



(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)



2-0002890

(51) **C07D 307/00; A61K 36/53**
2016.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00514

(22) 06/08/2018

(67) 1-2018-03423

(45) 25/04/2022 409

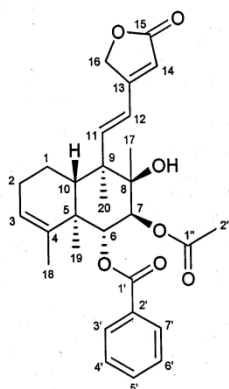
(43) 25/02/2020 383A

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

(72) Châu Văn Minh (VN); Nguyễn Hoài Nam (VN); Phan Văn Kiệm (VN); Nguyễn
Xuân Cường (VN); Trần Hồng Quang (VN); Trần Thị Hồng Hạnh (VN); Đỗ Thị
Thảo (VN); Nguyễn Quang Trung (VN); Nguyễn Thế Cường (VN).

(54) **HỢP CHẤT SCUTEBARBATOLIDE A CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG TẾ BÀO UNG THƯ
THỬ NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP CHIẾT HỢP CHẤT NÀY TỪ CÂY BÁN CHI LIÊN
SCUTELLARIA BARBATA**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất diterpenoit mới có công thức (I) dưới đây và phương pháp chiết hợp chất này từ cây bán chi liên *Scutellaria barbata* thu hái ở Mê Linh, Hà Nội vào tháng 6 năm 2016. Hợp chất này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên năm dòng tế bào ung thư thử nghiệm là ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư gan (HepG2), ung thư biểu mô (KB), ung thư vú (MCF7) và ung thư da (SK-Mel2). Phương pháp theo sáng chế rất hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra dược phẩm có tác dụng phòng và điều trị ung thư chứa hợp chất này cũng như các dẫn xuất của nó.



(I)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc từ cây thuốc Việt Nam có hoạt tính gây độc tế bào ung thư thử nghiệm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất diterpenoit 6α -benzoyloxy- 7β -acetoxy- 8β -hydroxy-3,11(*E*),13-neoclerodatrien-15,16-olide (được đặt tên là scutebarbatolide A) và phương pháp chiết hợp chất này từ cây bán chi liên *Scutellaria barbata* thu hái ở Mê Linh, Hà Nội.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

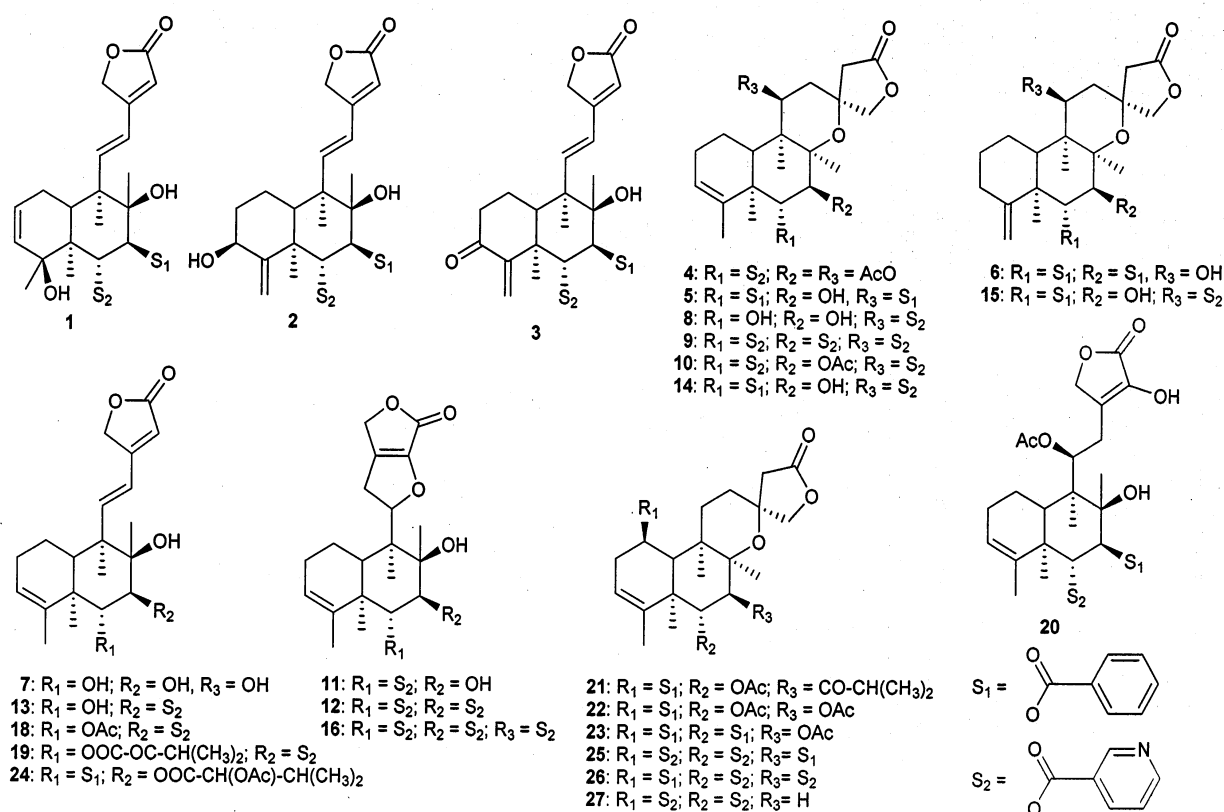
Cây bán chi liên (*Scutellaria barbata* D. Don) thuộc họ Hoa môi (Lamiaceae) là dạng cây thảo, cao 0,2-0,5 m, thân không lông. Lá mọc đối, phiến xoan thon, dài 1-2 cm, mép có răng đều. Cụm hoa dài 3-5 cm mọc ở ngọn. Cây mọc ở nơi sáng và ẩm, ruộng hoang, bãi hoa từ vùng thấp đến vùng cao. Cây ra hoa từ tháng 4 đến tháng 10, có quả từ tháng 6 đến tháng 11. Cây phân bố ở một số nước châu Á như Ấn Độ, Mianma, Trung Quốc, Lào, Thái Lan, và Việt Nam. Ở Việt Nam, cây bán chi liên được tìm thấy ở Thái Nguyên, Bắc Giang, Bắc Ninh, Phú Thọ, Hà Nội, Hòa Bình, Hải Dương, Ninh Bình, Thanh Hóa, và Quảng Trị. Trong y học dân gian Việt Nam, cây dùng trị khối u tân sinh, áp xe phổi, viêm ruột thừa, viêm gan, điều trị các loại mụn nhọt sưng đau, viêm mủ, rắn độc cắn, sâu bọ đốt, đòn ngã tổn thương. Theo y học cổ truyền Trung Quốc, dịch chiết của *Scutellaria barbata* được sử dụng rộng rãi trong điều trị ung thư phổi, ung thư gan, ung thư trực tràng (xem tài liệu *Võ Văn Chi, Từ điển cây thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học* 2012, tập 1, trang 1102).

Các nghiên cứu về dược học trên thế giới cho thấy *Scutellaria barbata* thể hiện hoạt tính tiêu diệt tế bào ung thư và kháng khối u như: ức chế sự phát triển của ung thư phổi A549 (xem tài liệu *Life Science* 2004, 75, 2233-2244), ung thư tử cung (xem tài liệu *Phytotherapy Research* 2008, 22, 583-590), ức chế tăng sinh và kích hoạt cơ chế chết theo

chương trình ở tế bào A2780 thông qua con đường ty thể và giảm biểu hiện MMP-2/9 (xem tài liệu *Journal of Ethnopharmacology* 2017, 206, 184-192), ức chế sự di căn và xâm lấn của các tế bào ung thư ruột kết thông qua ức chế con đường truyền tín hiệu PI3K/AKT và TGF- β /Smad (xem tài liệu *Experimental and Therapeutic Medicine* 2017, 14, 5527-5534). Dịch chiết *Scutellaria barbata* cũng ức chế mạnh sự phát triển cũng như sự hình thành u của các tế bào ung thư da (xem tài liệu *Phytotherapy Research* 2007, 21, 135-141), ức chế hình thành mạch của khối u ở mô hình chuột ung thư ruột kết (xem tài liệu *International Journal of Molecular Sciences* 2012, 13, 9419-9430), ức chế sự phát triển khối u gan ở mô hình chuột thực nghiệm thông qua điều hòa tế bào Treg và phản ứng miễn dịch Th1/Th17 (xem tài liệu *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2017, 17, 41). Bên cạnh đó, *Scutellaria barbata* cũng thể hiện hoạt tính kháng ung thư phổi thông qua ức chế sự tăng sinh, gây chết theo chương trình, ức chế hình thành mạch và kích hoạt sự tự hủy của tế bào ung thư phổi CL1-5 (xem tài liệu *Oncotarget* 2017, 8, 109340-109357). Dịch chiết nước của *Scutellaria barbata* được dùng trong điều trị bệnh nhân ung thư ở thử nghiệm lâm sàng pha I cho thấy hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư và được đánh giá là an toàn cho người bệnh (xem tài liệu *Breast Cancer Research and Treatment* 2007, 105, 17-28).

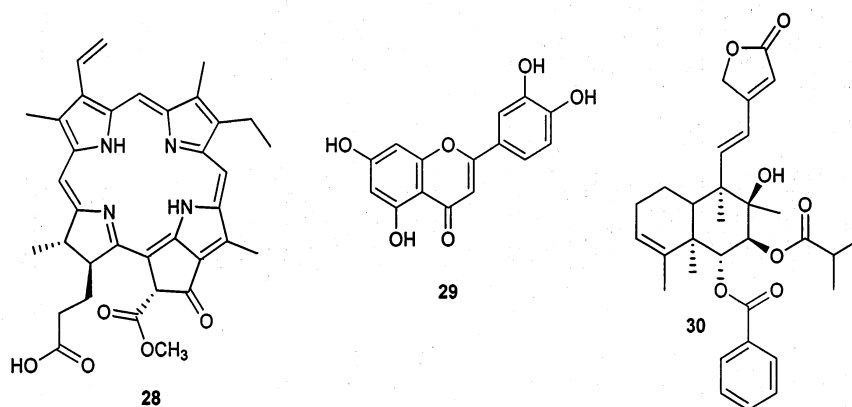
Các nghiên cứu trên thế giới về thành phần hóa học của *Scutellaria barbata* cho thấy sự có mặt của các hợp chất phenolic, flavonoit, và diterpenoit, trong đó lớp chất neoclerodane diterpenoit được xem như thành phần chính của cây thuốc này. Nhóm nghiên cứu của Dai và cộng sự đã phân lập và xác định cấu trúc của một dãy các hợp chất neoclerodane diterpenoit mới từ *Scutellaria barbata* và đánh giá hoạt tính gây độc 3 dòng tế bào ung thư (ung thư vòm họng: HONE-1, ung thư biểu mô: KB, và ung thư ruột kết: HT29), bao gồm: scutebarbatine C-F (1-4) ($IC_{50} = 3,9-7,8 \mu M$) (xem tài liệu *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2006, 54, 869-872.); barbatin A-C (5-7) ($IC_{50} = 3,5-8,1 \mu M$) (*Phytochemistry* 2006, 67, 1326-1330); scutebarbatine G (8), 6,7-di-O-nicotinoylscutebarbatine G (9), 6-O-nicotinoyl-7-O-acetylscutebarbatine G (10), scutebarbatine H (11) and 7-O-nicotinoylscutebarbatine H (12) ($IC_{50} = 3,4-8,5 \mu M$)

(*Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2007, 55, 1218-1221), scutehenanine A-D (**13-17**), 6-*O*-acetylscutehenanine A (**18**), and 6-*O*-(2-carbonyl-3-methylbutanoyl)scutehenanine A (**19**) ($IC_{50} = 2,8-6,4 \mu M$) (xem tài liệu *Journal of Natural Products* 2009, 72, 1793-1797). Theo tài liệu Zhu et al., *Journal of Natural Products* 2010, 73, 233-236, hợp chất neo-clerodane diterpenoit mới scutebata A (**20**) phân lập được từ *Scutellaria barbata* thể hiện hoạt tính gây độc dòng tế bào SK-BR-3, với $IC_{50} = 15,2 \mu M$. Hợp chất scutebata S (**21**) và D (**22**) thể hiện hoạt tính gây độc các tế bào HL-60, LU-1 và MCF7 ở mức yếu (xem tài liệu *Journal of Asian Natural Products Research* 2014, 16, 364-369). Theo tài liệu Yuan et al., *Fitoterapia* 2017, 119, 40-44, hợp chất neo-clerodane diterpenoit mới scubatine F (**23**) thể hiện hoạt tính gây độc dòng tế bào A549 and HL-60 với giá trị $IC_{50} = 10,4$ và $15,3 \mu M$.



Bên cạnh hoạt tính gây độc tế bào ung thư và kháng khối u, các hợp chất neo-clerodane diterpenoit mới phân lập từ *Scutellaria barbata* còn thể hiện một số hoạt tính đáng chú ý khác như: hợp chất scutolide D (**24**) thể hiện hoạt tính kháng virus Epstein-

Barr mạnh, với giá trị $EC_{50} = 3.2 \mu M$ (xem tài liệu *Journal of Natural Products* 2015, 78, 500-509) và ba hợp chất scutebatin A-C (**25-27**) thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh nitric oxide với $IC_{50} = 20,2-35 \mu M$ (xem tài liệu *Journal of Natural Products* 2015, 78, 2292-2296). Ngoài ra, một số hợp chất khác phân lập từ *Scutellaria barbata* thể hiện hoạt tính kháng ung thư như: pheophorbide A (**28**) kích hoạt cơ chế chết theo chương trình của tế bào ung thư gan (xem tài liệu *Planta Medica* 2006, 72, 28-33). Hợp chất luteolin (**29**) phân lập từ *Scutellaria barbata* kích hoạt cơ chế chết theo chương trình của tế bào ung thư phổi thông qua kích thích sự biểu hiện của các protein caspaza và ức chế sự kích hoạt protein kinaza/Akt (xem tài liệu *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007, 1095, 598-611).



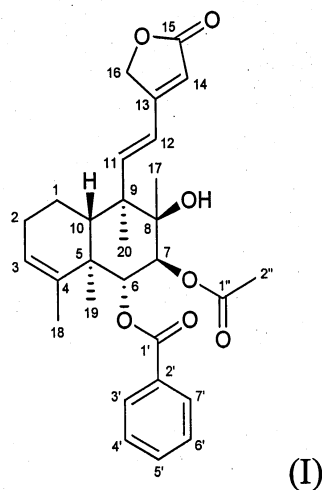
Với những tác dụng ưu việt trong điều trị ung thư trong y học dân gian cũng như hoạt tính chống ung thư trong các nghiên cứu về dược học, cây bán chi liên *Scutellaria barbata* ở Việt Nam đã được nhóm nghiên cứu lựa chọn để nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào ung thư của cây thuốc này. Từ dịch chiết rượu metylic của cây bán chi liên *Scutellaria barbata*, nhóm nghiên cứu đã phân lập và xác định được một hợp chất neo-clerodane diterpenoit mới là 6 α -benzoyloxy-7 β -acetoxo-8 β -hydroxy-3,11(*E*),13-neoclerodatrien-15,16-olide (đặt tên là scutebarbatolide A). Theo tra cứu thư viện thông tin khoa học Scifinder, hợp chất scutebarbatolide A có cấu trúc khá tương tự với hợp chất scutolide C (**30**) đã được mô tả trong tài liệu *Journal of Natural Products* 2015, 78, 500-509, điểm khác biệt giữa hai hợp chất này là sự thay thế nhóm isobutyryloxy bằng nhóm acetoxo ở vị trí C-7 ở hợp chất scutebarbatolide A.

Trong quá trình nghiên cứu tìm kiếm và phát triển thuốc chống ung thư, việc sàng lọc các hợp chất có hoạt tính tiêu diệt tế bào ung thư đóng vai trò quan trọng, góp phần định hướng cho các nghiên cứu sâu hơn để tìm ra các hợp chất có vai trò dẫn đường cho phát triển thuốc mới. Hợp chất neo-clerodane diterpenoit mới scutebarbatolide A phân lập từ *Scutellaria barbata* thể hiện hoạt tính gây độc năm dòng tế bào ung thư người, bao gồm ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư gan (HepG2), ung thư biểu mô (KB), ung thư vú (MCF7) và ung thư da (SK-Mel2). Phương pháp tách chiết hợp chất scutebarbatolide A từ loài bán chi liên *Scutellaria barbata* 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 gây độc tế bào ung thư, tạo tiền đề cho việc bào chế được phẩm góp phần phòng và điều trị ung thư từ hoạt chất phân lập được.

Sáng chế đề xuất hợp chất diterpenoit mới scutebarbatolide A phân lập từ cây bán chi liên *Scutellaria barbata*, có công thức (I):



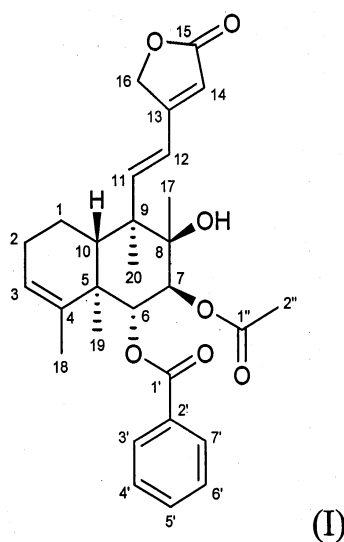
Hợp chất diterpenoit mới (scutebarbatolide A) theo sáng chế thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư tốt trên năm dòng tế bào ung thư được thử nghiệm là ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư gan (HepG2), ung thư biểu mô (KB), ung thư vú (MCF7) và ung thư da (SK-Mel2).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp chiết hợp chất scutebarbatolide A phân lập từ cây bán chi liên *Scutellaria barbata*. Phương pháp theo sáng chế đơn giản, có độ ổn định và hiệu suất cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mẫu cây bán chi liên *Scutellaria barbata* được thu hái tại Mê Linh, Hà Nội vào tháng 6 năm 2016. Tên khoa học được giám định tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu cây sau khi thu hái được phơi khô trong bóng râm, nghiền nhỏ thành bột và tiến hành chiết xuất, phân lập, và xác định cấu trúc hóa học của hợp chất theo các phương pháp mô tả dưới đây: Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715) và RP₁₈ F254s (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu. Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel 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.). Độ quay cực được đo trên máy JASCO P-2000. 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.

Sáng chế đề cập đến hợp chất diterpenoit mới (scutebarbatolide A) có công thức (I):



Hợp chất scutebarbatolide A này có danh pháp hóa học là 6 α -benzoyloxy-7 β -acetoxoy-8 β -hydroxy-3,11(*E*),13-neoclerodatrien-15,16-olide. Các thông số hoá lý của hợp chất này là như sau:

Công thức phân tử: C₂₉H₃₄O₇;

Khối lượng phân tử: M = 494;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$ -12.0 (c = 0.1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-QTOF-MS tại m/z 495.2377 [M+H]⁺ (tính toán lý thuyết cho công thức C₂₉H₃₅O₇⁺, 495.2383);

Phương pháp phân lập hợp chất scutebarbatolide A từ cây bán chi liên *Scutellaria barbata* theo sáng chế bao gồm các bước:

- (i) mẫu khô cây bán chi liên được xay nhỏ, sau đó bột tạo ra được chiết 3 lần bằng rượu metylic trong điều kiện siêu âm, mỗi lần trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng;
- (ii) kết hợp các dịch chiết trong rượu metylic thu được ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là dịch cô SB-M;
- (iii) hòa tan dịch cô SB-M với nước cất rồi chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan trong 3 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 dịch SB-W;
- (iv) dịch SB-W được tiếp tục chiết phân bố bằng diclometan trong 3 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 SB-D;
- (v) cặn SB-D được tiến hành phân tách trên cột sắc ký lỏng sử dụng chất hấp phụ là silica gel thường, Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck, với hệ dung môi rửa giải

gradient *n*-hexan/axeton từ 50:1 đến 1:1 (tỷ lệ về thể tích) thu được sáu phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là từ SB-D1 đến SB-D6;

(vi) phân đoạn SB-D5 tiếp tục được phân lập trên cột sắc ký lỏng, sử dụng chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18, cỡ hạt 12 nm S-150 μm , YMC Co., Ltd., với hệ dung môi rửa giải gradient MeOH/H₂O từ 2:1 đến 15:1 (tỷ lệ về thể tích) thu được sáu phân đoạn nhỏ, được ký hiệu lần lượt là SB-D5A đến SB-D5F;

(vii) phân đoạn SB-D5E tiếp tục được phân lập trên cột sắc ký lỏng với chất hấp phụ là silicagel pha thường, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck, sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là diclometan/etyl axetat với tỷ lệ về thể tích là 8/1 thu được bốn phân đoạn nhỏ, được ký hiệu lần lượt là SB-D5E1 đến SB-D5E6;

(viii) phân đoạn SB-D5E4 được tinh chế bằng cột sắc ký lỏng với chất hấp phụ là silica gel pha thường, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck, sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là diclometan/axeton với tỷ lệ về thể tích là 10/1 thu được hợp chất scutebarbatolide A dưới dạng chất bột màu trắng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

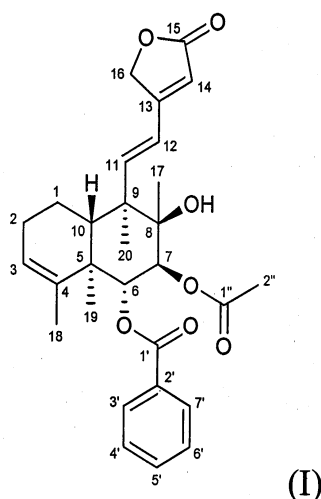
Ví dụ 1

Chiết hợp chất scutebarbatolide A từ cây bán chi liên *Scutellaria barbata*

Mẫu khô cây bán chi liên được xay nhỏ, sau đó bột tạo ra (8 kg) được chiết 3 lần bằng rượu metylic trong điều kiện siêu âm, mỗi lần trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các dịch chiết trong rượu metylic được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là dịch cô SB-M (500 g). Hòa tan dịch cô SB-M với nước cất (5 lit) rồi chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan trong 3 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 dịch SB-W. Dịch SB-W được tiếp tục chiết phân bố bằng diclometan trong 3 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 SB-D (70 g).

Cặn SB-D (70 g) được tiến hành phân tách trên cột sắc ký lỏng (Φ 15 cm, L 50 cm) sử dụng chất hấp phụ là silica gel pha thường, Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck, với hệ dung môi rửa giải gradient *n*-hexan/axeton từ 50:1 đến 1:1 (tỷ lệ về thể tích) thu được sáu phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là từ SB-D1 đến SB-D6. Phân đoạn SB-D5 được tiếp tục phân lập trên cột sắc ký lỏng (Φ 5 cm, L 80 cm), sử dụng chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18, cỡ hạt 12 nm S-150 μ m, YMC, với hệ dung môi rửa giải gradient MeOH/H₂O từ 2:1 đến 15:1 (tỷ lệ về thể tích) thu được sáu phân đoạn nhỏ, được ký hiệu lần lượt là SB-D5A đến SB-D5F. Tiến hành phân lập phân đoạn SB-D5E trên cột sắc ký lỏng (Φ 2,5 cm, L 80 cm) với chất hấp phụ là silicagel pha thường, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck, sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là diclometan/etyl axetat với tỷ lệ về thể tích là 8/1 thu được sáu phân đoạn nhỏ, được ký lần lượt hiệu là SB-D5E1 đến SB-D5E6. Phân đoạn SB-D5E4 được tinh chế bằng sắc ký cột sắc ký lỏng (Φ 1,0 cm, L 80 cm) với chất hấp phụ là silica gel pha thường, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck, sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là diclometan/axeton với tỷ lệ về thể tích là 10/1 thu được 10 mg hợp chất scutebarbatolide A dưới dạng chất bột màu trắng.

Hợp chất 6 α -benzoyloxy-7 β -acetoxy-8 β -hydroxy-3,11(*E*),13-neoclerodatrien-15,16-olide (scutebarbatolide A) thu được có công thức (I):



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

Công thức phân tử: C₂₉H₃₄O₇;

Khối lượng phân tử: $M = 494$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} -12.0$ ($c = 0.1$, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-QTOF-MS tại m/z 495.2377 $[M+H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{29}H_{35}O_7^+$, 495.2383);

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

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

C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC
1	19,3	1,33 m; 1,63 m	
2	26,2	2,06 br s	
3	123,0	5,22 br s	
4	141,1	-	
5	43,4	-	
6	75,5	5,69 d (10,0)	4, 5, 7, 19, 1'
7	75,6	5,46 d (10,0)	6, 1''
8	76,9	-	
9	48,2	-	
10	42,8	2,32 dd (1,5, 13,0)	1, 5, 19, 20
11	146,9	6,37 d (17,0)	10, 20
12	121,8	6,42 d (17,0)	11, 13, 14
13	162,1	-	
14	115,0	5,93 s	12, 13, 15
15	174,0	-	
16	70,7	5,01 d (3,0)	12, 14, 15
17	22,5	1,00 s	7, 8, 9
18	20,1	1,58 s	3, 4, 5
19	17,4	1,40 s	4, 5, 6, 10
20	15,4	1,22 s	8, 9, 10, 11
1'	166,0	-	
2'	130,2	-	
3', 7'	129,6	8,01 d (8,0)	
4', 6'	128,6	7,45 t (8,0)	
5'	133,3	7,58 t (8,0)	
1''	170,1	-	
2''	20,5	1,81 s	1''

^a đo trong $CDCl_3$, ^b 125MHz, ^c 500MHz

Ví dụ 2

Thử nghiệm tác dụng gây độc tế bào ung thư của hợp chất scutebarbatolide A

Hợp chất scutebarbatolide A theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính gây độc tế bào bằng phương pháp SRB (Monks A. et al. *Journal of the National Cancer Institute*, 1991, 83(11), 757-766.) như sau:

Các dòng tế bào ung thư được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường nuôi cấy DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) với thành phần kèm theo gồm 2mM L-glutamin, 1,5 g/L natri bicacbonat, 4,5 g/L glucoza, 10 mM HEPES và 1,0mM natri pyruvat, ngoài ra bổ sung huyết thanh bê tươi 10% (FBS - Fetal Bovine Serum, GIBCO). Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂.

Hợp chất scutebarbatolide A được pha ở nồng độ gốc là 4 mg/ml trong dimethylsulfosit (DMSO) 10%. Sau đó được pha loãng để có nồng độ cuối cùng trong giếng thử là 20 µg/ml trong các phép thử sàng lọc. Ở các phép thử xác định nồng độ ức chế 50% sự phát triển tế bào ung thư (IC₅₀), các chất được tiếp tục pha loãng để tạo loạt nồng độ 200 µg/ml; 40 µg/ml; 8 µg/ml và 1,6 µg/ml bằng DMSO 10%. Các tế bào ung thư được nuôi trong phiên vi lượng 96 giếng, được thử chất, nhuộm bằng SRB (sulforhodamine B) và đo hàm lượng protein tổng số ở bước sóng 515 nm bằng máy đọc vi phiên (Microplate Reader, BioRad). Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{[\text{OD}_{(\text{chất thử})} - \text{OD}_{(\text{ngày 0})}] \times 100}{\text{OD}_{(\text{đối chứng âm})} - \text{OD}_{(\text{ngày 0})}}$$

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \% \text{ sống sót}$$

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác của thí nghiệm và của dữ liệu. DMSO 10% là dung môi pha chất được sử dụng như đối chứng âm. Ellipticine (Sigma) được sử dụng làm đối chứng dương và được thử nghiệm ở các nồng độ 10,0, 2,0, 0,4 và

0,08 $\mu\text{g/ml}$. Sau quá trình xử lý số liệu bằng phần mềm TableCurve 2Dv4, các giá trị IC_{50} đã được tính toán và cho thấy độ tin cậy cao (sai số $p < 0,01$). Kết quả được nêu trong Bảng 2.

Bảng 2: Kết quả hoạt tính gây độc tế bào *in vitro*

Hợp chất	Giá trị IC_{50} (μM)				
	LNCaP	HepG2	KB	MCF-7	SK-Mel2
Scutebarbatolide A	34,56 $\pm$ 3,26	33,87 $\pm$ 1,07	39,12 $\pm$ 3,57	45,58 $\pm$ 3,11	30,79 $\pm$ 2,20
Ellipticine ^a	2,20 $\pm$ 0,20	1,59 $\pm$ 0,08	1,79 $\pm$ 0,08	1,38 $\pm$ 0,16	1,34 $\pm$ 0,12

^aChất đối chứng dương

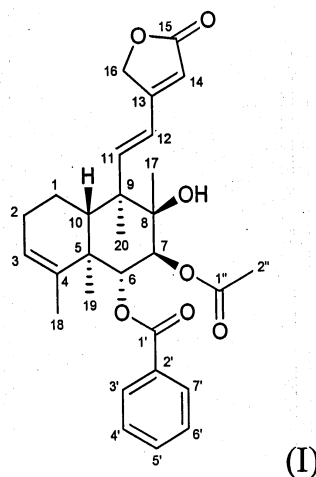
Như vậy, hợp chất scutebarbatolide A thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở tất cả năm dòng tế bào ung thư thử nghiệm.

Lợi ích có thể đạt được

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất diterpenoit mới scutebarbatolide A từ cây bán chi liên thu hái ở Mê Linh, Hà Nội vào tháng 6 năm 2016. Hợp chất này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư trên năm dòng tế bào ung thư thử nghiệm là ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư gan (HepG2), ung thư biểu mô (KB), ung thư vú (MCF7), và ung thư da (SK-Mel2). 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 tiêu diệt các tế bào ung thư từ cây thuốc bán chi liên nói riêng và từ nguồn dược liệu Việt Nam nói chung.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất steroid mới scutebarbatolide A có công thức (I) phân lập được từ cây bán chi liên *Scutellaria barbata*:



2. Phương pháp chiết hợp chất scutebarbatolide A có công thức (I) như nêu trong điểm 1 từ cây bán chi liên *Scutellaria barbata*, phương pháp này bao gồm các bước:

- (i) mẫu khô cây bán chi liên được xay nhỏ, sau đó bột tạo ra được chiết 3 lần bằng rượu metylic trong điều kiện siêu âm, mỗi lần trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng;
- (ii) kết hợp các dịch chiết trong rượu metylic thu được ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là dịch cô SB-M;
- (iii) hòa tan dịch cô SB-M với nước cất rồi chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan trong 3 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 dịch SB-W;
- (iv) dịch SB-W được tiếp tục chiết phân bố bằng diclometan trong 3 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 SB-D;

(v) cặn SB-D được tiến hành phân tách trên cột sắc ký lỏng sử dụng chất hấp phụ là silica gel thường, Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, với hệ dung môi rửa giải gradient *n*-hexan/axeton từ 50:1 đến 1:1 (tỷ lệ về thể tích) thu được sáu phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là từ SB-D1 đến SB-D6;

(vi) phân đoạn SB-D5 tiếp tục được phân lập trên cột sắc ký lỏng, sử dụng chất hấp phụ là silica gel pha đảo RP-18, cỡ hạt 12 nm S-150 μ m, với hệ dung môi rửa giải gradient MeOH/H₂O từ 2:1 đến 15:1 (tỷ lệ về thể tích) thu được sáu phân đoạn nhỏ, được ký hiệu lần lượt là SB-D5A đến SB-D5F;

(vii) phân đoạn SB-D5E tiếp tục được phân lập trên cột sắc ký lỏng với chất hấp phụ là silicagel pha thường, cỡ hạt 230-400 mesh, sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là diclometan/etyl axetat với tỷ lệ về thể tích là 8/1 thu được bốn phân đoạn nhỏ, được ký lần lượt hiệu là SB-D5E1 đến SB-D5E6;

(viii) phân đoạn SB-D5E4 được tinh chế bằng cột sắc ký lỏng với chất hấp phụ là silica gel pha thường, cỡ hạt 230-400 mesh, sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là diclometan/axeton với tỷ lệ về thể tích là 10/1 thu được hợp chất scutebarbatolide A dưới dạng chất bột màu trắng.