



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

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



2-0002478

(51)⁷ **A61K 36/537 (13) Y**

(21) 2-2018-00268

(22) 31/07/2018

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/12/2018 369A

(73) Nguyễn Hữu Tùng (VN)

Khoa Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Hữu Tùng (VN); Lê Anh Tuấn (VN); Nguyễn Minh Đức (VN); Vương Đức Anh (VN); Phạm Việt Anh (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CAO CHIẾT CHỨA HỢP CHẤT TANSHINON TỪ CÂY ĐAN SÂM (SALVIA MILTIORRHIZA)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất cao chiết chứa hợp chất tanshinon có tác dụng chống ung thư từ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza*, trong đó bằng cách thay đổi hệ dung môi và điều kiện chiết, quy trình cho phép sản xuất được cao chiết chứa hợp chất tanshinon với hiệu suất đủ để phát triển nguồn dược liệu để sản xuất thuốc chống ung thư máu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực hóa dược và các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất cao chiết chứa hợp chất tanshinon từ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* để phát triển dược liệu dùng trong sản xuất thuốc điều trị bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong Đông y, Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza*) được dùng trong các bài thuốc bổ máu và trị bệnh tim mạch, đã có nhiều nghiên cứu công bố về tác dụng sinh học và dược lý của cây Đan sâm. Gần đây tác dụng chống ung thư của cây Đan sâm, đặc biệt là của thành phần tanshinon được phát hiện và thu hút nhiều sự quan tâm.

Các nghiên cứu công bố chỉ ra rằng tác dụng chống ung thư của cây Đan sâm tập trung vào thành phần chính tanshinon. Nghiên cứu tác dụng chống ung thư của các tanshinon chủ yếu trên các mô hình nuôi cấy tế bào. Một số hợp chất tanshinon ức chế mạnh sự phát triển của các dòng tế bào ung thư ở nồng độ thấp với giá trị IC_{50} nhỏ hơn $10 \mu M$. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu về cơ chế tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư của các hợp chất tanshinon đã được công bố và chỉ ra rằng cơ chế gây chết rụng tế bào apoptosis đóng vai trò chính.

Tài liệu CN105399796A đã đề cập đến phương pháp tinh chế hoạt chất tanshinon chính bao gồm tanshinon I và IIA từ cây Đan sâm, trong đó tài liệu này mô tả kỹ thuật chiết bằng etanol và tinh chế dùng sắc ký cột Sephadex với pha động là metanol. Tuy nhiên, ở công đoạn chiết, sáng chế này chưa đề cập đến phương pháp chiết siêu âm với dung môi etanol 95% ở nhiệt độ thấp có tác dụng vừa hòa tan tốt, triệt để và tránh sự phân hủy của các hoạt chất tanshinon. Không những thế, ở bước tinh chế, sáng chế này chưa dùng phương pháp chiết phân bố lỏng-lỏng để tách riêng các nhóm chất và đặc biệt là sáng chế này sử dụng pha động là metanol chứ chưa sử dụng sắc ký cột Sephadex LH-20 với pha động là etanol 95% dẫn đến quy trình chiết xuất chưa hiệu quả.

Ở Việt Nam cho đến nay có rất ít nghiên cứu về thành phần hóa thực vật và hoạt tính sinh học của cây đan sâm. Gần đây, nhóm nghiên cứu Viện Dược liệu nghiên cứu về thực vật học và khảo sát thành phần chất chính tanshinon IIA của đan sâm thu hái ở Việt Nam. Chưa có quy trình cụ thể cũng như nghiên cứu toàn diện về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của đan sâm Việt Nam.

Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế số 1-2016-03772 đã đề cập đến kỹ thuật phân lập hợp chất diterpenoit từ rễ cây Đan sâm. Tài liệu của tác giả Lại Thị Thắm, “bước đầu nghiên cứu thành phần của cây đan sâm” đã mô tả kỹ thuật chiết mộ số thành phần hoạt chất từ cây Đan sâm, nhưng không đề cập đến quy trình chiết hợp chất chứa tanshinon có hoạt tính chống ung thư. Tài liệu của tác giả Đặng Thị Ngân, Nghiên cứu phân lập và định lượng Cryptotanshinon từ cây Đan sâm, khóa luận tốt nghiệp, Đại học Quốc gia Hà Nội, 2017 mặc dù đã đề cập đến quy trình chiết hợp chất tanshinon từ cây Đan sâm, tuy nhiên, kỹ thuật của tác giả này không sử dụng kỹ thuật chiết phân đoạn và hấp phụ sắc ký bằng cột Sephadex thu phân đoạn chứa tanshinon. Kỹ thuật này được đánh giá phức tạp và không hiệu quả trong việc thu hồi tanshinon.

Do đó, cần có quy trình sản xuất, cụ thể là chiết hợp chất tanshinon từ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* đơn giản nhưng đặc hiệu và với hiệu suất đủ để có khả năng phát triển được sản phẩm để cung cấp, ứng dụng cho ngành dược.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm khắc phục các vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất cao chiết chứa hợp chất tanshinon có hoạt tính chống ung thư từ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý nguyên liệu bằng cách thu hái rễ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza*, sau đó thái nhỏ, sấy khô đến độ ẩm khoảng 10%, tiếp đó nghiền thành bột;

b) chiết nguyên liệu bằng cách chuyển bột rễ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* thu được từ bước xử lý nguyên liệu vào bình chiết, tiếp đó chiết 3 lần trong điều kiện siêu âm bằng dung môi etanol 96% với tổng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/8 (trọng lượng/thể tích), phần dịch chiết được thu gom rồi cô chân không phần dịch chiết này đến khi còn 1/8, thu phần dịch chiết lỏng;

c) tinh sạch sơ bộ dịch chiết lỏng bằng cách chiết phân bố 3 lần phần dịch chiết lỏng thu được từ bước chiết nguyên liệu với diclometan (CH_2Cl_2) theo tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích), sau khi thu phân đoạn diclometan cất loại dung môi diclometan thu được cao lỏng chứa tanshinon; và

d) thu cao chiết chứa hợp chất tanshinon có hoạt tính chống ung thư bằng cách hấp phụ phần cao lỏng chứa tanshinon lên cột sắc ký Sephadex LH-20 được nhồi hạt nhựa diaion HP-20 theo tỷ lệ cao lỏng/hạt nhựa là 10/1 (thể tích/trọng lượng), tiếp đó để cân bằng hấp phụ cột trong 8 giờ rồi rửa loại tạp chất bằng etanol với thể tích gấp hai lần thể tích cột, cuối cùng rửa giải bằng etanol 96% với lượng gấp 5 lần thể tích cột, phần dịch rửa giải này được cất loại dung môi trên máy cất quay thu được sản phẩm chứa hợp chất tanshinon dạng cao đặc.

Theo một phương án, trong đó quy trình này còn thêm bước sấy cao chiết chứa hợp chất tanshinon trong thiết bị cô sấy chân không ở nhiệt độ từ 55 đến 60°C đến khi hàm ẩm khoảng 5% để thu được sản phẩm cao chiết dạng bột.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết nguyên liệu bột rễ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* được thực hiện 3 lần, mỗi lần 2 giờ ở nhiệt độ 40°C trong điều kiện áp suất giảm.

Ngoài ra, giải pháp hữu ích cũng đề cập đến cao chiết chứa hợp chất tanshinon thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó sản phẩm này có tác dụng ức chế khối u thích hợp để sản xuất thuốc hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

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

Quy trình sản xuất cao chứa hợp chất tanshinon có hoạt tính chống ung thư từ cây đan sâm *Salvia miltiorrhiza* theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước: a) xử lý nguyên liệu; b) chiết nguyên liệu; c) tinh sạch sơ bộ dịch chiết lỏng; và thu cao chiết chứa hợp chất tanshinon có hoạt tính chống ung thư.

Cây Đan sâm có tên khoa học là *Salvia miltiorrhiza*, bộ phận sử dụng để sản xuất cao chiết theo giải pháp hữu ích là rễ của cây. Theo đó, trong bước xử lý nguyên liệu, rễ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* được thu hái, sau đó thái nhỏ, sấy khô đến độ ẩm khoảng 10%. Tiếp đó, nguyên liệu được nghiền thành bột.

Tiêu chuẩn bột cây Đan sâm sau nghiền cần đạt tiêu chuẩn cơ sở theo Dược điển Việt Nam với điều kiện hàm lượng tanshinon có trong dược liệu đan sâm không được thấp hơn 0,2% tính theo dược liệu khô tuyệt đối.

Các thành phần dụng cụ, nguyên liệu, dung môi và thiết bị được sử dụng trong quá trình điều chế cao giàu tanshinon cần phải được rửa sạch, sấy khô, đảm bảo vệ sinh an toàn, đáp ứng tiêu chuẩn sản xuất nguyên liệu dùng cho dược phẩm.

Trong bước chiết nguyên liệu, việc chiết nguyên liệu được thực hiện bằng kỹ thuật ngâm chiết trong thiết bị chiết. Theo đó tiến hành chuyển bột rễ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* nguyên liệu được chuẩn bị trong bước xử lý nguyên liệu vào bình chiết và bổ sung dung môi là etanol để tiến hành chiết. Để tăng hiệu suất chiết, quá trình chiết được thực hiện trong điều kiện siêu âm với hệ dung môi chiết là etanol 96%. Các tác giả bằng thực nghiệm đã thấy rằng, điều kiện chiết tối ưu để thu được lượng tanshinon cao, nhưng giảm được thời gian chiết cũng như thu được ít tạp chất nhất. Theo đó, để tăng hiệu suất chiết, quá trình chiết cần được tiến hành với 3 lần chiết trong điều kiện siêu âm với tổng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/8 (trọng lượng/thể tích). Tốt hơn nữa là quá trình chiết này được thực hiện trong điều kiện áp suất giảm.

Theo một phương án cụ thể, trong đó bước chiết nguyên liệu bột rễ đan sâm *Salvia miltiorrhiza* được thực hiện 3 lần, mỗi lần 2 giờ ở nhiệt độ 40°C trong điều kiện áp suất giảm.

Phần dịch chiết sau đó được thu gom rồi cô chân không này đến khi còn 1/8 thể tích, thu phần dịch chiết lỏng. Theo đó, lượng dịch chiết sau khi chiết được tính cho lượng nguyên liệu đạt tỷ lệ 1:1 (trọng lượng/thể tích). Với lượng dịch chiết này, hiệu suất chiết và lượng dung môi sử dụng trong các bước sau được tối ưu và tiết kiệm được dung môi cần sử dụng.

Trong bước tinh sạch sơ bộ dịch chiết lỏng, tiến hành chiết phân bố 3 lần phần dịch chiết lỏng thu được từ bước chiết nguyên liệu với diclometan (CH_2Cl_2) theo tỷ lệ

1:1 (thể tích/thể tích). Mục đích của quá trình này nhằm chiết chọn lọc các thành phần tan trong diclometan. Theo đó, phần dịch chiết được bổ sung với lượng diclometan tương ứng và chiết phân đoạn bằng cách lắc. Sau khi chiết phân bố, phân đoạn diclometan được thu gom bằng phễu chiết và được cất loại dung môi đến dạng cao lỏng. Phần cao lỏng này đã được tách các thành phần phân cực thân nước.

Trong bước thu cao chiết chứa hợp chất tanshinon có hoạt tính chống ung thư, bước này được thực hiện với kỹ thuật sắc ký, cụ thể là bằng cột sắc ký Sephadex LH-20 với nhựa hấp phụ thích hợp. Cụ thể, phần cao lỏng chứa tanshinon thu được ở trên được hấp phụ lên cột sắc ký Sephadex LH-20 đã được nhồi hạt nhựa diaion HP-20 bằng cách bơm từ từ lượng cao lỏng lên cột nhồi theo tỷ lệ cao lỏng/hạt nhựa là 10/1 (thể tích/trọng lượng). Quá trình này được kiểm soát bằng sắc ký màng mỏng để đảm bảo phần cao chiết không thoát ra khỏi cột. Tiếp đó, giữ cột để cân bằng hấp phụ trong 8 giờ để hoạt chất tanshinon hấp phụ lên hạt nhựa. Sau đó rửa loại tạp chất bằng etanol với thể tích gấp hai lần thể tích cột. Sau khi loại tạp chất, để thu hợp chất tanshinon, tiến hành rửa giải bằng etanol 96% với lượng gấp 5 lần thể tích cột. Phần dịch rửa giải này được thu gom và cất loại dung môi trên máy cất quay thu được sản phẩm chứa hợp chất tanshinon dạng cao đặc.

Sản phẩm cao đặc này được kiểm tra chất lượng, hàm lượng hoạt chất để trực tiếp đưa vào sản xuất hoặc có thể được đưa vào sấy cao chiết chứa hợp chất tanshinon thu được này trong thiết bị cô sấy chân không ở nhiệt độ từ 55 đến 60°C đến khi hàm ẩm khoảng 5% để thu được sản phẩm cao chiết dạng bột.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Sản xuất cao chiết chứa hợp chất tanshinon từ cây Đan sâm

Rễ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* Bunge được thu hái, rửa sạch, loại bỏ tạp chất và thái thành lát nhỏ và sấy khô đến khi hàm ẩm khoảng 10%, tiếp đó nghiền nguyên liệu thành bột.

Cân 20 kg bột rễ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* Bunge thu được ở trên chuyển vào bình chiết. Tiếp đó chuẩn bị một lượng metanol 96% theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/8. Bổ sung 1/3 lượng dung môi vào bình chiết (khoảng 53 lít metanol/lần chiết) và tiến hành chiết trong điều kiện siêu âm trong 2 giờ ở nhiệt độ 40°C với áp

suất giảm. Sau khi chiết, thu hồi dung môi và lặp lại quá trình chiết 3 lần. Phần dịch chiết được thu gom và cô trong chân không đến khi còn 20 lít dịch chiết.

Tiếp đó, bổ sung một lượng diclometan tương ứng vào phần dịch chiết thu được và khuấy trộn đều để quá trình chiết phân bố xảy ra hiệu quả. Quá trình chiết được thực hiện 3 lần, phân đoạn diclometan mỗi lần được thu gom bằng phễu chiết. Tiếp đó phân đoạn diclometan này được cất loại dung môi đến khi thu được dạng cao lỏng, sánh màu nâu chứa tanshino.

Từng phần cao lỏng được tinh sạch bằng cột Sephadex. Theo đó, nhồi nhựa diaion HP-20 lên cột Sephadex kích thể tích 100 ml, tiếp đó cấp từ từ một lượng cao lỏng theo lượng nhựa diaion HP-20 với tỷ lệ 10/1 (thể tích/trọng lượng) để hấp phụ, quá trình hấp phụ lên nhựa này được kiểm soát bằng sắc ký lỏng sao cho lượng hoạt chất không bị dư và thoát ra ngoài. Tiếp đó để yên cột Sephadex nhằm ổn định và cân bằng cột trong 8 giờ, sau đó rửa tạp chất không hấp phụ lên nhựa bằng etanol với thể tích gấp 2 lần thể tích cột (200 ml).

Cuối cùng, tiến hành rửa giải hấp phụ bằng etanol 96% với lượng gấp 5 lần thể tích cột (500 ml), phần dịch rửa giải này được gom và cất loại dung môi trên máy cất quay đến khi thu được dạng cao đặc.

Phần cao đặc này được chuyển vào thiết bị cô sấy chân không với áp suất giảm, sấy nhiệt độ 55°C đến khi hàm ẩm khoảng 5% thu được khoảng 1kg cao chiết dạng bột.

Phần bột được đưa đi kiểm tra cho thấy thành phần chủ yếu chứa tanshinon. Cụ thể là chủ yếu chứa tanshinon với hợp chất trijuganon C. Các hợp chất này đã được thử nghiệm lâm sàng cho thấy tác dụng ức chế rất mạnh sự phát triển của tế bào ung thư HL-60 với $IC_{50} = 6,1 \mu M$, mạnh hơn chất chuẩn dương mitoxantron ($IC_{50} = 7,2 \mu M$).

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất cao chiết chứa hợp chất tanshino từ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* theo giải pháp hữu ích cho phép chiết được thành phần hoạt tính đã được chứng minh có tác dụng chống ung thư với hiệu suất đủ để có thể phát triển thành nguồn dược liệu sản xuất thuốc. Việc tinh chế các thành phần tanshinon dựa trên sắc

ký lọc kích thước phân tử, độ chọn lọc cao dựa trên đặc điểm cấu trúc của các hợp chất tanshinon giúp tăng hiệu suất chiết, đơn giản hóa quy trình so với kỹ thuật chiết và kết tinh truyền thống.

Bằng cách vận dụng kỹ thuật chiết với các hợp chất tanshinon ít phân cực tan trong dung môi hữu cơ nên có thể tách nhóm hợp chất này bằng chiết phân bố hai pha thân dầu-thân nước. Ngoài ra, dựa trên cấu trúc khung và kích thước phân tử và nhóm thế tương đồng, quy trình cho phép tinh chế hợp chất tanshinon bằng lọc kích thước phân tử hiệu quả hơn là kỹ thuật sắc ký hấp phụ. Đây là một kỹ thuật cho phép chiết nhóm chất ở nhiệt độ thấp nên không những giữ được hoạt tính của hợp chất mà còn rút ngắn và đơn giản hóa quá trình chiết.

Quy trình sản xuất cao chiết chứa hợp chất tanshinon từ cây Đan sâm cho phép phát triển được nguyên liệu với thử nghiệm lâm sàng cho thấy tác dụng ức chế rất mạnh sự phát triển của tế bào ung thư HL-60 với $IC_{50} = 6,1 \mu M$, mạnh hơn chất chuẩn dương mitoxantron ($IC_{50} = 7,2 \mu M$) mở ra hướng phát triển thuốc để điều trị ung thư hiệu quả và ít độc so với những thuốc được tổng hợp hóa học.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất cao chiết chứa hợp chất tanshinon có hoạt tính chống ung thư từ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý nguyên liệu bằng cách thu hái rễ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza*, sau đó thái nhỏ, sấy khô đến độ ẩm khoảng 10%, tiếp đó nghiền thành bột;

b) chiết nguyên liệu bằng cách chuyển bột rễ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* thu được từ bước xử lý nguyên liệu vào bình chiết, tiếp đó chiết 3 lần trong điều kiện siêu âm bằng dung môi etanol 96% với tổng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/8 (trọng lượng/thể tích), phần dịch chiết được thu gom rồi cô chân không phần dịch chiết này đến khi còn 1/8, thu phần dịch chiết lỏng;

c) tinh sạch sơ bộ dịch chiết lỏng bằng cách chiết phân bố 3 lần phần dịch chiết lỏng thu được từ bước chiết nguyên liệu với diclometan (CH_2Cl_2) theo tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích), sau khi thu phân đoạn diclometan cất loại dung môi diclometan thu được cao lỏng chứa tanshinon; và

d) thu cao chiết chứa hợp chất tanshinon có hoạt tính chống ung thư bằng cách hấp phụ phần cao lỏng chứa tanshinon lên cột sắc ký Sephadex LH-20 được nhồi hạt nhựa diaion HP-20 theo tỷ lệ cao lỏng/hạt nhựa là 10/1 (thể tích/trọng lượng), tiếp đó để cân bằng hấp phụ cột trong 8 giờ rồi rửa loại tạp chất bằng etanol với thể tích gấp hai lần thể tích cột, cuối cùng rửa giải bằng etanol 96% với lượng gấp 5 lần thể tích cột, phần dịch rửa giải này được cất loại dung môi trên máy cất quay thu được sản phẩm chứa hợp chất tanshinon dạng cao đặc.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn thêm bước sấy cao chiết chứa hợp chất tanshinon trong thiết bị cô sấy chân không ở nhiệt độ từ 55 đến 60°C đến khi hàm ẩm khoảng 5% để thu được sản phẩm cao chiết dạng bột.

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó bước chiết nguyên liệu bột rễ cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* được thực hiện 3 lần, mỗi lần 2 giờ ở nhiệt độ 40°C trong điều kiện áp suất giảm.