



(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)



2-0003660

(51) **C07D 311/02; A61K 36/48**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00175

(22) 29/04/2022

(45) 25/09/2024 438

(43) 25/07/2022 412

(73) Trường Đại học Phenikaa (VN)

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

(72) Tô Đạo Cường (VN); Nguyễn Phương Đại Nguyên (VN); Nguyễn Hữu Kiên (VN);
Nguyễn Phi Hùng (VN); Nguyễn Thị Thu Trâm (VN).

(54) **QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ HỢP CHẤT EPICATECHIN CÓ TÁC
DỤNG KHÁNG VIÊM TỪ NẤM TRÚNG GÀ (*AMANITA CAESAREA* (SCOP.)
PERS. 1801)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế hợp chất epicatechin có tác dụng điều trị viêm từ nấm Trúng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801). Quy trình theo giải pháp bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột nấm Trúng gà; c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất epicatechin; d) thu hợp chất epicatechin thô; và e) tinh chế hợp chất epicatechin. Quy trình theo giải pháp thu được hợp chất epicatechin có công thức (1). Hợp chất epicatechin 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 epicatechin từ nấm Trứng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801). Hợp chất epicatechin 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 viêm.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

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

Có nhiều phương pháp để điều trị viêm và một trong những phương pháp hay được sử dụng phổ biến hiện nay là sử dụng thuốc. Các loại thuốc phổ biến nhất hiện nay được sử dụng để điều trị các bệnh viêm là các lớp thuốc corticosteroid, các lớp chất kháng-histamin, các lớp chất không steroid, decongestant, chất kháng cholinergic, chất ổn định tế bào Mast, v/v. (xem tài liệu của C. A. Kontogiorgis và 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 clorpheniramin, cetirizin, levocetirizin, diclofenac, acuvall, bromfenac, nevanac, v/v. (xem tài liệu của 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 hợp chất mới có tác dụng điều trị viêm từ nguồn thiên nhiên, đặc biệt là nguồn dược thay thế cho các loại thuốc tổng hợp đã được quan tâm và đầu tư nghiên cứu. Đối với Nấm Trứng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801),

các tác giả đã phát hiện ra tác dụng kháng viêm của các cao chiết cũng như các hợp chất phân lập được (xem tài liệu của Z. J. Yang, D. D. Zhou, S. Y. Huang, A. P. Fang, H. B. Li, H. L. Zhu. Effects and mechanisms of natural products on Alzheimer's disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 6, 1-21; W. J. Hu, Z. P. Li, W. Q. Wang, M. K. Song, R. T. Dong, Y. L. Zhou, Y. Li, D. Wang. Structural characterization of polysaccharide purified from *Amanita caesarea* and its pharmacological basis for application in Alzheimer's disease: endoplasmic reticulum stress. *Food & Function*, 2021, 12(21), 11009-11023. Tuy nhiên, tác dụng kháng viêm của các cao chiết cũng như các hoạt chất phân lập được từ loài nấm Trúng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801) lại chưa được nghiên cứu. Do đó, giải pháp sau đây đưa ra quy trình phân lập và tinh chế hợp chất epicatechin có tác dụng kháng viêm từ loài nấm Trúng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801). Dựa vào kết quả sàng lọc hoạt tính kháng viêm, cao chiết diclometan được lựa chọn để tách và tinh chế hợp chất epicatechin có hoạt tính sinh học, cụ thể là có tác dụng điều trị viêm thông qua ức chế sự sản sinh oxit nitric (NO).

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 epicatechin từ nấm Trúng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801) có tác dụng điều trị viêm và hợp chất epicatechin thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp đề xuất quy trình phân lập và tinh chế hợp chất epicatechin có tác dụng ức chế sự sản sinh NO từ nấm Trúng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu nấm Trúng gà, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 55⁰C và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,2 mm thu được nguyên liệu bột nấm Trúng gà;

b) chiết nguyên liệu bằng cách chiết nguyên liệu bột nấm Trúng gà với etanol 96⁰ theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết bột nấm trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 20 đến 40 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 60 đến 70⁰C, sau đó thu dịch chiết và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etanol (ACE);

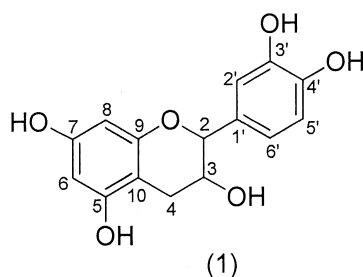
c) hòa tan cao chiết ACE bằng cách hòa tan cao chiết ACE vào nước nóng theo tỉ lệ 1/3 (khối lượng/thể tích), sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết ACE thu được hỗn hợp dạng lỏng;

d) chiết bằng diclometan bằng cách bổ sung diclometan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước c) theo tỷ lệ 1/3 (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 diclometan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết diclometan (ACED);

e) thu phân đoạn chứa hợp chất epicatechin bằng cách nhồi phân cao chiết diclometan (ACED) thu được ở bước d) lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh, tiến hành rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 50/1, 30/1, 10/1, 7/1, 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn *n*-hexan/axeton tỷ lệ 3/1 và có kí hiệu ACED-6;

f) thu hợp chất epicatechin thô bằng cách nhồi phân đoạn có kí hiệu ACED-6 thu được ở bước e) lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh, tiến hành rửa giải với hệ dung môi diclometan/metanol lần lượt theo tỷ lệ 10/1, 7/1 và 5/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/metanol tỷ lệ 5/1 và có kí hiệu ACED-6-3;

g) tinh chế hợp chất epicatechin bằng cách nhồi phân đoạn có kí hiệu ACED-6-3 thu được ở bước f) lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-C18 có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (lần lượt theo tỷ lệ 1/2, 1/1 và 2/1, thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất epicatechin chất rắn, không màu và có công thức (1) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết bằng diclometan đều được thực hiện 3 lần.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hệ dung môi rửa giải trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất epicatechin thô là diclometan/axeton theo tỷ lệ axeton tăng dần từ 0 đến 100%.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó còn có bước tinh sạch hợp chất epicatechin bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi axetonitril/nước để thu hợp chất epicatechin tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất epicatechin 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 epicatechin có tác dụng điều trị viêm từ nấm Trứng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801) và hợp chất epicatechin 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 epicatechin có tác dụng điều trị viêm từ nấm Trứng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột nấm Trứng gà; c) thu các cao chiết và phân đoạn chứa hợp chất epicatechin; d) chiết hợp chất epicatechin; e) thu hợp chất epicatechin thô; và f) tinh chế hợp chất epicatechin.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, thu nấm Trứng gà, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, thái nhỏ, sau đó sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 55⁰C và xay nhỏ (đến kích thước 0,2mm) thu được nguyên liệu bột nấm Trứng gà.

Trong bước chiết nguyên liệu bột nấm Trứng gà, tiến hành chiết ba lần phần bột thu được ở trên bằng etanol 96⁰ theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 20 đến 40 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 60 đến 70⁰C. Sau khi chiết, phần dịch chiết được thu gom và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết etanol (ACE).

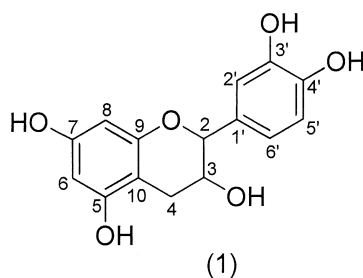
Trong bước hòa tan cao chiết ACE, hòa tan cao chiết ACE vào nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết ACE thu được hỗn hợp dạng lỏng.

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

Trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất epicatechin, đưa cao chiết ACED thu được ở bước trên lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh, tiến hành rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 50/1, 30/1, 10/1, 7/1, 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn *n*-hexan/axeton tỷ lệ 3/1 và có kí hiệu ACED-6.

Trong bước thu hợp chất epicatechin thô, đưa phân đoạn có kí hiệu ACED-6 thu được ở bước trên lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh, tiến hành rửa giải với hệ dung môi diclometan/metanol lần lượt theo tỷ lệ 10/1, 7/1 và 5/1 (thể tích/thể tích), thu phân đoạn diclometan/metanol tỷ lệ 5/1 và có kí hiệu ACED-6-3.

Trong bước thu hợp chất epicatechin tinh, đưa phân đoạn có kí hiệu ACED-6-3 thu được ở bước trên lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-C18 có kích cỡ hạt 40 đến 63 μm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (lần lượt theo tỷ lệ 1/2, 1/1 và 2/1, thể tích/thể tích), sau khi cô loại dung môi, thu được hợp chất epicatechin dạng rắn, không màu và có công thức (1) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó hệ dung môi rửa giải trong bước thu phân đoạn chứa hợp chất epicatechin thô là diclometan/axeton theo tỷ lệ axeton tăng dần từ 0 đến 100%.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó còn có bước tinh sạch hợp chất epicatechin bằng cách hòa tan sản phẩm thu được trong hệ dung môi axetonitril/nước để thu hợp chất epicatechin tinh khiết trên 95%.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến hợp chất epicatechin thu được bằng quy trình theo giải pháp, trong đó hợp chất epicatechin 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 epicatechin từ nấm Trứng gà (Amanita caesarea (Scop.) Pers. 1801).

Thu nấm Trứng gà, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ khoảng 50°C đến khối lượng không đổi sau đó xay nhỏ thành bột (có kích thước 0,2mm) và thu được 1kg bột. Phần bột này được chiết ba lần bằng etanol 96⁰ (3 x 5L) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm 30 phút ở nhiệt độ chiết 65°C, sau khi cô quay loại bỏ dung môi thu được cao etanol (ACE 50g). Cao chiết ACE được hòa tan vào 150 mL nước nóng, sau đó siêu âm để hòa tan hết cao chiết ACE thu được hỗn hợp dạng lỏng. Bổ sung 450 mL diclometan (3 x 450 mL) 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 diclometan và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết diclometan (ACED; 15g). Cao chiết ACED (15g) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/axeton lần lượt theo tỷ lệ 50/1, 30/1, 10/1, 7/1, 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 3/1 và có kí hiệu là ACED-6 (1,2g). Phân đoạn ACED-6 (1,2g) tiếp tục được đưa lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là diclometan/metanol theo tỷ lệ 10/1, 7/1 và 5/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclometan/metanol là 5/1 và có kí hiệu là ACED-6-3 (380mg). Hòa tan phân đoạn có kí hiệu ACED-6-3 (380mg) lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-C18 (có kích cỡ hạt 40 đến 63µm) theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (lần lượt theo tỷ lệ 1/2, 1/1 và 2/1, thể tích/thể tích) thu được hợp chất có tên là epicatechin (65 mg) có công thức (1) dạng rắn, không màu.

Ví dụ 2: Định tính và định lượng hợp chất epicatechin được phân lập và tinh chế từ nấm Trứng gà (Amanita caesarea (Scop.) Pers. 1801).

Hợp chất dạng rắn, 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 epicatechin có công thức (1)

- Tên theo IUPAC: 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2*H*-chromene-3,5,7-triol.

- Mô tả: Hợp chất dạng rắn, không màu, tan tốt trong dung môi metanol. Xác định định tính bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel pha đảo tráng sẵn 60 RP-18 F_{254S} (Merck), dung môi triển khai là metanol/nước = 1/1 (v/v); $R_f = 0,35$.

- CTPT: C₁₅H₁₄O₆ (M = 290).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ¹H-NMR (500 MHz, Metanol-*d*₄) δ_H (ppm): 7,01 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'); 6,83 (1H, dd, $J = 8,5; 2,0$ Hz, H-6'); 6,79 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'); 5,97 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8); 5,95 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6); 4,84 (1H, overlap, H-2); 4,20 (1H, t, $J = 3,0$ Hz, H-3); 2,89 (1H, dd, $J = 5,0; 12,0$ Hz, H-4_{ax}); 2,76 (1H, dd, $J = 3,0; 12,0$ Hz, H-4_{eq}); ¹³C-NMR (125 MHz, Metanol-*d*₄) δ_C (ppm): 158,1 (C-7); 157,8 (C-5); 157,5 (C-9); 146,0 (C-4'); 145,9 (C-3'); 132,4 (C-1'); 119,5 (C-6'); 116,0 (C-5'); 115,4 (C-2'); 100,2 (C-10); 96,5 (C-6); 96,0 (C-8); 80,0 (C-2); 67,6 (C-3); 29,3 (C-4).

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 epicatechin.

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất epicatechin phân lập từ nấm Trùng gà (Amanita caesarea (Scop.) Pers. 1801) 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 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 550nm.

+ Phương pháp xác định hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất epicatechin phân lập từ nấm Trứng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801).

Tế bào RAW 264,7 được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ 10^4 tế bào/giếng, ủ trong 12 giờ ở điều kiện 37°C , 5% CO_2 . Hút bỏ môi trường cũ và thay thế bằng môi trường chứa 1% FBS, ủ trong 6 giờ. Sau đó, thay môi trường cũ bằng môi trường có chứa hợp chất epicatechin (hoặc đối chứng dương-Celastrol) ở các nồng độ khác nhau và LPS nồng độ $0,5\mu\text{g/mL}$, ủ 24 giờ. Hút $50\mu\text{L}$ dịch nổi trong mỗi giếng sang đĩa 96 giếng khác và bổ sung $50\mu\text{L}$ 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 epicatechin phân lập từ nấm Trứng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801)

Hợp chất	IC ₅₀ (μM)
Epicatechin	$5,7 \pm 0,5$
Celastrol	$1,0 \pm 0,1$

Tác dụng ức chế sự sản sinh NO của hợp chất epicatechin được thể hiện ở bảng 1. Hợp chất epicatechin có tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO với giá trị $\text{IC}_{50} = 5,7 \pm 0,5$ (μM) so với chất đối chứng dương-Celastrol ($\text{IC}_{50} = 1,0 \pm 0,1$ μM). Với tác dụng ức chế mạnh sự sản sinh NO, hợp chất epicatechin có tiềm năng trong điều trị viêm, từ đó định hướng hợp chất epicatechin 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 epicatechin từ nấm Trứng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801) với hiệu suất chiết cao và có tác dụng điều trị viêm trên cơ sở ức chế tốt sự sản sinh NO. 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. Hợp chất epicatechin theo giải pháp có tiềm năng phát triển thành dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng hỗ trợ trong việc ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập và tinh chế hợp chất epicatechin có tác dụng kháng viêm từ nấm Trứng gà (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu nấm Trứng gà, rửa sạch, loại bỏ tạp chất, thái nhỏ, sau đó sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 55°C và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,2mm thu được nguyên liệu bột nấm Trứng gà;

b) chiết nguyên liệu bằng cách chiết nguyên liệu bột nấm Trứng gà với etanol 96⁰ theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 20 đến 40 phút ở nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 60 đến 70°C, sau khi cất loại dung môi thu được phân cao chiết;

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

d) chiết bằng diclometan bằng cách bổ sung diclometan vào hỗn hợp dạng lỏng thu được ở bước c) theo tỷ lệ 1/3 (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 diclometan và cô quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết diclometan;

c) thu phân đoạn chứa hợp chất epicatechin bằng cách nhồi phân cao chiết thu được ở bước d) lên cột sắc ký silica gel có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh, tiến hành rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 50/1, 30/1, 10/1, 7/1, 5/1 và 3/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ *n*-hexan/axeton là 3/1;

d) thu hợp chất epicatechin thô bằng cách nhồi phân đoạn *n*-hexan/axeton là 3/1 thu được ở trên lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (có kích cỡ hạt 230 đến 400 mesh) và hệ dung môi rửa giải là diclometan/metanol lần lượt theo tỷ lệ 10/1, 7/1 và 5/1 (thể tích/thể tích) thu được phân đoạn có tỷ lệ diclometan/metanol là 5/1; và

e) tinh chế hợp chất epicatechin bằng cách nhồi phân đoạn có tỷ lệ diclometan/metanol là 5/1 lên cột sắc ký ODS với chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-C18 có kích cỡ hạt 40 đến 63µm theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/khối lượng) với hệ dung môi rửa giải là metanol/nước (theo tỷ lệ 1/2, 1/1, và 2/1, thể tích/thể tích), sau khi

cô loại dung môi, thu được hợp chất epicatechin dạng rắn, không màu và có công thức (1):

