



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0004349

(51) **A61K 31/56; C07J 9/00**
2024.01

(13) **Y**

(21) 2-2024-00059

(22) 02/12/2021

(67) 1-2021-07762

(45) 27/10/2025 451

(43) 25/04/2022 409A

(73) Trường Đại học Văn Lang (VN)

45 Nguyễn Khắc Nhu, phường Cô Giang, quận 1, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Nguyễn Hữu Hùng (VN); Dương Thúc Huy (VN); Nguyễn Thị Phương (VN); Phan Thị Phương Thanh (VN); Nguyễn Tiến Trung (VN); Phan Đặng Cẩm Tú (VN); Mai Đình Trị (VN); Jirapast Sichaem (TH); Nguyễn Ngọc Hồng (VN); Trần Công Luận (VN); Đào Thị Bích Ngọc (VN).

(54) **HỢP CHẤT COMBRETANONE G CÓ TÁC DỤNG GÂY ĐỘC ẦU TRÙNG GIUN
ĐUỠ CHÓ TOXOCARA CANIS VÀ TẾ BÀO UNG THƯ TỪ CÂY TRÂM BÀU
COMBRETUM QUADRANGULARE KUR**

(21) 2-2024-00059

(57) Giải pháp hữu ích đề xuất hợp chất Combretanone G và phương pháp cô lập hợp chất này từ lá cây trâm bầu *Combretum quadrangulare* Kurz. Hợp chất này có hoạt tính gây độc đối với ấu trùng giun đũa chó *Toxocara canis* và các dòng tế bào ung thư gồm HepG2 (tế bào ung gan), K562 (tế bào ung thư máu) và MCF7 (tế bào ung thư vú).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất combretanone G có tác dụng gây độc ấu trùng giun đũa chó *toxocara canis* và tế bào ung thư từ cây trám bầu *Combretum Quadrangulare* Kurz.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây Trám bầu có tên khoa học là *Combretum quadrangulare* Kurz, phân bố ở Nam Trung bộ và miền Nam Việt Nam, ngoài ra cây còn mọc ở Campuchia, Lào, Thái Lan, Mianma (Đỗ Tất Lợi, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học, 2019). Trong dân gian, trám bầu từ lâu đã được dùng như một dược liệu. Nhân dân miền Nam Việt Nam và Campuchia thường dùng hạt trám bầu như thuốc trị giun đũa, dùng phối hợp với lá mơ tam thể *Paederia tomentosa*.

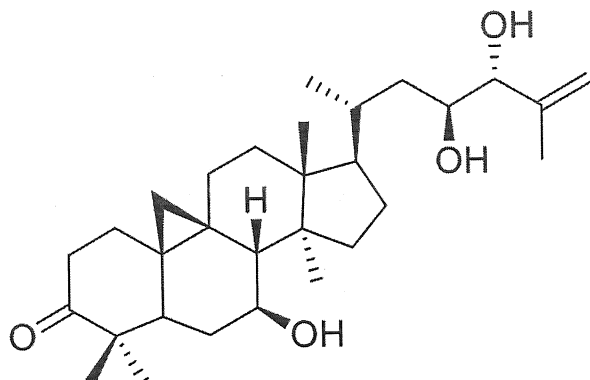
Năm 1988, một báo cáo nghiên cứu cho thấy hạt nghiền của trám bầu (Tiếng Thái gọi là Sakea naa) có tác dụng tẩy giun tròn *Neoscaris vitulorum* trên nghé. Liều dùng là 1 hạt, 1/2 hạt và 1/3 hạt cho 1 kg thể trọng, tương ứng với 54, 27 và 18 mg/kg thể trọng. Kết quả cho thấy không còn trứng của giun trong phân trong vòng 1 – 3 tuần sau khi uống 1 liều duy nhất. Nhóm nghiên cứu cũng kiểm tra độc tính (bằng đường uống) của hạt trám bầu khô ở chuột thí nghiệm, kết quả cho thấy liều 582 mg/kg và 1985 mg/kg không có ảnh hưởng đến sức khỏe của chuột và không có dấu hiệu ngộ độc sau khi uống 48 giờ (Euswas P et al., Studies on anthelmintic activity of Sakae Na (*Combretum quadramulare* Kurz) seeds on round worms of buffalo calves. *Đại học Kasetsart (Witthaya)* 1988, 22:201-208).

Từ năm 1998 đến năm 2011, nhiều hợp chất mới từ trám bầu được phát hiện, trong đó có nhiều hoạt chất có tác dụng gây độc tế bào ung thư đại tràng 26-L5 ở chuột, tăng cường biểu hiện của thụ thể chết 5 (DR5) và có 1 hợp chất có hoạt tính bài trừ tính kháng đối với phôi tử kích hoạt quá trình chết của tế bào liên quan đến yếu tố hoại tử khối u (TRAIL) (Banskota AH et al., Cytotoxic cycloartane-type triterpenes from *Combretum quadrangulare*. *Bioorg Med Chem Lett* 1998, 8(24):3519-3524; Banskota AH et al., Thirteen novel cycloartane-type triterpenes from *Combretum quadrangulare*. *J Nat Prod* 2000, 63(1):57-64; Banskota AH et al., Methyl quadrangularates A-D and related triterpenes from *Combretum quadrangulare*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2000, 48(4):496-504; Toume K et al., Cycloartane triterpenes isolated from *Combretum quadrangulare* in a screening program for death-receptor expression enhancing activity. *J Nat Prod* 2011, 74(2):249-255).

Khảo sát tổng quan năm 2014 cho thấy có 97 hợp chất được phát hiện từ cây trám bầu. Trong đó, hầu hết các hợp chất này thuộc nhóm triterpenoid và flavonoid với hoạt tính sinh học đa dạng gồm kháng khuẩn, kháng vi rút HIV, gây độc tế bào ung thư, bảo vệ gan (Roy R et al., *Combretum quadrangulare* (Combretaceae): Phytochemical Constituents and Biological activity. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* 2014, 4(8):3416-3427).

Bản chất của kỹ thuật giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất Combretanone G, được phân lập từ cây trám bầu *Combretum quadrangulare* Kurz có cấu trúc hóa học thể hiện như sau:

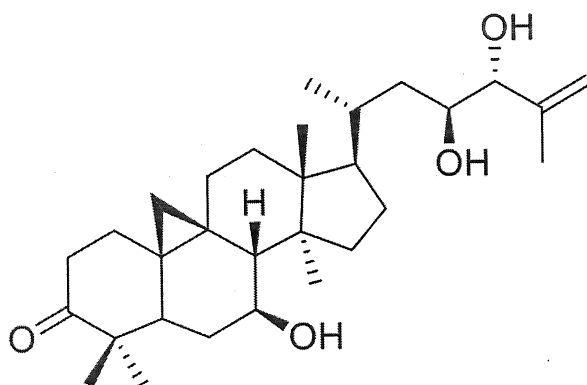


Mô tả vắn tắt hình vẽ

FIG.1 là cấu trúc hóa học của hợp chất Combretanone G từ lá cây trám bầu *Combretum quadrangulare* Kurz.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Theo FIG.1 giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất Combretanone G, được phân lập từ cây trám bầu *Combretum quadrangulare* Kurz có cấu trúc hóa học thể hiện như sau:



Theo đó, phương pháp cô lập hợp chất Combretanone G từ lá cây trám bầu bao gồm các bước:

- (i) Lá trám bầu *Combretum quadrangulare* Kurz được phơi trong phòng mát và làm khô bằng quạt máy.
- (ii) Lá trám bầu khô (3,5 kg) được nghiền nhỏ và chiết xuất với 10 lít ethanol ở 70 °C trong 8 giờ. Dịch lọc sau đó được cô quay làm khô ở điều kiện áp suất thấp để thu hồi cao thô (118,4 g).
- (iii) Cao thô sau đó được phân đoạn bằng các dung môi n-hexan, n-hexan:ethyl acetate (1:1), ethyl acetate và n-butanol. Cô quay các phân đoạn thu được tương ứng cao H (6,1 g), cao HEA (54,5 g), cao EA (30,0 g) và cao Bu (12,0 g).
- (iv) Cao HEA (54,5 g) được nạp lên sắc ký cột silica gel sử dụng pha động chứa n-hexan:ethyl acetate:acetone (5:1:1) thu được 14 phân đoạn (từ P1 đến P14), trong đó P1 (2,95

g), P2 (0,72 g), P3 (0,94 g), P4 (0,82 g), P5 (0,69 g), P6 (0,23 g), P7 (0,20 g), P8 (0,15 g), P9 (0,30 g), P10 (0,10 g), P12 (6,0 g), P13 (13,1 g) và P14 (20,1 g).

(v) Phân đoạn P12 (6,0 g) tiếp tục được nạp lên sắc ký cột silica gel sử dụng pha động chứa n-hexan:ethyl acetate:acetone (5:1:1) thu được 8 phân đoạn gồm T1 (1,3 g), T2 (0,2 g), T3 (0,3 g), T4 (1,0 g), T5 (1,2 g), T6 (0,3 g), T7 (0,12 g), T8 (0,5 g).

(vi) Phân đoạn T5 (1,2 g) tiếp tục được chạy sắc ký cột (CC) sử dụng hệ dung môi chứa n-hexan:CHCl₃:ethyl acetate:acetone:nước (3:1:2:2:0,01) thu được các phân đoạn T5.1 (130,0 mg), T5.2 (60,0 mg) và T5.3 (30,0 mg).

(vii) Phân đoạn T5.1 được chạy lại bằng sắc ký cột (CC) như bước (v) thu được hợp chất Combretanone G (4,7 mg).

Combretanone G được dùng để thử nghiệm hoạt tính gây độc đối với ấu trùng giun đũa chó *Toxocara canis* và các dòng tế bào ung thư gồm HepG2 (tế bào ung gan), K562 (tế bào ung thư máu) và MCF7 (tế bào ung thư vú). Kết quả thử nghiệm cho thấy Combretanone G có hoạt tính mạnh đối với ấu trùng *T. canis* so với chất đối chứng Albendazole và Mebendazole (Bảng 1) và có hoạt tính trung bình trên các dòng tế bào ung thư này so với chất đối chứng Doxorubicin (Bảng 2).

Bảng 1. Hoạt tính kháng ký sinh trùng của hợp chất Combretanone G trên ấu trùng *T. canis* ở ngày 2 và ngày 4.

Hợp chất	Độ di động tương quan (%)					
	Ngày 2			Ngày 4		
	Nồng độ hợp chất (µg/ml)			Nồng độ hợp chất (µg/ml)		
	5	50	250	5	50	250
Albendazole	100,0	97,0	102,2	98,6	93,7	70,1
Mebendazole	99,6	100,0	100,4	99,3	100,0	100,0
Combretanone G	72,4	44,5	39,9	50,2	34,9	35,1

Bảng 2. Giá trị IC₅₀ (µg/ml) của Combretanone G. Số liệu thể hiện giá trị trung bình ± sai số chuẩn của thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

Hợp chất	K562	HepG2	MCF-7
Combretanone G (1)	13,3 ± 1,1	20,0 ± 0,4	65,8 ± 3,4
Doxorubicin	2,2 ± 0,7	2,4 ± 0,2	13,9 ± 2,2

Ví dụ thực hiện sáng chế

1. Phương pháp tách chiết hợp chất Combretanone G

(i) Lá trâm bầu *Combretum quadrangulare* Kurz được phơi trong phòng mát và làm khô bằng quạt máy.

(ii) Lá tràem bầu khô (3,5 kg) được nghiền nhỏ và chiết xuất với 10 lít ethanol ở 70 °C trong 8 giờ. Dịch lọc sau đó được cô quay làm khô ở điều kiện áp suất thấp để thu hồi cao thô (118,4 g).

(iii) Cao thô sau đó được phân đoạn bằng các dung môi n-hexan, n-hexan:ethyl acetate (1:1), ethyl acetate và n-butanol. Cô quay các phân đoạn thu được tương ứng cao H (6,1 g), cao HEA (54,5 g), cao EA (30,0 g) và cao Bu (12,0 g).

(iv) Cao HEA (54,5 g) được nạp lên sắc ký cột silica gel sử dụng pha động chứa n-hexan:ethyl acetate:acetone (5:1:1) thu được 14 phân đoạn (từ P1 đến P14), trong đó P1 (2,95 g), P2 (0,72 g), P3 (0,94 g), P4 (0,82 g), P5 (0,69 g), P6 (0,23 g), P7 (0,20 g), P8 (0,15 g), P9 (0,30 g), P10 (0,10 g), P12 (6,0 g), P13 (13,1 g) và P14 (20,1 g).

(v) Phân đoạn P12 (6,0 g) tiếp tục được nạp lên sắc ký cột silica gel sử dụng pha động chứa n-hexan:ethyl acetate:acetone (5:1:1) thu được 8 phân đoạn gồm T1 (1,3 g), T2 (0,2 g), T3 (0,3 g), T4 (1,0 g), T5 (1,2 g), T6 (0,3 g), T7 (0,12 g), T8 (0,5 g).

(vi) Phân đoạn T5 (1,2 g) tiếp tục được chạy sắc ký cột (CC) sử dụng hệ dung môi chứa n-hexan:CHCl₃:ethyl acetate:acetone:nước (3:1:2:2:0,01) thu được các phân đoạn T5.1 (130,0 mg), T5.2 (60,0 mg) và T5.3 (30,0 mg).

(vii) Phân đoạn T5.1 được chạy lại bằng sắc ký cột (CC) như bước (v) thu được hợp chất Combretanone G (4,7 mg).

2. Đặc điểm và dữ liệu phổ của hợp chất Combretanone G

Combretanone G là chất bột màu trắng vô định hình có phổ ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz), ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) (Bảng 3) và HRESIMS m/z: [M + Na]⁺ 495.3439 tính toán lý thuyết cho C₃₀H₄₈O₄Na (calcd. 495.3450).

Bảng 3. Phổ ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) và ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) của hợp chất Combretanone G.

No.	Combretanone G (CDCl ₃)	
	δ _H	δ _C
1	1,60 m, 1.85 m	32,7
2	2,32 ddd (2,5,4,5,14,0)	37,2
	2,70 td (6,5, 13,5)	
3		215,9
4		49,8
5	1,90 m	46,8
6	1,15 m, 1,73 m	31,3
7	3,65 ddd (10,5; 9,5; 4,0)	70,8
8	1,69 m	54,8
9		21,0
10		26,7
11	1,32 m, 1,90 m	27,0

12	1,64 m, 1,85 m	33,0
13		46,1
14		48,6
15	1,49 m, 1,60 m	37,4
16	1,37 m, 1,96 m	28,4
17	1,68 m	53,4
18	1,03 s	17,6
19	0,56 d (4,5)	27,7
	0,95 d (4,5)	
20	1,72 m	33,5
21	0,90 d (6,5)	18,4
22	1,15 m, 1,66 m	39,6
23	3,86 ddd (10,5; 9,0; 2,0)	76,4
24	3,96 d (8,5)	85,7
25		141,9
26	4,94 hrs, 5,02 s	114,3
27	1,77 s	17,6
28	1,05 d (3,0)	22,3
29	1,10 s	20,8
30	0,94 s	19,0
	7-OH	
	23-OH	
	24-OH	

3. Nghiên cứu hoạt tính sinh học

a. Vật liệu và hóa chất

Môi trường DMEM và huyết thanh bào thai bò FBS được mua của Biowest. Môi trường RPMI 1640 được mua của Sigma. Kháng sinh Penicillin được mua của Mekophar. Kháng sinh Streptomycin được mua của Shandong Reyoung. MTT (3- (4, 5- dimethylthiazol - 2- yl) - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromid) và DMSO (dimethyl sulfoxide) được mua của Thermo Fisher. Doxorubicin 2mg/ml (tên thương mại Adrim) được mua của Fresenius Kabi. Dodecyl Sulfate Sodium (SDS), HCl, Albendazole và Mebendazole được mua của Merck.

Đĩa nhựa nuôi tế bào được mua của Corning. Máy đọc đĩa ELISA của Sunrise. Tủ cấy an toàn sinh học cấp 2 của Labtech. Tủ ấm nuôi tế bào của ESCO. Tế bào ung gan HepG2, tế bào ung thư máu K562 và tế bào ung thư vú MCF7 được cung cấp bởi Viện tế bào gốc và Trung tâm Công nghệ sinh học TP. HCM.

b. Phương pháp

Thử nghiệm ức chế ấu trùng T. canis

Ấu trùng *T. canis* được chuẩn bị trong phòng thí nghiệm theo phương pháp được mô tả trong bài báo khoa học được công bố năm 2017 của chúng tôi (Nguyen HH. et al., The 33.1 kDa excretory/secretory protein produced by *Toxocara canis* larvae serves as a potential common biomarker for serodiagnosis of toxocariasis in paratenic animals and human. *Iran J Parasitol.* 12 (1), 69–82). Giun trưởng thành được thu nhận từ chó con. Để thu trứng, giun đực và cái được nuôi trong dung dịch PBS bổ sung 1% huyết thanh người và kháng sinh penicillin (100 U/ml) và streptomycin (100 µg/ml) ở 37 °C, 5% CO₂ trong 7 ngày. Trứng được thu bằng ly tâm và ủ trong dung dịch PBS chứa 1% formalin trong 30 ngày ở nhiệt độ phòng. Sự hình thành phôi được quan sát bằng kính hiển vi đảo ngược. Để làm nở, trứng được ủ trong dung dịch NaClO 6% trong 5 phút ở nhiệt độ phòng và rửa 3 lần với dung dịch PBS vô trùng. Trứng sau đó được ủ với dung dịch Hank's balance saline pH 2.0 trong 30 phút. Trứng được tiếp tục rửa và ủ trong môi trường DMEM không huyết thanh, bổ sung kháng sinh penicillin (100 U/ml) và streptomycin (100 µg/ml) ở 37 °C, 5% CO₂. Trứng nở trong vòng 3 ngày. Ấu trùng được thu nhận bằng ly tâm và ấu trùng sống được lọc bằng rây 40 µm trong môi trường DMEM. Combretanone G được hòa trong DMSO ở nồng độ 10 mg/ml và sau đó được bổ sung vào các giếng nuôi cấy chứa môi trường DMEM để đạt nồng độ cuối là 5 µg/ml, 50 µg/ml và 250 µg/ml. Albendazole và Mebendazole được pha trong DMSO và được dùng làm chứng dương ở nồng độ tương đương với Combretanone G. DMSO được dùng làm đối chứng dung môi hòa tan. Sự chuyển động của ấu trùng được quan sát và đánh giá ở ngày 2 và 4 sau khi tiếp xúc với các hợp chất. Thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Chỉ số di động (Mobility Index – MI) và độ di động tương quan (Relative Mobility – RM) được tính dựa vào tiêu chí ở Bảng 4 và bằng công thức (1) và (2) như sau:

Bảng 4. Tiêu chí đánh giá hoạt tính ức chế ấu trùng *T. canis* của Combretanone G.

Trạng thái của ấu trùng	Điểm (n)
Di động bình thường, toàn thân	3
Di động chỉ 1 phần cơ thể	2
Bất động (chưa chết)	1
Chết	0

$MI = \sum n N_n / \sum N_n$, trong đó N_n là số ấu trùng có điểm tương ứng là n (1).

$RM = MI_{mẫu} / MI_{đối chứng} \times 100$ (2).

Nuôi cấy tế bào ung thư

Các dòng tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư vú MCF-7 được nuôi cấy với mật độ ban đầu là 10^4 tế bào/ml trong môi trường nuôi cấy DMEM được bổ sung 10% FBS, penicillin (100 IU/ml) và streptomycin (100 µg/ml). Dòng tế bào ung thư máu dòng lympho K562 được nuôi cấy ở mật độ ban đầu là 10^4 tế bào/ml trong môi trường nuôi cấy RPMI 1640 được bổ sung 10% FBS, penicillin (100 IU/ml) và streptomycin (100 µg/ml). Tế bào được nuôi trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂.

Thử nghiệm MTT đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của Combretanone G

Nguyên tắc: hợp chất MTT tham gia phản ứng oxy hoá khử với ti thể của tế bào và tạo thành các formazan dạng tinh thể. Có thể dùng một số dung dịch khác nhau để vừa phá hủy màng tế bào và hoà tan các tinh thể formazan, sau đó đo độ hấp thụ quang học của các dung dịch này ở bước sóng 595 nm. Phương pháp thử nghiệm này đánh giá sức sống của tế bào thông qua hoạt động hô hấp của chúng.

Combretanone G được pha trong dung môi DMSO ở nồng độ 10 mg/ml. Dung dịch chứa Combretanone G này và dung dịch Doxorubicin (chất đối chứng dương, 2mg/ml) được dùng để pha với môi trường nuôi cấy DMEM hoặc RPMI 1640 sao cho nồng độ cuối đạt 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 và 0 µg/ml.

Sau 24 giờ nuôi cấy (đối với tế bào HepG2) và 48 giờ nuôi cấy (đối với tế bào K562 và MCF7), môi trường nuôi tế bào được loại bỏ và thay thế bằng 100 µl môi trường nuôi cấy mới chứa nồng độ khác nhau của Combretanone G và Doxorubicin được nêu trên. Ủ tế bào trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂ trong 72 giờ. Thêm 10 µl MTT (5 mg/ml) vào mỗi giếng nuôi tế bào. Tiếp tục ủ tế bào trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂ trong 3,5 giờ. Thêm 70 µl dung dịch ly giải tế bào (chứa 10% SDS và 0,01 M HCl) vào mỗi giếng và ủ tế bào trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂ trong 16 giờ. Đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 595 nm. Vẽ đồ thị thể hiện phần trăm số tế bào chết bằng phần mềm Prism v5.0. Tỷ lệ tế bào chết được tính theo công thức sau:

$$I (\%) = 100 - 100 * (A_{595nm \text{ mẫu}} - A_{595nm \text{ nền}}) / (A_{595nm \text{ DMSO}} - A_{595nm \text{ nền}})$$

Trong đó:

I (%): phần trăm tế bào chết.

$A_{595nm \text{ mẫu}}$: giá trị mật độ quang ở bước sóng 595 nm của tế bào đã được thử nghiệm với Combretanone G hoặc Doxorubicin.

$A_{595nm \text{ nền}}$: giá trị mật độ quang ở bước sóng 595 nm của đối chứng trắng.

$A_{595nm \text{ DMSO}}$: giá trị mật độ quang ở bước sóng 595 nm của tế bào nuôi trong môi trường nuôi cấy chứa DMSO (ở nồng độ tương ứng với các giếng chứa mẫu thử nghiệm).

Giá trị IC₅₀ được tính bằng phương pháp đồ thị, giá trị được thể hiện là giá trị trung bình kèm theo độ lệch chuẩn. Phương pháp thống kê được sử dụng là Unpaired T-test with Welch's correction. Số liệu coi là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

c. Phân tích kết quả

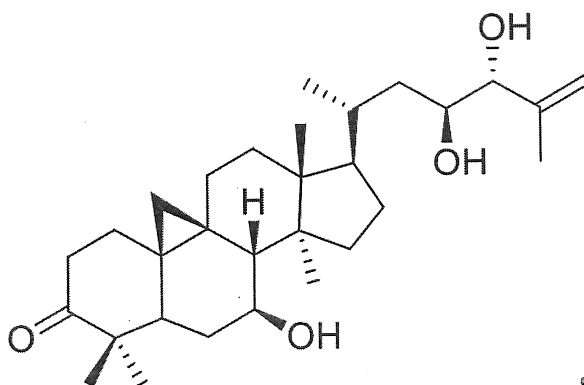
Kết quả thử nghiệm cho thấy Combretanone G có hoạt tính mạnh so với chất đối chứng Albendazole và Mebendazole đối với ấu trùng *T. canis* thông qua chỉ số RM (Bảng 1) và có hoạt tính trung bình so với chất đối chứng Doxorubicin trên ba dòng tế bào ung thư gồm tế bào ung thư gan HepG2, tế bào ung thư máu K562 và tế bào ung thư vú MCF7 (Bảng 2).

Những lợi ích có thể đạt được của giải pháp hữu ích

Combretanone G là một hợp chất mới được phát hiện và cô lập lần đầu tiên từ lá cây trâm bầu *Combretum quadrangulare* Kurz. Chất này có hoạt tính gây độc đối với ấu trùng giun đũa chó *Toxocara canis* và các dòng tế bào ung thư gồm HepG2 (tế bào ung gan), K562 (tế bào ung thư máu) và MCF7 (tế bào ung thư vú) và cần được tiếp tục nghiên cứu hoạt tính sinh học để ứng dụng làm sản phẩm dùng trong điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh nhiễm ký sinh trùng *Toxocara* spp. và ung thư.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất Combretanone G cô lập từ lá cây trám bầu (*Combretum quadrangulare* Kurz) có tác dụng gây độc ấu trùng giun đũa chó *toxocara canis* và tế bào ung thư, có cấu tạo hóa học thể hiện như sau:



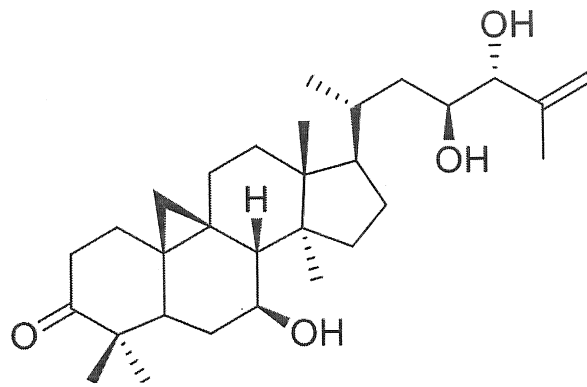


FIG.1