



(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)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002961

(51) **C12P 5/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00225

(22) 22/05/2020

(45) 25/08/2022 413

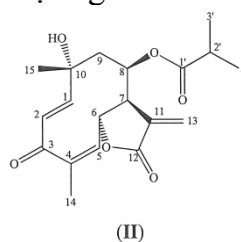
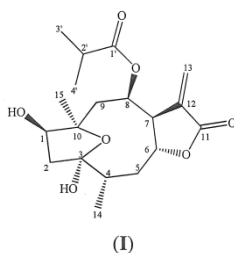
(43) 25/08/2020 389AHI

(73) Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Trịnh Thị Thủy (VN); Nguyễn Thị Hoàng Anh (VN); Bá Thị Châm (VN); Nguyễn
Thị Thùy Linh (VN); Trần Đức Quân (VN); Trần Thị Thanh Thủy (VN); Nguyễn
Thanh Tâm (VN); Giang Thị Kim Liên (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP CHIẾT NHÓM HỢP CHẤT SESQUITERPEN CÓ HOẠT TÍNH ỨC
CHẾ TĂNG SINH TẾ BÀO UNG THƯ TỦY XƯƠNG CẤP TỪ CÂY CÚC QUỠ

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết nhóm hợp chất sesquiterpen có hoạt tính
ức chế tăng sinh tế bào ung thư tủy xương cấp từ cây Cúc quỳ *Tithonia diversifolia*, quy
trình theo giải pháp sử dụng kỹ thuật chiết chọn lọc cho phép chiết được hỗn hợp hai chất
sesquiterpen chính bao gồm [1*R*,2*S*,4*R*,8*S*,9*R*,11*R*,12*S*)-1,12-dihydroxy-2,11-dimethyl-7-
methylidene-6-oxo-5,14-dioxatricyclo[9.2.1.0^{4,8}] tetradecan-9-yl] 2-methylpropanoate
(TagA) có công thức (I) và [(3*aR*,4*R*,6*R*,7*E*,10*E*,11*aR*)-6-hydroxy-6,10-dimethyl-3-
methylidene-2,9-dioxo-3*a*,4,5,11*a*-tetrahydrocyclodeca [b]furan-4-yl] 2-methylpropanoate
(TagC) có công thức (II) với hiệu suất chiết đạt 0,1%. Nhóm hợp chất sesquiterpen cho
thấy có hiệu quả trong việc ức chế tăng sinh tế bào ung thư tủy xương cấp thích hợp để
phát triển nguồn dược chất để sản xuất thuốc điều trị ung thư.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến lĩnh vực hóa học các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học, cụ thể là đề cập đến phương pháp chiết nhóm hợp chất sesquiterpen từ cây Cúc quỳ (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray) có hoạt tính chống tăng sinh tế bào ung thư tùy xương cấp.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đã có nhiều nghiên cứu, tìm kiếm các hoạt chất có tác dụng sinh học từ dược liệu để góp phần phát triển dược phẩm, đặc biệt là những dược phẩm có tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào nhằm điều trị bệnh ung thư. Một trong những loài được nghiên cứu đó là cây Cúc quỳ. Cây Cúc quỳ có tên khoa học là *Tithonia diversifolia* còn gọi là dã quỳ, sơn quỳ biển điệp, quỳ đại, hướng dương đại, hướng dương Mexico, cúc Nitobe, là một loài thực vật trong họ Cúc (Asteraceae). Tại Nam Mỹ, nước ép từ rễ và lá cây từ lâu đã được sử dụng để điều trị áp-xe (Jatem-Lasser et al., Herbal traditional medicine of Venezuelan Andes: an ethnopharmacological study. *Phytother. Res.* 12, S53 (1998)). Tại Mexico, dịch chiết từ loài này được sử dụng để chữa sốt rét và điển hình là chữa các khối tụ máu và rút cơ, bột từ lá sao khô trị vết thâm, vết thương và vùng da nhiễm trùng. Ở Đài Loan, dịch chiết nước của lá cây được sử dụng để trị đái tháo đường (T. Miura et al., Antidiabetic effect of Nitobegiku, the herb *Tithonia diversifolia*, in KK-Ay diabetic mice. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 2152 (2005)). Trên thế giới, loài Cúc quỳ được quan tâm nghiên cứu nhiều nhất trong các loài thực vật thuộc chi *Tithonia* về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học. Nghiên cứu về hóa học đã xác định được các hợp chất flavonoid, terpenoid, sesquiterpen lacton và axit chlorogenic là thành phần hóa học chủ yếu của loài này. Cao chiết và các hợp chất terpen, sesquiterpen lacton được tách từ loài này có nhiều hoạt tính sinh học như chống viêm, trị ung thư, chống huyết khối, kháng virus và giảm đau (Alex Mabou Tagne et al., *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray as a medicinal plant: A comprehensive review of its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacotoxicology and clinical relevance. *Journal of Ethnopharmacology* 220, 2018, 94-116). Từ dịch chiết dichlometan của lá cây Cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*) thu hái tại Việt Nam đã phân lập được 3 hợp chất là myristyl myristat, hispidulin và eupafolin

(Trần Thị Thanh Thủy et al., Primary results on the chemical constituents of the dichloromethane leaf extract of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. Vietnam Journal of Chemistry, 51(6), 2013, 770-773).

Đáng chú ý, các hợp chất sesquiterpen lacton là thành phần hóa học chính và có nhiều hoạt tính thú vị được tìm thấy từ loài Cúc quỳ (Alex Mabou Tagne et al., *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray as a medicinal plant: A comprehensive review of its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacotoxicology and clinical relevance. Journal of Ethnopharmacology 220, 2018, 94-116). Theo Kuroda và cộng sự các hợp chất sesquiterpen và flavonoid phân lập từ loài này còn có hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư bạch cầu HL-60 với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,13 đến 13,0 mM (Kuroda, M et al., Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. Chem. Pharm. Bull. 55(8) 1240-1244 (2007). Trong số đó, Tagitinin C và các dẫn xuất của nó được chú ý quan tâm nghiên cứu do có phổ hoạt tính sinh học khá rộng và được cho là chất có tiềm năng ứng dụng điều trị chống sốt rét và một số bệnh khác (Gu JQ et al., Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. J. Nat Prod. 2002 65(4):532-6).

Theo các tài liệu trên, các hợp chất sesquiterpen có khung germacranolite được phân lập từ cây Cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*) được gọi chung là Tagitinin (Tag). Chúng được chú ý nghiên cứu nhiều do có phổ tác dụng dược lý rộng, đặc biệt liên quan đến hoạt tính ức chế yếu tố hạt nhân-kappa B (nuclear factor-kappa B inhibition). Từ cành lá Cúc quỳ, thu tại Việt Nam, các tác giả đã phân lập được hai chất Tagitinin A và Tagitinin C. Tuy nhiên, hàm lượng các hợp chất này có trong cây thấp nên hiệu quả chiết không cao, đặc biệt các kỹ thuật chiết thông thường gây biến tính hợp chất, giảm tác dụng sinh học.

Các nghiên cứu cho thấy hợp chất Tagitinin C (TagC) có trong cây Cúc quỳ thu tại Trung Quốc là một chất chủ vận PPAR α /kép, có tác dụng chống tiểu đường thông qua con đường PPAR γ và cải thiện rối loạn lipid máu, nhưng chưa có báo cáo liên quan đến tác dụng điều trị bệnh của hợp chất Tagitinin A (TagA) cũng như hiệu quả hiệp đồng liên quan đến hai hợp chất thuộc nhóm hợp chất sesquiterpen này. Các tác giả đã nghiên cứu và thấy rằng, việc kết hợp TagA với TagC cho hoạt tính chống tăng sinh trên dòng tế bào bạch cầu tủy xương cấp tính (OCI-AML3) khá tốt. Mặt khác, việc chiết riêng rẽ hai hợp chất này có hiệu suất rất thấp và không đủ để phát triển nguồn dược liệu. Ngoài ra một số phương pháp chiết sử dụng dung môi mạnh và nhiệt độ cao sẽ làm mất hoạt tính sinh học của nhóm hợp chất này. Do đó, cần có một

quy trình chiết nhóm hợp chất sesquiterpen chứa đồng thời cả hai hợp chất TagA và TagC một cách chọn lọc từ cây Cúc quỳ *Tithonia diversifolia* với hiệu suất và độ tinh sạch đủ để có thể phát triển thành dược phẩm.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm khắc phục các nhược điểm nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp chiết nhóm hợp chất sesquiterpen có hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư tùy xương cấp từ cây Cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*). Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép chiết một cách chọn lọc một số hợp chất có hoạt tính sinh học với hiệu suất cao để có thể phát triển được nguồn nguyên liệu cho ngành dược phẩm.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp chiết nhóm hợp chất sesquiterpen có hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư tùy xương cấp từ cây Cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*), trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu gom mẫu cành và lá cây Cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*), sau khi loại bỏ tạp, sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50-60°C đến khô giòn, sau đó xay nhỏ qua cỡ sàng 5mm thu được nguyên liệu là bột cây Cúc quỳ có độ ẩm khoảng 10%;

b) chiết nguyên liệu bằng cách ngâm bột cây Cúc quỳ với dung môi etanol 80%, siêu âm trong 15 phút và ngâm chiết khoảng 24 giờ trong điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45-50°C, thu hồi phần dịch chiết;

c) chiết loại tạp chất bằng cách cô phần dịch chiết trong điều kiện áp suất 6700Pa trên máy cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C để loại bỏ dung môi đến khi còn 1/5 thể tích, để thu được phần dịch chiết dạng sệt, dịch chiết này được chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan với lượng tương đương để loại bỏ tạp chất;

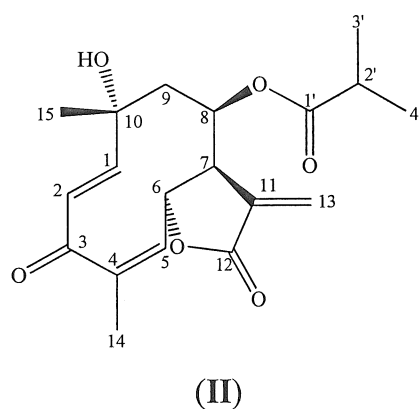
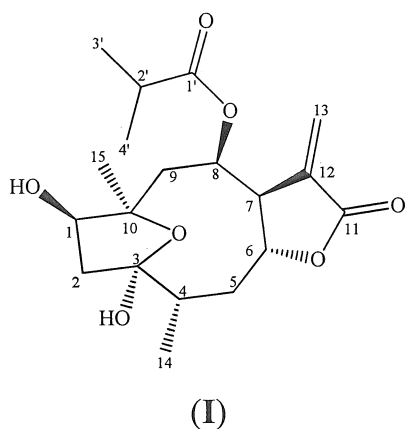
d) chiết phân lớp bằng cách chiết phần dịch nước sau khi chiết bằng *n*-hexan với etyl axetat 3 lần với thể tích tương đương, sau đó cất cô dịch chiết dưới áp suất giảm thu được cặn chiết etyl axetat; và

e) thu nhóm hợp chất sesquiterpen có hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư tùy xương cấp bằng cách nhồi cặn chiết etyl axetat lên cột sắc ký và rửa bằng hệ dung môi *n*-hexan/etyl axetat với tỷ lệ *n*-hexan giảm dần, thu phân đoạn *n*-hexan/etyl axetat tỷ lệ 50/50, sau khi lọc phân đoạn này trên gel sephadex LH-20 với dung môi metanol, cất loại dung môi thu được nhóm hợp chất sesquiterpen dạng bột màu vàng nhạt, vị đắng bao gồm [(1*R*,2*S*,4*R*,8*S*,9*R*,11*R*,12*S*)-1,12-dihydroxy-2,11-dimethyl-7-methylidene-6-oxo-5,14-dioxatricyclo[9.2.1.0^{4,8}]tetradecan-9-yl] 2-methylpropanoate

(Tag A) và [(3*aR*,4*R*,6*R*,7*E*,10*Z*,11*aR*)-6-hydroxy-6,10-dimethyl-3-methylidene-2,9-dioxo-3*a*,4,5,11*a*-tetrahydrocyclodeca[*b*]furan-4-yl] 2-methylpropanoate (TagC).

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết nguyên liệu được thực hiện trong điều kiện siêu âm ở tần số từ 30 kHz đến 50 kHz trong 15 phút trước khi ngâm chiết ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ và hệ dung môi sắc ký là n-hexan/etyl axetat.

Hỗn hợp các sesquiterpen thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm hai chất chính là hợp chất [(1*R*,2*S*,4*R*,8*S*,9*R*,11*R*,12*S*)-1,12-dihydroxy-2,11-dimethyl-7-methylidene-6-oxo-5,14-dioxatricyclo[9.2.1.0^{4,8}]tetradecan-9-yl] 2-methylpropanoate) (TagA) có công thức (I) chiếm tỷ lệ từ 20 đến 40% trọng lượng và hợp chất [(3*aR*,4*R*,6*R*,7*E*,10*Z*,11*aR*)-6-hydroxy-6,10-dimethyl-3-methylidene-2,9-dioxo-3*a*,4,5,11*a*-tetrahydrocyclodeca[*b*]furan-4-yl] 2-methylpropanoate)) (TagC) có công thức (II) chiếm tỷ lệ từ 40 đến 60% trọng lượng. Hỗn hợp các sesquiterpen này có hoạt tính chống tăng sinh trên dòng tế bào bạch cầu tủy xương cấp tính (OCI-AML3) thích hợp để phát triển thuốc điều trị bệnh ung thư tủy xương.



Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sắc ký đồ HPLC của nhóm hợp chất sesquiterpen chiết từ cây Cúc quỳ, trong đó cho thấy có hai pic chính của TagA và TagC với hàm lượng khoảng 80-90%, các hợp chất sesquiterpen còn lại chiếm khoảng 10-20%.

Hình 2 là biểu đồ mô tả kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của nhóm hợp chất sesquiterpen thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích với các nồng độ thử nghiệm khác nhau đến số lượng tế bào OCI-AML3 sống sau thử nghiệm. Thanh xám là nhóm hợp chất sesquiterpen theo giải pháp hữu ích, thanh trắng là đối chứng dimethyl sulfoxit (DMSO).

Hình 3 là biểu đồ mô tả kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của nhóm hợp chất sesquiterpen thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích với các nồng độ thử nghiệm

khác nhau đến số lượng tế bào OCI-AML3 chết sau thử nghiệm. Thanh xám là nhóm hợp chất sesquiterpen theo giải pháp hữu ích, thanh trắng là đối chứng dimethyl sulfoxit (DMSO).

Hình 4 là biểu đồ mô tả kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của nhóm hợp chất sesquiterpen thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích với các nồng độ thử nghiệm khác nhau đến chu kỳ tế bào OCI-AML3. Thanh xám là nhóm hợp chất sesquiterpen theo giải pháp hữu ích, thanh trắng là đối chứng dimethyl sulfoxit (DMSO): Pha G0/G1 (bên trái), pha S (giữa) hoặc pha G2/M (bên phải).

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 mục đích minh họa và làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Cây Cúc quỳ có tên khoa học là *Tithonia diversifolia*, còn gọi là dã quỳ, sơn quỳ, biển diệp, quỳ đại, hướng dương đại, hướng dương Mexico, cúc Nitobe là một loài thực vật trong họ Cúc (Asteraceae). Phụ thuộc vào khu vực, nó có thể là cây một năm hay cây lâu năm, dạng cây bụi cao tới 3 m với thân cây mọc thẳng và đôi khi hóa gỗ, hoa màu vàng cam. Vật liệu sử dụng trong phương pháp chiết các hợp chất Tagitinin có hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư tùy xương cấp là từ lá và thân của cây Cúc quỳ.

Phương pháp chiết nhóm các hợp chất sesquiterpen có hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư tùy xương cấp từ cây Cúc quỳ theo giải pháp bao gồm các bước a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết nguyên liệu; c) chiết loại tạp chất; d) chiết phân lớp cao chiết bằng cách hòa tan với etyl axetat 3 lần với thể tích tương đương, cô quay dịch chiết dưới áp suất giảm thu được cặn chiết etyl axetat; và e) thu các hợp chất Tagitinin có hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư tùy xương cấp.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, lá và cành cây Cúc quỳ được thu gom, sau khi loại bỏ tạp chất, sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45-50°C đến khô giòn. Quá trình này nhằm thu được nguyên liệu khô kiệt để thuận lợi cho quá trình nghiền. Sau đó xay nhỏ qua cỡ sàng 5mm thu được bột cây Cúc quỳ có độ ẩm khoảng 10%.

Trong bước chiết nguyên liệu, tiến hành ngâm chiết bột cây Cúc quỳ với dung môi etanol 80%. Lượng etanol được sử dụng sao cho ngâm hoàn toàn lượng bột Cúc quỳ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn xác định được lượng etanol tối ưu được sử dụng để ngâm chiết bột cây Cúc quỳ. Theo một

phương án cụ thể, bột cây Cúc quỳ được bỏ sung vào bình ngâm kiệt và bỏ sung etanol 80% đến ngập. Sau khi bỏ sung, siêu âm trong 15 phút và ngâm khoảng 24 giờ trong điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45-50°C, thu hồi phần dịch chiết. Trong suốt quá trình thực hiện không được để nhiệt độ cao quá 50°C vì sẽ gây biến tính hoạt chất đích.

Theo một phương án ưu tiên, siêu âm được thực hiện trong điều kiện tần số từ 30 kHz đến 50 kHz trong 15 phút trước khi ngâm chiết ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ.

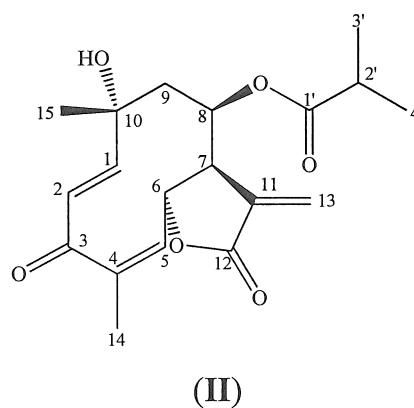
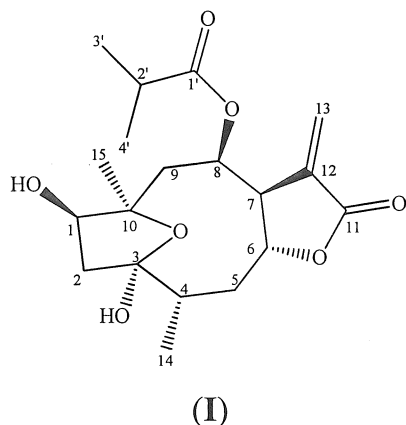
Trong bước chiết loại tạp chất, phần dịch chiết được cô trong điều kiện áp suất 6700Pa trên máy cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C. Quá trình cô nhằm loại bỏ dung môi đến khi còn 1/5 thể tích. Phần dịch chiết sau khi cô sẽ ở dạng sệt, cao chiết này được chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan để loại bỏ tạp chất. Việc chiết phân bố bằng *n*-hexan giúp loại được các tạp chất, không mong muốn một cách hiệu quả, tăng hiệu suất chiết các hoạt chất mong muốn. Các tác giả đã thử nghiệm và nhận thấy việc chiết phân bố bằng *n*-hexan cho phép loại được các tạp chất triệt để hơn so với các phương pháp chiết bằng các dung môi thông thường. Ngoài ra, *n*-hexan dễ thu hồi và tái sử dụng trong các lần chiết tiếp theo nên giảm được chi phí sản xuất.

Trong bước tiếp theo phần dịch chiết nước sau khi chiết bằng *n*-hexan được phân bố với với etyl axetat. Quá trình này được thực hiện lặp lại 3 lần với thể tích tương đương. Quá trình này giúp tách các phân đoạn hòa tan trong etyl axetat. Sau khi chiết, tiến hành cô quay dịch chiết dưới áp suất giảm thu được cặn chiết etyl axetat.

Trong bước thu các hợp chất Tagitinin có hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư tùy xương cấp, tiến hành sắc ký cặn chiết etyl axetat với hệ dung môi dung môi *n*-hexan/etyl axetat với tỷ lệ *n*-hexan giảm dần. Quá trình này giúp chiết phân đoạn hợp chất có hoạt tính sinh học đặc hiệu. Tỷ lệ *n*-hexan/etyl axetat ban đầu được thực hiện với *n*-hexan 100%, sau đó giảm dần để thu các phân đoạn tương ứng theo tỷ lệ phân đoạn chiết. Phân đoạn *n*-hexan/etyl axetat tỷ lệ 50/50 được thu hồi và sau đó lọc phân đoạn này trên gel Sephadex LH-20 với dung môi metanol. Sau khi loại dung môi, thu được hỗn hợp nhóm hợp chất sesquiterpen dạng bột màu vàng nhạt, vị đắng bao gồm [(1*R*,2*S*,4*R*,8*S*,9*R*,11*R*,12*S*)-1,12-dihydroxy-2,11-dimethyl-7-methylidene-6-oxo-5,14-dioxatricyclo[9.2.1.0^{4,8}]tetradecan-9-yl] 2-methylpropanoate (TagA) và [(3*aR*,4*R*,6*R*,7*E*,10*Z*,11*aR*)-6-hydroxy-6,10-dimethyl-3-methylidene-2,9-dioxo-3*a*,4,5,11*a*-tetrahydrocyclodeca[*b*]furan-4-yl] 2-methylpropanoate (TagC).

Nhóm hợp chất sesquiterpen thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm hỗn hợp hai hợp chất là [(1*R*,2*S*,4*R*,8*S*,9*R*,11*R*,12*S*)-1,12-dihydroxy-2,11-dimethyl-7-methylidene-6-oxo-5,14-dioxatricyclo[9.2.1.0^{4,8}]tetradecan-9-yl] 2-

methylpropanoate) có công thức (I) (TagA) và hợp chất ([*(3aR,4R,6R,7E,10Z,11aR)*-6-hydroxy-6,10-dimethyl-3-methylidene-2,9-dioxo-3*a*,4,5,11*a*-tetrahydrocyclodeca[*b*]furan-4-yl] 2-methylpropanoate)) có công thức (II) (TagC) có hoạt tính chống tăng sinh trên dòng tế bào bạch cầu tủy xương cấp tính (OCI-AML3).



Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Chiết nhóm hợp chất sesquiterpen từ cây Cúc quỳ *Tithonia diversifolia*

Cành và lá cây Cúc quỳ *Tithonia diversifolia* mọc hoang được thu hái tươi và phơi khô ngoài nắng, sau đó sấy giòn trong tủ sấy khoảng 50°C, xay nhỏ qua cỡ sàng 5mm. Lấy 300 gam bột cành, lá khô có độ ẩm khoảng 10% cho vào bình ngâm kiệt chứa 1500ml etanol 80%. Sau khi siêu âm 15 phút với tần số 40Hz, ngâm trong khoảng 24 giờ ở nhiệt độ 50°C. Rút kiệt phần dịch và đưa đi cô đặc trong điều kiện áp suất 6700 Pa trên máy quay chân không, nhiệt độ 50°C cho đến khi còn khoảng 300ml dịch chiết lỏng dạng sệt.

Phần dịch chiết lỏng dạng sệt được chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan để loại tạp, sau đó chiết phân bố tiếp bằng etyl axetat và loại dung môi thu được các cao chiết tương ứng. Cặn chiết etyl axetat (10g) được đưa lên cột silica gel, với hệ dung môi *n*-hexan/etyl axetat với tỷ lệ *n*-hexan là 100% và giảm dần 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 và 50/50. Phân đoạn *n*-hexan/etyl axetat 50/50 được thu hồi. Tiếp đó, lọc phân đoạn này (640mg) trên gel Sephadex LH-20 với dung môi metanol, sau khi sấy khô thu được 300mg chất bột màu vàng nhạt, không mùi, vị đắng, tan tốt trong cloroform, metanol, DMSO, ít tan trong *n*-hexan và nước. Hiệu suất chiết đạt 0,1% (so với nguyên liệu khô).

Ví dụ 2. Xác định cấu trúc của các hợp chất thu được theo giải pháp hữu ích

Để xác định được chính xác cấu trúc thành phần hóa học chính của các hợp chất thu được theo Ví dụ 1, trước hết tách riêng rẽ hai chất chính bằng cách đưa lên cột silica gel (1/2 bột hỗn hợp chất, 320 mg), với hệ dung môi *n*-hexan/ethyl axetat với tỷ 50/50, thu được hai chất chính (CQE12 và CQE13). Cấu trúc của hai chất này được xác định bằng phương pháp phổ khối (MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton và cacbon 13 (^1H -, ^{13}C NMR). Dữ liệu phổ được thể hiện trong Bảng 1.

Kết quả đã xác định được hỗn hợp thu được theo giải pháp hữu ích thuộc nhóm hợp chất sesquiterpen và bao gồm hợp chất Tagitinin A (TagA, ký hiệu CQE12) ([[(1*R*,2*S*,4*R*,8*S*,9*R*,11*R*,12*S*)-1,12-dihydroxy-2,11-dimethyl-7-methylidene-6-oxo-5,14-dioxatricyclo[9.2.1.0^{4,8}]tetradecan-9-yl] 2-methylpropanoate) có công thức (I) và Tagitinin C (TagC, ký hiệu CQE13) ([[(3*aR*,4*R*,6*R*,7*E*,10*Z*,11*aR*)-6-hydroxy-6,10-dimethyl-3-methylidene-2,9-dioxo-3*a*,4,5,11*a*-tetrahydrocyclodeca[*b*] furan-4-yl] 2-methylpropanoate)) có công thức (II).

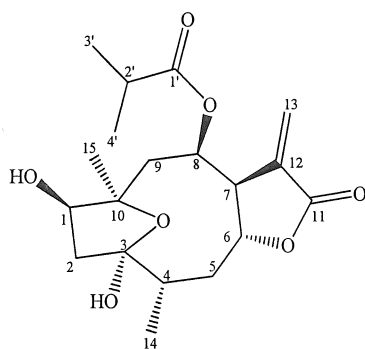
Bảng 1. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất Tagitinin A (TagA) và Tagitinin C (TagC) thu được từ cây Cúc quỳ (dung môi CDCl_3 , 500/125 MHz)

TT	Tagitinin A (TagA)		Tagitinin C (TagC)	
C	^a δ_{H}	^b δ_{C}	^c δ_{H}	^d δ_{C}
1	4,21-4,62 (1H, m)	78,36	6,92 (1H, d, J=17,0 Hz)	160,18
2	2,4-2,47 (1H, m), 2,05-2,12 (1H, m)	46,8	6,24 (1H, d, J=17,0 Hz)	129,69
3	-	105,6	-	196,68
4	2,08 (1H, m)	44,27	-	138,96
5	2,08 (2H, m)	37,68	5,86 (1H, dd, J=8,0; 1,5 Hz)	137,14
6	5,54-5,59 (1H, ddd, J=1,8, 6,6, 10,2 Hz)	81,59	5,39 (1H, d, br, J=9,0 Hz)	75,98
7	4,02 (1H, ddd, J=3,0, 6,5, 9,8 Hz)	47,71	3,53 (1H, dd, 3,5; 2)	47,08
8	5,54-5,59 (1H, ddd, J=2,7, 5,4, 6,5 Hz)	69,79	5,3-5,38 (1H, m)	73,90
9	1,94 (1H, dd, J=14,5, và 5,0 Hz, CH-9a) 1,80 (1H, dd, J=7,5 và 14,5 Hz, CH-9b)	34,52	2,45 m (CH-9a) 1,99 (1H, dd, J=10,0 và 4,0 CH-9b)	48,43

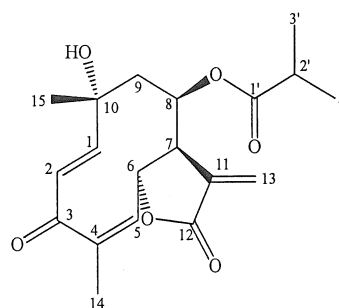
10	-	81,73	-	72,07
11	-	136,98	-	136,06
12	-	169,69	-	169,65
13	6,27 (1H, d, J=3,6 Hz, H-13a) 5,54 (1H, d, J=3,3 Hz, H-13b)	121,68	6,35 (1H, d, J=1,5Hz, H-13a) 5,80 (1H, d, J=2,0 Hz, H-13b)	124,46
14	1,11 (3H, s, br, CH ₃)	19,07	1,96 (3H,d, J=2,0 Hz, CH ₃)	19,67
15	1,42 (3H, s, CH ₃)	24,83	1,54 (3H, s, CH ₃)	29,01
1'	1,05 (3H, d, J=6,9Hz, CH ₃)	176,42	-	176,12
2'	2,44 (1H, m)	33,98	2,42 (1H, m)	34,06
3'	1,05 (3H, d, J=6,9Hz, CH ₃)	18,30	1,07 (3H, d, J=7,0 Hz, CH ₃)	18,63
4'	1,07 (3H, d, J=6,9Hz, CH ₃)	18,64	1,07 (3H, d, J=7,0 Hz, CH ₃)	18,80

^{a)}δ_H và ^{b)}δ_C của TagA, ^{c)}δ_H và ^{d)}δ_C của TagC

và cấu trúc của chất thu được theo giải pháp hữu ích có công thức (I) và (II) sau:



(I)



(II)

Ví dụ 3. Xác định thành phần và hàm lượng của hỗn hợp sesquiterpen thu được theo giải pháp hữu ích

Hàm lượng của hỗn hợp sesquiterpen thu được từ Ví dụ 1 được xác định bằng phương pháp HPLC. Hệ thiết bị HPLC của Hệ thống Spectra (Thermo Separation, San Jose, CA, United States, Hoa Kỳ), được trang bị môđun bơm bậc bốn (P4000), bộ khử khí trực tuyến và đầu dò diốt (DAD) SpectroSystem UV 6000lp (Thermo Separation). Các phân tích được phân tách bằng cột ODS Agilent Zorbax pha đảo (kích thước hạt 5 μm, 3,0 × 150 mm; Agilent Technologies, Milan, Italia), được nhồi trong cột Column J'sphere RP18 (150 mm dài × 4,6 mm ID). Rửa giải gradient với tốc độ dòng 1 ml/phút. Pha động: (A) axetonitril và (B) nước. Thành phần pha động ban đầu là 20% A. Tỷ lệ phần trăm của B được tuyến tính, sau 40 phút. Cuối cùng, tỷ lệ phần trăm của B đã

giảm xuống còn 10% và cột được cân bằng lại với các điều kiện ban đầu trong 10 phút. Thể tích tiêm là 10 μ L. Phát hiện bằng DAD trong khoảng từ 200 đến 500nm. Sắc ký đồ đã được thu thập và dữ liệu được xử lý bằng phần mềm Xcalibur phiên bản 1.2 (Finnigan Corporation 1998-2000, San Jose, CA, Hoa Kỳ). Kết quả sắc ký đồ HPLC được thể hiện trên Hình 1.

Kết quả cho thấy hỗn hợp sesquiterpen có hai thành phần chính tương ứng với pic của Tag A ($[(1R,2S,4R,8S,9R,11R,12S)-1,12\text{-dihydroxy-2,11-dimethyl-7-methylidene-6-oxo-5,14-dioxatricyclo}[9.2.1.0^{4,8}]\text{tetradecan-9-yl}]$ 2-methylpropanoate) 24,4% và pic của Tag C ($[(3aR,4R,6R,7E,10Z,11aR)-6\text{-hydroxy-6,10-dimethyl-3-methylidene-2,9-dioxo-3a,4,5,11a-tetrahydrocyclodeca}[b]\text{furan-4-yl}]$ 2-methylpropanoate) có tỷ lệ 40,1%.

Ví dụ 3. Thử nghiệm hoạt tính ức chế tăng sinh trên dòng tế bào ung thư tủy xương

Để thử nghiệm hoạt tính ức chế tăng sinh trên dòng tế bào ung thư tủy xương cấp của hợp chất thu được từ Ví dụ 1, thử nghiệm được tiến hành trên dòng tế bào ung thư tủy xương cấp tính (OCI-AML3) với các nồng độ thử nghiệm pha loãng là 5,0; 2,5; 1,25 μ g/ml. Phương pháp thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp chuẩn *in vitro* theo hướng dẫn của nhà cung cấp tế bào dòng ung thư tủy xương. Hợp chất đối chứng được sử dụng là dimethyl sulfoxide (DMSO) với các nồng độ tương ứng.

Các chỉ tiêu đánh giá bao gồm đánh giá tác động của chất thu được từ Ví dụ 1 (ký hiệu TVH-CQE6=CQE12+ CQE13) ở ba mức nồng độ đến số lượng tế bào OCI-AML3, đánh giá về số lượng tế bào sống, chết sau thời gian thử nghiệm và đánh giá về tác động liên quan đến chu kỳ tế bào OCI-ALM3.

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng hỗn hợp chất thử nghiệm (CQE6) thu được từ giải pháp hữu ích có khả năng làm suy giảm đáng kể số lượng các tế bào thử nghiệm tại các nồng độ thử nghiệm (5,0; 2,5; 1,25 μ g/ml) (Hình 1) và làm gia tăng số lượng tế bào chết bằng cách cảm ứng và kích hoạt quá trình chết tự nhiên của chúng (*apoptosis*) sau 24 giờ thử nghiệm ở mức có ý nghĩa thống kê (Hình 2). Tất cả các dữ liệu thu được từ ba thí nghiệm độc lập là giá trị trung bình sai số chuẩn $\pm$ (SEM) (**p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05). Đáng chú ý, hợp chất thử nghiệm (ký hiệu TVH-CQE6=CQE12- CQE13) làm giảm sự tăng sinh tế bào OCI-ALM3 và gia tăng chu kỳ tế bào ngay ở nồng độ thấp 1,25 μ g/mL.

Số lượng tế bào giảm do chất thử gây ra có thể do sự gia tăng tế bào chết, giảm sự tăng sinh hoặc cả hai. Đánh giá ảnh hưởng của các chất lên dòng tế bào thử nghiệm theo phương pháp nhuộm nhân tế bào bằng propidium iodide (PI) và kỹ thuật phân tích dòng tế bào phân tích hàm lượng ADN của tế bào. Phân tích kết quả của phép đo này cho thấy tỷ lệ phần trăm tế bào đang ở pha nào (các pha chính là G0/G1, S, và G2/M) của chu kỳ tế bào. Kết quả thể hiện trên Hình 3 này phần nào cho thấy hợp chất theo giải pháp hữu ích có khả năng ức chế quá trình tăng sinh tế bào OCI-AML3 theo cơ chế ngăn chặn giai đoạn chuẩn bị hay phân chia (pha G2/M) trong chu trình tế bào (Hình 3).

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình chiết các hợp chất Tagitinin từ cây Cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*) theo giải pháp hữu ích đơn giản, cho phép chiết, tách chọn lọc hợp chất có tác dụng sinh học từ nguyên liệu ban đầu với hiệu suất chiết đạt 0,1% với thành phần là hai hoạt chất chính: hợp chất Tagitinin A (TagA) ($[(1R,2S,4R,8S,9R,11R,12S)-1,12\text{-dihydroxy-2,11-dimethyl-7-methylidene-6-oxo-5,14-dioxatricyclo}[9.2.1.0^{4,8}]\text{tetradecan-9-yl}]$ 2-methylpropanoate) có công thức (I) và Tagitinin C (TagC) ($[(3aR,4R,6R,7E,10Z,11aR)-6\text{-hydroxy-6,10-dimethyl-3-methylidene-2,9-dioxo-3a,4,5,11a-tetrahydrocyclodeca}[b]\text{furan-4-yl}]$ 2-methylpropanoate)) có công thức (II). Quy trình cho phép phát triển được nguồn nguyên liệu từ hợp chất thiên nhiên với lượng và độ tinh sạch khả thi để làm nguyên liệu phát triển được phẩm hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Bằng kỹ thuật chiết chọn lọc, quy trình cho phép chiết được hợp chất có hoạt tính ức chế dòng tế bào ung thư tủy xương ngay cả nồng độ thấp (1,25 $\mu\text{g/mL}$) trên cơ sở ức chế chu trình tế bào. Đây là hướng mới cho phép can thiệp chọn lọc tế bào ung thư, ngăn khả năng phát triển của tế bào ung thư ở cơ chế tế bào giúp việc điều trị ung thư hiệu quả.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp chiết nhóm hợp chất sesquiterpen có hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư tủy xương cấp từ cây Cúc quỳ, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu gom mẫu cành và lá cây Cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*), sau khi loại bỏ tạp, sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50-60°C đến khô giòn, sau đó xay nhỏ qua cỡ sàng 5mm thu được nguyên liệu là bột cây Cúc quỳ có độ ẩm khoảng 10%;

b) chiết nguyên liệu bằng cách ngâm bột cây Cúc quỳ với dung môi etanol 80%, siêu âm trong 15 phút và ngâm chiết khoảng 24 giờ trong điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45-50 °C, thu hồi phần dịch chiết;

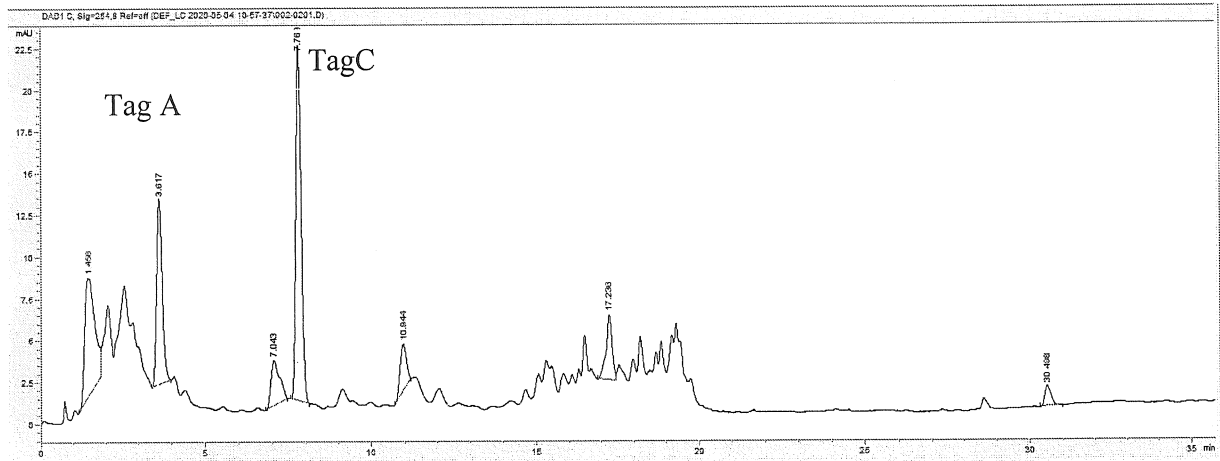
c) chiết loại tạp chất bằng cách cô phần dịch chiết trong điều kiện áp suất 6700Pa trên máy cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C để loại bỏ dung môi đến khi còn 1/5 thể tích, để thu được phần dịch chiết dạng sệt, dịch chiết này được chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan với lượng tương đương để loại bỏ tạp chất;

d) chiết phân lớp bằng cách chiết phần dịch nước sau khi chiết bằng *n*-hexan với etyl axetat 3 lần với thể tích tương đương, sau đó cất cô dịch chiết dưới áp suất giảm thu được cặn chiết etyl axetat; và

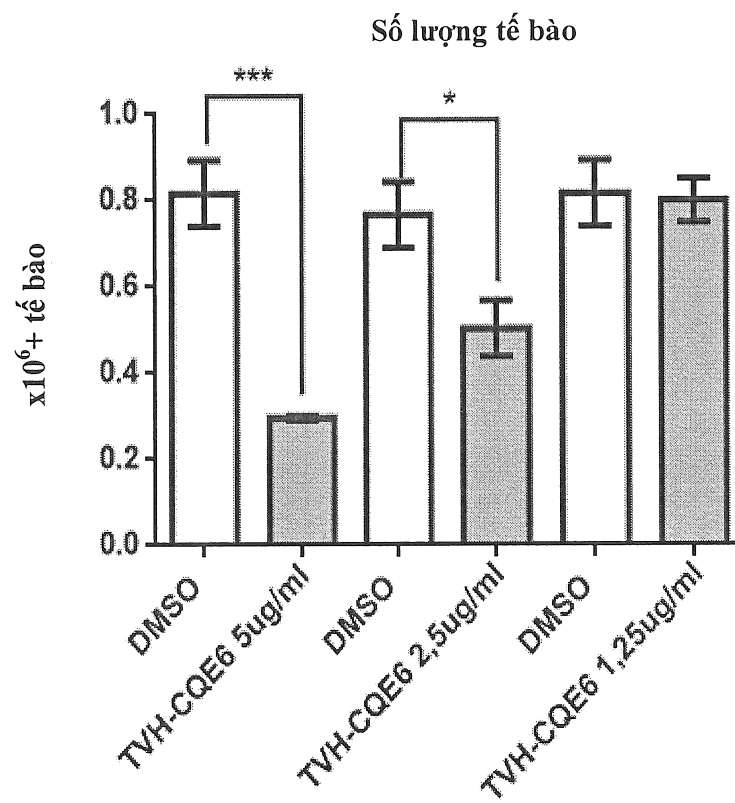
e) thu nhóm hợp chất sesquiterpen có hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư tủy xương cấp bằng cách nhồi cặn chiết etyl axetat lên cột sắc ký và rửa bằng hệ dung môi *n*-hexan/etyl axetat với tỷ lệ *n*-hexan giảm dần, thu phân đoạn *n*-hexan/etyl axetat tỷ lệ 50/50, sau khi lọc phân đoạn này trên gel sephadex LH-20 với dung môi metanol, cất loại dung môi thu được nhóm hợp chất sesquiterpen dạng bột màu vàng nhạt, vị đắng bao gồm [(1*R*,2*S*,4*R*,8*S*,9*R*,11*R*,12*S*)-1,12-dihydroxy-2,11-dimethyl-7-methylidene-6-oxo-5,14-dioxatricyclo[9.2.1.0^{4,8}]tetradecan-9-yl] 2-methylpropanoate (TagA) và [(3*aR*,4*R*,6*R*,7*E*,10*Z*,11*aR*)-6-hydroxy-6,10-dimethyl-3-methylidene-2,9-dioxo-3*a*,4,5,11*a*-tetrahydrocyclodeca[*b*]furan-4-yl] 2-methylpropanoate (TagC).

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước chiết nguyên liệu được thực hiện trong điều kiện siêu âm ở tần số từ 30 kHz đến 50 kHz trong 15 phút trước khi ngâm chiết ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ và hệ dung môi sắc ký là *n*-hexan/etyl axetat.

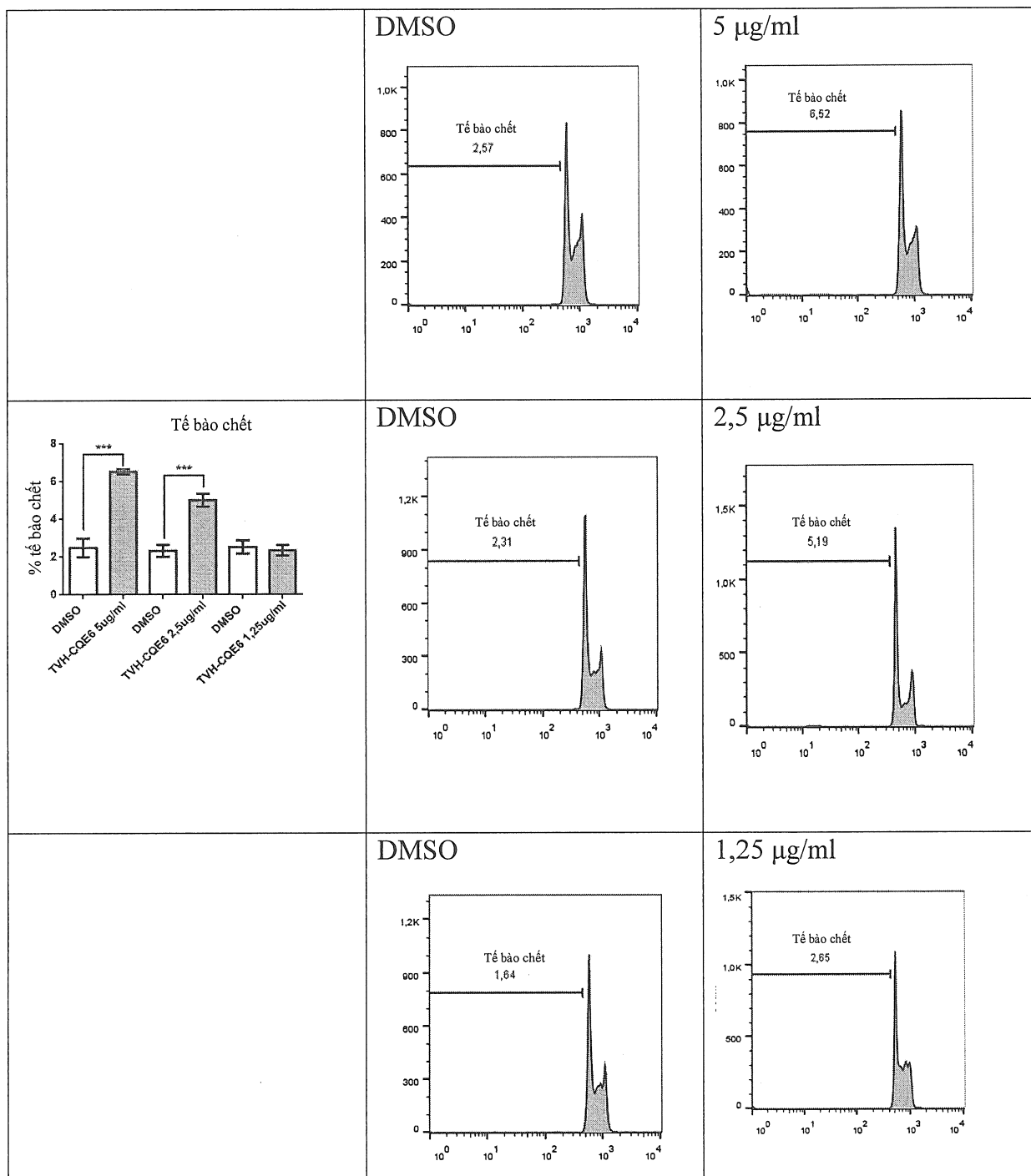
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4

