



(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) 
2-0002115

(51)⁷ **C07H 1/00, 17/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00079

(22) 06.05.2016

(67) 1-2016-02743

(45) 25.09.2019 378

(43) 25.07.2016 340

(73) **VIỆN HÓA HỌC CÁC HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN - VIỆN HÀN LÂM KHOA
HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)**

nhà 1H, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Mạnh Cường (VN), Trần Thu Hương (VN), Phạm Ngọc Khanh (VN), Ninh
Thế Sơn (VN), Vũ Thị Hà (VN), Nguyễn Linh Toàn (VN), Hồ Anh Sơn (VN),
Đoàn Thị Vân (VN), Tô Đạo Cường (VN)

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT HỖN HỢP ĐỂ NGĂN NGỪA VÀ ĐIỀU TRỊ BỆNH
VIÊM GAN B TỪ RỄ CÂY NHỚ ĐÔNG (MORINDA LONGISSIMA)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp để ngăn ngừa và
điều trị bệnh viêm gan B từ rễ cây Nhớ đông (*Morinda longissima*). Ngoài ra,
giải pháp hữu ích còn đề cập đến hỗn hợp thu được từ quy trình này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ hóa sinh và các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm gan B từ rễ cây Nhó đông (*Morinda longissima*) và hỗn hợp thu được từ quy trình này để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm gan B.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), trong số 10 bệnh nguy hiểm nhất thì bệnh về gan gây tỷ lệ tử vong cho con người đứng thứ 3 chỉ sau các bệnh về tim mạch và ung thư. Điều này rất nguy hiểm vì gan là một trong những cơ quan quan trọng nhất đóng vai trò sống còn trong cơ thể con người, là nơi dự trữ năng lượng, chuyển hóa các chất, tổng hợp protein, cố định các hormon, thuốc, các độc chất, vi khuẩn, v.v.. Trong đó bệnh viêm gan B là một trong những bệnh hay gặp nhất, hậu quả lâu dài dẫn đến xơ gan và ung thư gan.

Theo ước tính có khoảng hai tỷ người đã nhiễm virus viêm gan B (HBV), trong đó trên 400 triệu người đang mang HBV mạn tính trên thế giới (Kao và cộng sự, The Lancet Infectious Diseases, 2002, 2, 395-403). Tỷ lệ người mang HBV mạn tính thay đổi theo khu vực địa lý, dao động từ 10 đến 20% dân số ở Trung Quốc, các nước vùng Đông Nam Á, quần đảo Tây Thái Bình Dương và khu vực Sub-Sahara của Châu Phi đến dưới 1% ở khu vực Bắc Âu và Bắc Mỹ. Trong đó, khoảng 75% thuộc khu vực Đông Nam Á và Tây Thái Bình Dương. Khoảng 15 - 40% trường hợp viêm gan B mạn tính phát triển thành xơ gan, suy gan hoặc ung thư tế bào gan nguyên phát; trong đó khoảng 1/2 triệu người chết mỗi năm vì ung thư tế bào gan nguyên phát (Kwon và cộng sự, Korean Journal of Hepatology, 2011, 17, 87-95). Thống kê cho thấy có khoảng 25% bệnh nhân viêm gan mạn tính sau khi nhiễm HBV trong giai đoạn ở độ tuổi trẻ em sẽ chết vì xơ gan và ung thư gan (Chen và cộng sự, Journal of Gastroenterol Hepatology, 2011, 26, 628-638).

Việt Nam là một trong những nước có tỷ lệ nhiễm HBV cao trên thế giới, khoảng từ 20-26% dân số có HBsAg dương tính, ước tính có khoảng 6,4 triệu người nhiễm HBV năm 1990 nhưng đến năm 2005 số người nhiễm HBV tăng tới 8,4 triệu (Ngọc và cộng sự, Tạp chí Y học lâm sàng, 2008, 26, 34-39). Trong đó, 10-15% nhiễm HBV có

diễn biến thành viêm gan mạn tính, sau đó khoảng 25% thành xơ gan và 80% dẫn tới ung thư gan. Khoảng 50% các trường hợp viêm gan có HBsAg dương tính, tỷ lệ mang HBV ở các bệnh nhân ung thư gan nguyên phát (HCC) hoặc xơ gan là 50-85% (Ngọc, Luận án Tiến sỹ y học, Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương, Hà Nội, 2001; Thắng, Y học thực hành, 2003, 1, 90-91). Tỷ lệ phụ nữ mang thai có HBsAg là 12-18%, trong số đó có khoảng 30-40% mang đồng thời cả HBsAg và HBeAg do vậy lây truyền dọc từ mẹ sang con là một con đường lây truyền rất quan trọng ở Việt Nam (Hà và cộng sự, Thông tin Y dược, 2006, 12, 29-32; Nguyen et al., Journal of Medical Virology, 2011, 83, 399-404). Những năm gần đây, tình hình xơ gan, ung thư gan và tử vong do nhiễm HBV có xu hướng tăng lên mạnh mẽ. Theo thống kê chuyên ngành ung thư của WHO thì năm 2008, tử vong do ung thư gan nước ta là 21,748 người, gấp 2 lần so với chết do tai nạn giao thông năm 2012. Số bệnh nhân bị viêm gan virus trên 8 triệu người so với số bệnh nhân nhiễm HIV-AIDS 210,000 người (năm 2012), con số tử vong liên quan đến virus viêm gan do xơ gan, ung thư gan, viêm gan virus cấp và mạn tính phối hợp với bệnh lao phổi, đái tháo đường, tăng huyết áp, suy thận, v.v. đã gây ra cái chết cho hơn 10 vạn người mỗi năm.

Cho đến nay, việc diệt trừ hoàn toàn virus là cực kỳ khó khăn, việc điều trị kháng virus hiện nay chỉ nhằm hạn chế sự suy giảm chức năng gan và ung thư gan và tăng thời gian sống của bệnh nhân. Hiện nay, có hai loại thuốc được Cơ quan quản lý Thuốc và Thực phẩm Mỹ (FDA) cấp phép điều trị bệnh viêm gan B bao gồm thuốc miễn dịch interferon α (INF- α) và interferon α được pegyl hóa (peg-INF- α , một hợp chất do các tế bào bị nhiễm virus sản sinh ra có khả năng ức chế tăng trưởng virus), và các hợp chất tương tự nucleotit. Tuy vậy, các thuốc này chưa có hiệu quả vì tỉ lệ kháng thuốc, phản ứng phụ và giá thành thuốc cao (Kang và cộng sự, Viruses, 2015, 7, 4960-4977).

Việc nghiên cứu tìm kiếm các bài thuốc, dịch chiết và phân đoạn có tác dụng phòng ngừa và điều trị bệnh viêm gan B có nguồn gốc tự nhiên đã và đang được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm. Nhiều cây thuốc, bài thuốc cổ truyền Trung Quốc, Ấn Độ đã được nghiên cứu cho thấy tác dụng phòng ngừa và điều trị bệnh viêm gan B bằng cách loại bỏ độc tính và thúc đẩy sự bài tiết độc tố, ức chế sự nhân lên và làm âm tính HBV, ví dụ như Đại hoàng (*Rheum palmatum*), Hoàng cầm (*Scutellaria baicalensis*), Hoàng kỳ (*Astragalus membranaceus*), Ba kích (*Morinda officinalis*),

cộng sự, CN104784644, 2015). Chang và cộng sự phát hiện dịch chiết etanol và dịch nước của Cốt khí củ (*Polygonum cuspidatum*) ức chế sự sản sinh HBV trên dòng tế bào HepG2.2.15 (Chang và cộng sự, Antiviral Research, 2005, 66, 29-34). Ngoài ra, các nhà khoa học Ấn Độ đã phát hiện ra dịch chiết metanol của cây Cỏ tim phòng (*Hybanthus enneaspermus*), và cây Chiêu liêu (*Terminalia bellerica*) có tác dụng ức chế HBV thông qua làm giảm lượng kháng nguyên HBsAg và polyme enzym của HBV (Anbalagan và cộng sự, World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2015, 4, 909-915). Hai hợp chất furomollugin và mollugin thuộc khung naphthohydroquinon làm giảm mạnh sự tiết kháng nguyên bề mặt của viêm gan B (HBsAg) đều ở nồng độ 2,0 µg/ml (Ho và cộng sự, Journal of Natural Products, 1996, 59, 330-333). Các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng hai hợp chất chrysophanol 8-*O*-β-D-glucosit phân lập từ cây Đại hoàng (*Rheum palmatum*) và wogonin phân lập từ cây Hoàng cầm (*Scutellaria baicalensis*) thể hiện tác dụng mạnh nhất kháng HBV trên dòng HepG2.2.15 (Li và cộng sự, Chemotherapy, 2007, 53, 320-326; Chen và cộng sự, Journal of Viral Hepatitis, 2013, 20, 445-452). Cho đến nay, mới chỉ có một sáng chế công bố về các anthraquinon từ cây Đại hoàng (*Rheum palmatum*) để điều trị bệnh viêm gan B trên *in vivo* (Fu và cộng sự, CN104324089, 2015).

Trên thế giới có khoảng 65 loài thực vật thuộc chi *Morinda*, phân bố khắp vùng nhiệt đới và Á nhiệt đới, từ Trung Quốc đến Việt Nam, Lào, Campuchia, Thái Lan, Indonesia, Philippin, Ấn Độ, Úc và các đảo ở Thái Bình Dương. Nhiều loài cây thuộc chi *Morinda* (trong đó có cây Ba kích - *Morinda officinalis* là cây thuốc đang được nghiên cứu và phát triển mạnh) trong y học dân gian nhiều nước được dùng để chữa nhiều bệnh như chống viêm, kháng khuẩn, kháng virus, chống ung thư. Các hợp chất phân lập được từ thân và rễ của các cây thuộc chi *Morinda* bao gồm anthraquinon, irioid, anthraquinon glycosit, tritecpen, phenolic, v.v.. Đặc biệt lớp chất anthraquinon chiết tách ra được từ chi *Morinda* do chúng có nhiều các đặc tính dược lý thú vị: chống ung thư, chống nấm, chống oxy hóa, kháng virus và bảo vệ gan (Assi và cộng sự, Arabian Journal of Chemistry). Một số hợp chất thuộc khung anthraquinon như emodin, rhein, v.v. được phân lập từ dịch chiết etanol của cây Đại hoàng (*Rheum palmatum*) có tác dụng kháng HBV trên dòng tế bào HepAD38 (Sun và cộng sự, Virologica Sinica, 2007, 22, 14-20). Do vậy, các hợp chất anthraquinon rất có tiềm năng để phát triển thành thuốc phòng ngừa và điều trị bệnh về gan.

Cây Nhó đông có tên khoa học là *Morinda longissima*, là cây gỗ bụi, mọc thẳng đứng, cao từ 2-4m, gỗ thân và rễ có màu vàng, vị đắng. Bộ phận dùng làm thuốc của cây Nhó đông là rễ, thu hái quanh năm, tốt nhất vào mùa thu, thu mẫu, rửa sạch, phơi hoặc sấy khô. Dược liệu có vị đắng, màu vàng, tính bình, không độc, có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, kiện tỳ, hoạt huyết, tiêu viêm, tán ú, chữa viêm gan, vàng da, xơ gan. Hiện nay chưa có công bố khoa học nào về mô hình thử HBV *in vitro* của cây thuốc Việt Nam mặc dù đã có khá nhiều các công trình nghiên cứu về việc đánh giá tác dụng của cây Nhó đông trong việc hỗ trợ bảo vệ gan và chữa viêm gan mạn tính do độc (Khu và cộng sự, Tạp chí Dược học, 2011, 422, 24-27). Tuy nhiên, chưa có công bố nào liên quan đến việc phát hiện, sản xuất và đánh giá nhóm hoạt chất từ rễ cây Nhó đông có tác dụng ức chế sự nhân lên HBV *in vitro* nhằm phát triển thành sản phẩm dược để phòng ngừa và điều trị bệnh viêm gan B.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để đạt được mục đích nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất hỗn hợp để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm gan B từ rễ cây Nhó đông (*Morinda longissima*) và hỗn hợp thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hái và rửa sạch rễ cây Nhó đông (*Morinda longissima*), phơi và sấy khô ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 4 giờ rồi nghiền thành bột;

b) thu cao chiết etanol bằng cách ngâm bột rễ cây Nhó đông thu được ở bước a) với etanol theo tỷ lệ 1/4 (trọng lượng/thể tích) trong thời gian 6 giờ, sau khi loại bỏ phần bã, phần dịch chiết được cô quay loại bỏ dung môi thu được cao chiết ở dạng đặc quánh, tiếp đó kiểm hóa cao chiết bằng dung dịch NaOH 1N đến khi pH nằm trong khoảng từ 9 đến 11 trong điều kiện khuấy, sau khi loại bỏ cặn, axit hóa phần dịch kiềm thu được bằng axit clohydric 15% đến khi pH nằm trong khoảng từ 3 đến 5 trong điều kiện khuấy đến khi xuất hiện kết tủa, lọc và thu kết tủa ở dạng bột ướt (cao chiết etanol);

c) thu cao chiết etyl axetat bằng cách chuyển cao chiết etanol thu được từ bước b) vào thiết bị hồi lưu có khuấy chứa etyl axetat theo tỷ lệ cao chiết etanol/etyl axetat là 1/5 (trọng lượng/thể tích), chỉnh nhiệt độ đến khoảng từ 60 đến 80°C và khuấy trong khoảng thời gian từ 3,5 đến 4,5 giờ, sau đó thu dịch chiết etyl axetat, làm khan bằng natri sunfat

và cô quay dịch chiết trong điều kiện áp suất giảm thu được cao chiết, rửa cao chiết bằng nước, để khô thu được cao chiết ethyl axetat dạng bột; và

d) thu hỗn hợp bằng cách nhồi cao chiết ethyl axetat thu được từ bước c) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel và tiến hành sắc ký với hệ dung môi nhồi cột là n-hexan/ethyl axetat theo tỷ lệ 10/2 (thể tích/thể tích) và rửa giải bằng hệ dung môi n-hexan/ethyl axetat/metanol theo tỷ lệ 5/1/1 (B1), 3/1/1 (B2), 2/1/1 (B3), 1/1/1 (B4) và 1/1/2 (B5) (thể tích/thể tích/thể tích), thu 03 phân đoạn tương ứng với các hệ dung môi rửa giải B1, B3 và B4 và phối trộn theo tỷ lệ 1/1/1 (khối lượng/khối lượng/khối lượng) thu được hỗn hợp.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến hỗn hợp thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó hỗn hợp này bao gồm 3-hydroxy-1-methoxy-2-((((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-((((2R,3S, 4R, 5S)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)anthracene-9,10-dion, 1-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-3-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2S,3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxyanthracene-9,10-dion, 3-hydroxy-1-methoxy-2-((((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-((((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)anthracene-9,10-dion, 2-(6-O- α -L-Rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1,5-dihydroxy-6-methylanthraquinon, 1-Hydroxy-3-methoxy-2-methyl-9,10-anthraquinon, 1-hydroxy-2-methyl-6-methoxyanthraquinon, 1,6-dihydroxy-2-methyl-9,10-anthraquinon và 1,2,5-trihydroxy-6-methylanthracene-9,10-dion.

Theo một phương án ưu tiên, hỗn hợp theo giải pháp hữu ích có tác dụng ức chế virus viêm gan B, hữu ích để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm gan B.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: thể hiện sắc ký đồ của hỗn hợp thu được tại bước sóng 450 nm.

Hình 2: thể hiện hình ảnh tế bào nuôi cấy dưới tác dụng của thuốc thử sau 48 giờ thử nghiệm.

Hình 3: thể hiện hình ảnh tế bào nuôi cấy dưới tác dụng của thuốc thử sau 72 giờ thử nghiệm.

Hình 4: thể hiện lượng HBV-ADN có trong tế bào Hep3B sau 48 giờ và 72 giờ sau khi thử nghiệm. Kết quả realtime-PCR định lượng HBV-ADN của nhóm tế bào

dưới tác dụng của các sản phẩm từ rễ cây Nhó đông khi so sánh với đối chứng dương (lamivudin) và đối chứng âm (DMSO) theo thời gian tại thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau khi thử nghiệm.

Hình 5: thể hiện tác dụng ức chế tương đối sự nhân lên của HBV-ADN tại thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau khi thử. Hiệu quả ức chế sự nhân lên của HBV dưới tác dụng của các sản phẩm từ rễ cây Nhó đông, và đối chứng dương lamivudin khi so sánh với nhóm đối chứng âm (DMSO) theo thời gian tại thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau khi thử nghiệm.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết giải pháp hữu ích để làm rõ các phương án thực hiện chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Rễ cây Nhó đông được sử dụng theo giải pháp hữu ích thu được từ cây Nhó đông có tên khoa học là *Morinda longissima*. Đây là cây gỗ bụi, mọc thẳng đứng, cao từ 2-4m, gỗ thân và rễ có màu vàng, vị đắng. Trong y học cổ truyền, rễ cây Nhó đông được sử dụng làm dược liệu để thanh nhiệt, giải độc, kiện tỳ, hoạt huyết, tiêu viêm, tán úr, chữa viêm gan, vàng da, xơ gan. Đồng bào ở xã Chiềng An, thị xã Sơn La còn dùng rễ hoặc thân già (phần sát gốc rễ của cây Nhó đông phối hợp với rễ cây Hè mọ (*Psychotria reevesii*) để chữa bệnh viêm đại tràng và gan cho kết quả tốt (Trại và cộng sự, Tạp chí Dược liệu, 2004, 9, 1-2). Thuốc giúp người bệnh ăn ngủ tốt, hết vàng da, vàng mắt và đầy bụng.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) thu cao chiết etanol; c) thu cao chiết etyl axetat; và d) thu hỗn hợp.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, tiến hành thu hái và rửa sạch rễ cây Nhó đông (*Morinda longissima*), phơi và sấy khô ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 4 giờ. Sau đó nghiền thành bột, thu được bột rễ cây Nhó đông.

Trong bước thu cao chiết etanol, tiến hành ngâm bột rễ cây Nhó đông thu được ở trên với etanol theo tỷ lệ 1/4 (trọng lượng/thể tích) trong thời gian 6 giờ. Tiếp đó loại bỏ phần bã, thu phần dịch chiết. Phần dịch chiết này được cô quay loại bỏ dung môi để thu cao chiết ở dạng đặc quánh. Tiếp đó, kiểm hóa cao chiết bằng dung dịch NaOH 1N đến

khi pH nằm trong khoảng từ 9 đến 11 trong điều kiện khuấy. Sau khi loại bỏ cặn bằng cách lọc, axit hóa phần dịch kiềm thu được bằng axit clohydric 15% đến khi pH nằm trong khoảng từ 3 đến 5 trong điều kiện khuấy đến khi xuất hiện kết tủa. Tiến hành lọc và thu kết tủa ở dạng bột ướt (cao chiết etanol).

Trong bước thu cao chiết etyl axetat, tiến hành chuyển phần kết tủa thu được từ bước b) vào thiết bị hồi lưu có khuấy chứa etyl axetat theo tỷ lệ dịch chiết/etyl axetat là 1/5 (trọng lượng/thể tích). Điều chỉnh nhiệt độ đến khoảng từ 60 đến 80°C và khuấy trong khoảng thời gian từ 3,5 đến 4,5 giờ. Sau đó, tiến hành lọc thu dịch chiết etyl axetat, làm khan bằng natri sunfat và đưa vào cô quay trong điều kiện áp suất giảm để thu cao chiết etyl axetat. Cao chiết được rửa bằng nước, để khô, thu được cao chiết etyl axetat dạng bột.

Trong bước thu hỗn hợp, tiến hành nhồi cao chiết etyl axetat thu được ở trên lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel. Tiến hành sắc ký với hệ dung môi nhồi cột là n-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ 10/2 (thể tích/thể tích). Rửa giải bằng hệ dung môi n-hexan/etyl axetat/metanol theo tỷ lệ 5/1/1 (B1), 3/1/1 (B2), 2/1/1 (B3), 1/1/1 (B4) và 1/1/2 (B5) (thể tích/thể tích/thể tích). Các phân đoạn thu được tương ứng với các hệ dung môi, tiến hành thu 03 phân đoạn tương ứng với các hệ dung môi rửa giải B1, B3 và B4. Tiếp đó phối trộn ba phân đoạn này theo tỷ lệ 1/1/1 (khối lượng/khối lượng) thu được hỗn hợp.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến hỗn hợp thu được từ rễ cây Nhỏ đông theo quy trình theo giải pháp, trong đó hỗn hợp này bao gồm 3-hydroxy-1-methoxy-2-((((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-(((2R,3S, 4R, 5S)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)anthracene-9,10-dion, 1-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-3-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2S,3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxyanthracene-9,10-dion, 3-hydroxy-1-methoxy-2-((((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-(((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)anthracene-9,10-dion, 2-(6-O- α -L-Rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1,5-dihydroxy-6-methylanthraquinon, 1-Hydroxy-3-methoxy-2-methyl-9,10-anthraquinon, 1-hydroxy-2-methyl-6-methoxyanthraquinon, 1,6-

dihydroxy-2-methyl-9,10-anthraquinon và 1,2,5-trihydroxy-6-methylantracene-9,10-dion.

Hỗn hợp theo giải pháp hữu ích có tác dụng ức chế virus viêm gan B, hữu ích để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm gan B.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Sản xuất hỗn hợp từ rễ cây Nhó đông (*Morinda longissima*)

Rễ cây Nhó đông (*Morinda longissima*) được thu gom, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, phơi đến khô trong bóng râm và sấy khô ở nhiệt độ 60 °C trong thời gian 4 giờ, sau đó rễ được nghiền thành bột kích thước 1- 5mm.

Cân 5 kg bột rễ cây Nhó đông ngâm với 20 lít etanol trong thời gian 6 giờ. Sau đó loại bỏ phần bã bằng cách lọc và ép kiệt etanol thu được 450 lít dịch chiết. Dịch chiết được cô quay loại bỏ dung môi thu được cao chiết ở dạng đặc quánh (HCTN-210).

Kiểm hóa cao chiết bằng cách nhỏ từ từ 50 ml dung dịch NaOH 1N vào cao chiết đến pH =10. Trong quá trình kiểm hóa, hỗn hợp được khuấy đều liên tục bằng thiết bị khuấy treo tốc độ 400-500 vòng/phút. Tiếp đó, lọc bỏ cặn bằng hệ thống lọc cơ học thu 500 ml dịch kiềm.

Dịch kiềm tiếp tục được axit hóa bằng cách nhỏ từ từ 150 ml axit clohydric 15% vào dịch kiềm đến pH =4 kết hợp khuấy treo tốc độ 200 vòng/phút tạo kết tủa. Tiến hành lọc và thu kết tủa được 300 g cao chiết etanol ở dạng bột ướt (hỗn hợp A, HCTN-211).

Cao chiết etanol được chuyển vào thiết bị hồi lưu và chiết nóng bằng 1,5 lít dung môi etyl axetat ở nhiệt độ 80°C trong 4 giờ kết hợp khuấy. Sau đó dịch chiết được lọc bỏ cặn bằng giấy lọc và làm khan bằng 50 g natri sunfat thu được dịch chiết etyl axetat. Tiến hành cô quay dịch chiết etyl axetat trong điều kiện áp suất giảm thu được cao chiết. Rửa cao chiết với 100 ml nước, sau khi để khô tự nhiên thu được 150 g cao chiết etyl axetat dạng bột (hỗn hợp B, HCTN-212).

Tiến hành nhồi cao chiết etyl axetat lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel, hệ dung môi nhồi cột là n-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ 10/2 (thể tích/thể tích). Sau khi để ổn định, rửa giải bằng hệ dung môi n-hexan/etyl axetat/metanol với các nồng độ lần lượt theo tỷ lệ 5/1/1 (B1), 3/1/1 (B2), 2/1/1 (B3), 1/1/1 (B4) và 1/1/2 (B5) (thể tích/thể tích) thu được 05 phân đoạn bao gồm 25 g B1 (HCTN-213), 20 g B2 (HCTN-

214), 34 g B3 (HCTN-215), 42 g B4 (HCTN-216) và 28 g B5 (HCTN-217) tương ứng với các nồng độ n-hexan/etyl axetat/metanol theo tỷ lệ 5/1/1, 3/1/1, 2/1/1, 1/1/1 và 1/1/2.

Gom các phân đoạn B1, B3 và B4 và phối trộn theo tỷ lệ 1/1/1 theo khối lượng, thu được hỗn hợp (HCTN-218).

Hỗn hợp thu được là dạng bột vô định hình, màu nâu đỏ, thành phần hỗn hợp được kiểm tra bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối khối phổ (HPLC/MS) để xác định thành phần.

Ví dụ 2. Xác định thành phần trong hỗn hợp

Hỗn hợp theo giải pháp hữu ích được xác định thành phần bằng HPLC/MS, kết quả cho thấy hỗn hợp thu được từ Ví dụ 1 bao gồm 8 hợp chất. Kết quả thu được được thể hiện ở hình 1 và bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hợp chất có trong hỗn hợp.

Pic	t_R (phút)	Tên chất xác định	CTPT	Tên IUPAC
1	4,411	Damnacanthol-11- <i>O</i> -primeveroside	$C_{27}H_{30}O_{14}$ (MW = 578)	3-hydroxy-1-methoxy-2- (((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6- (((2R,3S,4R,5S)-3,4,5- trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2- yl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2- yl)oxy)methyl)anthracene-9,10-dion
2	5,081	Lucidin-3- <i>O</i> - primeveroside	$C_{26}H_{28}O_{14}$ (MW = 564)	1-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-3- [(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6- [[[(2S,3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxyoxan- 2-yl]oxymethyl]oxan-2- yl]oxyanthracene-9,10-dion
3	5,459	Damnacanthol-11- <i>O</i> -gentiobioside	$C_{28}H_{32}O_{15}$ (MW = 608)	3-hydroxy-1-methoxy-2- (((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6- (((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6- (hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2- yl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2- yl)oxy)methyl)anthracene-9,10-dion
4	6,017	Morindone-6- <i>O</i> - primeveroside	$C_{26}H_{28}O_{14}$ (MW = 564)	2-(6- <i>O</i> - α -L-Rhamnopyranosyl- β -D- glucopyranosyloxy)-1,5-dihydroxy-6- methylantraquinon

5	6,429	Rubiadin 3-methyl ether	C ₁₆ H ₁₂ O ₄ (MW = 268)	1-Hydroxy-3-methoxy-2-methyl-9,10-anthraquinon
6	6,587	1-hydroxy-2-methyl-6-methoxyanthraquinone	C ₁₆ H ₁₂ O ₄ (MW = 268)	1-hydroxy-2-methyl-6-methoxyanthraquinon
7	8,076	Soranjidiol	C ₁₅ H ₁₀ O ₄ (MW = 254)	1,6-dihydroxy-2-methyl-9,10-anthraquinon
8	8,928	Morindone	C ₁₅ H ₁₀ O ₅ (MW = 270)	1,2,5-trihydroxy-6-methylanthracene-9,10-dion

Ví dụ 3: Thử nghiệm *in vitro* tác dụng ức chế sự nhân lên HBV trên dòng tế bào Hep3B của hỗn hợp.

Để đánh giá khả năng ức chế virus HBV của các mẫu thử, tiến hành đánh giá trên dòng tế bào Hep3B ung thư gan của người được tích hợp mảnh ADN của HBV (tế bào được biến nạp HBV tái tổ hợp). Các mẫu thử được pha trong dung môi DMSO trước khi cho vào môi trường nuôi cấy. Trong đó, lamivudin (có tác dụng ức chế sự nhân lên của HBV đã được chứng minh trên lâm sàng) được sử dụng là đối chứng dương và DMSO làm đối chứng âm. Quá trình thử nghiệm được tiến hành như sau:

Nuôi cấy tế bào Hep3B

Tế bào Hep3B được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chuẩn Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12) (Invitrogen, USA) với 100 U/ml penicilin và 100 mg/ml streptomycin (Invitrogen, USA) ở nhiệt độ 37°C trong môi trường 5% CO₂. Khi tế bào nuôi cấy đạt tỉ lệ 70 - 80% diện tích đĩa nuôi, ta tiến hành cấy chuyển sử dụng 0,05 % trypsin/EDTA (Invitrogen, USA, 5 phút ở 37 °C) để tách tế bào khỏi đĩa nuôi cấy và chuyển sang đĩa nuôi cấy mới với môi trường như trên.

Xác định ngưỡng nồng độ thuốc thử không gây độc tính tế bào Hep3B

Cao chiết (HCTN-210), hỗn hợp A (HCTN-211), hỗn hợp B (HCTN-212), phân đoạn B1 (HCTN-213), phân đoạn B2 (HCTN-214), phân đoạn B3 (HCTN-215), phân đoạn B4 (HCTN-216), phân đoạn B5 (HCTN-217) và hỗn hợp (HCTN-218 (gọi chung là mẫu thử) thu được từ rễ cây Nhót đông được đánh giá tác dụng kháng HBV trên dòng tế bào Hep3B được tích hợp mảnh ADN của HBV khi so sánh với đối chứng dương là lamivudin (STADAR 100 mg) và đối chứng âm là DMSO (Fisher Chemical).

Các mẫu thử được pha trong DMSO với nồng độ dung dịch gốc là 10 mg/ml, riêng với lamivudin có nồng độ 10 mM/l. Các mẫu thử được đưa vào dung dịch nuôi cấy tế bào với nồng độ được xác định như sau: HCTN-210, HCTN-211, HCTN-213, HCTN-214, HCTN-216, HCTN-217 và HCTN-218 ở nồng độ 50 µg/ml; và HCTN-212 và HCTN-215 ở nồng độ 25 µg/ml.

Đánh giá tác dụng kháng HBV của các mẫu thử nghiệm

Tế bào Hep3B được gieo vào đĩa nuôi cấy 6 giếng (đường kính 5 cm) với nồng độ 10^5 tế bào/ml, tổng lượng tế bào là $2 \text{ ml} \times 10^5$ tế bào/giếng trong môi trường nuôi cấy chuẩn. Sau 24 giờ, tiến hành thay dịch nuôi cấy chứa các thuốc thử. Tiến hành thu tế bào và dịch nuôi cấy ở các thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau khi thử thuốc. Tế bào nuôi cấy được sử dụng để tách ADN và dùng để định lượng HBV-ADN bằng kỹ thuật realtime-PCR.

Kết quả ở hình 2 và hình 3 cho thấy các tế bào phát triển khỏe mạnh và phủ hầu hết bề mặt đĩa đến thời điểm 72 giờ sau thử thuốc trên tất cả các nhóm thử. Như vậy với nồng độ tối ưu của các mẫu thử như trên không làm ảnh hưởng đến sự phát triển tự nhiên của các tế bào Hep3B.

Để đánh giá tác dụng ức chế sự nhân lên HBV *in vitro* của các mẫu thử thu được từ rễ cây Nhó đông, tế bào Hep3B tích hợp mảnh ADN của HBV (ATCC) được nuôi cấy trong môi trường có các mẫu thử thu được từ rễ cây Nhó đông. Hiệu quả ức chế sự nhân lên HBV của các sản phẩm từ rễ cây Nhó đông được xác định thông qua so sánh lượng HBV-ADN với lamivudin và DMSO. Tế bào được thu để định lượng HBV-ADN ở thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau thử thuốc bằng kỹ thuật Realtime-PCR. Kết quả thu được tại bảng 2, bảng 3, hình 4 và hình 5.

Bảng 2: Kết quả realtime-PCR định lượng HBV-ADN của Hep3B tế bào dưới tác dụng của các mẫu thử thu được từ rễ cây Nhó đông sau 48 giờ thử nghiệm.

	Kí hiệu mẫu	HBV tương đối $\times 10^9/\text{mg}$ ADN tổng số	SE	% ức chế nhân lên HBV	% sai số
DMSO		1023,63	209,97	0	20,51
Lamivudin		138,12	200,08	86,50	19,54
Cao chiết	HCTN-210	59,39	131,58	94,19	12,85
Hỗn hợp A	HCTN-211	28,83	168,53	97,18	16,46
Hỗn hợp B	HCTN-212	492,35	30,88	51,90	3,01

Phân đoạn B1	HCTN-213	35,14	166,58	96,56	16,27
Phân đoạn B2	HCTN-214	100,00	84,06	90,23	8,21
Phân đoạn B3	HCTN-215	176,84	145,35	82,72	14,20
Phân đoạn B4	HCTN-216	278,08	148,73	72,83	14,52
Phân đoạn B5	HCTN-217	51,82	221,24	94,93	21,61
Hỗn hợp	HCTN-218	263,03	191,38	74,30	18,69

Bảng 3: Kết quả realtime-PCR định lượng HBV-ADN của tế bào Hep3B dưới tác dụng của các mẫu nghiệm thu được từ rễ cây Nhó đông sau 72 giờ thử nghiệm.

	Kí hiệu mẫu	HBV tương đối x10e9/1mg ADN tổng số	SE	% ức chế nhân lên HBV	% sai số
DMSO		1250,00	222,05	0	17,76
Lamivudin		166,90	137,79	86,64	11,02
Cao chiết	HCTN-210	314,41	87,51	74,84	7,00
Hỗn hợp A	HCTN-211	392,68	61,95	68,58	4,95
Hỗn hợp B	HCTN-212	232,63	79,61	81,38	6,36
Phân đoạn B1	HCTN-213	116,37	141,93	90,68	11,35
Phân đoạn B2	HCTN-214	517,5	3,41	58,60	0,27
Phân đoạn B3	HCTN-215	77,77	182,8	93,77	14,62
Phân đoạn B4	HCTN-216	23,60	159,04	98,11	12,72
Phân đoạn B5	HCTN-217	259,03	119,83	79,27	9,58
Hỗn hợp	HCTN-218	156,61	143,59	87,47	11,48

Một số các sản phẩm như hỗn hợp B (HCTN-212), phân đoạn B3 (HCTN-215), phân đoạn B4 (HCTN-216) và hỗn hợp (HCTN-218) có lượng HBV-ADN ở thời điểm 48 giờ giảm so với thời điểm 72 giờ, trong khi đó ở nhóm thử với DMSO và cao chiết (HCTN-210), hỗn hợp A (HCTN-211), phân đoạn B1 (HCTN-213), phân đoạn B5 (HCTN-217) có lượng HBV-ADN tăng. Ở mẫu đối chứng dương lamivudin có lượng HBV-ADN thấp, chênh lệch không nhiều ở hai thời điểm (hình 2). Như vậy, sau 72 giờ dùng thuốc, một số mẫu thử như HCTN-212, HCTN-215, HCTN-216 và HCTN-218 thu được từ rễ cây Nhó đông có tác dụng làm giảm lượng HBV-ADN trong tế bào Hep3B.

Đánh giá hiệu quả ức chế sự nhân lên của HBV (%) dưới tác dụng của các mẫu thu được từ rễ cây Nhó đông khi so sánh với đối chứng âm DMSO cho thấy các sản

phẩm từ rễ cây Nhó đông có tác dụng ức chế sự nhân lên của HBV dao động từ 51,90 – 97,18% ở thời điểm 48 giờ và 58,60 – 98,11% ở thời điểm 72 giờ thử thuốc, trong khi đối chứng dương lamivudin ức chế 86,50% ở thời điểm 48 giờ và 86,64% ở thời điểm 72 giờ sau thử thuốc (bảng 2, bảng 3 và hình 5).

Đặc biệt, lượng HBV-ADN trong tế bào Hep3B giảm rõ rệt dưới tác dụng của các phân đoạn B1 (giảm 90,68%), phân đoạn B3 (giảm 93,77%), phân đoạn B4 (giảm 98,11%) và hỗn hợp (giảm 87,47%).

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất hỗn hợp theo giải pháp hữu ích thu được hỗn hợp có hoạt tính sinh học, cụ thể là có tác dụng phòng ngừa và điều trị bệnh viêm gan B từ rễ cây Nhó đông (*Morinda longissima*). Hỗn hợp làm giảm rõ rệt lượng HBV trong mô hình thử nghiệm *in vitro* trên dòng tế bào Hep3B (87,47%).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất hỗn hợp để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm gan B từ rễ cây Nhó đông (*Morinda longissima*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

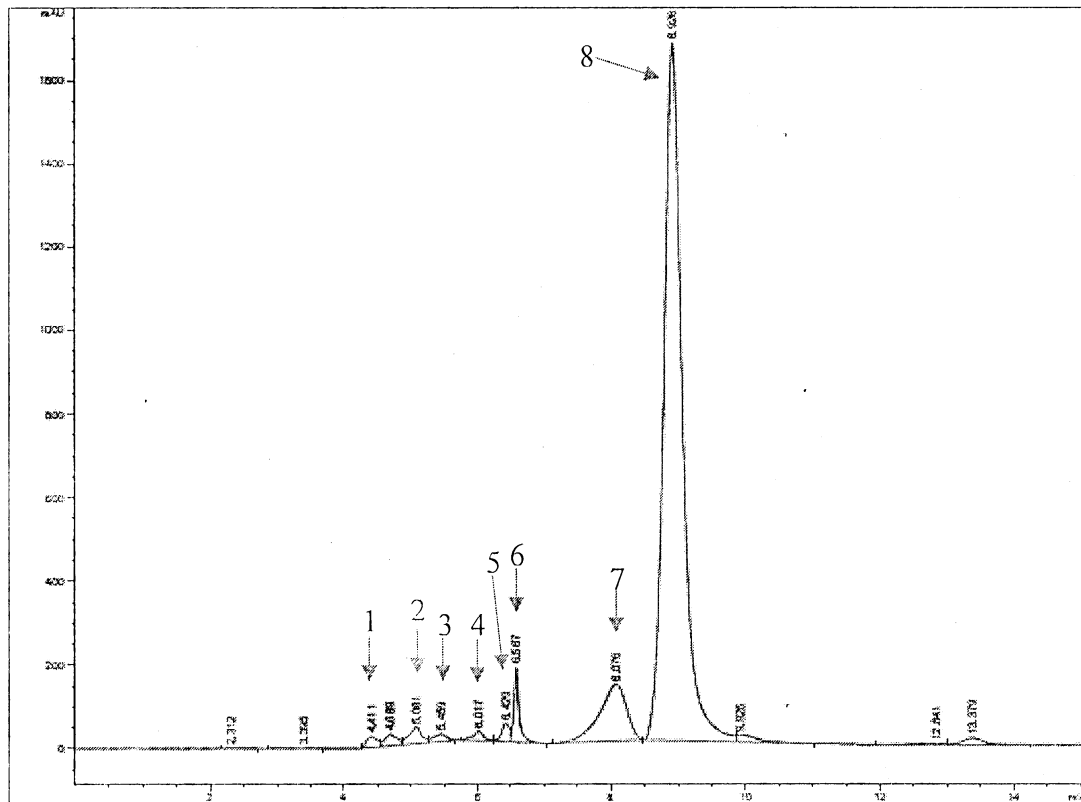
a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hái và rửa sạch rễ cây Nhó đông (*Morinda longissima*), phơi và sấy khô ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 4 giờ rồi nghiền thành bột;

b) thu cao chiết etanol bằng cách ngâm bột rễ cây Nhó đông thu được ở bước a) với etanol theo tỷ lệ 1/4 (khối lượng/thể tích) trong thời gian 6 giờ, sau khi loại bỏ phần bã, phần dịch chiết được cô quay loại bỏ dung môi thu được cao chiết ở dạng đặc quánh, tiếp đó kiềm hóa cao chiết bằng dung dịch NaOH 1N đến khi pH nằm trong khoảng từ 9 đến 11 trong điều kiện khuấy, sau khi loại bỏ cặn, axit hóa phần dịch kiềm thu được bằng axit clohydric 15% đến khi pH nằm trong khoảng từ 3 đến 5 trong điều kiện khuấy đến khi xuất hiện kết tủa, lọc và thu kết tủa ở dạng bột ướt (cao chiết etanol);

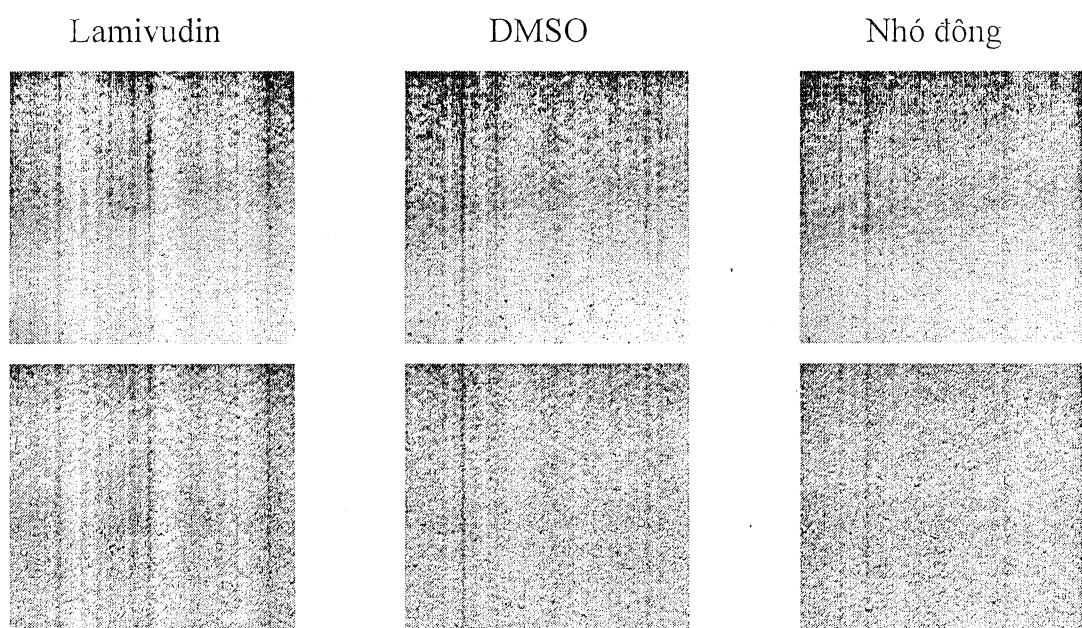
c) thu cao chiết etyl axetat bằng cách chuyển cao chiết etanol thu được từ bước b) vào thiết bị hồi lưu có khuấy chứa etyl axetat theo tỷ lệ cao chiết etanol/etyl axetat là 1/5 (khối lượng/thể tích), chỉnh nhiệt độ đến khoảng từ 60 đến 80°C và khuấy trong khoảng thời gian từ 3,5 đến 4,5 giờ, sau đó thu dịch chiết etyl axetat, làm khan bằng natri sulfat và cô quay dịch chiết trong điều kiện áp suất giảm thu cao chiết, rửa cao chiết bằng nước, sau khi để khô thu được cao chiết etyl axetat dạng bột; và

d) thu hỗn hợp bằng cách nhồi cao chiết etyl axetat thu được từ bước c) lên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel và tiến hành sắc ký với hệ dung môi nhồi cột là n-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ 10/2 (thể tích/thể tích) và rửa giải bằng hệ dung môi n-hexan/etyl axetat/metanol theo tỷ lệ 5/1/1 (B1), 3/1/1 (B2), 2/1/1 (B3), 1/1/1 (B4) và 1/1/2 (B5) (thể tích/thể tích/thể tích), thu 03 phân đoạn tương ứng với các hệ dung môi rửa giải B1, B3 và B4 và phối trộn theo tỷ lệ 1/1/1 (khối lượng/khối lượng/khối lượng) thu được hỗn hợp.

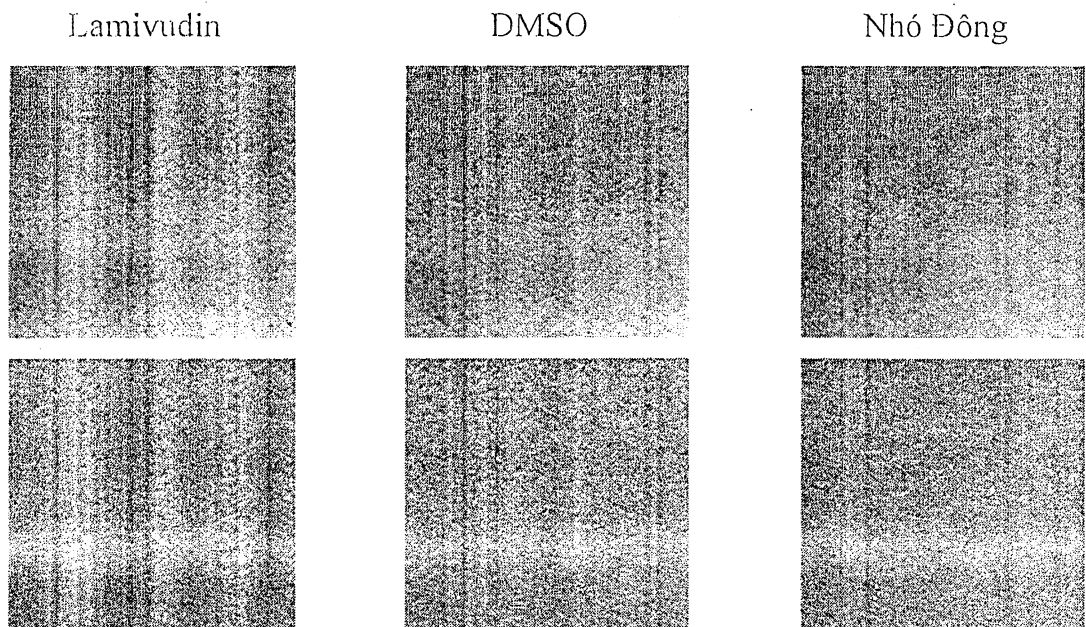
HÌNH 1



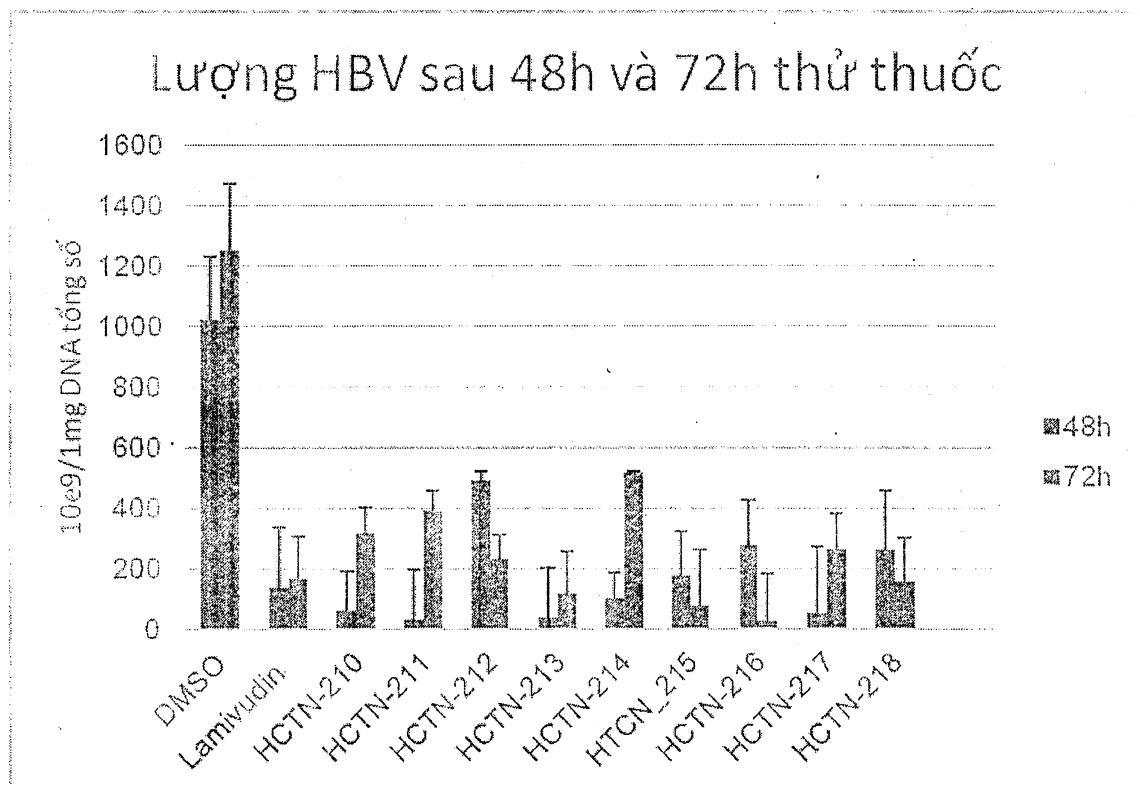
HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4



HÌNH 5

