaceae), cây Tô mộc còn có tên gọi là Tô phượng, Vang nhuộm, Mạ vang. Cây Tô mộc là loại cây có gai, cao từ 6 đến 9 mét, đường kính thân khoảng từ 15 đến 25

cm mọc hoang, phân bố nhiều ở Đông Nam Á (P. S. Varier. Indian Medicinal Plants, A compendium of 500 species, Vol I, Orient Longman, 1994, p.323). Thành phần được sử dụng làm nguyên liệu theo sáng chế là thân gỗ của cây Tô mộc.

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm từ gỗ cây Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.) và hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết nguyên liệu; c) loại bỏ tạp chất; và d) thu hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, gỗ cây Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.) được thu hái, sau khi tách bỏ phần vỏ, loại tạp chất. Gỗ được chặt nhỏ và sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 70⁰C rồi nghiền thành bột. Cần lưu ý trong quá trình sấy gỗ, do thành phần polyphenol có trong gỗ rất dễ bị phân hủy nên nhiệt độ sấy không được vượt quá 75⁰C. Bột nguyên liệu có màu vàng đất, mùi thơm đặc trưng.

Trong bước chiết nguyên liệu, để chiết được các thành phần hoạt chất có trong nguyên liệu một cách chọn lọc, các tác giả đã nghiên cứu với nhiều loại dung môi và phát hiện ra rằng, hiệu suất chiết và hoạt tính và thành phần của hỗn hợp thu được từ gỗ cây Tô mộc phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện chiết, cụ thể là dung môi, thời gian, nhiệt độ chiết và điều kiện chiết.

Đối với dung môi, các tác giả đã nghiên cứu và nhận thấy rằng, đối với các loại dung môi mạnh như diclorometan, etyl axetat hoặc metanol cho phép chiết kiệt các thành phần hòa tan trong dung môi phân cực. Đối với cây Tô mộc, các thành phần polyphenol đã được khảo sát và các nhà nghiên cứu thường sử dụng các loại dung môi phân cực mạnh như etanol để chiết, sau đó phân tách các phân đoạn và khảo sát hoạt tính. Tuy nhiên, kỹ thuật chiết này không chọn lọc và chiết polyphenol tổng và ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt tính của thành phần thu được. Ví dụ, khi gỗ cây Tô mộc bằng metanol, mặc dù tỷ lệ chiết các hợp chất polyphenol tổng khá cao, nhưng hoạt tính sinh học thu được lại thấp. Ngược lại, với dung môi diclorometan, mặc dù hoạt tính sinh học của hỗn hợp thu được là khá rõ, tuy nhiên, hiệu suất chiết polyphenol tổng lại rất thấp, chỉ đạt 1,86%.

Kỹ thuật chiết không chọn lọc thường chiết cả các thành phần phụ đi kèm đóng vai trò như tạp chất. Các thành phần đi kèm nhiều khi có tác dụng ức chế các thành phần hoạt chất. Để tách các thành phần hoạt chất, cần nhiều kỹ thuật chiết, tách phức tạp và tốn kém khác. Các kỹ thuật tinh chế này về lý thuyết cho phép tách từng thành phần hoạt chất và trên cơ sở các hoạt chất này, các nhà nghiên cứu sẽ nhóm chúng thành nhóm các hoạt chất có cùng tác dụng để từ đó phát triển nguồn nguyên liệu hoặc nghiên cứu hoạt tính lâm sàng của hoạt chất. Tuy nhiên, việc làm này sẽ giảm hiệu suất chiết và không có ý nghĩa về mặt thực tiễn nên các kỹ thuật chiết này chỉ mang ý nghĩa về mặt nghiên cứu hàn lâm. Trong thực tế, không thể phát triển được nguyên liệu để sản xuất được phẩm theo phương pháp này vì chi phí sản xuất quá cao do hiệu suất chiết quá thấp. Trường hợp sử dụng các dung môi ít phân cực hơn hoặc dung môi trung tính, ví dụ, nước, việc chiết thường kéo dài, không hiệu quả và thường không kiểm soát được thành phần chiết.

Ngoài ra, tùy theo đặc tính của hoạt chất cần chiết tách, cũng biết rằng thời gian và nhiệt độ chiết không chỉ ảnh hưởng lớn đến thành phần mà còn ảnh hưởng lớn đến hoạt tính của sản phẩm thu được, đặc biệt là hoạt tính sinh học. Đối với các hoạt chất có nguồn gốc từ tự nhiên, ví dụ từ thực vật, động vật hoặc nấm, hoạt tính của hoạt chất thường bị bất hoạt nếu nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp. Nếu nhiệt độ quá cao, dưới tác dụng của nhiệt độ, hoạt chất bị biến tính, ngược lại nếu nhiệt độ thấp, việc chiết sẽ kéo dài và chiết không đặc hiệu và lẫn nhiều chất không mong muốn. Theo đó, các tác giả đã nghiên cứu vào phát hiện ra rằng, một số hợp chất polyphenol sẽ bị biến tính nếu quá trình ngâm chiết kéo dài. Khi đó lượng polyphenol thu được sẽ giảm và tăng lượng các hợp chất không mong muốn khác. Hay nói cách khác, ví dụ, với dung môi metanol, lượng polyphenol thu được có thể lớn, nhưng các thành phần có hoạt tính sinh học lại giảm. Hay nói cách khác, khi đó quá trình chiết là không đặc hiệu.

Do đó, các tác giả đã nghiên cứu, chọn lọc và bất ngờ phát hiện ra rằng, đối với cây Tô mộc, bằng cách điều chỉnh hệ dung môi chiết và điều kiện chiết cho phép chiết được phân đoạn các hoạt chất có hoạt tính hiệp đồng.

Phức hệ dung môi cải tiến để chiết chọn lọc nhóm hợp chất có tác dụng sinh học, cụ thể là tác dụng kháng viêm từ gỗ cây Tô mộc bao gồm Tween 80 từ 5 đến 10% theo thể tích, etanol từ 70 đến 85% theo thể tích và nước từ 10 đến 25% theo thể tích. Các

tác giả bất ngờ phát hiện ra, với hệ dung môi nêu trên cùng với và quá trình chiết được tiến hành trong điều kiện siêu âm với tần số nằm trong khoảng từ 40-60Hz trong thời gian từ 20 đến 40 phút và nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 80 đến 100°C sẽ thu được thành phần hoạt chất có tác dụng kháng viêm vượt trội.

Tween 80 còn gọi là Poly Sorbat 80 có tên danh pháp IUPAC là poly oxyetylen (20) monoleat sorbitan. Tween 80 là một dung dịch tổng hợp tan tốt trong nước và các dung môi hữu cơ, được sử dụng như một phụ gia giúp ổn định trạng thái kem, sữa, tạo nên một lớp liên kết, pha phân tán giúp ổn định, củng cố trạng thái của sản phẩm, giảm thiểu độ tan chảy. Lượng Tween 80 trong phức hệ dung môi từ 5 đến 10% thể tích. Theo các phương án ưu tiên, lượng Tween 80 có trong phức hệ dung môi này là 5, 6, 7, 8, 9, 10% theo thể tích hoặc với lượng bất kỳ nằm trong khoảng này.

Etanol đóng vai trò là dung môi chiết và thường được sử dụng rộng rãi để chiết polyphenol tổng. Trong phức hệ dung môi theo sáng chế, lượng etanol nằm trong khoảng từ 70 đến 85% theo thể tích. Theo các phương án ưu tiên, lượng etanol có trong phức hệ dung môi này là 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 80, 82, 83, 84, 85% theo thể tích hoặc với lượng bất kỳ nằm trong khoảng này.

Nước trong phức hệ dung môi có tác dụng pha loãng, cân bằng áp suất thẩm thấu và điện môi. Lượng nước có trong phức hệ dung môi từ 10 đến 25% theo thể tích. Theo các phương án ưu tiên, lượng nước có trong phức hệ dung môi này là 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 25% hoặc với lượng bất kỳ nằm trong khoảng này.

Theo một phương án ưu tiên cụ thể, phức hệ dung môi được sử dụng để chiết nguyên liệu là Tween 80:etanol:nước là 10:80:10 theo tỷ lệ % thể tích.

Cần lưu ý rằng, mặc dù đã biết đặc tính của Tween 80 và etanol, tuy nhiên, chưa có một công bố hay nghiên cứu nào liên quan đến việc phối trộn Tween 80 và etanol để chiết các thành phần hoạt chất có tác dụng kháng viêm từ gỗ cây Tô mộc. Ngoài ra, cũng không có công bố nào mô tả chiết chọn lọc này nên cơ chế chiết của phức hệ dung môi này là bất ngờ và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này không thể dựa vào các dung môi độc lập để thu được phức hệ dung môi có đặc tính chiết chọn lọc các hoạt chất có tác dụng kháng viêm từ gỗ cây Tô mộc.

Theo đó, bột gỗ Tô mộc được bổ sung vào phức hệ dung môi bao gồm Tween 80 có tỷ lệ từ 5 đến 10% thể tích, etanol có tỷ lệ từ 70 đến 85% thể tích và nước có tỷ lệ từ 10 đến 25% thể tích theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5 (trọng lượng/thể tích). Điều kiện chiết được thực hiện trong điều kiện chiết siêu âm để rút ngắn quá trình chiết và bảo vệ được các thành phần có hoạt tính sinh học trong chế phẩm. Thời gian chiết siêu âm từ 20 đến 40 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 80 đến 100°C. Nhiệt độ chiết không được vượt quá 100°C vì nếu vượt quá nhiệt độ này, phần lớn polyphenol sẽ bị phân hủy. Tốt hơn là nhiệt độ chiết là 90°C trong điều kiện chiết với Tween 80 có tỷ lệ 10% (v/v), etanol có tỷ lệ 80% (v/v) và nước có tỷ lệ 10% (v/v) trong điều kiện chiết siêu âm. Điều kiện chiết siêu âm được thực hiện trong thiết bị siêu âm có công suất 180-220 W, tần số 40-60 kHz.

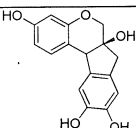
Theo một phương án ưu tiên cụ thể khác, trong đó nhiệt độ để chiết nguyên liệu là 90°C và tần số siêu âm là 50Hz, công suất siêu âm từ 180 đến 200W.

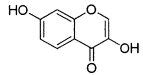
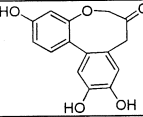
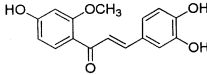
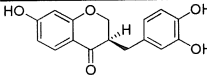
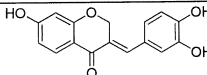
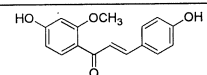
Theo một phương án ưu tiên cụ thể khác trong đó thời gian chiết là 30 phút với nhiệt độ chiết là 90°C trong điều kiện siêu âm với tần số 50Hz và công suất siêu âm 195W.

Với mục đích chiết chọn lọc, việc không chế thời gian và nhiệt độ chiết cũng như chiết trong điều kiện siêu âm được theo sáng chế không chỉ giúp chiết được thành phần hoạt tính có từ gỗ cây Tô mộc, mà còn giảm được lượng tạp chất đi kèm đồng thời còn tăng hiệu quả chiết.

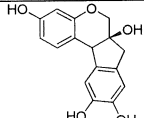
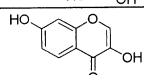
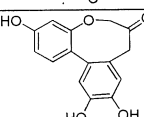
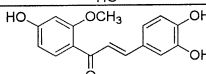
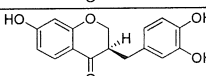
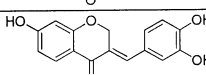
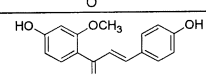
Trong bước loại bỏ tạp chất bằng cách cách ly tâm phần dịch chiết thu được với tốc độ ly tâm nằm trong khoảng từ 10.000 đến 15.000 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 10 đến 15 phút để loại bỏ hoàn toàn phần cặn, thu được phần dịch chiết.

Trong bước thu hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm bằng cách chuyển phần dịch chiết vào thiết bị cất quay đến khối lượng không đổi thu được hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm dạng bột mịn bao gồm các thành phần sau:

Thành phần	Công thức phân tử, MW)	Công thức cấu tạo	Tỷ lệ hàm lượng (%)
Brazilin	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		2-5

3,7-dihydroxychromen-4-on	$C_9H_6O_4$ (MW = 178)		25-30
Protosappanin A	$C_{15}H_{12}O_5$ (MW = 272)		30-35
Sapanchalcon	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		15-20
3-deoxysapanon B	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		10-12
Sapanon A	$C_{16}H_{12}O_5$ (MW = 284)		5-10
3-deoxysapanchalcon	$C_{16}H_{14}O_4$ (MW = 270)		0,3-1.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm từ gỗ cây Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.) thu được từ quy trình sản xuất theo điểm 1, trong đó hỗn hợp này bao gồm các thành phần sau:

Thành phần	Công thức phân tử, MW)	Công thức cấu tạo	Tỷ lệ hàm lượng (%)
Brazilin	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		2-5
3,7-dihydroxychromen-4-on	$C_9H_6O_4$ (MW = 178)		25-30
Protosappanin A	$C_{15}H_{12}O_5$ (MW = 272)		30-35
Sapanchalcon	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		15-20
3-deoxysapanon B	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		10-12
Sapanon A	$C_{16}H_{12}O_5$ (MW = 284)		5-10
3-deoxysapanchalcon	$C_{16}H_{14}O_4$ (MW = 270)		0,3-1.

Brazilin trong hỗn hợp được chiết từ cây Tô mộc có công thức chung $C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286). Brazilin (ở nồng độ 10 mg/kg trọng lượng cơ thể) có tác dụng điều trị viêm mãn tính như viêm khớp ở chuột thông qua hoạt tính kháng viêm của nó. Brazilin (ở liều 10 mg/kg trọng lượng cơ thể) làm giảm chỉ số viêm khớp và mức độ phù chân viêm cấp tính ở chuột CIA. Mật độ loãng xương thấp hơn đáng kể ở chuột và mạnh tương đương với chất đối chứng dương methotrexat (liều 3 mg/kg trọng lượng cơ thể). Brazilin ngăn chặn sự phá hủy khớp, xói mòn bề mặt và tăng cường sự hình

thành xương. Brazilin làm giảm nồng độ trong huyết thanh của các tác nhân gây viêm bao gồm TNF- α , IL-1 β và IL-6. Mặt khác, brazilin còn ức chế sự sản sinh NO *in vitro* với giá trị IC₅₀ là 43,5 μ M trên dòng tế bào RAW 264.7. Trong hỗn hợp hoạt chất thu được từ cây Tô mộc, brazilin có hàm lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 5% trọng lượng.

Hợp chất 3,7-dihydroxychromen-4-on trong hỗn hợp được chiết từ cây Tô mộc có công thức chung C₉H₆O₄ (MW = 178) và có tác dụng ức chế yếu sự sản sinh NO với giá trị IC₅₀ > 100 μ M. Trong hỗn hợp hoạt chất thu được từ cây Tô mộc, hợp chất 3,7-dihydroxychromen-4-on có hàm lượng nằm trong khoảng từ 25 đến 30% trọng lượng.

Protosappanin A trong hỗn hợp được chiết từ cây Tô mộc có công thức chung C₁₅H₁₂O₅ (MW = 272). Protosappanin A được biết đến có tác dụng ức chế mạnh các tác nhân gây viêm điển hình, đó là ức chế sự sản sinh NO và prostaglandin E2 (PGE₂) với giá trị IC₅₀ lần lượt là 12,5 và 64,2 μ M. Mặt khác, protosappanin A có thể bảo vệ chống xơ vữa động mạch thông qua giảm viêm (được chỉ định bởi nồng độ huyết thanh của matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), interleukin-6 (IL-6) và yếu tố hoại tử khối u-tumor necrosis factor- α (TNF- α) và các con đường truyền tín hiệu NF- κ B ở thỏ tăng lipid máu với nồng độ protosappanin A 5mg/kg (liều thấp) hoặc 25 mg/kg (liều cao). Ngoài ra, protosappanin A còn có tác dụng chống viêm thần kinh trên tế bào BV2 được kích hoạt bởi LPS. Kết quả cho thấy protosappanin A ức chế đáng kể việc sản xuất TNF- α và IL-1 β . Hơn nữa, các biểu hiện mRNA của IL-6, IL-1 β và MCP-1 đã bị giảm bởi protosappanin A khi phụ thuộc vào nồng độ (12,5, 25 và 50 μ M/L). Hơn nữa, protosappanin A còn ngăn chặn con đường viêm phụ thuộc JAK2/STAT3 thông qua điều chỉnh giảm quá trình phosphoryl hóa của JAK2 và STAT3, cũng như chuyển vị hạt nhân STAT3 để chống lại LPS. Những kết quả này cho thấy một vai trò mới của protosappanin A trong việc điều chỉnh các chấn thương thần kinh do LPS gây ra. Trong hỗn hợp hoạt chất thu được từ cây Tô mộc, hợp chất protosappanin A có hàm lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 35% trọng lượng.

Sapanchalcon trong hỗn hợp được chiết từ cây Tô mộc có công thức chung C₁₆H₁₄O₅ (MW = 286). Sapanchalcon được biết đến có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO và PGE₂ trên dòng tế bào RAW264.7 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 11,2 và 7,7

μM . Bên cạnh đó, Sapanchalcon còn ức chế mạnh sự biểu hiện của các protein mRNA của TNF- α , IL-6, COX-2 và iNOS với các giá trị IC_{50} lần lượt là 47,8, 17,4, 75,1 và 16,6 μM . Ngoài ra, Sapanchalcon còn làm giảm viêm khớp do giảm collagen (collagen-induced arthritis, CIA) trên mô hình chuột bị viêm khớp dạng thấp. Chuột DBA/1J do CIA gây ra được điều trị bằng Sapanchalcon và đối chứng dương methotrexat. Móng vuốt sưng, mức độ nghiêm trọng của viêm khớp, thay đổi X quang và mô hình học được sử dụng để đánh giá hiệu quả của Sapanchalcon. Kết quả cho thấy, Sapanchalcon giảm đáng kể viêm khớp lâm sàng và phù viêm ở bàn chân chuột. Mật độ loãng xương và cấu trúc xương được bảo vệ ở chuột DBA/1J do CIA gây ra khi sử dụng Sapanchalcon ở liều 10 mg/kg trọng lượng cơ thể. Mức độ của các cytokin tiền viêm (TNF- α , IL-6 và IL-1 β) thấp hơn đáng kể trong huyết thanh chuột được khi được điều trị bằng Sapanchalcon so với nhóm đối chứng dương methotrexat (liều 3 mg/kg trọng lượng cơ thể). Trong hỗn hợp hoạt chất thu được từ cây Tô mộc, hợp chất Sapanchalcon có hàm lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 10% trọng lượng.

Hợp chất 3-deoxysapanon B trong hỗn hợp được chiết từ cây Tô mộc có công thức chung $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ (MW = 286). Hợp chất 3-deoxysapanon B được biến đổi có tác dụng ức chế sự sản sinh NO và PGE_2 với giá trị IC_{50} lần lượt là 10,2 và 23,6 μM . Bên cạnh đó, ở các nồng độ 10, 20 và 50 μM , hợp chất 3-deoxysapanon B còn ức chế mạnh sự biểu hiện của các protein mRNA của TNF- α và IL-6 với các giá trị IC_{50} lần lượt là 90,6 và 17,7 μM . Kết quả trên cho thấy hợp chất 3-deoxysapanon B có tác dụng chống viêm thần kinh và bảo vệ thần kinh bằng cách sử dụng mô hình viêm màng thần kinh BV-2 thông qua ức chế hiệu quả sự giải phóng các chất thần kinh trung gian bao gồm NO, PGE_2 , TNF- α , IL-6 gây ra bởi vi khuẩn BV-2. Trong hỗn hợp hoạt chất thu được từ cây Tô mộc, hợp chất 3-deoxysapanon B có hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 12% trọng lượng.

Hợp chất Sapanon A trong hỗn hợp được chiết từ cây Tô mộc có công thức chung $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$ (MW = 284). Sapanon A được biết đến có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO với giá trị IC_{50} là 5,7 μM . Cao chiết với thành phần chính là Sapanon A ở nồng độ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ức chế mạnh sự sản sinh IL-6 được kích thích bởi LPS trên tế bào RAW264.7. Ngoài ra, Sapanon A có tiềm năng được sử dụng như một tác nhân điều trị bệnh hen suyễn. Sapanon A ở liều 12,5, 25 và 50 mg/kg trọng lượng cơ thể làm

giảm số lượng tế bào viêm phụ thuộc ở chuột BALB/c. Hơn nữa, Sapanon A còn làm giảm viêm đường hô hấp và tăng tiết chất nhầy gây ra bởi ovalbumin (OVA). Sapanon A ức chế hen suyễn gây ra bởi OVA bằng cách kích hoạt đường dẫn tín hiệu Nrf2. Trong hỗn hợp hoạt chất thu được từ cây Tô mộc, hợp chất Sapanon A có hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 15% trọng lượng.

Hợp chất 3-deoxysapanchalcon trong hỗn hợp được chiết từ cây Tô mộc có công thức chung $C_{16}H_{14}O_4$ (MW = 270). Hợp chất 3-deoxysapanchalcon được biết đến có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO với giá trị IC_{50} là 8,1 μ M trên dòng tế bào RAW264.7. Ngoài ra, ở liều 50 mg/kg trọng lượng cơ thể, hợp chất 3-deoxysapanchalcon có tác dụng kháng viêm trên dòng đại thực bào ở chuột bằng cách kích thích biểu hiện heme oxyase-1 (HO-1). Trong hỗn hợp hoạt chất thu được từ cây Tô mộc, hợp chất 3-deoxysapanchalcon có hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,3 đến 1% trọng lượng.

Từ các kết quả trên, các tác giả nhận thấy rằng, hiệu quả kháng viêm trong các hợp chất nêu trên tập trung vào 6 hoạt chất chính (chiếm từ 65 đến 70% trọng lượng hỗn hợp hoạt chất) bao gồm brazilin, protosappanin A, Sapanchalcon, 3-deoxysapanon B, Sapanon A và 3-deoxysapanchalcon và được cho là tập trung vào khung homoisoflavonoit và chalcon của nó. Do đó, khi có trong hỗn hợp hoạt chất, hoạt tính kháng viêm của hỗn hợp hoạt chất thể hiện tác dụng rất mạnh thông qua ức chế hiệp đồng sự sản sinh NO (106,6%) trên tế bào thử nghiệm.

Theo các phương án thực hiện cụ thể hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm từ gỗ cây Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.) thu được từ quy trình theo sáng chế thích hợp sử dụng để sản xuất dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng trong hỗ trợ và điều trị các bệnh viêm thông qua cơ chế ức chế sự sản sinh NO trong tế bào thử nghiệm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng viêm, trong đó chế phẩm này bao gồm hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm theo sáng chế phối trộn với loại thảo dược và chất mang dược dụng. Chế phẩm kháng viêm theo sáng chế có tác dụng hỗ trợ và điều trị các bệnh viêm thông qua cơ chế ức chế sự sản sinh NO trong tế bào thử nghiệm. Các chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước, các chất độn như sucroza hoặc tinh bột, các chất kết dính như dẫn xuất xenluloza, chất pha loãng, chất gây rã, chất tăng cường hấp thu hoặc chất làm ngọt.

Chế phẩm kháng viêm theo sáng chế có thể được điều chế bằng phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực dược, có thể được phối chế dưới dạng bột, viên nén, viên nang,片片, hạt hoặc chế phẩm dạng lỏng khác nhưng không chỉ giới hạn ở các dạng này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm từ gỗ cây Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.).

Để đánh giá hiệu quả và khả năng chiết đặc hiệu hỗn hợp hoạt chất từ gỗ cây Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.), tiến hành thử nghiệm với các hệ dung môi sau:

Bảng 1: Danh mục các hệ dung môi với các tỷ lệ khác nhau sử dụng để sản xuất hỗn hợp hoạt chất từ gỗ cây Tô mộc.

Thử nghiệm	Hệ dung môi
CT1	Tween 80:etanol:nước (10:80:10)
CT2	Tween 80:metanol:nước (10:80:10)
CT3	Tween 80:nước (10:90)
CT4	Etanol:nước (90:10)
CT5	Metanol:nước (90:10)
CT6	Etanol 96°
CT7	Metanol
CT8	Axeton
CT9	Etyl axetat
CT10	Diclorometan
ĐC	Nước cất

Gỗ cây Tô mộc được tách vỏ, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ và sấy khô ở nhiệt độ 60°C, sau đó gỗ được nghiền thành bột (100 g) kích thước 0,2-0,4 mm.

Lấy mỗi mẫu 100 g được chuyển vào thiết bị chiết siêu âm (công suất 180-220 W và tần số 40-60 kHz). Mỗi thử nghiệm được thực hiện với 500 mL dung môi như nêu ở bảng trên. Tiến hành bổ sung theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5 (trọng lượng/thể tích). Thời gian siêu âm 30 phút, nhiệt độ chiết 90°C. Sau khi chiết siêu âm, hỗn hợp được đem ly tâm ở tốc độ 12,000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ hoàn toàn phần cặn. Quá trình chiết siêu âm được thực hiện 3 lần.

Tiếp đó đưa dịch chiết thu được sau khi ly tâm vào thiết bị cất quay chân không và tiến hành cất quay đến khối lượng không đổi. Kết quả được thể hiện trên bảng sau:

Bảng 2: Hiệu suất chiết hỗn hợp hoạt chất theo các hệ dung môi khác nhau.

Thử nghiệm	Hệ dung môi	Sản phẩm	Hiệu suất chiết (%)
CT1	Tween 80:etanol:nước (10:80:10)	CSB-1	13,61
CT2	Tween 80:metanol:nước (10:80:10)	CSB-2	8,12
CT3	Tween 80:nước (10:90)	CSB-3	7,96
CT4	Etanol:nước (90:10)	CSB-4	5,06
CT5	Metanol:nước (90:10)	CSB-5	5,14
CT6	Etanol 96°	CSB-6	7,05
CT7	Metanol	CSB-7	6,75
CT8	Axeton	CSB-8	4,02
CT9	Etyl axetat	CSB-9	2,65
CT10	Diclorometan	CSB-10	1,86
ĐC	Nước cất	CSB-11	0,12

Kết quả Bảng 2 cho thấy mẫu CSB-1 khi sử dụng hệ dung môi Tween 80-etanol-nước với tỷ lệ tối ưu kết hợp với siêu âm cho hiệu suất tạo hỗn hợp hoạt chất cao nhất, lên tới 13,61%. Mẫu CSB-10 (chiết bằng dung môi diclorometan) cho hiệu suất tạo hỗn hợp hoạt chất thấp nhất (1,86%).

Mặc dù các mẫu CSB-2 và CSB-3 cho hiệu suất tạo hỗn hợp hoạt chất khá cao (8,12 và 7,96%), nhưng kiểm tra sắc ký đồ sau khi phân tích bằng LC/MS tại bước sóng $\lambda = 254$ nm cho thấy thành phần của các hỗn hợp hoạt chất này khác nhau, cụ thể thành phần bảy hoạt chất chính brazilin, 3,7-dihydroxy-4H-chromen-4-on, protosappanin A, Sapanchalcon, 3-deoxysapanon B, Sapanon A và 3-deoxysapanchalcon thấp hơn và xuất hiện nhiều pic khác. Do đó, cần hiểu rằng, quá trình tạo hỗn hợp hoạt chất với sự có mặt của metanol hoặc các dung môi riêng lẻ khác không những cho hiệu suất thấp mà còn đưa vào một lượng các thành phần không đáng có hoặc làm giảm tác dụng sinh học (tác dụng sinh học yếu).

Kết quả xác định hàm lượng polyphenol tổng bằng phương pháp Folin-Ciocalteu được thể hiện trên Bảng 3. Cụ thể các bước tiến hành như sau: Các chế phẩm (CSB-1 đến CSB-10) và axit gallic được pha loãng bằng metanol để đạt nồng độ 1 mg/mL cho

các hỗn hợp hoạt chất và dung dịch axit gallic đạt nồng độ 20, 40, 60, 80, 100 và 120 $\mu\text{g/mL}$; thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% được pha loãng với nước. Lần lượt cho 1 mL dung dịch axit gallic (nồng độ 20, 40, 60, 80, 100 và 120 $\mu\text{g/mL}$) vào 2,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% và để phản ứng trong 5 phút; sau đó, thêm tiếp vào 2 mL dung dịch Na_2CO_3 2%. Sau 45 phút phản ứng ở nhiệt độ phòng, độ hấp thụ được xác định bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 765 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị OD được ghi nhận và tiến hành vẽ đường thẳng hiệu chuẩn để sử dụng xác định hàm lượng polyphenol tổng trong các mẫu cao chiết. Axit gallic được sử dụng như là chất chuẩn tham khảo và kết quả được quy tương đương theo số milligram axit gallic/1 gam hỗn hợp hoạt chất khô (mg GAE/g hỗn hợp hoạt chất khô). Các mẫu hỗn hợp hoạt chất được tiến hành tương tự với chất chuẩn axit gallic. Hàm lượng polyphenol tổng được tính theo công thức:

$$P = a \times V/m$$

Trong đó: P: hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE/g hỗn hợp hoạt chất khô);

a: giá trị x từ đường chuẩn với axit gallic ($\mu\text{g/mL}$);

V: thể tích dung dịch hỗn hợp hoạt chất (mL);

m: khối lượng hỗn hợp hoạt chất có trong thể tích V (g).

Bảng 3. Hàm lượng polyphenol tổng của các hỗn hợp hoạt chất từ gỗ Tô mộc.

Thử nghiệm	Hệ dung môi	Ký hiệu	TPC (mg GAE/g hỗn hợp hoạt chất khô)
CT1	Tween 80:etanol:nước (10:80:10)	CSB-1	656,5
CT2	Tween 80:metanol:nước (10:80:10)	CSB-2	314,1
CT3	Tween 80:nước (10:90)	CSB-3	309,7
CT4	Etanol:nước (90:10)	CSB-4	185,6
CT5	Metanol:nước (90:10)	CSB-5	144,8
CT6	Etanol 96°	CSB-6	412,5
CT7	Metanol	CSB-7	398,8
CT8	Axeton	CSB-8	70,5
CT9	Etyl axetat	CSB-9	65,9
CT10	Diclorometan	CSB-10	45,1

Trong các mẫu thử nghiệm, hỗn hợp hoạt chất CSB-1 (Tween 80-etanol-nước) có hàm lượng polyphenol tổng (TPC) cao nhất lên tới 656,5 mg GAE/g hỗn hợp hoạt chất khô và CSB-10 có hàm lượng polyphenol tổng thấp nhất (45,1 mg GAE/g hỗn hợp

hoạt chất khô). Như vậy, sử dụng hệ dung môi Tween 80-etanol-nước với tỷ lệ tối ưu (10:80:10, v/v/v) để chiết cho phép thu được hỗn hợp hoạt chất không những có hiệu suất chiết cao mà còn có hàm lượng polyphenol tổng cao vượt trội so với các dung môi chiết thông thường. Điều này cho thấy hiệu quả vượt trội của hỗn hợp hoạt chất thu được khi chiết bằng hệ dung môi Tween 80-etanol-nước so với các hệ dung môi và dung môi đơn lẻ thông dụng khác.

Ví dụ 2: Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất và hàm lượng polyphenol tổng của hỗn hợp hoạt chất CSB-1

Để đánh giá ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất và hàm lượng polyphenol tổng thu được của hỗn hợp hoạt chất CSB-1, tiến hành thử nghiệm như sau:

Gỗ cay Tô mộc được tách vỏ, loại bỏ tạp chất, chặt nhỏ và sấy khô ở nhiệt độ 60°C, sau đó gỗ được nghiền thành bột (100 g) kích thước 0,2-0,4 mm.

Lấy mỗi mẫu 100 g được chuyển vào thiết bị chiết siêu âm (công suất 180-220 W và tần số 40-60 kHz). Mỗi thử nghiệm được thực hiện với 500 mL dung môi như nêu ở bảng trên. Tiến hành bổ sung theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5 (trọng lượng/thể tích). Thời gian siêu âm mỗi mẫu là 10, 20, 30, 40 và 50 phút, nhiệt độ chiết 90°C. Sau khi chiết siêu âm, hỗn hợp được đem ly tâm ở tốc độ 12,000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ hoàn toàn phần cặn. Quá trình chiết siêu âm được thực hiện 3 lần.

Tiếp đó đưa dịch chiết thu được sau khi ly tâm vào thiết bị cất quay chân không và tiến hành cất quay đến khối lượng không đổi. Kết quả được thể hiện trên bảng sau:

Bảng 4: Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất chiết và hàm lượng polyphenol tổng của hỗn hợp hoạt chất CSB-1.

Thời gian (phút)	Hiệu suất chiết (%)	TPC (mg GAE/g hỗn hợp hoạt chất khô)
10	9,25	485,8
20	12,13	578,3
30	13,60	655,1
40	13,62	612,4
50	13,63	578,3

Kết quả Bảng 4 cho thấy hiệu suất chiết hỗn hợp hoạt chất CSB-1 cao nhất tại thời gian 50 phút (13,63%), tiếp theo là thời gian 40 phút (13,62%), 30 phút (13,60%) và cuối cùng là 10 phút (9,25%). Tuy nhiên, hiệu suất chiết tại thời gian chiết 30 phút,

40 phút và 50 phút là tương đương (13,60%, 13,62% và 13,63%). Ngoài ra, hàm lượng polyphenol tổng (TPC) cao nhất tại thời gian chiết là 30 phút (655,1 mg GAE/g hỗn hợp hoạt chất khô) sau đó giảm dần theo thời gian (40 phút là 612,4 mg GAE/g hỗn hợp hoạt chất khô và 50 phút là 578,3 mg GAE/g hỗn hợp hoạt chất khô). Thời gian chiết càng dài thì hàm lượng polyphenol tổng thấp càng giảm (kéo theo hoạt tính sinh học giảm), có lẽ là do một số hợp chất vòng thơm có thể bị biến đổi hoặc bị phá hủy cấu trúc do tác động của từ trường khi chiết bằng siêu âm với thời gian dài. Vì vậy để thu được hiệu suất và hàm lượng polyphenol tổng cao (hoạt tính sinh học cao), thời gian chiết tối ưu được lựa chọn là 30 phút (Hình 2 và Hình 3).

Ví dụ 3: Xác định thành phần hoạt chất có trong hỗn hợp hoạt chất CSB-1

Các thành phần trong hỗn hợp hoạt chất CSB-1 được xác định bằng sắc kí lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS) tại bước sóng $\lambda = 254$ nm và được trình bày ở bảng sau:

Bảng 5: Thành phần hoạt chất có trong hỗn hợp hoạt chất CSB-1.

Pic	Thời gian lưu (phút)	Hợp chất xác định	Công thức phân tử (Khối lượng phân tử, MW)	Phổ khối (ESI) $[M+H]^+$	Hàm lượng (%)
1	12,623	Brazilin	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)	$[M+H]^+ = 287,1$ $[M-H_2O]^+ = 269,1$	3,4777
2	13,255	3,7-dihydroxychromen-4-on	$C_9H_6O_4$ (MW = 178)	$[M+H]^+ = 179,0$ $[M+2COOH+H]^+ = 267,1$	27,2045
3	14,480	Protosappanin A	$C_{15}H_{12}O_5$ (MW = 272)	$[M+H]^+ = 273,1$	32,1103
4	15,896	Sapanchalcon	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)	$[M+H]^+ = 287,1$	17,2462
5	16,202	3-deoxysapanon B	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)	$[M+H]^+ = 287,1$ $[M+Na]^+ = 309,1$	10,6219
6	16,343	Sapanon A	$C_{16}H_{12}O_5$ (MW = 284)	$[M+H]^+ = 285,1$	7,2384
7	17,452	3-deoxysapanchalcon	$C_{16}H_{14}O_4$ (MW = 270)	$[M+H]^+ = 271,1$	0,5734

Đặc tính của hợp chất Brazilin

- Tên theo IUPAC: (6a*S*,11*bR*)-7,11*b*-dihydro-6*H*-indeno[2,1-*c*]chromene-3,6*a*,9,10-tetrol.

- Mô tả: Chất bột màu đỏ nâu, tan tốt trong dung môi metanol. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel trắng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), dung môi triển khai là cloroform/metanol = 5/1 (v/v); $R_f = 0,45$.

- CTPT: C₁₆H₁₄O₅ (M=286).

- Phổ khối phân giải thấp ESI-MS m/z : 287,1 [M + H]⁺ (C₁₆H₁₅O₅).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ_H (ppm): 7,17 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-1), 6,44 (1H, dd, $J = 1,6; 8,4$ Hz, H-2), 6,24 (1H, d, $J = 1,6$ Hz, H-4), 4,01 (1H, dd, $J = 3,6; 10,8$ Hz, H-6 β), 3,46 (1H, t, $J = 10,8$ Hz, H-6 α), 2,74 (1H, m, H-6*a*), 3,01 (1H, dd, $J = 7,2; 14,2$ Hz, H-7 β), 2,44 (1H, d, $J = 14,2$ Hz, H-7 α), 6,76 (1H, s, H-8), 6,63 (1H, s, H-11), 4,02 (1H, s, H-12). ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ_C (ppm): 132,1 (C-1), 109,6 (C-2), 157,6 (C-3), 104,3 (C-4), 156,7 (C-4*a*), 67,8 (C-6), 38,3 (C-6*a*), 34,6 (C-7), 138,3 (C-7*a*), 113,0 (C-8), 145,3 (C-9), 145,0 (C-10), 112,6 (C-11), 133,3 (C-11*a*), 44,1 (C-12), 116,7 (C-12*a*).

Đặc tính của hợp chất 3,7-dihydroxychromen-4-on

- Tên theo IUPAC: 3,7-dihydroxy-4*H*-chromen-4-on.

- Mô tả: Chất bột màu trắng ngà, 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 F₂₅₄ (Merck), dung môi triển khai là methanol/nước = 3/1 (v/v); $R_f = 0,50$.

- CTPT: C₉H₆O₄ (M=178).

- Phổ khối phân giải thấp ESI-MS m/z : 179,0 [M + H]⁺ (C₉H₇O₄).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_H (ppm): 8,47 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-5), 8,22 (1H, s, H-2), 7,21 (1H, dd, $J = 2,0; 8,8$ Hz, H-6), 7,10 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8). ¹³C-NMR (100 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_C (ppm): 174,2 (C-4), 164,2 (C-7), 159,0 (C-9), 144,1 (C-2), 140,2 (C-3), 117,4 (C-6), 116,0 (C-10), 103,6 (C-8).

Đặc tính của hợp chất Protosappanin A

- Tên theo IUPAC: 3,10,11-trihydroxy-6*H*-dibenzo[*b,d*]oxocin-7(8*H*)-on.

- Mô tả: tinh thể hình kim không màu, tan tốt trong dung môi pyridin. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo trắng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), dung môi triển khai là methanol/nước = 2/1 (v/v); $R_f = 0,35$.

- CTPT: C₁₅H₁₂O₅ (M=272).

- Phổ khối phân giải thấp ESI-MS m/z : 273,1 [M + H]⁺ (C₁₅H₁₃O₅).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_H (ppm): 7,42 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1), 7,12 (1H, dd, $J = 2,0$ 8,0 Hz, H-2), 7,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-4), 7,37 (1H, s, H-9), 7,40 (1H, s, H-12), 4,72 (2H, s, H-6), 3,73 (2H, br s, H-8). ¹³C-NMR (100 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_C (ppm): 135,8 (C-1), 113,8 (C-2), 160,6 (C-3), 109,6 (C-4), 159,1 (C-4a), 78,7 (C-6); 206,3 (C-7), 49,5 (C-8), 126,9 (C-8a), 118,5 (C-9), 147,3 (C-10), 147,1 (C-11), 118,4 (C-12), 131,1 (C-12a), 124,6 (C-12b).

Đặc tính của hợp chất Sapanchalcon

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

- Mô tả: tinh thể hình kim màu vàng, tan tốt trong dung môi pyridin. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo trắng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), dung môi triển khai là methanol/nước = 3/1 (v/v); $R_f = 0,40$.

- CTPT: C₁₆H₁₄O₅ (M=286).

- Phổ khối phân giải thấp ESI-MS m/z : 287,1 [M + H]⁺ (C₁₆H₁₅O₅).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ_H (ppm): 7,57 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6), 7,50 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H- β), 7,37 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H- α), 7,11 (1H, dd, $J = 2,0$ 8,0 Hz, H-2), 6,98 (1H, dd, $J = 2,0$; 8,4 Hz, H-6), 6,79 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6'), 6,51 (1H, $J = 2,4$ Hz, H-3'), 6,46 (1H, dd, $J = 2,4$; 8,0 Hz, H-5'), 3,87 (3H, s, 2'-OCH₃). ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ_C (ppm): 193,2 (C-7'), 164,6 (C-4'), 162,6 (C-2'), 149,6 (C-4), 146,8 (C-3), 144,7 (C- β); 133,8 (C- α), 128,7 (C-1), 125,2 (C-1'), 123,5 (C-6), 121,6 (C-6'), 116,6 (C-5), 115,3 (C-5'), 109,0 (C-2), 100,2 (C-3'), 56,2 (2'-OCH₃).

Đặc tính của hợp chất 3-deoxysapanon B

- Tên theo IUPAC: (*R*)-3-(3,4-dihydroxybenzyl)-7-hydroxychroman-4-on.

- Mô tả: chất bột màu đỏ nâu, 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 F₂₅₄ (Merck), dung môi triển khai là methanol/nước = 2/1 (v/v); $R_f = 0,60$.

- CTPT: C₁₆H₁₄O₅ (M=286).

- Phổ khối phân giải thấp ESI-MS m/z : 287,1 [M + H]⁺ (C₁₆H₁₅O₅).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ_H (ppm): 4,12 (1H, dd, $J = 4,0$; 11,6 Hz, H-2a), 3,96 (1H, d, $J = 7,6$; 11,6 Hz, H-2b), 2,56 (1H, m, H-3), 7,56 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-5), 6,33 (1H, dd, $J = 2,0$; 8,8 Hz, H-6), 6,14 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8), 2,86 (1H, dd, $J = 4,4$; 14,4 Hz, H-9a), 2,39 (1H, dd, $J = 10,8$; 14,4 Hz, H-9b), 6,54 (1H, s, H-2'), 6,57 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,39 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6'). ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ_C (ppm): 70,7 (C-2), 48,9 (C-3), 195,2 (C-4), 114,2 (C-4a), 130,3 (C-5), 112,3 (C-6), 167,5 (C-7), 103,7 (C-8), 165,5 (C-8a), 33,4 (C-9), 131,3 (C-1'), 116,5 (C-2'), 146,4 (C-3'), 145,0 (C-4'), 117,1 (C-5'), 121,5 (C-6').

Đặc tính của hợp chất Sapanon A

- Tên theo IUPAC: (*E*)-3-(3,4-dihydroxybenzylidene)-7-hydroxychroman-4-on.

- Mô tả: chất bột màu đỏ vàng đậm, 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 F₂₅₄ (Merck), dung môi triển khai là methanol/nước = 2/1 (v/v); $R_f = 0,45$.

- CTPT: C₁₆H₁₂O₅ (M=284).

- Phổ khối phân giải thấp ESI-MS m/z : 285,1 [M + H]⁺ (C₁₆H₁₃O₅).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ_H (ppm): 5,37 (2H, s, H-2), 7,81 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5), 6,53 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6), 6,32 (1H, s, H-8), 7,66 (1H, s, H-9), 6,84 (1H, s, H-2'), 6,87 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,78 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6'). ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ_C (ppm): 69,2 (C-2), 129,6 (C-3), 183,2 (C-4), 116,0 (C-4a), 130,8 (C-5), 112,3 (C-6), 166,7 (C-7), 103,6 (C-8), 165,0 (C-8a), 138,5 (C-9), 127,8 (C-1'), 116,7 (C-2'), 148,9 (C-3'), 146,7 (C-4'), 118,4 (C-5'), 124,7 (C-6').

Đặc tính của hợp chất 3-deoxysapanchalcon

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

- Mô tả: chất bột màu vàng, tan tốt trong dung môi pyridin. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo trắng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck), dung môi triển khai là methanol/nước = 3/1 (v/v); $R_f = 0,40$.

- CTPT: C₁₆H₁₄O₄ (M=270).

- Phổ khối phân giải thấp ESI-MS m/z : 271,1 [M + H]⁺ (C₁₆H₁₅O₄).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ_H (ppm): 6,52 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-3), 6,46 (1H, dd, $J = 2,0; 8,4$ Hz, H-5), 7,58 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6), 7,41 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H- α), 7,56 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H- β), 7,50 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2'/6'), 6,82 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-3'/5'), 3,89 (1H, s, 2-OCH₃). ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ_C (ppm): 128,2 (C-1), 162,6 (C-2), 100,3 (C-3), 164,6 (C-4), 109,0 (C-5), 121,8 (C-6), 193,2 (C-7), 133,9 (C- α), 144,3 (C- β), 125,2 (C-1'), 131,5 (C-2'/6'), 117,0 (C-3'/5'), 161,2 (C-4'), 56,2 (2-OCH₃).

Ví dụ 4: Xác định hoạt tính kháng viêm của các hỗn hợp hoạt chất được sản xuất từ gỗ Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.) 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 của các hỗn hợp hoạt chất (CSB-1 đến CSB-10) sản xuất từ gỗ Tô mộc

Tế bào RAW 264,7 được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ 10⁴ 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 hỗn hợp hoạt chất (hoặc đối chứng dương-Dexamethason) 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 6. Hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của các hỗn hợp hoạt chất thu được từ gỗ Tô mộc.

Thử nghiệm	Hệ dung môi	Ký hiệu	% ức chế (tại nồng độ 10 µg/mL)
CT1	Tween 80:etanol:nước (10:80:10)	CSB-1	106,6 ± 3,5
CT2	Tween 80:metanol:nước (10:80:10)	CSB-2	87,3 ± 1,4
CT3	Tween 80:nước (10:90)	CSB-3	83,1 ± 5,5
CT4	Etanol:nước (90:10)	CSB-4	55,2 ± 2,1
CT5	Metanol:nước (90:10)	CSB-5	58,0 ± 1,8
CT6	Etanol 96°	CSB-6	80,2 ± 1,7
CT7	Metanol	CSB-7	50,2 ± 2,4
CT8	Axeton	CSB-8	38,2 ± 2,2
CT9	Etyl axetat	CSB-9	45,5 ± 2,5
CT10	Diclorometan	CSB-10	28,2 ± 1,8

Kết quả Bảng 6 cho thấy tại nồng độ 10 µg/mL, 03 hỗn hợp hoạt chất CSB-2, CSB-3 và CSB-6 đều thể hiện khả năng ức chế sự sản sinh NO với giá trị ức chế trong khoảng 80,2 – 87,3%. Hỗn hợp hoạt chất CSB-10 có tác dụng ức chế yếu nhất sự sản sinh NO (28,2%) do có hàm lượng polyphenol tổng thấp nhất trong các chế phẩm. Trong các hỗn hợp hoạt chất, CSB-1 có tác dụng ức chế sự sản sinh NO mạnh nhất (106,6%). Hỗn hợp hoạt chất CSB-1 chứa 7 hợp chất chính bao gồm brazilin, 3,7-dihydroxy-4*H*-chromen-4-on, protosappanin A, Sapanchalcon, 3-deoxysapanon B, Sapanon A và 3-deoxysapanchalcon, trong đó 7 hợp chất này đã được chứng minh có tác dụng ức chế sự sản sinh NO và đóng vai trò quyết định đến hoạt tính sinh học của hỗn hợp hoạt chất. Sáu trong bảy hợp chất chính trong hỗn hợp hoạt chất CSB-1 bao gồm protosappanin A, Sapanchalcon, Sapanon A, 3-deoxysapanchalcon, brazilin và 3-deoxysapanon B ngoài chiếm 71,2679% hỗn hợp hoạt chất (về khối lượng) thì chúng còn có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 12,5, 11,2, 5,7, 8,1, 43,5 và 42,4 µM (B. S. Min, T. D. Cuong, T. M. Hung, B. K. Min, B. S. Shin, M. H. Woo. Compounds from the heartwood of *Caesalpinia sappan* and their anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22, 7436–

7439). Hợp chất còn lại, 3,7-dihydroxy-4*H*-chromen-4-on chiếm 27,2045% hỗn hợp hoạt chất CSB-1 (về khối lượng) và có tác dụng ức chế yếu sự sản sinh NO với giá trị $IC_{50} > 100 \mu M$ (B. S. Min, T. D. Cuong. Phenolic Compounds from *Caesalpinia sappan* and Their Inhibitory Effects on LPS-induced NO Production in RAW264.7 Cells. *Natural Product Sciences*, 2013, 19, 201–205). Những kết quả trên đã lí giải được tác dụng hiệp đồng rất mạnh ức chế sự sản sinh NO (106,6%) của 7 hoạt chất chính tạo nên hỗn hợp hoạt chất CSB-1. Điều này minh chứng cho thấy tác dụng chiết đặc hiệu các hoạt chất có đặc tính ức chế sự sản sinh NO của hệ dung môi Tween 80-ethanol-nước với tỷ lệ tối ưu (10:80:10, v/v/v) được sử dụng theo sáng chế.

Như vậy, từ những kết quả trên cho thấy bằng cách chiết siêu âm sử dụng hệ dung môi Tween 80-ethanol-nước với tỷ lệ tối ưu (10:80:10, v/v/v) cho phép tạo hỗn hợp hoạt chất có hiệu quả vượt trội đối với khả năng ức chế sự sản sinh NO bởi tế bào thử nghiệm. Điều này chứng tỏ rằng hỗn hợp hoạt chất CSB-1 thu được từ gỗ cây Tô mộc có tác dụng kháng viêm vượt trội.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình sản xuất của sáng chế cho phép sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm, trên cơ sở ức chế sự sản sinh NO bởi tế bào, từ gỗ Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.) với hiệu suất chiết cao và có tác dụng sinh học vượt trội. Bằng cách điều chỉnh hệ dung môi và điều kiện chiết, quy trình cho phép chiết chọn lọc hoạt chất mà không phải chiết riêng từng thành phần, điều này cho phép tăng hiệu quả, 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.

Hỗn hợp hoạt chất thu được từ quy trình theo sáng chế đã được chứng minh có tác dụng kháng viêm trên cơ sở ức chế sự sản sinh NO trên tế bào thử nghiệm. Bằng cách chiết siêu âm sử dụng hệ dung môi Tween 80-ethanol-nước trong điều kiện chiết tối ưu, quy trình theo sáng chế cho phép thu được hỗn hợp hoạt chất bao gồm 7 thành phần có hiệu quả kháng viêm vượt trội. Hỗn hợp theo sáng chế có tiềm năng phát triển thành dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng hỗ trợ trong việc ngăn ngừa và điều trị các bệnh viêm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

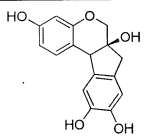
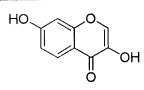
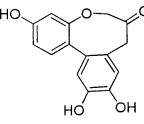
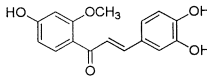
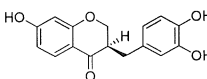
1. Quy trình sản xuất hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm từ gỗ cây Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

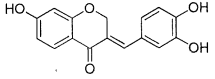
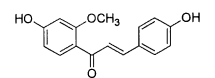
a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu gỗ cây Tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.), tách bỏ phần vỏ, loại tạp chất và sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C rồi nghiền nhỏ thu được bột gỗ Tô mộc;

b) chiết nguyên liệu bằng cách bổ sung phần bột gỗ Tô mộc vào phức hệ dung môi theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5 (khối lượng:thể tích), trong đó phức hệ dung môi này có thành phần bao gồm Tween 80 từ 5 đến 10% theo thể tích, etanol từ 70 đến 85% theo thể tích và nước từ 10 đến 25% theo thể tích và quá trình chiết được tiến hành trong điều kiện siêu âm với tần số nằm trong khoảng từ 40-60Hz trong thời gian từ 20 đến 40 phút và nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 80 đến 100°C thu được phần dịch chiết;

c) loại bỏ tạp chất bằng cách cách ly tâm phần dịch chiết thu được với tốc độ ly tâm nằm trong khoảng từ 10.000 đến 15.000 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 10 đến 15 phút để loại bỏ hoàn toàn phần cặn, thu được phần dịch chiết; và

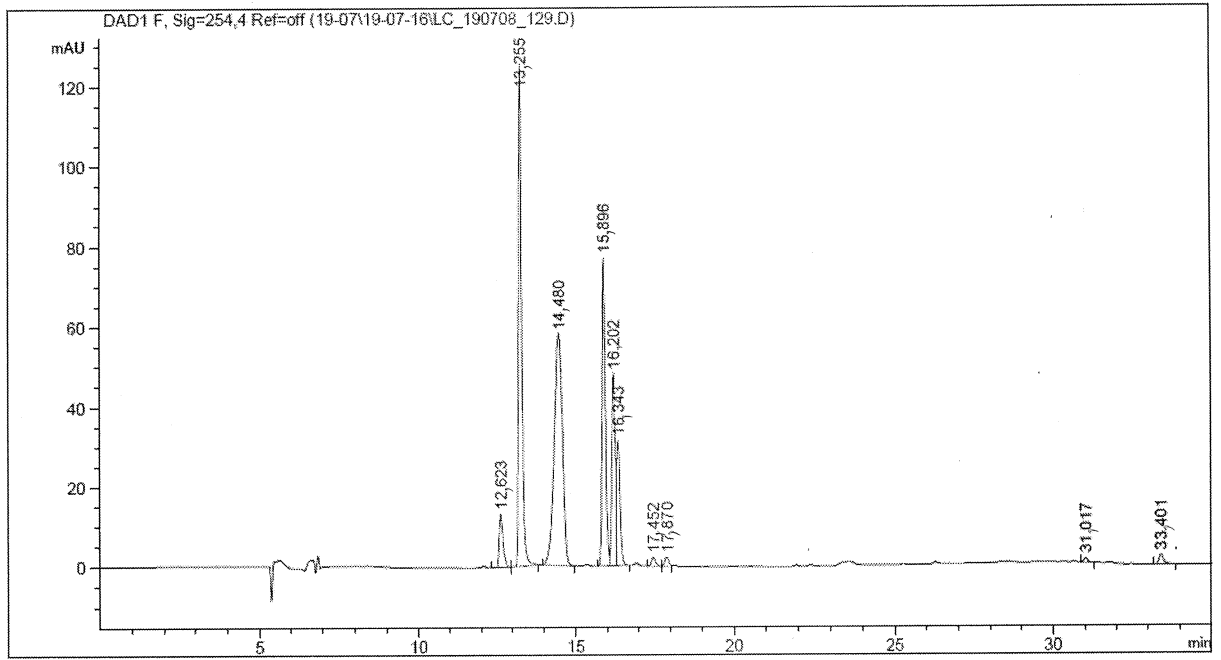
d) thu hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm bằng cách chuyển phần dịch chiết vào thiết bị cất quay đến khối lượng không đổi thu được hỗn hợp hoạt chất có tác dụng kháng viêm dạng bột mịn bao gồm các thành phần sau:

Thành phần	Công thức phân tử, MW)	Công thức cấu tạo	Tỷ lệ hàm lượng (%)
Brazilin	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		2-5
3,7-dihydroxychromen-4-on	$C_9H_6O_4$ (MW = 178)		25-30
Protosappanin A	$C_{15}H_{12}O_5$ (MW = 272)		30-35
Sapanchalcon	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		15-20
3-deoxysapanon B	$C_{16}H_{14}O_5$ (MW = 286)		10-12

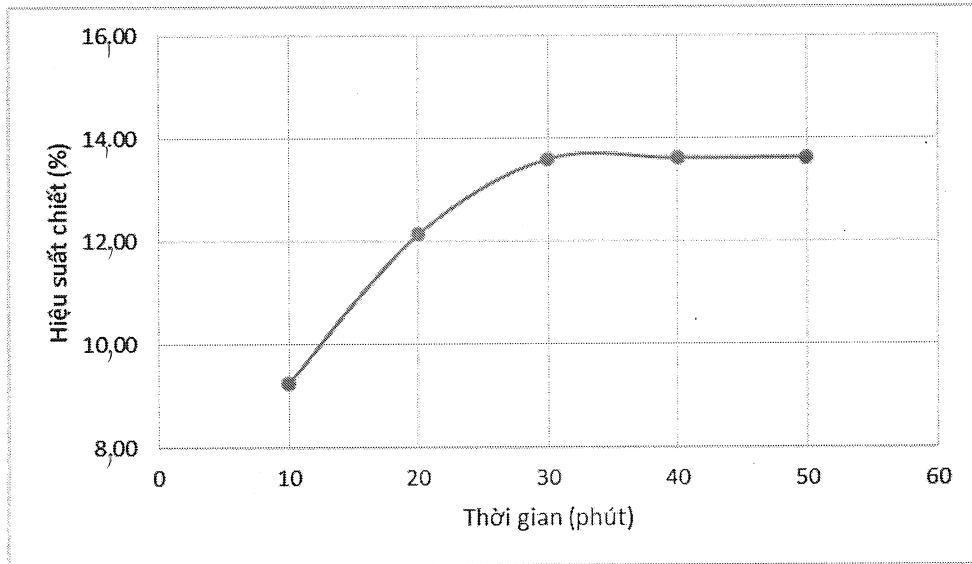
Sapanon A	$C_{16}H_{12}O_5$ (MW = 284)		5-10
3-deoxysapanchalcon	$C_{16}H_{14}O_4$ (MW = 270)		0,3-1.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó phức hệ dung môi được sử dụng để chiết nguyên liệu là Tween 80:etanol: nước là 10:80:10 theo tỷ lệ % thể tích, chiết ở nhiệt độ 90°C trong điều kiện siêu âm với tần số 50Hz và công suất siêu âm từ 180 đến 200W.

HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3

