



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0048691

(51)^{2022.01} C07D 311/00; A61K 31/00; A61P 35/00 (13) B

(21) 1-2023-08096

(22) 16/11/2023

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/01/2024 430A

(73) Trường Đại học Giao thông vận tải (VN)

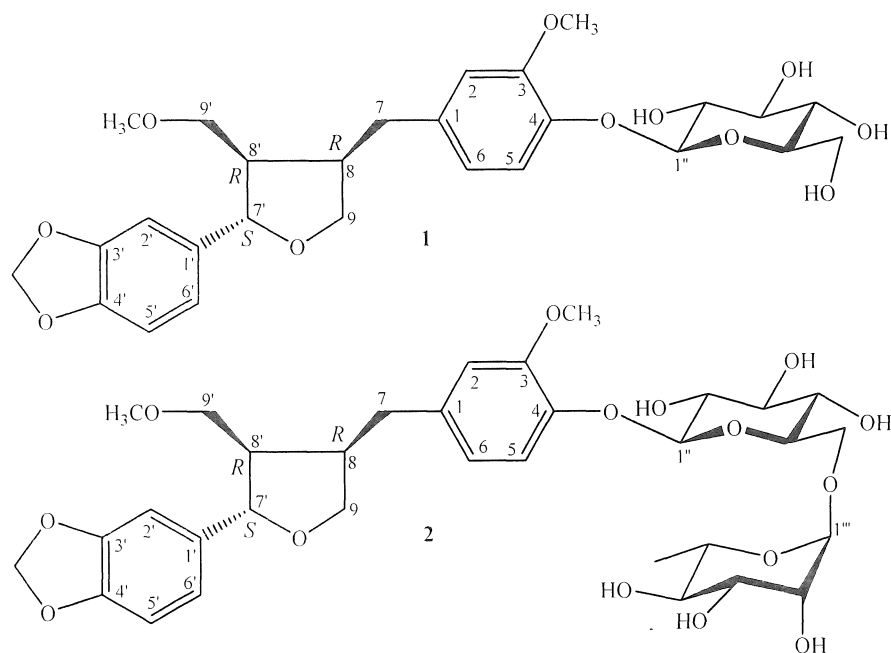
Số 3 đường Cầu Giấy, phường Láng Thượng, quận Đống Đa, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Mai (VN); Bùi Thị Mai Anh (VN); Trần Thúy Nga (VN); Lại Thị Hoan (VN); Phan Văn Kiệm (VN); Bùi Hữu Tài (VN); Bùi Thị Nha Trang (VN).

(54) HỢP CHẤT LIGNAN GLYCOSIT CÓ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM VÀ PHƯƠNG
PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI Ô RÔ HOA TÍM ACANTHUS
ILICIFOLIUS

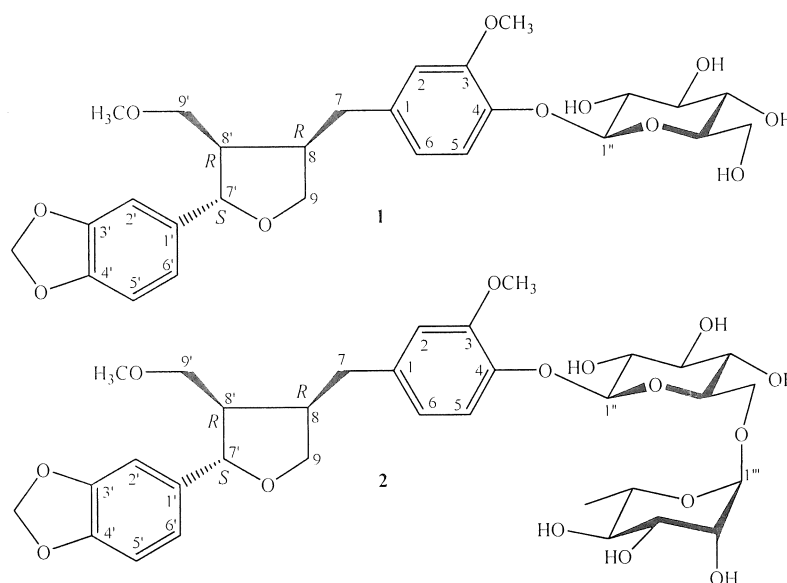
(21) 1-2023-08096

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất lignan glycosit có công thức dưới đây và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài *Acanthus ilicifolius* thu thập ở Nam Định. Hợp chất lignan glycosit theo sáng chế có tác dụng kháng viêm, 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/hỗ trợ điều trị các triệu chứng viêm.



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 kháng viêm nhằm phát triển các sản phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng chống viêm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hai hợp chất lignan glycosit có cấu trúc hóa học mới, được gọi là acaniliciosit A và acaniliciosit B, lần lượt có công thức (1) và (2):



Phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài ô rô hoa tím (*Acanthus ilicifolius*) và hợp chất theo sáng chế có tác dụng kháng viêm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

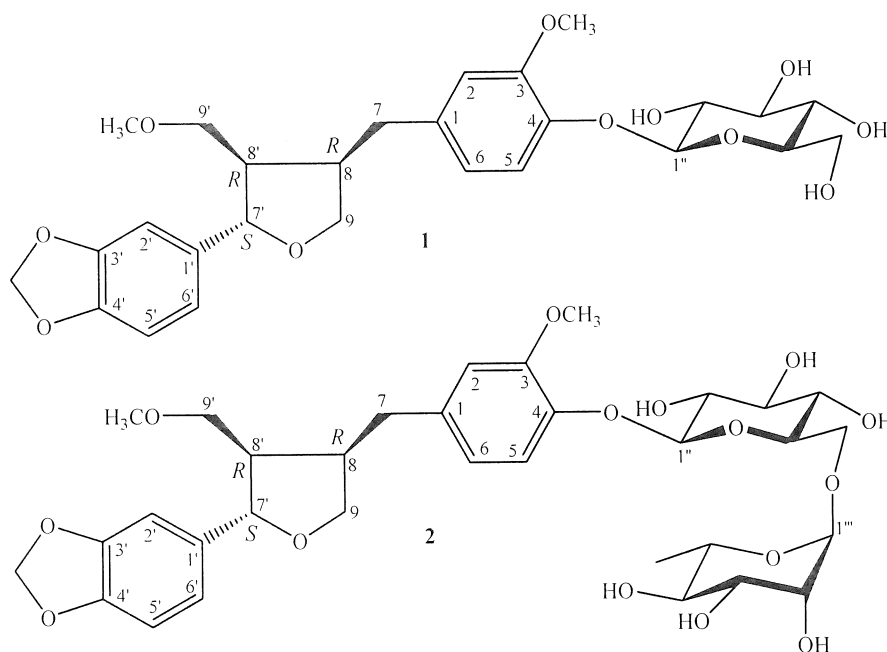
Viêm là một phần của phản ứng sinh học phức tạp của các mô của cơ thể đối với các kích thích có hại chẳng hạn như mầm bệnh, tế bào bị hư hỏng hoặc chất kích thích. Chức năng của viêm là loại bỏ nguyên nhân gây tổn thương tế bào, loại bỏ các hoại tử, các mô bị tổn thương từ sự xâm nhập ban đầu cũng như trong quá trình viêm và bắt đầu sửa chữa mô. Tuy nhiên, viêm không phải lúc nào cũng tốt cho cơ thể. Trong một số trường hợp, hệ thống miễn dịch chống lại các tế bào của cơ thể do nhầm lẫn, gây ra viêm nhiễm có hại. Chính vì thế, trong quá trình điều trị một số bệnh thường phải sử dụng thêm thuốc kháng viêm. Trong vòng hai thập kỷ gần đây, xu hướng quay lại sử dụng các sản phẩm thuốc có nguồn gốc thảo dược để phòng và trị bệnh trở nên phổ biến. Ở Việt Nam, *Acanthus ilicifolius* là một loại dược liệu được sử dụng rộng rãi để điều trị các triệu chứng viêm. Do vậy, việc điều tra, nghiên cứu về thành phần hóa học loài *Acanthus ilicifolius*, đặc biệt là việc phát hiện ra các hợp chất lignan glycosit mới từ loài *Acanthus*

ilicifolius sẽ có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao. Kết quả sẽ góp phần làm rõ giá trị cũng như công dụng của chi *Acanthus*, vì vậy, sẽ góp phần tích cực vào việc khai thác và sử dụng một cách hợp lý nguồn tài nguyên thiên nhiên của đất nước.

Trong khuôn khổ nghiên cứu, tập thể tác giả sáng chế đã đi sâu nghiên cứu thành phần hóa học của loài *Acanthus ilicifolius* và đã phân lập được hai hợp chất có cấu trúc hóa học mới là acaniliciosit A và acaniliciosit B. Hai hợp chất này thuộc lớp chất lignan glycosit, cấu trúc hóa học của chúng lần đầu tiên được công bố. Bên cạnh đó, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập và tác dụng kháng viêm thông qua ức chế sản sinh NO của hai hợp chất lignan glycosit mới. Hai hợp chất acaniliciosit A và acaniliciosit B ức chế sự sản sinh NO với giá trị IC_{50} lần lượt là $11,35 \pm 1,27$, $15,42 \pm 2,12$ μ M. Phương pháp phân lập hai hợp chất lignan glycosit từ loài *Acanthus ilicifolius* theo sáng chế là dễ dàng thực hiện và cho độ tinh khiết cao, có thể phát triển thực hiện để tạo sản phẩm có tính ứng dụng trong điều trị/hỗ trợ điều trị viêm hoặc sử dụng làm chất tham chiếu cho loài *Acanthus ilicifolius*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp chất lignan glycosit, trong đó hợp chất này là hợp chất được chọn từ các hợp chất có công thức sau:



Theo một phương án, hợp chất lignan glycosit là hợp chất acaniliciosit A có công thức (1).

Theo một phương án khác, hợp chất lignan glycosit là hợp chất acaniliciosit B có công thức (2).

Các hợp chất lignan glycosit bao gồm acaniliciosit A có công thức (1), acaniliciosit B có công thức (2) theo sáng chế thể hiện tác dụng kháng viêm và hữu dụng để phát triển thành các sản phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng chống viêm.

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

(i) mẫu *Acanthus ilicifolius* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 60 phút;

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

(iii) hòa tan dịch cô trong rượu metylic với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích. Phần nước sau khi chiết được đưa lên cột Diaion HP-20, rửa bằng nước sau đó rửa giải bằng rượu metylic trong nước (25, 50, 75 và 100% về thể tích rượu metylic) thu được 4 phân đoạn ký hiệu lần lượt từ AI1 đến AI4;

(iv) tiến hành phân tách phân đoạn AI2 trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hệ dung môi rửa là diclometan/rượu metylic tỉ lệ 7/1 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ AI2A-AI2D.

(v) tiếp tục tiến hành phân tách phân đoạn AI2B trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 150 µm, hãng sản xuất YMC Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải là rượu metylic/nước cất tỉ lệ 1/1 về thể tích, tạo ra bốn phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ AI2B1 đến AI2B4.

(vi) hợp chất acaniliciosit B có công thức (2) thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng từ phân đoạn AI2B3 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (250 × 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 18% trong nước.

(vii) tiến hành phân tách phân đoạn AI3 trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hệ dung môi rửa là diclometan/rượu metylic tỉ lệ 8/1 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ AI3A đến AI3D.

(viii) tiến hành phân tách phân đoạn AI3C trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 150 μm , hãng sản xuất YMC Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải là rượu metylic/nước cất tỉ lệ 1.2/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ AI3C1 đến AI3C3.

(ix) Hợp chất acanilicisot A có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng từ phân đoạn AI3C2 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (250 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 22 % trong nước.

Mô tả chi tiết sáng chế

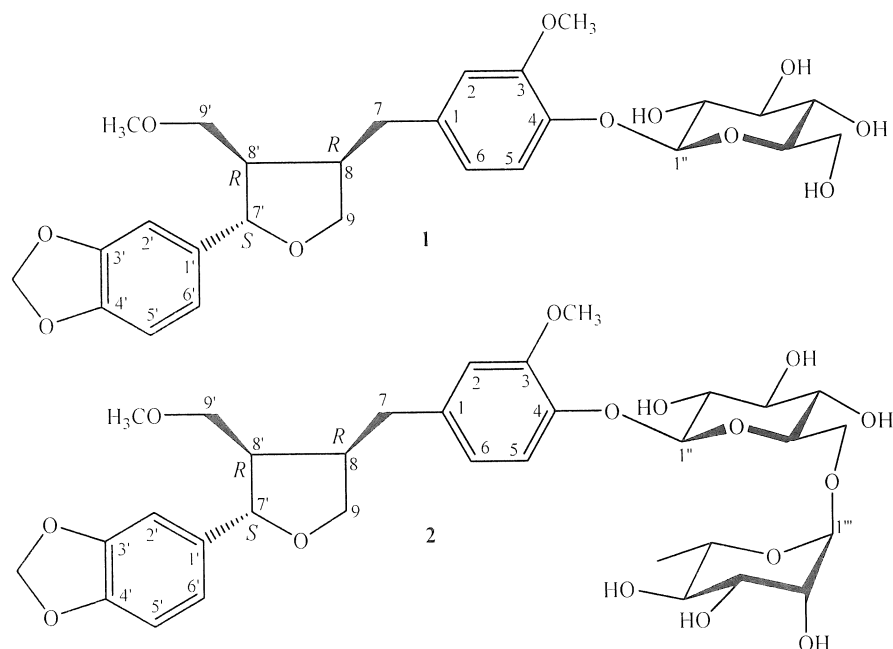
Sau đây, sáng chế còn được mô tả thông qua các phương án cụ thể minh họa và mô tả chi tiết hơn nữa cho sáng chế. Ngoài ra, cần phải hiểu rằng, các phương án cụ thể sau đây được mô tả chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế và sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể này. Rõ ràng là, người có 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.

Ngoài ra, trong bản mô tả này, mẫu *Acanthus ilicifolius* được thu tại Xuân Thủy, Nam Định, vào tháng 11 năm 2022. Tên khoa học được giám định bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Mẫu tiêu bản (NCCT-128) được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển. Mẫu *Acanthus ilicifolius* tươi được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm 3 lần, mỗi lần 60 phút, với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C sau đó tiến hành chiết xuất, phân lập, và xác định cấu trúc hóa học theo các phương pháp mô tả dưới đây: Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn (loại DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715) hoặc RP18 F254s (Merck)). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi đun nóng từ từ đến khi hiện màu. Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel hoặc pha đảo. Silica gel có cỡ hạt là 40-63 μm (230-400 mesh, Merck). Pha đảo RP-18 (150 μm , YMC Chemical Ltd). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy

Bruker AM500 FT NMR. Phổ khối lượng phân giải cao được đo trên máy Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS.

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



Các hợp chất lignan glycosit trên đây là các hợp chất có cấu trúc hóa học mới. Các thông số hóa-lý của các hợp chất này như sau:

Hợp chất acaniliciosit A (**1**):

+ Công thức phân tử: $C_{27}H_{34}O_{11}$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 534$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 569.1796 $[M+^{35}Cl]^-$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{27}H_{34}O_{11}^{35}Cl]^-$: 569.1795 và m/z 571.1790 $[M+^{37}Cl]^-$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{27}H_{34}O_{11}^{37}Cl]^-$: 571.1765;

Hợp chất acaniliciosit B:

+ Công thức phân tử: $C_{33}H_{44}O_{15}$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 680$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 715.2375 $[M+^{35}Cl]^-$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{33}H_{44}O_{15}^{35}Cl]^-$: 715.2374; và m/z 717.2359 $[M+^{37}Cl]^-$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{33}H_{44}O_{15}^{37}Cl]^-$: 717.2344).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập các hợp chất lignan glycosit có công thức (1) và (2) từ loài *Acanthus ilicifolius* như sau:

(i) mẫu *Acanthus ilicifolius* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 60 phút;

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

(iii) hòa tan dịch cô trong rượu metylic với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích. Phần nước sau khi chiết được đưa lên cột Diaion HP-20, rửa bằng nước sau đó rửa giải bằng rượu metylic trong nước (25, 50, 75 và 100% về thể tích rượu metylic) thu được 4 phân đoạn ký hiệu lần lượt từ AI1 đến AI4;

(iv) tiến hành phân tách phân đoạn AI2 trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hệ dung môi rửa là diclometan/rượu metylic tỉ lệ 7/1 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ AI2A-AI2D;

(v) tiếp tục tiến hành phân tách phân đoạn AI2B trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 150 μm , hãng sản xuất YMC Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải là rượu metylic/nước cất tỉ lệ 1/1 về thể tích, tạo ra bốn phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ AI2B1 đến AI2B4;

(vi) hợp chất acaniliciosit B có công thức (2) thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng từ phân đoạn AI2B3 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (250 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 18% trong nước.

(vii) tiến hành phân tách phân đoạn AI3 trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hệ dung môi rửa là diclometan/rượu metylic tỉ lệ 8/1 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ AI3A đến AI3D;

(viii) tiến hành phân tách phân đoạn AI3C trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 150 μm , hãng sản xuất YMC Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải là rượu metylic/nước cất tỉ lệ 1.2/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ AI3C1 đến AI3C3;

(ix) Hợp chất acanilicisot A có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng từ phân đoạn AI3C2 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (250 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 22 % trong nước.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập hai hợp chất lignan glycosit từ loài *Acanthus ilicifolius*

Mẫu *Acanthus ilicifolius* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với rượu metylic 3 lần ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần 60 phút rồi lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô rượu metylic (186 g);

Hòa tan dịch cô rượu metylic với nước cất (2 lít) rồi chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích. Phần nước sau khi chiết được đưa lên cột Diaion HP-20, rửa bằng nước sau đó rửa giải bằng rượu metylic trong nước (25, 50, 75 và 100% về thể tích rượu metylic) thu được 4 phân đoạn ký hiệu lần lượt từ AI1 đến AI4;

Tiến hành phân tách phân đoạn AI2 trên cột sắc ký ái lực (Φ 12 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là silica gel (Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải là diclometan/rượu metylic tỉ lệ 7/1 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ AI2A-AI2D;

Tiếp tục tiến hành phân tách phân đoạn AI2B trên cột sắc ký ái lực (Φ 8 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 150 μm , hãng sản xuất YMC Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải là rượu metylic/nước cất tỉ lệ 1/1 về thể tích, tạo ra bốn phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ AI2B1 đến AI2B4;

Hợp chất acanilicisot B có công thức (2) thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng từ phân đoạn AI2B3 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (250 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 18% trong nước.

Tiến hành phân tách phân đoạn AI3 trên cột sắc ký ái lực (Φ 12 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck)

với hệ dung môi rửa là diclometan/rượu metylic tỉ lệ 8/1 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ AI3A đến AI3D;

Tiến hành phân tách phân đoạn AI3C trên cột sắc ký ái lực (Φ 8 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 150 μ m, hãng sản xuất YMC Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải là rượu metylic/nước cất tỉ lệ 1.2/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ AI3C1 đến AI3C3;

Hợp chất acanilicisot A có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng từ phân đoạn AI3C2 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (250 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 22 % trong nước.

Các hợp chất thu được còn được tiến hành xác định các đặc tính hóa-lý. Kết quả được thể hiện sau đây.

Hợp chất acanilicisot A có công thức (1):

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 569.1796 $[M+^{35}\text{Cl}]^-$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_{11}^{35}\text{Cl}]^-$: 569.1795 và m/z 571.1790 $[M+^{37}\text{Cl}]^-$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_{11}^{37}\text{Cl}]^-$: 571.1765;

+ 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 acanilicisot A

STT	^{a, b} δ_{C}	^{a, c} δ_{H} (dạng pic $J = \text{Hz}$)
1	137.1	-
2	114.3	6.88 (d, 1.8)
3	150.9	-
4	146.4	-
5	118.3	7.11 (d, 8.0)
6	122.3	6.76 (dd, 8.0, 1.8)
7	33.9	2.92 (dd, 15.5, 5.0) 2.57 (dd, 15.5, 11.0)
8	43.9	2.74 (m)
9	73.7	3.99 (dd, 8.5, 6.5) 3.71 (dd, 8.5, 6.0)
1'	138.3	-
2'	107.3	6.85 (d, 1.8)
3'	149.3	-
4'	148.4	-
5'	108.9	6.78 (d, 8.0)
6'	120.4	6.80 (dd, 8.0, 1.8)

7'	84.2	4.77 (d, 7.0)
8'	51.8	2.41 (quin, 7.0)
9'	71.5	3.64 (dd, 9.5, 7.0) 3.47 [*]
3-OCH ₃	56.8	3.87 (s)
9'-OCH ₃	59.2	3.37 (s)
O-CH ₂ -O	102.3	5.94 (s)
Glc		
1''	103.1	4.87 (d, 8.0)
2''	75.0	3.50 [*]
3''	77.9	3.49 [*]
4''	71.4	3.41 [*]
5''	78.2	3.42 [*]
6''	62.6	3.70 (dd, 12.0, 5.0) 3.89 (dd, 12.0, 2.0)

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, ^{*}Tín hiệu bị chồng chập

Hợp chất acaniliciosit B có công thức (2):

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 715.2375 [$M+^{35}\text{Cl}$]⁻, tính toán lý thuyết cho công thức [$\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_{15}^{35}\text{Cl}$]⁻: 715.2374; và m/z 717.2359 [$M + ^{37}\text{Cl}$]⁻, tính toán lý thuyết cho công thức [$\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_{15}^{37}\text{Cl}$]⁻: 717.2344);

+ 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 rhabdaglostelone B

STT	^{a, b} δ _C	^{a, c} δ _H (dạng píc $J = \text{Hz}$)
1	137.2	-
2	114.4	6.89 (d, 1.8)
3	150.9	-
4	146.3	-
5	118.5	7.08 (d, 8.0)
6	122.3	6.78 (dd, 8.0, 1.8)
7	33.9	2.94 (dd, 15.5, 5.0) 2.56 (dd, 15.5, 11.0)
8	43.9	2.74 (m)
9	73.7	3.99 (dd, 8.5, 6.5) 3.71 (dd, 8.5, 6.0)
1'	138.2	-
2'	107.3	6.85 (d, 1.8)
3'	149.3	-
4'	148.4	-
5'	108.9	6.78 (d, 8.0)

6'	120.5	6.79 (dd, 8.0, 1.8)
7'	84.2	4.76 (d, 7.0)
8'	51.9	2.42 (quin, 7.0)
9'	71.5	3.63 (dd, 9.5, 7.0) 3.47 [*]
3-OCH ₃	56.8	3.87 (s)
9'-OCH ₃	59.2	3.37 (s)
O-CH ₂ -O	102.3	5.94 (s)
Glc		
1''	103.0	4.76 (d, 8.0)
2''	75.0	3.50 [*]
3''	77.9	3.47 [*]
4''	71.6	3.38 [*]
5''	77.0	3.53 [*]
6''	67.8	3.62 (dd, 12.0, 5.0) 4.02 (dd, 12.0, 2.0)
Rha		
1'''	102.1	4.72 (d, 1.5)
2'''	72.2	3.83 (dd, 3.0, 1.5)
3'''	72.4	3.69 (dd, 9.0, 9.0)
4'''	74.1	3.38 [*]
5'''	69.8	3.66 (m)
6'''	17.9	1.22 (d, 6.5)

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, ^{*}Tín hiệu bị chồng chập

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác dụng dược lý của hai hợp chất acaniliciosit A và acaniliciosit B

Hai hợp chất acaniliciosit A và acaniliciosit B theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW264.7

- Tế bào RAW 264.7 được đưa vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 2×10^5 tế bào/giếng và nuôi trong tủ ẩm ở 37°C và 5% CO₂ trong 24h.
- Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3h.
- Tế bào sau đó được ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2h trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (1 µg/mL) trong 24h.
- Một số giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm. Trong khi đối chứng dương được sử dụng là N^G-Methyl-L-arginin axetat (L-NMMA) ở các nồng độ 100, 20, 4, và 0.8 µM.

- Nitrit (NO_2^-), được xem là chỉ thị cho việc tạo NO, sẽ được xác định nhờ bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể là, 100 μL môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 μL Griess reagent: 50 μL of 1% (w/v) sulfanilamid trong 5% (v/v) acid phosphoric và 50 μL 0.1% (w/v) N-1-naphtylethylenediamin dihydroclorit pha trong nước.
- Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrit sẽ được đo bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank).
- Hàm lượng nitrit của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO_2 và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).
- Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định nhờ công thức :

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{sample}} / \text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] * 100$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

Bảng 3: Kết quả hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất tinosinodane trên tế bào BV2 được kích thích bằng LPS

Hợp chất	IC_{50} (μM)	% ức chế tế bào ở nồng độ 100 μM (%)
Acaniliciosit A	$11,35 \pm 1,27$	$92,5 \pm 2,7$
Acaniliciosit A	$15,42 \pm 2,12$	$96,3 \pm 3,5$
L-NMMA	$32,50 \pm 2,34$	$90,9 \pm 4,3$

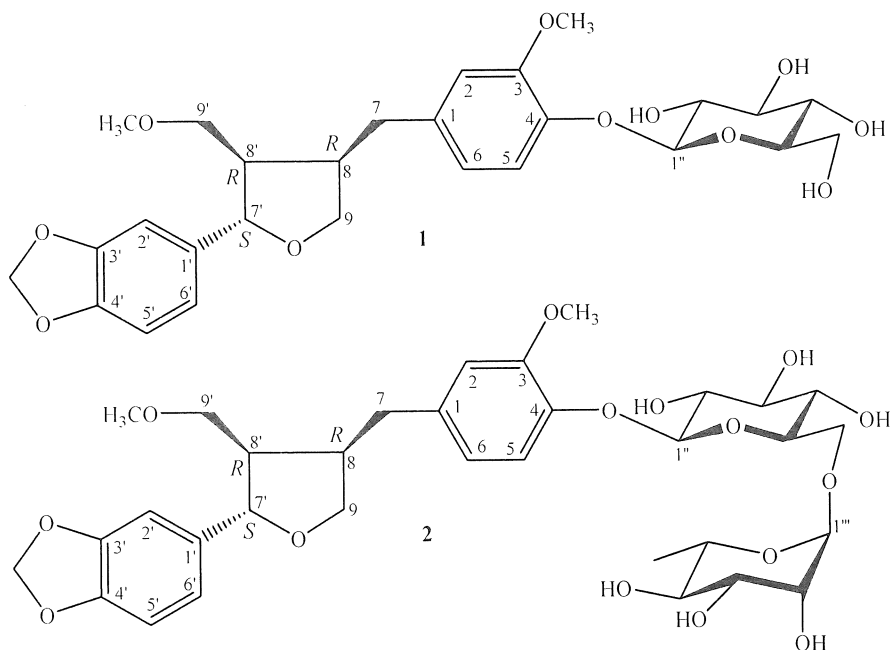
N^G -Methyl-L-arginin axetat (L-NMMA) là chất đối chứng dương

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập các hợp chất mới, acaniliciosit A và acaniliciosit B từ loài *Acanthus ilicifolius* thu thập tại Xuân Thủy, Nam Định. Các hợp chất này thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO tốt hơn so với chất đối chứng L-NMMA. 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 hỗ trợ điều trị viêm 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 lignan glycosit, trong đó hợp chất này là hợp chất được chọn từ các hợp chất công thức sau:



+ trong đó hợp chất này là hợp chất acaniliciosit A có công thức (1)

+ trong đó hợp chất này là hợp chất acaniliciosit B có công thức (2).

2. Phương pháp chiết các hợp chất lignan glycosit theo điểm 1 từ loài *Acanthus ilicifolius*, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) mẫu *Acanthus ilicifolius* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 60 phút;

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

(iii) hòa tan dịch cô trong rượu metylic với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích; phần nước sau khi chiết được đưa lên cột Diaion HP-20, rửa bằng nước sau đó rửa giải bằng rượu metylic trong nước (25, 50, 75 và 100% về thể tích rượu metylic) thu được 4 phân đoạn ký hiệu lần lượt từ AI1 đến AI4;

(iv) tiến hành phân tách phân đoạn AI2 trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hệ dung môi

rửa là diclometan/rượu metylic tỉ lệ 7/1 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ AI2A-AI2D;

(v) tiếp tục tiến hành phân tách phân đoạn AI2B trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 150 μm , hãng sản xuất YMC Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải là rượu metylic/nước cất tỉ lệ 1/1 về thể tích, tạo ra bốn phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ AI2B1 đến AI2B4;

(vi) hợp chất acaniliciosit B có công thức (2) thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng từ phân đoạn AI2B3 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (250 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 18% trong nước;

(vii) tiến hành phân tách phân đoạn AI3 trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hệ dung môi rửa là diclometan/rượu metylic tỉ lệ 8/1 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ AI3A đến AI3D;

(viii) tiến hành phân tách phân đoạn AI3C trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 150 μm , hãng sản xuất YMC Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải là rượu metylic/nước cất tỉ lệ 1,2/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ AI3C1 đến AI3C3;

(ix) Hợp chất acaniliciosit A có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng từ phân đoạn AI3C2 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (250 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 22 % trong nước.