



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

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



1-0028503

(51)<sup>7</sup> C07D 319/00; A61K 31/33 (13) B

(21) 1-2019-01843

(22) 12/04/2019

(45) 25/06/2021 399

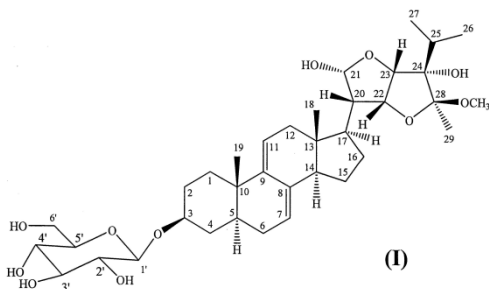
(43) 25/08/2020 389ASC

(73) Viện Nghiên cứu khoa học Miền Trung (VN)  
321 Huỳnh Thúc Kháng, thành phố Huế

(72) Phạm Việt Cường (VN); Hoàng Lê Tuấn Anh (VN); Lê Cảnh Việt Cường (VN);  
Nguyễn Hải Đăng (VN); Lê Thị Liên (VN).

(54) HỢP CHẤT VERNOAMYOSIT E VÀ PHƯƠNG PHÁP CHIẾT HỢP CHẤT NÀY  
TỪ CÂY LÁ ĐĂNG *VERNONIA AMYGDALINA*

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất vernoamyosit E có công thức (I) và phương pháp chiết các hợp chất này từ cây lá đăng *Vernonia amygdalina* thu được tại Việt Nam. Hợp chất này thể hiện hoạt tính khá cao ức chế enzym  $\alpha$ -amylaza và enzym  $\alpha$ -glucosidaza so với chất chuẩn đối chứng acarboza. Phương pháp theo sáng chế rất hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các dược phẩm phòng chữa bệnh đái tháo đường chứa hợp chất này cũng như các dẫn xuất của chúng.



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên có hoạt tính sinh học ức chế enzym  $\alpha$ -amylaza và enzym  $\alpha$ -glucosidaza nhằm nghiên cứu ứng dụng chữa bệnh đái tháo đường. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp chiết hợp chất mới vernoamyosit E (vernoamyside) từ cây lá đắng (*Vernonia amygdalina* Delile, 1826) ở Việt Nam.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

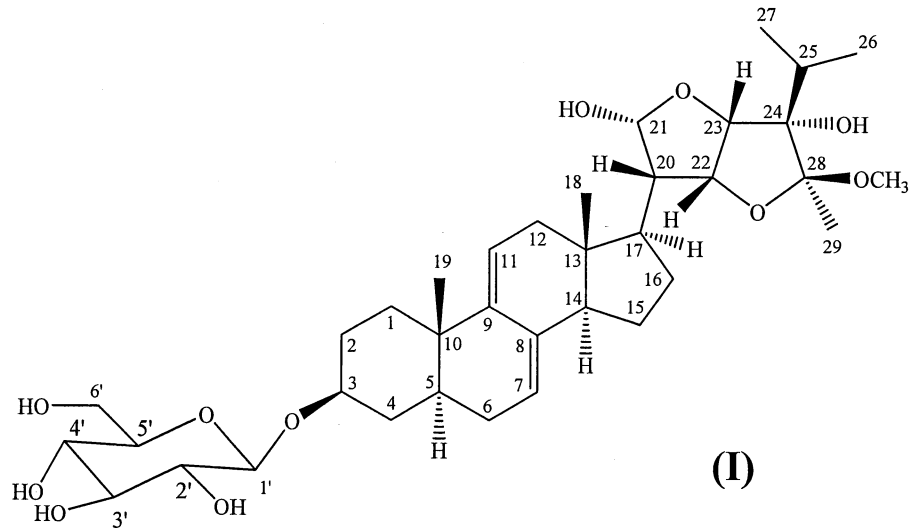
Việc sử dụng các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên làm thuốc chữa bệnh đã và đang được nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước quan tâm bởi sự đa dạng về cấu trúc, hoạt tính sinh học cũng như độc tính thấp của chúng. Đặc biệt, nước ta có nguồn tài nguyên dược liệu từ thực vật rất đa dạng và phong phú, đã và đang được sử dụng làm thuốc chữa nhiều bệnh khác nhau, trong đó có một số cây thuốc được sử dụng chữa bệnh đái tháo đường. Bệnh đái tháo đường đang trở thành căn bệnh nguy hiểm và khá phổ biến ở nước ta và trên thế giới. Bệnh tiểu đường có thể gây nên các biến chứng trên tim mạch, bàn chân, suy thận, mù lòa và nhiều rủi ro khác. Cây lá đắng cũng được sử dụng trong dân gian làm thuốc chữa bệnh tiểu đường. Vì vậy những nghiên cứu sâu hơn về cây thuốc này, nhất là việc phát hiện ra hợp chất mới vernoamyosit E từ cây lá đắng có hoạt tính sinh học ức chế enzym  $\alpha$ -amylaza và enzym  $\alpha$ -glucosidaza là có ý nghĩa cả về khoa học và thực tiễn.

Từ kết quả nghiên cứu sàng lọc nhằm tìm kiếm các chất có khả năng chống đái tháo đường thông qua việc đánh giá các chất có khả năng ức chế enzym  $\alpha$ -amylaza và enzym  $\alpha$ -glucosidaza tập thể tác giả sáng chế đã đi sâu nghiên cứu thành phần hóa học của cây lá đắng và đã phân lập được một hợp chất mới là vernoamyosit E, một hợp chất thuộc lớp chất sterol glycosit có dạng khung stigmastan thể hiện hoạt tính khá cao ức chế enzym  $\alpha$ -amylaza và enzym  $\alpha$ -

glucosidaza. Đây là một phát hiện hoàn toàn mới, hợp chất vernoamyosit E chưa được phát hiện từ trước đến nay trên thế giới.

### Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết hợp chất vernoamyosit E (vernoamyside) từ cây lá đắng *Vernonia amygdalina*, có công thức cấu tạo (I) sau:

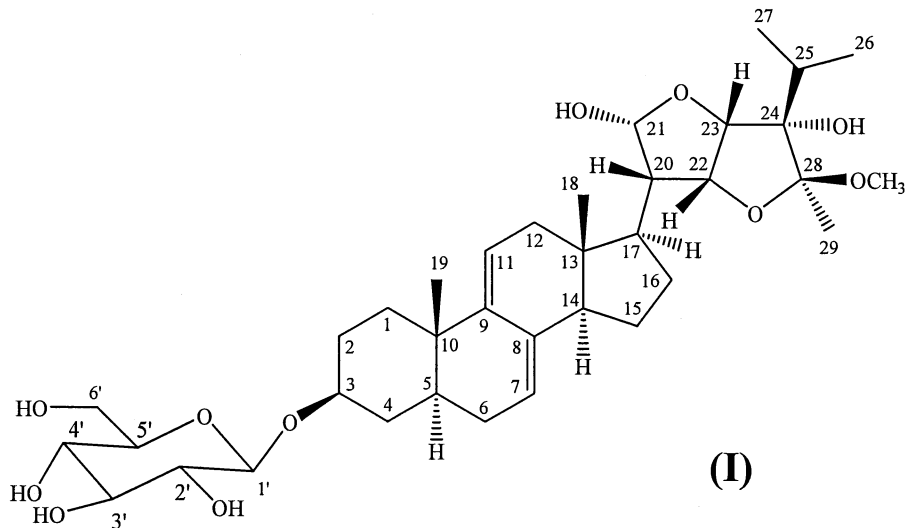


Hợp chất vernoamyosit E theo sáng chế thể hiện hoạt tính khá cao ức chế enzym  $\alpha$ -amylaza và enzym  $\alpha$ -glucosidaza là cơ sở để nghiên cứu phát triển các dược phẩm có tác dụng điều trị bệnh đái tháo đường.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp chiết hợp chất vernoamyosit E nêu trên từ cây lá đắng *Vernonia amygdalina* đơn giản, dễ thực hiện và cho hiệu suất tương đối cao.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Hợp chất vernoamyosit E (vernoamyside) theo sáng chế có công thức cấu tạo (I) sau:



Tên khoa học theo IUPAC là: (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-(((3*S*,10*S*,13*R*)-17-((2*R*,5*S*,6*S*)-2,6-dihydroxy-6-isopropyl-5-methoxy-5-methylhexahydrofuro[3,2-*b*]furan-3-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,10,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-3-yl)oxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol.

Tên khoa học theo danh pháp Việt Nam là: (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-(((3*S*,10*S*,13*R*)-17-((2*R*,5*S*,6*S*)-2,6-dihydroxy-6-isopropyl-5-methoxy-5-methylhexahydrofuro[3,2-*b*]furan-3-yl)-10,13-đimetyl-2,3,4,5,6,10,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-3-yl)oxy)-6-(hydroxymetyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol.

Các thông số hoá lý của hợp chất này là như sau:

Công thức phân tử:  $C_{36}H_{56}O_{11}$ ;

Khối lượng phân tử:  $M = 664$ ;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực  $[\alpha]_D^{22} + 27^\circ$  ( $c$  0,15, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại  $m/z$  687.3708  $[M+Na]^+$ , tính toán lý thuyết 687.3720 cho công thức  $C_{36}H_{56}O_{11}Na$ ;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 1.

Bảng 1. Số liệu phổ  $^1\text{H}$ - NMR và  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\delta$ , ppm) của hợp chất (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-(((3*S*,10*S*,13*R*)-17-((2*R*,5*S*,6*S*)-2,6-dihydroxy-6-isopropyl-5-methoxy-5-methylhexahydrofuro[3,2-*b*]furan-3-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,10,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-3-yl)oxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol (I)

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ , dạng pic (J, Hz)	HMBC (H→C)
1	35,8	1,34 (m) 1,99 (m)	
2	30,8	1,93 (m)	
3	78,9	3,71 (m)	
4	34,8	1,32 (m) 1,88 (m)	
5	40,1	1,41 (m)	
6	30,3	1,61 (m) 1,97 (m)	
7	121,4	5,43 (d, 5,0)	5, 8, 9
8	137,2	-	
9	144,8	-	
10	36,8	-	
11	119,5	5,53 (d, 5,5)	8, 10, 13
12	41,9	2,04 (m) 2,22 (m)	
13	42,7	-	
14	51,9	2,26 (m)	
15	24,2	1,49 (m) 1,86 (m)	
16	28,0	1,53 (m) 2,18 (m)	
17	45,4	2,08 (m)	12, 14, 18, 20
18	12,9	0,57 (s)	12, 13, 14, 17
19	19,8	0,93 (s)	1, 5, 9, 10
20	50,2	1,95 (m)	13, 16, 23
21	100,0	5,43 (d, 5,0)	17, 22, 23
22	81,0	4,26 (t, 5,5)	
23	91,3	4,45 (d, 5,5)	
24	83,2	-	
25	32,7	2,20 (m)	
26	17,4	0,94 (d, 7,0)	24, 25, 27

27	18,1	0,95 (d, 7,0)	24, 25, 26
28	112,9	-	
29	17,4	1,42 (s)	22, 24, 28
1'	102,6	4,42 (d, 7.5)	3
2'	74,8	3,18 (dd, 7.5, 9.0)	
3'	77,4	3,29 (t, 9,0)	
4'	71,4	3,32 (t, 9,0)	
5'	77,7	3,39 (m)	
6'	62,6	3,70 (dd, 5,5, 12,0) 3,87 (dd, 2,5, 12,0)	
28-OCH <sub>3</sub>	48,3	3,21 (s)	28

<sup>a</sup>Đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz

Phương pháp chiết các hợp chất vernoamyosit E từ cây lá đắng *Vernonia amygdalina* theo sáng chế bao gồm các bước sau:

(i) mẫu lá cây lá đắng *Vernonia amygdalina* được thái nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ 50°C rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được chiết ngâm bằng siêu âm 3 lần, mỗi lần 1 giờ, với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C;

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

(iii) hòa tan dịch cô A với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết etyl axetat được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô etyl axetat, ký hiệu là dịch B;

(iv) dịch B được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel pha thường (Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol trong diclometan (metanol/diclometan 100/1- 0/1) rồi rửa cột bằng metanol thu được năm phân đoạn ký hiệu lần lượt là từ VAE-1 đến VAE-5;

(v) hòa tan phân đoạn VAE-3 vào hỗn hợp dung môi diclometan/metanol với tỷ lệ 2,5/1 về thể tích và tiến hành phân lập trên sắc ký trên cột với chất hấp phụ là

silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ B-4B/silica gel = 1/20 về khối lượng) thu được ba phân đoạn ký hiệu là VAE-3.1 đến VAE-3.3; và

(vi) hòa tan phân đoạn VAE-3.3 vào hỗn hợp dung môi diclometan/metanol với tỷ lệ 2/1 về thể tích và tiến hành phân lập trên sắc ký trên cột sắc ký pha đảo YMC\*GEL ODS-A (cỡ hạt 12 nm) và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là metanol/nước với tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được hợp chất mới do chúng tôi đặt tên là vernoamyosit E dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng.

Hợp chất vernoamyosit E có dạng bột vô định hình màu trắng, độ quay cực  $[\alpha]_D^{22} + 27^\circ$  ( $c$  0,15, MeOH), công thức phân tử là  $C_{36}H_{56}O_{11}$ , có phổ khối lượng phân giải cao tại ion  $m/z$  687.3708 tương ứng với ion  $[M+Na]^+$ , có các dữ kiện phổ NMR như nêu tại Bảng 1.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

#### Ví dụ 1

Phân lập hợp chất vernoamyosit E từ cây lá đắng *Vernonia amygdalina*

Mẫu lá cây lá đắng tươi (7 kg) được thái nhỏ, sấy khô ở  $50^\circ\text{C}$  (thu được 1 kg khô) rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được chiết ngâm bằng siêu âm 3 lần, mỗi lần 1 giờ, với rượu metylic ở nhiệt độ  $50^\circ\text{C}$ .

Các dịch chiết trong rượu metylic thu được được gộp lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là dịch cô A (60 g).

Hòa tan dịch cô A với nước cất (2 lít) rồi chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết etyl axetat được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô etyl axetat, ký hiệu là dịch B (20 g).

Dịch B (20 g) được tiến hành phân tách trên sắc ký cột ( $\Phi$  8 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là silica gel pha thường (Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol trong diclometan (metanol/diclometan 100/1- 0/1) rồi rửa cột bằng metanol thu được năm phân đoạn

ký hiệu lần lượt là từ VAE-1 (3 g), VAE-2 (4 g), VAE-3 (5 g), VAE-4 (3 g) và VAE-5 (5 g).

Hòa tan phân đoạn VAE-3 (5 g) vào hỗn hợp dung môi diclometan/metanol với tỷ lệ 2,5/1 về thể tích và tiến hành phân lập trên sắc ký trên cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ B-4B/silica gel = 1/20 về khối lượng) thu được ba phân đoạn ký hiệu là VAE-3.1 (1 g), VAE-3.2 (2 g) và VAE-3.3 (2 g).

Hòa tan phân đoạn VAE-3.3 (2 g) vào hỗn hợp dung môi diclometan/metanol với tỷ lệ 2/1 về thể tích và tiến hành phân lập trên sắc ký trên cột sắc ký pha đảo YMC\*GEL ODS-A (cỡ hạt 12 nm) và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là metanol/nước với tỷ lệ 1/1 về thể tích thu được 40 mg hợp chất vernoamyosit E dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng.

Hợp chất vernoamyosit E có dạng bột vô định hình màu trắng, độ quay cực  $[\alpha]_D^{22} + 27^\circ$  ( $c$  0,15, MeOH), công thức phân tử là  $C_{36}H_{56}O_{11}$ , có phổ khối lượng phân giải cao tại ion  $m/z$  687.3708 tương ứng với ion  $[M+Na]^+$ , có các dữ kiện phổ NMR như nêu tại Bảng 1. Ví dụ 2

Thử nghiệm về tác dụng dược lý của hợp chất vernoamyosit E

Hợp chất vernoamyosit E theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -glucosidaza như sau:

Hoạt tính ức chế  $\alpha$ -glucosidaza được thực hiện dựa trên phản ứng thủy phân 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranosit (p NPG) thành đường glucoza và p-nitrophenol, hợp chất có màu vàng, dưới xúc tác của enzym  $\alpha$ -glucosidaza. Khi mẫu thử có hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -glucosidaza, sự tạo thành hợp chất p-nitrophenol sẽ giảm, do vậy mật độ quang (OD) của p-nitrophenol so với mẫu đối chứng, không bị ức chế sẽ giảm theo. Mật độ quang(OD) của p-nitrophenol sinh ra sau phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm và được dùng để đánh giá hoạt động ức chế enzym của mẫu thử. Nồng độ ức chế 50%, IC<sub>50</sub> được xây dựng trên 5 nồng độ thử nghiệm. Giá trị IC<sub>50</sub> được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính



trên phần mềm Graphpad Prism 5.0. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

trong mỗi giếng nghiên cứu chứa: 50 $\mu$ L mẫu thử và 100 $\mu$ L dung dịch enzym  $\alpha$ -glucosidaza được ủ 25°C trong 5 phút, tiếp tục bổ sung 50 $\mu$ L 4-nitrophenyl-  $\alpha$ - D-glucopyranosit (p NPG), đo trên máy ELISA ở bước sóng 405 nm. Chất chuẩn dương (*positive control*) acarboza được dùng để kiểm soát độ ổn định và đánh giá hoạt tính ức chế tương đương. Các phép thử được lặp lại 3 lần.

Kết quả được nêu trong Bảng 2:

Bảng 2: Kết quả hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -glucosidaza

Tên mẫu	Nồng độ thử ( $\mu$ g/mL)	% Ức chế	Sai số
Vernoamyosit E	100	50,17	1,03
	500	60,03	3,85
Acarboza	100	9,69	2,28
	500	45,18	0,67

### Ví dụ 3

Thử nghiệm về tác dụng dược lý của hợp chất vernoamyosit E

Hợp chất vernoamyosit E theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -amylaza như sau:

Hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -amylaza được thực hiện dựa vào phản ứng tạo màu của tinh bột xanh Starch azure (Brilliant Blue R) với dung dịch đệm Tris dưới xúc tác của enzym  $\alpha$ -amylaza. Khi mẫu thử có hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -amylaza: sự phân cắt liên kết  $\alpha$ -1,4 của thành phần amiloza và amilopectin trong tinh bột bị cản trở, sự tạo thành các polysacarit nhỏ, disacarit glucoza và chất mang màu xanh (Brilliant Blue R) giảm. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

Trong một ống mẫu có chứa 100  $\mu$ L mẫu, 100  $\mu$ L tinh bột xanh và 50  $\mu$ L enzym  $\alpha$ -amylaza, sau đó ủ 37°C trong 15 phút, tiếp tục 250  $\mu$ L axit axetic dùng để phản ứng, ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó hút 200  $\mu$ L dịch trong vào hai giếng, đo trên máy ELISA ở bước sóng 595 nm.

Kết quả được nêu trong Bảng 3:

Bảng 3: Kết quả hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -amylaza

Tên mẫu	Nồng độ thử ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Ức chế	Sai số
Vernoamyosit E	50	22,53	3,63
	200	50,99	1,96
Acarboza	10	71,09	0,42
	100	98,06	0,21

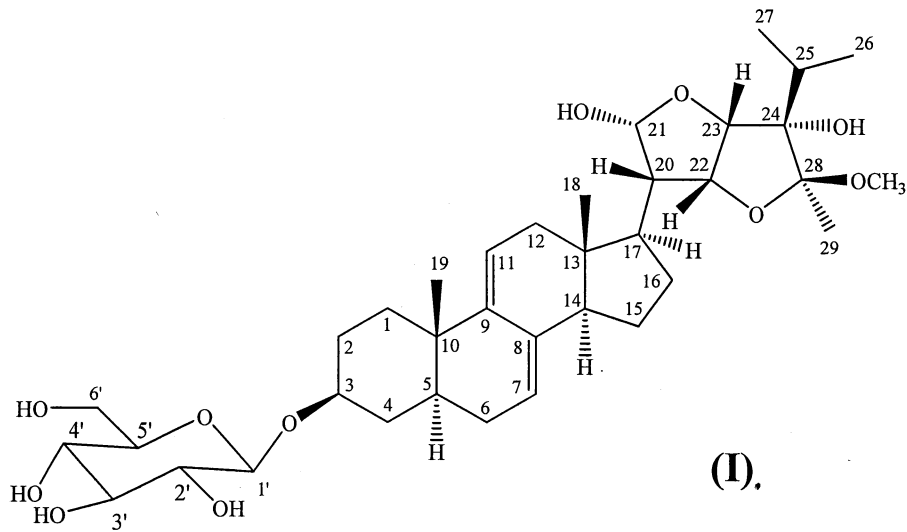
Kết quả trên cho thấy hợp chất mới vernoamyosit E có hoạt tính sinh học ức chế enzym  $\alpha$ -amylaza và enzym  $\alpha$ -glucosidaza khá cao so với chất đối chứng dương acarboza.

### Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết được một hợp chất mới vernoamyosit E từ từ cây lá đắng *Vernonia amygdalina* thu được ở Việt Nam. Hợp chất này thể hiện hoạt tính khá cao ức chế enzym  $\alpha$ -amylaza và enzym  $\alpha$ -glucosidaza so với chất chuẩn đối chứng acarboza. Sáng chế này tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng phòng và điều trị bệnh đái tháo đường dựa trên việc khai thác nguồn dược liệu quý, sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

## 1. Hợp chất có công thức chung (I):

2. Phương pháp chiết hợp chất vernoamyosit E có công thức (I) từ cây lá đắng *Vernonia amygdalina* bao gồm các bước:

(i) mẫu lá cây lá đắng *Vernonia amygdalina* được thái nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ 50°C rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được chiết ngâm bằng siêu âm 3 lần, mỗi lần 1 giờ, với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C;

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

(iii) hòa tan dịch cô A với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết etyl axetat được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô etyl axetat, ký hiệu là dịch B;

(iv) dịch B được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel pha thường, cụ thể là Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol trong diclometan, cụ thể là

metanol/diclometan 100/1- 0/1, rồi rửa cột bằng metanol thu được năm phân đoạn ký hiệu lần lượt là từ VAE-1 đến VAE-5;

(v) hòa tan phân đoạn VAE-3 vào hỗn hợp dung môi diclometan/metanol với tỷ lệ 2,5/1 về thể tích và tiến hành phân lập trên sắc ký trên cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường, cụ thể là có cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ B-4B/silica gel = 1/20 về khối lượng, thu được ba phân đoạn ký hiệu là VAE-3.1 đến VAE-3.3; và

(vi) hòa tan phân đoạn VAE-3.3 vào hỗn hợp dung môi diclometan/metanol với tỷ lệ 2/1 về thể tích và tiến hành phân lập trên sắc ký trên cột sắc ký pha đảo YMC\*GEL ODS-A, cỡ hạt 12 nm và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là metanol/nước với tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được hợp chất vernoamyosit E dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng.