



(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)



1-0037618

(51)^{2020.01} C07D 311/00; A61K 31/00; A61P 35/00 (13) B

(21) 1-2021-00734

(22) 09/02/2021

(45) 27/11/2023 428

(43) 26/07/2021 400

(73) 1. Trường Đại học Giao Thông Vận tải (VN)

Số 3 phố Cầu Giấy, phường Láng Thượng, quận Đống Đa, thành phố Hà Nội

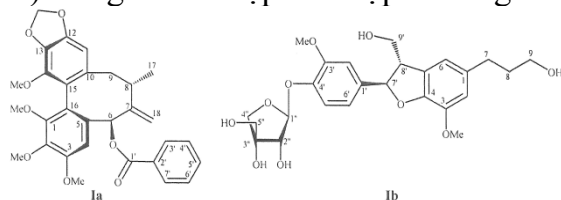
2. Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Số 18 đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Mai (VN); Phan Văn Kiệm (VN); Nguyễn Xuân Nhiệm (VN); Bùi Hữu Tài (VN); Nguyễn Thị Cúc (VN); Vũ Văn Đoán (VN); Trần Tuấn Anh (VN); Hoàng Thị Tuyết Lan (VN); Bùi Thị Mai Anh (VN); Bùi Quang Tuấn (VN); Vũ Thị Xuân (VN).

(54) HỢP CHẤT LIGNAN VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI NGŨ VỊ VẢY CHÒI SCHISANDRA PERULATA

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất lignan có công thức (Ia) và (Ib), sau đây:



và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata*. Các hợp chất lignan theo sáng chế có tác dụng ức chế sự phát triển tế bào ung thư. Các hợp chất lignan 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 tác dụng ức chế sự phát triển tế bào ung thư nhằm nghiên cứu ứng dụng chữa ung thư. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các hợp chất lignan và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài Ngũ vị vảy chồi *Schisandra perulata* Gagnep ở Việt Nam.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ung thư là một căn bệnh nan y đang giành được sự quan tâm của toàn thế giới, do cho tới nay các việc chữa trị vẫn còn gặp nhiều khó khăn và hiệu quả chưa cao. Theo các số liệu thống kê gần đây, tỷ lệ người mắc bệnh ung thư ngày càng gia tăng. Ở Mỹ và các nước phát triển khác, ung thư chiếm khoảng 25% trường hợp tử vong do mọi nguyên nhân. Chính vì vậy, bên cạnh việc đầu tư cho các chẩn đoán sớm các bệnh ung thư, việc tìm kiếm các phương pháp điều trị mới, các thuốc mới là vô cùng cần thiết, đặc biệt là các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên. Từ nhiều cây thuốc, các nhà khoa học đã tiến hành nghiên cứu và phát hiện được nhiều hợp chất có tác dụng trong điều trị ung thư như vinblastine và vincristine từ loài dừa cạn *Catharanthus roseus* G, paclitaxel từ loài *Taxus brevifolia* Nutt, Camptothecin từ loài hỷ thụ *Camptotheca acuminata*, Podophyllotoxin từ loài táo ma *Podophyllum peltatum* (xem Phytochemistry Letters 7 (2014) 173-181).

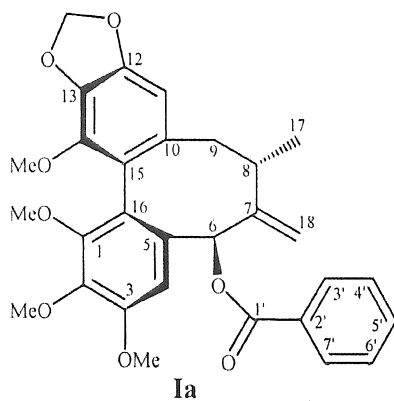
Schisandra là một chi thực vật có hoa trong họ Schisandraceae, thường là những cây dây leo lá sớm rụng có thể phát triển tốt trên nhiều loại đất và ưa thích các bờ tường nơi có nhiều bóng râm. Các loài cây này có nguồn gốc ở khu vực Châu Á, quả khô của chúng được dùng nhiều trong y học. Chi *Schisandra* được các nhà khoa học trên thế giới rất quan tâm, có đến 25 loài của chi đã được công bố về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học. Thành phần hóa học chính của chi này là các hợp chất lignan và triterpenoid, ngoài ra, còn chứa các thành phần khác như diterpenoid, flavonoid, ... Các hợp chất dibenzocyclooctadien là thành phần chính của lignan trong chi này. Sự có mặt của các hợp chất lignan và các tác dụng sinh học của chúng đã góp phần làm sáng tỏ công dụng trong dân gian của một số loài *Schisandra* được sử dụng bảo vệ gan, chống oxy hóa. Bên cạnh đó với cấu trúc hóa học tương đối đặc biệt, các hợp chất dibenzocyclooctadien còn thể hiện hoạt tính chống ung thư và kháng HIV rất tiềm năng (xem Phytochemistry

Reviews, 2017, 16, 195-218). Do vậy, việc điều tra, nghiên cứu về loài Ngũ vị vảy chồi *Schisandra perulata* (hay *S. perulata*), đặc biệt là phát hiện ra các hợp chất lignan mới từ loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata* sẽ có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

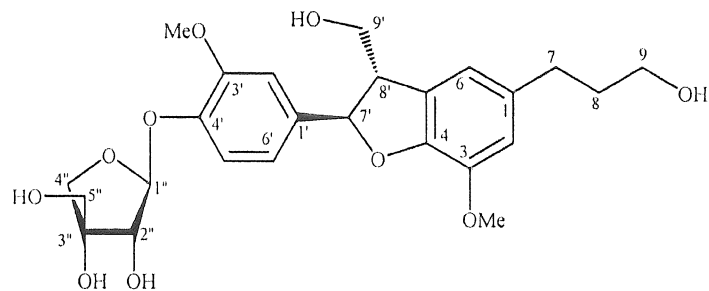
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các hợp chất lignan thể hiện tác dụng ức chế mạnh sự phát triển tế bào ung thư vòm họng (CAL27), ung thư vú (MDAMB231) và phương pháp phân lập các hợp chất lignan từ loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata* để 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.

Để đạt được mục đích trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất lignan: schisandrulata A và schisandrulata B có công thức (Ia) và (Ib) sau đây:



Ia
(schisandrulata A)



Ib
(schisandrulata B)

Theo một phương án, hợp chất (Ia) này là schisandrulata A.

Theo một phương án, hợp chất (Ib) này là schisandrulata B.

Các hợp chất lignan theo sáng chế thể hiện tác dụng ức chế mạnh sự phát triển tế bào ung thư vòm họng (CAL27) và ung thư vú (MDAMB231) có thể sử dụng để phát triển thành các sản phẩm điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp phân lập các hợp chất lignan: schisandrulata A và schisandrulata B trên đây từ loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata*, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn mẫu lá loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata*, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với rượu metylic 3 lần ở nhiệt độ 40°C, mỗi lần 60 phút;

- (ii) gom các dịch chiết ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô trong rượu metylic, được ký hiệu là dịch cô SP;
- (iii) phân bố đều dịch cô SP với nước cất rồi chiết phân bố với diclorometan và etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, sau đó tiến hành loại bỏ dung môi của dịch chiết diclorometan và etyl axetat dưới áp suất giảm thu được các dịch cô diclorometan (SP1), etyl axetat (SP2) và dịch chiết nước (SP3);
- (iv) tiến hành phân tách dịch cô SP1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/0 đến 1/1 thu được sáu phân đoạn, ký hiệu từ SP1A đến SP1F;
- (v) tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn SP1B trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji Silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 2/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SP1B1 đến SP1B3;
- (vi) hòa tan phân đoạn SP1B1 vào hỗn hợp dung môi *n*-hexan/axeton tỷ lệ 8/1 về thể tích và tiến hành phân tách trên sắc ký trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) tỷ lệ SP1B1/silica gel = 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/axeton (8/1, v/v), thu được bốn phân đoạn, ký hiệu từ SP1B1A đến SP1B1D;
- (vii) tách các hợp chất schisandrulata A và schisandrulata B, trong đó:
- tiến hành sắc ký phân đoạn SP1B1C trên hệ thống HPLC, dung môi axetonitril 33% trong nước, cho hợp chất schisandrulata A có công thức (Ia) dưới dạng bột vô định hình;
- (viii) tiến hành loại bỏ dung môi etyl axetat dịch chiết nước (SP3), sau đó đưa lên cột Diaion HP-20, loại bỏ đường bằng nước sau đó tăng dần nồng độ rượu metylic (MeOH) trong nước (25, 50, 75 và 100% MeOH) thu được 4 phân đoạn, ký hiệu là SP3A-SP3D;
- (ix) tiến hành phân tách phân đoạn SP3D trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ MeOH trong diclorometan (CH_2Cl_2) là $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ tỷ lệ 10/1 $\rightarrow$ 1/1 thu được bốn phân đoạn, ký hiệu từ SP3D1 đến SP3D4;

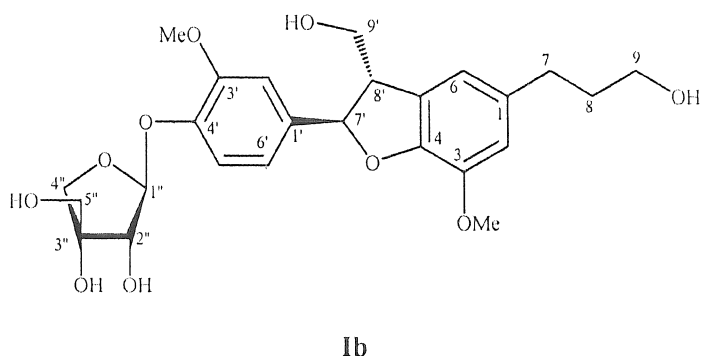
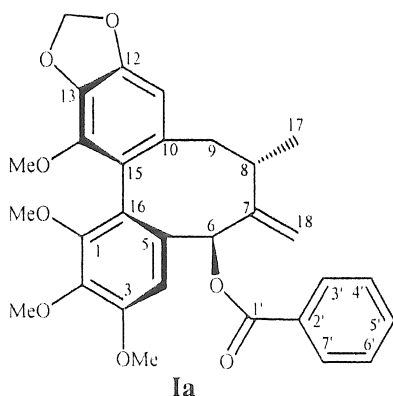
(x) tiến hành phân tách phân đoạn SP3D2 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 4/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SP3D2A đến SP3D2D;

- tiến hành sắc ký phân đoạn SP3D2A trên hệ thống HPLC, dung môi axetonitril 20% trong nước, cho hợp chất schisandrulata B có công thức (**Ib**) dưới dạng bột vô định hình;

Mô tả chi tiết sáng chế

Mẫu lá loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata* được thu tại Sapa, Lào Cai tháng 12 năm 2018. Tên khoa học được giám định bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Mẫu lá loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm 3 lần, mỗi lần 60 phút, với rượu metylic ở nhiệt độ 40°C sau đó tiến hành chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hóa học theo các phương pháp mô tả dưới đây: Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn (loại DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715) hoặc RP18 F254s (Merck)). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng từ từ đến khi hiện màu. Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel hoặc pha đảo. Silica gel có cỡ hạt là 40-63 μm (230-400 mesh, Merck). Pha đảo RP-18 (30 - 50 μm , Fuji silysia Chemical Ltd). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruker AM500 FT NMR. Phổ khối lượng phân giải cao được đo trên máy Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các hợp chất lignan có công thức (**Ia**) và (**Ib**) sau đây:



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

Hợp chất schisandrulata A có công thức (Ia):

+ Công thức phân tử: $C_{30}H_{30}O_8$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 518$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} +32,3^\circ$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 541,1819 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{30}O_8Na]^+$, 541,1838;

Hợp chất schisandrulata B có công thức (Ib):

+ Công thức phân tử: $C_{25}H_{32}O_{10}$;

Khối lượng phân tử: $M = 492$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} -45,0^\circ$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 515,1891 $[M + Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{25}H_{32}O_{10}Na]^+$, 515,1888;

Theo khía cạnh thứ khác, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập các hợp chất lignan trên đây từ lá loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata*, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) Mẫu lá loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với rượu metylic 3 lần ở nhiệt độ 40°C , mỗi lần 60 phút.

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

(iii) phân bố đều dịch cô SP với nước cất rồi chiết phân bố với diclorometan và etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, sau đó tiến hành loại bỏ dung môi của dịch chiết diclorometan và etyl axetat dưới áp suất giảm thu được các dịch cô diclorometan (SP1), etyl axetat (SP2) và dịch chiết nước (SP3).

(iv) tiến hành phân tách dịch cô SP1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/0 đến 1/1 thu được sáu phân đoạn, ký hiệu từ SP1A đến SP1F.

(v) tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn SP1B trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 2/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SP1B1 đến SP1B3.

(vi) tiến hành phân tách phân đoạn SP1B1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải *n*-hexan/axeton tỷ lệ 8/1 thu được bốn phân đoạn, ký hiệu từ SP1B1A đến SP1B1D.

(vii) tiến hành sắc ký phân đoạn SP1B1C trên hệ thống HPLC, dung môi axetonitril 33% trong nước, cho hợp chất schisandrulata A có công thức (Ia) dưới dạng bột vô định hình.

(viii) tiến hành loại bỏ dung môi etyl axetat dịch chiết nước (SP3), sau đó đưa lên cột Diaion HP-20, loại bỏ đường bằng nước sau đó tăng dần nồng độ rượu metylic (MeOH) trong nước (25, 50, 75 và 100% MeOH) thu được 4 phân đoạn, ký hiệu là SP3A-SP3D.

(xi) tiến hành phân tách phân đoạn SP3D trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ MeOH trong diclorometan (CH_2Cl_2) là $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ tỷ lệ 10/1 $\rightarrow$ 1/1 thu được bốn phân đoạn, ký hiệu từ SP3D1 đến SP3D4.

(x) tiến hành phân tách phân đoạn SP3D2 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 4/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SP3D2A đến SP3D2D. Phân đoạn SP3D2A được sắc ký trên hệ thống HPLC, dung môi axetonitril 20% trong nước, cho hợp chất schisandrulata B có công thức (Ib) dưới dạng bột vô định hình.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập các hợp chất lignan từ lá loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata*

Mẫu lá loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn (5,0 kg). Sau đó, bột này được ngâm chiết siêu âm với rượu metylic 3 lần ở nhiệt độ 40°C, mỗi lần 60 phút. Các dịch chiết được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô trong rượu metylic, được ký hiệu là dịch cô SP.

Dịch cô SP (300 g) được hòa tan với nước cất (3 lít) rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi diclometan và etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích. Các dịch chiết được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được các dịch cô diclometan (SP1, 113,0 g), etyl axetat (SP2, 25,0 g) và dịch chiết nước (SP3).

Dịch cô SP1 được tiến hành phân tách trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (Φ 12 cm, chiều dài cột nhồi 5 cm) (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/0 đến 1/1 thu được sáu phân đoạn, ký hiệu từ SP1A đến SP1F.

Phân đoạn SP1B (22.0 g) được phân tách trên cột sắc ký (Φ 8 cm, chiều dài cột nhồi 40 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 2/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SP1B1 đến SP1B3. Hòa tan phân đoạn SP1B1 vào hỗn hợp dung môi *n*-hexan/axeton tỷ lệ 8/1 về thể tích và tiến hành phân tách trên sắc ký trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (Φ 4 cm, chiều dài cột nhồi 50 cm) (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) tỷ lệ SP1B1/silica gel = 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/axeton (8/1, v/v), thu được bốn phân đoạn, ký hiệu từ SP1B1A đến SP1B1D. Phân đoạn SP1B1C được sắc ký trên hệ thống HPLC dung môi axetonitril 33% trong nước, thu được hợp chất schisandrulata A có công thức (**1a**) dưới dạng bột vô định hình.

Dịch chiết nước (SP3) được tiến hành loại bỏ dung môi etyl axetat, sau đó đưa lên cột Diaion HP-20, loại bỏ đường bằng nước sau đó tăng dần nồng độ rượu metylic (MeOH) trong nước (25, 50, 75 và 100% MeOH) thu được 4 phân đoạn, ký hiệu lần lượt là SP3A-SP3D. Phân đoạn SP3D được tiến hành phân tách trên cột sắc ký (Φ 8 cm, chiều dài cột nhồi 5 cm) với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ MeOH trong diclometan (CH₂Cl₂) là CH₂Cl₂/MeOH tỷ lệ 10/1→1/1 thu được bốn phân đoạn, ký hiệu từ SP3D1 đến SP3D4. Phân đoạn SP3D2 được phân tách trên cột sắc ký (Φ 4 cm, L

60 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 4/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SP3D2A đến SP3D2D. Phân đoạn SP3D2A được sắc ký trên hệ thống HPLC dung môi axetonitril 20% trong nước, thu được hợp chất schisandrulata B có công thức (**Ib**) dưới dạng bột vô định hình

Hợp chất schisandrulata A có công thức (**Ia**), tên thường gọi là schisandrulata A.

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +32,3^{\circ}$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 541,1819 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{Na}]^{+}$, 541,1838;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Số liệu phổ ^1H - NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất schisandrulata A (**Ia**) trong CDCl_3

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)
1	152.0	-	15	121.9	-
2	141.5	-	16	122.2	-
3	152.7	-	17	20.6	1.24 (d, 7.0)
4	108.3	6.81 (s)	18	111.7	4.80 (s) 5.10 (s)
5	134.7	-	1-OMe	60.6	3.56 (s)
6	81.0	6.55 (s)	2-OMe	60.8	3.88 (s)
7	149.6	-	3-OMe	56.0	3.92 (s)
8	38.9	2.65 (m)	14-OMe	59.1	3.58 (s)
9	41.0	2.24 (dd, 10.0, 13.5) 2.54 (dd, 3.0, 13.5)	-OCH ₂ O-	100.6	5.80 (d, 2.0) 5.87 (d, 2.0)
10	134.8	-	1'	165.0	-
11	102.5	6.51 (s)	2'	130.0	-
12	148.8	-	3', 7'	129.6	7.63 (dd, 2.0, 8.0)
13	134.3	-	4', 6'	127.9	7.33 (dt, 2.0, 8.0)
14	141.0	-	5'	132.8	7.49 (dt, 2.0, 8.0)

^a) Đo trong CDCl_3 , OMe: metoxy.

Hợp chất schisandrulata B có công thức (**Ib**), tên thường gọi là schisandrulata B.

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -45,0^{\circ}$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 515,1891 $[\text{M} + \text{Na}]^{+}$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_{10}\text{Na}]^{+}$, 515,1888;

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

Bảng 2: Số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất schisandrulata B (**Ib**) trong CD_3OD

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)
1	137.1	-	4'	147.0	-
2	114.2	6.75 (s)	5'	118.9	7.04 (d, 8.0)
3	145.2	-	6'	119.2	6.92 (dd, 2.0, 8.0)
4	147.5	-	7'	88.5	5.56 (d, 5.0)
5	138.3	-	8'	55.6	3.48 (m)
6	118.0	6.74 (s)	9'	65.1	3.78 (dd, 6.5, 11.0) 3.86 (dd, 5.0, 11.0)
7	32.9	2.64 (t, 7.5)	3'-OMe	56.5	3.82 (s)
8	35.8	1.84 (m)	4'-Apio		
9	62.2	3.59 (t, 6.5)	1''	109.7	5.56 (d, 2.0)
3-OMe	56.8	3.88 (s)	2''	78.3	4.23 (d, 2.0)
1'	129.7	-	3''	80.6	-
2'	111.2	7.03 (d, 2.0)	4''	75.8	3.87 (d, 10.0) 4.12 (d, 10.0)
3'	151.8	-	5''	65.4	3.69 (s)

^{a)} Đo trong CD_3OD , Apio: apiofuranosyl, OMe: metoxy.

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

Các hợp chất lignan theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính ức chế sự phát triển tế bào ung thư vòm họng (CAL27) và ung thư vú (MDAMB231) như sau:

Phương pháp thử độ độc tế bào in vitro được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện in vitro. Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Các hợp chất thể hiện % sống sót của tế bào ung thư >50% ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ được đánh giá ở các nồng độ thấp hơn 50, 25, 12.5 và 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Các tế bào được ủ ấm CO_2 và để phát triển trong vòng 72 h. Sau đó tế bào được cố định vào đáy giếng bằng TCA trong 30 phút, được nhuộm bằng SRB trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C . Đổ bỏ SRB và các giếng thí nghiệm được rửa 3 lần bằng acetic acid (5%) rồi để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, sử dụng 10 mM dung dịch bazơ Tris để hòa tan lượng SRB đã bám và nhuộm các phân tử protein, đưa lên máy lắc đĩa lắc nhẹ trong 10 phút và sử dụng máy ELISA Plate Reader để đọc kết quả về hàm lượng màu của chất nhuộm SRB qua phổ hấp phụ ở bước sóng 515 nm. Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ Sống sót} = \frac{\text{OD (chất thử)} - \text{OD (ngày 0)} \times 100}{\text{OD (chất đối chứng)} - \text{OD (ngày 0)}}$$

Các phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine được sử dụng là chất đối chứng dương. Giá trị IC_{50} được xác định bằng phần mềm TableCurve.

Kết quả được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Kết quả đánh giá hoạt tính ức kháng tế bào ung thư của các chất

Hợp chất	IC_{50} (μM)	
	CAL27	MDAMB231
Ia	1.8 ± 0.2	3.5 ± 0.2
Ib	>30	>30
Capecitabine	8.2 ± 0.8	5.2 ± 0.9

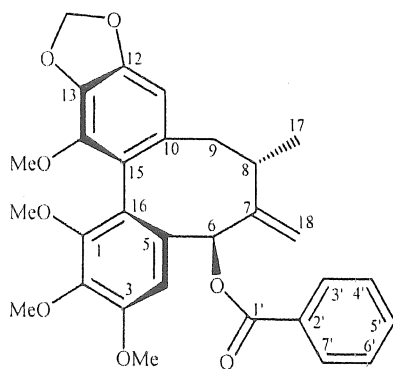
Hợp chất schisandrulata A (**Ia**) thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển và sống sót tế bào ung thư trên 2 dòng ung thư vòm họng (CAL27) và ung thư vú (MDAMB231) với giá trị IC_{50} lần lượt là $1,8 \pm 0,2$ và $3,5 \pm 0,2 \mu M$, mạnh hơn chất đối chứng dương capecitabine với IC_{50} lần lượt là $8,2 \pm 0,8$ và $5,2 \pm 0,9 \mu M$. 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 bệnh ung thư từ loài Ngũ vị vảy chồi.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

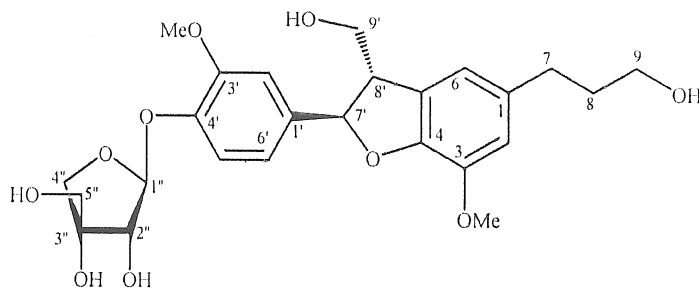
Sáng chế đề cập đến các hợp chất mới, schisandrulata A và schisandrulata B, và phương pháp phân lập các hợp chất từ loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata*. Tất cả các hợp chất theo sáng chế đã được đánh giá tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư vòm họng (CAL27) và ung thư vú (MDAMB231). Hợp chất schisandrulata A thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển tế bào ung thư trên 2 dòng: ung thư vòm họng (CAL27) và ung thư vú (MDAMB231) với giá trị IC_{50} lần lượt là $1,8 \pm 0,2$ và $3,5 \pm 0,2 \mu M$. 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.

Yêu cầu bảo hộ

1. Hợp chất schisandrulata A và schisandrulata B có công thức (Ia) và (Ib) sau đây:



Ia
(schisandrulata A)



Ib
(schisandrulata B)

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất (Ia) này là schisandrulata A.

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất (Ib) này là schisandrulata B.

4. Phương pháp tách chiết các hợp chất schisandrulata A và schisandrulata B theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 từ loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata*, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn mẫu lá loài Ngũ vị vảy chồi *S. perulata*, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với rượu metylic 3 lần ở nhiệt độ 40°C, mỗi lần 60 phút;

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

(iii) phân bố đều dịch cô SP với nước cất rồi chiết phân bố với diclorometan và etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, sau đó tiến hành loại bỏ dung môi của dịch chiết diclorometan và etyl axetat dưới áp suất giảm thu được các dịch cô diclorometan (SP1), etyl axetat (SP2) và dịch chiết nước (SP3);

(iv) tiến hành phân tách dịch cô SP1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/0 đến 1/1 thu được sáu phân đoạn, ký hiệu từ SP1A đến SP1F;

(v) tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn SP1B trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μ m, hãng sản xuất Fujisilysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 2/1 về thể tích, thu được ba phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SP1B1 đến SP1B3;

(vi) hòa tan phân đoạn SP1B1 vào hỗn hợp dung môi *n*-hexan/axeton tỷ lệ 8/1 về thể tích và tiến hành phân tách trên sắc ký trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) tỷ lệ SP1B1/silica gel = 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/axeton (8/1, v/v), thu được bốn phân đoạn, ký hiệu từ SP1B1A đến SP1B1D;

(vii) tách các hợp chất schisandrulata A và schisandrulata B, trong đó:

- tiến hành sắc ký phân đoạn SP1B1C trên hệ thống HPLC, dung môi axetonitril 33% trong nước, cho hợp chất schisandrulata A có công thức (**Ia**) dưới dạng bột vô định hình;

(viii) tiến hành loại bỏ dung môi ethyl axetat dịch chiết nước (SP3), sau đó đưa lên cột Diaion HP-20, loại bỏ đường bằng nước sau đó tăng dần nồng độ rượu metylic (MeOH) trong nước (25, 50, 75 và 100% MeOH) thu được 4 phân đoạn, ký hiệu là SP3A-SP3D;

(ix) tiến hành phân tách phân đoạn SP3D trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ MeOH trong diclorometan (CH₂Cl₂) là CH₂Cl₂/MeOH tỷ lệ 10/1 → 1/1 thu được bốn phân đoạn, ký hiệu từ SP3D1 đến SP3D4;

(x) tiến hành phân tách phân đoạn SP3D2 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỷ lệ 4/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ SP3D2A đến SP3D2D;

- tiến hành sắc ký phân đoạn SP3D2A trên hệ thống HPLC, dung môi axetonitril 20% trong nước, cho hợp chất schisandrulata B có công thức (**Ib**) dưới dạng bột vô định hình.