



(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)



1-0037993

(51)^{2019.01} C07D 307/00; C07D 307/77; A61K
31/343; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2020-01113

(22) 27/02/2020

(45) 25/12/2023 429

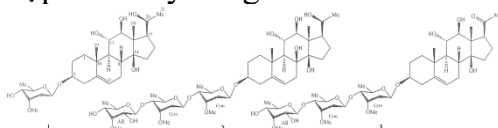
(43) 27/07/2020 388

(73) Viện Hóa sinh biển- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Phường Nghĩa Đô, Quận Cầu Giấy, Thành Phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Kim Thúy (VN); Phan Văn Kiêm (VN); Châu Văn Minh (VN); Nguyễn Xuân Nhiệm (VN); Nguyễn Thị Mai (VN); Nguyễn Thị Cúc (VN); Bùi Hữu Tài (VN).

(54) HỢP CHẤT PREGNAN GLYCOSIT VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI DREGEA VOLUBILIS

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất pregnan glycosit, mà là các hợp chất có công thức dưới đây, trong đó các biến là như được xác định trong bản mô tả, và phương pháp chiết các hợp chất này từ loài *D. volubilis* thu hái ở Lạng Sơn. Hợp chất pregnan glycosit theo sáng chế có tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza, do đó hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các dược phẩm hỗ trợ chữa bệnh đái tháo đường chứa 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 có nguồn gốc thiên nhiên có khả năng ức chế enzym α -glucosidaza với mục đích nghiên cứu ứng dụng chữa bệnh đái tháo đường. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp chiết hợp chất pregnan glycosit từ loài *Dregea volubilis* (L.f.) Benth. ex Hook. f. ở Việt Nam.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

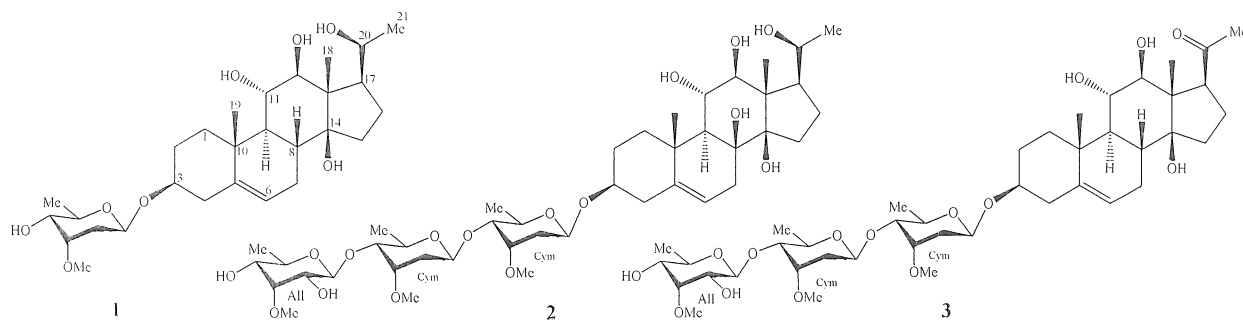
Việc sử dụng nguồn dược liệu tự nhiên nói chung, đặc biệt là các hợp chất thiên nhiên có nguồn gốc từ thực vật để chữa trị một số bệnh nhiệt đới và những bệnh hiểm nghèo đã và đang là mối quan tâm không chỉ của ngành dược ở nước ta mà còn của các nước trong khu vực cũng như các nước trên thế giới. Nhiều cây thuốc trong đó đã được phát hiện có tác dụng làm hạ đường huyết, có thể sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường. Bệnh tiểu đường là một bệnh mãn tính gây nhiều biến chứng nguy hiểm. Bệnh này do di truyền, thiếu insulin ở các mức độ khác nhau, hoặc ức chế insulin. Vì thế đường huyết tăng và nếu vượt quá ngưỡng thì có đường niệu (nước tiểu có đường), gây phá hủy các hệ thống trên cơ thể, đặc biệt là các mạch máu, và các dây thần kinh, có thể dẫn đến mù lòa, xơ vữa động mạch, đột quỵ, v.v. Chính vì vậy, việc nghiên cứu, tìm kiếm các hợp chất mới có nguồn gốc từ thiên nhiên có hoạt tính nhằm tạo ra các sản phẩm thuốc có tác dụng trong phòng và điều trị bệnh tiểu đường hiện nay là vô cùng quan trọng.

Loài *Dregea volubilis* thuộc họ La bố ma (Apocynaceae) là một nguồn dược liệu quan trọng từ thiên nhiên, trong đó bao gồm các lớp hợp chất chính là pregnan, steroid và saponin. Trong dân gian, các loài thuộc chi *Dregea* đã được sử dụng để trị sốt, bệnh về da, thuốc xổ, nôn, hen suyễn, viêm, vết thương, trĩ, bạch đậu khấu, khối u, tiết niệu, v.v. Trên thế giới, một số nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của một số loài thuộc chi này thể hiện hoạt tính chống bệnh đái tháo đường, kháng viêm, chống oxy hóa, bảo vệ thần kinh, chống ung thư, v.v. Ở Việt Nam vẫn chưa có công trình công bố nào nghiên cứu về hóa học và hoạt tính sinh học các loài thuộc chi *Dregea*. Vì vậy, việc điều tra, nghiên cứu phát hiện các hợp chất pregnan glycosit mới từ loài *D. volubilis* sẽ có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn cao, góp phần tích cực vào việc khai thác và sử dụng một cách hợp lý nguồn tài nguyên thiên nhiên của đất nước.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất pregnan glycosit khả năng ức chế enzym α -glucosidaza và do đó hữu ích để sử dụng để phát triển thành các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường và phương pháp phân lập hợp chất này.

Cụ thể hơn, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất pregnan glycosit, trong đó hợp chất này là hợp chất được chọn từ các hợp chất có công thức sau:



trong đó:

Cym là H;

Me là CH_3 .

Theo một phương án, hợp chất pregnan glycosit là hợp chất $3\beta, 8\beta, 11\alpha, 12\beta, 14\beta, 20R$ -hexahydroxy-pregn-5(6)-en 3-*O*- β -D-cymaropyranosit (volubilosit D) có công thức (1).

Theo một phương án khác, hợp chất pregnan glycosit là hợp chất $3\beta, 8\beta, 11\alpha, 12\beta, 14\beta, 20R$ -hexahydroxy-pregn-5(6)-en 3-*O*-6-deoxy-3-*O*-metyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosit (volubilosit E) có công thức (2).

Theo một phương án khác, hợp chất pregnan glycosit là hợp chất $3\beta, 11\alpha, 12\beta, 14\beta$ -tetrahydroxy-pregn-5(6)-en-20-on 3-*O*-6-deoxy-3-*O*-metyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosit (volubilosit F) có công thức (3).

Các hợp chất pregnan glycosit bao gồm volubilosit D có công thức (1), volubilosit E có công thức (2) và volubilosit F có công thức (3) theo sáng chế thể hiện khả năng ức chế enzym α -glucosidaza và hữu dụng để phát triển thành các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp phân lập hợp chất pregnan glycosit trên đây từ loài *D. volubilis*, phương pháp này bao gồm các bước:

i) thái nhỏ, phơi khô mẫu lá cây *D. volubilis* ở nhiệt độ 50°C rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm 3 lần, mỗi lần 1 giờ, với metanol ở nhiệt độ 50°C;

ii) gộp các dịch chiết trong metanol thu được ở bước i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol;

iii) hòa tan cặn chiết metanol với nước cất, chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, diclometan và sau cùng là etyl axetat (EtOAc), mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích;

iv) tiến hành loại bỏ dung môi của các dịch chiết dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết *n*-hexan (DV1), diclometan (DV2), etyl axetat (DV3) và dịch chiết nước (DV4);

v) tiến hành phân tách cặn chiết DV2 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/0→0/1 thu được sáu phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là DV2A đến DV2F;

vi) tiếp tục phân tách phân đoạn DV2D trên sắc ký cột với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 µm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 2/1 về thể tích, thu được sáu phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt là DV2D1 đến DV2D6;

vii) tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn DV2D1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 µm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1,2/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn, được ký hiệu là DV2D1A và DV2D1B;

viii) phân lập các hợp chất, trong đó:

- hợp chất volubilosit E có công thức (2) và hợp chất volubilosit F có công thức (3) thu được ở dạng bột vô định hình, màu trắng từ phân đoạn DV2D1B và DV2D1A sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 35% trong nước;
- hợp chất volubilosit D có công thức (1) thu được từ phân đoạn DV2F bằng cách:
 - tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn DV2F trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 µm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/1,8 về

thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt là DV2F1 đến DV2F3;

- tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn DV2F1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn, ký hiệu là DV2F1A và DV2F1B;
- hợp chất volubilosit D có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn DV2F1A sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 200 mm), điều kiện dung môi axetonitril 20% trong nước.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

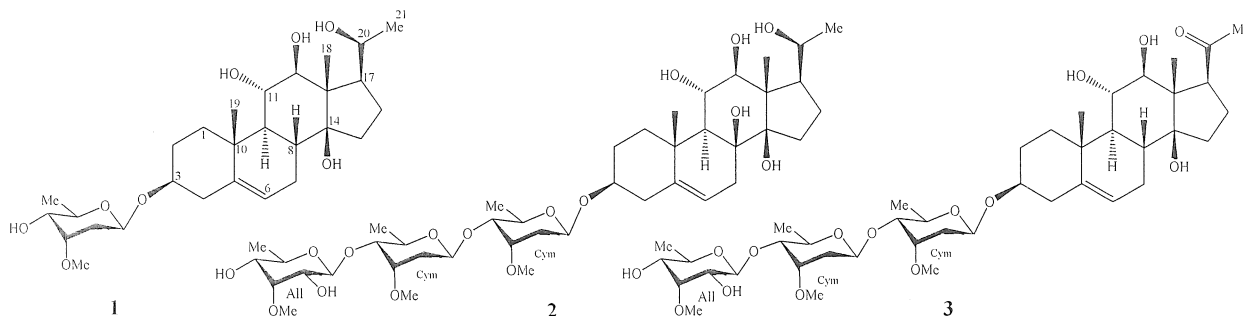
Sáng chế đề xuất phương pháp phân lập và xác định cấu trúc của các hợp chất được phân lập từ loài *D. Volubilis* với đặc tính được học hữu ích. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất hợp chất có cấu trúc lần lượt là $3\beta, 8\beta, 11\alpha, 12\beta, 14\beta, 20R$ -hexahydroxy-pregn-5(6)-en 3-*O*- β -D-cymaropyranosit (volubilosit D), $3\beta, 8\beta, 11\alpha, 12\beta, 14\beta, 20R$ -hexahydroxy-pregn-5(6)-en 3-*O*-6-deoxy-3-*O*-metyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosit (volubilosit E) và $3\beta, 11\alpha, 12\beta, 14\beta$ -tetrahydroxy-pregn-5(6)-en-20-on 3-*O*-6-deoxy-3-*O*-metyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosit (volubilosit F) và phương pháp phân lập hợp chất này từ loài *D. Volubilis*. Các hợp chất theo sáng chế có tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza và do đó, thích hợp dùng làm chất có khả năng chống đái tháo đường.

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.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất pregnan glycosit, trong đó hợp chất này là hợp chất được chọn từ các hợp chất có công thức sau:



Các hợp chất pregnan glycosit trên đây được xác định đặc trưng cấu trúc và được xác định là các hợp chất có cấu trúc hóa học mới. Các thông số hóa-lý của các hợp chất này như sau:

Hợp chất volubilosit D có công thức (1):

+ Công thức phân tử: $C_{28}H_{46}O_8$

+ Khối lượng phân tử: $M = 510$

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} -14,1^\circ$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 545,2887 $[M + Cl]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{28}H_{46}O_8Cl]^-$, 545,2887)

Hợp chất volubilosit E có công thức (2):

+ Công thức phân tử: $C_{42}H_{70}O_{16}$;

Khối lượng phân tử: $M = 830$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} -27,5^\circ$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 853,4561 $[M + Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{42}H_{70}O_{16}Na]^+$, 853,4556).

Hợp chất volubilosit F có công thức (3):

+ Công thức phân tử: $C_{42}H_{68}O_{15}$;

Khối lượng phân tử: $M = 812$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} -34.9^\circ$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 813,4614 $[M + H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{42}H_{69}O_{15}]^+$, 813,4631).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập ba hợp chất Pregnan glycosit có công thức (I) từ loài *D. volubilis* như sau:

i) thái nhỏ, phơi khô mẫu lá cây *D. volubilis* ở nhiệt độ 50°C rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm 3 lần, mỗi lần 1 giờ, với metanol ở nhiệt độ 50°C ;

ii) gộp các dịch chiết trong metanol thu được ở bước i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol;

iii) hòa tan cặn chiết metanol với nước cất, chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, diclometan và sau cùng là etyl axetat (EtOAc), mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích;

iv) tiến hành loại bỏ dung môi của các dịch chiết dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết *n*-hexan (DV1), diclometan (DV2), etyl axetat (DV3) và dịch chiết nước (DV4);

v) tiến hành phân tách cặn chiết DV2 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/0 $\rightarrow$ 0/1 thu được sáu phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là DV2A đến DV2F;

vi) tiếp tục phân tách phân đoạn DV2D trên sắc ký cột với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 2/1 về thể tích, thu được sáu phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt là DV2D1 đến DV2D6;

vii) tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn DV2D1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1,2/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn, được ký hiệu là DV2D1A và DV2D1B;

viii) phân lập các hợp chất, trong đó:

- hợp chất volubilosit E có công thức (2) và hợp chất volubilosit F có công thức (3) thu được ở dạng bột vô định hình, màu trắng từ phân đoạn DV2D1B và DV2D1A sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 35% trong nước;

- hợp chất volubilosit D có công thức (1) thu được từ phân đoạn DV2F bằng cách:
 - tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn DV2F c trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/1,8 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt là DV2F1 đến DV2F3;
 - tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn DV2F1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn, ký hiệu là DV2F1A và DV2F1B;
 - hợp chất volubilosit D có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn DV2F1A sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 200 mm), điều kiện dung môi axetonitril 20% trong nước.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập ba hợp chất Pregnan glycosit từ loài *D. volubilis*

Mẫu lá cây *D. volubilis* được thái nhỏ, phơi khô ở nhiệt độ 50°C rồi nghiền thành bột (5,0 kg). Sau đó, bột này được ngâm chiết siêu âm 3 lần, mỗi lần 1 giờ, với metanol ở nhiệt độ 50°C. Các dịch chiết được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol (630 g).

Hòa tan cặn chiết metanol với nước cất (3 lít) rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích. Các dịch chiết được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết *n*-hexan (DV1, 90 g), diclometan (DV2, 200 g), etyl axetat (DV3, 23 g) và dịch chiết nước (DV4).

Cặn chiết DV2 được tiến hành phân tách trên cột sắc ký (Φ 12 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/0 $\rightarrow$ 0/1 thu được sáu phân đoạn ký hiệu lần lượt từ DV2A đến DV2F.

Phân đoạn DV2D (14 g) tiếp tục được phân tách trên sắc ký cột (Φ 8 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji

silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 2/1 về thể tích, thu được sáu phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ DV2D1 đến DV2D6. Phân đoạn DV2D1 (2,0 g) được tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký (Φ 4 cm, L 60 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1,2/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn, ký hiệu là DV2D1A (0,5 g) và DV2D1B (0,6 g).

Hợp chất: volubilosit E (19,1 mg) có công thức (2) và volubilosit F (40,6 mg) có công thức (3) thu được ở dạng bột vô định hình, màu trắng từ phân đoạn DV2D1B và DV2D1A khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 35% trong nước.

Phân đoạn DV2F (12 g) được tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký (Φ 8 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/1,8 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ DV2F1 đến DV2F3. Phân đoạn DV2F1 (1,6 g) được tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký (Φ 4 cm, L 60 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn, ký hiệu là DV2F1A (0,4 g) và DV2F1B (0,5 g). Hợp chất: volubilosit D (400 mg) có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn DV2F1A khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 $\times$ 200 mm), điều kiện dung môi axetonitril 20% trong nước.

Hợp chất volubilosit D có công thức (1).

- + Chất bột vô định hình màu trắng;
- + Độ quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 14,1^{\circ}$ (c 0,1, MeOH);
- + Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 545,2887 $[\text{M} + \text{Cl}]^{-}$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_8\text{Cl}]^{-}$, 545,2887;
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Số liệu phổ ^1H - NMR và ^{13}C -NMR (δ , ppm) của hợp chất volubilosit D

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a)}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a)}$ (mult., $J = \text{Hz}$)	C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a)}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a)}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	40.2	1.15 (m)/2.68 (dt, 3.5, 14.0)	16	27.0	1.62 (m) /1.92 (m)
2	30.8	1.58 (m)/1.84 (m)	17	54.7	2.18 (m)
3	79.2	3.51 (m)	18	11.0	1.12 (s)
4	40.3	2.22 (m)/2.35 (m)	19	19.2	1.20 (s)
5	141.3	-	20	71.4	3.79 (m)

6	122.9	5.49 (br d, 5.5)	21	23.0	1.22 (d, 6.5)
7	28.7	1.83 (m)/2.25 (m)	Cym I		
8	38.5	1.76 (m)	1	97.1	4.86 (br d, 7.0)
9	50.5	1.25 (d, 10.5)	2	35.9	1.54 (m)/2.16 (m)
10	40.2	-	3	79.1	3.61 (br dd, 3.0, 3.0)
11	72.1	3.67 (dd, 10.0, 10.5)	4	74.4	3.19 (dd, 3.5, 9.5)
12	80.9	3.04 (d, 10.0)	5	71.4	3.75 (m)
13	54.4	-	6	18.7	1.24 (d, 6.0)
14	85.7	-	3-OMe	58.1	3.45 (s)
15	33.9	1.63 (m)/1.75 (m)			

^{a)} Đo trong CD₃OD, Cym: β -D-cymaropyranosyl.

Hợp chất volubilosit E có công thức (2)

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 27,5^\circ$ (*c* 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại *m/z* 853,4561 $[M + Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{42}H_{70}O_{16}Na]^+$, 853,4556;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Số liệu phổ ¹H- NMR và ¹³C-NMR (δ , ppm) của hợp chất volubilosit E

C	$\delta_C^a)$	$\delta_H^a)$ (mult., <i>J</i> = Hz)	C	$\delta_C^a)$	$\delta_H^a)$ (mult., <i>J</i> = Hz)
1	41.2	1.09 (m)/2.67 (m)	Cym I		
2	30.4	1.65 (m)/1.80 (m)	1	97.1	4.88 (dd, 2.0, 9.5)
3	79.6	3.53 (m)	2	36.6	1.57 (m)/2.09 (m)
4	40.2	2.31 (m)/2.37 (m)	3	78.6	3.86 (m)
5	142.0	-	4	83.9	3.24 (m)
6	118.8	5.34 (br d, 5.5)	5	70.0	3.83 (dq, 6.5, 9.5)
7	36.1	1.65 (m)/2.17 (m)	6	18.5	1.21 (d, 6.5)
8	76.9	-	3-OMe	58.5	3.45 (s)
9	51.6	1.44 (d, 10.5)	Cym II		
10	40.2	-	1	101.1	4.82 (dd, 2.0, 11.0)
11	70.8	4.02 (dd, 10.0, 10.5)	2	36.4	1.61 (m)/2.16 (m)
12	82.6	3.17 (d, 10.0)	3	78.7	3.86 (m)
13	54.0	-	4	84.0	3.25 (m)
14	86.0	-	5	70.1	3.89 (dq, 6.5, 9.5)
15	36.0	1.75 (m)/2.15 (m)	6	18.8	1.31 (d, 6.5)
16	27.3	1.61 (m)/1.84 (m)	3-OMe	58.5	3.46 (s)
17	56.9	2.08 (m)	All		
18	11.5	1.28 (s)	1	104.0	4.60 (d, 8.0)
19	18.0	1.40 (s)	2	73.3	3.38 (dd, 3.0, 8.0)
20	70.5	3.75 (dq, 7.5, 6.0)	3	83.9	3.65 (t, 3.0)
21	22.6	1.20 (d, 6.0)	4	74.9	3.20 (dd, 3.0, 9.5)
			5	70.9	3.69 (dq, 6.5, 9.5)
			6	18.3	1.24 (d, 6.5)
			3-OMe	62.5	3.62 (s)

^{a)} Đo trong CD₃OD, Cym: β -D-cymaropyranosyl, All: 6-deoxy-3-*O*-methyl- β -D-allopyranosyl.

Hợp chất volubilosit F có công thức (3)

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 34,9^\circ$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 813,4614 $[M + H]^{++}$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{42}H_{69}O_{15}]^+$, 813,4631;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Số liệu phổ 1H - NMR và ^{13}C -NMR (δ , ppm) của hợp chất volubilosit F

C	$\delta_C^{a)}$	$\delta_H^{a)}$ (mult., $J = \text{Hz}$)	C	$\delta_C^{a)}$	$\delta_H^{a)}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	40.4	1.15 (m)/2.68 (m)	Cym I		
2	30.8	1.57 (m)/1.83 (m)	1	97.1	4.87 (dd, 2.0, 9.5)
3	79.2	3.50 (m)	2	36.7	1.56 (m)/2.07 (m)
4	40.3	2.20 (m)/2.35 (m)	3	78.6	3.85 (m)
5	141.2	-	4	83.8	3.25 (m)
6	122.9	5.48 (br d, 5.5)	5	69.9	3.82 (dq, 6.5, 9.5)
7	28.7	1.80 (m)/2.27 (m)	6	18.5	1.19 (d, 6.5)
8	37.8	1.69 (m)	3-OMe	58.5	3.45 (s)
9	50.4	1.27 (d, 10.5)	Cym II		
10	40.0	-	1	101.1	4.81 (dd, 2.0, 11.0)
11	72.3	3.65 (dd, 10.0, 10.5)	2	36.3	1.62 (m)/2.15 (m)
12	78.8	3.08 (d, 10.0)	3	78.7	3.85 (m)
13	56.0	-	4	84.0	3.25 (m)
14	85.9	-	5	70.1	3.88 (dq, 6.5, 9.5)
15	35.4	1.80 (m)/2.00 (m)	6	18.8	1.31 (d, 6.5)
16	24.9	1.96 (m)/2.03 (m)	3-OMe	58.5	3.46 (s)
17	59.0	3.57 (dd, 4.0, 9.0)	All		
18	10.4	0.93 (s)	1	104.0	4.60 (d, 8.0)
19	19.2	1.18 (s)	2	73.3	3.38 (dd, 3.0, 8.0)
20	218.9	-	3	83.8	3.64 (t, 3.0)
21	32.6	2.27 (s)	4	74.9	3.20 (dd, 3.0, 9.5)
			5	70.9	3.68 (dq, 6.5, 9.5)
			6	18.3	1.24 (d, 6.5)
			3-OMe	62.6	3.62 (s)

^{a)} Đo trong CD₃OD, Cym: β -D-cymaropyranosyl, All: 6-deoxy-3-*O*-methyl- β -D-allopyranosyl.

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác dụng dược lý của các hợp chất pregnan glycosit

Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza của các hợp chất Pregnan glycosit trong sáng chế được thử nghiệm như sau:

Hoạt tính ức chế α -glucosidaza được thực hiện dựa trên phản ứng thủy phân 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranosit (p NPG) thành đường glucoza và *p*-nitrophenol, hợp chất có màu vàng, dưới xúc tác của enzym α -glucosidaza. Khi mẫu thử có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza, sự tạo thành hợp chất *p*-nitrophenol sẽ giảm, do vậy mật độ

quang (OD) của *p*-nitrophenol so với mẫu đối chứng, không bị ức chế sẽ giảm theo. Mật độ quang (OD) của *p*-nitrophenol sinh ra sau phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm và được dùng để đánh giá hoạt động ức chế enzym của mẫu thử. Nồng độ ức chế 50%, IC₅₀ được xây dựng trên 5 nồng độ thử nghiệm. Giá trị IC₅₀ được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 5.0. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau.

Trong mỗi giếng nghiên cứu chứa: 50 μ L mẫu thử và 100 μ L dung dịch enzym α -glucosidaza được ủ 25°C trong 5 phút, tiếp tục bổ sung 50 μ L 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranosit, đo trên máy ELISA ở bước sóng 405 nm. Chất chuẩn dương acarboza được dùng để kiểm soát độ ổn định và đánh giá hoạt tính ức chế tương đương. Các phép thử được lặp lại 3 lần. Acarboza được sử dụng làm chất đối chứng dương.

Kết quả hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza của các hợp chất pregnan glycosit được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Kết quả hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza tại nồng độ 40 μ M

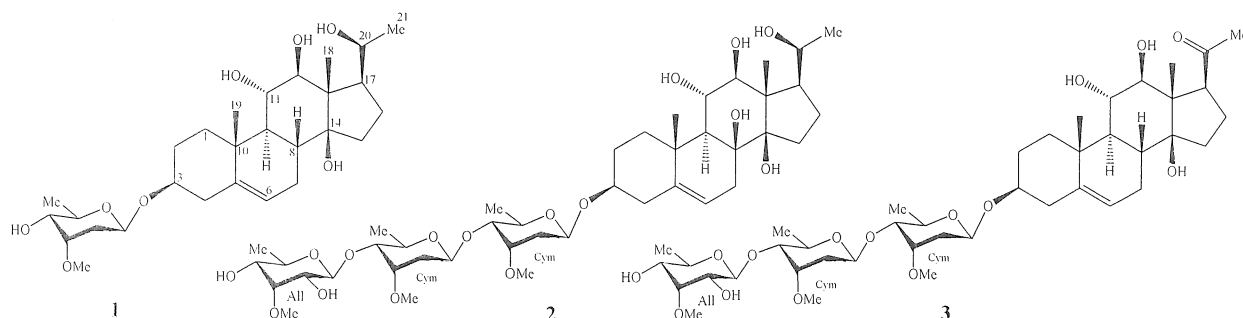
Tên mẫu	% Ức chế	Sai số
1	11,8	0,5
2	16,9	0,7
3	<10	
Acarboza	59,8	1,6

Khả năng áp dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề xuất hợp chất pregnan glycosit (volubilosit D-F) và phương pháp phân lập ba hợp chất này từ loài *D. volubilis* thu hái tại Lạng Sơn. Các hợp chất, đặc biệt là hợp chất **1** và **2**, thể hiện hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza khá cao so với chất chuẩn đối chứng acarboza. Sáng chế tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường dựa trên việc khai thác nguồn dược liệu quý, sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất pregnan glycosit, trong đó hợp chất này là hợp chất được chọn từ các hợp chất có công thức sau:



trong đó:

Cym là H;

Me là CH₃.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất 3 β ,8 β ,11 α ,12 β ,14 β ,20 R -hexahydroxy-pregn-5(6)-en 3- O - β -D-cymaropyranosit (volubilosit D) có công thức (1).

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất 3 β ,8 β ,11 α ,12 β ,14 β ,20 R -hexahydroxy-pregn-5(6)-en 3- O -6-deoxy-3- O -metyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosit (volubilosit E) có công thức (2).

4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất 3 β ,11 α ,12 β ,14 β -tetrahydroxy-pregn-5(6)-en-20-on 3- O -6-deoxy-3- O -metyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosit (volubilosit F) có công thức (3).

5. Phương pháp phân lập hợp chất pregnan glycosit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 từ loài *D. volubilis*, phương pháp này bao gồm các bước:

i) thái nhỏ, phơi khô mẫu lá cây *D. volubilis* ở nhiệt độ 50°C rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm 3 lần, mỗi lần 1 giờ, với metanol ở nhiệt độ 50°C;

ii) gộp các dịch chiết trong metanol thu được ở bước i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol;

iii) hòa tan cặn chiết metanol với nước cất, chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, diclometan và sau cùng là etyl axetat (EtOAc), mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích;

iv) tiến hành loại bỏ dung môi của các dịch chiết dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết *n*-hexan (DV1), diclometan (DV2), etyl axetat (DV3) và dịch chiết nước (DV4);

v) tiến hành phân tách cặn chiết DV2 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/0→0/1 thu được sáu phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là DV2A đến DV2F;

vi) tiếp tục phân tách phân đoạn DV2D trên sắc ký cột với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 µm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 2/1 về thể tích, thu được sáu phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt là DV2D1 đến DV2D6;

vii) tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn DV2D1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 µm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1,2/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn, được ký hiệu là DV2D1A và DV2D1B;

viii) phân lập các hợp chất, trong đó:

- hợp chất volubilosit E có công thức (2) và hợp chất volubilosit F có công thức (3) thu được ở dạng bột vô định hình, màu trắng từ phân đoạn DV2D1B và DV2D1A sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere M-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 35% trong nước;
- hợp chất volubilosit D có công thức (1) thu được từ phân đoạn DV2F bằng cách:
 - tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn DV2F c trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 µm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/1,8 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt là DV2F1 đến DV2F3;
 - tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn DV2F1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 µm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn, ký hiệu là DV2F1A và DV2F1B;
 - hợp chất volubilosit D có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn DV2F1A sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC

với cột J's sphere M-80 (150×200 mm), điều kiện dung môi axetonitril 20% trong nước.