



(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)



1-0048677

(51)^{2020.01} A61K 31/00; A61P 19/10; C07J 63/00; (13) B
A61P 19/00

(21) 1-2021-05953

(22) 24/09/2021

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/01/2022 406A

(73) Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

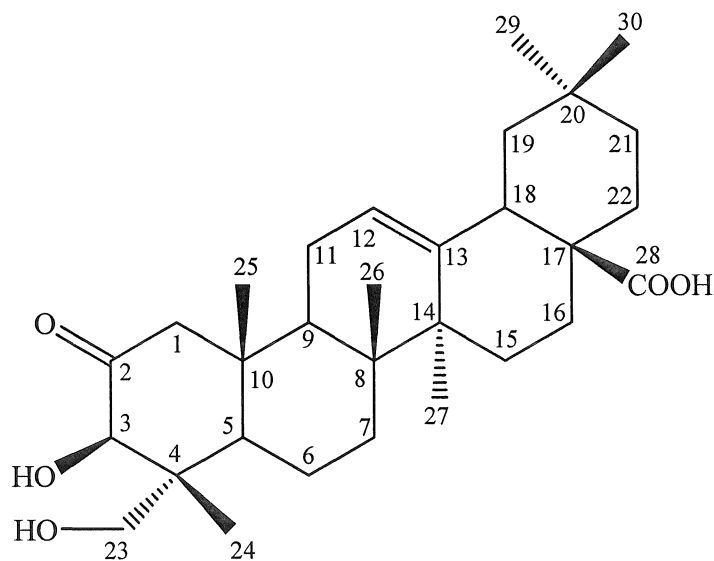
Số 18 đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Hải Đăng (VN); Nguyễn Xuân Nhiệm (VN); Phan Văn Kiệm (VN); Dương Thị Dung (VN); Nguyễn Phương Minh (VN); Lê Đức Thiện (VN).

(54) HỢP CHẤT AXIT 2-OXO-3B,23-DIHYDROXYOLEAN-12-EN-28-OIC VÀ
PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI VÓT VÀNG NHẬT
VIBURNUM LUTESCENS

(21) 1-2021-05953

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic có công thức (1) và phương pháp phân lập hợp chất này từ loài *Viburnum lutescens*.

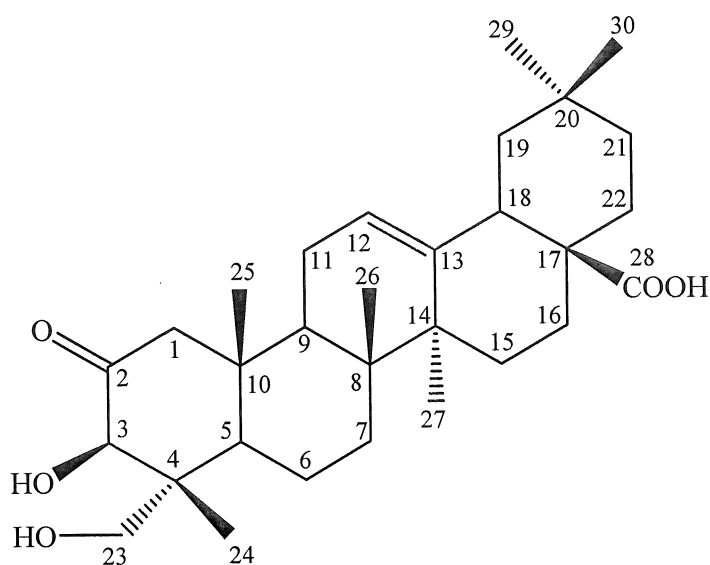


(1)

Hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic theo sáng chế có tác dụng chống loãng xương thông qua việc ức chế sự hình thành của tế bào hủy xương do đó hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các dược phẩm điều trị và/hoặc hỗ trợ điều trị bệnh loãng xương chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên có hoạt tính ức chế sự hình thành các tế bào hủy xương. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất olean triterpen có cấu trúc hóa học mới từ loài vót vàng nhạt (*Viburnum lutescens*) ở Việt Nam và tác dụng chống loãng xương của hợp chất này. Cụ thể hơn nữa, sáng chế đề cập đến hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic có công thức (1) và phương pháp phân lập hợp chất này từ loài vót vàng nhạt (*Viburnum lutescens*).



(1)

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Loãng xương hiện nay là một căn bệnh phổ biến ở mọi quốc gia, số lượng bệnh nhân bị bệnh loãng xương trong cộng đồng tương đương với bệnh nhân mắc bệnh tim mạch và ung thư. Loãng xương là bệnh rối loạn chuyển hóa của xương, làm giảm sức mạnh của xương dẫn đến làm tăng nguy cơ gãy xương. Nguyên nhân gây loãng xương phổ biến nhất là do sự hoạt động quá mức của các tế bào hủy xương (osteoclast), được đặc trưng bởi mật độ xương thấp và sự suy giảm vi kiến trúc. Cụ thể, cân bằng nội môi của xương được điều chỉnh bởi sự cân bằng chức năng và hoạt động của các tế bào hủy xương và tạo xương. Hoạt động quá mức của tế bào hủy xương có liên quan đến các bệnh như loãng xương, viêm khớp dạng thấp và di căn xương khối u. Các nghiên cứu trong thời gian gần đây đã chỉ ra rằng các tế bào hủy xương có nguồn gốc từ các đại thực bào (macrophage) và đơn bào lớn (monocyte) của tủy xương. Nếu các đại thực bào tách từ tủy xương được nuôi trong môi trường đặc biệt có tăng cường *phối tử hoạt hóa thụ thể của yếu tố nhân*

kappa B (RANKL) thì chúng sẽ bị kích thích biệt hóa thành tế bào hủy xương. Điều này mở ra khả năng vô cùng lớn trong việc phát triển nghiên cứu đánh giá hoạt tính chống loãng xương thông qua khả năng tác động lên quá trình hình thành tế bào hủy xương của các chất thử trong môi trường *in vitro*. Hiện nay, liệu pháp sử dụng các thuốc có gốc biphosphonat và estrogen được sử dụng rộng rãi và có hiệu quả cao đối với nhiều trường hợp rối loạn tiêu xương qua trung gian là các tế bào hủy xương. Tuy nhiên, điều trị bằng những thuốc này có thể dẫn đến nhiều tác dụng phụ như rối loạn tiêu hóa, hạ calci máu, hoại tử xương hàm, rung nhĩ, tăng huyết áp, bệnh túi mật và ung thư. Cho đến nay, các sản phẩm tự nhiên từ cây cỏ đã được khai thác như một nguồn để phát hiện các thuốc vì tính hiệu quả và ít tác dụng phụ hơn. Do đó, sự phát triển của các chất chống loãng xương có nguồn gốc từ thiên nhiên là phù hợp với xu hướng hiện nay.

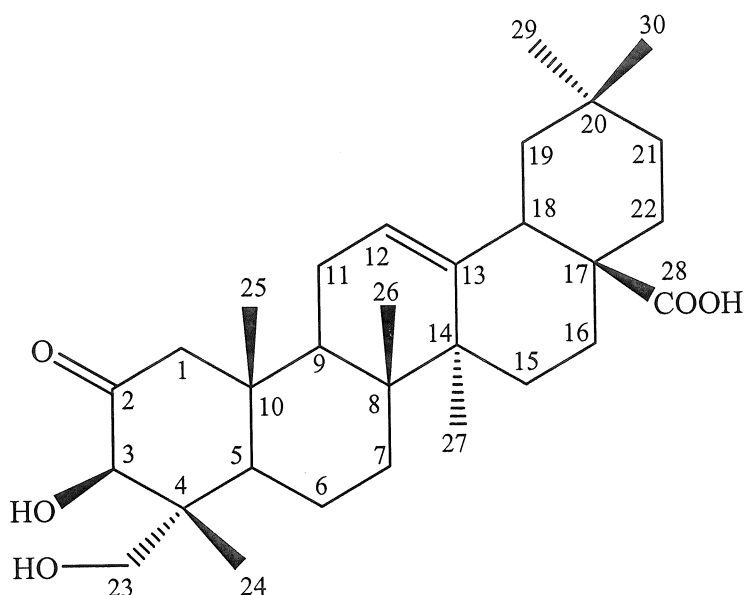
Chi Kim ngân hoa *Viburnum* (thuộc họ Caprifoliaceae) bao gồm hơn 200 loài (trong đó có 8 loài phân bố ở Việt Nam). Một số loài như *V. ridatum*, *V. ridndricum*, *V. luzonicum*, *V. odoratissimum*, và *V. lutescens* được sử dụng làm thuốc dân gian để điều trị ho, tiêu chảy, viêm khớp dạng thấp và bệnh viêm khớp. Loài *Viburnum lutescens* (*V. lutescens*) có tên gọi là vót vàng nhạt là một loại cây bụi hoặc cây thường xanh nhỏ, phân bố ở Việt Nam, Lào, Indonesia, Ấn Độ và Trung Quốc. Trong y học cổ truyền, loài *V. lutescens* đã được sử dụng trong các bài thuốc điều trị bệnh thấp khớp và viêm tắc tĩnh mạch. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài *V. lutescens*.

Trong một dự án khảo sát về tác dụng chống loãng xương của thực vật ở Việt Nam, cặn chiết metanol của loài *V. lutescens* được phát hiện ức chế mạnh sự hình thành các tế bào hủy xương trên tế bào RAW 264.7. Vì vậy, việc điều tra, nghiên cứu phát hiện hợp chất oleanane triterpenoid mới từ loài *V. lutescens* có hoạt tính chống loãng xương 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 olean triterpen có khả năng chống loãng xương và do đó hữu ích để sử dụng để phát triển thành các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh loãng xương và phương pháp phân lập hợp chất này.

Cụ thể hơn, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất olean triterpen có tên khoa học là axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic có công thức (1):



(1)

Hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic có công thức (1) như trên theo sáng chế thể hiện hoạt tính ức chế sự hình thành các tế bào hủy xương và có thể sử dụng để phát triển thành các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh loãng xương.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp phân lập hợp chất 1 từ loài vót vàng nhạt *V. lutescens*, phương pháp này bao gồm các bước:

i) thái nhỏ, phơi khô mẫu thân lá cây *V. lutescens* ở nhiệt độ 50°C, tiếp theo nghiền thành bột, sau đó ngâm chiết siêu âm bột thu được 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 cặn chiết metanol với nước cất, chiết phân bố lần lượt bằng dung dịch diclometan và etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần với tỷ lệ về thể tích là 1/1;

iv) tiến hành loại bỏ dung môi của các dịch chiết dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết diclometan (VL1), etyl axetat (VL2) và dịch chiết nước (VL3);

v) tiến hành phân tách cặn chiết VL1 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 metanol trong diclometan lần lượt theo tỷ lệ về thể tích của diclometan/metanol là 20/1, 10/1, 5/1 và 0/1 thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là VL1A đến VL1D;

vi) tiếp tục phân tách phân đoạn VL1B trên sắc ký cột với chất hấp phụ là pha đảo loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μ m (hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung

môi rửa giải metanol/nước cất với tỷ lệ về thể tích là 5/1, thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt là VL1B1 đến VL1B4;

vii) phân tách hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic có công thức (1) ở dạng bột vô định hình, màu trắng từ phân đoạn VL1B1 bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere H-80 (150 $\times$ 20 mm) sử dụng dung môi axetonitril 70% trong nước, thời gian lưu t_R = 42,9 phút.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp phân lập và xác định cấu trúc của hợp chất olean triterpen có cấu trúc hóa học mới từ loài vót vàng nhạt *Viburnum lutescens* (*V. lutescens*) với đặc tính dược học hữu ích. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic có công thức (1) và phương pháp phân lập hợp chất này từ loài *V. lutescens*. Hợp chất theo sáng chế có tác dụng ức chế sự hình thành các tế bào hủy xương, do đó thích hợp để dùng làm thuốc chống loãng xương. 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 hoạt tính chống loãng xương dựa trên việc khai thác nguồn dược liệu sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sau đây, sáng chế còn được mô tả thông qua các phương án cụ thể minh họa cho sáng chế với sự tham chiếu đến các hình vẽ, trong đó:

Hình 1 thể hiện hoạt tính ức chế sự hình thành các tế bào hủy xương do RANKL gây ra trên tế bào RAW 264.7 của hợp chất (1) ở nồng độ 10 μ M và đối chứng;

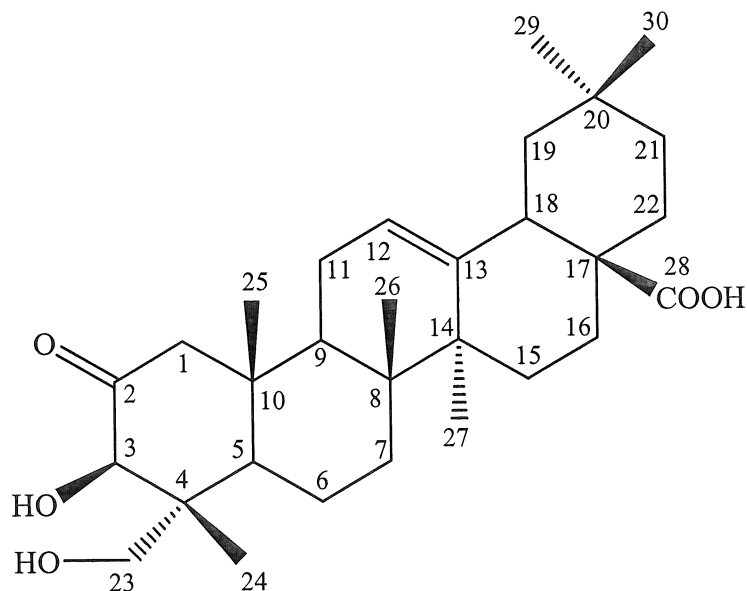
Hình 2 thể hiện khả năng ức chế của hợp chất (1) đối với sự hình thành của tế bào hủy xương do RANKL gây ra trong tế bào RAW 264.7 theo nồng độ.

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 olean triterpen có tên gọi là axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic, hợp chất này có công thức (1) sau đây:



(1)

Hợp chất thuộc lớp chất olean triterpen trên đây được xác định đặc trưng cấu trúc và được xác định là hợp chất có cấu trúc hóa học mới. Các thông số hóa-lý của hợp chất này như sau:

Hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic:

+ Công thức phân tử: $C_{30}H_{46}O_5$

+ Khối lượng phân tử: $M = 486$

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 36,1$ ($c = 0,1$, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS tại m/z 521,3045 $[M + Cl]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{46}O_5Cl]^-$, 521,3039).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất olean triterpen có công thức (I) từ loài *V. lutescens* như sau:

i) thái nhỏ, phơi khô mẫu thân lá cây *V. lutescens* 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 cặn chiết metanol với nước cất, chiết phân bố lần lượt bằng dung dịch diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần với tỷ lệ về thể tích là 1/1;

iv) tiến hành loại bỏ dung môi của các dịch chiết dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết diclometan (VL1), etyl axetat (VL2) và dịch chiết nước (VL3);

v) tiến hành phân tách cặn chiết VL1 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 metanol trong diclometan lần lượt theo tỷ lệ về thể tích của diclometan/metanol là 20/1, 10/1, 5/1 và 0/1 thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là VL1A đến VL1D;

vi) tiếp tục phân tách phân đoạn VL1B 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 metanol/nước cất với tỷ lệ về thể tích là 5/1, thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt là VL1B1 đến VL1B4;

vii) phân lập hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic có công thức (1) ở dạng bột vô định hình, màu trắng từ phân đoạn VL1B1 bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere H-80 (150 $\times$ 20 mm), sử dụng dung môi axetonitril 70% trong nước, thời gian lưu $t_R = 42,9$ phút.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế còn được mô tả thông qua các ví dụ chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế mà không làm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ 1: Phân lập hợp chất olean triterpen từ loài *V. lutescens*

Mẫu thân lá cây *V. lutescens* được thu hái tại Vĩnh Phúc. Sau đó, được thái nhỏ, phơi khô ở nhiệt độ 50°C rồi nghiền thành bột (7,0 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 (500 g).

Hòa tan cặn chiết metanol với nước cất (4 lít) rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi diclometan rồi đến 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 diclometan (VL1, 110,0 g), etyl axetat (VL2, 3,5 g) và dịch chiết nước (VL3).

Cặn chiết VL1 (110,0 g) 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 metanol trong diclometan là diclometan/metanol lần lượt theo tỷ lệ về thể tích là 20/1, 10/1, 5/1, 0/1 thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là VL1A đến VL1D.

Phân đoạn VL1B (11,2 g) trên sắc ký cột với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μ m, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải metanol/nước cất tỷ lệ 5/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt là VL1B1 đến VL1B4.

Hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic (6,9 mg) thu được ở dạng chất bột vô định hình màu trắng từ phân đoạn VL1B1 (0,3 g) sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere H-80 (150 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 70% trong nước, thời gian lưu t_R = 42,9 phút.

Hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic:

+ Công thức phân tử: $C_{30}H_{46}O_5$

+ Khối lượng phân tử: $M = 486$

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$: - 36,1 ($c = 0,1$, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 521.3045 $[M + Cl]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{46}O_5Cl]^-$, 521.3039).

+ 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 axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic

C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	53,3	2,13 (d, 12,0)
		2,43 (d, 12,0)
2	213,0	-
3	77,2	4,37 (s)
4	49,6	-
5	46,3	1,92 (br d, 11,5)
6	18,5	1,42 (m)/1,60 (m)
7	32,2	1,37 (m)/1,67 (m)
8	40,0	-
9	47,7	1,95 (m)

10	43,8	-
11	23,7	1,83 (m)/1,93 (m)
12	121,8	5,29 (br s)
13	144,5	-
14	41,6	-
15	27,9	1,13 (m)/1,74 (m)
16	23,3	1,62 (m)/1,98 (m)
17	46,7	-
18	42,2	2,85 (dd, 4,0, 13,5)
19	46,3	1,25 (d, 12,5)
		1,64 (m)
20	30,9	-
21	34,1	1,22 (m)/1,35 (m)
22	32,8	1,57 (m)/1,75 (m)
23	65,1	3,42 (d, 11,0) 3,44 (d, 11,0)
24	13,0	0,59 (s)
25	16,9	0,91 (s)
26	16,7	0,80 (s)
27	26,0	1,21 (s)
28	181,0	-
29	33,2	0,91 (s)
30	23,7	0,94 (s)

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác dụng ức chế sự hình thành các tế bào hủy xương của hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic (**1**)

Phương pháp thử nghiệm

Hoạt tính ức chế sự hình thành các tế bào hủy xương của hợp chất **1** trong sáng chế được thử nghiệm như sau:

Trong nghiên cứu này, các tác giả sáng chế tiến hành đánh giá hoạt tính chống loãng xương *in vitro* của hợp chất **1** trên dòng tế bào RAW264.7 được biệt hóa thành thể bào hủy xương (osteoclast).

Mẫu hợp chất **1** được pha thành dung dịch gốc với nồng độ 50 mM trong DMSO, sau đó pha loãng ở các nồng độ thích hợp.

Tế bào RAW264.7 đã được biệt hóa thành tế bào hủy xương được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường DMEM ở 37°C, 5% CO₂ với 10% FBS, penicillin và streptomycin. Sau đó, chúng được nuôi cấy trong phiên 96 giếng với mật độ 5 x 10⁴ tế bào/giếng. Sau 24 giờ, tế bào được xử lý với hợp chất thử nghiệm và bổ sung 1 μ L RANKL (100 ng/mL) vào tất

cả các giếng. Sau 48 giờ, tế bào được xử lý một lần nữa với hợp chất thử nghiệm và RANKL (100 ng/mL). Sau 24 giờ, loại bỏ dịch nuôi tế bào ở các giếng và rửa bằng nước cất.

Các tế bào hủy xương (osteoclasts) được cố định trong dung dịch chứa xitrat, axeton và 37% formaldehyt, tỷ lệ 25:65:8 trong 30 giây, sau đó rửa lại 3 lần bằng nước cất. Các tế bào được nhuộm màu TRAP bằng bộ kit axit phosphatase tế bào bạch cầu (acid phosphatase leukocyte) của hãng Sigma Aldrich (USA), bọc giấy bạc, ủ phiên 96 trong tủ ấm 37°C.

Sau 1 giờ, loại bỏ dung dịch nhuộm và rửa giếng bằng nước cất. Để cho dung dịch còn sót lại dưới đáy tự bay hơi, sau đó chụp ảnh quan sát sự phát triển của tế bào hủy xương dưới kính hiển vi. Các tế bào đa nhân dương tính với TRAP có hơn 3 nhân được coi là các tế bào hủy xương. Các mẫu có hoạt tính là các mẫu ngăn chặn thành công quá trình biệt hóa của đại thực bào thành tế bào hủy xương. Tiến hành đếm trực tiếp các tế bào thu được trên ảnh chụp.

Thảo luận

Kết quả hoạt tính ức chế sự hình thành các tế bào hủy xương của hợp chất **1** được thể hiện trong *Hình 1* và *Hình 2*. Cụ thể như sau:

Tế bào RAW 264,7 sau khi được xử lý với hợp chất **1** đã **ức chế đáng kể số lượng tế bào hủy xương** ở nồng độ 10 μ M (*Hình 1*).

Hợp chất này tiếp tục được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế sự hình thành các tế bào hủy xương theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Kết quả cho thấy, hợp chất **1** đã **ngăn chặn đáng kể sự biệt hóa tế bào hủy xương** do RANKL gây ra trên các tế bào RAW 264.7 (*Hình 2*). Hợp chất **1** cho thấy tác dụng ức chế sự hình thành của tế bào hủy xương mạnh bằng cách làm **giảm cả số lượng và kích thước của tế bào hủy xương, ức chế 60%** sự hình thành tế bào hủy xương ở nồng độ 10 μ M.

Rõ ràng là, sáng chế đã tạo ra hiệu quả bất ngờ về khả năng ức chế đáng kể số lượng tế bào hủy xương (**đến 60%** ở nồng độ 10 μ M) và ngăn chặn đáng kể sự biệt hóa tế bào hủy xương do RANKL gây ra.

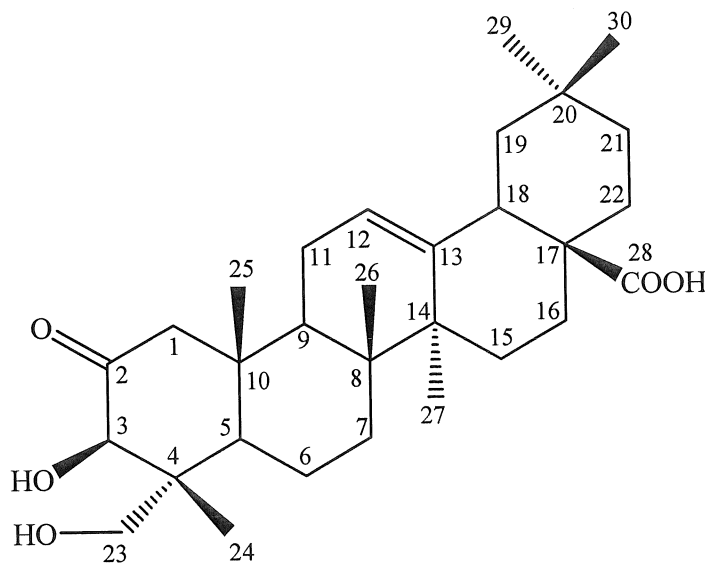
Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề xuất hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic và phương pháp phân lập hợp chất này từ loài *V. lutescens*. Hợp chất này thể hiện hoạt tính ức chế sự hình thành của tế bào hủy xương **đến 60%** ở nồng độ 10 μ M. 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 loãng xương 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 axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic có công thức (1):



(1)

2. Phương pháp phân lập hợp chất theo điểm 1 từ loài vót vàng nhạt *Viburnum lutescens* (*V. lutescens*), phương pháp này bao gồm các bước:

i) thái nhỏ, phơi khô mẫu thân lá cây *V. lutescens* ở nhiệt độ 50°C, nghiền thành bột, sau đó ngâm chiết siêu âm bột thu được 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;

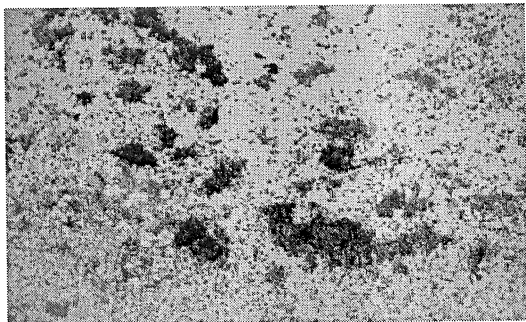
iii) hòa cặn chiết metanol với nước cất, chiết phân bố lần lượt bằng dung dịch diclometan và etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần với tỷ lệ về thể tích là 1/1;

iv) tiến hành loại bỏ dung môi của các dịch chiết dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết diclometan (VL1), etyl axetat (VL2) và dịch chiết nước (VL3);

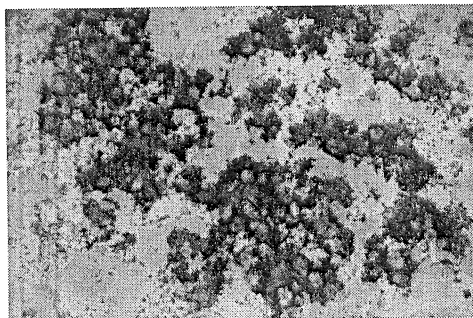
v) tiến hành phân tách cặn chiết VL1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel loại Kieselgel 60, cỡ hạt nằm trong khoảng từ 230 đến 400 mesh (hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol trong diclometan lần lượt theo tỷ lệ về thể tích của diclometan/metanol là 20/1, 10/1, 5/1, 0/1 thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là VL1A đến VL1D;

vi) tiếp tục phân tách phân đoạn VL1B trên sắc ký cột với chất hấp phụ là pha đảo loại RP-18, cỡ hạt nằm trong khoảng từ 30 đến 50 μm (hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải metanol/nước cất với tỷ lệ về thể tích là 5/1, thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu lần lượt là VL1B1 đến VL1B4;

vii) phân tách hợp chất axit 2-oxo-3 β ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic có công thức (1) ở dạng bột vô định hình, màu trắng từ phân đoạn VL1B1 bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere H-80 (250 $\times$ 20 mm) sử dụng dung môi axetonitril 70% trong nước, thời gian lưu t_R = 42,9 phút.

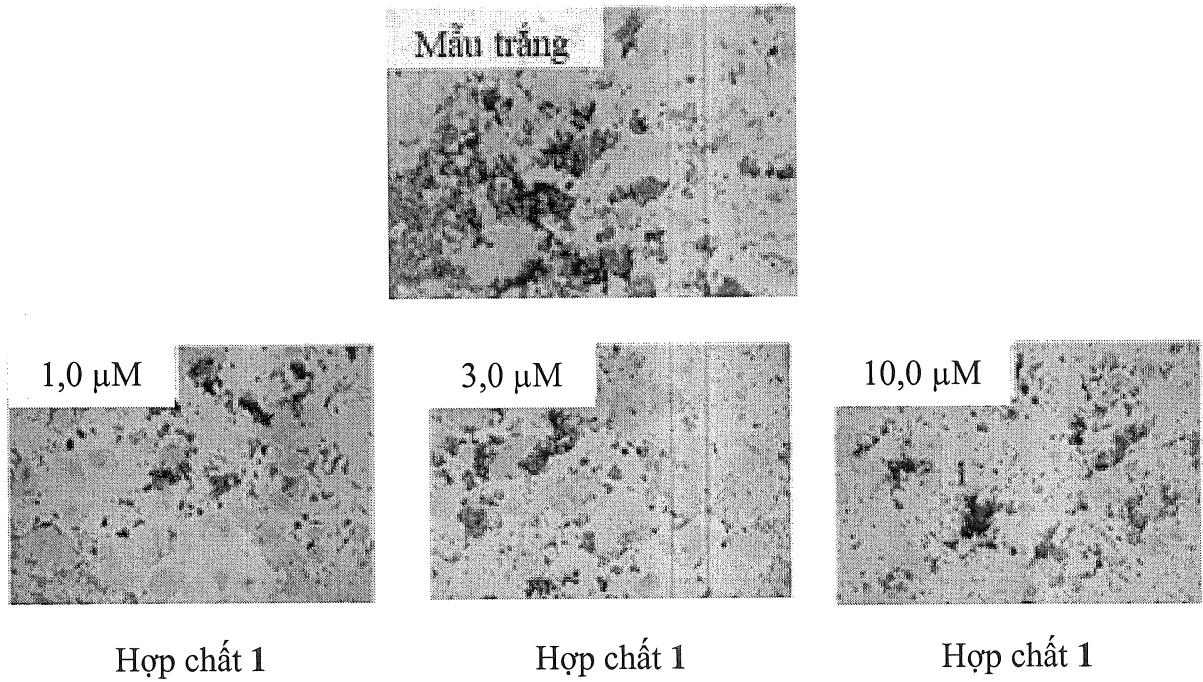


Hợp chất (1)



Đối chứng

Hình 1

**Hình 2**