



(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)



1-0036649

(51)^{2019.01} C07D 307/00; C07D 307/77; A61K
31/343; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2020-01112

(22) 27/02/2020

(45) 25/08/2023 425

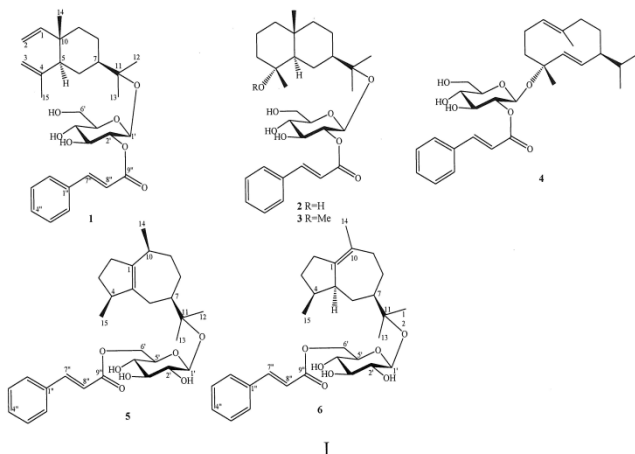
(43) 27/07/2020 388ASC

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

(72) Nguyễn Xuân Nhiệm (VN); Châu Văn Minh (VN); Bùi Hữu Tài (VN); Phan Văn Kiệm (VN); Nguyễn Thị Bích Thu (VN); Trần Minh Ngọc (VN); Ngô Sỹ Thịnh (VN).

(54) HỢP CHẤT SESQUITERPEN GLUCOSIT CÓ TÁC DỤNG GÂY ĐỘC TẾ BÀO
UNG THƯ VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI CÁCH
THUR TÁI FISSISTIGMA PALLENS

(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất sesquiterpen glucosit có công thức (I):



I

và phương pháp phân lập các hợp chất này từ cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*), thu hái ở Quế Phong, Nghệ An. Các hợp chất sesquiterpen glucosit có tác dụng gây độc tế bào ung thư người. Các hợp chất sesquiterpen glucosit và phương pháp phân lập các 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 điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên có hoạt tính sinh học gây độc tế bào ung thư nhằm nghiên cứu ứng dụng chống lại bệnh ung thư. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các hợp chất sesquiterpen glucosit có cấu trúc hóa học mới và phương pháp chiết các hợp chất này từ Cách thư tái *Fissistigma pallens* (Fin. & Gagn.) Merr. ở Việt Nam.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc nghiên cứu các hợp chất thiên nhiên theo định hướng hoạt tính sinh học có đặc biệt có ý nghĩa trong việc phát hiện và phát triển các loại dược liệu mới. Trong những hoạt tính sinh học được nghiên cứu ở thực vật, hoạt tính gây độc tế bào đã và đang được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu. Các hợp chất thiên nhiên và các hợp chất dẫn xuất có cấu trúc liên quan vẫn chiếm 50% số lượng thuốc đang được sử dụng trong hoá trị ung thư. Tiêu biểu trong số đó là các loài: cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*), cây thông đỏ (*Taxus brevifolia*), cây hạnh phúc (*Camptotheca accuminata*), loài (*Cephalotaxus harringtoni*)...

Các loài thuộc chi *Fissistigma* (họ Na Annonaceae) được rất nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm. Trên thế giới, chi *Fissistigma* có 65 loài phân bố chủ yếu ở các khu vực từ miền Đông Ấn Độ đến khu vực Đông Bắc Australia. Còn theo Nguyễn Tiến Bản (xem Thực vật chí Việt Nam, tập 1, (2000), 192-227), chi *Fissistigma* tại Việt Nam hiện có 23 loài một số loài trong chi này là những cây quen thuộc, mọc hoang ở nhiều địa phương, cũng được sử dụng làm thuốc chữa bệnh.

Hiện nay, có một số alkaloit được phân lập từ loài Cách thư tái (*Fissistigma pallens*) cho thấy tác dụng kháng viêm và tác dụng chống ung thư (xem tài liệu Natural Products Communications, 8, 663-665). Bên cạnh đó, *F. pallens* hoạt tính kháng vi sinh vật khá mạnh đối với vi khuẩn *E. coli* và *B. subtilis*. Tuy nhiên ở Việt Nam chỉ mới có một vài nghiên cứu về thành phần hóa học và dược học về loài *Fissistigma pallens*

Trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens* (Fin. & Gagnep.) Merr)), Họ Na (Annonaceae)”, tập thể tác giả sáng chế đã đi sâu nghiên cứu thành phần hóa học của

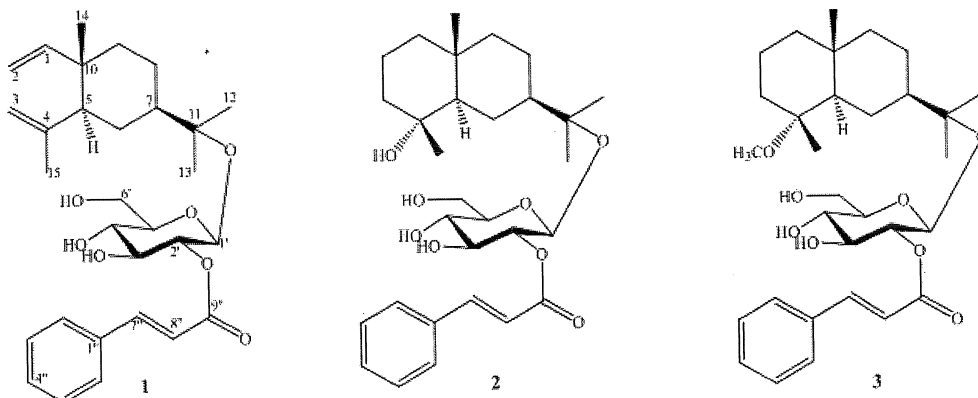
Cách thư tái (*Fissistigma pallens*) và đã phân lập được các hợp chất có cấu trúc hóa học mới là elemol 11-*O*-(2-(*E*)-cinnamoyl)- β -D-glucopyranosit (fissispallin A), 4 α -hydroxyeudesman 11-*O*-(2-(*E*)-cinnamoyl)- β -D-glucopyranosit (fissispallin B), 4 α -metoxyeudesman 11-*O*-(2-(*E*)-cinnamoyl)- β -D-glucopyranosit (fissispallin C), germacra-1(10),5-dien-4-*O*-(2-(*E*)-cinnamoyl)- β -D-glucopyranosit (fissispallin D), guai-1(5)-en-11-*O*-(6-(*E*)-cinnamoyl)- β -D-glucopyranosit (fissispallin E), bulnesol-11-*O*-(6-(*E*)-cinnamoyl)- β -D-glucopyranosit (fissispallin F).

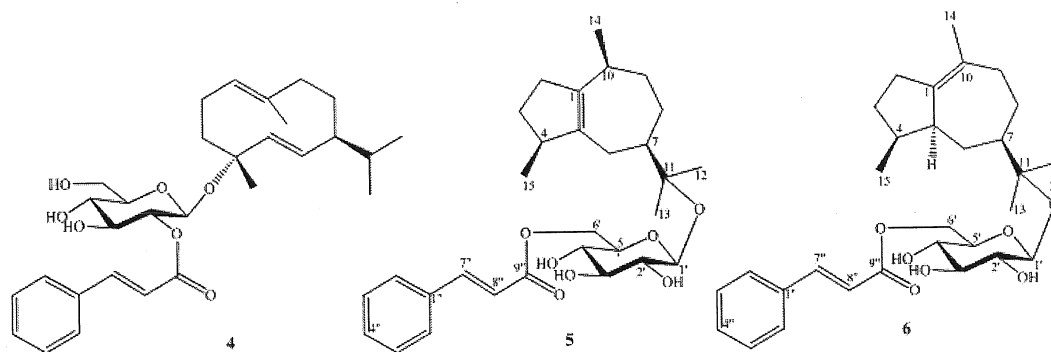
Nhóm hợp chất này có dạng khung sesquiterpen. Đây là một phát hiện hoàn toàn mới, các hợp chất fissispallin A-F chưa được phát hiện từ trước đến nay trên thế giới. Tất cả các hợp chất này đã được đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư. Trong đó, hợp chất fissispallin A thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư tốt nhất đối với ba dòng tế bào ung thư: ung thư đại tràng người (HT-29), ung thư sắc tố da người (A-2058), ung thư phổi người (A-549) ($IC_{50} < 1,5 \mu M$). Các hợp chất fissispallin B, C, D cũng cho thấy tác dụng gây độc tế bào ung thư trên ba dòng tế bào với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng 0,4 đến 7,2 μM . Bên cạnh đó, phương pháp phân lập các hợp chất sesquiterpen glucosit từ cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*) theo sáng chế là dễ thực hiện và cho độ tinh khiết cao, có thể phát triển thực hiện để tạo sản phẩm có tính ứng dụng trong điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên có hoạt tính sinh học gây độc tế bào ung thư nhằm nghiên cứu ứng dụng chống lại bệnh ung thư.

Để đạt được mục đích trên đây, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các hợp chất sesquiterpen glucosit phân lập từ cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*), có công thức (I):





I

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các hợp chất sesquiterpen glucosit bao gồm fissispallin A có công thức (1); fissispallin B có công thức (2); fissispallin C có công thức (3); fissispallin D có công thức (4); fissispallin E có công thức (5); fissispallin F có công thức (6). Các hợp chất sesquiterpen glucosit theo sáng chế thể hiện tác dụng gây độc tế bào ung thư có thể sử dụng để phát triển các sản phẩm điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Một khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất phương pháp phân lập các hợp chất sesquiterpen glucosit có công thức (I) từ cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*). Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập các hợp chất sesquiterpen glucosit trên đây bao gồm các bước:

(i) mẫu lá cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*) được phơi khô rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được chiết siêu âm metanol (2 lần x 10L) ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 4 giờ.

(ii) gộp các dịch chiết trong metanol thu được ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được 400mg cặn chiết metanol.

(iii) cặn chiết này sau đó được phân bố đều trong H₂O (2,5 L) và chiết lần lượt với *n*-hexan, chloroform, và etyl axetat (EtOAc); cất loại bỏ dung môi được các cặn chiết tương ứng *n*-hexan (FP1, 14,0 g), chloroform (FP2, 72,0 g), EtOAc (FP3, 9,0 g) và H₂O (FP4 305,0 g).

(iv) Phân đoạn FP2 được phân tách trên cột sắc ký silica gel và với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/axeton (100/1, 40/1, 20/1, 10/1, 5/1, 2.5/1, 1/1, v/v) thu được 5 phân đoạn nhỏ hơn FP2A (3,0 g), FP2B (7,0 g), FP2C (4,5 g), FP2D (4,1 g), FP2E (5,0 g), và FP2F (7,5 g).

(v) Phân đoạn FP2F được phân tách tiếp trên cột sắc ký silica gel CC, rửa giải với hệ dung môi chloroform/MeOH (10/1/, v/v) thu được 4 phân đoạn FP2F1 (0,8 g), FP2F2 (3,5 g), FP2F3 (0,7 g), và FP2F4 (0,6 g).

(vi) Phân đoạn FP2F2 phân tách tiếp trên cột sắc ký RP-18 CC với hệ dung môi rửa giải chloroform/MeOH (10/1/, v/v) thu được 3 phân đoạn FP2F2A (0,4 g), FP2F2B (0,2 g), và FP2F2C (0,6 g).

(vii) Phân đoạn FP2F2A phân tách tiếp trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm, tốc độ dòng 4 mL/phút, pha động 80 % axetonitril, thu được hợp chất **2** (8,0 mg) và **3** (13,0 mg).

(viii) Hợp chất **1** (16,0 mg), và **4** (33,0 mg) được phân lập từ phân đoạn FP2F2B, bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm tốc độ dòng 4 mL/phút, pha động 80 % axetonitril.

(ix) Tiếp tục tiến hành sắc ký phân đoạn FP2F2C sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm tốc độ dòng 4 mL/phút, pha động 80 % axetonitril trong nước thu được hợp chất **5** (29,0 mg), **6** (23,0 mg).

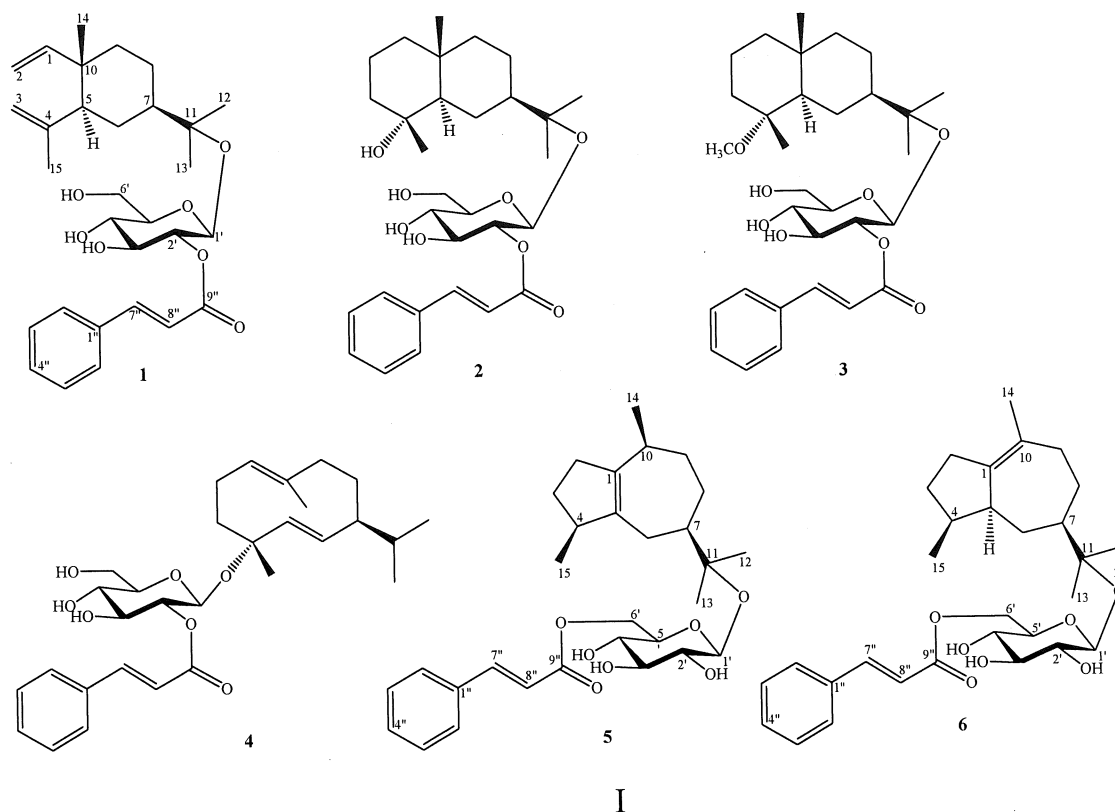
Mô tả chi tiết sáng chế

Mẫu cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*) được thu tại Quê Phong, Nghệ An tháng 4 năm 2016. Tên khoa học được giám định bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Mẫu tiêu bản (NCCT-P14) được lưu giữ tại phòng Nghiên cứu cấu trúc, Viện Hóa sinh biển. Mẫu lá cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*) (50 kg) được phơi khô rồi nghiền thành bột, sau đó bột này (5,0 kg) được chiết ngâm bằng siêu âm 2 lần, mỗi lần 4 giờ, với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C sau đó tiến hành chiết xuất, phân lập, và xác định cấu trúc hóa học theo các phương pháp mô tả dưới đây:

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Agilent 400 MHz hoặc 800 MHz. Xử lý số liệu bằng phần mềm MestReNova ver. 9.0.1. Phổ khối lượng phân giải cao được đo trên máy Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS. Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Agilent 1200 HPLC, sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm. Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel hoặc pha đảo. Silica gel có cỡ hạt là 40-63 μ m (230-400 mesh, Merck). Pha đảo RP-18 (30 - 50 μ m, Fuji silysia Chemical Ltd). Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn (loại DC-Alufolien 60 F254 (Merck 0,25 mm) hoặc RP18 F254s (0,25 mm Merck)).

Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254nm và 365nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các hợp chất sesquiterpen glucosit có công thức (I):



Các hợp chất sesquiterpen glucosit này là các hợp chất có cấu trúc hóa học mới.

Các thông số hóa lý của các hợp chất này như sau:

Hợp chất fissispallin A có công thức (1)

+ Công thức phân tử: $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_7$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 514$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22} -300,0$ (c 1,0 MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 537,2822 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Na}]^+$, 537,2823;

Hợp chất fissispallin B có công thức (2)

+ Công thức phân tử: $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_8$;

Khối lượng phân tử: $M = 532$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ -170,0 (c 1,0 MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 555,2934 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{44}O_8Na]^+$, 537,2823;

Hợp chất fissispallin C có công thức (3)

+ Công thức phân tử: $C_{31}H_{46}O_8$;

Khối lượng phân tử: $M = 546$;

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ -240,0 (c 1,0 MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 569,3085 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{31}H_{46}O_8Na]^+$, 569,3084;

Hợp chất fissispallin D có công thức (4)

+ Công thức phân tử: $C_{30}H_{42}O_7$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 514$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ +340,0 (c 1,0 MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 537,2824 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{42}O_7Na]^+$, 537,2823;

Hợp chất fissispallin E có công thức (5)

+ Công thức phân tử: $C_{30}H_{42}O_7$;

Khối lượng phân tử: $M = 514$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ -15,0 (c 1,0 MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 537,2814 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{42}O_7Na]^+$, 537,2823;

Hợp chất fissispallin F có công thức (6)

+ Công thức phân tử: $C_{30}H_{42}O_7$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 514$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22} +70,0$ (c 1,0 MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 537,2814 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{42}O_7Na]^+$, 537,2823;

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập các hợp chất sesquiterpen glucosit có công thức (I) từ cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*) gồm các bước sau:

(i) mẫu lá cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*) được phơi khô rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được chiết siêu âm metanol (2 lần x 10L) ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 4 giờ.

(ii) gộp các dịch chiết trong metanol thu được ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được 400mg cặn chiết metanol.

(iii) cặn chiết này sau đó được phân bố đều trong H_2O (2,5 L) và chiết lần lượt với *n*-hexan, chloroform, và etyl axetat (EtOAc); cất loại dung môi được các cặn chiết tương ứng *n*-hexan (FP1, 14,0 g), chloroform (FP2, 72,0 g), EtOAc (FP3, 9,0 g) và H_2O (FP4 305,0 g).

(iv) Cặn chiết FP2 được phân tách trên cột sắc ký silica gel và với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/axeton (100/1, 40/1, 20/1, 10/1, 5/1, 2.5/1, 1/1, v/v) thu được 5 phân đoạn nhỏ hơn FP2A (3,0 g), FP2B (7,0 g), FP2C (4,5 g), FP2D (4,1 g), FP2E (5,0 g), và FP2F (7,5 g).

(v) Phân đoạn FP2F được phân tách tiếp trên cột sắc ký silica gel CC, rửa giải với hệ dung môi chloroform/MeOH (10/1/, v/v) thu được 4 phân đoạn FP2F1 (0,8 g), FP2F2 (3,5 g), FP2F3 (0,7 g), và FP2F4 (0,6 g).

(vi) Phân đoạn FP2F2 phân tách tiếp trên cột sắc ký RP-18 CC với hệ dung môi rửa giải chloroform/MeOH (10/1/, v/v) thu được 3 phân đoạn FP2F2A (0,4 g), FP2F2B (0,2 g), và FP2F2C (0,6 g).

(vii) Phân đoạn FP2F2A phân tách tiếp trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm, tốc độ dòng 4 mL/phút, pha động 80 % axetonitril, thu được hợp chất **2** (8,0 mg) và **3** (13,0 mg).

(viii) Hợp chất **1** (16,0 mg), và **4** (33,0 mg) được phân lập từ phân đoạn FP2F2B, bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm tốc độ dòng 4 mL/phút, pha động 80 % axetonitril.

(ix) Tiếp tục tiến hành sắc ký phân đoạn FP2F2C sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm tốc độ dòng 4 mL/phút, pha động 80 % axetonitril trong nước thu được hợp chất **5** (29,0 mg), **6** (23,0 mg).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập các hợp chất fissispallin A-F từ cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*).

(i) mẫu lá cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*) được phơi khô rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được chiết siêu âm metanol (2 lần $\times$ 10L) ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 4 giờ.

(ii) gộp các dịch chiết trong metanol thu được ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được 400mg cặn chiết metanol.

(iii) cặn chiết này sau đó được phân bố đều trong H₂O (2,5 L) và chiết lần lượt với *n*-hexan, chloroform, và etyl axetat (EtOAc); cất loại dung môi được các cặn chiết tương ứng *n*-hexan (FP1, 14,0 g), chloroform (FP2, 72,0 g), EtOAc (FP3, 9,0 g) và H₂O (FP4 305,0 g).

(iv) cặn chiết FP2 được phân tách trên cột sắc ký silica gel và với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/axeton (100/1, 40/1, 20/1, 10/1, 5/1, 2,5/1, 1/1, v/v) thu được 5 phân đoạn nhỏ hơn FP2A (3,0 g), FP2B (7,0 g), FP2C (4,5 g), FP2D (4,1 g), FP2E (5,0 g), và FP2F (7,5 g).

(v) Phân đoạn FP2F được phân tách tiếp trên cột sắc ký silica gel CC, rửa giải với hệ dung môi chloroform/MeOH (10/1, v/v) thu được 4 phân đoạn FP2F1 (0,8 g), FP2F2 (3,5 g), FP2F3 (0,7 g), và FP2F4 (0,6 g).

(vi) Phân đoạn FP2F2 phân tách tiếp trên cột sắc ký RP-18 CC với hệ dung môi rửa giải chloroform/MeOH (10/1, v/v) thu được 3 phân đoạn FP2F2A (0,4 g), FP2F2B (0,2 g), và FP2F2C (0,6 g).

(vii) Phân đoạn FP2F2A phân tách tiếp trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm, tốc độ dòng 4 mL/phút, pha động 80 % axetonitril, thu được hợp chất **2** (8,0 mg) và **3** (13,0 mg).

(viii) Hợp chất **1** (16,0 mg), và **4** (33,0 mg) được phân lập từ phân đoạn FP2F2B, bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm tốc độ dòng 4 mL/phút, pha động 80 % axetonitril.

(ix) Tiếp tục tiến hành sắc ký phân đoạn FP2F2C sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm tốc độ dòng 4 mL/phút, pha động 80 % axetonitril trong nước thu được hợp chất **5** (29,0 mg), **6** (23,0 mg).

Hợp chất fissispallin A có công thức (1)

+ Công thức phân tử: $C_{30}H_{42}O_7$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 514$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ -300,0 (c 1,0 MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 537,2822 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{42}O_7Na]^+$, 537,2823;

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

Bảng 1. Số liệu phổ 1H - NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất fissispallin A

C	δ_C^a	δ_H^a (mult., $J = \text{Hz}$)
Aglycone		
1	150,2	5,72 (dd, 11,2, 17,2)
2	110,0	4,78 (d, 17,2) 4,80 (d, 11,2)
3	112,0	4,47 (s)/4,69 (s)
4	147,7	-
5	52,5	1,86 (dd, 3,2, 12,8)
6	27,9	1,29 (m, β) 1,56 (m, α)
7	48,1	1,38 (m)
8	22,5	1,54 (m)
9	39,9	1,32 (m)
10	39,7	-
11	80,4	-
12	22,6	1,12 (s)
13	25,1	1,17 (s)

14	16,6	0,87 (s)
15	24,6	1,59 (s)
4-OMe		
11-OGlc		
1'	95,2	4,68 (d, 8,0)
2'	74,2	4,88 (t, 8,0)
3'	75,6	3,68 (dd, 8,0, 8,8)
4'	70,8	3,66 (dd, 8,0, 8,8)
5'	75,1	3,35 (m)
6'	62,2	3,83 (m)
Cin		
1''	134,2	-
2'', 6''	128,2	7,45 (d, 8,0)
3'', 5''	128,8	7,33 (t, 8,0)
4''	130,4	7,34 (t, 8,0)
7''	145,9	7,66 (d, 16,0)
8''	117,4	6,39 (d, 16,0)
9''	166,6	-

^{a)}Đo trong CDCl₃, ^{b)}800 MHz, Glc, glucopyranosyl; Cin, cinnamoyl

Hợp chất fissispallin B có công thức (2)

+ Công thức phân tử: C₃₀H₄₄O₈;

Khối lượng phân tử: M = 532;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ -170,0 (*c* 1,0 MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại *m/z* 555,2934 [M+Na]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₃₀H₄₄O₈Na]⁺, 537,2823;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Số liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của hợp chất fissispallin B

C	δ _C ^{a)}	δ _H ^{b)} (mult., <i>J</i> = Hz)
Aglycone		
1	40,8	1,04 (ddd, 4,0, 12,8, 12,8, α) 1,29 (dt, 4,0, 4,0, 12,8, β)
2	20,0	1,39 (m, β) 1,49 (m, α)
3	42,3	1,38 (m, β) 1,70 (br d, 12,8, α)
4	72,9	-
5	53,8	1,18 (dd, 2,4, 12,0)
6	20,8	0,86 (dd, 12,0, 12,4, β) 2,13 (br d, 12,4, α)
7	48,1	1,51 (m)

8	23,7	1,11 (ddd, 4,0, 12,8, 12,8, β) 1,37 (m, α)
9	44,7	1,14 (m, α) 1,34 (m, β)
10	34,5	-
11	81,1	-
12	22,0	1,03 (s)
13	25,4	1,16 (s)
14	18,7	0,76 (s)
15	22,9	1,06 (s)
4-OMe		
11-OGlc		
1'	95,0	4,65 (d, 7,8)
2'	74,5	4,91 (dd, 7,8, 9,3)
3'	75,6	3,68 (dd, 8,8, 9,3)
4'	70,7	3,60 (dd, 8,8, 8,8)
5'	76,4	3,37 (m)
6'	61,7	3,78 (dd, 5,6, 12,4) 3,89 (dd, 2,4, 12,4)
Cin		
1''	134,2	-
2'', 6''	128,2	7,48 (d, 8,0)
3'', 5''	128,9	7,35 (d, 8,0)
4''	130,4	7,36 (t, 8,0)
7''	146,0	7,71 (d, 16,0)
8''	117,5	6,44 (d, 16,0)
9''	166,0	-

^{a)} đo trong CDCl₃, ^{b)} 800 MHz, Glc, glucopyranosyl; Cin, cinnamoyl

Hợp chất fissispallin C có công thức (3)

+ Công thức phân tử: C₃₁H₄₆O₈;

Khối lượng phân tử: M = 546;

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ -240,0 (c 1,0 MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 569,3085 [M+Na]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₃₁H₄₆O₈Na]⁺, 569,3084;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Số liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của hợp chất fissispallin C

C	δ_C ^{a)}	δ_H ^{b)} (mult., J = Hz)
Aglycone		
1	40,6	1,03 (ddd, 4,0, 12,8, 12,8, α) 1,31 (ddd, 2,4, 4,0, 12,8, β)
2	19,5	1,38 (m, β) 1,52 (m, α)

3	37,5	1,19 (d, 4,0, 12,8, 13,6, β) 1,91 (dt, 4,0, 4,0, 12,8, α)
4	76,9	-
5	52,8	1,17 (m)
6	20,8	0,88 (ddd, 8,8, 12,0, 12,8, β) 2,20 (br d, 12,8, α)
7	47,1	1,52 (m)
8	23,5	1,13 (m, β) 1,38 (m, α)
9	45,0	1,17 (m, α) 1,35 (dt, 3,2, 12,0, β)
10	34,4	-
11	81,1	-
12	22,5	1,05 (s)
13	25,5	1,16 (s)
14	19,2	0,82 (s)
15	16,3	1,00 (s)
4-OMe	47,8	3,16 (s)
11-OGlc		
1'	94,8	4,65 (d, 8,0)
2'	74,7	4,89 (dd, 8,0, 8,8)
3'	76,2	3,63 (t, 8,8)
4'	71,7	3,45 (dd, 7,2, 8,8)
5'	76,5	3,38 (m)
6'	62,6	3,66 (dd, 7,2, 12,0) 3,91 (br d, 12,0)
Cin		
1''	134,2	-
2'', 6''	128,2	7,49 (d, 8,0)
3'', 5''	128,9	7,37 (t, 8,0)
4''	130,5	7,38 (t, 8,0)
7''	146,1	7,72 (d, 16,0)
8''	117,3	6,43 (d, 16,0)
9''	166,8	-

^{a)} đo trong CDCl₃, ^{b)} 800 MHz, Glc, glucopyranosyl; Cin, cinnamoyl

Hợp chất fisispallin D có công thức (4)

+ Công thức phân tử: C₃₀H₄₂O₇;

+ Khối lượng phân tử: M = 514;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ +340,0 (c 1,0 MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 537,2824 [M+Na]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₃₀H₄₂O₇Na]⁺, 537,2823;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4. Số liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất fissispallin D

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a)}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b)}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
Aglycone		
1	129,2	4,74 (br d, 11,8)
2	24,0	1,92 (m, α) 2,17 (m, β)
3	34,3	1,48 (dt, 4,0, 13,4, β) 1,67 (dt, 3,8, 13,4, α)
4	81,4	-
5	137,9	4,97 (d, 16,0)
6	134,1	5,10 (dd, 9,8, 16,0)
7	53,6	1,90 (m)
8	26,6	1,37 (m)
9	41,2	2,12 (m)
10	131,8	-
11	32,7	1,44 (m)
12	19,3	0,81 (d, 6,8)
13	21,2	0,88 (d, 6,6)
14	16,6	1,41 (s)
15	20,8	1,31 (s)
11-OGlc		
1'	95,6	4,56 (d, 8,0)
2'	74,0	4,85 (dd, 8,0, 9,6)
3'	75,5	3,56 (t, 9,6)
4'	70,3	3,65 (t, 9,6)
5'	75,4	3,24 (dt, 3,6, 9,6)
6'	61,0	3,82 (m)
Cin		
1''	134,3	-
2'', 6''	128,1	7,52 (d, 8,0)
3'', 5''	128,9	7,38 (t, 8,0)
4''	130,4	7,38 (t, 8,0)
7''	145,6	7,71 (d, 16,0)
8''	117,7	6,44 (d, 16,0)
9''	166,4	-

^{a)} đo trong CDCl_3 ^{b)} 800 MHz, Glc, glucopyranosyl; Cin, cinnamoyl

Hợp chất fissispallin E có công thức (5)

+ Công thức phân tử: $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_7$;

Khối lượng phân tử: $M = 514$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -15,0$ (c 1,0 MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 537,2814 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Na}]^+$, 537,2823;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5. Số liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất fissispallin E

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a)}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b)}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
Aglycone		
1	139,7	-
2	35,4	2,05 (m, α) 2,38 (m, β)
3	30,8	1,22 (m, β) 1,91 (m, α)
4	46,2	2,50 (m)
5	139,0	-
6	27,7	1,84 (dd, 13,5, 13,5, β) 2,15 (br d, 13,5, α)
7	47,4	1,72 (m)
8	27,1	1,38 (m, β)/1,76 (m, α)
9	33,7	1,65(m, β)/1,51(m, α)
10	33,6	2,24 (m)
11	81,3	-
12	24,9	1,15 (s)
13	24,4	1,18 (s)
14	19,7	0,93 (d, 7,2)
15	20,0	0,90 (d, 7,2)
11-OGlc		
1'	96,9	4,45 (d, 8,0)
2'	73,7	3,37 (dd, 8,0, 8,8)
3'	76,4	3,58 (dd, 8,8, 9,2)
4'	70,4	3,42 (dd, 8,8, 9,2)
5'	73,7	3,47 (m)
6'	63,9	4,40 (m)
Cin		
1''	134,3	-
2'', 6''	128,1	7,48 (d, 8,0)
3'', 5''	128,8	7,34 (t, 8,0)
4''	130,3	7,34 (t, 8,0)
7''	145,4	7,66 (d, 16,0)
8''	117,6	6,41 (d, 16,0)
9''	167,3	-

^{a)}đo trong CDCl_3 , ^{b)}800 MHz, Glc, glucopyranosyl; Cin, cinnamoyl

Hợp chất fissispallin F có công thức (6)

+ Công thức phân tử: $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_7$;

+Khối lượng phân tử: $M = 514$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +70,0$ (c 1,0 MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 537,2814 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{42}O_7Na]^+$, 537,2823;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 6. Số liệu phổ 1H - NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất fissispallin F

	δ_C^a	δ_H^b (mult., $J = \text{Hz}$)
Aglycone		
1	141,9	-
2	30,4	2,09 (m, α) 2,25 (m, β)
3	33,0	1,28 (m, β) 1,58 (m, α)
4	38,9	2,04 (m)
5	46,1	2,36 (m)
6	28,5	0,69 (dd, 11,6, 12,0, β) 1,91 (br d, 12,0, α)
7	52,2	1,60 (m)
8	28,0	0,98 (m, α)/1,80 (m, β)
9	35,1	2,00 (m, α)/2,09 (m, β)
10	128,4	-
11	81,6	-
12	24,6	1,19 (s)
13	23,6	1,12 (s)
14	22,3	1,57 (s)
15	15,4	0,85 (d, 6,8)
11-OGlc		
1'	96,9	4,47 (d, 8,0)
2'	73,7	3,38 (dd, 8,0, 8,8)
3'	76,4	3,60 (dd, 8,0, 8,8)
4'	70,4	3,42 (dd, 8,0, 8,8)
5'	73,8	3,52 (m)
6'	64,1	4,40 (dd, 6,0, 12,0) 4,46 (br d, 12,0)
Cin		
1''	134,2	-
2'', 6''	128,1	7,47 (d, 8,0)
3'', 5''	128,8	7,35 (t, 8,0)
4''	130,3	7,35 (t, 8,0)
7''	145,5	7,66 (d, 16,0)
8''	117,5	6,41 (d, 16,0)
9''	167,3	-

^{a)} đo trong $CDCl_3$, ^{b)} 800 MHz, Glc, glucopyranosyl; Cin, cinnamoyl

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

Các hợp chất sesquiterpen glucosit theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính gây độc tế bào ung thư như sau:

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất sẽ được xác định theo phương pháp MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazol brom). Ba dòng tế bào ung thư người sử dụng là ung thư đại tràng người (HT-29), ung thư sắc tố da người (A-2058), ung thư phổi người (A-549) được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 bổ sung 10% huyết thanh phôi bò (fetal bovine serum) và penicillin/streptomycin (tương ứng 100 U/mL và 100 mg/mL) ở 37 °C trong môi trường 5 % CO₂ được làm ẩm. Các tế bào phát triển theo cấp số nhân được sử dụng trong các thí nghiệm.

Phương pháp MTT được tiến hành như sau: Các dòng tế bào ung thư người ($1.5 \sim 2.5 \times 10^5$ cells/mL) được xử lý trong 2 ngày với các hợp chất ở nồng độ 50 μ M. Mitoxantrone (Sigma-Aldrich, USA; với độ tinh khiết, 97%) được sử dụng như là chất đối chứng dương và được thử nghiệm ở các nồng độ 1, 3, 10, và 20 μ M

Sau quá trình ủ, 0,1 mg (50 μ L của dung dịch 2 mg/mL) MTT (Sigma, Saint Louis, MO, USA) được bổ sung vào mỗi giếng và các tế bào sau đo tiếp tục được ủ ở 37°C trong 4 giờ. Các phiên được tiến hành ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng và sau đó môi trường được loại bỏ một cách cẩn thận. Sau đó, dimethylsunfoxit (150 μ L) được cho vào mỗi giếng để hòa tan các tinh thể formazan. Các phiên được đọc ngay sau đó ở bước sóng 540 nm trên thiết bị đọc vi phiên (Amersham Pharmacia Biotech., USA). Tất cả các thí nghiệm đều được tiến hành lặp lại 3 lần và giá trị trung bình được tính toán. Kết quả được biểu thị là phần trăm ức chế đã tạo ra sự giảm cường độ hấp phụ khi xử lý với các chất thử so sánh với đối chứng âm. Đường cong phụ thuộc nồng độ được xây dựng và nồng độ ức chế 50 % (IC₅₀) được xác định cho các mẫu thử cũng như cho từng dòng tế bào. Giá trị IC₅₀ được tính toán bằng Grapad Prism 8,0.

Kết quả được biểu thị trên bảng 7 dưới đây.

Bảng 7. Tác dụng ức chế sự phát triển tế bào ung thư của các hợp chất 1-6.

Hợp chất	IC ₅₀ ^{a)}		
	HT-29	A-2058	A-549
1	1,5±0,3	0,6±0,1	1,1±0,2
2	5,8±0,8	6,7±0,5	7,2±0,8
3	4,1±0,9	4,5±0,9	4,5±1,2
4	3,8±0,4	4,4±1,0	4,1±0,2
5	15,5±2,7	20,3±5,9	15,6±3,3
6	18,5±2,8	23,9±5,0	18,7±4,3
MX ^{b)}	8,7±0,8	10,3±1,1	7,8±0,9

^{a)} Nồng độ ức chế 50%.

^{b)} Mitoxantrone chất đối chứng

Hợp chất fissispallin A thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư tốt nhất đối với ba dòng tế bào ung thư: ung thư đại tràng người (HT-29), ung thư sắc tố da người (A-2058), ung thư phổi người (A-549) với giá trị $IC_{50} < 1,5 \mu M$. Các hợp chất fissispallin B, C, D cũng cho thấy tác dụng gây độc tế bào ung thư trên ba dòng tế bào với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng 0,4 đến 7,2 μM .

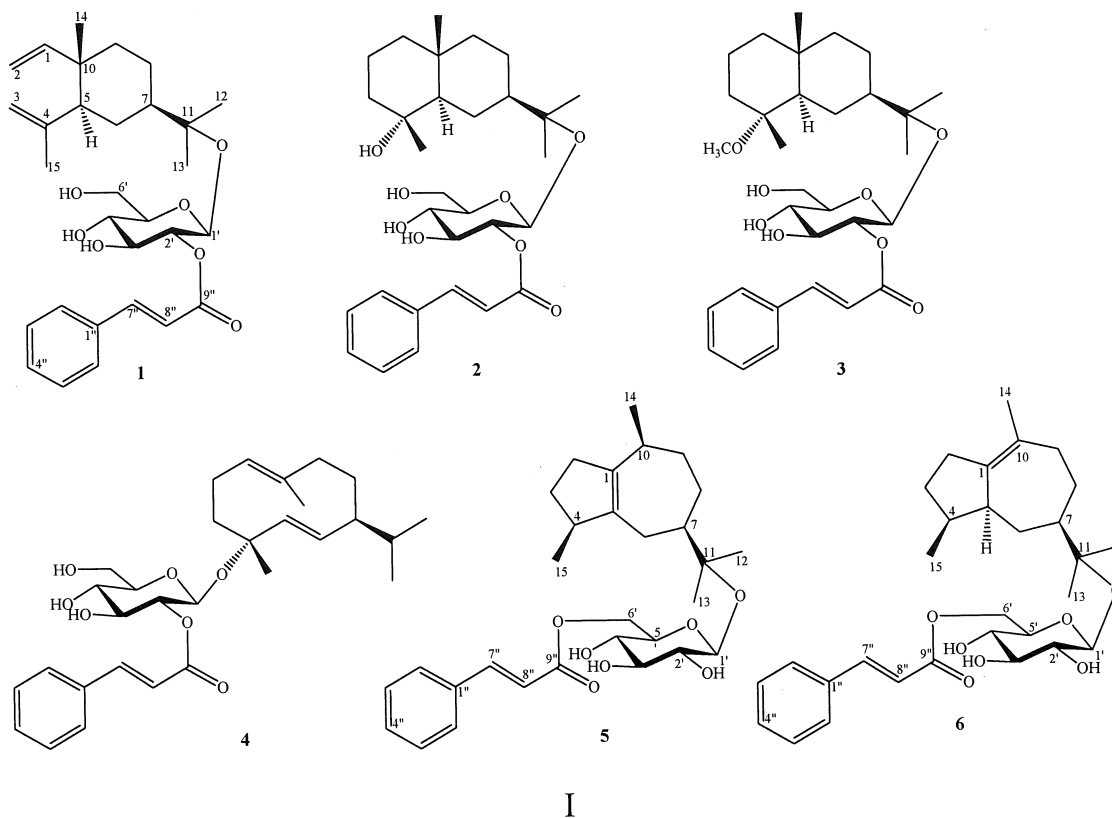
Kết quả này có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao, tạo cơ sở để nghiên cứu phát triển các dược phẩm mới có tác dụng điều trị/ hỗ trợ ung thư từ cây Cách thư tái.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập các hợp chất mới, fissispallin A-F từ cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*) thu hái Quế Phong, Nghệ An. Tất cả các hợp chất này đã được đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư. Hợp chất fissispallin A thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư đối với ba dòng tế bào ung thư: ung thư đại tràng người (HT-29), ung thư sắc tố da người (A-2058), ung thư phổi người (A-549) ($IC_{50} < 1,5 \mu M$). Các hợp chất fissispallin B, C, D cũng cho thấy tác dụng gây độc tế bào ung thư trên ba dòng tế bào với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng 0,4 đến 7,2 μM . Sáng chế này tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng phòng và điều trị bệnh ung thư dựa trên việc khai thác nguồn dược liệu quý, sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Các hợp chất fissispallin A-F có công thức (I):

2. Phương pháp chiết các hợp chất sesquiterpen glucosit có công thức (I) theo điểm 1 từ cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*), phương pháp này bao gồm các bước:

(i) mẫu lá cây Cách thư tái (*Fissistigma pallens*) được phơi khô rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được chiết siêu âm metanol (2 lần x 10L) ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 4 giờ;

(ii) gộp các dịch chiết trong metanol thu được ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được 400mg cặn chiết metanol;

(iii) cặn chiết này sau đó được phân bố đều trong H₂O (2,5 L) và chiết lần lượt với *n*-hexan, chloroform, và etyl axetat (EtOAc); cất loại dung môi được các cặn chiết tương ứng *n*-hexan (FP1, 14,0 g), chloroform (FP2, 72,0 g), EtOAc (FP3, 9,0 g) và H₂O (FP4 305,0 g);

(iv) cặn chiết FP2 được phân tách trên cột sắc ký silica gel và với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/axeton (100/1, 40/1, 20/1, 10/1, 5/1, 2,5/1, 1/1, v/v) thu được 5 phân đoạn nhỏ hơn FP2A (3,0 g), FP2B (7,0 g), FP2C (4,5 g), FP2D (4,1 g), FP2E (5,0 g), và FP2F (7,5 g);

(v) Phân đoạn FP2F được phân tách tiếp trên cột sắc ký silica gel CC, rửa giải với hệ dung môi chloroform/MeOH (10/1/, v/v) thu được 4 phân đoạn FP2F1 (0,8 g), FP2F2 (3,5 g), FP2F3 (0,7 g), và FP2F4 (0,6 g);

(vi) Phân đoạn FP2F2 phân tách tiếp trên cột sắc ký RP-18 CC với hệ dung môi rửa giải chloroform/MeOH (10/1/, v/v) thu được 3 phân đoạn FP2F2A (0,4 g), FP2F2B (0,2 g), và FP2F2C (0,6 g);

(vii) Phân đoạn FP2F2A phân tách tiếp trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm, tốc độ dòng 4 mL/phút, pha động 80 % axetonitril, thu được hợp chất **2** (8,0 mg) và **3** (13,0 mg);

(viii) Hợp chất **1** (16,0 mg), và **4** (33,0 mg) được phân lập từ phân đoạn FP2F2B, bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm tốc độ dòng 4 mL/phút, pha động 80 % axetonitril;

(ix) Tiếp tục tiến hành sắc ký phân đoạn FP2F2C sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột J'sphere, ODS H-80, 4 μ M, 250 $\times$ 20 mm tốc độ dòng 4 mL/phút, pha động 80 % axetonitril trong nước thu được hợp chất **5** (29,0 mg), **6** (23,0 mg).