



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

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

(11)



1-0029299

(51)⁷ A61K 35/00

(13) B

(21) 1-2018-02090

(22) 18/05/2018

(45) 25/08/2021 401

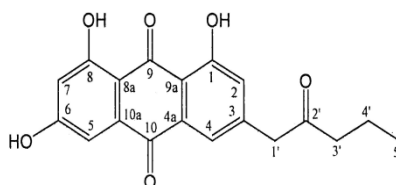
(43) 25/11/2019 380A

(73) Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Châu Văn Minh (VN); Nguyễn Hoài Nam (VN); Phan Văn Kiệm (VN); Nguyễn Xuân Cường (VN); Lê Thị Viên (VN); Trần Thị Hồng Hạnh (VN); Phan Thị Thanh Hương (VN); Nguyễn Hải Đăng (VN); Nguyễn Văn Thanh (VN); Đỗ Công Thung (VN).

(54) HỢP CHẤT ANTHRAQUINON CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM VÀ PHƯƠNG PHÁP CHIẾT HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI HUỆ BIỂN CAPILLASTER MULTIRADIATUS

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất anthraquinon có công thức (I) dưới đây và phương pháp chiết hợp chất này từ huệ biển *Capillaster multiradiatus* sinh sống ở vùng biển Trung Bộ Việt Nam. Hợp chất này có hoạt tính kháng viêm trên cơ sở ức chế mạnh sự sản sinh nitric oxit (NO) ở tế bào RAW264.7.



(I)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

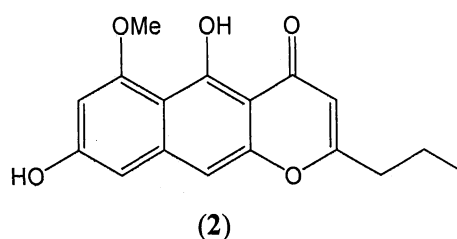
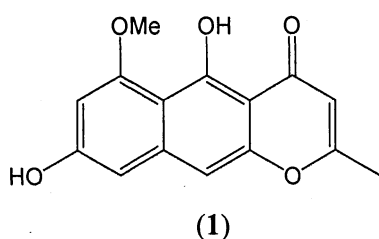
Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa học, cụ thể là sáng chế đề cập đến hợp chất anthraquinon mới 3-(2'-on-*n*-pentyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinon (được đặt tên là capillasterquinone A) có hoạt tính kháng viêm và phương pháp chiết hợp chất này từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

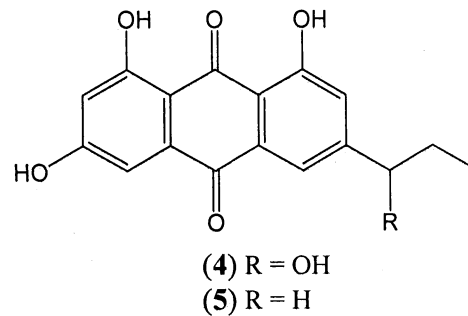
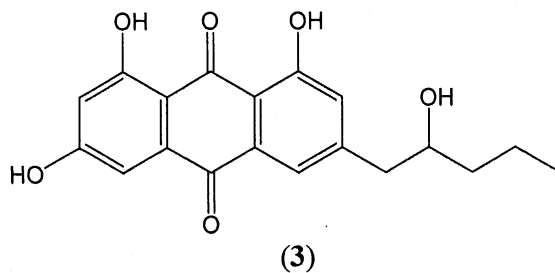
Với khoảng 7000 loài đã được ghi nhận, động vật da gai là một ngành lớn nhất trong số các động vật biển không xương sống và hầu hết chúng là các loài sinh vật đáy. Các loài động vật da gai tồn tại ở tất cả các vùng biển trên thế giới từ các vùng ven bờ cho đến những khu vực sâu nhất và kích thước của chúng thay đổi rất đa dạng. Hiện nay, các loài động vật da gai được chia thành năm lớp chính là Hải sâm - Holothuroidea, Sao biển - Asteroidea, Cầu gai - Echinoidea, Huệ biển - Crinoidea và Đuôi rắn - Ophiuroidea. Trong đó, các loài huệ biển thường có kích thước nhỏ (trung bình từ 10-20 cm), dễ vỡ và thường có màu sắc sặc sỡ với sự có mặt của các lớp chất sắc tố. Các nghiên cứu đã công bố cho thấy, thành phần hóa học chủ yếu của các loài huệ biển là các chất sắc tố quinon (chủ yếu là anthraquinon và naphthopyron), steroid, glycolipit, phosphoceramit và các dẫn xuất 3,5-dibromotyrosin (theo tài liệu Kornprobst, Jean-Michel, *Encyclopedia of Marine Natural Products - Echinoderms*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014, pp. 1499-1599).

Tuy nhiên, hiện có rất ít các công trình khoa học nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài huệ biển thuộc giống *Capillaster* được công bố trên toàn thế giới. Năm 2010, hai hợp chất naphthopyron là TMC-256A1 (1) và 5,8-dihydroxy-6-methoxy-2-propyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one (2) được phân lập từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*. Hai hợp chất này được đánh giá khả năng kìm hãm ABCG2 (một protein màng dẫn thuốc có vai trò trong quá trình gây kháng thuốc). Tuy nhiên, chúng chỉ thể hiện hoạt tính yếu [theo tài liệu Bokesch H R et al., *Bioorg. Med.*

Chem. Lett., 2010, 20(13), 3848-3850]. Đến năm 2015, các căn chiết axeton, butanol, cloroform, etyl axetat, metanol và nước của loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* được phát hiện có biểu hiện hoạt tính kháng một số chủng vi khuẩn gây bệnh cho người và cá [theo tài liệu Emmanuel Joshua Jebasingh S et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.*, 2015, 85(1), 271-276].



Trong khuôn khổ hợp phần dự án nghiên cứu tìm kiếm các chất có khả năng kháng viêm từ dược liệu da gai ở vùng biển Trung Bộ Việt Nam, nhóm tác giả đã đi sâu nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính kháng viêm của loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* thu tại vùng biển Sơn Trà, Đà Nẵng vào tháng 8 năm 2016 và phân lập được một hợp chất anthraquinon mới được đặt tên là capillasterquinone A. Đây là lần đầu tiên một nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài huệ biển này được thực hiện ở Việt Nam. Hợp chất capillasterquinone A theo sáng chế có cấu trúc mạch nhánh độc đáo có độ dài mạch là 5 cacbon và một nhóm keton ở vị trí C-2'. Theo dữ liệu tra cứu sử dụng Scifinder, hiện chưa có nhiều các hợp chất anthraquinon có cấu trúc nhánh gần giống với nhánh của capillasterquinone A được công bố. Hiện mới chỉ có duy nhất hợp chất 3-(2'-hydroxy-*n*-pentyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinon (3) cũng có cấu trúc nhánh chứa 5 cacbon nhưng có nhóm OH ở vị trí C-2' lần đầu tiên được phát hiện từ loài huệ biển *Comanthus bennetti* và được mô tả trong tài liệu: Bartolini G L et al., *Tetrahedron*, 1973, 29(22), 3699-3702. Sau đó, hợp chất này tiếp tục được phát hiện từ loài sao biển *Echinaster echinophorus* năm 1977 [Utkina N K and Maksimov O B, *Chem. Nat. Comp.*, 1977, 13(5), 528-531] và sao biển *Echinaster brasiliensis* năm 1993 [Iorizzi M et al., *J. Nat. Prod.*, 1993, 56(12), 2149-2162]. Tuy nhiên, chưa có số liệu nào về hoạt tính sinh học của hợp chất này được công bố.



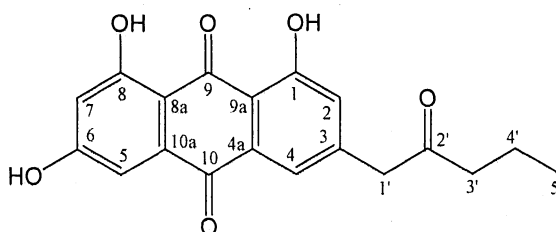
Một số hợp chất có cấu trúc tương tự với phần nhánh chứa 3 cacbon như rhodoptilometrin (4) và 1'-deoxyrhodoptilometrin (5) cũng được công bố từ loài huệ biển *Colobometra perspinosa* [theo tài liệu Wright A D et al., *Mar. Drugs*, 2009, 7, 565-575] và *Comanthus* sp. [theo tài liệu Wätjen W et al., *Arch. Toxicol.*, 2017, 91(3), 1485-1495]. Các hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng một số dòng tế bào ung thư.

Trong lĩnh vực tìm kiếm các chất kháng viêm, việc tìm kiếm, sàng lọc và đánh giá các chất có khả năng ức chế sự sản sinh nitric oxit (NO) là bước đi đầu tiên vô cùng quan trọng. Viêm được coi như một cơ chế phòng vệ sinh lý chủ yếu, giúp cơ thể tự bảo vệ chống lại nhiễm trùng, bỏng, hóa chất độc hại, chất gây dị ứng hoặc kích thích độc hại khác. Viêm không kiểm soát được có thể như một yếu tố dẫn đến các bệnh mãn tính. Trong quá trình viêm, những tế bào viêm (bạch cầu trung tính, bạch cầu ái toan, thực bào đơn nhân và đại thực bào) được kích hoạt tiết ra một lượng lớn nitric oxit (NO), prostaglandin E2 (PGE2) và các xytokin tiền viêm như IL-1 β , IL-6, TNF- α nhằm tiêu diệt hoặc ức chế sự tăng trưởng của vi sinh vật xâm nhập hoặc mô ung thư. Các tác nhân như LPS (lipopolysacarit), một thành phần chính của màng ngoài vi khuẩn Gram âm, có thể kích hoạt các đại thực bào tiết ra các xytokin tiền viêm và chất trung gian gây viêm như NO. Sự sản sinh NO được điều khiển bởi nitric oxit synthaza (NOS), trong đó bao gồm nitric oxit synthaza cảm ứng (iNOS), nitric oxit synthaza nội bào (eNOS) và nitric oxit synthaza thần kinh (nNOS). NO được sinh ra từ quá trình chuyển hoá L-Arginin thành L-citrulin, xúc tác chủ yếu bởi iNOS. Tuy nhiên việc sản sinh ra quá nhiều hợp chất này không chỉ gây tổn thương mô và tế bào mà còn là nguyên nhân quan trọng gây ra bệnh thấp khớp và viêm gan mạn tính. Thông qua ức chế enzym tổng hợp NO (iNOS) và COX-2, các thuốc chống viêm ngăn cản sản xuất NO tham gia vào đáp ứng viêm. Như vậy, hợp chất capillasterquinone A theo sáng chế có cấu trúc hóa học độc đáo và thể

hiện hoạt tính ức chế mạnh sự sản sinh NO ở tế bào RAW264.7. Phương pháp chiết hợp chất capillasterquinone A từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* được đề cập theo sáng chế để thực hiện, đảm bảo độ lặp lại và cho hiệu suất cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế nhằm góp phần nghiên cứu và phân lập các hoạt chất có hoạt tính kháng viêm, tạo tiền đề quan trọng trong việc bào chế dược phẩm góp phần phòng và điều trị bệnh viêm từ hoạt chất phân lập được. Để đạt được mục đích này, theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất anthraquinon được chiết từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* có công thức (I):



(I)

Hợp chất anthraquinon này được đặt tên là capillasterquinone A có hoạt tính kháng viêm trên cơ sở ức chế mạnh sự sản sinh nitric oxit (NO) ở tế bào RAW264.7.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp chiết hợp chất anthraquinon từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*. Phương pháp theo sáng chế đơn giản, có độ ổn định và hiệu suất cao.

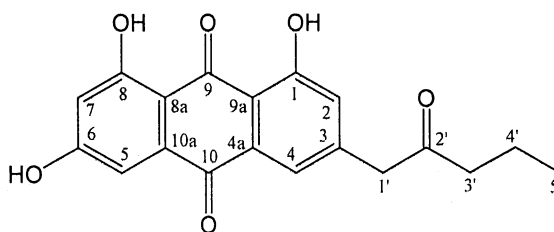
Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết với các ví dụ và các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên các ví dụ và các phương án thực hiện này chỉ nhằm làm rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* được thu gom tại Sơn Trà, Đà Nẵng. Tên khoa học được giám định tại Viện Tài nguyên và Môi trường Biển. Loài huệ biển sau khi thu gom được tiến hành rửa sạch, sấy khô, xay nhỏ, chiết, phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất theo các phương pháp mô tả dưới đây: Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck 1,05715), RP-18 F_{254S} (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm hoặc

dùng thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng từ từ đến khi hiện màu. Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là Silicagel pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (240-430 mesh, Merck). Silicagel pha đảo YMC*GEL (ODS-A, 12 nm S-150 μm , YMC Co., Ltd.). Sắc ký lỏng trung áp (MPLC) được thực hiện trên máy Biotage - Isolera One. Sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (preparative HPLC) được thực hiện trên hệ thống máy Agilent 1200 series. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy AVANCE III HD 500. Phổ khối lượng phân giải cao HR-QTOF-MS được đo trên máy Agilent 6530 Accurate-Mass spectrometer.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất anthraquinon được chiết từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* có công thức (I):



(I)

Hợp chất này được đặt tên là capillasterquinone A và có danh pháp hóa học là 3-(2'-on-*n*-pentyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinon. Các thông số hoá lý của hợp chất này là như sau:

Công thức phân tử: $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_6$;

Khối lượng phân tử: $M = 340$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột màu đỏ;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-QTOF-MS tại m/z 341,0998 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_6^+$, 341,1014) và 363,0818 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{NaO}_6^+$, 363,0839);

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp chiết hợp chất anthraquinon từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* bao gồm các bước:

(i) chiết xuất loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* bằng cách chiết xuất loài huệ biển đã được xay thành bột bằng rượu metylic theo tỷ lệ khối lượng bột loài huệ biển/thể tích rượu metylic là 1/2, chiết 3 lần trong điều kiện siêu âm, mỗi lần chiết trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng thu được dịch chiết;

(ii) thu dịch nước (CM-W) bằng cách lọc dịch chiết thu được ở bước (i), cất quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô, hòa tan dịch cô với nước theo tỷ lệ khối lượng dịch cô/thể tích nước là 1/10, sau đó chiết phân bố lỏng-lỏng với dung môi *n*-hexan một lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, lớp nước được tiến hành cất loại bỏ *n*-hexan dưới áp suất giảm để thu được dịch nước, ký hiệu là CM-W;

(iii) phân tách để thu các phân đoạn bằng cách chiết phân bố CM-W bằng diclometan ba lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, lớp diclometan được tiến hành cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết, tiếp theo phân tách cặn chiết trên sắc ký lỏng trung áp (MPLC) sử dụng cột nhồi silica gel, pha động gradient *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ từ 50/1 đến 1/1 về thể tích thu được bảy phân đoạn ký hiệu từ CM-D1 đến CM-D7 tương ứng với các nồng độ *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 50/1, 30/1, 20/1, 10/1, 5/1, 2/1, 1/1 về thể tích;

(iv) thu các phân đoạn nhỏ bằng cách phân lập phân đoạn CM-D4 trên sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha đảo, sử dụng hệ dung môi rửa giải MeOH/H₂O theo tỷ lệ 1/1 về thể tích thu được năm phân đoạn nhỏ hơn được ký hiệu lần lượt là CM-D4A đến CM-D4E;

(v) thu hợp chất anthraquinon bằng cách phân lập phân đoạn CM-D4B trên sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là *n*-hexan/EtOAc với tỷ lệ về thể tích là 5/1 thu được hai phân đoạn nhỏ hơn được ký hiệu là CM-D4B1 và CM-D4B2, tiếp theo tinh chế phân đoạn CM-D4B1 trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (preparative HPLC), cột C₁₈, pha động axetonitril/nước theo tỷ lệ 60/40 thu được hợp chất anthraquinon dưới dạng chất bột màu đỏ.

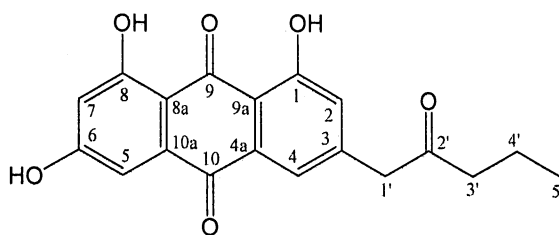
Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chiết hợp chất anthraquinon từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus*

Mẫu khô huệ biển *Capillaster multiradiatus* được xay nhỏ thu bột, cân 1,5kg bột và chiết 3 lần bằng rượu metylic (3×3 lít) trong điều kiện siêu âm, mỗi lần trong thời gian 1 giờ ở

nhiệt độ trong phòng. Gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được, lọc qua giấy lọc và cất quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là CM-M (100 g). Hòa tan dịch cô CM-M với nước cất (1 lít) rồi chiết phân bố lỏng-lỏng với dung môi *n*-hexan 1 lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, lớp nước được tiến hành cất loại bỏ *n*-hexan (còn sót) dưới áp suất giảm để thu được dịch nước, ký hiệu là CM-W. Dịch CM-W được tiếp tục chiết phân bố bằng diclometan ba lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, lớp diclometan được tiến hành cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết ký hiệu là CM-D (20 g); cặn CM-D (20 g) được tiến hành phân tách trên sắc ký lỏng trung áp (MPLC) sử dụng cột nhồi silica gel (Biotage® KP-SIL 120 g), pha động gradient *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 50/1 đến 1/1 về thể tích thu được bảy phân đoạn ký hiệu từ CM-D1 đến CM-D7 tương ứng với các nồng độ *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 50/1, 30/1, 20/1, 10/1, 5/1, 2/1, 1/1 về thể tích. Phân đoạn CM-D4 (1,5 g) được tiếp tục tiến hành phân lập trên sắc ký cột (Φ 2,5 cm, L 80 cm) với chất hấp phụ là silica gel pha đảo, sử dụng hệ dung môi rửa giải MeOH/H₂O tỷ lệ 1/1 về thể tích thu được năm phân đoạn nhỏ hơn được ký hiệu lần lượt là CM-D4A đến CM-D4E. Phân đoạn CM-D4B (55 mg) được tiếp tục tiến hành phân lập trên sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là *n*-hexan/EtOAc với tỷ lệ về thể tích là 5/1 thu được hai phân đoạn nhỏ hơn được ký hiệu là CM-D4B1 (27 mg) và CM-D4B2 (25 mg). Phân đoạn CM-D4B1 (27 mg) được tinh chế trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (preparative HPLC) Agilent 1200 series sử dụng cột Cosmosil 5C18-MS-II column, 250×4,6 mm, 5 μm, pha động axetonitril/H₂O 60/40, tốc độ dòng 0,6 ml/phút thu được 11 mg hợp chất capillasterquinone A dưới dạng chất bột màu đỏ.

Hợp chất 3-(2'-on-*n*-pentyl)-1,6,8-trihydroxy-9,10-anthraquinon (capillasterquinone A) thu được có công thức (I):



(I)

Các thông số hoá lý của hợp chất này là như sau:

Công thức phân tử: $C_{19}H_{16}O_6$;

Khối lượng phân tử: $M = 340$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột màu đỏ;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-QTOF-MS tại m/z 341,0998 $[M+H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{19}H_{17}O_6^+$, 341,1014) và 363,0818 $[M+Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{19}H_{16}NaO_6^+$, 363,0839);

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

Bảng 1. Số liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất capillasterquinone A có công thức (I).

C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	161,1	-	
2	125,2	7,17 br s	1
3	144,7	-	
4	121,0	7,51 br s	2, 9a, 10, 1'
4a	132,7	-	
5	109,6	7,10 br s	6, 7, 8a, 10
6	166,1	-	
7	107,9	6,54 br s	6, 8
8	164,6	-	
8a	108,5	-	
9	189,1	-	
9a	114,2	-	
10	181,6	-	
10a	135,1	-	
1'	48,3	3,96 s	2, 3, 4, 2'
2'	206,7	-	
3'	43,9	2,54 t (7,5)	2'
4'	16,5	1,52 m	2'
5'	13,5	0,86 t (7,5)	3', 4'

^aĐo trong DMSO- d_6 , ^b125 MHz, ^c500 MHz.

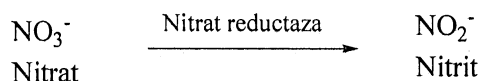
Ví dụ 2: Thử nghiệm tác dụng kháng viêm của hợp chất capillasterquinone A

Hợp chất capillasterquinone A được đánh giá khả năng kháng viêm dựa trên sự ức chế sản sinh nitric oxit (NO) trên dòng tế bào RAW264.7 theo phương pháp của Dirsch (Dirsch V M et al., *Planta Medica*, 1998, 64, 423-426) cụ thể như sau:

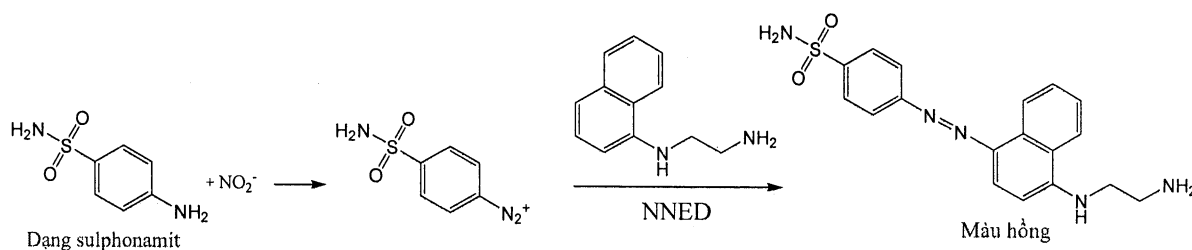
Chuẩn bị mẫu: Hợp chất capillasterquinone A được pha thành dung dịch gốc với nồng độ 100 mM trong DMSO, sau đó pha loãng ở các nồng độ khác nhau.

Nguyên lý: Gốc tự do $\bullet$ NO được sản sinh ở nhiều loại tế bào khác nhau. Dạng $\bullet$ NO cảm ứng có mặt ở các tế bào như đại thực bào, nguyên bào sợi, hay tế bào gan thường được sản sinh với lượng lớn khi xuất hiện các đáp ứng viêm.

Một phương pháp được sử dụng để xác định gián tiếp $\bullet$ NO là đo màu các thành phần sản phẩm của nó (nitrat và nitrit). Phản ứng này đòi hỏi rằng nitrat (NO_3^-) đầu tiên được giảm thành nitrit (NO_2^-), do tác động của nitrat reductaza.



Nitrit được phát hiện và phân tích bằng cách hình thành một màu hồng đỏ khi mẫu thử có chứa NO_2^- với thuốc thử Griess.



Khi thêm axit sulphanilic, nitrit tạo thành muối diazonium, sau đó các thuốc nhuộm azo (N- α -naphthyl-ethylenediamin) được thêm vào để tạo thành màu hồng.

Các bước tiến hành: Tế bào RAW264.7 được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường DMEM ở 37°C , 5% CO_2 với 10% FBS, penixilin (100 U/mL) và streptomycin sulphat (100 $\mu\text{g/mL}$). Sau đó chúng được nuôi cấy trong giếng phiên 96 với thể tích là 200 μL , mật độ $2,5 \times 10^5$ tế bào/giếng. Tế bào được kích thích với 0,1 mg/mL LPS trong 24 giờ dưới sự có mặt của các hợp chất thử ở nhiều nồng độ khác nhau, được pha sẵn trong

DMSO. Dịch nổi của tế bào phản ứng với thuốc thử Griess. NaNO_2 ở các nồng độ khác nhau (5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g/mL}$) được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Độ hấp thụ được đo ở 570 nm.

Tính giá trị IC_{50} : Nồng độ ức chế 50% (IC_{50}) được xây dựng trên 5 nồng độ thử nghiệm là 1, 3, 10, 30 và 100 μM . Giá trị IC_{50} được xác định theo phương pháp hồi quy không tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 6.0.

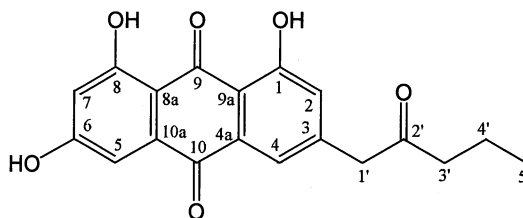
Kết quả: Kết quả sàng lọc sơ bộ cho thấy, ở nồng độ 100 μM , hợp chất capillasterquinone A ức chế $87,92 \pm 1,37\%$ sự sản sinh nitric oxit (NO) trên dòng tế bào RAW264.7. Kết quả đánh giá tiếp theo cho thấy, hợp chất này có biểu hiện hoạt tính kháng viêm mạnh với giá trị nồng độ ức chế 50% (IC_{50}) là $5,89 \pm 0,11\ \mu\text{M}$, gần tương đương với chất đối chứng dương được sử dụng là cardamonin ($\text{IC}_{50} = 2,59 \pm 0,18\ \mu\text{M}$).

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Hợp chất anthraquinon mới capillasterquinone A được chiết từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* thu ở vùng biển Sơn Trà, Đà Nẵng có hoạt tính kháng viêm trên cơ sở ức chế mạnh sự sản sinh nitric oxit (NO) ở tế bào RAW264.7, và phương pháp chiết hợp chất này đơn giản và có độ ổn định cao. Sáng chế này tạo cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng kháng viêm từ nguồn dược liệu biển quý và sẵn có trong nước, cụ thể là loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* phân bố rộng rãi và có trữ lượng dồi dào ở vùng biển Trung Bộ Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất anthraquinon được chiết từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* có công thức (I):



(I)

2. Phương pháp chiết hợp chất anthraquinon có công thức (I) từ loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* bao gồm các bước:

- (i) chiết xuất loài huệ biển *Capillaster multiradiatus* bằng cách chiết xuất loài huệ biển đã được xay thành bột bằng rượu metylic theo tỷ lệ khối lượng bột loài huệ biển/thể tích rượu metylic là 1/2, chiết 3 lần trong điều kiện siêu âm, mỗi lần chiết trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng thu được dịch chiết;
- (ii) thu dịch nước (CM-W) bằng cách lọc dịch chiết thu được ở bước (i), cất quay loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô, hòa tan dịch cô với nước theo tỷ lệ khối lượng dịch cô/thể tích nước là 1/10, sau đó chiết phân bố lỏng-lỏng với dung môi *n*-hexan một lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, lớp nước được tiến hành cất loại bỏ *n*-hexan dưới áp suất giảm để thu được dịch nước, ký hiệu là CM-W;
- (iii) phân tách để thu các phân đoạn bằng cách chiết phân bố CM-W bằng diclometan ba lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, lớp diclometan được tiến hành cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết, tiếp theo phân tách cặn chiết trên sắc ký lỏng trung áp (MPLC) sử dụng cột nhồi silica gel, pha động gradient *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ từ 50/1 đến 1/1 về thể tích thu được bảy phân đoạn ký hiệu từ CM-D1 đến CM-D7 tương ứng với các nồng độ *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 50/1, 30/1, 20/1, 10/1, 5/1, 2/1, 1/1 về thể tích;
- (iv) thu các phân đoạn nhỏ bằng cách phân lập phân đoạn CM-D4 trên sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha đảo, sử dụng hệ dung môi rửa giải MeOH/H₂O theo tỷ lệ

1/1 về thể tích thu được năm phân đoạn nhỏ hơn được ký hiệu lần lượt là CM-D4A đến CM-D4E; và

(v) thu hợp chất anthraquinon bằng cách phân lập phân đoạn CM-D4B trên sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là *n*-hexan/EtOAc với tỷ lệ về thể tích là 5/1 thu được hai phân đoạn nhỏ hơn được ký hiệu là CM-D4B1 và CM-D4B2, tiếp theo tinh chế phân đoạn CM-D4B1 trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (preparative HPLC), cột C₁₈, pha động axetonitril/nước theo tỷ lệ 60/40 thu được hợp chất anthraquinon dưới dạng chất bột màu đỏ.