



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

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

(11)



1-0044517

(51)^{2022.01} C07D 307/00; C07D 307/77; A61K
31/34; A61P 29/00

(13) B

(21) 1-2022-07613

(22) 22/11/2022

(45) 25/04/2025 445

(43) 27/01/2023 418A

(71) Đại học Bách khoa Hà Nội (VN)

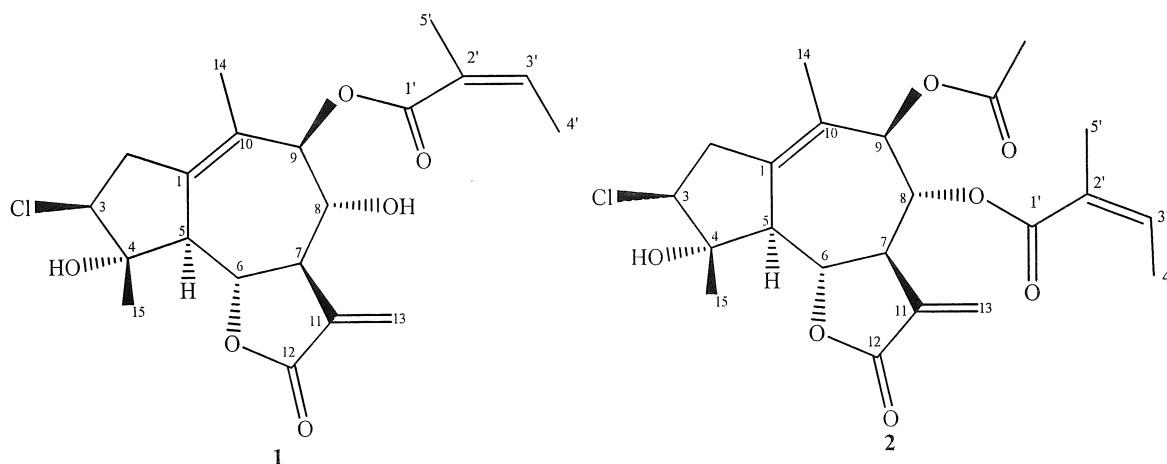
Số 1 Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Việt Thanh (VN).

(54) HỢP CHẤT CLO SESQUITECPEN CÓ TÁC DỤNG ỨC CHẾ OXIT NITRIC VÀ
PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI SIGESBECKIA
ORIENTALIS L.

(21) 1-2022-07613

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất clo sesquiterpen có công thức (1) và (2) sau đây



và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài *Sigesbeckia orientalis* L. Các hợp chất clo sesquiterpen theo sáng chế có tác dụng ức chế sản sinh NO. Các hợp chất clo sesquiterpen và phương pháp phân lập hợp chất này theo sáng chế rất hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các sản phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh gút.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên có tác dụng ức chế oxit nitric nhằm nghiên cứu ứng dụng để chữa bệnh gút. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất clo sesquiterpen và phương pháp phân lập hợp chất này từ loài *Sigesbeckia orientalis* L..

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khai thác dược liệu quý từ các cây cỏ Việt Nam đang là hướng đi tích cực, đã mang lại nhiều kết quả và sản phẩm được đón nhận. Hiện nay cao chiết từ một số loài cây thuốc đã và đang được sử dụng để bào chế thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị bệnh gút chiết xuất từ thảo dược đã và đang mang lại hiệu quả tích cực.

Hiện nay gút là bệnh xương khớp khá phổ biến. Các dữ liệu thu thập cho thấy tỉ lệ bệnh gút đang ngày một gia tăng ở các nước Âu, Mỹ và nhiều nước khác như Nhật Bản, Trung Quốc, Việt Nam... Nguyên nhân của bệnh gút là do tăng axit uric trong máu ($> 420 \mu\text{mol/l}$ đối với nam và $>360 \mu\text{mol/l}$ đối với nữ, gây viêm khớp ; ở thận gây viêm thận kẽ, ở các mô dưới da: khuỷu tay, mắt cá, gỏi hình thành hạt tophus..

Sáng chế CN115403546 A công bố ngày 25/05/2022 cho thấy các dẫn xuất guaiane sesquiterpene thể hiện hoạt tính kháng viêm mạnh và được cải thiện đáng kể về độ ổn định hóa học, độ hòa tan trong nước và sinh khả dụng qua đường uống đã được phát hiện. Đồng thời dẫn xuất guaiane sesquiterpene mới được xác minh là có tác dụng kháng viêm. Do đó dẫn xuất guaiane sesquiterpene mới có tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm.

Bài báo "Muaitaer Nuermaiti, *et al.*, Sesquiterpenes from *Artemisia Sieversiana* and their anti-inflammatory activities, *Fitoterapia*, 154-104996, 1-7, 2021" đã công bố phân lập được 18 sesquiterpen, trong đó có tám hợp chất mới, bao gồm ba guaianolide dime và năm sesquiterpen, cùng với mười hợp chất đã biết từ loài *Artemisia sieversiana*. Các hợp chất phân lập được đã được thử nghiệm về tác dụng kháng viêm. Kết quả cho thấy 6 hợp chất có hoạt tính kháng viêm mạnh mẽ.

Bài báo "Ishaq Muhammad *et al.*, Three new guaiane-type sesquiterpenoids and a monoterpenoid from *Litsea lancilimba* Merr, *Natural Product Research*, Jul;36(13):3271-3279, 2022" đã công bố ba sesquiterpen loại guaiane và một monotecpenoit mới cùng

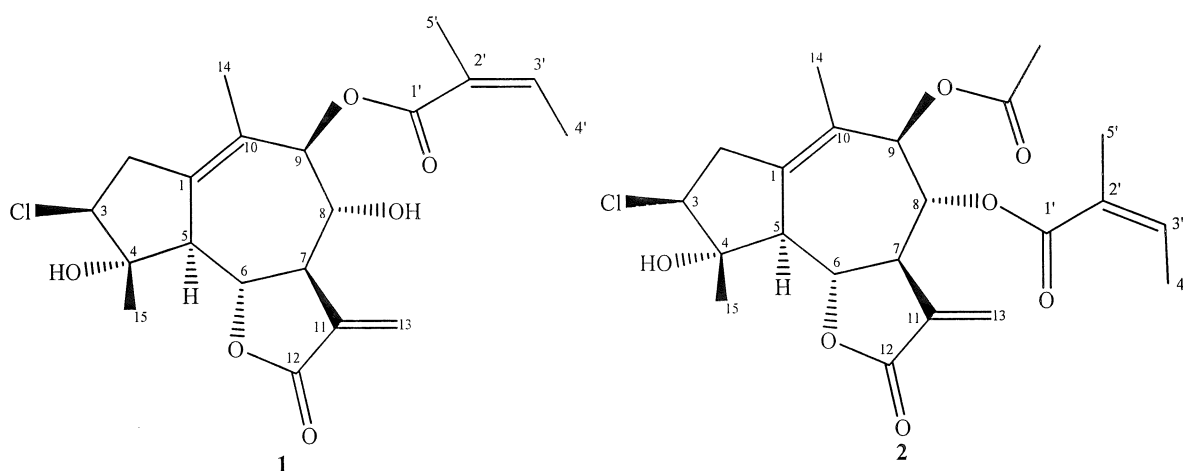
với 11 hợp chất đã biết được phân lập từ dịch chiết của cây *Litsea lancilimba* Merr. Cấu trúc của tất cả các hợp chất phân lập được đã được làm sáng tỏ dựa trên các phương pháp phổ hiện đại. Các thử nghiệm hoạt tính kháng viêm dựa trên khả năng ức chế sản sinh oxit nitric trên đại thực bào cho thấy các ba sesquiterpen loại guaiane có hoạt tính kháng viêm trung bình.

Loài *Sigesbeckia orientalis* L. có tên là Hy thiêm thuộc họ cúc Compositae hay Asteraceae. Loài này phân bố rộng rãi ở Việt Nam và các nước Đông Nam Á. Cây được sử dụng toàn bộ (cả rễ, thân lá) để điều trị các triệu chứng viêm khác nhau, các bệnh chốc lở, nhổ lông, vết thương và bỏng. Đặc biệt cây này đã được sử dụng trong các bài thuốc đông y để điều trị viêm khớp cấp tính, thấp khớp, viêm và đặc biệt là bệnh gút. Do vậy việc điều tra, phát hiện các hợp chất clo sesquiterpen mới từ loài *Sigesbeckia orientalis* L. có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao, sẽ góp phần làm rõ giá trị cũng như công dụng của loài *Sigesbeckia orientalis* L., thúc đẩy việc khai thác và sử dụng một cách hợp lý nguồn tài nguyên thiên nhiên của đất nước.

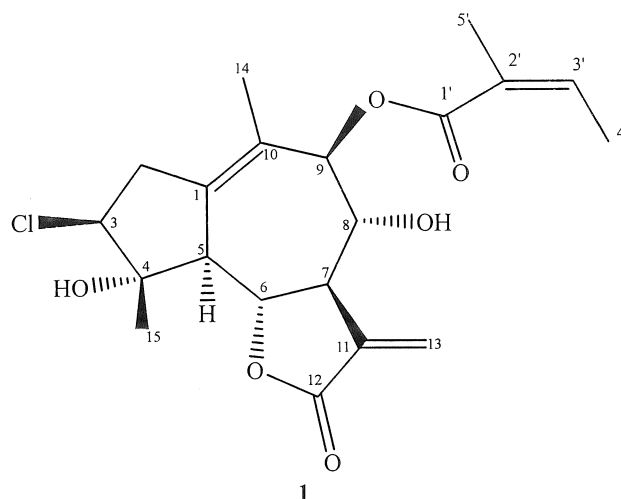
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các hợp chất clo sesquiterpen có khả năng kháng viêm và do đó hữu ích để sử dụng để phát triển thành các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh gút và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài *Sigesbeckia orientalis* L..

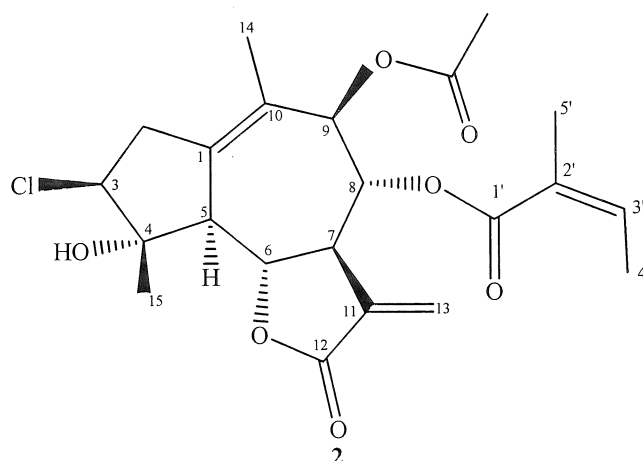
Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất hợp chất clo sesquiterpen, trong đó hợp chất này là hợp chất được chọn từ các hợp chất có công thức (1) và (2) sau đây:



Theo một phương án của khía cạnh thứ nhất, hợp chất clo sesquiterpen là hợp chất chlosigesolides A có công thức (1):



Theo một phương án khác của khía cạnh thứ nhất, hợp chất clo sesquiterpen là hợp chất chlosigesolides B có công thức (2):



Các hợp chất clo sesquiterpen bao gồm hợp chất chlosigesolides A và chlosigesolides B theo sáng chế thể hiện tác dụng ức chế oxit nitric, và do đó có thể sử dụng để phát triển thành các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh gút.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập các hợp chất clo sesquiterpen trên đây từ loài *Sigesbeckia orientalis* L., phương pháp này bao gồm các bước:

i) thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn mẫu cây *Sigesbeckia orientalis* L., sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần 60 phút;

ii) gom các dịch chiết ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol;

iii) hòa tan cạn chiết metanol 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 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích;

iv) tiến hành loại bỏ dung môi các dịch chiết dưới áp suất giảm để thu được các cạn chiết *n*-hexan (S1), diclometan (S2), etyl axetat (S3) và dịch chiết nước (S4);

v) tiến hành phân tách cạn chiết S2 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ etylaxetat (EtOAc) trong *n*-hexan (C_6H_{14}) là *n*-hexan/ EtOAc tỷ lệ 40/0→0/1 thu được sáu phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu SD1, SD2, SD3, SD4, SD5 và SD6;

vi) phân lập hợp chất chlosigesolides B có công thức (2) trong đó:

tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn SD2 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), với hỗn hợp dung môi rửa giải diclometan/axeton tỷ lệ 10/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SD2A đến SD2C; và hợp chất: chlosigesolides B có công thức (2) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn SD2A khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere OSD-H80 (20 × 250 mm), điều kiện dung môi axetonitril/nước tỷ lệ 2/3 về thể tích;

vii) phân lập hợp chất chlosigesolides A có công thức (1) trong đó:

tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn SD4 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), với hỗn hợp dung môi rửa giải diclometan/axeton tỷ lệ 7/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SD4A đến SD4B; và hợp chất: chlosigesolides A có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn SD4A khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere OSD-H80 (20 × 250 mm), điều kiện dung môi axetonitril/nước tỷ lệ 3/2 về thể tích.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

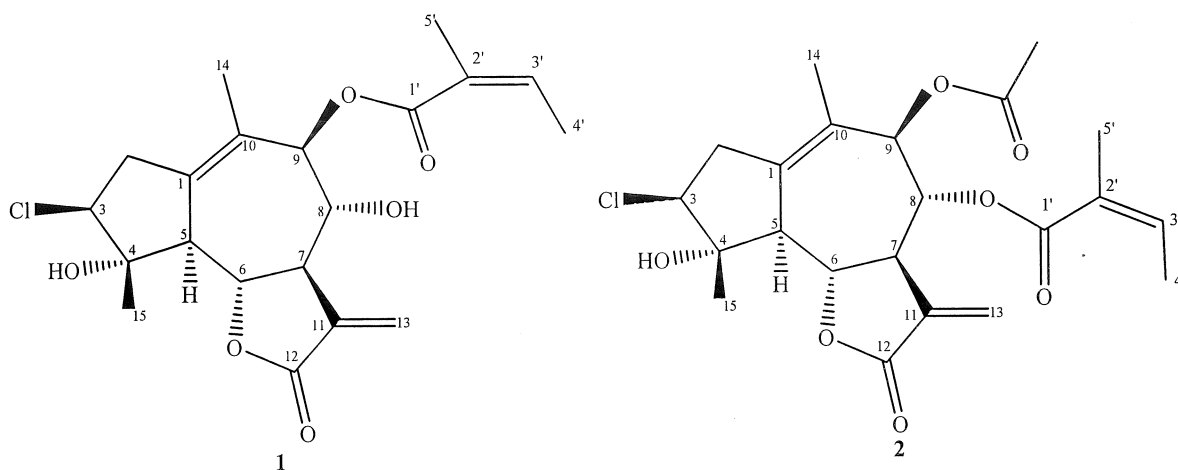
Sáng chế đề xuất phương pháp phân lập và xác định cấu trúc của các hợp chất mới được phân lập từ loài *Sigesbeckia orientalis* L. với đặc tính dược học hữu ích. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất hợp chất có cấu trúc lần lượt chlosigesolides A và chlosigesolides B và phương pháp phân lập hai hợp chất này từ loài *Sigesbeckia orientalis* L. Các hợp chất theo sáng chế có tác dụng ức chế oxit nitric. Sáng chế này là cơ sở khoa học nhằm tạo ra các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh gút phục vụ cuộc sống.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế còn được mô tả thông qua các phương án cụ thể minh họa và mô tả chi tiết hơn nữa cho sáng chế. Ngoài ra, cần phải hiểu rằng, các phương án cụ thể sau đây được mô tả chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế và sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể này. Rõ ràng là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trên cơ sở các nội dung mô tả trong bản mô tả này, có thể thực hiện các phương án tương đương mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế như được mô tả trong yêu cầu bảo hộ kèm theo sau đây.

Trong bản mô tả này, các giá trị số nên được hiểu là bao gồm cả nghĩa “khoảng”, cụ thể là chỉ chính giá trị số đó cũng như các giá trị số nằm trong khoảng $\pm 10\%$, tốt hơn là $\pm 5\%$, và tốt nhất là 0% của giá trị số đó.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất clo sesquiterpen, trong đó hợp chất này là hợp chất được chọn từ các hợp chất có công thức sau:



Các hợp chất clo sesquiterpen trên đây theo sáng chế là các hợp chất có cấu trúc hóa học mới. Các thông số hóa lý của các hợp chất này như sau:

Hợp chất chlosigesolides A có công thức (1):

+ Công thức phân tử: $C_{20}H_{25}O_6Cl$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 396,5$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 41,8^\circ$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 397,1416 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{20}H_{26}O_6^{35}Cl]^+$, 397,1413;

Hợp chất chlosigesolides B có công thức (2):

+ Công thức phân tử: $C_{22}H_{27}O_7Cl$;

Khối lượng phân tử: $M = 438,5$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 37,0^\circ$ (c 01, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 456,1800 $[M+NH_4]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{22}H_{27}O_7^{35}ClNH_4]^+$, 456,1784;

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập hai hợp chất clo sesquitecpen có công thức (1) và (2) trên đây từ loài *Sigesbeckia orientalis* L., phương pháp này bao gồm các bước:

i) thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn mẫu cây *Sigesbeckia orientalis* L., sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ $50^\circ C$, mỗi lần 60 phút;

ii) gom các dịch chiết ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol;

iii) hòa tan cặn chiết metanol 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 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích;

iv) tiến hành loại bỏ dung môi các dịch chiết dưới áp suất giảm để thu được các cặn chiết *n*-hexan (S1), diclometan (S2), etyl axetat (S3) và dịch chiết nước (S4);

v) tiến hành phân tách cặn chiết S2 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ etylaxetat (EtOAc) trong *n*-hexan (C_6H_{14}) là *n*-hexan/ EtOAc tỷ lệ 40/0→0/1 thu được sáu phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu SD1, SD2, SD3, SD4, SD5 và SD6;

vi) phân lập hợp chất chlosigesolides B có công thức (2) trong đó:

tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn SD2 được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), với hỗn hợp dung môi rửa giải diclometan/axeton tỷ lệ 10/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SD2A đến SD2C; và hợp chất: chlosigesolides B có công thức (2) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn SD2A khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere OSD-H80 (20×250 mm), điều kiện dung môi axetonitril/nước tỷ lệ 2/3 về thể tích;

vii) phân lập hợp chất chlosigesolides A có công thức (1) trong đó:

tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn SD4 được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), với hỗn hợp dung môi rửa giải diclometan/axeton tỷ lệ 7/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SD4A đến SD4B; và hợp chất: chlosigesolides A có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn SD4A khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere OSD-H80 (20 × 250 mm), điều kiện dung môi axetonitril/nước tỷ lệ 3/2 về thể tích.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập hai hợp chất clo sesquiterpen từ cây *Sigesbeckia orientalis* L.

Mẫu cây *Sigesbeckia orientalis* L. được thái nhỏ đến kích thước (3-5 cm), phơi khô ở 60 °C rồi nghiền thành bột mịn (5,0 kg). Sau đó, bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần 60 phút. Các dịch chiết được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol (140 g).

Cặn chiết metanol được hòa tan với nước cất (2,5 lít) 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 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích. Các dịch chiết được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết *n*-hexan (S1, 3,1 g), diclometan (S2, 35,7 g), etyl axetat (S3, 24,0 g) và dịch chiết nước (S4).

Cặn chiết diclometan (S2) được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực (Φ 12 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ etylaxetat (EtOAc) trong *n*-hexan (C₆H₁₄) là *n*-hexan/ EtOAc tỷ lệ 40/0→0/1 thu được sáu phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu SD1, SD2, SD3, SD4, SD5 và SD6;

Phân đoạn SD2 được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực (Φ 8 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), với hỗn hợp dung môi rửa giải diclometan/axeton tỷ lệ 10/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SD2A đến SD2C. Hợp chất: chlosigesolides B (5,8 mg) có công thức (2) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn SD2A khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere OSD-H80 (20 × 250 mm), điều kiện dung môi axetonitril/nước tỷ lệ 2/3 về thể tích.

Phân đoạn SD4 được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực (Φ 8 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), với hỗn hợp dung môi rửa giải diclometan/axeton tỷ lệ 7/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SD4A đến SD4B. Hợp chất: chlosigesolides A (22,0 mg) có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn SD4A khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere OSD-H80 (20 × 250 mm), điều kiện dung môi axetonitril/nước tỷ lệ 3/2 về thể tích.

Hợp chất chlosigesolides A có công thức (1).

- + Chất bột vô định hình màu trắng;
- + Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 41,8^\circ$ (c 0,1, MeOH);
- + Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 397,1416 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{20}H_{26}O_6Cl]^+$, 397,1413;
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Số liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR (δ , ppm) của hợp chất chlosigesolides A

C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (J in Hz)
1	130,2	-
2	39,9	2,96 (dd, 17,5, 8,0), H _{α} 2,46 (17,5, 11,0) H _{β}
3	63,5	4,17 (dd, 11,0, 8,0)
4	80,9	-
5	56,7	2,85 (d, 10,0)
6	77,8	4,07 (dd, 10,0, 10,0)
7	51,4	3,03 (dd, 10,0, 9,5)
8	71,7	3,88 (dd, 9,5, 7,0)
9	78,6	5,42 (d, 7,0)
10	128,7	-
11	135,7	-
12	168,9	-
13	124,9	6,32 (d, 3,0) 6,33 (d, 3,0)
14	18,1	1,64 (s)
15	17,8	1,40 (s)
1'	167,2	-
2'	126,6	-
3'	141,1	6,23 (d, 7,0)
4'	16,0	2,04 (d, 7,0)
5'	20,5	1,96 (s)

^{a)} Đo trong MeOD, ^{b)}125 MHz, ^{c)}500 MHz

Hợp chất chlosigesolides B có công thức (2).

- + Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 37,0^\circ$ (c 01, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 456,1800 $[M+NH_4]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{22}H_{27}O_7^{35}ClNH_4]^+$, 456,1784;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Số liệu phổ 1H - NMR và ^{13}C -NMR (δ , ppm) của hợp chất chlosigesolides B

C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (J in Hz)
1	130,6	-
2	39,8	2,98 (d, 17,5, 8,5), H _{β} 2,46 (d, 17,5, 11,0), H _{α}
3	63,4	4,19 (dd, 11,0, 8,5)
4	80,8	-
5	57,1	2,84 (d, 10,5)
6	77,9	4,30 (dd, 10,5, 10,0)
7	49,4	3,19 (dd, 10,0, 10,0)
8	70,4	5,37 (dd, 10,0, 8,0)
9	75,5	5,52 (d, 8,0)
10	128,4	-
11	135,0	-
12	168,3	-
13	123,5	6,28 (d, 3,5) 5,67 (d, 3,5)
14	18,3	1,65 (s)
15	17,7	1,40 (s)
1'	166,0	-
2'	126,4	-
3'	141,7	6,27 (d, 7,0)
4'	16,0	2,02 (d, 7,0)
5'	20,4	1,89 (s)
1''	169,6	-
2''	20,6	2,04 (s)

^{a)} Đo trong MeOD, ^{b)}125 MHz, ^{c)}500 MHz

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác dụng dược lý của các hợp chất clo sesquiterpen

Các hợp chất clo sesquiterpen theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính ức chế sản sinh oxit nitric như sau:

Hoạt tính ức chế sản sinh oxit nitric được thực hiện dựa trên khả năng ức chế sản sinh NO trên tế bào đại thực bào RAW 264,7 ở điều kiện *in vitro*. Theo đó Tế bào RAW 274,7 được đưa vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 2×10^5 tb/giếng và nuôi trong tủ ẩm ở 37°C và 5% CO₂ trong 24h.

- Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) không có fetal bovine serum (FBS) trong 3h.

- Tế bào sau đó được ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2h trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (10 µg/mL) trong 24h.
- Một số giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm. Trong khi đối chứng dương được sử dụng là N^G-Metyl-L-arginin axetat (L-NMMA) (Sigma) ở các nồng độ 100; 20; 4 và 0,8 µg/mL.
- Nitrit (NO₂⁻), được xem là chỉ thị cho việc tạo NO, sẽ được xác định nhờ bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể là, 100 µL môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 µL Griess reagent: 50 µL of 1% (w/v) sunfanilamit trong 5% (v/v) axit phosphoric và 50 µL 0,1% (w/v) N-1-naphtyl-etylendiamin dihydroclorua pha trong nước.
- Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrit sẽ được đo bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank).
- Hàm lượng nitrit của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO₂ và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).
- Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định nhờ công thức :

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{sample}} / \text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] * 100$$

Kết quả được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Kết quả hoạt tính ức chế sản sinh NO

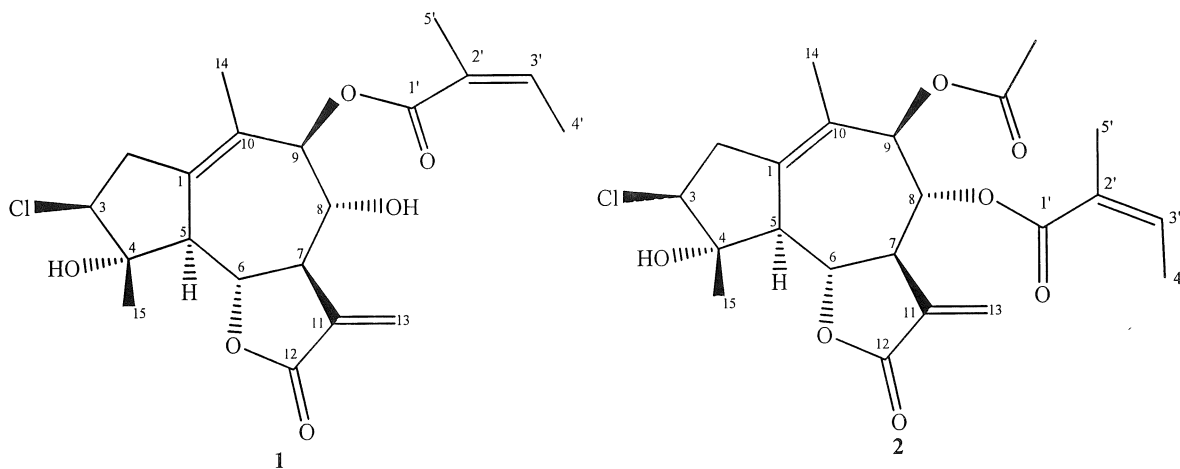
Hợp chất	Nồng độ thử (µg/mL)	% Ức chế NO
chlosigesolides A	100	93,00
chlosigesolides B	100	92,80
L-NMMA	100	94,34

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

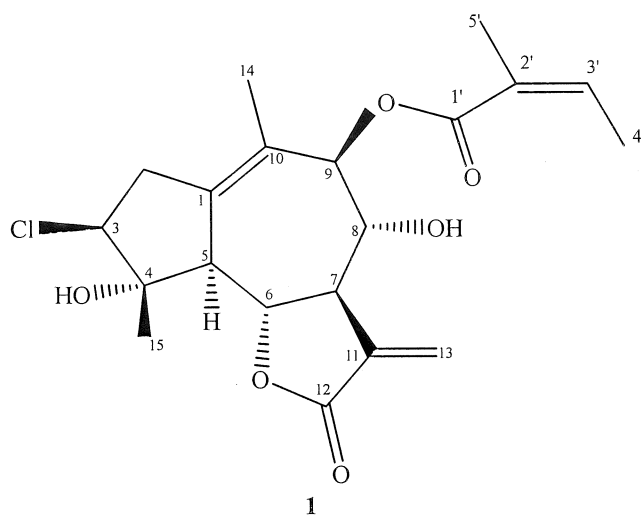
Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hai hợp chất, chlosigesolides A từ loài *Sigesbeckia orientalis* L. thu hái tại vườn Quốc gia Tam Đảo, Vĩnh Phúc. Hai hợp chất này thể hiện hoạt tính khá cao ức chế sản sinh NO so với chất chuẩn đối chứng L-NMMA. Sáng chế này tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh gút dựa trên việc khai thác nguồn dược liệu quý, sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

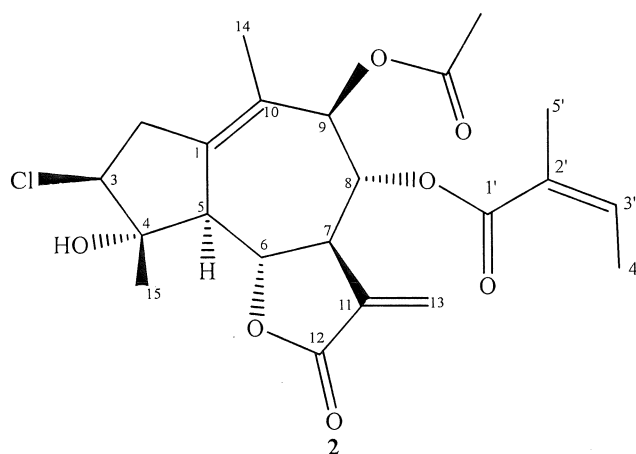
1. Hợp chất clo sesquiterpen, trong đó hợp chất này là hợp chất được chọn từ các hợp chất có công thức sau:



2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức (1):



3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức (2):



4. Phương pháp phân lập hợp chất clo sesquiterpen có công thức (2) từ loài *Sigesbeckia orientalis* L., phương pháp này bao gồm các bước:

i) thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn mẫu cây *Sigesbeckia orientalis* L., sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50 °C, mỗi lần 60 phút;

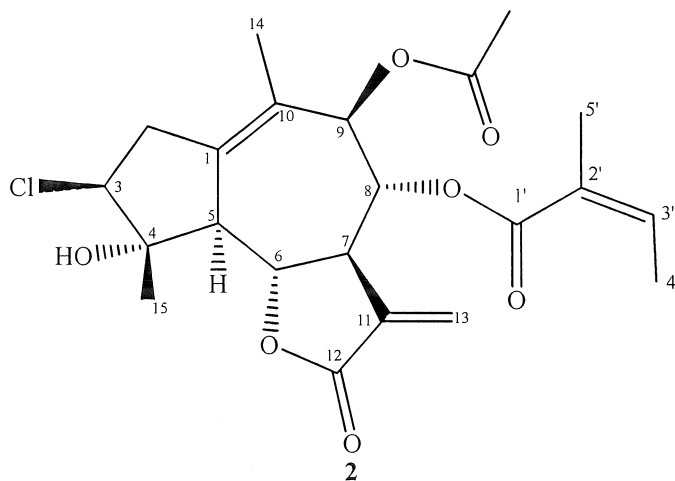
ii) gom các dịch chiết ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết metanol;

iii) hòa tan cặn chiết metanol 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 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích;

iv) tiến hành loại bỏ dung môi các dịch chiết dưới áp suất giảm để thu được các cặn chiết *n*-hexan (S1), diclometan (S2), etyl axetat (S3) và dịch chiết nước (S4);

v) tiến hành phân tách cặn chiết S2 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ etylaxetat (EtOAc) trong *n*-hexan (C₆H₁₄) là *n*-hexan/ EtOAc tỷ lệ 40/0→0/1 thu được sáu phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu là SD1, SD2, SD3, SD4, SD5 và SD6;

vi) tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn SD2 được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), với hỗn hợp dung môi rửa giải diclometan/axeton tỷ lệ 10/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SD2A đến SD2C; và hợp chất: chlosigesolides B có công thức (2) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn SD2A khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere OSD-H80 (20 × 250 mm), điều kiện dung môi axetonitril/nước tỷ lệ 2/3 về thể tích



5. Phương pháp theo điểm 4, khác biệt ở chỗ tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn SD4 được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), với hỗn hợp dung môi rửa giải diclometan/axeton tỷ lệ 7/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SD4A đến SD4B; và hợp chất: chlosigesolides A có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn SD4A khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere OSD-H80 (20 × 250 mm), điều kiện dung môi axetonitril/nước tỷ lệ 3/2 về thể tích

