



(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)



**2-0003370**

(51) **C07H 17/07; A01H 3/04**  
2020.01

(13) **Y**

---

(21) 2-2021-00328

(22) 16/08/2021

(45) 25/10/2023 427

(43) 25/11/2021 404

(73) Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)  
Nhà A18, số 18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Thu Hà (VN); Nguyễn Văn Tuyển (VN); Ninh Thế Sơn (VN); Nguyễn Thanh Trà (VN); Lê Thị Tú Anh (VN).

---

(54) QUY TRÌNH CHIẾT HỖN HỢP ALCALOID TỪ CỦ RÁY DẠI (*ALOCASIA ODORA* K. KOCH)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp alcaloit chứa ba chất hợp Alocasin A, Hyrtiosin B và Hyrtiosulawesine từ củ Ráy dại (*Alocasia odora* K. Koch) thuộc chi Ráy (*Alocasia*), họ Ráy (*Araceae*) và hỗn hợp thu được từ quy trình này có tác dụng ức chế enzym xanthin oxidaza.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ thực vật. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp alkaloid từ củ Ráy dại (*Alocasia odora* K. Koch) thuộc chi Ráy (*Alocasia*), họ Ráy (*Araceae*) và hỗn hợp thu được từ quy trình này có tác dụng ức chế enzym xanthin oxidaza, một enzym đóng vai trò rất quan trọng trong việc hình thành axit uric và là nguyên nhân trực tiếp gây ra bệnh gút.

### Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Gút là bệnh lý chuyển hóa liên quan đến tăng nồng độ axit uric trong máu, đặc trưng bởi những đợt viêm khớp cấp hoặc viêm khớp mạn tính do lắng đọng tinh thể mononatri urat. Trước đây, gút được coi là bệnh hiếm gặp nhưng từ những năm đầu của thế kỉ 21, tỷ lệ bệnh gút đang gia tăng rất nhanh trên thế giới, nó ngày càng phổ biến trong xã hội hiện đại và trở thành một vấn đề đáng quan tâm. Các biểu hiện lâm sàng của bệnh và mối liên quan với các bệnh lý khác như tim mạch, sỏi thận, đái tháo đường, béo phì, cao huyết áp, đột quỵ, v.v. có nhiều thay đổi theo chiều hướng xấu khiến bệnh trở nên khó điều trị. Điều này làm giảm chất lượng cuộc sống, gia tăng tỷ lệ tàn phế và tử vong trên nhiều bệnh nhân. Gút được dự đoán là một trong những căn bệnh chuyển hóa phổ biến nhất trong tương lai, chỉ đứng sau bệnh tiểu đường tít 2 (Huang J et al., *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 1943, 2011). Axit uric là sản phẩm cuối của quá trình chuyển hóa purin trong cơ thể. Việc sản xuất axit uric được xúc tác bởi enzym xanthin oxidaza ở gan, nó đóng vai trò quan trọng trong quá trình oxy hoá hypoxanthin thành xanthin và oxy hoá xanthin thành axit uric (De Oliveira et al., *Diabetology & metabolic syndrome*, 4(1), 12, 2012). Dựa vào mối liên quan mật thiết giữa nồng độ axit uric máu và enzym xanthin oxidaza đối với bệnh gút, nên ức chế enzym xanthin oxidaza là một trong những cơ chế chính mà các thuốc phòng và điều trị gút đang hướng tới. Các thuốc tổng hợp hiện nay vẫn đóng vai

trò chính trong điều trị bệnh gút với mục tiêu chính là hạ axit uric máu và chống viêm. Ưu điểm của thuốc tổng hợp là tác dụng nhanh, sử dụng thuận tiện nhưng các thuốc này thường đi kèm một số tác dụng không mong muốn như các phản ứng quá mẫn, độc với thận, tủy xương, v.v. làm hạn chế hiệu quả điều trị. Mặt khác, do bệnh mãn tính, người bệnh phải dùng thuốc trong thời gian dài nên chi phí điều trị rất tốn kém. Chính vì vậy, nỗ lực tìm kiếm những hoạt chất mới an toàn và hợp lý cho người sử dụng vẫn cần được tiếp tục. Một trong những định hướng đó là phát triển các thuốc hoặc chế phẩm bổ sung có nguồn gốc từ thực vật.

Chi Ráy *Alocasia* thuộc họ Ráy (Araceae) gồm hơn 100 loài, thường là các loại thảo mộc có nhựa mủ. Chúng được phân bố trên khắp vùng cận nhiệt đới ở châu Á và tây Thái Bình Dương. Trong Y học của nhiều nước trên thế giới, các loài trong chi Ráy được sử dụng làm thuốc chữa nhiều loại bệnh. Kết quả tìm kiếm trên Science Direct và Google Scholar cho thấy, các loài *Alocasia* chủ yếu được nghiên cứu về hoạt tính chống oxy hóa, chống khối u, gây độc tế bào ung thư, kháng khuẩn, làm lành vết thương, có tác dụng hạ đường huyết và mỡ máu, bảo vệ gan (Romeo C. Ongpoy, *J. of Asian Association of Schools of Pharmacy*, 6(1), 25-33, 2017). Các nghiên cứu về thành phần hóa học chi Ráy chủ yếu gồm các lớp chất lignan, neolignan, terpenoit, alcaloit, glucozit với các aglycon rất đa dạng, cerebrozit, các axit béo mạch dài. Theo đánh giá của các nhà khoa học, chi *Alocasia* có đầy hứa hẹn nhờ tiềm năng của nó cho mục đích y học (Moon J.M et al., *Hum Exp Toxicol.*, 30(10), 1720-3, 2011).

Qua tìm hiểu tài liệu, chúng tôi nhận thấy củ Ráy dại (*Alocasia odora* K. Koch), tên gọi khác là Bạc hà, Dã vu được sử dụng trong dân gian chữa đau nhức xương khớp, gút, giải độc, bí tiểu, v.v.. Ráy dại là loại cây mọc hoang ở khắp nơi trên nước ta, thường mọc ở bìa rừng, ven suối hoặc trong vườn nhà, những nơi có độ ẩm ướt cao, v.v.. Để có tác dụng chữa bệnh tốt cây phải từ 3-5 tuổi trở lên. Tài liệu cổ coi củ Ráy dại có vị nhạt, tính hàn, độc nhiều, ăn vào gây ngứa miệng và họng. Mặc dù vậy nhưng khi dùng uống thì có tác dụng làm mát gan, tẩy độc đặc biệt đối với những người chức năng gan yếu. Thân ráy dại thường ngứa nhưng lại được dùng trị cảm rất tốt. Thân cây giã nát, đắp vào nơi bị bỏng làm giảm bỏng

rát, tránh phòng rộp và phục hồi vết bỏng nhanh. Củ Ráy dại có tác dụng chữa mụn nhọt tốt khi kết hợp với nghệ, dầu gừng, dầu thông và sáp ong. Trong bài thuốc của dân tộc Dao ở Ba Vì lấy thân cây ráy dại cạo bỏ vỏ ngoài, thái lát, phơi khô kết hợp với các vị thuốc khác dùng chữa tê thấp, nhức mỏi chân tay (Đỗ Tất Lợi, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Y học, 122, 2000). Ngoài ra, các tinh thể gây ngứa không bị mất đi khi sấy hay phơi khô, có thể dùng làm thuốc diệt côn trùng (Nguyễn Văn Dur và cs, Hội nghị khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, 5, 993-997, 2013). Theo Y học cổ truyền, ở Trung Quốc, thân rễ Ráy dại được dùng uống chữa sốt rét, thũng độc, ngứa lở, đau bụng, dịch tả, thoát vị, đau dạ dày, lao phổi, v.v.; ở Ấn Độ, dịch ép từ thân Ráy dại có tác dụng chữa bọ cạp cắn; ở Indonesia, lá Ráy dại dùng chữa sung huyết da, đau khớp (Đỗ Huy Bích và cs, Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam. NXB. Khoa học Kỹ thuật, 2, 614-616, 2003).

Các nghiên cứu trong và ngoài nước về thành phần hóa học của loài *A. odora* đến nay rất ít. Theo tác giả Kobamoto, thân Ráy dại có tới 95,5 % nước, 1,59 % tinh bột, 3,58 % nitrogen tự do, còn lại là chất béo 0,05 %, protein 0,08 %, xơ 0,3 %, tro 0,49 %, canxi 0,09 % (Naotada Kobamoto et al., *Science Bulletin Agricultural University RyuKiyus*, 27, 149-154, 1980). Trong nghiên cứu của tác giả Moon JM. và cộng sự, loài *A. odora* có chứa canxi oxalat, saponin và alocasin không hòa tan. Khi tiếp xúc trực tiếp với niêm mạc hoặc ăn có thể dẫn đến ngộ độc và kích ứng tại chỗ như tê miệng và đau lưỡi. Các tinh thể canxi oxalat có thể phá hủy tế bào và gây ra các độc tố khác như kích ứng đường tiêu hóa, suy hô hấp hoặc rối loạn chức năng tim (Moon J.M et al., *Hum Exp Toxicol.*, 30(10), 1720-1723, 2011). Loài *A. odora* được cho là có khả năng tăng cường sự hấp thụ và thẩm thấu của thuốc qua da trên mô hình chuột (Fuh YM et al., *Medicina* (Kaunas), 55(5), 121, 2019).

Các nghiên cứu trong nước cho thấy, loài *A. odora* thu hái tại Huế đã xác định được thành phần hoá học gồm alcaloit (dạng bazơ và dạng muối), phytosterol, chất béo, axit hữu cơ tự do, đường khử, steroid, saponin (Trương Thị Diệu Thuận và cs, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 6, 47-49, 2003). Trên mô hình *in vivo*, dịch chiết hỗn hợp dung môi metanol và cloroform từ thân rễ loài này có tác dụng hạ cholesterol toàn phần trong huyết thanh trên thỏ bị gây bệnh tăng cholesterol máu nội sinh thực nghiệm. Với liều phytosterol 30mg/kg, mức hạ cholesterol máu chưa rõ ràng. Với liều tương đương 60mg và 90mg

phytosterol/kg, mức hạ cholesterol máu so với lô chứng tương ứng là 48,99% và 37,17% (Lê Ngọc Kính, *Tạp chí Dược học*, 6, 17-19, 2007). Dịch chiết của cây Ráy dại có một số hoạt tính chống oxy hóa và góp phần làm lành da ở vết thương thông qua sự tăng sinh của nguyên bào sợi da (Viet L. D. et al., *Planta Med*, 72, 24, 2006).

Các loài khác trong chi *Alocasia* cũng được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Nghiên cứu thành phần hóa học cho thấy củ Ráy (*A. macrorrhiza*) chứa alcaloit, steroid, glucozit và các axit mạch dài với hoạt tính chủ đạo là gây độc tế bào ung thư (Huang W et al., *Phytochemistry*, 143, 81-86, 2017; Zhu L.H et al., *Chem Pharm Bull*, 60(5), 670-3, 2012). *A. cucullata* là một loài thảo dược thường được sử dụng để điều trị nhiễm trùng và ung thư theo cách điều chỉnh phản ứng miễn dịch. Dịch chiết nước của rễ cây này có thể làm giảm đáng kể sự phát triển khối u trong các mô hình khối u chuột và đồng thời có khả năng kích thích các xytokin chống ung thư chủ chốt như IL-2, IFN- $\gamma$  và TNF- $\alpha$  (Peng Q et al., *PLoS One*, 8(9), 2013). *A. indica* (Roxb.) Schott được có nghiên cứu nhiều nhất về gan. Khi nghiên cứu đánh giá tác dụng giải độc gan trên mô hình gan chuột bị tổn thương bởi rượu, kết quả đánh giá mô bệnh học cho thấy, ở liều 200 mg/kg và 400 mg/kg thể trọng dịch chiết cồn của củ *A. indica* các tế bào gan phục hồi lại bình thường sau 15 ngày, đồng thời thúc đẩy hoạt động của các enzym catalaza và superoxit disutaza trong cơ thể. Đánh giá hiệu quả của chiết xuất etanol của củ *A. indica* chống lại chiếu xạ gây ra độc tính buồng trứng và tử cung, với liều dùng cho chuột bạch tạng là 200 và 400 mg/kg trọng lượng cơ thể/ngày cho thấy tác dụng bảo vệ đối với tổn thương do tia phóng xạ gây ra, có tiềm năng trong ngăn ngừa vô sinh nữ (Prasad SK et al., *Int J Radiat Biol.*, 95(11), 1529-1542, 2019). Dịch chiết etanol của *A. indica* còn có khả năng chống nhiễm trùng, gây độc tế bào (Islam M.K et al., *J. Integr Med.*, 11(5), 343-51, 2013). Phân tích thành phần hóa học của *A. indica* thấy sự hiện diện của phytosterol, alcaloit, flavonoit, glycosit, saponin và tanin (Romeo C. Ongpoy, *J. of Asian Association of Schools of Pharmacy*, 6(1), 25-33, 2017). Bằng các phương pháp sắc ký, các hợp chất  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranozit và n-butyl- $\beta$ -D-fructopyranozit đã được phân lập từ bộ phận thân rễ, trong đó hợp chất n-butyl- $\beta$ -D-fructopyranozit lần đầu tiên phát hiện trong loài *A. macrorrhiza* của Việt Nam (Nguyễn Xuân Dũng và cs, *Tạp chí Dược học*, 12, 4-6, 2006). Các hoạt chất thuộc lớp chất cerebrosid là alocerebrosid A-D

cũng được phân lập từ loài thực vật này và thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định gram (+), gram (-) và nấm mạnh với giá trị MIC từ 12.5 – 50 µg/ml (Nguyễn Quyết Tiến, Nghiên cứu thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của cây ráy (*Alocasia macrorrhiza* (L.) schott, araceae, *Luận án Tiến sĩ*, 2004; Lành Thị Ngọc, Phân lập và xác định cấu trúc hóa học các thành phần có hoạt tính diệt tế bào ung thư và kháng vi sinh vật kiểm định từ cây Cỏ roi ngựa (*Verbena officinalis* L.) và cây Ráy (*Alocasia macrorrhizos* (L.) G. Don.), *Luận án Tiến sĩ*, 2012). Nhiều công trình nghiên cứu về hoạt tính của lớp chất cerebrosid cho thấy chúng có hoạt tính chống loét, kháng viêm, bảo vệ tế bào gan và ức chế các enzym liên quan đến chuyển hóa trong cơ thể. Khi nghiên cứu tác dụng hạ axit uric máu trên thực nghiệm của bài thuốc chuỗi hột và củ ráy *A. macrorrhiza* cho thấy trên chuột bình thường, ở liều 16g/kg có tác dụng làm giảm nồng độ axit uric máu là 25,32 % so với lô đối chứng; còn trên mô hình chuột gây tăng axit uric bằng kali oxalat, ở liều 8g/kg và 16g/kg có tác dụng làm giảm nồng độ axit uric máu tương ứng là 25,7 % và 20,57 % (Đào Thị Vui và cs, *Tạp chí dược học*, 428, 45-47, 2011).

Cây Ráy dại (*Alocasia odora* K. Koch), có giá trị sử dụng rất lớn trong cả ngành dược và nông nghiệp. Tuy nhiên, những nghiên cứu về thành phần hóa học, đặc biệt là lớp chất alcaloit và tác dụng dược lí của loài thực vật này đến nay rất ít. Theo Y học cổ truyền, củ Ráy dại có tác dụng tiêu viêm, tiêu độc, lợi tiểu, v.v. đều là một trong những tác dụng cần đạt được trong quá trình điều trị bệnh gút. Cho đến nay, chưa có công bố nào nghiên cứu về quy trình chiết hỗn hợp alcaloit từ loài thực vật này cũng như tác dụng ức chế enzym xanthin oxidaza của nó. Các kết quả nghiên cứu về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học sẽ là cơ sở để sử dụng chúng làm thuốc phục vụ sức khỏe cộng đồng một cách hiệu quả.

### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình chiết hỗn hợp alcaloit từ củ Ráy dại (*Alocasia odora* K. Koch) và hỗn hợp alcaloit thu được từ quy trình này có tác dụng ức chế enzym xanthin oxidaza.

Cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình chiết hỗn hợp alcaloit chứa ba hợp chất Alocasin A, Hyrtiosin B và Hyrtiosulawesine từ củ cây Ráy dại (*Alocasia odora* K. Koch), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu củ Ráy dại (*Alocasia odora* C. Koch) dưới dạng bột khô;

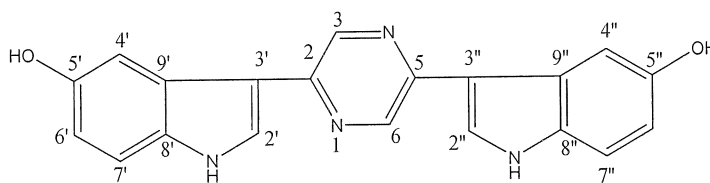
b) chiết bột củ Ráy đại bằng cách bổ sung bột thu được ở bước a) vào dung môi metanol (MeOH) trong điều kiện siêu âm;

c) thu cặn chiết MeOH bằng cách lọc lấy phần dịch ở bước b) và cất loại dung môi đến khối lượng không đổi;

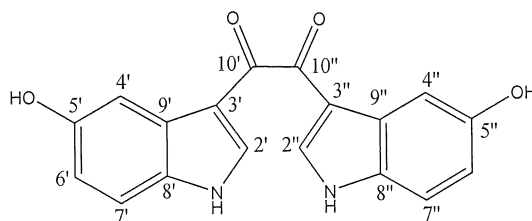
d) thu hỗn hợp alcaloit bằng cách tinh chế cặn chiết MeOH thu được ở bước c) trên cột sắc ký với chất hấp thụ là silica gel và hệ dung môi rửa giải là  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  theo tỉ lệ thể tích 9/1;

e) ba hợp chất Alocasin A, Hyrtiosin B và Hyrtiosulawesine thu được bằng cách tinh chế hỗn hợp alcaloit thu được ở bước d) trên cột Sephadex với dung môi  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  tỉ lệ 9/1.

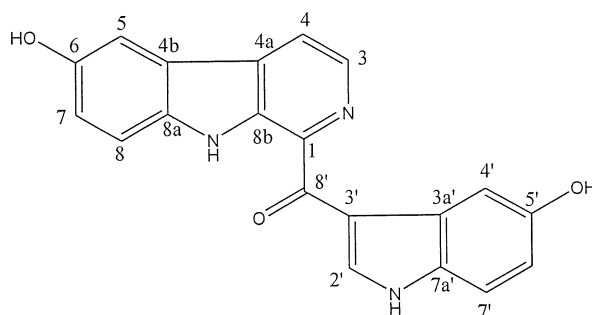
Công thức của ba hợp chất Alocasin A, Hyrtiosin B và Hyrtiosulawesine như sau:



**Alocasin A**



**Hyrtiosin B**



**Hyrtiosulawesine**

Mục đích khác của giải pháp hữu ích đề cập đến hỗn hợp alcaloit có tác dụng ức chế enzym xanthin oxidaza thu được từ quy trình trên, trong đó hỗn hợp này chứa ba hợp chất bao gồm Alocasin A, Hyrtiosin B và Hyrtiosulawesine.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

**Hình 1:** Quy trình chiết hỗn hợp alcaloit từ củ cây Ráy dại (*Alocasia odora* K. Koch).

**Hình 2:** Bảng dữ liệu phổ NMR của các hợp chất Alocasin A, Hyrtiosin B và Hyrtiosulawesine.

### Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp alcaloit chứa ba hợp chất Alocasin A, Hyrtiosin B và Hyrtiosulawesine từ củ cây Ráy dại (*Alocasia odora* K. Koch), trong đó quy trình này bao gồm các bước sau:

- a) củ Ráy dại (*Alocasia odora* C. Koch), sau khi loại bỏ tạp chất, rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ từ 50 đến 55°C và nghiền thành bột;
- b) ngâm bột khô thu được ở bước a) với dung môi MeOH theo tỉ lệ 1/3 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 30 đến 40 phút và nhiệt độ chiết từ 45 đến 50°C, thực hiện lặp lại 3 lần;
- c) lọc lấy phần dịch thu được từ bước b) và cất loại dung môi bằng máy cô quay dưới áp suất giảm đến khối lượng không đổi để thu cặn chiết MeOH;
- d) cặn chiết MeOH thu được ở bước c) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp thụ là silica gel và hệ dung môi rửa giải theo tỉ lệ thể tích là CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH từ 100/0 đến 0/100 thu được 8 phân đoạn chính F1-F8 (bảng 1);

**Bảng 1: Các phân đoạn của cột rửa MeOH**

STT	Phân đoạn	Tỉ lệ thể tích hệ dung môi
1	F1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 10/0
2	F2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 9/1
3	F3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 8/2



4	F4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 7/3
5	F5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 5/5
6	F6	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 3/7
7	F7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 1/9
8	F8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 0/10

e) phân đoạn F2 thu được ở bước d) được tinh chế trên cột Sephadex với hệ dung môi rửa giải là MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> theo tỉ lệ thể tích 9/1, thu được 6 phân đoạn nhỏ kí hiệu F2.1-F2.6, cô khô phân đoạn F2.3 thu được hỗn hợp có màu vàng;

Hỗn hợp được nghiên cứu thành phần hóa học, kết quả cho thấy hỗn hợp chứa ba chất hợp Alocasin A, Hyrtiosin B và Hyrtiosulawesine với hàm lượng lớn hơn 50 % tính theo tổng hàm lượng của hỗn hợp.

Một khía cạnh khác của giải pháp hữu ích là đề cập đến hỗn hợp alcaloit chứa ba hợp chất Alocasin A, Hyrtiosin B và Hyrtiosulawesine thu được từ quy trình trên có tác dụng ức chế enzym xanthin oxidaza. Kết quả thử nghiệm cho thấy, hỗn hợp này có hoạt tính ức chế enzym XO mạnh với giá trị IC<sub>50</sub> là 18.56±1.2 µg/ml. Những cao chiết hoặc phân đoạn có giá trị IC<sub>50</sub> < 100 µg/ml được coi là dược liệu có tiềm năng trong việc điều trị Gút. Chất tham khảo Allopurinol thể hiện tác dụng ức chế enzym với giá trị IC<sub>50</sub> là 2.45±0.18 µg/ml.

#### **Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích**

Sau đây, giải pháp hữu ích được minh họa bằng các ví dụ cụ thể, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích làm rõ, nhưng không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của giải pháp này.

Điểm nóng chảy được đo bằng máy đo điểm nóng chảy hiệu Boetius. Phổ khối phun mù electron (ESI-MS) được đo trên máy ghi phổ khối Agilent 1100. Các phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân hiệu Bruker Avance 500 MHz với TMS là chất chuẩn nội. Sắc ký cột được thực hiện trên chất mang là silica gel và sephadex LH-20. Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng silicagel Merck 60 F254, dày 0,25 mm.

Các hóa chất được sử dụng gồm: enzym xanthin oxidaza (X18775-sigma), cơ chất xanthin (X7375-sigma), axit HCl (Merk), chất tham chiếu Allopurinol (E713-AK scientific). Độ hấp thụ quang được (OD) đo trên máy quang phổ Biotech Epoch 2.

*Ví dụ 1: Quy trình chiết hỗn hợp alcaloit từ củ cây Ráy dại (Alocasia odora)*

- a) Củ tươi (20 kg) cây Ráy dại (*Alocasia odora* C. Koch) thu hái tại Na Hang - Tuyên Quang được loại bỏ tạp chất, rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ từ 50 đến 55°C và nghiền thành bột ;
- b) ngâm bột khô (1,7 kg) thu được ở bước a) với dung môi MeOH theo tỉ lệ 1/3 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 30 đến 40 phút và nhiệt độ chiết từ 45 đến 50°C, thực hiện lặp lại 3 lần;
- c) lọc lấy phần dịch MeOH (5 lít) thu được từ bước b) và cất loại dung môi bằng máy cô quay dưới áp suất giảm đến khối lượng không đổi để thu cặn chiết MeOH;
- d) cặn chiết MeOH (120 g) thu được ở bước c) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp thụ là silica gel và hệ dung môi rửa giải theo tỉ lệ thể tích là CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH từ 100/0 đến 0/100 thu được 8 phân đoạn chính F1-F8 (bảng 2);

**Bảng 2: Các phân đoạn của cột cặn MeOH**

STT	Phân đoạn	Tỉ lệ thể tích hệ dung môi	Khối lượng các phân đoạn (gram)
1	F1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 10/0	26.5
2	F2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 9/1	11.0
3	F3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 8/2	10.5
4	F4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 7/3	9.8
5	F5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 5/5	12.3
6	F6	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 3/7	10.5
7	F7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 1/9	15.8
8	F8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 0/10	21.5

- e) phân đoạn F2 (11.0 g) thu được ở bước d) được tinh chế trên cột Sephadex với hệ dung môi rửa giải là MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> theo tỉ lệ thể tích 9/1, thu được 6 phân đoạn nhỏ kí hiệu F2.1-F2.6 (bảng 3), cô khô phân đoạn F2.3 (90 mg) thu được hỗn hợp có màu vàng;

**Bảng 3: Các phân đoạn nhỏ của F2**

STT	Phân đoạn	Tỉ lệ thể tích hệ dung môi	Khối lượng các phân đoạn (mg)
1	F2.1	MeOH/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 9/1	200
2	F2.2		180
3	F2.3		90
4	F2.4		210
5	F2.5		105
6	F2.6		250

*Ví dụ 2: Tinh chế ba hợp chất Alocasin A, Hyrtiosin B và Hyrtiosulawesine từ hỗn hợp alcaloit*

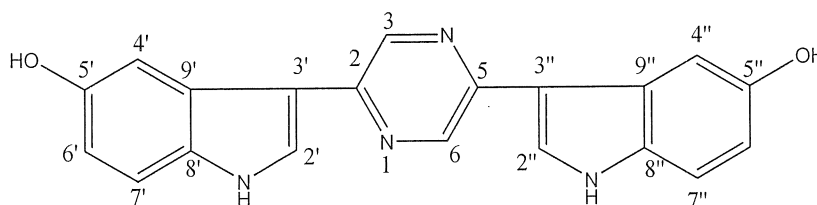
Tinh chế 40 mg phân đoạn F2.3 thu được ở trên bằng sắc ký bản mỏng điều chế với hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH tỉ lệ 9/1, thu được 8 mg hợp chất (1) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt, 6 mg hợp chất (2) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt và 7 mg hợp chất (3) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt.

Cấu trúc hóa học của các hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ NMR 1D và 2D và phổ khối lượng ESI-MS. Hợp chất (1) được xác định là Alocasin A, hợp chất (2) được xác định là Hyrtiosin B và hợp chất (3) được xác định Hyrtiosulawesine.

**- Hợp chất 1: Alocasin A**

CTPT: C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>

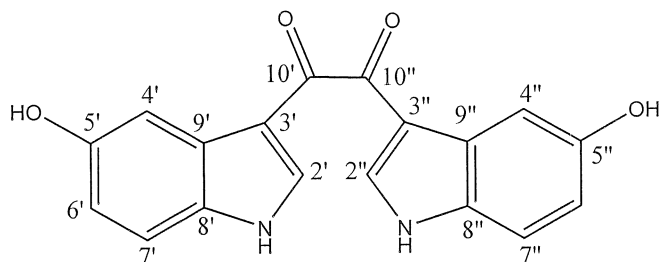
ESI-MS *m/z*: 375 [M+ H]<sup>+</sup>



**- Hợp chất 2: Hyrtiosin B**

CTPT: C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>

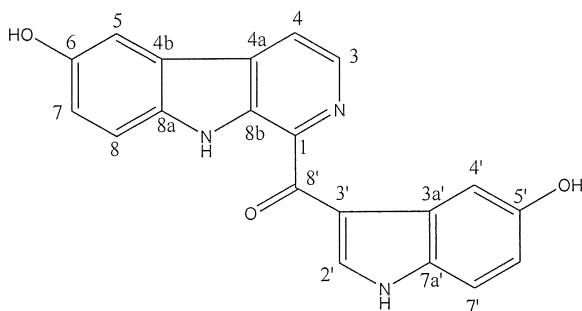
ESI-MS *m/z*: 391 [M+ H]<sup>+</sup>



- **Hợp chất 3:** Hyrtiosulawesine

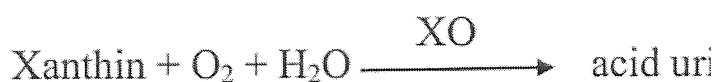
CTPT: C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>

ESI-MS *m/z*: 391 [M+ H]<sup>+</sup>



*Ví dụ 3:* Đánh giá tác dụng ức chế enzym xanthin oxidaza của hỗn hợp alkaloit thu được từ củ Ráy dại (*Alocasia odora* K. Koch)

Nguyên lý phép thử : enzym xanthin oxidaza (XO) xúc tác cho quá trình oxy hóa xanthin thành axit uric:



Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế xanthin oxidaza được triển khai theo phương pháp của Noro (Noro. T et al, *Chem. Pharm. Bull.*, 1983, 31: 3984-3987; *Tran Dang Xuan, Medicines* 2019, 6, 20) trên đĩa 96 giếng và được điều chỉnh cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

#### Tiến hành thí nghiệm

Trên mỗi đĩa 96 giếng gồm có: Hỗn hợp phản ứng ban đầu gồm 115  $\mu\text{L}$  chứa đệm PBS (70 mM, pH 7,5), enzym XO (0,04 U/ml) và các nồng độ khác nhau của chất thử (128  $\mu\text{g/ml}$ , 32  $\mu\text{g/ml}$ , 8  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  và 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) được ủ ở nhiệt độ phòng (25°C) trong 30 phút. Sau đó, phản ứng được bổ sung 60  $\mu\text{L}$  xanthin 150  $\mu\text{M}$  và được tiếp tục ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Dừng phản ứng bằng 25

$\mu\text{L}$  HCl 1N. Hỗn hợp phản ứng sau cùng được đo độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 290 nm. Allopurinol được dùng là chất tham chiếu.

Đánh giá kết quả: Tính I (% ức chế) theo công thức:

$$I (\%) = (\Delta\text{OD}_c - \Delta\text{OD}_t) / \Delta\text{OD}_c \times 100$$

trong đó:  $\Delta\text{OD}_c = \text{OD}_{\text{chứng}} - \text{OD}_{\text{trắng chứng}}$ ;  $\Delta\text{OD}_t = \text{OD}_{\text{thử}} - \text{OD}_{\text{trắng thử}}$

Phương pháp xử lý số liệu:

Các số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và tính trung bình I% ở các nồng độ khảo sát bằng Microsoft Excel. Giá trị  $\text{IC}_{50}$  được tính toán dựa vào giá trị I%.

Hỗn hợp thu được được đánh giá hoạt tính ức chế enzyme xanthin oxidaza. Kết quả cho thấy hỗn hợp này có tác dụng ức chế enzyme xanthin oxidaza mạnh với giá trị  $\text{IC}_{50}$  là  $18.56 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ . Những cao chiết có giá trị  $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$  được coi là dược liệu có tiềm năng trong việc điều trị gút. Chất tham khảo Allopurinol thể hiện tác dụng ức chế enzyme với giá trị  $\text{IC}_{50}$  là  $2.45 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$  (bảng 4).

**Bảng 4. Hoạt tính ức chế enzyme XO của hỗn hợp alkaloid từ củ Ráy dại**

Tên chất thử	Nồng độ thử ( $\mu\text{g/ml}$ )	% ức chế hoạt động enzyme XO
Hỗn hợp theo sáng chế	128	90
	32	64
	8	39
	2	15
	0.5	8
	<b><math>\text{IC}_{50}</math></b>	<b><math>18.56 \pm 1.2</math></b>
Chất tham khảo Allopurinol	128	100
	32	95
	8	87
	2	47
	<b><math>\text{IC}_{50}</math></b>	<b><math>2.45 \pm 0.18</math></b>

**Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Quy trình theo giải pháp hữu ích đã thu nhận được hỗn hợp alcaloit gồm ba hợp chất Alocasin A, Hyrtiosin B và Hyrtiosulawesine từ củ cây Ráy dại (*Alocasia odora* K. Koch). Quy trình được thực hiện đơn giản và hiệu quả với hàm lượng alcaloit lớn hơn 50% tính theo tổng hàm lượng của hỗn hợp thu được. Hỗn hợp này thể hiện tác dụng ức chế enzym xanthin oxidaza mạnh với giá trị  $IC_{50}$  là  $18.56 \pm 1.2$   $\mu\text{g/ml}$ , là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm phát triển và sử dụng hỗn hợp này trong hỗ trợ điều trị bệnh gút.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chiết hỗn hợp alcaloit có tác dụng ức chế enzym xanthin oxidaza từ củ cây Ráy dại (*Alocasia odora* K. Koch), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) củ Ráy dại (*Alocasia odora* C. Koch), sau khi loại bỏ tạp chất, rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ từ 50 đến 55<sup>0</sup>C và nghiền thành bột;

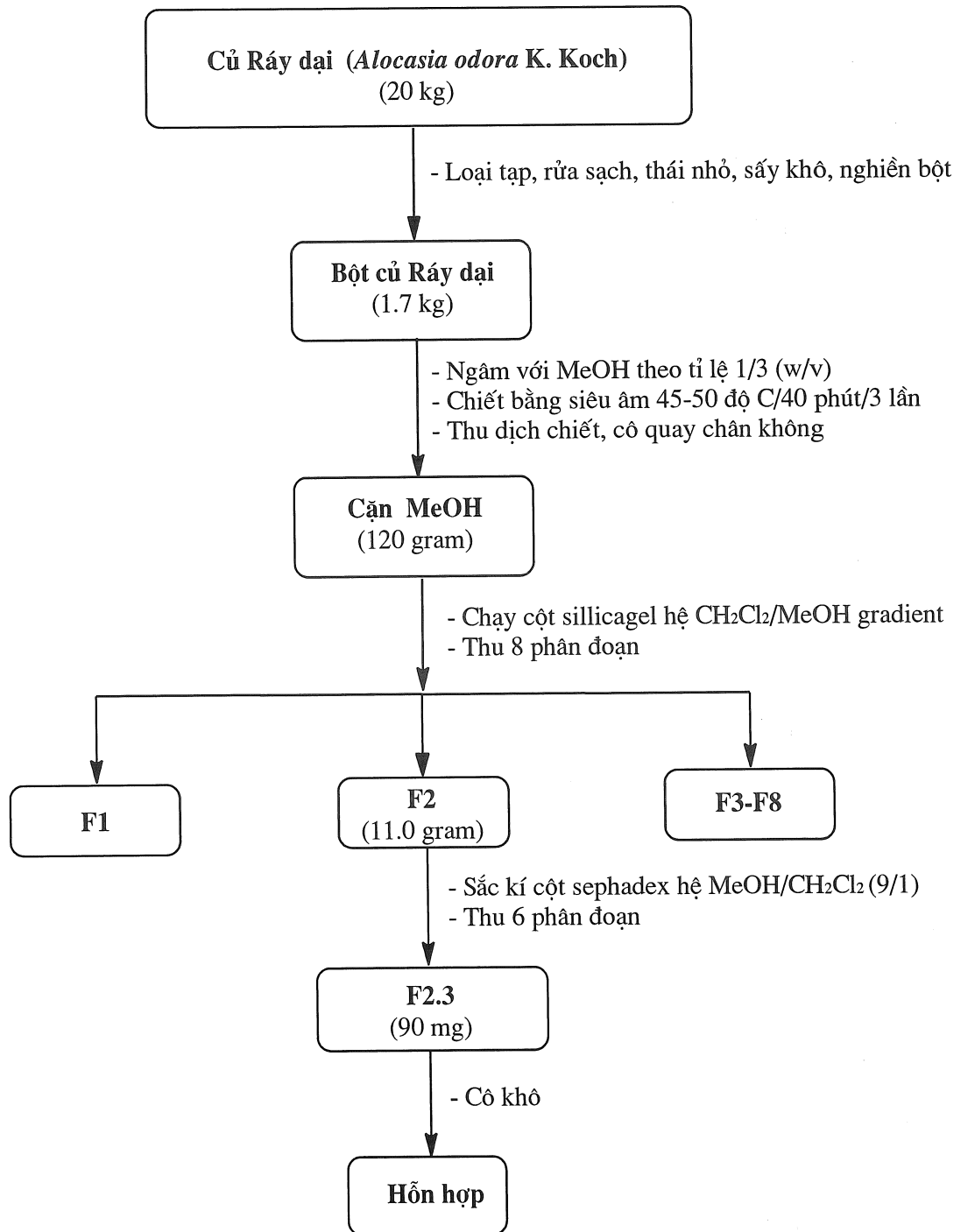
b) ngâm bột khô thu được ở bước a) với dung môi metanol (MeOH) theo tỉ lệ 1/3 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 30 đến 40 phút và nhiệt độ chiết từ 45 đến 50<sup>0</sup>C, thực hiện lặp lại 3 lần;

c) lọc lấy phần dịch MeOH thu được từ bước b) và cất loại dung môi bằng máy cô quay dưới áp suất giảm đến khối lượng không đổi để thu cặn chiết MeOH;

d) cặn chiết MeOH thu được ở bước c) được đưa lên cột sắc ký với chất hấp thụ là silica gel và hệ dung môi rửa giải theo tỉ lệ thể tích là CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH từ 100/0 đến 0/100 thu được 8 phân đoạn chính F1-F8; và

e) phân đoạn F2 thu được ở bước d) được tinh chế trên cột Sephadex với hệ dung môi rửa giải là MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> theo tỉ lệ thể tích 9/1, thu được 6 phân đoạn nhỏ kí hiệu F2.1-F2.6, cô khô phân đoạn F2.3 thu được hỗn hợp alcaloit chứa ba hợp chất Alocasin A, Hyrtiosin B và Hyrtiosulawesine với hàm lượng lớn hơn 50% tính theo tổng hàm lượng của hỗn hợp.

Hình 1





Hình 2

	Hợp chất Alocasin A		Hợp chất Hyrtiosin B		
C	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm), $J$ (Hz)	
2, 5	148,4				
3, 6	141,5	8,96 s			
2', 2''	126,7	7,92 s	138,5	8,04 s	
3', 3''	113,9		114,2		
4', 4''	106,2	7,74 d (2,0)	107,5	7,78 d (2,5)	
5', 5''	152,8	-	155,0		
6', 6''	113,3	6,81 d (2,0; 8,5)	114,5	6,85 dd (2,5; 8,5)	
7', 7''	113,2	7,31 d (8,5)	113,7	7,34 d (8,5)	
8', 8''	133,6		132,9		
9', 9''	127,4		128,5		
10', 10''			191,2		
Hợp chất Hyrtiosulawesine					
C	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm) $J$ (Hz)	C	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm), $J$ (Hz)
1	140,4		8b	137,4	
3	137,4	8,45 d (5,0)	2'	139,1	8,91 s
4	118,	8,18 d (5,0)	3'	116,1	
4a	132,5		3'a	129,8	
4b	122,6		4'	108,0	8,04 d (2,5)
5	106,8	7,60 d (2,0)	5'	154,4	
6	152,6		6'	113,9	6,84 dd (2,5; 8,5)
7	119,9	7,16 dd (2,5; 8,5)	7'	113,3	7,35 d (8,5)
8	113,9	7,57 d (8,5)	7'a	132,4	
8a	137,5		8'	189,9	