

(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)



1-0037859

(51)^{2020.01} **A61K 36/82**; C07H 17/04; C07G 3/00;
A61P 39/06; C07D 311/00

(13) **B**

(21) 1-2020-01291

(22) 06/03/2020

(45) 25/12/2023 429

(43) 27/07/2020 388

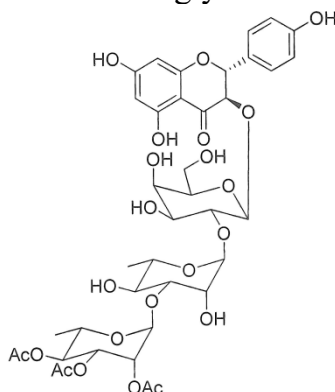
(73) Hợp tác xã Bảo tồn và Phát triển du lịch Sóc Sơn (VN)

Phúc Xuân, Xã Bắc Sơn, Huyện Sóc Sơn, Thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thanh Tuyền (VN); Trần Văn Hiệu (VN); Phạm Gia Điền (VN); Vũ Đình Hoàng (VN); Trần Thị Thu Thủy (VN); Nguyễn Thị Minh Hằng (VN).

(54) HỢP CHẤT FLAVONOIT GLYCOSIT VÀ PHƯƠNG PHÁP CHIẾT HỢP CHẤT NÀY TỪ LÁ CÂY TRÀ HOA VÀNG (CAMELLIA HAKODAE)

(57) Sáng chế đề cập hợp chất flavonoid glycoside có công thức (I):



(I)

Hợp chất flavonoid glycoside thu được theo sáng chế là hợp chất (2*R*,3*R*)-Dihydrokaempferol 3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-

Dihydrokaempferol 3-O-[2,3,4-tri-O-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-galactopyranoside (hakodoside A) có công thức (I). Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất hakodoside A từ lá cây trà hoa vàng *Camellia hakodae*. Hợp chất flavonoid glycoside này theo sáng chế thể hiện hoạt tính tiêu sợi huyết (tan huyết khối), kháng sinh và gây độc tế bào ung thư. Phương pháp theo sáng chế rất hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các dược phẩm hỗ trợ phòng chống bệnh đột quỵ, ung thư và nhiễm khuẩn mà có chứa các hợp chất này cũng như các dẫn xuất của chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất thiên nhiên có nguồn gốc từ thực vật có hoạt tính sinh học để sử dụng trong việc hỗ trợ và điều trị bệnh. Cụ thể, sáng chế đề cập đến c hợp chất mới dạng khung flavonoid glycoside có tên gọi là hakodoside A được phân lập từ lá cây trà hoa vàng *Camellia hakodae*. Hợp chất này thể hiện hoạt tính tan sợi huyết (tan huyết khối), kháng sinh và gây độc tế bào ung thư. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp chiết hợp chất flavonoid glycoside này từ lá cây trà hoa vàng *Camellia hakodae*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc sử dụng các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên làm thuốc chữa bệnh đã và đang được quan tâm bởi sự đa dạng về cấu trúc, hoạt tính sinh học cũng như độc tính thấp của chúng.

Trà hoa vàng là tên gọi chung của các loài trà thuộc chi *Camellia* có hoa màu vàng. Chúng còn có tên gọi khác là kim hoa trà được mệnh danh là nữ hoàng của các loại trà. Xưa kia, trà hoa vàng chỉ được dùng cho vua chúa không chỉ vì tác dụng tốt cho sức khỏe mà cây trà hoa vàng còn được trồng trong lâm viên của vua chúa vì sự thanh tao và vẻ đẹp quyến rũ của nó.

Trà hoa vàng là loại trà rừng, mọc hoang dại ở khắp các tỉnh miền núi phía Bắc nước ta. Trà hoa vàng thường mọc nhiều ở các tỉnh Quảng Ninh, Lạng Sơn, Bắc Giang, Yên Bái, Phú Thọ, Hòa Bình...Hiện nay, nguồn dược liệu trà hoa vàng ngoài tự nhiên còn rất ít do thời gian trước đây người dân không biết được giá trị của cây trà này nên đã chặt phá làm rẫy hoặc bán rẻ cho thương lái Trung Quốc. Tuy nhiên trong một vài năm gần đây người dân đã biết được giá trị kinh tế cực cao của loài cây này, nhà nước cũng đã có hướng bảo tồn, phát triển nên nguồn dược liệu này đã có những bước phát triển khá tốt. Nhiều hộ dân cũng đã nhân giống thành công giúp tăng sản lượng trà hoa vàng cung cấp cho thị trường thế giới.

Theo đánh giá của các nhà khoa học Mỹ, Nhật Bản và nhiều quốc gia khác trên thế giới tất cả các bộ phận của cây trà hoa vàng gồm: Lá, búp non và hoa đều được sử dụng làm thuốc. Là loại trà quý, không chỉ mang những công dụng trong điều trị bệnh, trà hoa vàng còn dùng để phòng bệnh và tăng cường sức khỏe. Do vậy các chuyên gia

sức khỏe luôn khuyên chúng ta cho dù là người có bệnh hay người bình thường không bệnh tật nếu có điều kiện hãy luôn sử dụng kim hoa trà hàng ngày. Trà hoa vàng có vị ngọt, mùi thơm, tính bình. Vào 3 kinh tâm, can, thận. Lá trà hoa vàng có thể uống thường xuyên để điều chỉnh các chất béo trong cơ thể, lượng đường trong máu, giải độc gan và thận rất hiệu quả.

Các nghiên cứu về các loài trà hoa vàng trên thế giới cho biết các hợp chất flavonoid và dẫn xuất của chúng là thành phần chủ yếu của các loài trà *Camellia*, cho đến nay đã có khoảng trên 200 hợp chất được phân lập từ các loài thuộc chi này [J. Agric. Food Chem., 67(19), 5318-5349 (2019)].

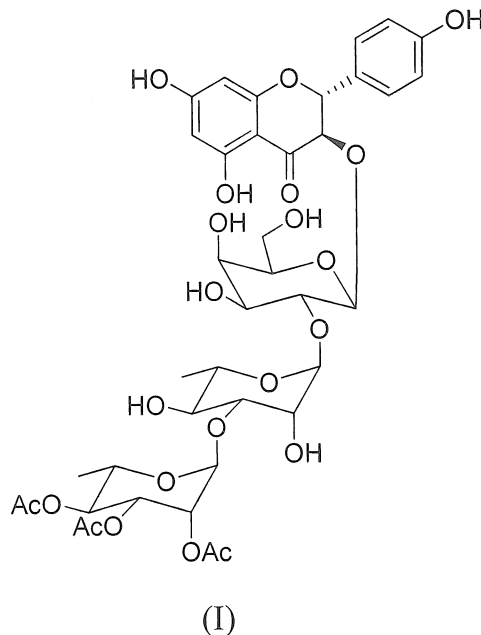
Trà hoa vàng *Camellia hakodae* là một trong số 20 loài trà hoa vàng chỉ được tìm thấy ở Việt Nam và đã được nhân giống thành nhiều hecta, trồng và bảo tồn theo hướng hữu cơ tại huyện Sóc Sơn, thành phố Hà Nội. Đây là loài trà có giá trị dinh dưỡng cao, tuy nhiên còn chưa được nghiên cứu. Cho đến nay, trên thế giới cũng như ở Việt Nam mới chỉ có duy nhất một công trình nghiên cứu của chính nhóm tác giả sáng chế này về thành phần flavonoid của hoa trà hoa vàng *Camellia hakodae*. [Nat. Prod. Commun., 14(9), 1-4 (2014)]. Lá trà hoa vàng *Camellia hakodae* còn chưa được nghiên cứu cả về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học.

Flavonoid là một lớp các chất chuyển hóa thứ cấp có cấu trúc dạng polyphenolic quan trọng của các sản phẩm tự nhiên được tìm thấy rộng rãi trong trái cây, rau và một số đồ uống như trà, ca cao. Flavonoid thường được tìm thấy dưới dạng glycosyl hóa hoặc ester hóa. Rất nhiều nghiên cứu đã chứng minh về tác dụng chống vi-rút, vi khuẩn, chống viêm, bảo vệ tim mạch, chống tiểu đường, chống ung thư, chống lão hóa của các hợp chất flavonoid. Do các đặc tính chống oxy hóa, chống viêm, chống đột biến và chống ung thư của chúng cùng với khả năng điều chỉnh các chức năng enzyme chính của tế bào, flavonoid là thành phần không thể thiếu trong một loạt các sản phẩm dinh dưỡng, dược phẩm và mỹ phẩm. Chúng cũng được biết đến là chất ức chế mạnh đối với một số enzyme, chẳng hạn như xanthine oxyase (XO), cyclo-oxyase (COX), lipoxygenase và phosphoinositide 3-kinase. [J. Nutr. Sci., 5(e47), 1-15 (2016), Asian journal of pharmaceutical sciences, 13, 12-23 (2018)].

Sáng chế này đề cập việc phân lập và xác định được các hợp chất mới thuộc khung flavonoid glycoside góp phần làm sáng tỏ tác dụng chữa bệnh của cây trà hoa vàng *Camellia hakodae*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất flavonoid glycoside được phân lập từ lá cây trà hoa vàng *Camellia hakodae*, có công thức cấu tạo (I):



Hợp chất flavonoid glycoside thu được theo sáng chế là hợp chất (2*R*,3*R*)-dihydrokaempferol 3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-α-*L*-rhamnopyranosyl-(1→3)-α-*L*-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-*D*-galactopyranoside (còn được gọi là hakodoside A, công thức I). Hợp chất hakodoside A thể hiện hoạt tính tan sợi huyết (tan huyết khối) và hoạt tính kháng sinh và hoạt tính gây độc tế bào đối với một số dòng tế bào ung thư.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp phân lập hợp chất flavonoid glycoside này từ lá cây trà hoa vàng *Camellia hakodae*. Phương pháp theo sáng chế là đơn giản, dễ thực hiện và cho hiệu suất tương đối cao.

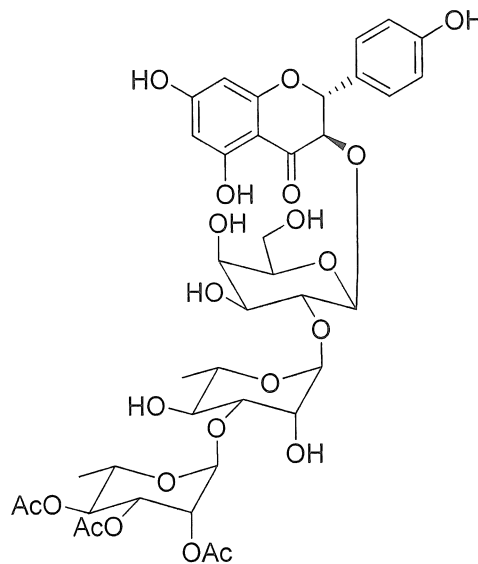
Mô tả chi tiết sáng chế

Các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học trong các loại thực vật bậc cao thường nằm trong hỗn hợp của rất nhiều chất. Do đó, để phân lập các hợp chất có hoạt tính sinh học này cần kết hợp sử dụng các phương pháp chiết, sắc kí và phân tích.

Phương pháp chiết có ảnh hưởng quan trọng đến việc chiết xuất các hợp chất thuộc các lớp chất mong muốn ở trong mẫu thực vật. Trong sáng chế này, các tác giả sáng chế đã sử dụng kết hợp các phương pháp phân tích và phân tách như sắc kí lớp mỏng (TLC) thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn của hãng Merck, sắc ký cột (CC) với các chất nhồi hấp thụ pha thường, Silica gel (Merck).

Nguyên liệu dùng cho quy trình phân lập các hợp chất flavonoid glycoside theo sáng chế được sử dụng ưu tiên là phần lá của cây trà hoa vàng *Camellia hakodae*.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất flavonoid glycoside là hakodoside A có công thức (I) :



(I)

Tên khoa học theo IUPAC: (2*R*,3*R*)-Dihydrokaempferol 3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-galactopyranoside

Công thức phân tử: $C_{39}H_{48}O_{22}$

Khối lượng phân tử: 868,2;

Thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình, màu vàng nhạt;

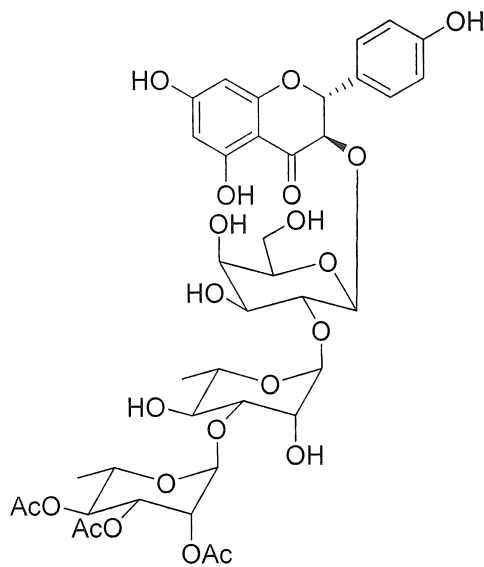
+ Phổ khối lượng HR-ESI-MS: m/z 869,2697 $[M+H]^+$.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chiết hợp chất flavonoid glycoside này từ lá cây trà hoa vàng *Camellia hakodae*. Phương pháp này bao gồm các bước:

(i) thu gom mẫu lá cây trà hoa vàng *Camellia hakodae*, rửa sạch, phơi khô và sau đó nghiền nhỏ thành bột bằng máy nghiền, tiếp đó ngâm chiết bột này bằng dung môi rượu etylic 96% 3 lần, mỗi lần trong 24 giờ (tỷ lệ 3 lít dung môi trên 1 kg nguyên liệu);

(ii) gộp các dịch chiết trong rượu etylic thu được ở bước (i) lại, lọc bằng giấy lọc và cất để loại bỏ hoàn toàn dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết rượu etylic, ký hiệu là dịch cô A;

- (iii) hòa tan dịch cô A với hòa tan dịch cô A với nước cất (tỷ lệ 1 lít dung môi trên 100 g dịch) rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi ethyl axetat và rượu butylic, mỗi dung môi chiết 3 lần (tỷ lệ dung môi/dịch nước 1:1 theo thể tích), dịch rượu butylic sau khi chiết được tiến hành cô cạn dưới áp suất giảm thu được dịch cô rượu butylic, ký hiệu là dịch cô B;
- (iv) dịch cô B được hòa tan trong rượu metylic (tỷ lệ 4 ml dung môi trên 1 g dịch) rồi tẩm lên silica gel (tỷ lệ silica gel/dịch 3:1 theo khối lượng) và được tiến hành phân tách bằng cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha thường, rửa giải theo phương pháp gradient nồng độ hệ dung môi diclometan:rượu metylic theo tỷ lệ về thể tích 1:0, 1:2, 2:3, 3:4, 4:5, 5:6 và 0:1 thu được 7 phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt từ B-1 đến B-7;
- (v) phân đoạn B-2 thu được ở bước (iv) được phân lập trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ B-2/silica gel về khối lượng 1/20) và rửa giải theo phương pháp gradient nồng độ hệ dung môi diclometan:rượu metylic theo tỷ lệ về thể tích 1:0, 1:2, 1:1, 4:5 và 0:1 thu được hợp chất (2*R*,3*R*)-Dihydrokaempferol 3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-galactopyranoside (hakodoside A) có công thức (I);



(I)

Ưu điểm của phương pháp chiết tách theo sáng chế là đơn giản, dễ thực hiện và cho phép phân lập được hợp chất hakodoside A tinh khiết ra khỏi hỗn hợp của nhiều chất từ lá cây trà hoa vàng *Camellia hakodae*.

Hợp chất hakodoside A được thử nghiệm hoạt tính sinh học và kết quả cho thấy hợp chất này có hoạt tính tiêu sợi huyết (tiêu huyết khối), kháng sinh và có tác dụng gây độc đối với một số dòng tế bào ung thư. Hợp chất hakodoside A chưa từng được phát hiện trong lá trà hoa vàng *Camellia hakodae*, cũng như các nguồn gốc khác, đồng thời chưa từng được công bố trong bất kỳ ấn phẩm nào trước đây. Việc phân lập được hợp chất tinh khiết có hoạt tính đáng quý nêu trên mở ra hướng nghiên cứu mới trong việc sử dụng lá trà hoa vàng *Camellia hakodae* làm nguồn nguyên liệu để tạo ra chế phẩm có khả năng hỗ trợ phòng chống các bệnh nhiễm khuẩn, ung thư và đột quỵ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập hợp chất hakodoside A từ lá cây trà hoa vàng Camellia hakodae.

- (i) thu gom 10 kg mẫu lá trà hoa vàng *Camellia hakodae*, rửa sạch, phơi khô thu được 3 kg nguyên liệu khô và sau đó nghiền nhỏ thành bột bằng máy nghiền. Ngâm chiết bột này bằng 9 lít dung môi rượu etylic 96% trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rút cạn dung môi ngâm, lặp lại quá trình chiết như trên để thu được 3 lần dịch ngâm chiết;
- (ii) gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được ở bước (i) lại, lọc bằng giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được 120 g cặn chiết trong rượu etylic, ký hiệu là dịch cô A;
- (iii) hòa tan 120 g cặn tổng A với 1200 mL nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi etyl axetat và rượu butylic, mỗi dung môi chiết 3 lần, mỗi lần 1200 mL dung môi, dịch rượu butylic sau khi chiết được tiến hành cô cạn dưới áp suất giảm thu được 30 g dịch cô rượu butylic, ký hiệu là dịch cô B;
- (iv) dịch cô B được hòa tan trong 120 mL rượu metylic rồi tẩm lên 90 g silica gel và được tiến hành phân tách bằng cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha thường, rửa giải theo phương pháp gradient nồng độ hệ dung môi diclometan:rượu metylic theo tỉ lệ về thể tích 1:0, 1:2, 2:3, 3:4, 4:5, 5:6 và 0:1 thu được 7 phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt từ B-1 đến B-7;
- (v) 4,0 g phân đoạn B-2 thu được ở bước (iv) được phân lập trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ B-2/silica gel về khối lượng 1/20) và rửa giải theo phương pháp gradient nồng độ hệ dung môi diclometan:rượu metylic theo tỉ lệ về thể tích 1:0, 1:2, 1:1, 4:5 và 0:1 thu được hợp chất (2*R*,3*R*)-Dihydroxykaempferol 3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-

acetyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-galactopyranoside (hakodoside A).

Bảng 1. Số liệu phổ NMR của hợp chất hakodoside A (I)

No.	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (dạng pic, $J = \text{Hz}$)	No.	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (dạng pic, $J = \text{Hz}$)
2	83,4	5,23 (d, 10,5)	5''	71,1	3,34 (m)
3	80,6	4,57 (d, 10,5)	6''	62,2	3,70-3,75 (m)
4	195,5	-	Rha-1		
5	165,5	-	1'''	104,1	4,27 (d, 8,0)
6	96,5	5,93 (brs)	2'''	74,2	3,34
7	169,2	-	3'''	78,6	3,52 (t, 9,0)
8	96,5	5,92 (brs)	4'''	78,4	3,37
9	164,0		5'''	70,7	4,18 (q, 6,0)
10	101,8		6'''	17,7	1,22 (d, 6,0)
1'	128,7	-	Rha-2		
2'	130,1	7,38 (d, 8,0)	1'''	98,8	5,37 (overlap)
3'	116,6	6,89 (d, 8,0)	2'''	70,8	5,37
4'	159,2	-	3'''	71,1	5,37
5'	116,6	6,89 (d, 8,0)	4'''	72,4	5,01(t, 10,0)
6'	130,1	7,38 (d, 8,0)	5'''	67,9	4,43 (q, 6,0)
Gal-1			6'''	17,95	1,17 (d, 6,0)
1''	102,4	4.64 (brs)	OAc	20,6 171,7	1,97 (s)
2''	80,8	3.67 (m)	OAc	20,6 171,8	2,08 (s)
3''	71,7	3,80 (dd, 3,0; 10,0)	OAc	20,7 172,0	2,13 (s)
4''	77,3	3,17 (m)			

a) Đo trong CD₃OD, ^{b)}125MHz, ^{c)}500 MHz

Ví dụ 2: Thử nghiệm hoạt tính tiêu sợi huyết của hợp chất hakodoside A

Vật liệu:

Bovine fibrinogen, thrombin from bovine plasma (Sigma)

Máy móc và các thiết bị cần thiết khác

Phương pháp:

Hoạt tính sinh học của chế phẩm được xác định theo phương pháp đĩa fibrin của Astrup và cs (1952) sử dụng plasmin (yếu tố thủy phân fibrin có sẵn trong cơ thể người) làm chuẩn.

Nguyên tắc: Dựa trên sự thủy phân fibrin của chế phẩm tạo vòng tròn trong suốt. Đo đường kính, tính diện tích vòng phản ứng. Hoạt tính thủy phân fibrin của mẫu được xác định dựa trên đường chuẩn plasmin.

Chuẩn bị đĩa: Mỗi đĩa petri đường kính 10 cm chứa 10 ml dung dịch fibrinogen tinh khiết trong NaCl 0,9% (nồng độ 0,2%) được ngưng kết bằng 15 μ l thrombin (100 UI/ml). Chú ý, đĩa đặt ở vị trí phẳng, dung dịch được đổ cho đồng đều, tránh tạo bọt khí. Đĩa được để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ để fibrin đông tụ hoàn toàn.

Chuẩn bị mẫu: Mẫu được hòa tan vào DMSO với nồng độ 100 mg/1ml. Mẫu tan hoàn toàn.

Ủ phản ứng: Nhỏ từng giọt 10 μ l dịch mẫu lên đĩa (giọt phải tròn), ủ 37°C trong 5 giờ. Khi đông tụ, fibrin có màu trắng đục, do đó, các vùng bị thủy phân trở nên trong suốt, dễ dàng quan sát bằng mắt thường. Sau 5 giờ, đo đường kính, tính diện tích vòng phản ứng. Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần để lấy giá trị trung bình.

Kết quả:

Hợp chất hakodoside A thể hiện tác dụng thủy phân fibrin với độ hoạt động là $2,0 \pm 0,15$ IU/mg.

Bảng 2. Kết quả thử tác dụng thủy phân fibrin của hakodoside A và B

Stt	Mẫu thử	Đơn vị enzyme	Kết Quả
1	Hakodoside A	IU/mg	$2,0 \pm 0,15$

Như vậy hợp chất hakodoside A có tác dụng làm tiêu sợi huyết (tan huyết khối).

Ví dụ 3: Thử nghiệm hoạt tính kháng sinh (kháng vi sinh vật kiểm định)

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ của (Hadacek F, Greger H., 2000). Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng VSVKĐ và nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các

mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là **MIC** (nồng độ ức chế tối thiểu). Mẫu ban đầu được pha loãng trong DMSO ở dải nồng độ giảm dần: 256µg/ml, 128µg/ml, 64µg/ml, 32µg/ml, 16µg/ml, 8µg/ml, 4µg/ml và 2µg/ml với số thí nghiệm lặp lại N=3.

Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn hoặc nấm với nồng độ 2.10^4 CFU/ml: Hút 50 µl dịch vi khuẩn hoặc nấm trong ống giữ chủng được lấy từ -80°C cho vào bình 125 ml chứa 25 ml môi trường LB lỏng ủ trong 37°C qua đêm cho đến khi đạt OD = 2. Sau đó hút 2 ml dịch OD = 2.0 vào ống chứa 15 ml môi trường LB lỏng đặt tại nhiệt độ phòng cho tới khi OD = 1.0. Tiếp đó hút 2 ml dịch từ OD = 1.0 vào ống chứa 6 ml môi trường LB lỏng sao cho đạt được nồng độ như ống 0.5 McF chuẩn của BBL. Từ đây hút 100µl vào ống chứa 10 ml môi trường LB lỏng thì được dịch vi khuẩn hoặc nấm 2.10^4 CFU/ ml.

Tiến hành thử: lấy 5,12 µl dung dịch mẫu thử có nồng độ 10mg/ml vào hàng đầu tiên có chứa 100µl môi trường LB rồi pha loãng nối tiếp giảm $\frac{1}{2}$ nồng độ vào các hàng có chứa 50µl cho đến khi đạt được nồng độ là 2 µg/ml, thêm 50 µl dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ 2.10^4 CFU/ml, ủ ở 37°C. Sau 24h, xác định sơ bộ giá trị MIC bằng quan sát. Giá trị **MIC** được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất gây ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ nuôi cấy và được xác định chính xác dựa trên số liệu đo độ đục tế bào bằng máy quang phổ Bioteck và phần mềm Raw data. Chất đối chứng là kháng sinh Streptomycin và Kanamycin cho các chủng vi khuẩn. Nistatin và cyclohexamide cho nấm.

Các chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm là: 3 chủng vi khuẩn Gram (–) (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC113076), 3 chủng Gram (+) (*Enterococcus faecalis* ATCC299212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC13245), 1 chủng nấm (*Candida albicans* ATCC1023).

Kết quả:

Hợp chất hakodoside A thể hiện hoạt tính ức chế 3 chủng vi khuẩn Gram(+) *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* và ức chế vi nấm *Candida albicans* với giá trị MIC lần lượt là 128, 64, 256 và 16 µg/mL.

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng sinh

Tên mẫu	MIC ($\mu\text{g/mL}$)						
	Gram +			Gram -			Nấm men
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC299212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Bacillus cereus</i> ATCC13245	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC299212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Bacillus cereus</i> ATCC13245	<i>Candida albicans</i> ATCC10231
Hakodoside A	128	64	256	-	-	-	16
Streptomycin	256	256	128	32	256	128	-
Cyclohexamide							32

Ví dụ 4: Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào

Nguyên lí:

Hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện dựa trên phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) được mô tả lần đầu tiên bởi tác giả Tim Mosman, 1983. Đây là phương pháp đánh giá khả năng sống sót của tế bào qua khả năng khử MTT (màu vàng) thành một phức hợp formazan (màu tím) bởi hoạt động của enzym dehydrogenase trong ty thể. Sản phẩm formazan được hòa tan bằng DMSO và đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 540 nm. Giá trị thể hoạt tính là IC_{50} (nồng độ chất thử ức chế 50% sự phát triển của tế bào).

Chuẩn bị thí nghiệm:

Các dòng tế bào có nguồn gốc từ Bảo tàng giống chuẩn Hoa kỳ (ATCC) gồm: ung thư biểu mô biểu mô KB (CCL -17TM), ung thư gan Hep G2 (HB - 8065TM), ung thư phổi LU-1 (HTB - 57TM) và ung thư vú MCF-7 (HTB - 22TM).

Dòng tế bào được lưu giữ trong nitơ lỏng, hoạt hóa và duy trì trong các môi trường dinh dưỡng như DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt) có bổ sung 7-10% FBS (Fetal Bovine Serum) và một số thành phần thiết yếu khác. Tế bào được nuôi trong các điều kiện tiêu chuẩn (5% CO₂, độ ẩm 98%, nhiệt độ 37°C, vô trùng tuyệt đối) và được cấy chuyển 1-2 lần trước khi thí nghiệm. Tế bào phát triển ở pha log sẽ được sử dụng để thử độc tính.

Mẫu thử được hòa tan bằng dung môi DMSO với nồng độ ban đầu là 20 mg/ml. Tiến hành pha loãng 2 bước trên đĩa 96 giếng thành 5 dãy nồng độ từ cao xuống thấp lần lượt là 2564, 640, 160, 40 và 10 $\mu\text{g/ml}$. Nồng độ chất thử trong đĩa thử nghiệm tương

ứng là 128, 32, 8, 2 và 0.5 µg/ml. Chất tham chiếu Ellipticine (Sigma) pha trong DMSO với nồng độ 2 mg/ml.

Tiến hành thí nghiệm:

- Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm tế bào. Tiếp đó, pha tế bào bằng môi trường sạch và điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm (khoảng $1-3 \times 10^4$ tế bào/ml tùy theo từng dòng tế bào).
- Lấy vào mỗi giếng 10 µl chất thử đã chuẩn bị ở trên và 190 µl dung dịch tế bào. Đối chứng dương của thí nghiệm là môi trường có chứa tế bào, đối chứng âm chỉ có môi trường nuôi cấy.
- Địa thí nghiệm được ủ ở điều kiện tiêu chuẩn.
- Sau 72 giờ mỗi giếng thí nghiệm được tiếp tục ủ với 10 µl MTT (5 mg/ml) trong 4h. Sau khi loại bỏ môi trường, tinh thể formaran được hòa tan bằng 100 µl DMSO 100%.
- Kết quả thí nghiệm được xác định bằng giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm trên máy quang phổ Genios Tecan. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Xử lý kết quả thực nghiệm:

Giá trị IC_{50} được xác định thông qua giá trị % ức chế tế bào phát triển và phần mềm máy tính Rawdata.

$$\% \text{ ức chế tế bào} = (OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{mẫu thử}}) / (OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{chứng (-)}}) \times 100\%$$

$$IC_{50} = High_{Conc} - \frac{(High_{Inh\%} - 50) \times (High_{Conc} - Low_{Conc})}{High_{Inh\%} - Low_{Inh\%}}$$

(Trong đó, $High_{Conc}/Low_{Conc}$: chất thử ở nồng độ cao/chất thử thấp ở nồng độ thấp; $High_{Inh\%}/Low_{Inh\%}$: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp).

Kết quả

Hợp chất hakodoside A thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở mức độ yếu đối với dòng tế bào ung thư biểu mô (KB) với IC_{50} là 64,0 µg/mL và ở mức độ rất yếu đối với dòng tế bào ung thư gan HepG2 với IC_{50} là 192,0 µg/mL.

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào

Tên mẫu	IC_{50} (µg/mL)
---------	-------------------

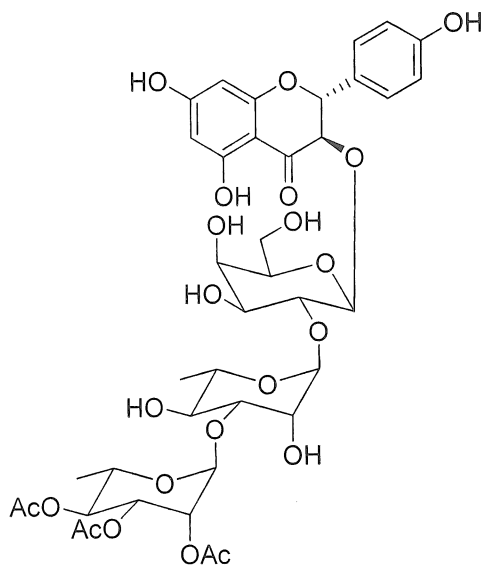
	KB	HepG2	SK-LU1	MCF7
Hakodoside A	64,0	192,0	>256	>256
Ellipticine	0,27	0,30	0,35	0,48

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất mới hakodoside A từ lá trà hoa vàng *Camellia hakodae*. Hợp chất này thuộc khung flavonoid glycoside mang nhiều hoạt tính sinh học đã làm sáng tỏ phần nào về các công dụng của lá trà hoa vàng *Camellia hakodae*, một cây thuốc quý được sử dụng trong dân gian. Các hợp chất theo sáng chế có tác dụng thủy phân fibrin (tác dụng tan sợi huyết), kháng vi khuẩn và gây độc tế bào có thể sử dụng để bào chế sản phẩm chống huyết khối, chống nhiễm khuẩn và ung thư. Sáng chế này tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng phòng và điều trị một số bệnh theo hướng phòng chống ung thư và đột quỵ dựa trên việc khai thác bền vững nguồn dược liệu quý sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất flavonoid glycoside là hakodoside A có công thức (I):



(I)

2. Phương pháp chiết hợp chất hakodoside A từ lá trà hoa vàng *Camellia hakodae* bao gồm các bước:

- (i) thu gom mẫu lá cây trà hoa vàng *Camellia hakodae*, rửa sạch, phơi khô và sau đó nghiền nhỏ thành bột bằng máy nghiền, tiếp đó ngâm chiết bột này bằng dung môi rượu etylic 96% 3 lần, mỗi lần trong 24 giờ (tỷ lệ 3 lít dung môi trên 1 kg nguyên liệu);
- (ii) gộp các dịch chiết trong rượu etylic thu được ở bước (i) lại, lọc bằng giấy lọc và cất để loại bỏ hoàn toàn dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết rượu etylic, ký hiệu là dịch cô A;
- (iii) hòa tan dịch cô A với hòa tan dịch cô A với nước cất (tỷ lệ 1 lít dung môi trên 100 g dịch) rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi etyl axetat và rượu butylic, mỗi dung môi chiết 3 lần (tỷ lệ dung môi/dịch nước 1:1 theo thể tích), dịch rượu butylic sau khi chiết được tiến hành cô cạn dưới áp suất giảm thu được dịch cô rượu butylic, ký hiệu là dịch cô B;
- (iv) dịch cô B được hòa tan trong rượu metylic (tỷ lệ 4 ml dung môi trên 1 g dịch) rồi tẩm lên silica gel (tỷ lệ silica gel/dịch 3:1 theo khối lượng) và được tiến hành phân tách bằng cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha thường, rửa giải theo phương pháp gradient nồng độ hệ dung môi

diclometan:rượu metylic theo tỉ lệ về thể tích 1:0, 1:2, 2:3, 3:4, 4:5, 5:6 và 0:1 thu được 7 phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt từ B-1 đến B-7;

- (v) phân đoạn B-2 thu được ở bước (iv) được phân lập trên cột sắc ký với chất hấp thụ là silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ B-2/silica gel về khối lượng 1/20) và rửa giải theo phương pháp gradient nồng độ hệ dung môi diclometan:rượu metylic theo tỉ lệ về thể tích 1:0, 1:2, 1:1, 4:5 và 0:1 thu được hợp chất hakodoside A.