



(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)



1-0034905

(51)^{2020.01} C07D 311/00; C07C 7/00

(13) B

(21) 1-2020-02852

(22) 21/05/2020

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/08/2020 389ASC

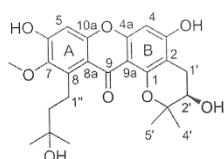
(73) Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội (VN)

Số 1, Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

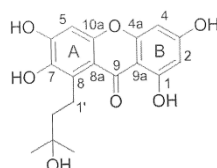
(72) Trần Thu Hương (VN); Lê Huyền Trâm (VN); Trần Thị Minh (VN); Nguyễn Văn Thông (VN); Nguyễn Tuấn Anh (VN); Nguyễn Hoàng Minh (VN); Trần Thượng Quảng (VN); Nguyễn Thị Minh Thu (VN); Đinh Thị Thu Hiền (VN); Trần Thu Hà (VN); Hà Mạnh Tuấn (VN); Nguyễn Thị Hồng Phượng (VN); Đỗ Thị Thảo (VN); Phạm Thị Hồng Phượng (VN); Giang Thị Phương Ly (VN); Nguyễn Thị Việt Thanh (VN); Ninh Thị Phương (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÁP LẬP HỢP CHẤT XANTHON TỪ VỎ QUẢ MĂNG CỤT
(GARCINIA MANGOSTANA L., CLUSIACEAE)

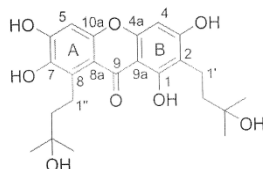
(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất xanthon từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) có hoạt tính sinh học hữu dụng bao gồm hoạt tính hạ đường huyết, chống oxy hóa và gây độc tế bào, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào ung thư phổi ở người SK-LU-1, ung thư vú ở người MCF7 và ung thư ruột kết ở người HT-29, đặc trưng ở chỗ, hợp chất xanthon này được chọn trong nhóm bao gồm các hợp chất có công thức (I)-(IV) sau đây:



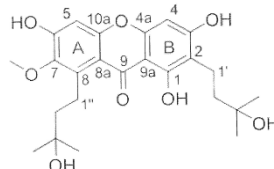
(I)



(II)



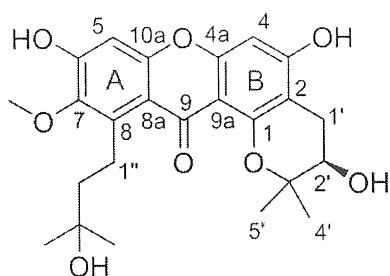
(III)



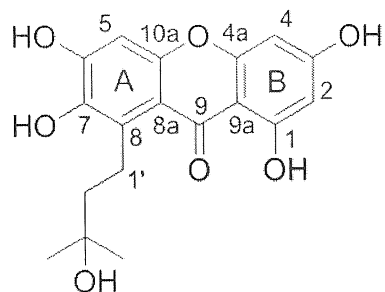
(IV).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

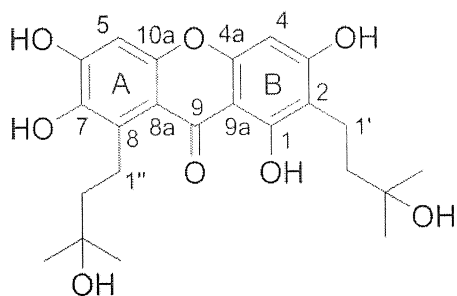
Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hoạt chất thiên nhiên có nguồn gốc từ thực vật có hoạt tính sinh học nhằm sử dụng trong việc hỗ trợ điều trị bệnh. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất xanthon có hoạt tính sinh học hữu dụng bao gồm hoạt tính chống oxy hóa, hạ đường huyết và gây độc tế bào, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào ung thư phổi ở người SK-LU-1, ung thư vú ở người MCF7 và ung thư ruột kết ở người HT-29, đặc trưng ở chỗ, hợp chất xanthon này được chọn trong nhóm bao gồm các hợp chất có công thức (I)-(IV) sau đây:



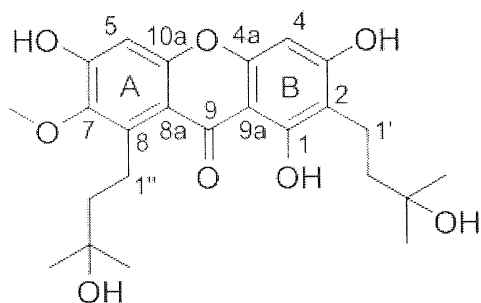
(I)



(II)



(III)



(IV).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp lập các hợp chất xanthon này từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Măng cụt có tên khoa học là *Garcinia mangostana* L., là một loài thực vật thuộc họ Bứa (Clusiaceae). Măng cụt có nguồn gốc ở các nước Philipin, Malaysia, Indonesia, sau này được di thực vào miền Nam của Việt Nam và trồng rộng rãi ở các tỉnh Nam Bộ. Các bộ phận khác nhau của cây Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) như vỏ quả, vỏ cây và rễ đã được sử dụng hàng trăm năm trong y học cổ truyền của các nước Đông Nam Á như Indonesia, Malaysia, Philippin và Thái Lan. Do

có tác dụng chống viêm tốt nên người dân các nước này dùng vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) để điều trị các vết thương bị nhiễm trùng, mưng mủ, chữa bệnh vàng da, dùng lá cây chữa bệnh eczema và một số bệnh ngoài da khác [Pedraza Chaverri J. *et al.*, *Food and Chem. Toxicol.*, 46, 3227-3239, 2008]. Tại Mỹ, Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) là loại trái cây phổ biến và rất được ưa chuộng. Nước ép từ áo hạt Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) trở thành một trong 3 mặt hàng bán chạy nhất trên thị trường Mỹ năm 2007 và trở thành loại đồ uống bổ sung dinh dưỡng từ thực vật thường xuyên trong chế độ ăn của người dân nơi đây bởi vì họ nhận thức được tác dụng của loại trái cây này trong việc cải thiện và nâng cao sức khỏe của họ [Young Won Chin *et al.*, *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 5, 355-364, 2008]. Garrity A. và cộng sự đã được cấp bằng sáng chế tại Mỹ và được lưu hành rộng rãi trên toàn thế giới cho các sản phẩm thực phẩm chức năng từ vỏ quả Măng cụt [Garrity A. *et al*, *Nutraceutical mangosteen composition*, U.S. Patent 6, 730.333, 2004].

Ở Việt Nam, nước sắc của vỏ quả Măng cụt đã được sử dụng từ lâu trong y học cổ truyền nước ta để chữa bệnh kiết lỵ rất hiệu quả [Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, 428-429, 2006]. Tác dụng kháng khuẩn của vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) cũng tương đối phù hợp với các nghiên cứu của Trương Văn Châu và cộng sự. Nhóm nghiên cứu phát hiện các hợp chất phenolic trong dịch chiết etanol và metanol của vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) có tác dụng ức chế mạnh sự phát triển của trực khuẩn mủ xanh *Staphylococcus aureus* và tụ cầu vàng *Pseudomonas aeruginosa* [Trương Văn Châu và cộng sự, *Tạp chí Sinh học*, 26(4), 59-62, 2004]. Sakagami và cộng sự cũng đã khẳng định hợp chất mangostin được phân lập từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) có khả năng kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* [Sakagami Y. *et al*, *Phytomedicine*, 12, 203-208, 2005]. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Mai Phương và cộng sự cũng cho thấy dịch chiết etanol từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) có tác dụng làm ức chế sự hình thành biofilm và sinh axit gây sâu răng ở người của vi khuẩn *Streptococcus mutans* [Nguyễn Thị Mai Phương và cộng sự, *Tạp chí Dược học*, 44, 18-21, 2004]. Tác dụng kháng khuẩn này được xác định là do thành phần xanthon và polyphenol có trong vỏ quả [11,12]. Các hợp chất xanthon này còn thể hiện nhiều hoạt tính sinh học đáng chú ý khác như chống oxy hoá (*antioxidant*), diệt tế bào ung thư (*cytotoxic*), kháng viêm (*antiinflammatory*). Một nghiên cứu khác của trường Đại học Quốc gia Singapore năm 1997 đã chứng minh cao chiết của vỏ Măng cụt có tác dụng ức chế enzyme *alpha*-amylaza, một enzym liên quan đến sự chuyển hoá gluco gây bệnh tiểu đường.

Thành phần hóa học của vỏ quả măng cụt đã được các nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam nghiên cứu. Các thành phần có hoạt tính chủ yếu là các dẫn xuất của xanthon. Xanthon là một lớp chất thuộc nhóm polyphenol có khung xanthen-9-on, là hệ thống gồm 3 vòng thơm. Ngoài ra, trong măng cụt còn có thành phần proanthocyanidin và anthocyanin, một lớp chất thuộc nhóm flavonoid thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tốt.

Tài liệu “Chemical constituents of *Garcinia Mangostana*”, *Journal of Natural Products*, vol.50, no.3, p.474-478, công bố tháng 6 năm 1987, bộc lộ các hợp chất xanthon được phân lập từ vỏ quả măng cụt, trong đó có hợp chất 1-isomangostin hydrat.

Tài liệu “Cytotoxic and NF- κ B Inhibitory Constituents of the Stems of *Cratoxylum cochinchinense* and Their semisynthetic Analogues”, *Journal of Natural Products*, 2011, 74, p.1117-1125, công bố ngày 23/03/2011, bộc lộ các hợp chất xanthon được phân lập từ thân cây thành ngành nam *Cratoxylum cochinchinense*, họ *Clusiaceae*, trong đó bao gồm hợp chất 1-isomangostin hydrat và cũng mô tả phương pháp phân lập và chiết các hợp chất xanthon này từ thân cây thành ngành nam.

Tài liệu “UPLC-PDA-QTOFMS-guided isolation of prenylated xanthonones and benzoylphloroglucinols from the leaves of *Garcinia oblongifolia* and their migration-inhibitory activity”, *Scientific reports*, công bố ngày 21/10/2016, bộc lộ các hợp chất xanthon được phân lập từ lá cây bứa *Garcinia oblongifolia*, họ *Clusiaceae*, (quả bứa còn gọi là quả măng cụt rừng), trong đó bao gồm hợp chất $C_{24}H_{30}O_8$ và cũng mô tả phương pháp phân lập và chiết các hợp chất xanthon từ lá cây bứa này.

Công bố đơn quốc tế số WO2009/093255 A2, công bố ngày 30/07/2009 bộc lộ được phẩm/mỹ phẩm/thực phẩm chức năng chứa chiết phẩm từ vỏ quả măng cụt *Garcinia mangostana*, trong đó chiết phẩm này chứa các hợp chất xanthon như Garcinone D (7), γ -Mangostin (2), v.v.. và cũng mô tả phương pháp phân lập các hợp chất xanthon.

Bằng độc quyền sáng chế Trung Quốc số CN102796113 B, công bố ngày 19/02/2014, bộc lộ hợp chất xanthon được phân lập từ vỏ, lá cành của bứa ít hoa *Garcinia oligantha*, họ *Clusiaceae* và cũng mô tả phương pháp phân lập các hợp chất này.

Bằng độc quyền sáng chế Trung Quốc số CN101904880 B, công bố ngày 13/03/2013, bộc lộ hợp chất xanthon được phân lập từ vỏ quả măng cụt *Garcinia mangostana* như mangostin, 3-isomangostin, v.v.. và cũng mô tả phương pháp phân lập các hợp chất này.

Tài liệu “New xanthone and cytotoxic constituents from *Garcinia mangostana* fruit hulls against human hepatocellular, breast, and colorectal cancer cell lines”, *Journal of Ethnopharmacology*, công bố ngày 18/01/2017, bộc lộ các hợp chất xanthon được phân lập từ vỏ quả măng cụt *Garcinia mangostana* và phương pháp phân lập các hợp chất này.

Tài liệu “Potential Anticancer Agents Characterized from Selected Tropical Plants”, *J Nat Prod*, công bố ngày 22/03/2019, bộc lộ các hợp chất xanthon được phân lập từ vỏ cây măng cụt *Garcinia mangostana*, trong đó bao gồm hợp chất 1-isomangostin hydrat.

Tài liệu “Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*)”, *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008), p. 3227-3239, công bố tháng 9 năm 2008, đề cập đến các hợp chất xanthon được phân lập từ vỏ quả măng cụt *Garcinia mangostana* (GML), trong đó các hợp chất này được chiết bằng metanol, trong đó các hợp chất này có tác dụng chống oxy hóa, chống khối u, chống viêm, chống dị ứng, chống vi khuẩn, nấm và virus, chống sốt rét.

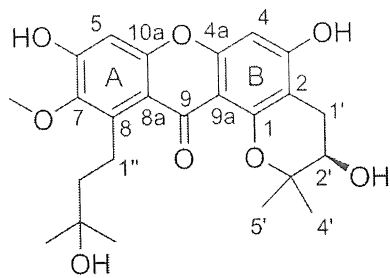
Tài liệu “ α -Amylase inhibition of xanthones from *Garcinia mangostana* pericarps and their possible use for the treatment of diabetes with molecular docking studies”, *Journal of Food Biochemistry*.2019; e12844, công bố ngày 21/03/2019, đề cập đến các hợp chất xanthon được phân lập từ vỏ quả măng cụt *Garcinia mangostana* (GML), trong đó các hợp chất này được chiết bằng metanol, tinh chế và phân lập bằng phương pháp sắc ký bao gồm sắc ký cột silicagel, RP-18, và Sephadex LH-20 CC, các hợp chất này có tác dụng ức chế α -amylaza, enzyme liên quan đến sự chuyển hóa gluco gây bệnh tiểu đường.

Các tác giả sáng chế đã tập trung nghiên cứu nhằm làm sáng tỏ hơn nữa thành phần và tác dụng chữa bệnh của quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae), cụ thể là từ vỏ quả Măng cụt. Kết quả là, các tác giả đã chiết tách, phân lập được các hợp chất xanthon có hoạt tính sinh học tốt, thích hợp để làm chế phẩm thuốc tiềm năng, các sản phẩm thực phẩm chức năng hữu dụng, và phương pháp phân lập các hợp chất này từ quả Măng cụt.

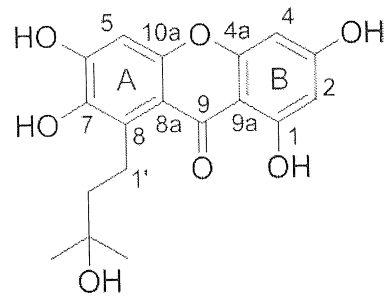
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất xanthon có hoạt tính sinh học tốt, tiềm năng và hữu dụng bao gồm hoạt tính hạ đường huyết, hoạt tính chống oxy hóa, hạ đường huyết và gây độc tế bào, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào ung thư phổi ở người SK-LU-1, ung thư vú ở người MCF7 và ung thư ruột kết ở người HT-29, thích hợp để làm chế phẩm thuốc tiềm năng, các sản phẩm thực phẩm chức năng hữu dụng, và phương pháp phân lập các hợp chất này từ quả Măng cụt.

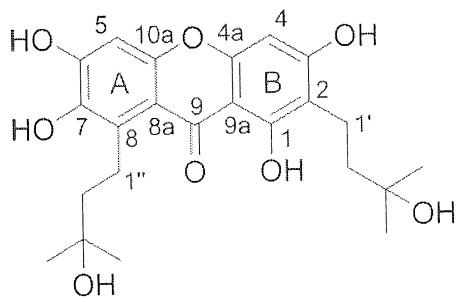
Để đạt được mục đích nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất xanthon, đặc trưng ở chỗ, hợp chất này được chọn trong nhóm bao gồm các hợp chất xanthon có công thức (I)-(IV) sau đây:



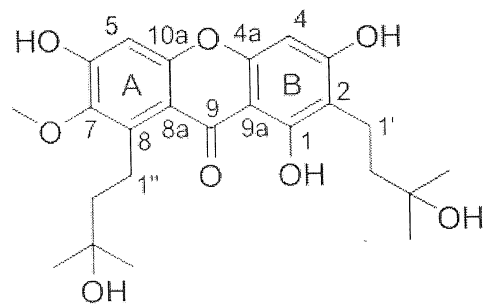
(I)



(II)

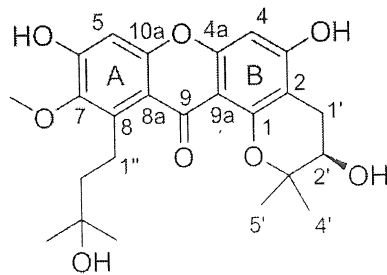


(III)



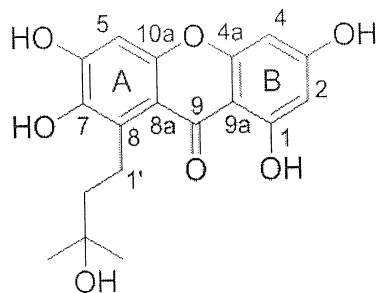
(IV)

Theo một phương án, hợp chất nêu trên là hợp chất có công thức (I):



(I).

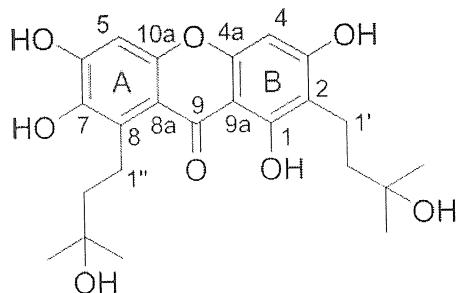
Theo một phương án khác, hợp chất nêu trên là hợp chất này có công thức (II):



(II).

Theo một phương án khác nữa, hợp chất nêu trên là hợp chất này có công thức

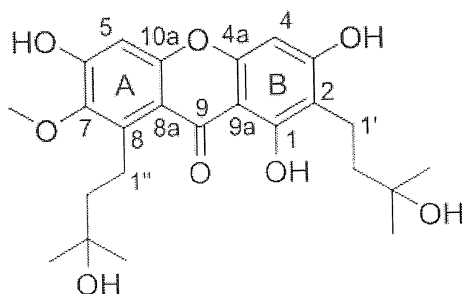
(III):



(III).

Theo một phương án khác nữa, hợp chất nêu trên là hợp chất này có công thức

(IV):



(IV).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp pháp lập hợp chất trên đây từ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae), đặc trưng ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước:

- i) phơi khô, xay nhỏ vỏ quả măng cụt, ngâm chiết bột thu được với metanol 3 lần (3x) ở nhiệt độ trong khoảng 40 đến 50°C;
- ii) cất loại dung môi dịch chiết thu được ở 50°C và áp suất giảm để thu được cặn chiết metanol, sau đó hòa với nước và chiết với diclometan;
- iii) tiến hành sắc ký trên cột silicagel pha thường đối với cặn chiết diclometan, rửa giải bằng hệ dung môi gradient diclometan : axeton (100:1 – 0:100, v/v) thu được 15 phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là F1 đến F15;
- iv) tiến hành phân lập các hợp chất có công thức (I) đến (IV) trên đây, trong đó:
 - iv.1) tiến hành sắc ký phân đoạn F3 trên cột silicagel và rửa giải bằng hệ dung môi diclometan : metanol (50:1 – 0:100, v/v) thu được 12 phân đoạn nhỏ, được ký hiệu lần lượt là F3.1 đến F3.12, và
 - tiến hành sắc ký phân đoạn F3.6 qua cột pha đảo YMC-RP-18 với hệ dung môi metanol : nước (3:1, v/v) thu được ba hợp chất có công thức (I), (III), và (IV);

iv.2) tiến hành sắc ký phân đoạn F5 trên cột silicagel và rửa giải bằng hệ dung môi diclometan : axeton (15:1, v/v) thu được 10 phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là F5.1 đến F5.10, và

- sắc ký phân đoạn F5.4 (5,5 mg) qua cột silicagel với hệ dung môi diclometan : metanol (10:1, v/v) thu được 5 phân đoạn nhỏ, được ký hiệu lần lượt là F5.4.1 đến F5.4.5, và

- tiến hành sắc ký phân đoạn F5.4.4 trên cột silicagel và rửa giải bằng hệ dung môi metanol : nước (3:1, v/v) để thu được hợp chất có công thức (II).

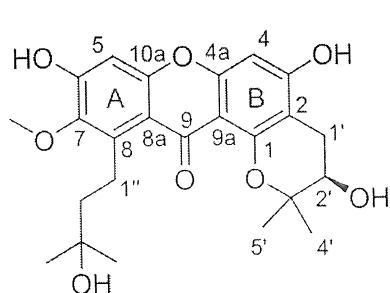
Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế còn được mô tả thông qua các phương án cụ thể minh họa và mô tả chi tiết hơn nữa cho sáng chế. Ngoài ra, cần phải hiểu rằng, các phương án cụ thể sau đây được mô tả chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế và sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể này. Rõ ràng là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trên cơ sở các nội dung mô tả trong bản mô tả này, có thể thực hiện các phương án tương đương mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế như được mô tả trong yêu cầu bảo hộ kèm theo sau đây.

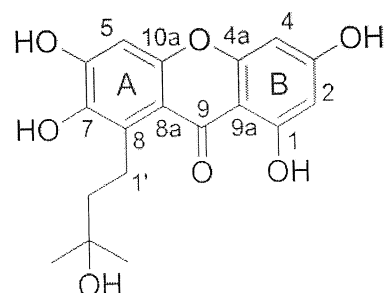
Trong bản mô tả này, các giá trị số nên được hiểu là bao gồm cả nghĩa “khoảng”, cụ thể là chỉ chính giá trị số đó cũng như các giá trị số nằm trong khoảng $\pm 10\%$, tốt hơn là $\pm 5\%$, và tốt nhất là 0% của giá trị số đó. Do đó, ví dụ, nếu nhiệt độ được sử dụng theo sáng chế là 50°C , thì cần phải hiểu rằng, các nhiệt độ 55°C , $52,5^{\circ}\text{C}$, $47,5^{\circ}\text{C}$ và 45°C hoặc các giá trị khác nằm trong khoảng các giá trị này đều có thể được sử dụng theo sáng chế.

Hợp chất theo sáng chế

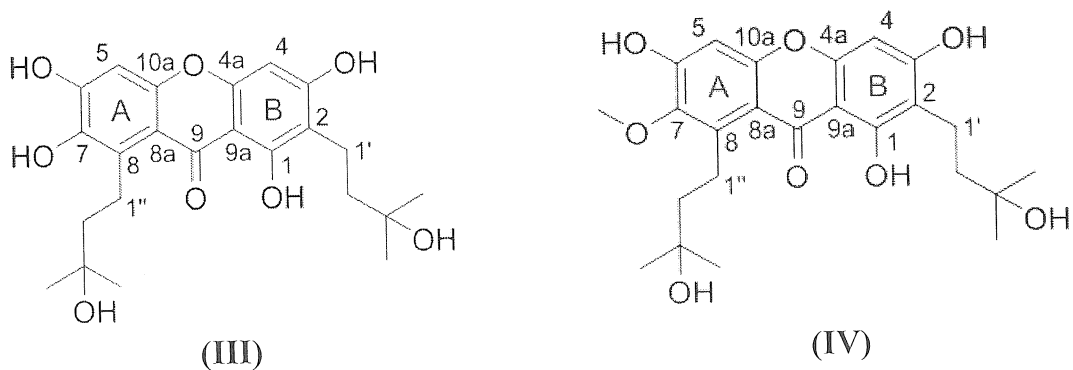
Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất, đặc trưng ở chỗ, hợp chất xanthon này được chọn trong nhóm bao gồm các hợp chất có công thức (I)-(IV) sau đây:



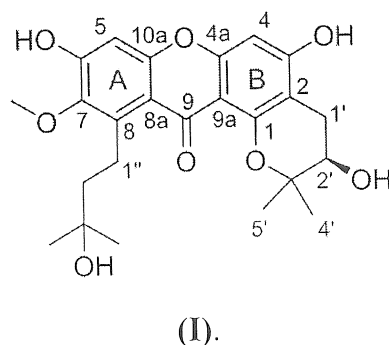
(I)



(II)



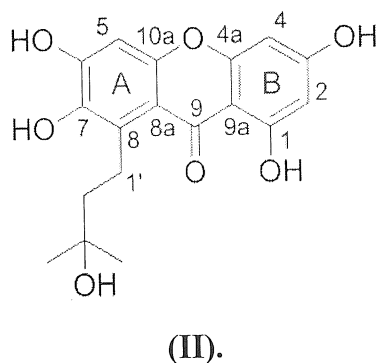
Theo một phương án, hợp chất nêu trên là hợp chất có công thức (I):



Hợp chất có công thức (I), được phân lập ở dạng chất rắn vô định hình, màu vàng. Trên phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử (HR-ESI-MS) xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 443,1730 $[M-H]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{24}H_{27}O_8$ m/z : 444,1784); kết hợp với các dữ liệu phổ NMR cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất này là $C_{24}H_{28}O_8$.

Dựa vào các phân tích trên đây, cấu trúc của hợp chất này được xác định là 11R-hydroxy-1-isomangostin hydrat, một hợp chất xanthon mới lần đầu được phân lập và được đặt tên riêng là **garcinoxanthon S**.

Theo một phương án khác, hợp chất nêu trên là hợp chất này có công thức (II):



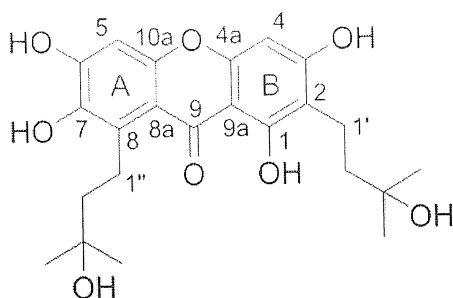
Hợp chất có công thức (II), được phân lập ở dạng chất rắn vô định hình, màu vàng.

Trên phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử (HR-ESI-MS) xuất hiện pic

ion giả phân tử tại m/z 345,0969 $[M-H]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{18}H_{17}O_7$; m/z : 346,1053); kết hợp với các dữ liệu phổ NMR cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất (II) là $C_{18}H_{18}O_7$

Dựa vào các phân tích trên đây, cấu trúc của hợp chất này được xác định là 1,3,6,7-tetrahydroxy-8-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthon, một hợp chất xanthon mới lần đầu được phân lập và được đặt tên riêng là **garcinoxanthon T**.

Theo một phương án khác nữa, hợp chất nêu trên là hợp chất này có công thức (III):



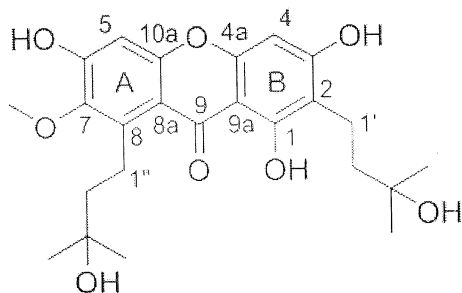
(III).

Hợp chất có công thức (III) được phân lập ở dạng chất rắn vô định hình, màu vàng.

Trên phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử (HR-ESI-MS) xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 431,1688 $[M-H]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{23}H_{27}O_8$; m/z : 432,1784); kết hợp với các dữ liệu phổ NMR cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất này là $C_{23}H_{28}O_8$.

Dựa vào các phân tích trên đây, cấu trúc của hợp chất (III) được xác định là 1,3,6,7-tetrahydroxy-1,8-di(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthon, một hợp chất xanthon mới lần đầu được phân lập và được đặt tên riêng là **garcinoxanthon U**.

Theo một phương án khác nữa, hợp chất nêu trên là hợp chất này có công thức (IV):



(IV).

Hợp chất có công thức (IV) được phân lập ở dạng chất rắn vô định hình, màu vàng.

Trên phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử (HR-ESI-MS) xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 445,1847 $[M-H]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{24}H_{29}O_8$ m/z : 432,1784); kết hợp với các dữ liệu phổ NMR cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất này là $C_{24}H_{30}O_8$, nhiều hơn khối lượng phân tử của hợp chất (III) là 14 đơn vị C.

Dựa vào các phân tích trên đây, cấu trúc của hợp chất này được xác định là 1,3,6,-trihydroxy-7-methoxy-1,8-di(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthon), một hợp chất xanthon mới lần đầu được phân lập và được đặt tên riêng là **garcinoxanthon V**.

Phương pháp phân lập theo sáng chế

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp phân lập hợp chất xanthon trên đây từ quả Mãng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae), đặc trưng ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước:

- i) phơi khô, xay nhỏ vỏ quả Mãng cụt, ngâm chiết bột thu được với metanol 3 lần (3x) ở nhiệt độ trong khoảng 40 đến 50°C;
- ii) cất loại dung môi chiết thu được ở 50°C và áp suất giảm để thu được cặn chiết metanol, sau đó hòa với nước và chiết với diclometan;
- iii) tiến hành sắc ký trên cột silicagel pha thường đối với cặn chiết diclometan, rửa giải bằng hệ dung môi gradient diclometan : axeton (100:1 – 0:100, v/v) thu được 15 phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là F1 đến F15;
- iv) tiến hành phân lập các hợp chất có công thức (I) đến (IV) trên đây, trong đó:
 - iv.1) tiến hành sắc ký phân đoạn F3 trên cột silicagel và rửa giải bằng hệ dung môi diclometan : metanol (50:1 – 0:100, v/v) thu được 12 phân đoạn nhỏ, được ký hiệu lần lượt là F3.1 đến F3.12, và
 - tiến hành sắc ký phân đoạn F3.6 qua cột pha đảo YMC-RP-18 với hệ dung môi metanol : nước (3:1, v/v) thu được ba hợp chất có công thức (I), (III), và (IV);
 - iv.2) tiến hành sắc ký phân đoạn F5 trên cột silicagel và rửa giải bằng hệ dung môi diclometan : axeton (15:1, v/v) thu được 10 phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là F5.1 đến F5.10, và
 - sắc ký phân đoạn F5.4 (5,5 mg) qua cột silicagel với hệ dung môi diclometan : metanol (10:1, v/v) thu được 5 phân đoạn nhỏ, được ký hiệu lần lượt là F5.4.1 đến F5.4.5, và

- tiến hành sắc ký phân đoạn F5.4.4 trên cột silicagel và rửa giải bằng hệ dung môi metanol : nước (3:1, v/v) để thu được hợp chất có công thức (II).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế còn được mô tả chi tiết hơn nữa thông qua các ví dụ. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng, các ví dụ này không làm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ 1: Phân lập các hợp chất theo sáng chế

Quả Mãng cụt đã được thu mua vào tháng 6/2018 tại thành phố Hồ Chí Minh, sau đó tách lấy vỏ quả, đem phơi khô.

Vỏ quả măng cụt sau khi phơi khô, xay nhỏ (4,4 kg bột khô) và ngâm chiết với metanol (10 lít x 3 lần) ở nhiệt độ 40-50°C. Dịch chiết được cất loại dung môi ở 50°C và áp suất giảm thu được cặn chiết metanol (1,1 kg). Cặn chiết được hòa với 2 lít nước và chiết với diclometan thì thu được cặn cloroform (450 g). Tiến hành sắc ký trên cột silicagel pha thường đối với cặn chiết diclometan, rửa giả bằng hệ dung môi gradient diclometan : axeton (100:1 – 0:100, v/v) thu được 15 phân đoạn F1- F15.

Tiến hành sắc ký phân đoạn F3 (7,1 g) trên cột silicagel và rửa giải bằng hệ dung môi diclometan : metanol (50:1 – 0:100, v/v) thu được 12 phân đoạn nhỏ (F3.1– F3.12). Phân đoạn F3.6 (640 mg) được sắc ký qua cột pha đảo YMC-RP-18 với hệ dung môi metanol : nước (3:1, v/v) thu được ba hợp chất có công thức (I) (10 mg), hợp chất (III) (12 mg), và hợp chất (IV) (10 mg).

Tiến hành sắc ký phân đoạn F5 (12,2 g) trên cột silicagel và rửa giải bằng hệ dung môi diclometan : axeton (15:1, v/v) thu được 10 phân đoạn F5.1- F5.10. Phân đoạn F5.4 (5,5 mg) được sắc ký qua cột silicagel với hệ dung môi diclometan : metanol (10:1, v/v) thu được 5 phân đoạn nhỏ (F5.4.1– F5.4.5). Tiến hành sắc ký phân đoạn F5.4.4 (128 mg) trên cột silicagel và rửa giải bằng hệ dung môi metanol : nước (3:1, v/v) thu được hợp chất (II) (4 mg).

Hợp chất có công thức (I)

- Chất rắn vô định hình, màu vàng. Độ quay cực: $[\alpha]_D^{20}$ -20,4 (*c* 0.05, MeOH).
- UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 368 (3,35), 320 (3,75), 260 (3,85), 243 (3,90) nm; IR $\nu_{\max}$ (KBr): 3420, 2924, 1647, 1445, 1254, 1133, 1083 cm^{-1} ; ECD (MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$): 218 (+0,95) nm.

- Phổ ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): (Bảng 1)
- Phổ ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm): (Bảng 1)
- Phổ khối phân giải cao: (HR-ESI-MS) (negative) m/z : 443,1730 $[\text{M-H}]^-$.

Hợp chất có công thức (II)

- Chất rắn vô định hình, màu vàng.
- UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 358 (3,01), 320 (3,78), 258 (4,05), 244 (4,15) nm; IR ν_{max} (KBr): 3420, 2923, 1646, 1460, 1254, 1131, 1083 cm^{-1} ;
- Phổ ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): (Bảng 1)
- Phổ ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm): (Bảng 1)
- Phổ khối phân giải cao: (HR-ESI-MS) (negative) m/z : 345,0969 $[\text{M-H}]^-$.

Hợp chất có công thức (III)

- Chất rắn vô định hình, màu vàng.
- UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 360 (3,27), 316 (3,98), 258 (4,14), 244 (4,12) nm; IR ν_{max} (KBr): 3420, 2922, 1648, 1446, 1250, 1128, 1064 cm^{-1} .
- Phổ ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): (Bảng 2)
- Phổ ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm): (Bảng 2)
- Phổ khối phân giải cao: (HR-ESI-MS) (negative) m/z : 431,1688 $[\text{M-H}]^-$.

Hợp chất có công thức (IV)

- Chất rắn vô định hình, màu vàng. Độ quay cực: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -20,4 (c 0.05, MeOH).
- UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 360 (3,32), 316 (4,01), 258 (4,26), 244 (4,14) nm; IR ν_{max} (KBr): 3420, 2924, 1648, 1446, 1250, 1128, 1064 cm^{-1} .
- Phổ ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): (Bảng 2)
- Phổ ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm): (Bảng 2)
- Phổ khối phân giải cao: (HR-ESI-MS) (negative) m/z : 445,1847 $[\text{M-H}]^-$.

Xác định cấu trúc của hợp chất (I)

Các hợp chất xanthon này được đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều, 2 chiều, phổ khối phân giải cao, cho kết quả như sau:

Hợp chất (I) thu được dưới dạng chất rắn vô định hình, màu vàng. Trên phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử (HR-ESI-MS) xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 443,1730 $[\text{M-H}]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_8$ m/z : 444,1784); kết hợp với các dữ liệu phổ NMR cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất

(I) là $C_{24}H_{28}O_8$.

Phổ hồng ngoại của (I) thể hiện các tín hiệu đặc trưng cho nhóm hydroxyl (3420 cm^{-1}), vòng thơm (1445 cm^{-1}), và nhóm cacbonyl (1647 cm^{-1}).

Trên phổ ^1H NMR của (I) xuất hiện các tín hiệu proton tương tự như của α -mangostin bao gồm: hai proton singlet của các olefin vòng thơm tại độ dịch chuyển δ_{H} 6,63 (1H, s, H-5), 6,29 (1H, s, H-4) và một nhóm methoxyl tại δ_{H} 3,79 (3H, s, OCH_3 -7) [1]. Bên cạnh đó, tại vùng trường cao, sự xuất hiện hai nhóm metylen tại δ_{H} 3,34 (2H, m, H-1'') và δ_{H} 1,74 (2H, t, $J=7,2\text{ Hz}$, H-2'') và hai nhóm methyl ở dạng singlet tại δ_{H} 1,32 (6H, s, CH_3 -4'', 5''); kết hợp với các tín hiệu cacbon trên phổ ^{13}C NMR của (I) tại δ_{C} 23,3 (C-1''), 45,6 (C-2''), 72,0 (C-3''), và 29,3 (C-4'', C-5'') là đặc trưng cho sự có mặt của nhóm 3-hydroxyl-3-methylbutyl [2]. Ngoài ra, các phổ ^1H và ^{13}C NMR của (I) cũng chỉ ra sự xuất hiện của nhóm 3-hydroxyl-2,2-dimethylchroman bởi các tín hiệu đặc trưng tại δ_{H} 2,88 (1H, dd, $J=15,2, 5,2\text{ Hz}$, H-1'a), 2,55 (1H, dd, $J=15,2, 7,2\text{ Hz}$, H-1'b), 3,77 (1H, m H-2'), 1,74 (3H, s, H-5'), 1,32 (3H, s, H-4') và δ_{C} 27,2 (C-1'), 69,7 (C-2'), 79,5 (C-3'), 25,8 (C-5'), 20,8 (C-4') [3].

Trên phổ ^{13}C NMR xuất hiện tín hiệu của 24 nguyên tử cacbon. Kết hợp với phổ HMQC ta nhận thấy sự có mặt của ba nhóm metylen, ba nhóm metin, bốn nhóm methyl và một nhóm methoxyl tại δ_{C} 61,6. Ngoài ra, các tín hiệu của nhóm cacbon vòng thơm ở vùng trường thấp và tín hiệu tại δ_{C} 178,9 của cacbon nhóm cacbonyl cho phép nhận định đây là một hợp chất khung xanthon với hai nhóm thế lớn là 3-hydroxyl-3-methylbutyl và 3-hydroxyl-2,2-dimethylchroman. Dữ liệu phổ của (I) (Bảng 1) tương tự với dữ liệu phổ của hợp chất 1-isomangostin hydrate ngoại trừ vị trí C-2' do sự đính thêm một nhóm hydroxyl tại vị trí C-2' của 1-Isomangostin hydrate để hình thành (I) [4]. Nhận định trên cũng như vị trí của các nhóm thế được xác định bởi phổ HMBC. Trên phổ HMBC của hợp chất (I), các tương tác từ các proton của nhóm metylen tại δ_{H} 2,88 và 2,55 (H-1') tới các cacbon tại δ_{C} 156,2 (C-1), 105,4 (C-2), và 162,2 (C-3); cùng với tương tác HMBC của nhóm metin tại δ_{H} 3,77 (H-2') tới cacbon tại δ_{C} 105,4 (C-2) đã chỉ ra vòng dihydropyran của nhóm thế 3-hydroxyl-2,2-dimethylchroman được đính tại vị trí số 1 và 2 như trong hình 2. Ngoài ra, vị trí của các nhóm thế methoxyl và 3-hydroxyl-3-methylbutyl tại số 7 và 8 tương ứng của khung xanthon được chứng minh bởi các tương tác HMBC từ các proton của nhóm metylen tại δ_{H} 3,34 (H-1'') tới các cacbon tại δ_{C} 144,7 (C-7), 137,7 (C-8), và 115,0 (C-8a); cùng với tương tác HMBC

của nhóm methoxyl tại δ_H 3,79 (OCH₃-7) tới cacbon tại δ_C 144,7 (C-7). Cấu hình tuyệt đối của (I) tại vị trí C-2' được xác định bằng việc so sánh dữ liệu phổ CD và độ quay cực của (I) với hợp chất có cấu trúc tương tự garcinoxanthon G [3]. Hợp chất (I) ($[\alpha]_D^{20}$ -20,4) thể hiện tín hiệu Cotton effect dương [$\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$): 218 (+0,95)], đối nghịch với tín hiệu Cotton effect [$\lambda_{\max}$ ($\Delta\epsilon$): 226 (- 0,94)] của garcinoxanthon G ($[\alpha]_D^{20}$ +6,1). Do đó, cấu hình tuyệt đối của (I) tại vị trí C-2' được xác định là R, ngược với cấu hình 2'S của garcinoxanthon G [3].

Dựa vào các phân tích trên, cấu trúc của hợp chất (I) được xác định là 11R-hydroxy-1-isomangostin hydrate, một hợp chất mới lần đầu được phân lập và được đặt tên riêng là **garcinoxanthon S**.

Bảng 1: Số liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của hợp chất (I) và (II)

Vị trí	Hợp chất (I)		Hợp chất (II)	
	δ_H mult., (J in Hz)	δ_C	δ_H mult., (J in Hz)	δ_C
1		156,2		164,9
2		105,4	6,10, s	98,6
3		162,2		165,8
4	6,29, s	93,9	6,20, s	93,9
4a		158,4		158,6
5	6,63, s	102,3	6,69, s	101,2
6		155,7		154,2
7		144,7		142,2
8		139,7		131,1
8a		115,0		112,3
9		179,8		183,6
9a		107,6		104,1
10a		156,7		153,6
1'	2,88,dd, 17,2, 5.2 2,55,dd, 17,2, 7,2	27,2	3,42, m	23,1
2'	3,77, m	69,7	1,79, m	44,5
3'		79,5		72,2
4'	1,74, s	25,8	1,32, s	29,2
5'	1,32, s	20,8	1,32, s	29,2
1''	3,34, m	23,3		
2''	1,74, t, 7,2	45,6		
3''		72,0		
4''	1,32, s	29,3		
5''	1,32, s	29,3		
7-OCH ₃	3,79, s	61,6		

Xác định cấu trúc của hợp chất (II)

Hợp chất (II) thu được dưới dạng chất rắn vô định hình, màu vàng.

Trên phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử (HR-ESI-MS) xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 345,0969 $[M-H]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{18}H_{17}O_7$; m/z : 346,1053); kết hợp với các dữ liệu phổ NMR cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất (II) là $C_{18}H_{18}O_7$.

Phổ tử ngoại (UV) và hồng ngoại (IR) của (II) tương đồng với các dữ liệu phổ tương ứng của (I) đã gợi ý rằng (II) cũng là hợp chất có khung xanthon. Phổ 1H NMR của (II) cũng tiết lộ rằng các tín hiệu liên quan đến vòng A của (II) là tương tự với vòng A của (I) ngoại trừ sự vắng mặt của nhóm methoxyl, với một proton singlet của olefin vòng thơm tại độ dịch chuyển δ_H 6,69 (1H, s, H-5) và một nhóm 3-hydroxyl-3-methylbutyl (Bảng 1). Do đó, hai tín hiệu proton còn lại của một hệ ghép cặp AX tại độ dịch chuyển δ_H 6,20 (1H, s, H-4) và 6,10 (1H, s, H-2) thuộc về vòng B của (II). Nhận định trên được xác nhận bởi các tương tác HMBC của proton H-4 (δ_H 6,20) tới các cacbon C-9a (δ_C 104,1)/ C-2 (δ_C 98,6)/ C-3 (δ_C 165,8)/ C-4a (δ_C 158,6); và của proton H-2 (δ_H 6,10) tới các cacbon C-9a (δ_C 104,1)/ C-1 (δ_C 164,9)/ C-3 (δ_C 165,8)/ C-4 (δ_C 93,9). Tương tự như (I), vị trí của nhóm 3-hydroxyl-3-methylbutyl tại vị trí số 8 được chứng minh bởi các tương tác bởi các tương tác HMBC từ các proton của nhóm metylen tại δ_H 3,42 (H-1') tới các cacbon tại δ_C 142,2 (C-7), 131,1 (C-8), và 111,3 (C-8a). Dựa vào các phân tích trên, cấu trúc của hợp chất (II) được xác định là 1,3,6,7-tetrahydroxy-8-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthon, một hợp chất mới lần đầu được phân lập và được đặt tên riêng là **garcinoxanthon T**.

Xác định cấu trúc của hợp chất (III)

Hợp chất (III) thu được dưới dạng chất rắn vô định hình, màu vàng.

Trên phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử (HR-ESI-MS) xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 431,1688 $[M-H]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{23}H_{27}O_8$; m/z : 432,1784); kết hợp với các dữ liệu phổ NMR cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất (III) là $C_{23}H_{28}O_8$.

Phổ tử ngoại (UV) và hồng ngoại (IR) của (III) tương đồng với các dữ liệu phổ tương ứng của các hợp chất có khung xanthon khác là (II) và (I). Trên phổ 1H NMR của (III) xuất hiện các tín hiệu proton tương tự như của (I) bao gồm: hai proton singlet của các olefin vòng thơm tại độ dịch chuyển δ_H 6,53 (1H, s, H-5) và 6,10 (1H, s, H-4). Ngoài ra, tương tự như (I) và (II) các phổ 1H và ^{13}C NMR của (III) cũng đã xác nhận

sự có mặt của 2 nhóm 3-hydroxyl-3-methylbutyl [2] (Bảng 2). Dữ liệu phổ liên quan đến vòng A của (III) hoàn toàn tương tự như của (II) (Bảng 1, 2). Do đó, các tín hiệu còn lại của một nhóm 3-hydroxyl-3-methylbutyl và một proton dạng singlet tại δ_H 6.10 thuộc về vòng B của (III). Vị trí của nhóm 3-hydroxyl-3-methylbutyl tại vị trí số 2 của vòng B được chứng minh bởi các tương tác bởi các tương tác HMBC từ các proton của nhóm metylen tại δ_H 2,58 (H-1') tới các cacbon tại δ_C 161,5 (C-1), 103,9 (C-2), và 163,3 (C-3). Dựa vào các phân tích trên, cấu trúc của hợp chất (III) được xác định là 1,3,6,7-tetrahydroxy-1,8-di(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthon, một hợp chất mới lần đầu được phân lập và được đặt tên riêng là **garcinoxanthon U**.

Bảng 2: Số liệu phổ 1H và ^{13}C NMR của các hợp chất (III) và (IV)

Vị trí	Hợp chất (III)		Hợp chất (IV)	
	δ_H mult., (J in Hz)	δ_C	δ_H mult., (J in Hz)	δ_C
1		161,5		161,8
2		103,9		103,9
3		163,3		163,8
4	6,10, s	93,1	6,23, s	93,3
4a		156,1		156,2
5	6,53, s	101,1	6,68, s	102,8
6		153,1		156,9
7		141,8		144,8
8		130,7		139,9
8a		112,2		112,3
9		183,4		183,3
9a		111,8		112,3
10a		154,1		158,0
1'	2,58, t, 7,2	18,5	2,67, t, 7,6	18,5
2'	1.61, m	43,4	1,65, m	43,4
3'		72,0		71,9
4'	1,21, s	29,0	1,27, s	29,1
5'	1,21, s	29,0	1,27, s	29,1
1''	3,27, m	23,1	3,38, m	23,7
2''	1,70, m	44,3	1,73, m	45,7
3''		72,3		72,0
4''	1,26, s	29,2	1,33, s	29,2
5''	1,26, s	29,2	1,33, s	29,2
7-OCH ₃			3,82, s	61,7

Xác định cấu trúc của hợp chất (IV)

Hợp chất (IV) thu được dưới dạng chất rắn vô định hình, màu vàng.

Trên phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử (HR-ESI-MS) xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 445,1847 $[M-H]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{24}H_{29}O_8$ m/z : 432,1784). Kết hợp với các dữ liệu phổ NMR cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất (IV) là $C_{24}H_{30}O_8$, nhiều hơn KLPT của (III) là 14 đvC.

Dữ liệu phổ 1H và ^{13}C NMR của (IV) tương tự như của (III) ngoại trừ sự xuất hiện thêm một nhóm methoxyl tại δ_H 3,82 (3H, s, OCH_3 -7), δ_C 61,7. Vị trí của nhóm methoxyl tại vị trí số 7 được xác nhận bởi tương tác HMBC của nhóm methoxyl tại δ_H 3,82 (OCH_3 -7) tới cacbon tại δ_C 144,8 (C-7). Như vậy có thể nhận định hợp chất (IV) được hình thành khi thay thế nhóm hydroxyl tại vị trí số 7 của (III) bằng nhóm methoxyl. Điều này hoàn toàn phù hợp với các tương tác HMBC được quan sát trên phổ HMBC của hợp chất (IV). Dựa vào các phân tích trên, cấu trúc của hợp chất (IV) được xác định là 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-1,8-di(3-hydroxy-3-methylbutyl)-xanthon, một hợp chất mới lần đầu được phân lập và được đặt tên riêng là **garcinoxanthon V**.

Tài liệu tham khảo

- [1] S. Suksamrarn, N. Suwannapoch, P. Ratananukul, N. Aroonlerk, A. Suksamrarn, J. Nat. Prod. 65 (2002) 761-763.
- [2] G.J. Bennett, L.J. Harrison, G.-L. Sia, K.-Y. Sim, Phytochemistry 32 (1993) 1245-1251.
- [3] Q. Liu, D. Li, A. Wang, Z. Dong, S. Yin, Q. Zhang, Y. Ye, L. Li, L. Lin, Phytochemistry 131 (2016) 115-123.
- [4] W. Mahabusarakam, P. Wiriyachitra, W.C. Taylor, J. Nat. Prod. 50 (1987) 474-478.

Ví dụ 2: Thử nghiệm hoạt tính ức chế DPP

Vật liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

- DPPH (Sigma)
- Đĩa 96 giếng nhựa (Corning, USA), pipette (eppendorf), máy đọc ELISA 96 giếng (Bio-rad)
- Chất tham khảo: Axit ascorbic (Vit C) của Sigma, USA
- Các hóa chất thông thường khác.

Thiết bị: Cân phân tích, máy đo máy đọc ELISA 96 giếng (Bio-rad)

Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa bằng DPPH

Phương pháp thử nghiệm theo sáng chế được tiến hành theo phương pháp của Brand Williams và cộng sự (1995) có điều chỉnh. Cụ thể như sau:

- Mẫu thử được pha stock trong DMSO, sau đó được pha thành dải nồng độ phù hợp với nước cất khử ion. Axit ascorbic được sử dụng làm đối chứng tham khảo và cũng được pha thành dải nồng độ với nước cất khử ion
- DPPH pha trong metanol (100%) nồng độ 0,25 μM
- Hút mẫu nghiên cứu đã pha ở các nồng độ vào ống thủy tinh. Thêm dung dịch DPPH đã chuẩn bị ở trên vào các ống đã có sẵn mẫu nghiên cứu (tỷ lệ 1:1)
- Ống không có mẫu thử chỉ có 1ml nước và 1 ml DPPH
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút rồi xác định độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng tại bước sóng 517 nm.
- Khả năng trung hòa gốc oxy hóa tự do (Scavenging Activities - SA) sinh ra từ DPPH của mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ SA} = (\text{OD}_{\text{đối chứng}} - \text{OD}_{\text{mẫu thử}}) * 100 / \text{OD}_{\text{đối chứng}} (\%)$$

trong đó: $\text{OD}_{\text{đối chứng}}$: Độ hấp thụ tại giếng không chứa chất thử

$\text{OD}_{\text{mẫu thử}}$: Độ hấp thụ tại giếng chứa chất thử

- Giá trị SC_{50} (Scavenging Concentration at 50% - nồng độ trung hòa được 50% gốc tự do của DPPH) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve2Dv4.

Kết quả nghiên cứu thử nghiệm

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 3 sau đây.

Bảng 3: Hoạt tính trung hòa gốc tự do từ thử nghiệm DPPH

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	% Hoạt tính				
	Hợp chất (I)	Hợp chất (III)	Hợp chất (IV)	Hợp chất (II)	Axit ascorbic (VitC)
100	34,49	90,88	34,03	81,48	91,76
20	12,73	40,93	7,41	33,61	89,49
4	4,63	12,59	5,23	2,59	23,15
0,8	-1,62	-0,65	-5,23	-1,34	2,22
SC_{50}	>100	$29,63 \pm 1,58$	>100	$42,48 \pm 4,23$	$8,46 \pm 0,70$

Kết quả trên cho thấy, các hợp chất (II) và (III) thể hiện hoạt tính với SC_{50} từ 7,40 đến 56,70 $\mu\text{g/mL}$. Chất đối chứng dương ascorbic axit hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

Ví dụ 3: Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Các dòng tế bào sử dụng trong nghiên cứu:

- SK-LU-1: Ung thư phổi ở người (human lung carcinoma)
- MCF7: Ung thư vú ở người (human breast carcinoma)
- HT-29: Ung thư ruột kết ở người (human colon carcinoma)

Vật liệu, hóa chất và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu và hoá chất

- Huyết thanh thai bò (Fetal bovine serum - FBS) của GIBCO, Invitrogen, axit tricloaxetic (trichloroacetic acid - TCA), sulforhodamin B (SRB) (Sigma) và các hóa chất thông thường khác. Chất tham khảo là Ellipticine (Merck);
- Đĩa 96 giếng nhựa (Corning, USA), pipette (eppendorf), máy đọc ELISA 96 giếng (Biotek EXL800);
- Các dòng tế bào ung thư do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island (Mỹ, US) và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan (Italia) cung cấp.

Phương pháp nuôi cấy tế bào *in vitro*

- Các dòng tế bào ung thư được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường nuôi cấy DMEM với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamin, 10 mM HEPES, và 1,0 mM natri pyruvat, ngoài ra bổ sung 10% FBS (Invitrogen);
- Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỷ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ẩm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂.

Phương pháp xác định tính độc tế bào ung thư (cytotoxic assay) đối với tế bào nuôi cấy dạng đơn lớp

Phương pháp thử độ độc tế bào ung thư *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt TBUT ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Skekan et al. (1990). Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

- Chất thử được pha từ dung dịch gốc (stock =10 mg/mL trong DMSO100%) thành các dải nồng độ thích hợp bằng DMSO10% trong đĩa pha mẫu. Cụ thể là lấy 10 μ L từ dung dịch gốc pha vào 90 μ L dung dịch DMSO10%, trộn đều để có được nồng độ số 1 là 1 mg/mL. Tiếp tục làm như trên và sử dụng nồng độ 1 để pha loãng 5 lần thu các nồng độ tiếp sau là 200-40-8 μ g/mL.
- Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm là (3×10^4 tế bào/mL).
- Lấy 20 μ L chất thử (đã pha ở đĩa pha mẫu) với ở các nồng độ ở trên đưa vào các giếng của đĩa thử nghiệm 96 giếng. Thêm 180 μ L hỗn dịch tế bào đã điều chỉnh nồng độ phù hợp (3×10^4 tế bào/mL) ở trên vào các giếng này sao cho nồng độ chất thử trong giếng là 100 μ g/mL; 20 μ g/mL; 4 μ g/mL và 0.8 μ g/mL.
- Đĩa thử nghiệm được ủ trong tủ ấm 72 giờ. Giếng không có chất thử nhưng có tế bào (180 μ L) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng axit tricloaxetic – TCA 20%.
- Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA 20% trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB (0,4% w/v trong axit axetic 1%) trong 30 phút ở 37°C, rửa 3 lần bằng axit axetic 1% rồi để khô ở nhiệt độ phòng. 10 mM Tris base không được đệm (100 μ L) được thêm vào từng giếng để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút.
- Đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Biotek).
- Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \frac{[\text{OD}_{\text{chất thử}} - \text{OD}_{\text{ngày 0}}] \times 100}{\text{OD}_{\text{đối chứng âm}} - \text{OD}_{\text{ngày 0}}}$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần trên đĩa để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ thử nghiệm là 10 μ g/mL; 2 μ g/mL; 0,4 μ g/mL; 0,08 μ g/mL được sử dụng như chất đối chứng tham khảo;
- DMSO10% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Cụ thể là lấy 10 μ L dung dịch DMSO10% đưa vào 190 μ L hỗn dịch tế bào trong đĩa thử nghiệm (giảm 20X). Như vậy, nồng độ cuối cùng của DMSO khi tiếp xúc tế bào là 0.5%.

- Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.
- Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), cặn chiết được coi có hoạt tính tốt với $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi $IC_{50} \leq 5 \mu\text{M}$ [Hughes JP, (2011)]

Kết quả nghiên cứu

Kết quả thí nghiệm thể hiện trong Bảng 4 sau đây.

Bảng 4: Tác động gây độc tế bào ung thư của các mẫu nghiên cứu

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	% ức chế					
	Hợp chất (III)			Hợp chất (IV)		
	SK-LU-1	HT-29	MCF-7	SK-LU-1	HT-29	MCF-7
100	26,24	23,71	39,71	22,11	26,13	36,73
20	2,49	4,18	2,50	3,58	2,60	5,75
IC_{50}	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Hợp chất (II)			Hợp chất (I)		
	SK-LU-1	SK-LU-1	SK-LU-1	SK-LU-1	HT-29	MCF-7
100	101,13	70,88	70,88	70,88	60,30	52,64
20	32,62	29,91	29,91	29,91	17,77	11,11
4	10,56	6,81	6,81	6,81	3,65	6,73
0,8	-1,74	-2,93	-2,93	-2,93	-4,07	-5,76
IC_{50}	35,05 $\pm$ 3,07	50,66 $\pm$ 3,60	50,66 $\pm$ 3,60	50,66 $\pm$ 3,60	76,19 $\pm$ 2,92	94,37 $\pm$ 3,93
Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Ellipticin					
	SK-LU-1	HT-29	MCF-7			
100	90,60	96,53	90,67			
20	88,76	84,09	77,88			
4	50,88	49,91	48,75			
0,8	21,73	21,45	26,48			
IC_{50}	0,39 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,04			

Kết quả trên cho thấy, các hợp chất (I) và (II) thể hiện mức hoạt tính với giá trị IC_{50} từ 5,88 – 95,73 $\mu\text{g/mL}$ trên các dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Chất đối chứng dương Ellipticin hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

Ví dụ 4: Thử nghiệm hoạt tính hạ đường huyết

Mẫu thử nghiệm: dịch chiết tổng chứa các hợp chất xanthon theo sáng chế được ký hiệu là MC1.

Phần dịch chiết khác không phải là xanthon được ký hiệu là TN1.

Động vật: chuột BALB/c khoẻ mạnh, không mắc bệnh, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, không phân biệt giống, có khối lượng 19-21g, được nuôi tại khu nuôi động vật của Viện Công nghệ Sinh học. Chuột được cho ăn thức ăn tiêu chuẩn và nước uống tự do.

Hoá chất: alloxan monohydrat (Sigma Aldrich)

Dụng cụ thí nghiệm: kim cong đầu tù, kim tiêm, các thiết bị phụ trợ khác.

Thiết bị xác định nồng độ glucoza: máy đo đường huyết OneTouch Ultra

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp gây tăng đường huyết

Gây tăng đường huyết cho chuột bằng cách tiêm alloxan monohydrat liều đơn 150 mg/kg (pha trong nước muối sinh lý 0,9%), tiêm vào trong màng bụng theo phương pháp của A. Mahdy and N. G. Shehab (2015). Chuột đã được nhịn đói 18 giờ trước khi tiêm Alloxan. Sau 1 giờ tiêm Alloxan chuột được cho ăn trở lại.

Phương pháp đánh giá hoạt tính hạ đường huyết

Được tiến hành theo phương pháp của G. Sivalingam and N. Sriram (2013) có chỉnh sửa nhỏ, cụ thể như sau:

Sau 72 giờ tiêm alloxan monohydrat (chuột được nhịn đói trước đó 16 giờ) mức đường huyết trong máu được xác định bằng thiết bị đo đường huyết OneTouch Ultra. Theo WHO (1985) những con chuột có mức đường huyết trong máu lớn hơn 150 mg/dL (tương đương 8,33 mg/L) thì được chọn để nghiên cứu và được phân thành các lô (6 chuột/lô) như sau:

- + Lô 1 (Đối chứng bệnh): uống nước
- + Lô 2 (Đối chứng tham khảo): uống Metformin liều 100 mg/kg/ngày
- + Lô 3 (thử mẫu): uống thử nghiệm 1 (TN1) liều 100 mg/kg/ngày
- + Lô 4 (thử mẫu): uống TN1 liều 200 mg/kg/ngày
- + Lô 5 (thử mẫu): uống MC1 liều 100 mg/kg/ngày
- + Lô 6 (thử mẫu): uống MC1 liều 200 mg/kg/ngày

Cho chuột uống mẫu thử hoặc nước trong 7 ngày. Sau 7 ngày xác định mức đường huyết trong máu (chuột đã nhịn đói 18 giờ trước). Đánh giá tác dụng của hoạt chất dựa vào sự giảm nồng độ glucoza trong huyết thanh trước và sau khi cho uống hoạt chất.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thể hiện ở dạng $X \pm SE$. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê khi $P < 0,05$

Khối lượng của chuột trước và sau khi thí nghiệm được mô tả trong Bảng 5 sau đây.

Bảng 5: Khối lượng của chuột trước khi và sau khi thí nghiệm

STT	Lô thử nghiệm	Trọng lượng chuột thí nghiệm (g/con)		
Trước khi tiêm alloxan monohydrat	Sau 72 giờ tiêm alloxan monohydrat và trước khi uống	Sau 7 ngày uống		
1	Đối chứng bệnh lý	$28,63 \pm 0,90$	$28,50 \pm 1,02$	$26,75 \pm 1,48$
2	Đối chứng tham khảo (Metformin: 100mg/kg/ngày)	$28,40 \pm 1,22$	$28,68 \pm 1,03$	$28,15 \pm 1,09$
5	MC1: 100 mg/kg/ngày	$28,63 \pm 1,60$	$28,65 \pm 1,54$	$26,50 \pm 1,04$
6	MC1: 200 mg/kg/ngày	$28,50 \pm 1,40$	$28,50 \pm 1,62$	$28,00 \pm 1,73$

Mức đường huyết trong máu

Kết quả xác định mức đường huyết trong máu của các lô được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6. Nồng độ đường huyết trong máu chuột trước và sau thí nghiệm

STT	Lô thử nghiệm	Mức đường huyết trong máu (mmol/L)	
Trước khi uống	Sau 7 ngày uống		
1	Đối chứng bệnh lý	$16,60 \pm 3,14$	$14,45 \pm 1,26$
2	Đối chứng tham khảo (Metformin: 100mg/kg/ngày)	$16,38 \pm 3,62$	$9,55^* \pm 1,54$
5	MC1: 100 mg/kg/ngày	$15,93 \pm 3,90$	$10,38^* \pm 3,21$
6	MC1: 200 mg/kg/ngày	$16,30 \pm 4,34$	$10,33^* \pm 2,01$

* Sự sai khác có ý nghĩa thống kê so với đối chứng với $P < 0,05$

Kết quả bảng trên cho thấy:

Sau 7 ngày uống TN1 liều 100 mg/kg/ngày thì mức đường huyết trong máu từ 16,30 mmol/L đã giảm xuống còn 11,80 mmol/L. Sự giảm này so với lô chứng bệnh lý là không sự sai khác thống kê ($P > 0,05$).

Sau 7 ngày uống TN1 liều 200 mg/kg/ngày thì mức đường huyết trong máu từ 16,55 mmol/L đã giảm xuống còn 10,90 mmol/L. Sự giảm này so với lô chứng bệnh lý là không sự sai khác thống kê ($P>0,05$).

Sau 7 ngày uống MC1 liều 100 mg/kg/ngày thì mức đường huyết trong máu từ 15,93 mmol/L đã giảm xuống còn 10,38 mmol/L. Sự giảm này so với lô chứng bệnh lý là có sự sai khác thống kê ($P<0,05$).

Sau 7 ngày uống MC1 liều 200 mg/kg/ngày thì mức đường huyết trong máu từ 16,30 mmol/L đã giảm xuống còn 10,33 mmol/L. Sự giảm này so với lô chứng bệnh lý là có sự sai khác thống kê ($P<0,05$).

Sau 7 ngày uống Metformin liều 100 mg/kg/ngày thì mức đường huyết trong máu từ 16,38 mmol/L đã giảm xuống còn 9,55 mmol/L. Sự giảm này so với lô chứng bệnh lý là có sự sai khác thống kê ($P<0,05$).

Kết luận

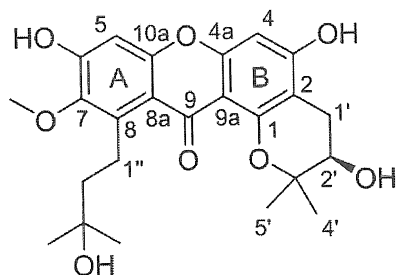
Mẫu MC1 ở cả hai mức liều 100 và 200 mg/kg/ngày đã làm giảm mức đường huyết ở chuột bị gây tăng đường huyết bằng alloxan monohydrat ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Những lợi ích có thể đạt được

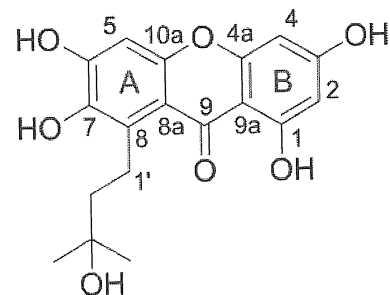
Sáng chế đề cập đến hợp chất có hoạt tính sinh học hữu dụng bao gồm hoạt tính chống oxy hóa, hạ đường huyết và gây độc tế bào, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào ung thư phổi ở người SK-LU-1, ung thư vú ở người MCF7 và ung thư ruột kết ở người HT-29 và phương pháp phát lập các hợp chất này từ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae), nguồn nguyên liệu phong phú, sẵn có ở Việt Nam. Đồng thời sáng chế cũng nhằm định hướng cho những nghiên cứu tiếp theo sâu hơn về cây Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae), một cây thuốc quý cần được đầu tư nghiên cứu để trở thành nguồn nguyên liệu quan trọng trong bào chế các thuốc chữa bệnh có hiệu quả nhất.

Yêu cầu bảo hộ

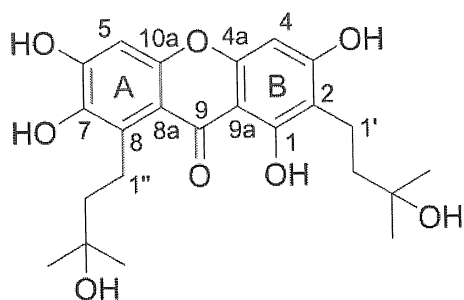
1. Phương pháp phân lập hợp chất từ vỏ quả Mãng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae), trong đó hợp chất này là hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có công thức (I) đến (IV):



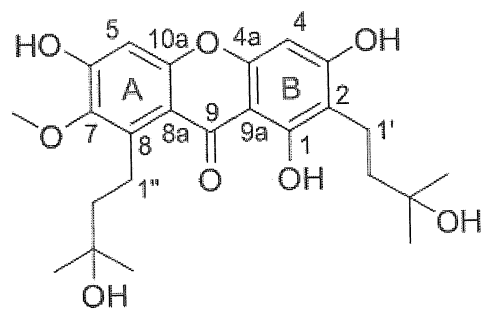
(I)



(II)



(III)



(IV)

đặc trưng ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước:

- i) phơi khô, xay nhỏ vỏ quả măng cụt, ngâm chiết bột thu được với metanol 3 lần (3x) ở nhiệt độ trong khoảng 40 đến 50°C;
- ii) cất loại dung môi dịch chiết thu được ở 50°C và áp suất giảm để thu được cặn chiết metanol, sau đó hòa với nước và chiết với diclometan;
- iii) tiến hành sắc ký trên cột silicagel pha thường đối với cặn chiết diclometan, rửa giải bằng hệ dung môi gradient diclometan : axeton (100:1 – 0:100, thể tích/thể tích) thu được 15 phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là F1 đến F15;
- iv) tiến hành phân lập các hợp chất có công thức (I) đến (IV) trên đây, trong đó:
 - iv.1) tiến hành sắc ký phân đoạn F3 trên cột silicagel và rửa giải bằng hệ dung môi diclometan : metanol (50:1 – 0:100, thể tích/thể tích) thu được 12 phân đoạn nhỏ, được ký hiệu lần lượt là F3.1 đến F3.12, và

- tiến hành sắc ký phân đoạn F3.6 qua cột pha đảo YMC-RP-18 với hệ dung môi metanol : nước (3:1, thể tích/thể tích) thu được ba hợp chất có công thức (I), (III), và (IV);

iv.2) tiến hành sắc ký phân đoạn F5 trên cột silicagel và rửa giải bằng hệ dung môi diclometan : axeton (15:1, thể tích/thể tích) thu được 10 phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là F5.1 đến F5.10, và

- sắc ký phân đoạn F5.4 (5,5 mg) qua cột silicagel với hệ dung môi diclometan : metanol (10:1, thể tích/thể tích) thu được 5 phân đoạn nhỏ, được ký hiệu lần lượt là F5.4.1 đến F5.4.5, và
 - tiến hành sắc ký phân đoạn F5.4.4 trên cột silicagel và rửa giải bằng hệ dung môi metanol : nước (3:1, thể tích/thể tích) để thu được hợp chất có công thức (II).