



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

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

(11)



1-0036647

(51)^{2020.01} C07D 493/14; A61P 29/00

(13) B

(21) 1-2021-03411

(22) 09/06/2021

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/08/2021 401

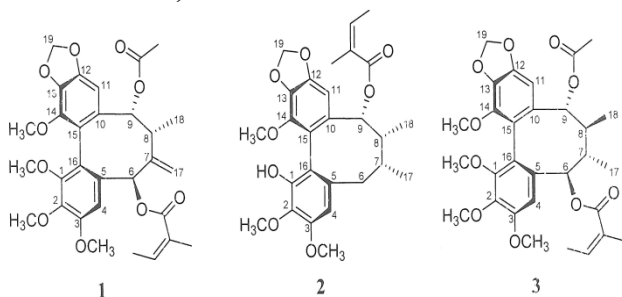
(73) Đại học Bách khoa Hà Nội (VN)

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

(72) Trần Thu Hương (VN); Lê Huyền Trâm (VN); Lê Thị Thùy (VN); Nguyễn Văn Thông (VN); Nguyễn Tuấn Anh (VN); Nguyễn Hoàng Minh (VN); Trần Thượng Quảng (VN); Lê Văn Dương (VN); Trần Thị Minh (VN); Trần Thu Hà (VN); Trương Thị Tô Chinh (VN); Lê Đức Đạt (VN); Bùi Thị Ngoan (VN); Phạm Toàn Thắng (VN).

(54) CÁC HỢP CHẤT DIBENZOCYCLOOCTADIEN LIGNAN VÀ PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH CÁC HỢP CHẤT NÀY TỪ LÁ CÂY NA RỪNG (*KADSURA COCCINEA* (LEM.) A. C. SMITH, SCHISANDRACEAE)

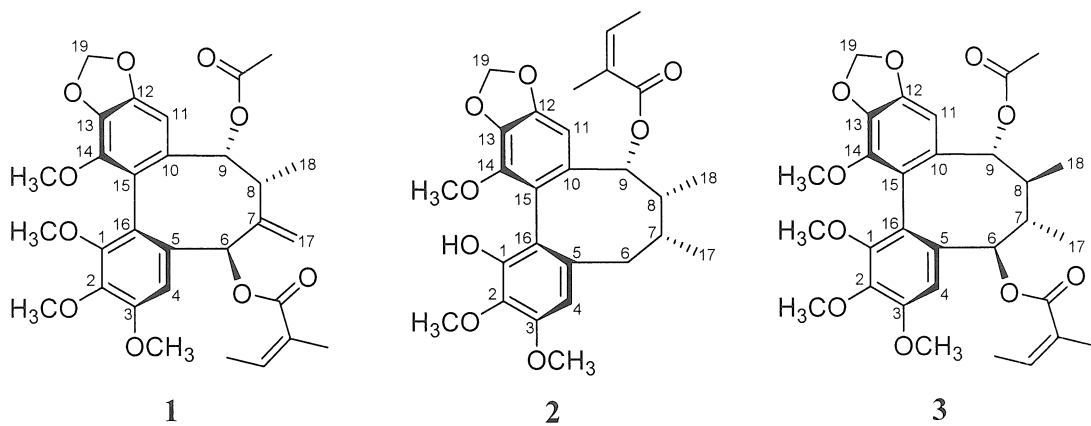
(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan có tác dụng kháng viêm, bao gồm kasuracin A có công thức **1**, angeloyl-binankadsurin A có công thức **2** và interiotherin C có công thức **3** từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae).



Sáng chế còn đề cập đến phương pháp chiết tách các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan này từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae). Phương pháp theo sáng chế cho phép chiết tách được các hợp chất kasuracin A có công thức **1**, angeloyl-binankadsurin A có công thức **2** và interiotherin C có công thức **3** tinh khiết ra khỏi hỗn hợp chất gồm rất nhiều chất từ phần chiết diclometan của mẫu lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hoạt chất thiên nhiên có cấu trúc mới từ nguồn gốc thảo dược có hoạt tính sinh học nhằm phát triển thành dược phẩm hỗ trợ điều trị bệnh. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan có hoạt tính kháng viêm, bao gồm hợp chất mới kasuracin A, các hợp chất đã biết angeloyl-binankadsurin A và interiotherin C có công thức (1-3) tương ứng sau đây:



Sáng chế còn đề cập đến phương pháp chiết tách các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan có công thức (1-3) từ lá cây Na rừng (tên khoa học là *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith) thuộc họ Ngũ vị (Schisandraceae).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây Na rừng có tên khoa học là *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, tên khoa học đồng nghĩa là *Kadsura chinensis* Hance ex Benth. Đây là một loài thực vật thuộc họ Ngũ vị (Schisandraceae) phân bố chủ yếu ở các quốc gia châu Á như Trung Quốc, Lào, Campuchia, Philipin, Thái Lan, Myanmar, Sri Lanka... Ở Trung Quốc, cây phân bố rộng rãi ở các tỉnh Giang Tây, Hồ Nam, Quảng Đông, Hải Nam, Tứ Xuyên, Quý Châu và Vân Nam, và Quảng Tây [Yang Yu-pei *et al*, *Chinese Herbal Medicines*, 12, 214-223, 2020]. Ở Việt Nam, cây mọc rải rác trong rừng thường xanh, ở độ cao từ 400-800m thuộc các tỉnh Lào Cai, Yên Bái, Lạng Sơn, Vĩnh Phúc, Hà Nội, Quảng Trị, Kon Tum, Lâm Đồng [Bùi Văn Thanh và cộng sự, *Hội nghị Khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ*

4, 352-355, 2011]. Cây Na rừng là cây dây leo to có nhánh mọc trườn, mảnh, phủ lớp lông tuyến màu sẫm, rồi về sau lại có lỗ bì hình dải. Lá bầu dục hay thuôn, dạng góc ở gốc, thon hẹp, tù, dài 6-10 cm, nhạt màu ở dưới, rất nhẵn. Hoa đơn tính ở nách lá dài 15 mm, rộng 10 mm, màu tím. Quả giống như một quả Na to [Võ Văn Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tập 2, 192, Nhà xuất bản Y học, 2012]. Ở Trung Quốc, loài thực vật này được đặt tên là “Heilaohu” do quả có hình dáng giống như một quả bóng đá và nổi tiếng là loại trái cây kỳ lạ trên thế giới. Thân và rễ của *Kadsura coccinea* được sử dụng trong y học dân gian của dân tộc Thổ Gia (Tujia) ở Trung Quốc để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp, điều trị các bệnh về da liễu [Liu Y. *et al*, *Molecules*, 23, 2147, 2018].

Các nghiên cứu trước đây về hoá thực vật trên thế giới đã cho thấy thành phần hoá học trong các bộ phận khác nhau của *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith chủ yếu là các hợp chất lignan bao gồm dibenzocyclooctadien lignan [Li L.N. *et al*, *Planta Medica*, 51, 297-300, 1985; Li L.N. *et al*, *Planta Medica*, 54, 45-46, 1998; Liu J.S. *et al*, *Phytochemistry*, 38, 1009-1011, 1995; Liu J.S. *et al*, *Canadian Journal of Chemistry*, 67, 682-684, 2011; Zhao Q.J. *et al*, *Archives of Pharmacal Research*, 37, 1375-1379, 2014]; aryl naphtalen lignan [Li H.R. *et al*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54, 1022-1025, 2006; Li H.R. *et al*, *Journal of Natural Products*, 70, 1999-2002, 2007; Yeon J.H. *et al*, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 10, 782-785, 2014; Jia Y.Z. *et al*, *Phytochemistry*, 184, 112678, 2021]; diarylbutan lignan [Gao X.M. *et al*, *Journal of Asian Natural Products Research*, 14, 129-134, 2012; Fang L.Z. *et al*, *Phytochemistry Letters*, 9, 158-162, 2014]. Ngoài ra, còn có các triterpen có khung lanostan, seco-lanostan, cycloartan, seco-cycloartan, nortriterpenoid [Song Y. *et al*, *Chinese Chemical Letters*, 11, 1352-1354, 2010; Song Y. *et al*, *Archives of Pharmacal Research*, 33, 1933-1936, 2010; Liang C.Q., *Journal of Natural Products*, 74, 2350-2354, 2013; Hu Z.X. *et al*, *Organic Letters*, 17, 4616-4619, 2015; Gao X.M. *et al*, *Tetrahedron*, 64, 11673-11679, 2008; Li H.R. *et al*, *Journal of Natural Products*, 71, 739-741, 2008; Wang N. *et al*, *Journal of Natural Products*, 71, 990-994, 2008; Wang N. *et al*, *Planta Medica*, 78, 1661-1666, 2012; Tan R. *et al*, *Planta Medica*, 57, 87-88, 1991; Sy L.K. *et al*, *Tetrahedron*, 55, 119-132, 1999; Yeon J.H. *et al*, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 10, 782-785, 2014], các hợp chất phenolic khác như flavonoid, acid phenolic và steroid [Ninh K.B *et al*, *Planta*

Medica, 75, 1253-1257, 2009; Woo M.H. *et al*, *Archives of Pharmacal Research*, 43, 204-213, 2020].

Ở Việt Nam, cây Na rừng còn có tên gọi khác là Dây xun xe, Nấm com, Ngũ vị nam, Dây răng ngựa. Cây thường được sử dụng trong các bài thuốc của một số dân tộc ở vùng núi phía Bắc. Quả ăn được, quả rang lên làm thuốc an thần gây ngủ; rễ dùng trị viêm ruột mạn tính, viêm dạ dày ruột cấp tính, viêm loét dạ dày và hành tá tràng, trị phong thấp đau xương, đòn ngã ứ đau, đau bụng trước khi hành kinh, sung vú; vỏ thân, vỏ rễ làm thuốc bổ, kích thích tiêu hóa, giảm đau [Võ Văn Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tập 2, 192, Nhà xuất bản Y học, 2012]. Mặc dù loài *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith có ở Việt Nam nhưng chưa được khai thác nhiều [Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, 872-875, Nhà xuất bản Y học, 2004]. Những nghiên cứu về cây Na rừng của Việt Nam mới được chú ý từ cuối thập kỷ trước, tuy còn tản mạn nhưng đã cho thấy có thành phần hoá học khá tương tự với các công bố trên thế giới, bao gồm các dẫn xuất lignan, lanostan và seco-lanostan triterpenoid, các hợp chất phenolic, flavonoid, steroid [Ninh K.B *et al*, *Planta Medica*, 75, 1253-1257, 2009; Phan Văn Kiệm và cộng sự, *Tạp chí Hoá học*, 48(1), 46-50, 2010; Phạm Thị Hồng Minh và cộng sự, *Tạp chí Hoá học*, 50(1), 50-53, 2012; Đỗ Tiến Lâm và cộng sự, *Tạp chí Hoá học*, 53(6e1,2), 267-271, 2015; Đỗ Tiến Lâm, *Luận án Tiến sĩ Hoá học*, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2016, Nguyen H.L. *et al*, *Indian Journal Pharmaceutical Science*, 80(4), 755-761, 2018; Trần Mạnh Hùng và cộng sự, *Tạp chí Dược liệu*, 23(4), 210-216, 2018].

Lignan là những hợp chất phenolic dimeric khá phong phú và đa dạng trong giới thực vật. Chúng được tạo thành từ phản ứng sinh tổng hợp các đơn vị phenylpropanoid C₆-C₃ (như ancol *p*-coumarylic, ancol coniferylic, ancol sinapylic) xúc tác bởi các enzym peroxidase và laccase. Phần lớn lignan trong thiên nhiên bị oxi hóa và dựa trên cách này mà nguyên tử oxi được kết hợp vào khung lignan thông qua phản ứng đóng vòng. Do trong cấu trúc có chứa các trung tâm bất đối xứng nên lignan là những chất hoạt động quang học. Giống như bất kỳ hợp chất có tính quang hoạt nào, các đặc tính sinh lý hay dược lý quan trọng của lignan thường liên quan đến cấu hình tuyệt đối của chúng. Lignan có chức năng sinh lý quan trọng đối với thực vật. Chúng là những chất miễn dịch, đóng vai trò bảo vệ thực vật chống lại các mầm bệnh xâm hại và động vật ăn cỏ [Cyril Heitner *et al*, *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry*, CRC Press, 2010]. Một số hợp chất lignan

đã được báo cáo về các hoạt tính chống oxy hóa, chống ung thư, chống viêm, kháng khuẩn, diệt côn trùng, hạ huyết áp, hạ cholesterol trong máu và bảo vệ gan như lariciresinol, pinoresinol, medioresinol, syringaresinol, arctigenin, schizandrin và sesamin. Các hợp chất lignan phân lập từ thực vật và một số loài động vật có vú đã được phát hiện đóng một vai trò quan trọng trong việc bảo vệ chống lại một số bệnh liên quan đến hormon, tim mạch, đồng thời làm giảm nguy cơ ung thư vú, ung thư ruột kết, ung thư buồng trứng và ung thư tuyến tiền liệt [Dar A.A. *et al*, *Bioorganic Chemistry*, 50, 1-10, 2013; Landete J.M, *Food Research International*, 46(1), 410-424, 2012; Kamal-Eldin A. *et al*, *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 3, 17-29, 2011].

Các nghiên cứu về hoá thực vật đã công bố trên thế giới và ở Việt Nam cho thấy cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith) rất giàu các hợp chất lignan thiên nhiên, bao gồm bốn loại khung chủ yếu là dibenzocyclooctadien, spirobenzofuranoid dibenzocyclooctadien, diarylbutan và aryltetralin. Cho đến nay, hơn 60 hợp chất dibenzocyclooctadien lignan đã được phân lập từ cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith). Sự khác nhau của các hợp chất lignan này là ở các nhóm thế gắn trên khung dibenzocyclooctadien (Hình 1). Nhóm metoxy (-OCH₃) là nhóm thế được tìm thấy nhiều nhất, ngoài ra còn có các nhóm thế khác bao gồm acetyl, angeloyl, tigloyl, propanoyl, benzoyl, cinnamoyl và butyryl. Trong hầu hết các hợp chất, nhóm hydroxy và metoxy được tìm thấy ở C-1, C-2, C-3 và C-13, còn các nhóm thế như acetyl, angeloyl, tigloyl, propanoyl, benzoyl, cinnamoyl, và butyryl chủ yếu có mặt ở C-6 hoặc C-9 [Yang Y. *et al*, *Chinese herbal medicines*, 12, 214-223, 2020].

Các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan không những là thành phần hoá học đặc trưng của cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith) mà còn có chiếm tỷ lệ cao trong nhiều loài thực vật khác thuộc chi *Kadsura*, họ Ngũ vị (Schisandraceae). Chúng thể hiện các hoạt tính bảo vệ gan, ức chế sự sản sinh NO, chống oxy hóa, chống ung thư và chống virus HIV tiềm năng. Các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan có nhóm hydroxy hoặc angeloyloxy tại C-6 hoặc C-9 trên khung etylden-cyclooctan có hoạt tính chống ung thư cao [Liu J. *et al*, *Phytomedicine*, 21, 1092-1097, 2014].

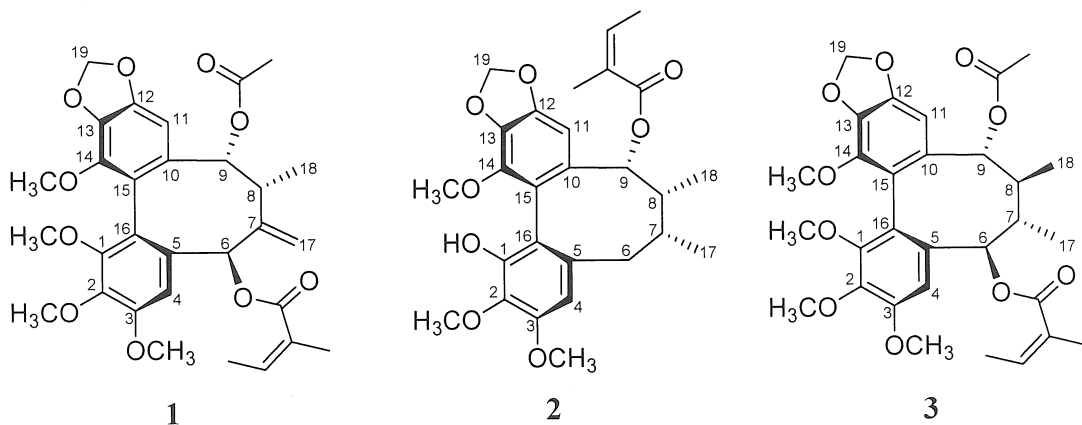
Các tác giả sáng chế đã tập trung nghiên cứu nhằm làm sáng tỏ tác dụng chữa bệnh của cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A.C. Smith, Schisandraceae). Kết quả nghiên cứu đã đề xuất phương pháp chiết tách để thu nhận hợp chất

kasuracin A, một dibenzocyclooctadien lignan mới lần đầu tiên được phân lập từ cây từ lá cây Na rừng của Việt Nam và hai hợp chất dibenzocyclooctadien lignan đã biết là angeloyl-binankadsurin A, interiotherin C chứa các nhóm thế acetyl, angeloyl ở C-6 và C-9 có tác dụng kháng viêm.

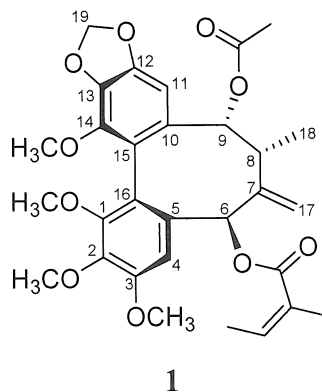
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất dibenzocyclooctadien lignan có hoạt tính kháng viêm tốt, thích hợp để làm chế phẩm thuốc tiềm năng, sản phẩm thực phẩm chức năng hữu dụng, và phương pháp phân lập các hợp chất này từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae).

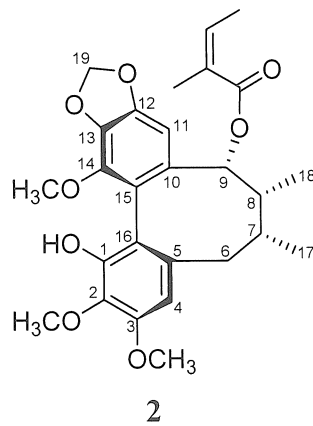
Để đạt được mục đích nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan, đặc trưng ở chỗ, các hợp chất này được chọn trong nhóm bao gồm các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan kasuracin A có công thức 1, angeloyl-binankadsurin A có công thức 2 và interiotherin C có công thức 3 sau đây:



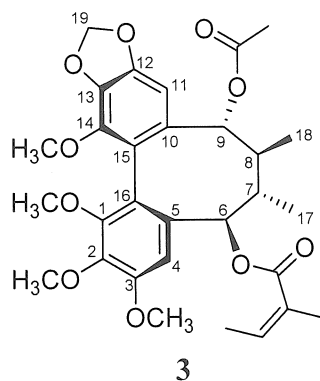
Theo một phương án, hợp chất nêu trên là hợp chất có công thức 1:



Theo một phương án khác, hợp chất nêu trên là hợp chất này có công thức 2:



Theo một phương án khác nữa, hợp chất nêu trên là hợp chất này có công thức 3:



Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chiết tách các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan gồm kasuracin A có công thức 1, angeloylbinankadsurin A có công thức 2 và interiotherin C có công thức 3 từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae), đặc trưng ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước sau:

- (i) thu gom nguyên liệu lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae), loại tạp chất, rửa sạch, sau đó thái nhỏ, phơi khô, rồi sấy nhẹ trong tủ sấy ở nhiệt độ khoảng từ 40 đến 45°C, và xay thành bột;
- (ii) ngâm chiết bột nguyên liệu lá Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) với metanol 95% theo tỷ lệ khối lượng bột/thể tích dung môi là 1/4 ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ, sau đó lọc qua phễu lọc Buchner bỏ bã lá và thu dịch chiết, lặp lại quá trình chiết 4 lần, rồi gộp các phần dịch chiết metanol thu được;
- (iii) cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 50°C để thu được dịch cô, ký hiệu là dịch cô A;
- (iv) hòa tan dịch cô A với nước cất theo tỷ lệ dịch cô A/nước cất là 1/6;

- (v) chiết dịch nước này được chiết lần lượt bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần là *n*-hexan (3 lần), diclometan (3 lần) và giữ lại phần dịch nước sau khi chiết;
- (vi) các dịch chiết *n*-hexan và diclometan được cô kiệt dưới áp suất giảm ở 40°C thu được các phần chiết tương ứng là phần chiết *n*-hexan, ký hiệu là phần chiết KC-H và phần chiết diclometan, ký hiệu là phần chiết KC-D;
- (vii) tiến hành chạy phân tách sắc ký phần chiết KC-D trên cột thuỷ tinh có đường kính cột $\Phi = 50\text{mm}$, chiều dài cột $L = 250\text{mm}$, được nhồi silica gel; rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol theo các tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 5/1, 1/1, 1/100 (thể tích/thể tích), thu được các phân đoạn gộp theo thể tích của hệ dung môi rửa giải tương ứng; kiểm tra quá trình phân tách sắc ký cột bằng phân tích trên sắc ký lớp mỏng, cất loại dung môi thu được 8 phân đoạn dịch chiết nhỏ ký hiệu lần lượt từ KC-D1 đến KC-D8;
- (viii) tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn KC-D5 trên cột thuỷ tinh có đường kính cột $\Phi = 15\text{mm}$, chiều dài cột $L = 350\text{ mm}$, sử dụng sephadex LH-20, rửa giải bằng hệ dung môi metanol/nước theo tỷ lệ thể tích là 1/1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất kasuracin A thô;
- (ix) tinh chế hợp chất kasuracin A thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi cloroform/metanol theo tỷ lệ thể tích là 10/1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất kasuracin A có công thức **1** tinh khiết dưới dạng tinh thể màu trắng.
- (x) tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn KC-D6 trên cột thuỷ tinh có đường kính cột $\Phi = 15\text{mm}$, chiều dài cột $L = 350\text{ mm}$, chất hấp phụ silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan/diclometan/metanol theo tỷ lệ thể tích là 1/3/1 (thể tích/thể tích/thể tích), thu được hợp chất angeloyl-binankadsurin A thô;
- (xi) tinh chế hợp chất angeloyl-binankadsurin A thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi cloroform/metanol theo tỷ lệ thể tích là 1:1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất angeloyl-binankadsurin A có công thức **2** tinh khiết dưới dạng tinh thể lỏng trắng không màu;
- (xii) tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn KC-D7 trên cột thuỷ tinh có đường kính cột $\Phi = 15\text{mm}$, chiều dài cột $L = 350\text{ mm}$, chất hấp phụ YMC

RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi axeton/nước theo tỷ lệ thể tích là 1/1,8 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất interiotherin C thô;

- (xiii) tinh chế hợp chất interiotherin C thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi metanol thu được hợp chất interiotherin C có công thức **3** tinh khiết dưới dạng hình kim không màu.

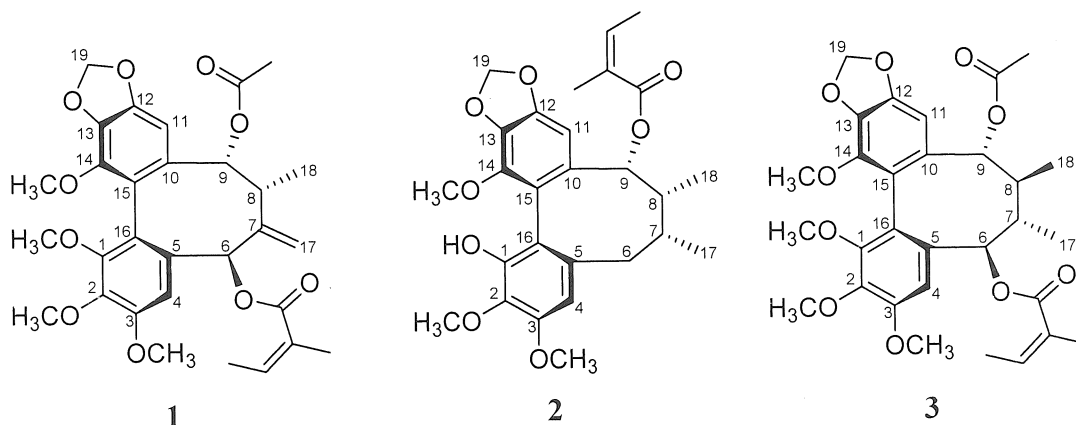
Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là mô tả kiểu cấu trúc khung dibenzocyclooctadien lignan và một số nhóm thế có thể gắn trên khung này.

Hình 2 là sơ đồ minh họa phương pháp chiết tách ba hợp chất dibenzocyclooctadien lignan kasuracin A (**1**), angeloyl-binankadsurin A (**2**) và interiotherin C (**3**) từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan gồm kasuracin A có công thức **1**, angeloyl-binankadsurin A có công thức **2** và interiotherin C có công thức **3** từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae).



Các bước chiết tách để thu nhận các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) được tiến hành tuần tự như sau: Mẫu lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) được thu gom, loại tạp chất, rửa sạch, thái nhỏ, phơi khô, rồi sấy nhẹ trong tủ sấy ở nhiệt độ khoảng từ 40 đến 45°C và xay thành bột. Sau đó, tiến hành chiết xuất, phân lập, xác định cấu trúc hoá học và xác định hoạt tính sinh học của các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan phân lập được.

Theo các tài liệu đã công bố trước đây, các hợp chất thiên nhiên có mặt trong các bộ phận khác nhau của cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) là các hợp chất thứ cấp thuộc nhóm phenolic (như lignan, flavonoid), terpenoid và steroid. Do chúng thường nằm trong hỗn hợp của nhiều chất nên để chiết tách chúng riêng biệt cần phải sử dụng kết hợp các phương pháp chiết xuất và các phương pháp phân tích, phân tách sắc ký.

Phương pháp chiết có ảnh hưởng quan trọng đến việc chiết xuất các hợp chất thuộc các lớp chất mong muốn ở trong mẫu thực vật, bao gồm việc xử lý mẫu thực vật trước khi chiết, lựa chọn dung môi và phương pháp chiết thích hợp. Nguyên liệu thực vật được xay nhỏ nhằm tạo thuận lợi cho quá trình chiết, giúp cho việc tiếp xúc giữa dung môi và nguyên liệu được tốt hơn. Do có cấu trúc hoá học khác nhau mà mỗi loại hợp chất thiên nhiên có độ hoà tan khác nhau trong dung môi. Các dung môi thuộc nhóm rượu có khả năng hòa tan được các chất không phân cực, đồng thời dung môi này cũng có thể tạo liên kết hydro với các nhóm phân cực khác, nhờ đó mà quá trình chiết sơ bộ ở giai đoạn đầu với các dung môi nhóm rượu như metanol hoặc etanol sẽ thu được triệt để hơn các thành phần hoá học có trong thực vật. Nhìn chung, không thể có một phương pháp chiết xuất chung cho tất cả các loại nguyên liệu thực vật, nhưng phương pháp chiết ngâm thường được lựa chọn để chiết hai pha rắn - lỏng. Đây là một phương pháp chiết đơn giản, rẻ tiền, có ưu điểm là không tiêu tốn năng lượng và đặc biệt không đòi hỏi các thiết bị cầu kỳ. Để thu các phần chiết cho mục đích phân lập chất, quá trình chiết lỏng-lỏng được thực hiện với các dung môi có độ phân cực tăng dần như *n*-hexan, diclometan. Do khả năng phân cực của *n*-hexan, diclometan thấp hơn so với dung môi nhóm rượu nên có thể rửa giải được các chất nằm ngoài tế bào, loại được những hợp chất béo và hydrocacbon ít phân cực không mong muốn. Lignan là nhóm các hợp chất thứ cấp thường được phân lập từ các phần chiết cloroform, diclometan, etyl axetat có độ phân cực trung bình. Thiết bị được sử dụng để cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu các phần chiết là thiết bị cô quay thông thường đã được sử dụng trong lĩnh vực nghiên cứu hoá học các hợp chất thiên nhiên.

Các phương pháp phân tích và phân tách chất như sắc ký lớp mỏng (TLC) thực hiện trên bản mỏng silica gel 60F₂₅₄ và RP-18 F_{254S} tráng sẵn của hãng Merck, sắc ký cột (CC) với các chất nhồi hấp phụ pha thường và pha đảo là Silica gel, Dianion, YMC RP-18, SephadexLH-20 cũng đã được sử dụng. Các chất hấp phụ pha thường cho phép phân tách các phần chiết ít phân cực đến phân cực trung

bình, trong khi đó các chất hấp phụ pha đảo cho phép phân tách các phần chiết có độ phân cực cao như phần chiết nước. Bên cạnh đó, để thu được các hợp chất tinh khiết còn sử dụng các phương pháp kết tinh lại trong dung môi thích hợp. Phương pháp chung để xác định cấu trúc hoá học của các hợp chất là việc kết hợp giữa các thông số vật lý (độ quay cực, nhiệt độ nóng chảy) với các phương pháp phổ hiện đại đo được như phổ hồng ngoại (IR), phổ tử ngoại (UV), phổ khối lượng (MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều (^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, COSY, HMBC, HSQC, NOESY...).

Phương pháp thử hoạt tính kháng viêm của các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan phân lập được từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) là phương pháp xác định khả năng ức chế sự sản sinh NO trên tế bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS [Green L.C. *et al*, *Analytical Biochemistry*, 126, 131-138, 1982].

Phương pháp chiết tách các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan gồm kasuracin A có công thức **1**, angeloyl-binankadsurin A có công thức **2** và interiotherin C có công thức **3** từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) gồm các bước được mô tả chi tiết dưới đây:

Phần lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) được thu gom, sơ chế loại tạp chất, rửa sạch, sau đó thái nhỏ, phơi khô, rồi sấy nhẹ trong tủ sấy ở nhiệt độ khoảng từ 40 đến 45°C, và xay thành bột.

Mẫu bột bột nguyên liệu lá Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) được ngâm chiết với metanol 95% theo tỷ lệ khối lượng bột/thể tích dung môi là 1/4 ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ, sau đó lọc qua phễu lọc Buchner thu dịch chiết. Quá trình chiết được lặp lại 4 lần. Các dịch chiết metanol được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 50°C để thu được dịch cô A.

Dịch cô A được hòa tan với nước cất theo tỷ lệ dịch cô A/nước cất là 1/6. Sau đó chiết phân bố dịch nước này lần lượt bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần là *n*-hexan (3 lần), diclometan (3 lần) và giữ lại phần dịch nước sau khi chiết. Sau đó, các dịch chiết *n*-hexan và diclometan được cô kiệt dưới áp suất giảm ở 40°C thu được các phần chiết tương ứng là phần chiết *n*-hexan, ký hiệu là phần chiết KC-H và phần chiết diclometan, ký hiệu là phần chiết KC-D.

Tiến hành chạy phân tách sắc ký phần chiết KC-D trên cột sắc ký silica gel; rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol theo các tỷ lệ thể tích lần lượt là

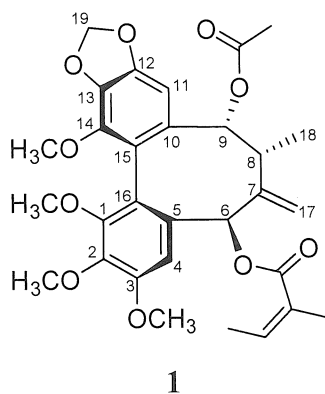
100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 5/1, 1/1, 1/100 (thể tích/thể tích), thu được các phân đoạn gộp theo thể tích của hệ dung môi rửa giải tương ứng; kiểm tra quá trình phân tách sắc ký cột bằng phân tích trên sắc ký lớp mỏng, cất loại dung môi thu được 8 phân đoạn dịch chiết nhỏ ký hiệu lần lượt từ KC-D1 đến KC-D8.

Tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn KC-D5 trên cột sephadex LH-20, rửa giải bằng hệ dung môi metanol/nước theo tỷ lệ thể tích là 1/1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất kasuracin A thô. Tinh chế hợp chất kasuracin A thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi cloroform/metanol theo tỷ lệ thể tích là 10/1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất kasuracin A có công thức **1** tinh khiết dưới dạng tinh thể màu trắng.

Tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn KC-D6 trên cột silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan/diclorometan/metanol theo tỷ lệ thể tích là 1/3/1 (thể tích/thể tích/thể tích), thu được hợp chất angeloyl-binankadsurin A thô. Tinh chế hợp chất angeloyl-binankadsurin A thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi cloroform/metanol theo tỷ lệ thể tích là 1/1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất angeloyl-binankadsurin A có công thức **2** tinh khiết dưới dạng tinh thể lỏng trắng không màu.

Tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn KC-D7 trên cột YMC RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi axeton/nước theo tỷ lệ thể tích là 1/1,8 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất interiotherin C thô. Tinh chế hợp chất interiotherin C thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi metanol thu được hợp chất interiotherin C có công thức **3** tinh khiết dưới dạng hình kim không màu.

- Hợp chất kasuracin A theo sáng chế có công thức cấu tạo sau:



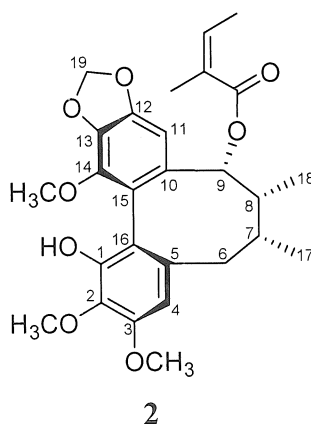
Công thức phân tử: $C_{30}H_{34}O_{10}$;

Khối lượng phân tử: $M = 576 \text{ g/mol}$;

Tính chất của hợp chất kasuracin A có công thức 1:

Các thông số vật lý:

- + Chất rắn dạng tinh thể màu trắng;
 - + Độ quay cực: $[\alpha]_D^{25} = +25,2$ (c 0,08; MeOH);
 - + Phổ tử ngoại UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 228 (3,58); 193 (3,15) nm;
 - + Phổ hồng ngoại IR (KBr): $\nu_{\max}$ 2949, 2836, 1735, 1646, 1463, 1151, và 1018 cm^{-1} ;
 - + Phổ khối lượng HRMS (ESI^+) m/z 572,2488 ($\text{M}+\text{NH}_4^+$), tính toán cho công thức $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_{10}\text{NH}_4$ 572,2496;
 - + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H NMR (400 MHz, CD_3Cl_3): δ 1,24 (H, d, H-18); 1,42 (1H, s, H-5''); 1,54 (1H, s, H-2'); 1,87 (1H, d, H-4''); 2,82 (H, m, H-8); 3,57 (1H, s, OCH_3 -14); 3,75 (1H, s, OCH_3 -2); 3,85 (1H, s, OCH_3 -1); 3,91 (1H, s, OCH_3 -3); 4,86 (1H, brs, H-17a); 5,30 (1H, brs, H-17b); 5,70 (1H, m, H-9); 5,92 (1H, brs, H-19a); 5,93 (1H, brs, H-19b); 5,98 (1H, m, H-3''); 6,40 (1H, s, H-6); 6,50 (1H, s, H-11); 6,50 (1H, s, H-4);
 - + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 15,8 (C-4''); 18,6 (C-18); 20,7 (C-2'); 40,6 (C-8); 56,1 (OCH_3 -3); 59,4 (OCH_3 -2); 60,4 (OCH_3 -1); 60,7 (OCH_3 -14); 79,7 (C-9); 81,4 (C-6); 101,2 (C-19); 102,4 (C-11); 104,4 (C-4); 115,1 (C-17); 120,7 (C-15); 121,7 (C-16); 127,4 (C-2''); 133,1 (C-5); 133,9 (C-10); 136,2 (C-12); 139,9 (C-3''); 141,1 (C-1); 141,7 (C-2); 146,5 (C-7); 148,7 (C-13); 151,5 (C-14); 152,7 (C-3); 166,2 (C-1''); 170,4 (C-1').
- Hợp chất angeloyl-binankadsurin A theo sáng chế có công thức cấu tạo sau:



Tên IUPAC: [(9*R*,10*R*,11*R*)-3-hydroxy-4,5,19-trimethoxy-9,10-dimethyl-15,17-dioxatetracyclo[10,7,0,0^{2,7},0^{14,18}]nonadeca-1(19),2,4,6,12,14(18)-hexaen-11-yl] (*Z*)-2-methylbut-2-enoate.

Tính chất của hợp chất angeloyl-binankadsurin A có công thức 2:

Công thức phân tử: C₂₇H₃₂O₈;

Khối lượng phân tử: M = 484 g/mol;

Các thông số vật lý:

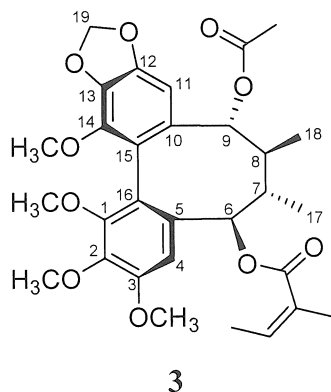
- + Chất rắn dạng lỏng trắng không màu;
- + Nhiệt độ nóng chảy: 121 - 122°C;
- + Độ quay cực: $[\alpha]_D^{25} = +61,5$ (*c* 1,16; CHCl₃);
- + Phổ tử ngoại UV: $\lambda_{\max}^{MeOH}$ (log ϵ) 218 (4,59); 254 (3,98); 288 (3,46) nm;
- + Phổ hồng ngoại IR (KBr): $\nu_{\max}$ 3325, 1740, 1605, 1580 cm⁻¹;
- + Phổ khối lượng MS, *m/z* (%): (M⁺, 10); 384 [M⁺-CH₃CH=C(CH₃)COOH, 100]; 100 [CH₃CH=C(CH₃)COOH, 27]; 83 [CH₃CH=C(CH₃)CO, 16]; 55 [CH₃CH=C(CH₃), 26];
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H NMR (CDCl₃): δ 0,68 (3H, d, *J*=6,9 Hz, H-18); 1,03 (3H, d, *J*=6,9 Hz, H-17); 1,98 (2H, m, H-7); 2,01 (2H, m, H-8); 2,06 (1H, m, H-6a); 2,24 (1H, dd, 9,5, 13,3, H-6b); 3,81, 3,84, 3,91 (3H, s, 3×OCH₃); 4,55 (1H, s, H-9); 5,94 (2H, s, OCH₂O); 6,65, 6,84 (1H, s, H-11, H-4); 1,79 (3H, brs); 1,80 (3H, m); 5,94 (1H, m, angeloyl);
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹³C NMR (CDCl₃) δ 8,2 (C-18); 22,1 (C-17); 35,0 (C-6); 39,4 (C-7); 42,4 (C-8); 73,2 (C-9); 100,9 (C-19); 102,2 (C-11); 109,8 (C-4); 118,9 (C-15); 134,5 (C-13); 137,2 (C-10); 139,2 (C-3); 139,4 (C-1); 140,3 (C-14); 142,1 (C-5); 148,6 (C-12); 153,3 (C-3); angeloyl: 15,5 (C-4'); 20,5 (C-5'); 127,7 (C-2'); 137,4 (C-3'); 166,4 (C-1').

Hoạt tính và tác dụng sinh học của hợp chất angeloyl-binankadsurin A có công thức 2:

Trong phép thử sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên các dòng tế bào ung thư thử nghiệm gồm A549 (ung thư phổi), DU145 (ung thư tuyến tiền liệt),

KB (ung thư biểu mô) và HCT-8 (ung thư manh tràng), hợp chất angeloyl-binankadsurin A có công thức 2 được báo cáo có tác dụng ức chế dòng tế bào KB với giá trị GC_{50} $14,62 \pm 0,7$ mg/ml [Huang Z.H. *et al*, *Helvetica Chimica Acta*, 94(3), 519-527, 2011]. Tuy nhiên, nghiên cứu công bố năm 2020 cho thấy hợp chất angeloyl-binankadsurin A không thể hiện hoạt tính ức chế enzym PTP1B (Protein tyrosine phosphatase 1B), một loại enzym tyrosine phosphatase của protein nội bào trong điều trị bệnh đái tháo đường type 2 (thông qua con đường truyền tín hiệu insulin và leptin) và cũng không ức chế được enzym AchE (Acetylcholinesterase), một enzym xúc tác sự phân hủy của acetylcholine có chức năng làm chất dẫn truyền thần kinh trong điều trị bệnh Alzheimer [Woo M.H. *et al*, *Archives of Pharmacal Research*, 43, 204–213, 2020].

- Hợp chất interiotherin C theo sáng chế có công thức cấu tạo sau:



Tên IUPAC: [(8*R*,9*S*,10*R*,11*R*)-11-acetyloxy-3,4,5,19-tetramethoxy-9,10-dimethyl-15,17-dioxatetracyclo[10,7,0,0^{2,7},0^{14,18}]nonadeca-1(19),2,4,6,12,14(18)-hexaen-8-yl] (Z)-2-methylbut-2-enoate.

Tính chất của hợp chất interiotherin C có công thức 3:

Công thức phân tử: $C_{30}H_{36}O_{10}$;

Khối lượng phân tử: $M = 556$ g/mol;

Các thông số vật lý:

- + Chất rắn tinh thể hình kim không màu;
- + Nhiệt độ nóng chảy: $179 - 181^{\circ}C$;
- + Độ quay cực: $[\alpha]_D^{25} = +127,66$ (c 1,175; $CHCl_3$);
- + Phổ tử ngoại UV: λ_{max}^{MeOH} (log $\square$) 217 (5,90); 260 (4,90); 285 (4,60) nm;

- + Phổ hồng ngoại IR (KBr): $\nu_{\max}$ 1741, 1708, 1593, 1446 cm^{-1} ;
- + Phổ khối lượng HRMS m/z 556,2307, tính toán cho công thức $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{O}_{10}$ là 556,2308;
- + Phổ khối lượng ESI-MS m/z (%): 556 [M^+] (100), 496 (5), 456 (22), 413 (20), 396 (30), 357 (45), 329 (18);
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H NMR (CD_3OD): δ (CDCl_3) δ 0,94 (3H, d, $J=7,0\text{Hz}$, H-17); 1,03 (3H, d, $J=7,0\text{Hz}$, H-18); 1,50 (3H, brs, angeloyl $\alpha\text{-CH}_3$); 1,59 (3H, s, Ac-9); 1,86 (3H, dq, $J=7,0$; 1,0 Hz, angeloyl $\beta\text{-CH}_3$); 2,12 (1H, m, H-7); 2,22 (1H, m, H-8); 3,58 (3H, s, OCH_3); 3,78 (3H, s, OCH_3); 3,88 (3H, s, OCH_3); 3,90 (3H, s, OCH_3); 5,73 (1H, d, $J=3,5$ Hz, H-9); 5,84 (1H, d, $J=7,5$ Hz, H-6); 5,95 (2H, s, OCH_2O); 5,98 (1H, q, $J=7,0$ Hz, angeloyl $\beta\text{-H}$); 6,44 (1H, s, H-11); 6,71 (1H, s, H-4).
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 15,6 (C-17, q); 15,6 ($\beta\text{-CH}_3$, q); 19,9 (C-18, q); 20,7 (CH_3 , q); 20,7 ($\alpha\text{-CH}_3$, q); 38,7 (C-7, d); 38,7 (C-8, d); 50,6; 59,3; 60,2; 60,6 (OCH_3 , q); 80,7 (C-6, d) 80,7 (C-9, d); 101,0 (C-19, t); 102,2 (C-11, d); 110,4 (C-4, d); 121,1 (C-15, s); 121,1 (C-16, s); 127,8 ($\alpha\text{-C}$, s); 131,3 (C-5, s); 133,1 (C-10, s); 135,9 (C-13, s); 138,6 ($\beta\text{-C}$, d); 141,2 (C-2, s); 141,7 (C-14, s); 148,6 (C-12, s); 151,5 (C-1, s); 151,8 (C-3, s); 166,7 (Ang C=O , s); 170,0 (Ac C=O , s).

Hoạt tính và tác dụng sinh học của hợp chất interiotherin C có công thức 3:

Hợp chất interiotherin C có công thức 3 đã được báo cáo về thử nghiệm khả năng ức chế sự kích hoạt kháng nguyên sớm của virus Epstein-Barr (EBV-EA) trong tế bào Raji *in vitro*. Thử nghiệm hoạt tính sinh học cho thấy hợp chất này có khả năng trở thành chất thúc đẩy chống khối u hoặc chất dự phòng chống ung thư có giá trị [Chen D.F. *et al*, *Journal of Natural Products*, 65(9), 1242-1245, 2002].

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế còn được mô tả chi tiết hơn nữa thông qua các ví dụ. Các ví dụ thực hiện sáng chế nhằm giải thích sáng chế được rõ ràng. Mặt khác, các cải biến dựa trên các ví dụ này có thể thực hiện dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chúng sẽ nằm trong phạm vi ý tưởng của sáng chế và của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng, các ví dụ này không làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ 1: Phương pháp chiết tách các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan gồm kasuracin A có công thức 1, angeloyl-binankadsurin A có công thức 2 và interiotherin C có công thức 3 từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae).

Nguyên liệu lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) được thu hái tại Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam. Lá cây được sơ chế loại tạp chất, rửa sạch, sau đó thái nhỏ, phơi khô, rồi sấy nhẹ trong tủ sấy ở nhiệt độ khoảng từ 40 đến 45°C, và xay thành bột. Bột lá nguyên liệu trước khi sử dụng được cho vào trong túi polyetylen kín và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Bột lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) (3,5 g) được ngâm chiết với được ngâm chiết với metanol 95% (theo tỷ lệ khối lượng bột/thể tích dung môi là 1/4) ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ, sau đó lọc qua phễu lọc Buchner thu dịch chiết. Quá trình chiết được lặp lại 4 lần. Các dịch chiết metanol được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 50°C để thu được dịch cô A (125 g). Hòa tan dịch cô A với 1 lít nước cất thu được dịch nước. Chiết dịch nước này ba lần, mỗi lần với 1 lít *n*-hexan. Gộp các dịch chiết trong *n*-hexan lại với nhau, cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 40°C để thu được phần chiết *n*-hexan, ký hiệu là phần chiết KC-H (50 g).

Phần dịch nước sau khi chiết với *n*-hexan được tiếp tục chiết với diclometan ba lần, mỗi lần với 1 lít diclometan. Gộp các dịch chiết trong diclometan lại với nhau, cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 40°C để thu được phần chiết diclometan, ký hiệu là phần chiết KC-D (11,0 g).

Phần chiết KC-D (11,0 g) được phân tách sắc ký trên cột sắc ký silica gel (Merck, cỡ hạt 0,063-0,010 mm), rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol theo các tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 5/1, 1/1, 1/100 (thể tích/thể tích), thu được 60 phân đoạn mỗi phân đoạn 20 ml. Kiểm tra quá trình phân tách sắc ký cột bằng sắc ký lớp mỏng. Các phân đoạn có TLC giống nhau được gộp lại và cất loại dung môi thu được 8 phân đoạn dịch chiết nhỏ ký hiệu lần lượt từ KC-D1 đến KC-D8. Khối lượng của từng nhóm phân đoạn là KC-D1 (0,3 g), KC-D2 (1,3 g), KC-D3 (2,2 g), KC-D4 (1,15 g), KC-D5 (0,2 g), KC-D6 (1,2 g), KC-D7 (0,7 g) và KC-D8 (1,15 g).

Tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn KC-D5 (0,2 g) trên cột sephadex LH-20, rửa giải bằng hệ dung môi metanol/nước theo tỷ lệ thể tích là 1/1 (thể tích/thể

tích), thu được hợp chất kasuracin A thô. Tinh chế hợp chất kasuracin A thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi cloroform/metanol theo tỷ lệ thể tích là 10:1 (thể tích/thể tích), thu được 4,5 mg hợp chất kasuracin A có công thức 1 tinh khiết dưới dạng tinh thể màu trắng.

Phân đoạn KC-D6 (1,2 g) được phân tách sắc ký trên cột silica gel (Merck, cỡ hạt 0,040-0,063 mm) rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan/diclorometan/metanol theo tỷ lệ thể tích là 1/3/1 (thể tích/thể tích/thể tích), thu được hợp chất angeloyl-binankadsurin A thô. Tinh chế hợp chất angeloyl-binankadsurin A thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi cloroform/metanol theo tỷ lệ thể tích là 1/1 (thể tích/thể tích), thu được 7,7 mg hợp chất angeloyl-binankadsurin A có công thức 2 tinh khiết dưới dạng tinh thể lỏng trắng không màu.

Phân tách sắc ký phân đoạn KC-D7 trên cột YMC RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi axeton/nước theo tỷ lệ thể tích là 1/1,8 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất interiotherin C thô. Hợp chất interiotherin C thô được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại trong hệ dung môi metanol thu được 4,3 mg hợp chất interiotherin C có công thức 3 tinh khiết dưới dạng hình kim không màu.

Cấu trúc hoá học của hợp chất 1 được xác định bằng các dữ kiện phổ đo được cho hợp chất này như sau:

Phổ tử ngoại UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 228 (3,58); 193 (3,15) nm;

Phổ hồng ngoại IR (KBr): $\nu_{\max}$ 2949, 2836, 1735, 1646, 1463, 1151, và 1018 cm^{-1} ;

Phổ khối lượng HRMS (ESI^+) m/z 572,2488 ($\text{M}+\text{NH}_4^+$), tính toán cho công thức $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_{10}\text{NH}_4$ 572,2496;

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H NMR (400 MHz, CD_3Cl_3): δ 1,24 (H, d, H-18); 1,42 (1H, s, H-5''); 1,54 (1H, s, H-2'); 1,87 (1H, d, H-4''); 2,82 (H, m, H-8); 3,57 (1H, s, OCH_3 -14); 3,75 (1H, s, OCH_3 -2); 3,85 (1H, s, OCH_3 -1); 3,91 (1H, s, OCH_3 -3); 4,86 (1H, brs, H-17a); 5,30 (1H, brs, H-17b); 5,70 (1H, m, H-9); 5,92 (1H, brs, H-19a); 5,93 (1H, brs, H-19b); 5,98 (1H, m, H-3''); 6,40 (1H, s, H-6); 6,50 (1H, s, H-11); 6,50 (1H, s, H-4);

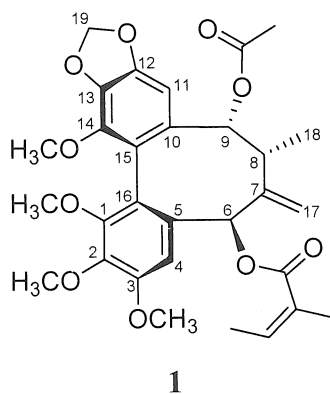
Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 15,8 (C-4''); 18,6 (C-18); 20,7 (C-2'); 40,6 (C-8); 56,1 (OCH_3 -3); 59,4 (OCH_3 -2); 60,4 (OCH_3 -1); 60,7 (OCH_3 -14); 79,7 (C-9); 81,4 (C-6); 101,2 (C-19); 102,4 (C-11); 104,4 (C-

4); 115,1 (C-17); 120,7 (C-15); 121,7 (C-16); 127,4 (C-2''); 133,1 (C-5); 133,9 (C-10); 136,2 (C-12); 139,9 (C-3''); 141,1 (C-1); 141,7 (C-2); 146,5 (C-7); 148,7 (C-13); 151,5 (C-14); 152,7 (C-3); 166,2 (C-1''); 170,4 (C-1').

Xác định cấu trúc hoá học của hợp chất 1:

Hợp chất 1 thu được ở dạng tinh thể màu trắng. Trên phổ khối lượng phân giải cao (HR-MS-ESI) của 1 cho thấy pic ion phân tử ở m/z 572,2488 $[M + NH_4]^+$, tính toán cho công thức $C_{30}H_{34}O_{10}NH_4$ là 572,2496 tương ứng với công thức phân tử của 1 là $C_{30}H_{34}O_{10}$. Phổ hồng ngoại (IR) của 1 cho thấy sự có mặt của các nhóm cacbonyl este (ở 1735 cm^{-1}), cacbon thơm (ở 1463 cm^{-1}) và $C\equiv O$ (ở 1019 cm^{-1}). Trên phổ tử ngoại (UV) có đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 228 nm. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton 1H NMR của 1 cho thấy một proton olefinic ở δ_H 5,98 (m, H-3'), một tín hiệu double của methyl ở δ_H 1,87 (d, $J = 7,3\text{ Hz}$, H-4') và một singlet của methyl ở δ_H 4,42 (H-5'), được liên kết với một gốc angeloyl; hai tín hiệu singlet của vòng thơm ở δ_H 6,50 (H-11) và 6,74 (H-4), hai proton methylen dioxy vùng trường cao ở δ_H 5,92 (brs, H-19a) và 5,93 (brs, H-19b), hai proton olefinic bị thế sp^2 ở δ_H 4,86 (brs, H-17a) và 5,30 (brs, H-17b), bốn tín hiệu singlet metoxy ở δ_H 3,57 (OCH_3 -14), 3,75 (OCH_3 -2), 3,85 (OCH_3 -1), 3,91 (OCH_3 -3), hai oxymethin ở δ_H 6,40 (s, H-6) và 5,70 (m, H-9), một methine ở δ_H 2,82 (m, H-8), một methyl thứ cấp ở δ_H 1,24 (d, $J = 7,1\text{ Hz}$), và một singlet ở vùng trường cao của nhóm methyl ở δ_H 1,54 (H-2'). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon ^{13}C NMR của 1 biểu thị hai nguyên tử cacbon cacbonyl ở δ_C 166,2 (C-1'') và 170,4 (C-1'), mười hai nguyên tử bậc bốn (bao gồm sáu nguyên tử cacbon oxy hóa ở δ_C 136,2 (C-12), 141,1 (C-1), 141,7 (C-2), 148,7 (C-13), 151,5 (C-15) và 152,7 (C-3); sáu cacbon bậc bốn ở δ_C 120,7 (C-15), 121,7 (C-16), 127,4 (C-2'), 133,1 (C-5), 133,9 (C-10) và 146,5 (C-7), sáu nhóm metin bao gồm hai nguyên tử cacbon thơm ở δ_C 102,4 (C-11) và 107,4 (C-4); một cacbon sp^2 ở δ_C 139,9; hai cacbon oxy ở δ_C 79,7 và 81,4; và một tín hiệu ở δ_C 40,6; hai nhóm methylen (một cacbon oxy ở δ_C 101,2 và một cacbon sp^2 ở δ_C 115,1); bốn cacbon metoxyl [ở δ_C 56,1 (OCH_3 -3), 59,4 (OCH_3 -2), 60,4 (OCH_3 -1) và 60,7 (OCH_3 -14)], bốn cacbon methyl [bao gồm hai tín hiệu ở δ_C 15,7 (C-4') và 18,6 (C-18); và hai cacbon ở δ_C 19,8 (C-5') và 20,7 (C-2')]. Các dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H và ^{13}C NMR của 1 đã gợi ra sự hiện diện của khung dibenzocyclooctadien có gắn với một nhóm angeloyl (OAng) và một nhóm acetyl (OAc). Dữ liệu phổ của 1 tương tự với dữ liệu phổ của hợp chất kadsurarin [Chen Y.-P. *et al*, *Tetrahedron Letters*, 14(43), 4257-

4260, 1973] nhưng có sự khác biệt ở liên kết đôi của **1**. Thật vậy, phổ HMBC của **1** cho thấy tương quan HMBC của hai proton ở δ_H 4,86/5,30 (H-17a/H-17b) đến C-6 (δ_C 81,4)/C-7 (δ_C 146,5)/C-8 (δ_C 40,6), và các proton ở δ_H 1,24 (H₃-18) đến C-7 (δ_C 146,5)/C-8 (δ_C 40,6 /C-9 (δ_C 79,7), khẳng định liên kết đôi nằm ở vị trí Δ^7 . Do đó, cấu trúc phẳng của **1** đã được được xác định. Các tương quan trên phổ ¹H-¹H NOESY giữa proton tại (δ_H 6,74 (H-4) và H-6 (δ_H 6,40), và của tín hiệu tại δ_H 5,70 (H-9) đến H-8 (δ_H 2,82)/H-11 (δ_H 6,50), được chỉ định cho cấu hình thuyền xoắn của vòng cyclooctadien [Wang W. *et al*, *Planta Medica*, 72(3), 284-288, 2006; Pham T.H.M. *et al*, *Bulletin of Korean Chemical Society*, 35, 1859-1862, 2014], do đó, các định hướng H-6 α , H-8 β , H-9 β được suy ra từ các dữ kiện trên. Hơn nữa, phổ CD của hợp chất **1** cho thấy hiệu ứng Cotton dương ở khoảng 212-220 nm và hiệu ứng Cotton âm ở khoảng 244 nm, cho thấy cấu hình *S*-biphenyl [Dong K. *et al*, *Journal of Natural Products*, 75(2), 249-256, 2012]. Vì thế, cấu trúc của hợp chất **1** được xác định là một dibenzocyclooctadien lignan mới và được đặt tên là kadsuracin A có công thức cấu tạo sau:



Các dữ kiện phổ của hợp chất **2** như sau:

Phổ tử ngoại UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 218 (4,59); 254 (3,98); 288 (3,46) nm;

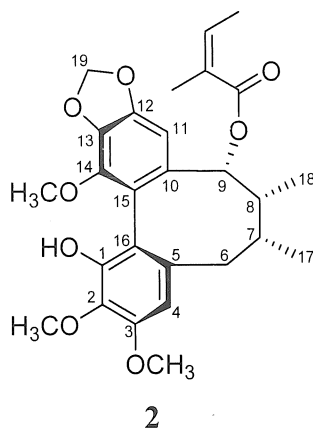
Phổ hồng ngoại IR (KBr): $\nu_{\max}$ 3325, 1740, 1605, 1580 cm^{-1} ;

Phổ khối lượng MS, m/z (%): (M^+ , 10); 384 [M^+ -CH₃CH=C(CH₃)COOH, 100]; 100 [CH₃CH=C(CH₃)COOH, 27]; 83 [CH₃CH=C(CH₃)CO, 16]; 55 [CH₃CH=C(CH₃), 26];

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H NMR (CDCl₃): δ 0,68 (3H, d, J =6,9 Hz, H-18); 1,03 (3H, d, J =6,9 Hz, H-17); 1,98 (2H, m, H-7); 2,01 (2H, m, H-8); 2,06 (1H, m, H-6a); 2,24 (1H, dd, 9,5, 13,3, H-6b); 3,81, 3,84, 3,91 (3H, s, 3 $\times$ OCH₃); 4,55 (1H, s, H-9); 5,94 (2H, s, OCH₂O); 6,65, 6,84 (1H, s, H-11, H-4); 1,79 (3H, brs); 1,80 (3H, m); 5,94 (1H, m, angeloyl);

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 8,2 (C-18); 22,1 (C-17); 35,0 (C-6); 39,4 (C-7); 42,4 (C-8); 73,2 (C-9); 100,9 (C-19); 102,2 (C-11); 109,8 (C-4); 118,9 (C-15); 134,5 (C-13); 137,2 (C-10); 139,2 (C-3); 139,4 (C-1); 140,3 (C-14); 142,1 (C-5); 148,6 (C-12); 153,3 (C-3); angeloyl: 15,5 (C-4'); 20,5 (C-5'); 127,7 (C-2'); 137,4 (C-3'); 166,4 (C-1').

Xác định cấu trúc hoá học của hợp chất **2** cho thấy đây là angeloyl-binankadsurin A, một dibenzocyclooctadien lignan đã biết có công thức cấu tạo như sau:



Theo các tài liệu đã công bố trước đây, hợp chất angeloyl-binankadsurin A có công thức **2** đã được phân lập lần đầu tiên vào năm 1981 từ quả khô của cây *Kadsura japonica* thu hái ở Nhật Bản [Ookawa N. *et al*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29(1), 123-127, 1981]. Sau đó, hợp chất này cũng được thông báo là đã được phân lập từ một số loài *Kadsura* khác họ Ngũ vị (Schisandraceae) như từ phần trên mặt đất của cây *Kadsura philippinensis* [Shen Y.C. *et al*, *Journal of Natural Products*, 69(9), 963-966, 2006], thân cây *Kadsura interior* và *Kadsura heteroclita* [Lu Y. *et al*, *Natural Product Research*, 22(15), 1344-1349, 2008], thân và rễ cây *Kadsura oblongifolia* [Huang Z.H. *et al*, *Helvetica Chimica Acta*, 94(3), 519-527, 2011] và rễ cây *Kadsura coccinea* [Woo M.H. *et al*, *Archives of Pharmacal Research*, 43, 204–213, 2020].

Các dữ kiện phổ của hợp chất **3** như sau:

Phổ tử ngoại UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 217 (5,90); 260 (4,90); 285 (4,60) nm;

Phổ hồng ngoại IR (KBr): ν_{max} 1741, 1708, 1593, 1446 cm^{-1} ;

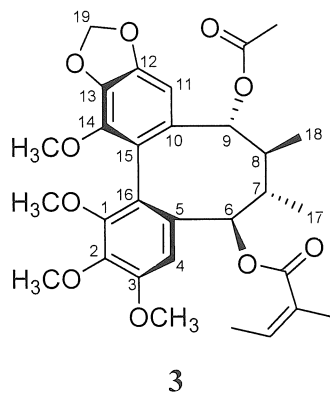
Phổ khối lượng HRMS m/z 556,2307, tính toán cho công thức $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{O}_{10}$ là 556,2308;

Phổ khối lượng ESI-MS m/z (%): 556 [M^+] (100), 496 (5), 456 (22), 413 (20), 396 (30), 357 (45), 329 (18);

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H NMR (CD_3OD): δ ($CDCl_3$) δ 0,94 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-17); 1,03 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-18); 1,50 (3H, brs, angeloyl α -CH₃); 1,59 (3H, s, Ac-9); 1,86 (3H, dq, $J=7,0$; 1,0 Hz, angeloyl β -CH₃); 2,12 (1H, m, H-7); 2,22 (1H, m, H-8); 3,58 (3H, s, OCH₃); 3,78 (3H, s, OCH₃); 3,88 (3H, s, OCH₃); 3,90 (3H, s, OCH₃); 5,73 (1H, d, $J=3,5$ Hz, H-9); 5,84 (1H, d, $J=7,5$ Hz, H-6); 5,95 (2H, s, OCH₂O); 5,98 (1H, q, $J=7,0$ Hz, angeloyl β -H); 6,44 (1H, s, H-11); 6,71 (1H, s, H-4).

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 15,6 (C-17, q); 15,6 ($\square$ -CH₃, q); 19,9 (C-18, q); 20,7 (CH₃, q); 20,7 (α -CH₃, q); 38,7 (C-7, d); 38,7 (C-8, d); 50,6; 59,3; 60,2; 60,6 (OCH₃, q); 80,7 (C-6, d) 80,7 (C-9, d); 101,0 (C-19, t); 102,2 (C-11, d); 110,4 (C-4, d); 121,1 (C-15, s); 121,1 (C-16, s); 127,8 (α -C, s); 131,3 (C-5, s); 133,1 (C-10, s); 135,9 (C-13, s); 138,6 (β -C, d); 141,2 (C-2, s); 141,7 (C-14, s); 148,6 (C-12, s); 151,5 (C-1, s); 151,8 (C-3, s); 166,7 (Ang C=O, s); 170,0 (Ac C=O, s).

Xác định cấu trúc hoá học của hợp chất **3** cho thấy đây là interiotherin C, một dibenzocyclooctadien lignan đã biết có công thức cấu tạo sau:



Theo một số tài liệu đã công bố trước đây, hợp chất interiotherin C đã được phân lập từ một số loài *Kadsura*, họ Ngũ vị (Schisandraceae) như từ vỏ thân cây *Kadsura interior* [Chen D.F. *et al*, *Journal of Natural Products*, 65(9), 1242-1245, 2002], thân cây *Kadsura heteroclita* [Chen M. *et al*, *Journal of Asian Natural Products Research*, 8(7), 643-648, 2006] và thân cây *Kadsura polysperma* [Dong K. *et al*, *Journal of Natural Products*, 75(2), 249-256, 2012].

Ví dụ 2: Thử nghiệm tác dụng kháng viêm *in vitro* của các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan gồm kasuracin A có công thức 1, angeloylbinankadsurin A có công thức 2 và interiotherin C có công thức 3 từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae).

a) Cơ sở của quá trình ức chế sinh NO trên tế bào RAW 264.7:

Viêm là một phản ứng của cơ thể người và động vật đối với các kích thích có hại. Quá trình viêm được đặc trưng bởi cảm giác sưng, đau, nóng và đỏ tấy. Phản ứng sinh học này là một cơ chế bảo vệ của cơ thể chống lại các kích thích có hại, đóng vai trò quan trọng đối với cơ thể con người và động vật, nhưng cũng dẫn đến các bệnh viêm mãn tính như hen suyễn, ung thư, viêm mũi dị ứng, viêm khớp dạng thấp và viêm da dị ứng [Bousquet J. *et al*, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(5), 1720-1745, 2000; Rajput S. *et al*, *Frontiers in Bioscience*, 2, 176-183, 2010; Weninger S.C. *et al*, *Nature Medicine*, 7(5), 527-528, 2001; Flavell R.A. *et al*, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 266, 1-9, 2002].

Nitric oxit (NO) là chất trung gian tế bào được tạo ra trong các tế bào động vật có vú, có mặt ở các tế bào như đại thực bào, nguyên bào sợi hay tế bào gan và thường được sản sinh với lượng lớn khi xuất hiện các đáp ứng viêm. Đây là một phân tử quan trọng trong nhiều hệ thống miễn dịch để bảo vệ vật chủ chống lại các mầm bệnh khác nhau như vi khuẩn, virus, nấm và ký sinh trùng [Bogdan C. *et al*, *Immunological Reviews*, 173(1), 17-26, 2000]. Trong các điều kiện sinh lý bình thường, NO đóng một vai trò quan trọng trong việc điều hòa các nhiều hệ thống sinh học trong cơ thể, bao gồm các mô miễn dịch, tế bào thần kinh và tim mạch [Moncada S. *et al*, *Pharmacological Reviews*, 43, 109-142, 1991]. Tuy nhiên, khi mức sản sinh NO quá cao có thể gây ra phản ứng độc hại làm tổn thương mô liên quan đến viêm cấp tính và mãn tính [Rothe H. *et al*, *Journal of Molecular Medicine*, 77, 40-44, 1999; Taira J. *et al*, *Food Chemistry*, 115, 1221-1227, 2009].

Đại thực bào là thành phần quan trọng của hệ thống miễn dịch của động vật có vú. Chúng đóng một vai trò quan trọng bằng cách tạo ra sự bảo vệ ngay lập tức chống lại các tác nhân ngoại lai trước sự di cư của bạch cầu và sản sinh ra các chất trung gian gây bệnh viêm nhiễm khác nhau bao gồm gốc tự do NO [Moncada S. *et al*, *Pharmacological Reviews*, 43, 109-142, 1991]. Lipopolysaccharid (LPS) là một thành phần của thành tế bào của vi khuẩn Gram âm. Đây là một trong những

nhóm chất hoạt hóa mạnh nhất của đại thực bào, liên quan đến việc sản xuất các cytokine tiền viêm [Nicholas C. *et al*, *The Journal of Immunology*, 179(10), 7121-7127, 2007]. Do đó, việc ức chế sản xuất NO trong các tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 được kích thích LPS là một trong những cách khả thi để đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vitro* của các chất.

Hiện nay, việc nghiên cứu phát triển của thuốc như chất ức chế mạnh sản sinh NO liên quan đến điều trị các bệnh viêm nhiễm đang được nhiều quốc gia quan tâm. Dược liệu được coi là nguồn nguyên liệu tự nhiên tiềm năng, cung cấp các phân tử có hoạt tính ức chế sự sản sinh NO hữu hiệu với độc tính tế bào thấp, bao gồm các hợp chất thứ cấp như flavonoid, lignan, coumarin, tannin, terpenoid, alkaloid, vitamin và các chất dẫn xuất của chúng [Nunes C R. *et al*, *Molecules*, 25, 3726, 2020; Mohammed M.S. *et al*, *The Journal of Phytopharmacology*, 3(4), 275-285, 2014; Le D.D. *et al*, *Carbohydrate Research*, 484, 107778, 2019; Le D.D. *et al*, *Phytochemistry Letters*, 33, 1-5, 2019].

b) Nuôi cấy tế bào:

Tế bào RAW 264.7 được lấy từ Ngân hàng Tế bào Hàn Quốc (KCLB, Chongno-gu, Seoul, Hàn Quốc) và được giữ trong môi trường Dulbecco biến tính (DMEM), bổ sung thêm 10% huyết thanh thai bò (FBS), (100 đơn vị/mL) penicillin, streptomycin sulfat (100 µg /mL) ở 37°C trong tủ áp được làm ẩm có chứa 5% CO₂. Sau khi các tế bào RAW 264.7 ủ trước trong 4 giờ, các chất được thêm vào ở nồng độ 3-60 µM.

c) Khả năng sống sót của tế bào:

Khả năng sống sót của tế bào được đánh giá bằng phương pháp MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]. Đây là một phương pháp so màu, đo độ suy giảm màu để đánh giá khả năng sống sót của tế bào [Carmichael J. *et al*, *Cancer Research*, 47(4), 943-946, 1987], trong đó tác dụng của các hợp chất được đánh giá bằng cách xác định phản ứng khử MTT thành formazan xúc tác bởi enzyme reductase của ty thể. Dạng formazan không hoà tan và có màu tím đậm. Tỷ lệ tế bào sống sót được suy ra từ lượng formazan tạo thành từ MTT.

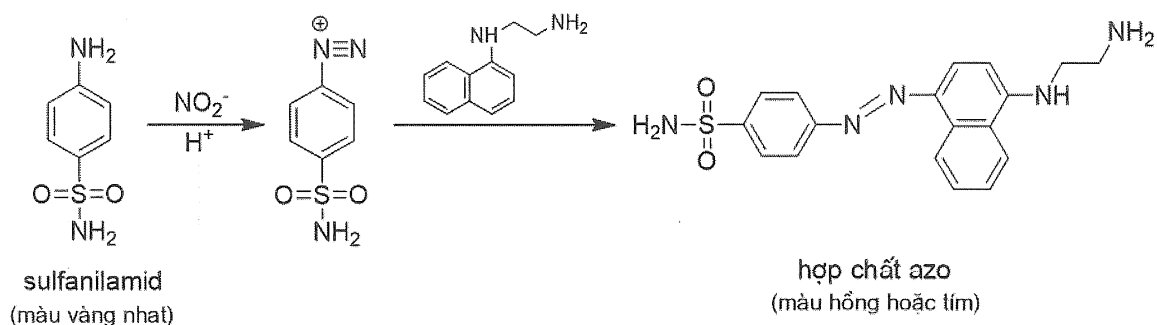
MTT được thêm vào huyền phù tế bào (1×10^4 tế bào/giếng) trong 4 giờ trước khi đưa các chất thử nghiệm vào trong 24 giờ. Hỗn hợp được xử lý với 0,5% DMSO. Phần trăm tế bào sống sót được tính theo công thức sau:

$$\text{số tế bào sống sót (\%)} = \frac{\text{OD}_{570} (\text{tế bào được xử lý})}{\text{OD}_{570} (\text{mẫu đối chứng})} \times 100$$

Tỷ lệ tế bào chết được xác định liên quan đến đối chứng. Đối chứng dương được sử dụng trong thử nghiệm là dexamethasone (một loại thuốc glucocorticoid được sử dụng để điều trị các vấn đề về thấp khớp, một số bệnh ngoài da, dị ứng nặng, hen suyễn, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, đau mắt...).

d) Thử nghiệm oxit nitric:

Nitrit (NO_2^-) là chất chỉ thị cho việc tạo NO, được tích lũy trong môi trường nuôi cấy. Chúng được xác định bằng phản ứng Griess như chất chỉ thị của quá trình tạo NO [Green L.C. *et al*, *Analytical Biochemistry*, 126(1), 131-138, 1982]. Nitrit được phát hiện và phân tích bằng cách hình thành một màu hồng đỏ khi mẫu thử có chứa NO_2^- phản ứng với thuốc thử Griess (gồm sulfanilamid và N-1-naphthylenediamin dihydroclorua (NED) trong điều kiện mặt axit photphoric). Phản ứng hoá học này là phản ứng diazo hoá được Griess mô tả ban đầu vào năm 1879 [Griess P., *Chemische Berichte*, 12, 426–428, 1879].



Các tế bào RAW 264.7 (1×10^5 tế bào/giếng) được kích thích với 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) trong 24 giờ khi có mặt hoặc không có các hợp chất được thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau 3, 10, 30 và 50 μM trong 1 giờ. Cả LPS và mẫu đều không được thêm vào nhóm đối chứng. Sau đó, môi trường nuôi cấy tế bào được trộn với một thể tích thuốc thử Griess, ủ ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ, và sau đó đo độ hấp thụ ở bước sóng 570 nm bằng đầu đọc vi thể (microplate). Môi trường nuôi cấy được sử dụng làm mẫu trắng trong tất cả các thí nghiệm. Lượng nitrit trong các mẫu đo được bằng xác định dãy đường chuẩn NaNO_2 pha loãng và tính toán lượng nitrit (NO_2^-) sinh ra.

e) Xử lý số liệu:

Các thử nghiệm độc lập được lặp lại ba lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) được xác định bằng cách sử dụng phần mềm máy tính GraphPad Prism 5.

f) Kết quả thử hoạt tính kháng viêm:

Cả ba các hợp chất kasuracin A có công thức **1**, angeloyl-binankadsurin A có công thức **2** và interiotherin C có công thức **3** được đánh giá khả năng ức chế sinh NO trong các tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS. Kết quả thử nghiệm hoạt tính được chỉ ra ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế sản sinh NO trong các tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS

Mẫu thử	Giá trị $IC_{50} \pm SD$ (μM)
Kasuracin A (1)	$10,2 \pm 0,66$
Angeloyl-binankadsurin A (2)	$12,3 \pm 0,85$
Interiotherin C (2)	$21,7 \pm 1,22$
Đối chứng dương (dexamethasone)	$0,01 \pm 0,00$

Kết quả ở Bảng 1 chỉ ra rằng hợp chất kasuracin A có công thức **1** và angeloyl-binankadsurin A có công thức **2** thể hiện sự ức chế đáng kể chống lại sự sản sinh NO với giá trị IC_{50} lần lượt là $10,2 \pm 0,66$ và $12,3 \pm 0,85 \mu M$, khi so sánh với đối chứng dương là dexamethasone ($0,01 \mu M$).

Điểm thú vị là ba hợp chất dibenzocyclooctadien lignan kasuracin A (**1**), angeloyl-binankadsurin A (**2**) và interiotherin C (**3**) đều có cấu hình *S*-biphenyl ở nhóm thế methylenedioxy, vì thế có thể ức chế đáng kể việc sản sinh NO trong các tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS. Hợp chất kasuracin A (**1**) và angeloyl-binankadsurin A (**2**) thể hiện khả năng ức chế sự sản sinh NO mạnh hơn interiotherin C (**3**). Kết quả này được cho rằng do sự hiện diện của nhóm thế liên kết đôi Δ^7 ở hợp chất kasuracin A (**1**) ($IC_{50} = 10,2 \mu M$) nên có thể có lợi cho tác dụng ức chế giải phóng NO trong tế bào RAW264.7 nhiều hơn so với angeloyl-binankadsurin A (**2**) ($IC_{50} = 12,3 \mu M$) và interiotherin C (**3**) ($IC_{50} = 21,7 \mu M$). Ngoài ra, sự hiện diện của nhóm thế ở C-7 trên khung dibenzocyclooctadien cũng có thể làm giảm hoạt động ức chế giải phóng NO khi

so sánh tác dụng ức chế giữa angeloyl-binankadsurin A (**2**) ($IC_{50} = 12,3 \mu M$) và interiotherin C (**3**) ($IC_{50} = 21,7 \mu M$).

Một số hợp chất dibenzocyclooctadien lignan phân lập được từ cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) đã được thử nghiệm hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trong các công bố trước đây. Trong công trình nghiên cứu năm 2007 của các nhà khoa học Nhật Bản, kadsuralignan H và kadsuralignan J thể hiện hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trong đại thực bào của chuột RAW 264.7 kích thích bởi lipopolysaccharide (LPS) với giá trị IC_{50} tương ứng là $7,6 \mu g/ml$ ($19,6 \mu M$) và $16,3 \mu g/mL$ ($33,5 \mu M$) [Li H. *et al*, *Journal of Natural Products*, 70, 1999–2002, 2007]. Trong nghiên cứu của các nhà khoa học Trung Quốc, kadsuralignan G và kadsuralignan L có tác dụng ức chế sự sản sinh NO vừa phải [Hu W. *et al*, *Journal of Asian Natural Products Research*, 14(4), 364–369, 2012], trong khi đó các hợp chất acetylschisantherin L, schiarisanrin A, schiarisanrin B, heteroclitin D, kadsulignan H và kadsulignan I có thể ức chế mạnh sự sản sinh NO do LPS gây ra trong mô tế bào chuột BV-2 [Fang L. *et al*, *Phytochemistry Letters*, 9, 158–162, 2014].

Như vậy, kết quả đánh giá khả năng ức chế sự sản sinh NO của kasuracin A có công thức **1**, angeloyl-binankadsurin A có công thức **2** và interiotherin C có công thức **3** đã đóng góp vào cơ sở dữ liệu về hoạt tính kháng viêm của cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae). Đồng thời, kết quả nghiên cứu này cũng gợi mở việc sử dụng các dibenzocyclooctadien lignan từ cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) làm nguồn nguyên liệu tiềm năng để bào chế các loại dược phẩm chống viêm.

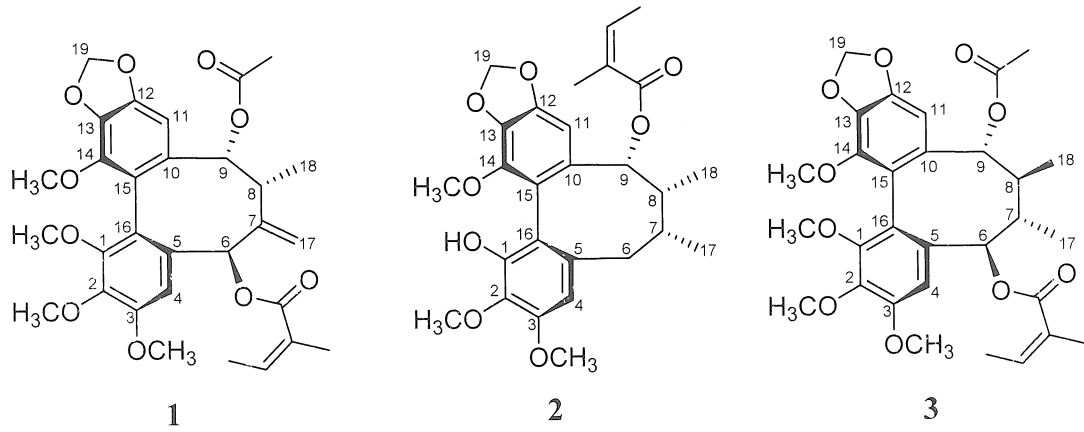
Những lợi ích có thể đạt được

Sáng chế đề xuất thành công phương pháp chiết tách các hợp chất dibenzocyclooctadien lignan từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) Việt Nam. Hợp chất kasuracin A có công thức **1** theo sáng chế là một dibenzocyclooctadien lignan mới, hai hợp chất angeloyl-binankadsurin A có công thức **2** và interiotherin C có công thức **3** là các hợp chất đã biết, đều có tác dụng ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 được kích hoạt bằng LPS. Vì thế, sáng chế này góp phần tạo cơ sở vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo tạo ra nguyên liệu an toàn để bào chế các dược phẩm có tác dụng phòng ngừa và điều trị các bệnh về viêm nhiễm. Hơn nữa, sáng chế cũng nhằm định

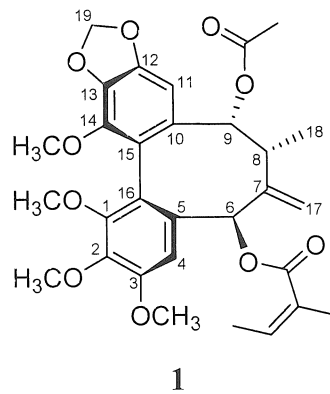
hướng cho việc khai thác bền vững, sử dụng đúng mục đích và có hiệu quả cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae), một cây thuốc quý của Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

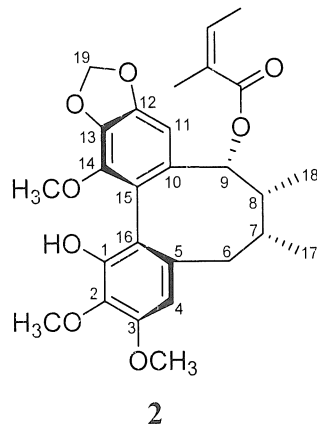
1. Hợp chất, đặc trưng ở chỗ, hợp chất này được chọn trong nhóm bao gồm các hợp chất có công thức 1 - 3 sau đây:



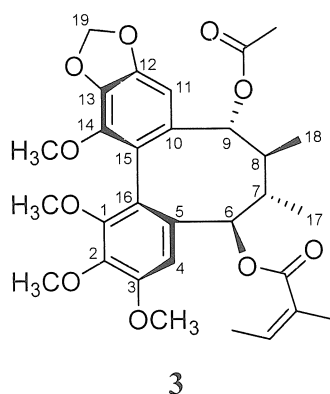
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức 1:



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



4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức 3:

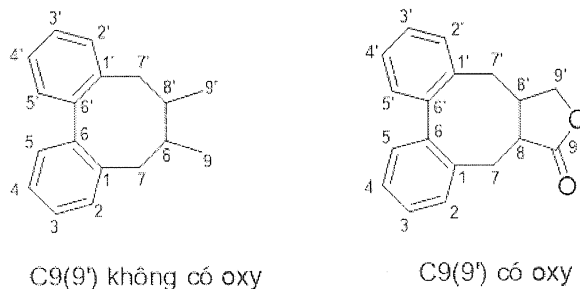


5. Phương pháp chiết tách hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae), đặc trưng ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước sau:

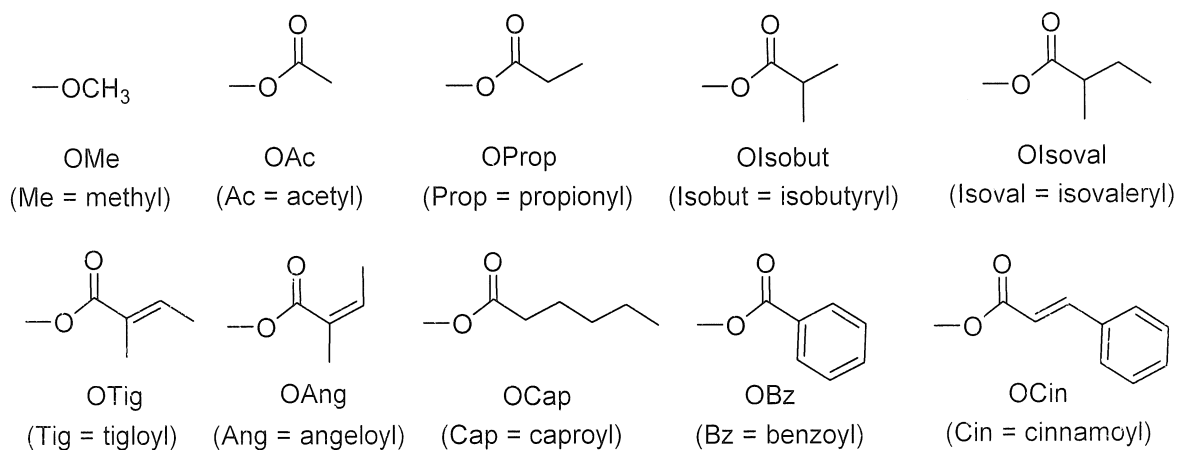
- (i) thu gom nguyên liệu lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae), loại tạp chất, rửa sạch, sau đó thái nhỏ, phơi khô, rồi sấy nhẹ trong tủ sấy ở nhiệt độ khoảng từ 40 đến 45°C, và xay thành bột;
- (ii) ngâm chiết bột nguyên liệu lá Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, Schisandraceae) với metanol 95% theo tỷ lệ khối lượng bột/thể tích dung môi là 1/4 ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ, sau đó lọc qua phễu lọc Buchner bỏ bã lá và thu dịch chiết, lặp lại quá trình chiết 4 lần, rồi gộp các phần dịch chiết metanol thu được;
- (iii) cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 50°C để thu được dịch cô, ký hiệu là dịch cô A;
- (iv) hòa tan dịch cô A với nước cất theo tỷ lệ dịch cô A/nước cất là 1/6;
- (v) chiết dịch nước này được chiết lần lượt bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần là *n*-hexan (3 lần), diclometan (3 lần) và giữ lại phần dịch nước sau khi chiết;
- (vi) các dịch chiết *n*-hexan và diclometan được cô kiệt dưới áp suất giảm ở 40°C thu được các phần chiết tương ứng là phần chiết *n*-hexan, ký hiệu là phần chiết KC-H và phần chiết diclometan, ký hiệu là phần chiết KC-D;

- (vii) tiến hành chạy phân tách sắc ký phần chiết KC-D trên cột thuỷ tinh có đường kính cột $\Phi = 50$ mm, chiều dài cột $L = 250$ mm, được nhồi silica gel; rửa giải bằng hệ dung môi diclometan/metanol theo các tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 5/1, 1/1, 1/100 (thể tích/thể tích), thu được các phân đoạn gộp theo thể tích của hệ dung môi rửa giải tương ứng; kiểm tra quá trình phân tách sắc ký cột bằng phân tích trên sắc ký lớp mỏng, cất loại dung môi thu được 8 phân đoạn dịch chiết nhỏ ký hiệu lần lượt từ KC-D1 đến KC-D8;
- (viii) tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn KC-D5 trên cột thuỷ tinh có đường kính cột $\Phi = 15$ mm, chiều dài cột $L = 350$ mm, sử dụng nhựa sephadex LH-20, rửa giải bằng hệ dung môi metanol/nước theo tỷ lệ thể tích là 1/1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất kasuracin A thô;
- (ix) tinh chế hợp chất kasuracin A thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi cloroform/metanol theo tỷ lệ thể tích là 10:1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất kasuracin A có công thức **1** tinh khiết dưới dạng tinh thể màu trắng;
- (x) tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn KC-D6 trên cột thuỷ tinh có đường kính cột $\Phi = 15$ mm, chiều dài cột $L = 350$ mm, chất hấp phụ silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan/diclometan/metanol theo tỷ lệ thể tích là 1/3/1 (thể tích/thể tích/thể tích), thu được hợp chất angeloyl-binankadsurin A thô;
- (xi) tinh chế hợp chất angeloyl-binankadsurin A thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi cloroform/metanol theo tỷ lệ thể tích là 1:1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất angeloyl-binankadsurin A có công thức **2** tinh khiết dưới dạng tinh thể lỏng trắng không màu;
- (xii) tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn KC-D7 trên cột thuỷ tinh có đường kính cột $\Phi = 15$ mm, chiều dài cột $L = 350$ mm, chất hấp phụ YMC RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi axeton/nước theo tỷ lệ thể tích là 1/1,8 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất interiotherin C thô;
- (xiii) tinh chế hợp chất interiotherin C thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi metanol thu được hợp chất interiotherin C có công thức **3** tinh khiết dưới dạng hình kim không màu.

**Hình 1. Kiểu cấu trúc khung dibenzocyclooctadien lignan (a)
và một số nhóm thế có thể gắn trên khung này (b)**



a) Kiểu cấu trúc khung dibenzocyclooctadien lignan



b) Các nhóm thế trên khung dibenzocyclooctadien lignan

Hình 2. Sơ đồ chiết tách hợp chất ba hợp chất dibenzocyclooctadien lignan kasuracin A (1), angeloyl-binankadsurin A (2) và interiotherin C (3) từ lá cây Na rừng (*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith)

