



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

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



1-0052331

(51)^{2021.01} A61K 36/00; C01B 32/182; A61K 47/00 (13) B

(21) 1-2022-02989

(22) 12/05/2022

(45) 27/10/2025 451

(43) 25/07/2022 412A

(73) Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ lọc hóa dầu (VN)

Số 2 Phạm Ngũ Lão, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

(72) VŨ THỊ THU HÀ (VN); ÂU THỊ HẰNG (VN).

(54) CHẾ PHẨM TỔ HỢP CHỨA TAGITININ C TỪ LÁ CÚC QUỲ TITHONIA
DIVERSIFOLIA (HEMSLEY) A.GRAY VÀ GRAPHEN CHẤM LƯỢNG TỬ HỮU
DỤNG ĐỂ SẢN XUẤT DƯỢC PHẨM ĐIỀU TRỊ UNG THƯ HƯỚNG ĐÍCH VÀ
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM TỔ HỢP NÀY

(21) 1-2022-02989

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm tổ hợp hữu dụng để làm nguyên liệu trong sản xuất dược phẩm điều trị ung thư hướng đích, đạt hiệu quả cao trong ngăn ngừa và ức chế khối u phát triển, an toàn với tế bào thường, đồng thời có giá thành thấp bao gồm thành phần hoạt chất tagitinin C (TC) phân lập từ lá cúc quỳ *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray được gắn lên bề mặt của thành phần mang hoạt chất tới đích là graphen chấm lượng tử được biến tính bề mặt. Đồng thời, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm tổ hợp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm tổ hợp mới, trong đó hoạt chất tagitinin C (TC) phân lập từ lá cúc quỳ *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray được gắn lên bề mặt của thành phần mang hoạt chất tới đích là graphen chấm lượng tử, nhằm làm nguyên liệu trong sản xuất được phẩm điều trị ung thư hướng đích, đạt hiệu quả cao trong ngăn ngừa và ức chế khối u phát triển, an toàn với tế bào thường, đồng thời có giá thành thấp. Đồng thời, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong số các loại bệnh, ung thư luôn là mối quan tâm trên toàn cầu. Theo WHO, năm 2008 thế giới có 12,6 triệu người mắc ung thư, trong đó có 7,5 triệu người tử vong. Đến năm 2015, có khoảng 90,5 triệu người bị ung thư. Mỗi năm có 14,1 triệu người mắc mới, trong đó, tử vong 8,8 triệu (15,7%), với khoảng 70% các ca tử vong do ung thư xảy ra ở các nước có thu nhập thấp và thu nhập trung bình. Nguyên nhân chủ yếu là các liệu pháp điều trị ung thư trong đó có các thuốc chống ung thư thường đòi hỏi chi phí sản xuất rất lớn kéo theo giá thành sản phẩm cao khiến cho các bệnh nhân nghèo không có điều kiện chữa trị. Điều đáng nói là 30% số ca bệnh ung thư có thể chữa được nếu được áp dụng các biện pháp y tế kịp thời.

Trong số 185/204 quốc gia có báo cáo thống kê về tình hình bệnh ung thư (theo *GLOBOCAN, năm 2020*), Việt Nam xếp thứ 91/185 về tỷ suất mắc mới và thứ 50/185 về tỷ suất tử vong trên 100.000 người. Thứ hạng này tương ứng của năm 2018 là 99/185 và 56/185. Tình hình này cũng tương tự với nhiều quốc gia trên thế giới, trong đó có các quốc gia phát triển như Anh, Pháp, Ý, Nhật Bản, Hàn Quốc, Thái Lan, Hoa Kỳ (Nguồn: Bộ Y Tế).

Có nhiều phương pháp điều trị ung thư, như phẫu thuật, xạ trị, hóa trị, miễn dịch... Những năm gần đây có thêm liệu pháp nhắm trúng đích, được đánh giá rất hiệu quả, giúp

bệnh nhân kéo dài sự sống. Đây là phương pháp trị ung thư bằng cách uống thuốc. Mỗi loại ung thư sẽ có loại thuốc đích khác nhau. Khác với điều trị bằng hóa chất, tia xạ, khi vào cơ thể, thuốc đích chỉ tiêu diệt các tế bào ung thư mà không làm tổn thương các tế bào khỏe mạnh. Khối u bị ngăn chặn sự phát triển, ngừng lan rộng, thậm chí tiêu biến. Mặc dù vậy, quá trình điều trị ung thư thường kéo dài và tốn rất nhiều chi phí. Vì thế, tìm kiếm các chế phẩm ngăn ngừa và điều trị ung thư hiệu quả, có giá thành thấp nhằm giảm gánh nặng kinh tế cho bệnh nhân ung thư là nỗ lực chung của các nhà nghiên cứu y dược học trên toàn thế giới.

Đối với hướng nghiên cứu về các hoạt chất hỗ trợ điều trị ung thư có nguồn gốc từ tự nhiên, các tác giả của sáng chế này đã phát hiện ra rằng cao chiết từ lá cúc quỳ *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray, có hoạt tính chống ung thư (Vũ Thị Thu Hà và cộng sự, Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích số 1489 - Phương pháp sản xuất cao chiết từ lá cúc quỳ (*Tithonia Diversifolia* (Hemsley) A. Gray) có hoạt tính chống ung thư, Quyết định số 5429/QĐ-SHTT ngày 24/01/2017). *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray, thuộc họ cúc (Asteraceae) là một cây thuốc cổ truyền của châu Mỹ hiện nay đã được tự nhiên hóa, mọc phổ biến ở rất nhiều nơi ở Việt Nam, đặc biệt là ở vùng Tây Nguyên và Tây Bắc (cây có tên gọi là cúc quỳ hay còn gọi dã quỳ, son quỳ biển điệp, quỳ đại, hướng dương đại, hướng dương Mexico, cúc Nitobe). Theo đó, cao chiết được điều chế dựa trên cơ sở dịch chiết giàu các hợp chất sesquiterpen lacton, trong đó hàm lượng tagitinin C nằm trong khoảng 25 – 40% khối lượng. Trên các dòng tế bào ung thư cơ (RD), ung thư vú người dạng di căn (MCF-7), ung thư phổi ở người (A549), ung thư dạ dày (HGC-270), chế phẩm thể hiện hoạt tính chống ung thư mạnh với giá trị IC₅₀ lần lượt là 0,096, 0,44, 0,22 và 0,31 µg/ml. Giá trị IC₅₀ của đối chứng dương ellipticin (ellipticine) trong các thử nghiệm tương ứng là 0,31, 0,48, 0,44 và 0,42 µg/ml. Trước đó, các tác giả cũng đề xuất quy trình phân lập tagitinin C từ lá cúc quỳ (Vũ Thị Thu Hà và cộng sự, Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích số 1813 - Quy trình phân lập tagitinin C từ lá cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*), quyết định số 55250/QĐ-SHTT ngày 06/08/2018). Như vậy, có thể thấy, hoạt chất tagitinin C từ lá cúc quỳ là một loại nguyên liệu đầy tiềm năng để sản xuất dược phẩm điều trị ung thư với hiệu quả cao, phổ điều trị rộng và có giá thành thấp, do được sản xuất một cách đơn giản và dễ dàng từ nguồn nguyên liệu rất sẵn có, dễ thu hái ở Việt Nam.

Tagitinin C đã được biết đến có nhiều tiềm năng về dược chất bởi các đặc tính sinh học và dược lý như kháng khuẩn, chống viêm, chống ký sinh trùng, sốt rét và chống ung thư. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng nhóm chức α -metylen- γ -lacton (α MyL), cấu trúc vòng có chứa oxy cùng nhóm chức carbonyl là nhóm chính tạo nên hoạt tính sinh học của tagitinin C. Các nghiên cứu về hiệu quả của các sesquiterpenlacton chứa nhóm xeton α , β -chưa bão hòa thay vì nhóm α MyL đối với việc gây chết tế bào ung thư gợi ý rằng nhóm chức chính quyết định hoạt tính là thành phần carbonyl chưa bão hòa có trong nhóm α MyL chứ không phải bản thân nhóm lacton. Nghiên cứu này cũng cho thấy các phân tử có cả nhóm α MyL và nhóm xeton α , β -chưa bão hòa có hoạt tính gây độc tế bào cao nhất. Sự vắng mặt của các nhóm xeton α , β -chưa bão hòa trong tagitinin C không cải thiện hoặc làm giảm hoạt tính gây độc tế bào của nó đối với các tế bào ung thư (HL-60). Một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng dẫn xuất của tagitinin C chỉ có một nhóm xeton α , β -chưa bão hòa có hoạt tính tương tự với tagitinin C có chứa ba nhóm xeton α , β -chưa bão hòa, nhóm hydroxyl (-OH) và este không có vai trò về hoạt tính sinh học trong tagitinin C đối với các tế bào ung thư. Ngoài ra trong hầu hết các trường hợp, việc đưa nitơ vào vị trí β của tagitinin C có thể tạo ra một thể liên kết hydro bổ sung và kiểm soát tính chọn lọc của tâm lập thể được hình thành. Điều này có thể làm cho các dẫn xuất mới tăng khả năng hòa tan trong nước, cải thiện đặc điểm dược động học và duy trì hoặc thậm chí tăng hoạt tính sinh học của các phân tử ban đầu.

Tuy tagitinin C có hoạt tính sinh học cao trong điều trị ung thư, nhưng các kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả cũng cho thấy nhược điểm của hoạt chất tagitinin C là không có tính chọn lọc cụ thể với tế bào ung thư, nồng độ điều trị cục bộ thấp và có độc tính trên tế bào thường cao, tương tự như các hoạt chất chống ung thư khác. Do đó, cần thiết phải tạo ra chế phẩm trên cơ sở tagitinin C phân lập từ lá cúc quỳ có hoạt tính kháng ung thư cao nhưng an toàn đối với các tế bào thường, nhằm làm nguyên liệu để sản xuất dược phẩm điều trị ung thư hiệu quả cao, an toàn, có giá thành thấp.

Graphen chấm lượng tử (GQDs), một loại vật liệu nano phát quang không chiều (0D) mới, là những mảnh graphen đủ nhỏ để có thể gây ra sự giới hạn kích thích trong các hạt 3–20 nm và hiệu ứng kích thước lượng tử. Là một thành viên của họ graphen và vật liệu nano carbon, GQDs có một số lợi thế so với các hạt nano khác trong ứng dụng phân phối

thuốc do độc tính thấp, tỷ lệ bề mặt/thể tích lớn và khả năng chức năng hóa bề mặt lớn (Pardo *et al.* 2018, Chong *et al.* 2014). So với các dạng chất mang nano truyền thống khác, chẳng hạn polyetylen glycol (PEG), GQDs có thể cung cấp nhiều vị trí liên kết hơn và cải thiện khả năng hấp thụ tế bào (Some *et al.* 2014). So với các chấm lượng tử kim loại có kích thước tương tự, GQDs thể hiện các đặc tính vượt trội như hiệu ứng giam giữ lượng tử, độc tính tương đối thấp, do không chứa các thành phần kim loại. Chẳng hạn, curcumin được mang trên GQDs cho hoạt tính kháng khuẩn và chống ung thư hiệu quả cao so với GQDs và curcumin riêng rẽ; hoặc GQDs có khả năng mang thuốc chống ung thư ưa nước có chứa vòng thơm, như DOX và CPT với tải lượng cao (Alani *et al.* 2020).

Tuy nhiên, cho đến nay chế phẩm tổ hợp chứa tagitinin C được gắn trên vật liệu mang thuốc nói chung và vật liệu graphen chấm lượng tử (GQDs) nói riêng, chưa từng được biết đến và chưa có tài liệu nào đề cập đến chế phẩm tổ hợp này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm hữu dụng để điều trị ung thư hướng đích, đạt hiệu quả cao trong ngăn ngừa và ức chế khối u phát triển, an toàn với tế bào thường, đồng thời có giá thành thấp.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm này.

Để đạt được các mục đích nêu trên, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm tổ hợp chứa :

- (i) thành phần hoạt chất là tagitinin C phân lập từ lá cúc quỳ, và
- (ii) thành phần mang hoạt chất tới đích là graphen chấm lượng tử (GQDs) đã được biến tính bề mặt.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm tổ hợp chứa:

hoạt chất tagitinin C (TC) phân lập từ lá cúc quỳ *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray được gắn lên bề mặt của thành phần mang hoạt chất tới đích là graphen chấm lượng tử (GQDs) được biến tính bề mặt, có hoạt tính kháng ung thư cao nhưng an toàn đối với các tế bào thường, làm nguyên liệu trong sản xuất dược phẩm điều trị ung thư hiệu quả cao, an toàn, có giá thành thấp.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm tổ hợp chứa hoạt chất tagitinin C (TC) và graphen chấm lượng tử (GQDs) được biến tính bề mặt

này bằng carboxyl hóa bằng axit hữu cơ, trong đó hoạt chất tagitinin C (TC) được gắn lên thành phần mang hoạt chất tới đích, thông qua phản ứng este hóa.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm tổ hợp chứa hoạt chất tagitinin C (TC) và graphene chấm lượng tử (GQDs) được biến tính bề mặt bằng diamin hóa, trong đó hoạt chất tagitinin C (TC) được gắn lên thành phần mang hoạt chất tới đích, thông qua phản ứng cộng Michael.

Phương pháp sản xuất chế phẩm tổ hợp chứa hoạt chất tagitinin C (TC) và graphene chấm lượng tử (GQDs) được biến tính bề mặt bao gồm các bước sau:

- (i) Chiết tách và tinh chế tagitinin C (TC) từ lá cóc quỳ;
- (ii) Tổng hợp graphene chấm lượng tử (GQDs);
- (iii) Biến tính bề mặt GQDs;
- (iv) Gắn TC lên bề mặt GQDs được biến tính bề mặt;
- (v) Đông khô để thu được chế phẩm tổ hợp dạng bột.

Theo một khía cạnh cụ thể, chế phẩm tổ hợp có công thức là GQDs-EBE-TC hoặc GQDs-EBE-TC.

Đồng thời, sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa chế phẩm tổ hợp theo sáng chế và các chất mang dược dụng, hữu dụng để điều trị ung thư hướng đích, đạt hiệu quả cao trong ngăn ngừa và ức chế khối u phát triển, an toàn với tế bào thường.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện phổ FT-IR của các mẫu graphene chấm lượng tử (GQDs), GQDs-COOH, GQDs-DD-TC và tagitinin C (TC).

Hình 2 thể hiện hình ảnh hiển vi điện tử truyền qua (TEM) của GQDs, và GQDs-DD-TC.

Hình 3 thể hiện phổ FT-IR của GQDs, EBE, GQDs-EBE, GQDs-EBE-TC và TC.

Hình 4 thể hiện hình ảnh hiển vi điện tử truyền qua (TEM) của GQDs, GQDs-EBE và GQDs-EBE-TC.

Hình 5 là sơ đồ minh họa phương pháp chiết xuất tagitinin C từ lá cóc quỳ, trong đó phân đoạn (a) 0-10% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (b) 10-30% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (c) 30-50% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (d) 50-70% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (e) 70-100% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (f) 1-20% metanol/etyl axetat.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “biến tính bề mặt” được sử dụng trong sáng chế này có nghĩa là dùng phản ứng hóa học để gắn thêm một số nhóm chức cần thiết lên bề mặt của graphene chấm lượng tử (GQDs) như nhóm carbonyl, amin.

Thuật ngữ “phản ứng este hóa” được sử dụng trong sáng chế này có nghĩa là phản ứng của nhóm -COOH trên bề mặt của GQDs với nhóm -OH trong tagitinin C.

Thuật ngữ “phản ứng cộng Michael” được sử dụng trong sáng chế này có nghĩa là phản ứng cộng nucleophilic của một nucleophil (amin) vào hợp chất có chứa nhóm α,β -chưa bão hòa (Tagitinin C).

Tagitinin C có tên theo danh pháp IUPAC là [(3*aR*, 4*R*, 6*R*, 7*Z*, 10*Z*, 11*aR*)-6-hydroxy-6,10-dimetyl-3-metyliden-2,9-dioxo-3*a*,4,5,11*a*-tetrahydroxycyclodeca[b]furan-4-yl] 2-metylpropanoat là thành phần hoạt chất của chế phẩm tổ hợp theo sáng chế.

Thuật ngữ “dược phẩm điều trị ung thư hướng đích” được sử dụng trong sáng chế này có nghĩa là thuốc ngăn ngừa và ức chế sự phát triển của khối u chứa chế phẩm tổ hợp hoặc dẫn xuất của nó, làm thành phần hoạt tính và chất mang dược dụng.

Thuật ngữ “GQDs-DD-TC” được sử dụng trong sáng chế này là chế phẩm tổ hợp được điều chế bằng cách gắn tagitinin C lên trên bề mặt của graphene chấm lượng tử (GQDs) sau khi được biến tính bằng carboxyl hóa bởi phản ứng este hóa, sử dụng chất xúc tác là hỗn hợp của dimetylaminopyridin và dicyclohexylcarbodiimide (viết tắt là DD).

Thuật ngữ “GQDs-EBE-TC” được sử dụng trong sáng chế này là chế phẩm tổ hợp được điều chế bằng cách gắn tagitinin C lên trên bề mặt của graphene chấm lượng tử (GQDs) sau khi được diamin hóa bởi diamin (một trong diamin có thể sử dụng là 2,2'-(etylendioxy)bis(etylamin)) (viết tắt là EBE) bởi phản ứng cộng Michael.

Thuật ngữ “% ức chế tế bào” trong sáng chế này là % tế bào bị ức chế tại nồng độ hoạt chất là 50 $\mu\text{g/mL}$.

Thuật ngữ “IC₅₀” được sử dụng trong sáng chế này là nồng độ ức chế 50% sự phát triển, là chỉ số dùng để đánh giá hoạt tính chống ung thư của hoạt chất, tương ứng với nồng độ hoạt chất cần sử dụng để ức chế 50% tế bào ung thư. Giá trị IC₅₀ được xác định bằng phần mềm máy tính Table Curve.

Graphen chấm lượng tử (GQDs) có các đặc tính của vật liệu mang thuốc nhưng tải lượng hoạt chất, khả năng tương thích sinh học và hướng đích phụ thuộc hoàn toàn vào sự biến tính bề mặt của GQDs. Thêm vào đó, việc lựa chọn tác nhân biến tính bề mặt GQDs vừa đáp ứng được các điều kiện trên vừa đảm bảo không làm mất hoạt tính kháng ung thư của hoạt chất là điều rất khó, bởi vì chỉ có một số vị trí/nhóm chức thích hợp của hoạt chất mới có thể tương tác với nhóm chức trên vật liệu mang để tạo nên hiệu ứng gắn hoạt chất, trong khi rất có thể đó là các vị trí/nhóm chức đảm nhiệm vai trò hoạt tính kháng ung thư. Vì vậy, trong sáng chế này các tác giả sáng chế gắn tagitinin C lên trên bề mặt của GQDs sau khi đã biến tính bề mặt, lựa chọn các nhóm chức và phản ứng phù hợp để tagitinin C gắn lên trên bề mặt của (GQDs) nhằm giữ nguyên các nhóm đảm nhận vai trò hoạt tính kháng ung thư, và đồng thời hoàn toàn không có độc tính với tế bào thường. Theo đó, GQDs sẽ được biến tính bằng các tác nhân như axit và diamine, sau đó tagitinin C được gắn lên bề mặt GQDs biến tính qua các phản ứng este hóa và phản ứng cộng Michael để tạo ra chế phẩm tổ hợp mới có vai trò ức chế tế bào ung thư và an toàn với tế bào thường. Vì vậy, sáng chế đã được hoàn thành.

Chế phẩm tổ hợp theo sáng chế chứa :

- (i) thành phần hoạt tính là tagitinin C phân lập từ lá cúc quỳ, và
- (ii) thành phần mang hoạt chất tới đích là graphen chấm lượng tử (GQDs) đã được biến tính bề mặt.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm tổ hợp chứa:

- (i) thành phần hoạt chất là [(3*aR*, 4*R*, 6*R*, 7*Z*, 10*Z*, 11*aR*)-6-hydroxy-6,10-dimethyl-3-methyliden-2,9-dioxo-3*a*,4,5,11*a*-tetrahydroyclodeca[*b*]furan-4-yl] 2-methylpropanoat (tagitinin C) phân lập từ lá cúc quỳ (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray), và

- (ii) thành phần mang hoạt chất tới đích là graphen chấm lượng tử (sau đây được viết tắt là GQDs) được biến tính bề mặt bằng quá trình carboxyl hoá sử dụng axit hữu cơ Cl-CH₂-COOH trong môi trường DMSO/H₂O sử dụng chất xúc tác là hỗn hợp của dimethylaminopyridin và dicyclohexylcarbodiimide (DD) để gắn nhóm carboxyl, hoặc bằng quá trình amin hoá sử dụng hợp chất (2,2'-(etylendioxy)bis(etylamin)) (EBE) để gắn nhóm chức amin, lên bề mặt GQDs,

trong đó, chế phẩm tổ hợp có hoạt tính kháng ung thư cao nhưng an toàn đối với các tế bào thường, làm nguyên liệu trong sản xuất được phẩm điều trị ung thư, trong đó tagitinin C (TC) được gắn lên bề mặt của thành phần mang hoạt chất tới đích là GQDs được biến tính bề mặt.

Chế phẩm tổ hợp theo sáng chế được sản xuất theo phương pháp bao gồm các bước sau :

Bước 1. Chiết tách và tinh chế tagitinin C (TC) từ lá cây cúc quỳ

Lá của cây cúc quỳ (*T. diversifolia*) được phơi khô và nghiền thành bột. Bột được chiết nhanh bằng diclometan, ở nhiệt độ trong phòng, trong 5 phút. Quá trình chiết nhanh được lặp lại 3 lần. Lọc qua giấy lọc 10 μm để thu dịch chiết. Cô đặc dịch chiết dưới áp suất giảm bằng thiết bị cô quay chân không, thu được dịch chiết cô đặc (ký hiệu là TDD). Dịch chiết cô đặc (TDD) được hòa tan trong dung môi MeOH/H₂O với tỷ lệ thể tích của MeOH/H₂O là 7/3, và sau đó được chiết phân đoạn với dung môi n-hexan (lặp lại 3-4 lần) và diclometan (lặp lại 7 lần), tạo ra hai phân đoạn, ký hiệu là TDD/CH₂Cl₂ (phần hòa tan trong diclometan) và TDD/n-hexan (phần hòa tan trong n-hexan). Phân đoạn TDD/CH₂Cl₂ được cô đặc, sau đó được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel, dùng hệ dung môi hexan/AcOEt và AcOEt/MeOH với các tỷ lệ khác nhau; phân đoạn (a) 0-10% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (b) 10-30% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (c) 30-50% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (d) 50-70% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (e) 70-100% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (f): 0-20% metanol/etyl axetat. Sản phẩm tagitinin C thu được ở phân đoạn (c) có màu vàng nhạt và ở dạng dầu. Sơ đồ chiết xuất tagitinin C từ lá cúc quỳ được minh họa trong hình 5.

Bước 2. Tổng hợp graphene chấm lượng tử (GQDs)

GQDs được tổng hợp bằng phương pháp phân tán graphene oxit trong H₂SO₄ đặc trong thời gian 6h. Dung dịch được trộn với KMnO₄ dạng bột và khuấy trong 1 h ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó khuấy thêm 1 h tại nhiệt độ 80°C. Dung dịch H₂O₂ (30%) được thêm vào để đảm bảo hoà tan hoàn toàn KMnO₄ trong hỗn hợp. Lọc để thu dịch lọc chứa GQDs. Dịch chứa GQDs được thẩm tách bằng màng thẩm tách MWCO 2 kDa, Sigma Aldrich. Sản phẩm GQDs thu được phân tán tốt trong nước và có kích thước hạt nằm trong khoảng từ 5 nm đến 20 nm.

Bước 3. Biến tính bề mặt GQDs:

Bước 3.1. Biến tính bề mặt GQDs bằng carboxyl hóa để tổng hợp chế phẩm tổ hợp GQDs-DD-TC:

GQDs được biến tính bề mặt bằng carboxyl hóa bằng cách trộn GQDs với kiềm và axit hữu cơ có công thức $X-R-COOH$ bằng phương pháp siêu âm. Tiếp theo, hỗn hợp chất xúc tác dimethylaminopyridin và dicyclohexylcarbodiimide (viết tắt là DD) được thêm vào hỗn dịch nêu trên. Sau đó, hỗn hợp được siêu âm để kích hoạt nhóm carboxyl.

Bước 4.1. Gắn TC lên bề mặt GQDs được biến tính bề mặt:

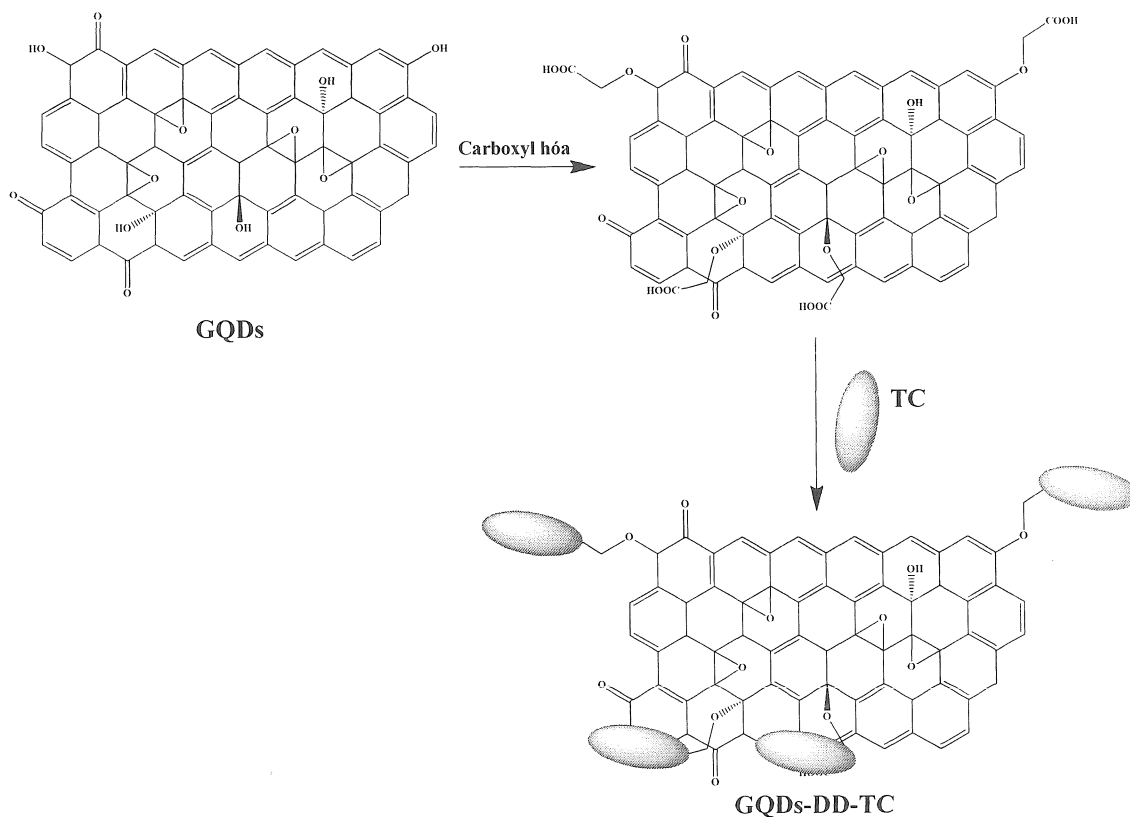
Tagitinin C hòa tan trong DMSO và được thêm vào hỗn hợp nêu trên, khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Tiến hành lọc và thẩm tách hỗn hợp bằng màng MWCO 1KDa, thu được dịch lỏng chứa GQDs-DD-TC tinh sạch, với kích thước hạt nằm trong khoảng từ 10 nm đến 500 nm.

Bước 5.1. Đông khô để thu được chế phẩm tổ hợp dạng bột:

Dịch lỏng chứa GQDs-DD-TC tinh sạch được đông khô để thu chế phẩm GQDs-DD-TC dạng bột.

Phương pháp sản xuất chế phẩm tổ hợp GQDs-DD-TC được thực hiện theo sơ đồ 1 dưới đây:

Sơ đồ 1:



và dưới các điều kiện phản ứng sau:

- Tải lượng TC trên GQDs nằm trong khoảng từ 1 đến 10 lần khối lượng so với GQDs (TC:GQDs = 0,1:1 -20:1), tốt hơn là tỷ lệ khối lượng TC:GQDs nằm trong khoảng từ 0,5:1 – 10:1, và tốt nhất là nằm trong khoảng 1:1 -5:1.

- GQDs được carboxyl hóa trong môi trường kiềm với axit hữu cơ có công thức X-R-COOH, trong đó X là halogen và R là gốc cacbon hydrat. Tốt hơn nếu phản ứng được thực hiện trong môi trường kiềm mạnh, và hoạt chất có gốc cacbon hydrat R ít cồng kềnh. Phản ứng đạt hiệu quả carboxyl hóa tối đa khi sử dụng NaOH và Cl-CH₂-COOH.

- Tốt hơn là thời gian kích hoạt nhóm carboxyl nằm trong khoảng từ 15 phút đến 2 giờ, tốt nhất là trong 1 giờ.

- Thời gian gắn tagitinin C lên trên bề mặt của GQDs sau quá trình carboxyl hóa nằm trong khoảng từ 3-24 giờ, tốt nhất là nằm trong khoảng 6-8 giờ.

- Tiến hành lọc và thẩm tách hỗn hợp trong thời gian nằm trong khoảng từ 12 đến 72 giờ, tốt hơn là nằm trong khoảng 24 - 48 giờ. Đối với sản phẩm GQDs-DD-TC thời gian thẩm tách tốt nhất là 24 giờ.

- Sản phẩm sau đó được tiến hành đông khô ở nhiệt độ tốt nhất là -80°C , tại áp suất 0,05 atm, và thời gian là 48 giờ.

Bước 3.2: Biến tính bề mặt GQDs bằng carboxyl hóa để tổng hợp chế phẩm tổ hợp GQDs-EBE-TC:

Trước tiên, GQDs (1 mg/mL) được phân tán trong phân cực và được siêu âm. Tiếp theo, hợp chất diamine $\text{H}_2\text{N}-\text{R}-\text{NH}_2$ hoặc $\text{H}_2\text{N}-\text{R}_1-\text{NH}-\text{R}_2$, (trong đó R, R₁, R₂ là các hợp chất cacbon hydrat, hoặc các hợp chất có chứa oxi), cụ thể là diamine (2,2'-(etylenedioxy)bis(etylamin)) (sau đây được viết tắt là EBE) được thêm từ từ vào dung dịch. Diamine được cho dư để ngăn cản liên kết chéo của các chấm lượng tử graphen. Hỗn hợp được khuấy đều ở nhiệt độ cao, sau đó làm nguội về nhiệt độ trong phòng. Dung dịch màu vàng thu được được thẩm tách bằng cách sử dụng màng MWCO 1 kDa để loại bỏ các nguyên liệu ban đầu không phản ứng.

Bước 4.2: Gắn TC lên bề mặt GQDs được biến tính bề mặt:

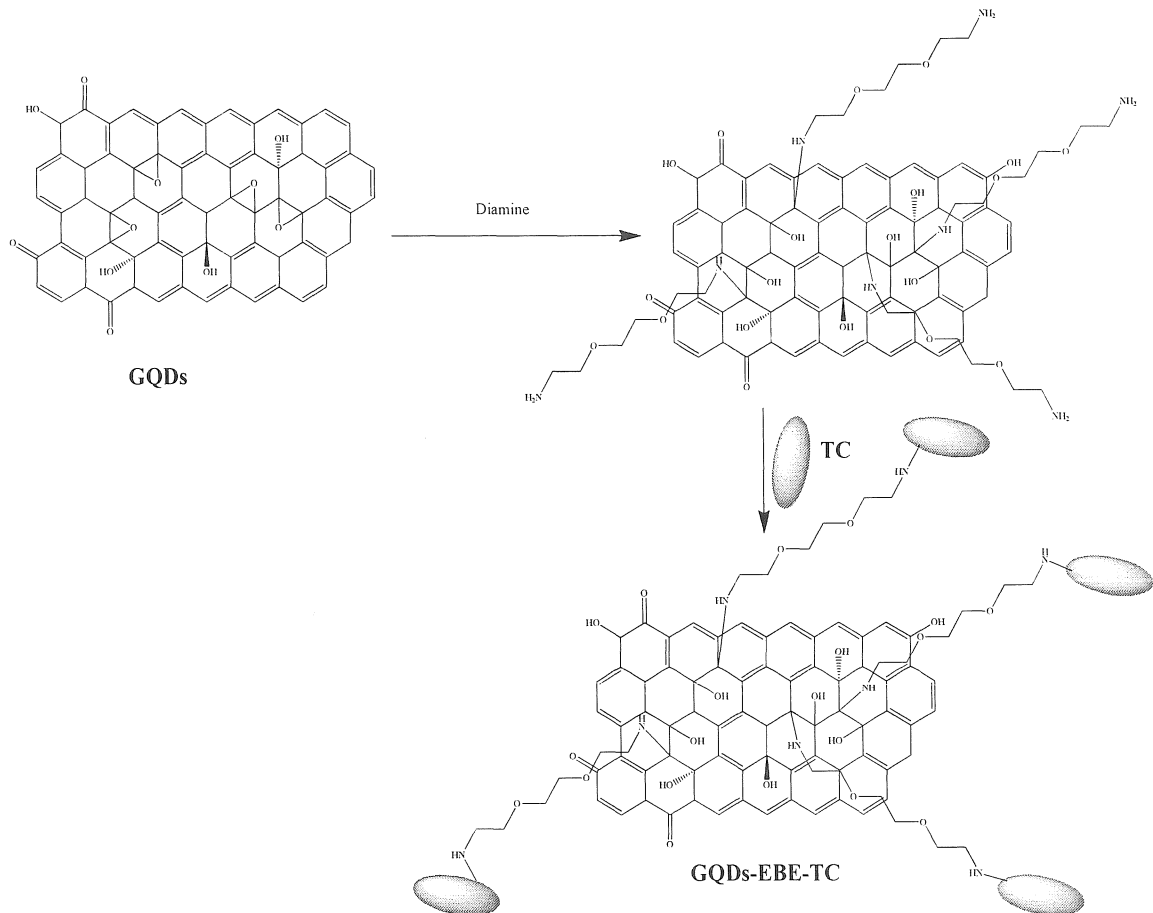
Tiếp theo, tagitinin C được hòa tan trong DMSO rồi được thêm vào dịch sau thẩm tách. Et_3N được thêm vào hỗn hợp để kiểm soát độ pH của dung dịch. Hỗn hợp phản ứng được giữ ở nhiệt độ 0°C trong 6h. Cuối cùng, hỗn hợp thu được được thẩm tách bằng màng MWCO 1 kDa, thu được dịch lỏng chứa GQDs-EBE-TC, với kích thước hạt nằm trong khoảng từ 10 nm đến 500 nm.

Bước 5.2. Đông khô để thu được chế phẩm tổ hợp dạng bột:

Dịch lỏng chứa GQDs-EBE-TC sau đó được đông khô để thu chế phẩm tổ hợp dạng bột GQDs-EBE-TC.

Phương pháp sản xuất chế phẩm tổ hợp GQDs-EBE-TC được thực hiện theo sơ đồ 2 dưới đây:

Sơ đồ 2:



và dưới các điều kiện phản ứng sau:

- Tải lượng TC trên GQDs nằm trong khoảng từ 1 đến 10 lần khối lượng so với GQDs (TC:GQDs = 0,1:1 -20:1), tốt hơn là tỷ lệ khối lượng TC:GQDs nằm trong khoảng từ 0,5:1 đến 10:1, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 5:1.
- GQDs được diamin hóa trong môi trường phân cực, tốt hơn là trong môi trường rượu và diamin ít công kênh. Phản ứng đạt hiệu quả nhất của quá trình diamin hóa khi sử dụng môi trường butanol và dùng diamin là 2,2'-(etylendioxy)bis(etylamin) (viết tắt là EBE).
- Nhiệt độ và thời gian diamin hóa nằm trong khoảng từ 70 đến 95°C và trong thời gian từ 6 đến 72 giờ, tốt nhất là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C và trong khoảng thời gian 8-12 giờ.
- Tốt nhất là pH môi trường của phản ứng tagitinin C lên trên bề mặt của GQDs sau khi diamin hóa nằm trong khoảng 8-8,5.

- Tiến hành lọc và thẩm tách hỗn hợp trong khoảng thời gian từ 12 đến 72 giờ, tốt hơn là trong khoảng thời gian 24 -48 giờ. Đối với chế phẩm tổ hợp GQDs-EBE-TC thời gian thẩm tách tốt nhất là 24 giờ.
- Sản phẩm sau đó được tiến hành đông khô ở nhiệt độ tốt nhất là -80°C , tại áp suất 0,05 atm, và thời gian là 48 giờ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn từ các ví dụ dưới đây. Các ví dụ này chỉ có tính chất minh họa nhưng không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1

Bột lá cây cúc quỳ *T. diversifolia* (500g) được chiết nhanh bằng 5L diclometan ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Dịch chiết diclometan được lọc qua giấy lọc 10 μm , và cô đặc dưới áp suất giảm bằng thiết bị cô quay chân không, thu được 27 g dịch chiết cô đặc (TDD). Dịch chiết cô đặc (TDD) được hòa tan trong 500 mL MeOH/H₂O (tỷ lệ thể tích MeOH/H₂O là 7/3), và được chiết phân đoạn bằng 500 mL n-hexan (3-4 lần) và 500 mL diclometan (7 lần), tạo ra hai phân đoạn TDD/CH₂Cl₂ (diclometan - phần hòa tan) và TDD/n-hexan (phần hòa tan n-hexan). Phân đoạn TDD/CH₂Cl₂ được cô đặc (~12g) được phủ với 10g silica gel và sau đó được đưa lên sắc ký cột trên silica gel với sự rửa giải liên tiếp bằng gradient hexan/AcOEt và AcOEt/MeOH. Tagitinin C thu được tại phân đoạn (c) ở dạng dầu và có màu vàng nhạt và có khối lượng khoảng 0,1g (Hình 5). Độ tinh khiết của tagitinin C được đo bằng phương pháp HPLC là 97%.

GQDs được carboxyl hóa bằng cách trộn đều 1,2g NaOH và 1,0g ClCH₂COOH vào 10 mL dung dịch GQDs (1mg/mL) bởi phương pháp siêu âm trong 3h. Tiếp theo, hỗn hợp chất xúc tác gồm 137 mg dimethylaminopyridin và 412 mg dicyclohexylcarbodiimide (viết tắt là DD) được thêm vào hỗn dịch nêu trên. Sau đó, hỗn hợp được siêu âm trong 1 giờ để kích hoạt nhóm carboxyl. Tiếp theo, 50 mg tagitinin C thu được ở trên được hòa tan trong 10mL DMSO rồi được thêm vào hỗn hợp nêu trên và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 6h. Tiến hành lọc và thẩm tách hỗn hợp bằng màng 1KDa MWCO trong 24 giờ, thu được 20 mL dịch lỏng chứa GQDs-DD-TC. Dịch lỏng chứa GQDs-DD-TC được đông khô tại nhiệt độ -80°C , áp suất 0,05 atm, trong 48 giờ để thu chế phẩm tổ hợp dạng bột GQDs-DD-TC.

Hình 1 thể hiện phổ FT-IR của các mẫu GQDs, GQDs-COOH, GQDs-DD-TC và TC. Trong phổ FT-IR của GQDs, đỉnh rộng ở 3257 cm^{-1} tương ứng với dao động kéo dài của nhóm OH. Ngoài ra, các đỉnh ở 1645 cm^{-1} và 1548 cm^{-1} liên quan tương ứng đến nhóm C=O (keton) và C=C. Các đỉnh ở 1386 cm^{-1} và 1043 cm^{-1} là do liên kết C-O. Phổ FT-IR của GQDs-COOH chỉ ra sự hiện diện của nhóm chức COOH ở 1718 cm^{-1} . Đối với TC, đỉnh ở 3464 cm^{-1} có liên quan đến dải O-H. Các đỉnh nhọn ở 1764 cm^{-1} , 1732 cm^{-1} , 1653 cm^{-1} lần lượt được gán cho liên kết C=O của nhóm lacton, este và α,β -keton không bão hòa. Đỉnh ở 1761 cm^{-1} được quan sát thấy tương ứng với sự hình thành chức năng carboxylat bằng cách este hóa giữa nhóm hydroxyl của TC và nhóm carboxyl của GQDs-COOH, và đỉnh 1720 cm^{-1} liên quan đến chức năng este trong tagitinin C. Điều này chỉ ra rằng tagitinin C được nạp thành công trên bề mặt của GQDs thông qua việc kích hoạt chức năng carboxyl.

Hình 2 thể hiện hình ảnh hiển vi điện tử truyền qua (TEM) của GQDs, và GQDs-DD-TC. Kết quả trong ảnh TEM cho thấy kích thước hạt của GQDs phân bố trong khoảng từ 5 nm đến 20 nm, trong khi chế phẩm tổ hợp GQDs-DD-TC có kích thước lớn hơn, phân bố trong khoảng từ 70 nm đến 300 nm. Điều này cho thấy, các hạt GQDs đã được bao phủ bởi TC để hình thành các hạt nano lớn hơn của chế phẩm tổ hợp GQDs-DD-TC.

Ví dụ 2

Bột lá cúc quỳ *T. diversifolia* (500g) được chiết nhanh bằng 5L diclometan ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Dịch chiết diclometan được lọc qua giấy lọc 10 μm , và cô đặc dưới áp suất giảm bằng thiết bị cô quay chân không thu được 27 g dịch chiết cô đặc (TDD). Dịch chiết cô đặc (TDD) được hòa tan trong 500 mL MeOH/H₂O (tỷ lệ thể tích MeOH/H₂O là 7/3), và được chiết phân đoạn bằng 500 mL n-hexan (3-4 lần) và 500 mL diclometan (7 lần), tạo ra hai phân đoạn TDD/CH₂Cl₂ (diclometan - phần hòa tan) và TDD/n-hexan (phần hòa tan n-hexan). Phân đoạn TDD/CH₂Cl₂ được cô đặc (~12g) được phủ với 10g silica gel và sau đó được đưa lên sắc ký cột trên silica gel với được rửa giải liên tiếp bằng gradient hexan/AcOEt và AcOEt/MeOH. Tagitinin C thu được phân đoạn (c) dạng dầu màu vàng nhạt và có khối lượng khoảng 0,1g. Độ tinh khiết của tagitinin C được đo bằng phương pháp HPLC là 97%.

GQDs được diamin hóa bằng cách cho 4 mL GQDs (1 mg/mL) phân tán trong 2 mL 1-butanol và được siêu âm trong 10 phút. Tiếp theo, 1 mL 2,2'-(etylendioxy)bis(etylamin)

(viết tắt là EBE) được thêm từ từ vào dung dịch. Hỗn hợp được khuấy trong 8h ở 90°C trong môi trường khí Ar, sau đó để nguội về nhiệt độ trong phòng. Dung dịch màu vàng GQDs-EBE thu được được thẩm tách bằng cách sử dụng màng MWCO 1 kDa trong 24h để loại bỏ các nguyên liệu ban đầu không phản ứng. Tiếp theo, 20 mg tagitinin C được hòa tan trong 4mL DMSO rồi được thêm vào dịch GQDs-EBE. Et₃N được thêm từ từ vào hỗn hợp để pH của dung dịch đạt 8-8,5. Dung dịch phản ứng được giữ ở 0°C trong 6h. Cuối cùng, dung dịch được thẩm tách bằng màng MWCO 1 kDa trong 24h để thu được dịch lỏng chứa GQDs-EBE-TC. Dịch lỏng chứa GQDs-EBE-TC được đông khô tại nhiệt độ -80°C, áp suất 0,05 atm, trong 48 giờ để thu chế phẩm tổ hợp dạng bột GQDs-EBE-TC.

Hình 3 thể hiện phổ FT-IR của các mẫu GQDs, TC, EBE, GQDs-EBE, và GQDs-EBE-TC. Trong phổ FT-IR của GQDs đỉnh rộng ở 3257 cm⁻¹ tương ứng với các dao động kéo dài của nhóm OH. Các đỉnh ở 1645 cm⁻¹ và 1548 cm⁻¹ liên quan đến các nhóm C=O và C=C tương ứng. Đỉnh ở 1386 cm⁻¹ và 1043 cm⁻¹ là do liên kết C-O. Trong trường hợp của TC, đỉnh ở 3464 cm⁻¹ có liên quan đến dải O-H. Các đỉnh nhọn ở 1764 cm⁻¹, 1732 cm⁻¹, 1653 cm⁻¹ được gán tương ứng cho các liên kết C=O của lacton, este và nhóm α , β -keton không bão hòa. GQDs-EBE cho thấy đỉnh mới nằm ở 1091 cm⁻¹ tương ứng với nhóm kéo dài C-O-C trong GO-EBE. Đối với GQDs-EBE-TC, quan sát thấy rằng các tín hiệu nằm ở 1772 cm⁻¹, 1720 cm (ν C = O) và 1016 cm⁻¹ tương ứng với liên kết C=O của epoxit lacton, este và COC của Tagitinin C. Đỉnh mạnh nằm ở 1624 cm⁻¹ và 1097 cm⁻¹ với sự hiện diện nhóm C = O (CO₂H) của graphen và nhóm kéo dài C-O-C. Nó cho thấy rằng tagitinin C đã được kết nối thành công với amin trên các chấm lượng tử graphen.

Hình 4 trình bày hình ảnh hiển vi điện tử truyền qua (TEM) của GQDs, GQDs-EBE và GQDs-EBE-TC. Kết quả trong ảnh TEM cho thấy các hạt nano GQDs và nano GQDs-EBE có hình thái cấu trúc và kích thước tương đương nhau, phân bố khá trong khoảng từ 5 nm đến 20 nm. Trong khi đó, hình ảnh TEM của GQDs-EBE-TC cho thấy kích thước hạt của GQDs-EBE-TC nằm trong khoảng từ 50 nm đến 100 nm, lớn hơn so với kích thước hạt của GQDs-EBE. Điều này cho thấy, các hạt GQDs-EBE đã được bao phủ bởi TC để hình thành các hạt nano lớn hơn của chế phẩm tổ hợp GQDs-EBE-TC.

Ví dụ 3

Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào của chế phẩm tổ hợp trên các dòng tế bào ung thư phổi (A549), ung thư vú (MCF-7), ung thư dạ dày (HGC-270) và dòng tế bào thường (vero) được tiến hành như sau:

- Các dòng tế bào ung thư phổi (A549), ung thư vú (MCF-7), ung thư dạ dày (HGC-270) và dòng tế bào thường (vero) được cung cấp bởi ATCC (American Type Culture Collection, USA; <https://www.atcc.org>) và CLS (Cell Lines Service GmbH, CHLB Đức (<https://clsgmbh.de>)).

- Phương pháp nuôi cấy tế bào *in vitro*

Tế bào được nuôi cấy ở 37°C, CO₂ 5% trong môi trường phù hợp: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Sigma-Aldrich, USA) hoặc RPMI 1640 (ThermoFisher, Waltham, CHLB Đức) có bổ sung L-glutamin 2mM, kháng sinh (Penicillin + Streptomycin sulfat) và huyết thanh bê 5-10%.

Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỷ lệ (1:3) và nuôi trong tủ âm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5%CO₂.

- Phép thử sinh học xác định độc tính tế bào (cytotoxic assay)

Độc tính tế bào của chế phẩm tổ hợp được xác định bằng phương pháp MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoli bromua], được Viện nghiên cứu ung thư quốc gia Mỹ (NCI) đánh giá là phương pháp quy chuẩn và hiệu quả cho sàng lọc nhanh các chất có hoạt tính gây độc hoặc ức chế sự tăng sinh tế bào. Nguyên tắc của phương pháp là gián tiếp xác định hoạt tính của chất thử qua khả năng ức chế enzym oxidoreductaza phụ thuộc NAD(P)H của tế bào. Enzym trong ty thể này xúc tác phản ứng khử thuốc nhuộm tetrazoli MTT thành dạng formazan không hoà tan, có màu tím, qua đó có thể phản ánh tương quan số lượng các tế bào đang phát triển khi đo ở bước sóng $\lambda = 540/720\text{nm}$. Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD-Optical Density) đo được sau khi nhuộm. Giá trị OD máy đo được tỷ lệ thuận với lượng thuốc nhuộm gắn với phân tử protein. Do đó lượng tế bào protein càng nhiều thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

Chế phẩm tổ hợp được pha trong DMSO 10% được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có các nồng độ 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL...

Một khay 96 giếng khác không có chế phẩm tổ hợp nhưng có tế bào ung thư được sử dụng làm đối chứng.

Sau 48 giờ phát triển trong tủ ấm CO₂ tế bào được nhuộm bởi thuốc nhuộm tetrazoli Khả năng ức chế tế bào của tổ hợp được đo xác định bằng mật độ quang học theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ ức chế tế bào (\%)} = [1 - (\text{OD}[\text{mẫu}] / \text{OD}[\text{đối chứng (-)}])] \times 100\% \quad (1)$$

Tỷ lệ ức chế tế bào và IC₅₀ của các chế phẩm tổ hợp này được đánh giá dựa trên ba dòng tế bào ung thư (HGC-27, A549 và MCF-7) và dòng tế bào thường (vero) được nêu trong bảng 1.

Bảng 1: Nghiên cứu hoạt tính sinh học của các chế phẩm

TT	Ký hiệu mẫu	Tế bào ung thư phổi ở người (A549)		Tế bào ung thư vú ở người (MCF-7)		Tế bào ung thư dạ dày ở người (HGC -270)		Tế bào thường (vero)	
		Tỷ lệ ức chế tế bào (%)*	IC ₅₀ (µg/mL)	Tỷ lệ ức chế tế bào (%)*	IC ₅₀ (µg/mL)	Tỷ lệ ức chế tế bào (%)*	IC ₅₀ (µg/mL)	Tỷ lệ ức chế tế bào (%)*	IC ₅₀ (µg/mL)
	Paclitaxel		48,27		38,75		62,85		
1	GQDs-EBE-TC	96,3 ± 0,7	2,56	98,94 ± 0,1	3,79	98,93 ± 0,2	12,29	0,91 ± 0,02	>50
2	GQDs-DD-TC	95,23 ± 1,1	11,97	98,92 ± 0,4	4,04	80,7 ± 0,2	10,97	0,25 ± 0,00	>50
3	GQDs	58,80 ± 2,3	44,11	40,26 ± 2,3	>50	58,18 ± 1,8	38,98	47,01 ± 0,2	>50
4	TC	95,84 ± 1,0	0,79	99,54 ± 0,1	0,28	100,00 ± 0,5	1,11	99,97 ± 0,81	4,63

*Tại nồng độ mẫu thử 50 µg/mL

Hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào thấp nhất đối với ba dòng tế bào ung thư thử nghiệm A549, MCF-7 và HGC-27 là GQDs, với giá trị IC₅₀ lần lượt là 44,11 µg/mL, > 50 µg/mL và 38,98 µg/mL.

Bảng 1 cũng cho thấy IC₅₀ của GQDs, TC, GQDs-EBE-TC và GQDs-DD-TC đối với ba dòng tế bào ung thư này. Độc tính tế bào của một hợp chất thấp hơn khi IC₅₀ của nó

cao hơn. Kết quả trong Bảng 1 cho thấy tổ hợp TC gắn trên vật liệu mang thuốc GQDs có hoạt tính gây độc tế bào thấp hơn TC riêng lẻ. Điều này có thể được giải thích là do một phần nhóm chức mang hoạt tính sinh học của TC được “che phủ” bởi vật liệu GQDs. Mặc dù vậy, hoạt tính gây độc tế bào của chế phẩm tổ hợp cao hơn rất nhiều so với đối chứng Paclitaxel. Một điều đặc biệt lý thú là cả hai chế phẩm tổ hợp GQDs-EBE-TC và GQDs-DD-TC đều không gây độc trên tế bào thường, thể hiện ở giá trị $IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$, trong khi TC riêng lẻ có độc tính cao đối với tế bào thường, với giá trị IC_{50} là $4,63 \mu\text{g/mL}$. Đặc biệt hơn nữa, ở cùng nồng độ $50 \mu\text{g/mL}$, giá trị tỷ lệ ức chế tế bào thường (vero) của GQDs và TC lần lượt là 47,01% và 99,97 %, trong khi với hai chế phẩm tổ hợp GQDs-EBE-TC và GQDs-DD-TC, các giá trị này lần lượt chỉ là 0,91% và 0,25%, thấp hơn rất nhiều so với các giá trị thu được đối với GQDs và TC riêng lẻ. Kết quả này cho thấy rõ hiệu ứng hiệp trợ của TC và GQDs trong việc giảm độc tính đối với tế bào thường. Điều này mở ra tiềm năng ứng dụng của chế phẩm tổ hợp trong điều trị ung thư ít tác dụng phụ.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm tổ hợp theo sáng chế, trong đó hoạt chất tagitinin C (TC) phân lập từ lá cúc quỳ *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray được gắn lên bề mặt của thành phần mang hoạt chất tới đích là graphen chấm lượng tử được biến tính bề mặt, không những có hoạt tính gây độc tế bào ung thư cao hơn rất nhiều so với đối chứng, trên dòng tế bào ung thư dạ dày ở người (HGC-27), tế bào ung thư phổi ở người (A549) và tế bào ung thư vú ở người (MCF-7), mà còn có ưu điểm là có hoạt tính gây độc tế bào thường thấp hơn rất nhiều so với hoạt chất TC riêng rẽ. Đồng thời, chế phẩm tổ hợp có giá thành rất thấp do nguyên liệu là hoạt chất sẵn có trong tự nhiên và được sử dụng một cách hiệu quả, nhờ khả năng mang thuốc hướng đích của hệ vật liệu mang thuốc graphen chấm lượng tử.

Dược phẩm chứa chế phẩm tổ hợp theo sáng chế kết hợp với các chất mang được dùng là hữu dụng để điều trị ung thư hướng đích, đạt hiệu quả cao trong ngăn ngừa và ức chế khối u phát triển, an toàn với tế bào thường, đồng thời có giá thành thấp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

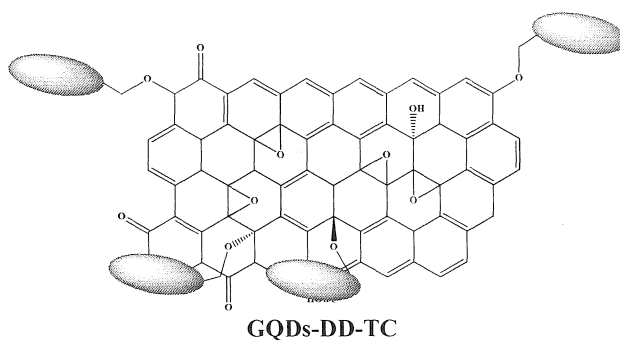
1. Chế phẩm tổ hợp chứa:

(i) thành phần hoạt chất là [(3*aR*, 4*R*, 6*R*, 7*Z*, 10*Z*, 11*aR*)-6-hydroxy-6,10-dimethyl-3-metyliden-2,9-dioxo-3*a*,4,5,11*a*-tetrahydroxyclo-deca[b]furan-4-yl] 2-metylpropanoat (tagitinin C) phân lập từ lá cúc quỳ (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray), và

(ii) thành phần mang hoạt chất tới đích là graphen chấm lượng tử (sau đây được viết tắt là GQDs) được biến tính bề mặt bằng quá trình carboxyl hoá sử dụng axit hữu cơ Cl-CH₂-COOH trong môi trường DMSO/H₂O sử dụng chất xúc tác là hỗn hợp của dimetylaminopyridin và dixyclohexylcarbodiimit (DD) để gắn nhóm carboxyl, hoặc bằng quá trình amin hoá sử dụng hợp chất (2,2'-(etylendioxy)bis(etylamin)) (EBE) để gắn nhóm chức amin, lên bề mặt GQDs,

trong đó, chế phẩm tổ hợp có hoạt tính kháng ung thư cao nhưng an toàn đối với các tế bào thường, làm nguyên liệu trong sản xuất dược phẩm điều trị ung thư, trong đó tagitinin C (TC) được gắn lên bề mặt của thành phần mang hoạt chất tới đích là GQDs được biến tính bề mặt.

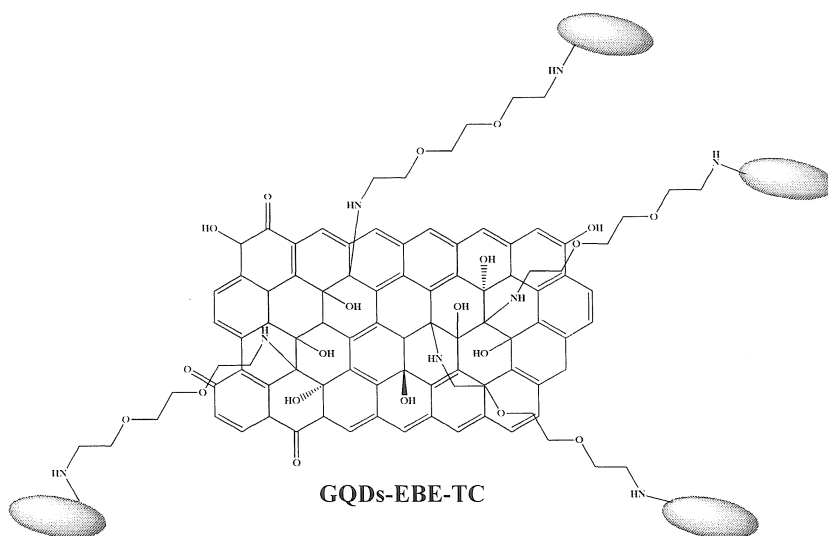
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này có công thức GQDs-DD-TC:



trong đó TC được gắn lên GQDs được biến tính bề mặt bằng axit hữu cơ Cl-CH₂-COOH trong môi trường DMSO/H₂O sử dụng chất xúc tác là hỗn hợp của dimetylaminopyridin và dixyclohexylcarbodiimit (DD).

3. Chế phẩm tổ hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó GQDs được biến tính bề mặt bằng axit hữu cơ Cl-CH₂-COOH và TC được gắn lên trên bề mặt của GQDs thông qua liên kết giữa nhóm -COOH trên bề mặt của GQDs sau khi được biến tính bề mặt và nhóm -OH của TC.

4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này có công thức GQDs-EBE-TC:



trong đó TC được gắn lên trên bề mặt của GQDs được biến tính bề mặt bằng quá trình diamin hóa bằng (2,2'-(etylendioxy)bis(etylamin)) (EBE).

5. Chế phẩm tổ hợp theo điểm 1 hoặc 4, trong đó GQDs được biến tính bề mặt bằng quá trình diamin hóa bằng EBE, TC được gắn lên bề mặt của GQDs được biến tính bề mặt bởi liên kết giữa nhóm alpha, beta – không no của tagitinin C và một đầu còn lại của amin trên bề mặt của GQDs.

6. Chế phẩm tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó hoạt chất tagitinin C (TC) được gắn lên bề mặt của thành phần mang hoạt chất tới đích là GQDs được biến tính với tỷ lệ theo khối lượng giữa TC và GQDs nằm trong khoảng từ 1:1 đến 5:1.

7. Chế phẩm tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, đặc trưng ở chỗ, chế phẩm này được bào chế ở dạng hạt nano, trong đó kích thước hạt nano của các chế phẩm nằm trong khoảng từ 10 nm đến 500 nm.

8. Phương pháp sản xuất chế phẩm tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) chiết tách và tinh chế tagitinin C (TC) từ lá cúc quỳ: bao gồm chiết nhanh bột lá cúc quỳ sử dụng dung môi diclometan, cô quay loại dung môi để thu được dịch chiết cô đặc, chiết phân đoạn dịch chiết cô đặc trong dung môi n-hexan và diclometan, sau đó,

tagitinin C được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là hexan/AcOEt và AcOEt/MeOH, TC thu được có độ tinh khiết đạt 95-97%;

(b) tổng hợp graphen chấm lượng tử (GQDs), trong đó:

GQDs được tổng hợp bằng cách phân tán graphen oxit trong H_2SO_4 đặc trong thời gian 6h để thu được dung dịch huyền phù, trộn với KMnO_4 dạng bột và khuấy trong 1h ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó khuấy thêm 1h tại nhiệt độ 80°C ; sau đó, bổ sung dung dịch H_2O_2 nồng độ 30% theo thể tích để đảm bảo hoà tan hoàn toàn KMnO_4 trong hỗn hợp, lọc để thu dịch lọc chứa GQDs bằng cách thẩm tách bằng màng thẩm tách MWCO 2 kDa để thu được GQDs phân tán tốt trong nước và có kích thước hạt nằm trong khoảng từ 5 nm đến 20 nm;

(c) biến tính bề mặt của GQDs: carboxyl hóa GQDs bằng axit hữu cơ $\text{Cl-CH}_2\text{-COOH}$ trong môi trường có chứa NaOH kết hợp siêu âm, ở nhiệt độ trong phòng để chuyển hóa các nhóm chức -OH trên bề mặt của GQDs thành nhóm -COOH và thu được GQDs biến tính bề mặt;

(d) gắn TC lên bề mặt GQDs biến tính bề mặt thu được từ bước (a) bằng phản ứng este hóa, sử dụng chất xúc tác là hỗn hợp của dimethylaminopyridin và dicyclohexylcarbodiimide (DD) trong dung môi $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ ở nhiệt độ $25^\circ\text{C} - 60^\circ\text{C}$ trong thời gian 6-24h, sau đó tiến hành thẩm tách bằng màng 1KDa MWCO trong 24h, để thu được dịch lỏng chứa GQDs-DD-TC có kích thước nano nằm trong khoảng từ 10 nm đến 500 nm;

(e) đông khô dịch lỏng chứa GQDs-DD-TC để thu được chế phẩm tổ hợp GQDs-DD-TC dạng bột.

9. Phương pháp sản xuất chế phẩm tổ hợp theo điểm 1, 4 hoặc 5, phương pháp này bao gồm các bước :

(i) chiết tách và tinh chế tagitinin C (TC) từ lá cúc quỳ: bao gồm chiết nhanh bột lá cúc quỳ sử dụng dung môi diclometan, cô quay loại dung môi để thu được dịch chiết cô đặc, chiết phân đoạn dịch chiết cô đặc trong dung môi n-hexan và diclometan, sau đó, tagitinin C được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là hexan/AcOEt và AcOEt/MeOH, TC thu được có độ tinh khiết đạt 95-97%;

(ii) tổng hợp graphen chấm lượng tử (GQDs), trong đó:

GQDs được tổng hợp bằng cách phân tán graphene oxit trong H_2SO_4 đặc trong thời gian 6h để thu được dung dịch huyền phù, trộn với KMnO_4 dạng bột và khuấy trong 1h ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó khuấy thêm 1h tại nhiệt độ 80°C ; sau đó, bổ sung dung dịch H_2O_2 nồng độ 30% theo thể tích để đảm bảo hoà tan hoàn toàn KMnO_4 trong hỗn hợp, lọc để thu dịch lọc chứa GQDs bằng cách thẩm tách bằng màng thẩm tách MWCO 2 kDa để thu được GQDs phân tán tốt trong nước và có kích thước hạt nằm trong khoảng từ 5 nm đến 20 nm;

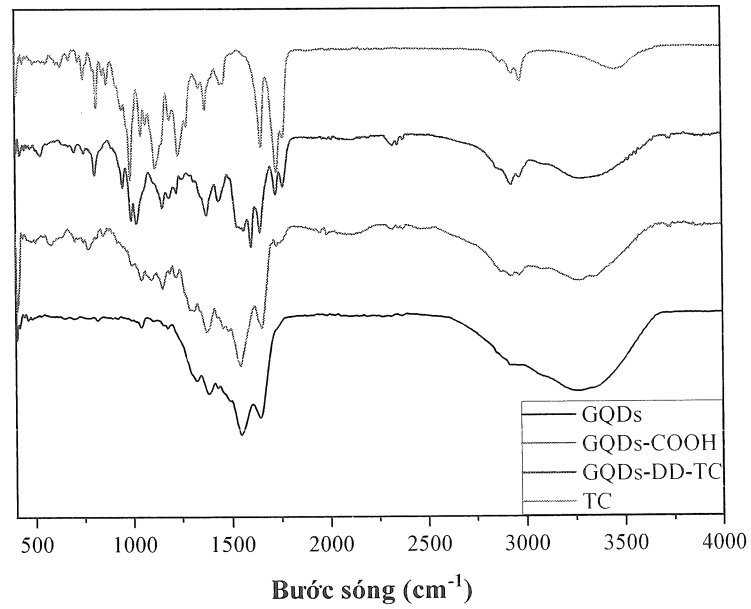
(iii) biến tính bề mặt của GQDs: diamin hóa GQDs bằng (2,2'-(etylendioxy)bis(etylamin)) (EBE) trong môi trường butanol trong thời gian nằm trong khoảng từ 8 đến 24 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 95°C trong môi trường khí trơ argon, sau đó để nguội về nhiệt độ trong phòng, thu được dung dịch GQDs-EBE màu vàng, dung dịch này được thẩm tách bằng màng MWCO 1 kDa trong 24h để loại bỏ các thành phần không phản ứng và thu được dung dịch GQDs-EBE tinh sạch;

(iii) gắn TC lên bề mặt GQDs-EBE bằng cách: hòa tan TC trong DMSO, sau đó bổ sung vào dung dịch GQDs-EBE thu được từ bước (i), tiếp theo thêm từ từ Et_3N vào để độ pH của dung dịch đạt 8-8,5, sau đó giữ dung dịch phản ứng ở 0°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 6h-24h và tiến hành thẩm tách dung dịch bằng màng MWCO 1 kDa trong 24h để thu được dịch lỏng chứa GQDs-EBE-TC tinh sạch, có kích thước nano nằm trong khoảng từ 10 nm đến 500 nm;

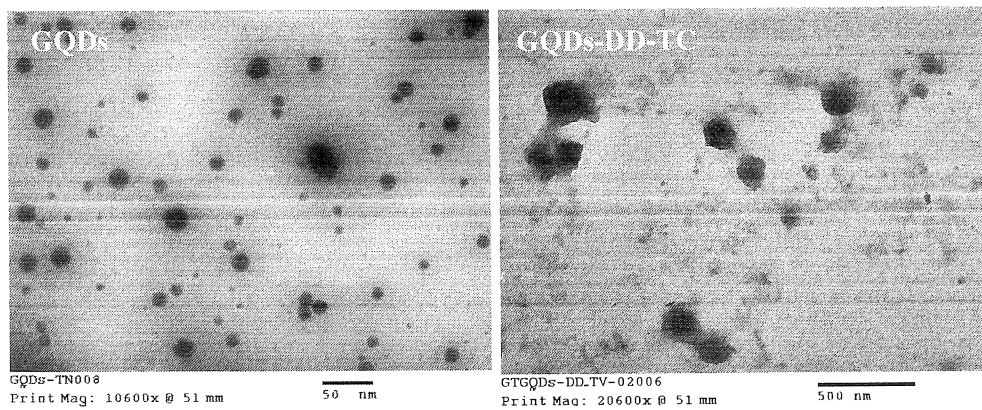
(iv) đông khô dịch lỏng chứa GQDs-EBE-TC nêu trên để thu được chế phẩm tổ hợp GQDs-EBE-TC dạng bột.

1/4

HÌNH 1

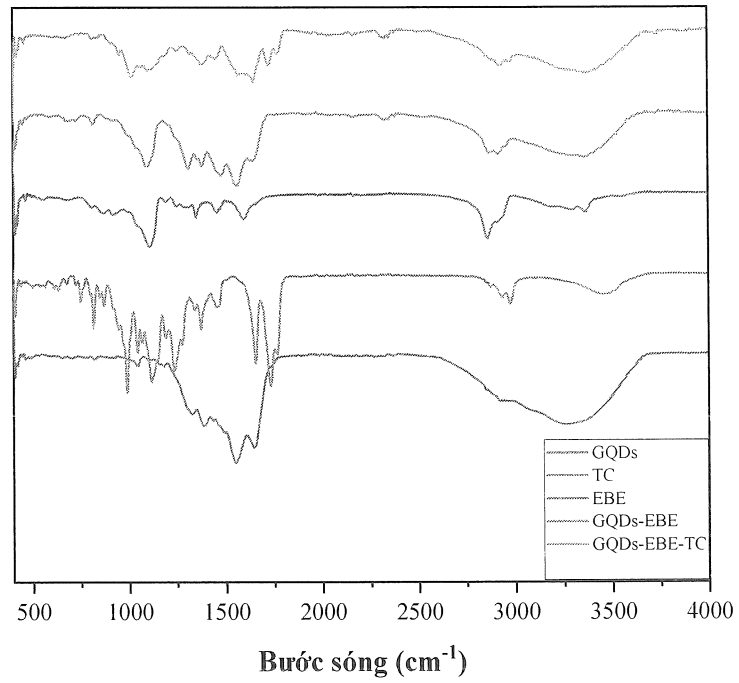


HÌNH 2



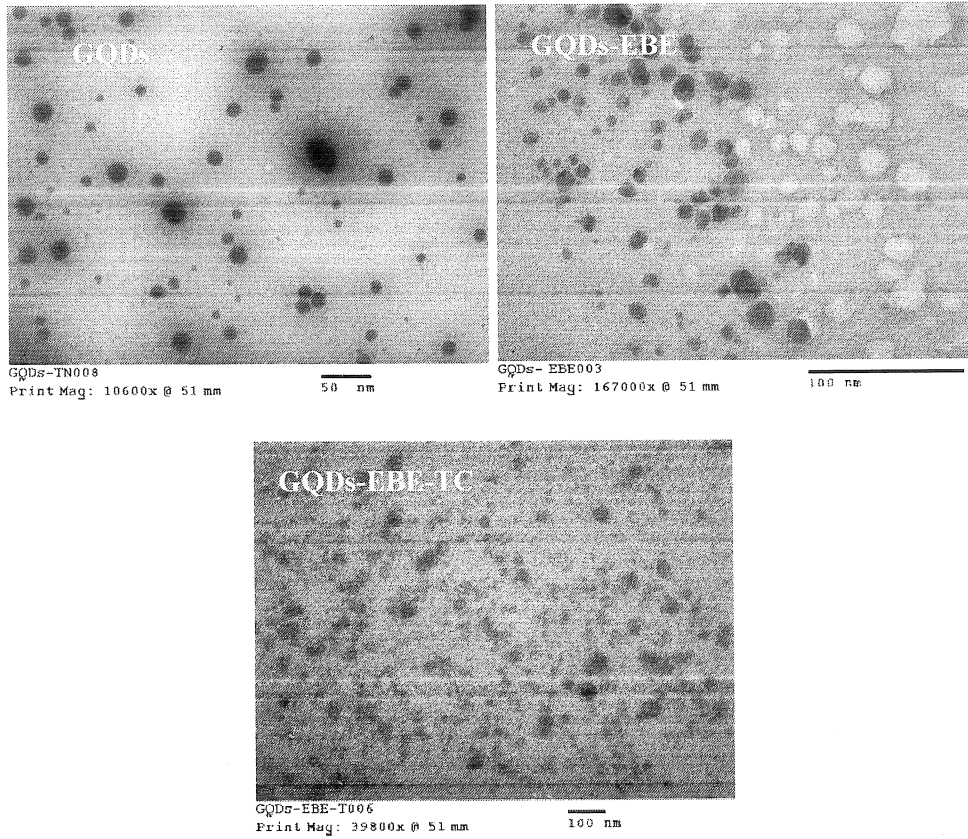
2/4

HÌNH 3



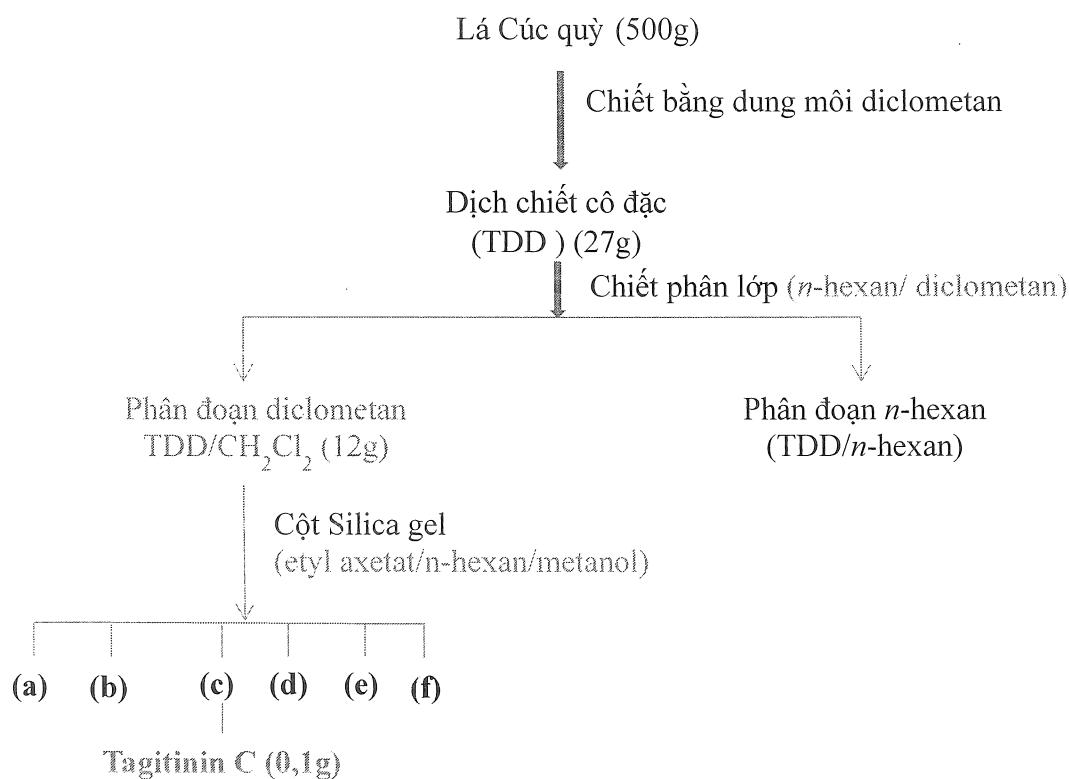
3/4

HÌNH 4



4/4

HÌNH 5



Sơ đồ chiết xuất tagitinin C từ lá cúc quỳ: phân đoạn (a) 0-10% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (b) 10-30% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (c) 30-50% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (d) 50-70% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (e) 70-100% etyl axetat/n-hexan, phân đoạn (f): 1-20% metanol/etyl axetat.