



(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)



1-0029666

(51)⁷ C07J 17/00

(13) B

(21) 1-2019-03817

(22) 16/07/2019

(45) 25/10/2021 403

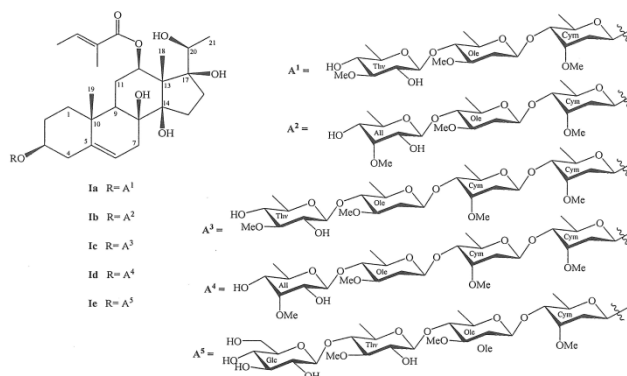
(43) 25/11/2019 380A

(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) Phan Văn Kiệm (VN); Châu Văn Minh (VN); Nguyễn Xuân Nhiệm (VN); Dương Thị Hải Yến (VN); Phạm Hải Yến (VN); Đỗ Thị Trang (VN); Bùi Hữu Tài (VN); Nguyễn Văn Hùng (VN); Trần Minh Ngọc (VN); Hoàng Đức Mạnh (VN); SeonJu Park (KR); Seung Hyun Kim (KR); Jae Hyuk Lee (KR); Sun Yeou Kim (KR).

(54) HỢP CHẤT GYMSYLOSIT CÓ TÁC DỤNG ỨC CHẾ ENZYM α -AMYLaza, α -GLUCOSIDaza VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI DÂY THÌA CANH GYMNEMA SYLVESTRE

(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất gymsylosit có công thức A-E:



và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài dây thìa canh *Gymnema sylvestre* thu hái ở Hải Lộc, Hải Hậu, Nam Định. Các hợp chất gymsylosit có tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza và α -amylaza. Các hợp chất gymsylosit 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 tiểu đường.

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 ức chế enzym α -amylaza và α -glucosidaza nhằm nghiên cứu ứng dụng chữa bệnh tiểu đường. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các hợp chất gymnsylosit A-E có cấu trúc hóa học mới và phương pháp chiết các hợp chất này từ dây thìa canh (*Gymnema sylvestre* (Retz) R. Br. ex. Schult) ở Việt Nam.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Xu hướng sử dụng nguồn dược liệu tự nhiên nói chung, đặc biệt là các hợp chất thiên nhiên có nguồn gốc từ thực vật để chữa trị một số bệnh nhiệt đới và những bệnh hiểm nghèo đã và đang là mối quan tâm không chỉ của ngành dược ở nước ta mà còn của các nước trong khu vực cũng như các nước trên thế giới. Nhiều cây thuốc bản địa đã được phát hiện có tác dụng làm hạ đường huyết, có thể sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường. Đây là một lợi thế vì khả năng cung cấp nguyên liệu để điều trị cũng như ít tác dụng phụ. Theo thống kê, có khoảng 800 loài được cho là có khả năng điều trị bệnh tiểu đường (xem, tài liệu Journal of Ethnopharmacology (1998), 71, 1738-1741). Tiêu biểu trong số đó là các loài: dây thìa canh (*G. sylvestre*), mướp đắng (*Momordica charantia*), cải bẹ xanh (*Brassica juncea*), bồ công anh (*Elephantopus scaber*), cỏ tóc tiên (*Liriope spicata*), thầu dầu (*Ricinus communis*), khoai sâm (*Smallanthus sonchifolius*), trạch lan (*Vernonia anthelmintica*), ...

Các loài thuộc chi *Gymnema* (họ Trúc đào Apocynaceae) nhận được rất nhiều quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới. Theo danh lục các loài thực vật Việt Nam (xem, Danh mục các loài thực vật Việt Nam, (2005), 3, 64-65) chi *Gymnema* tại Việt Nam hiện có 8 loài là *G. albiflorum* Cost, *G. alternifolium* (Lour.) Merr., *G. foetidum* Tsiang, *G. griffithii* Craib, *G. inodorum* (Lour.) Decne, *G. latifolium* Wall ex Wight, *G. reticulatum* (Moon) Alston và *G. sylvestre* (Retz) R. Br. Ex Schult.

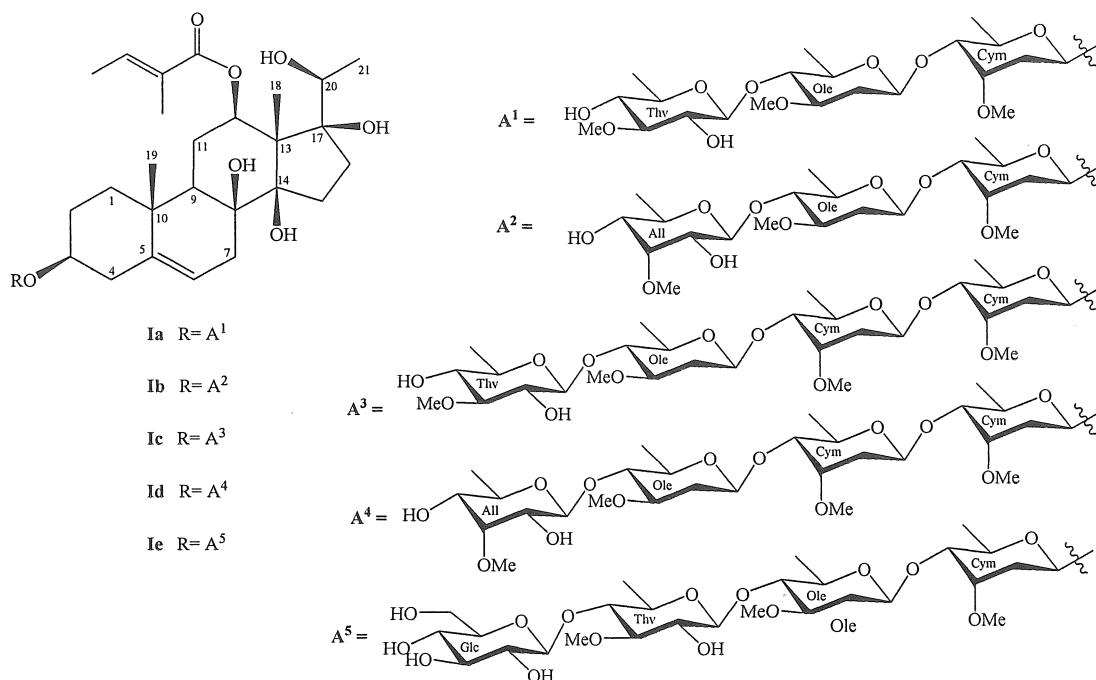
Ở Ấn Độ, loài dây thìa canh (*Gymnema sylvestre*) được sử dụng rộng rãi như là một loại thảo dược chuyên trị bệnh tiểu đường trên 2000 năm. Bên cạnh đó, *G. sylvestre* có

tính kháng khuẩn và bảo vệ tế bào gan. Tuy nhiên ở Việt Nam chỉ mới có một vài nghiên cứu về thành phần hóa học và dược học về loài *Gymnema sylvestre*.

Trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng hạ đường huyết *in vitro* của 3 loài thuộc chi *Gymnema* (*G. sylvestre*, *G. inodorum* và *G. latifolium*) ở Việt Nam”, tập thể tác giả sáng chế đã đi sâu nghiên cứu thành phần hóa học của cây dây thìa canh *Gymnema sylvestre* và đã phân lập được các hợp chất có cấu trúc hóa học mới là 12 β -tigloyloxy-3 β ,8 β ,14 β ,17 β ,20*S*-pregn-6-ene 3-*O*- β -D-thevetopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-oleandropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranoside (gymsylosit A); 12 β -tigloyloxy-3 β ,8 β ,14 β ,17 β ,20*S*-pregn-6-ene 3-*O*-6-deoxy-3-*O*-methyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-oleandropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranoside (gymsylosit B); 12 β -tigloyloxy-3 β ,8 β ,14 β ,17 β ,20*S*-pregn-6-ene 3-*O*- β -D-thevetopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-oleandropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranoside (gymsylosit C); 12 β -tigloyloxy-3 β ,8 β ,14 β ,17 β ,20*S*-pregn-6-ene 3-*O*-6-deoxy-3-*O*-methyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-oleandropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranoside (gymsylosit D); 12 β -tigloyloxy-3 β ,8 β ,14 β ,17 β ,20*S*-pregn-6-ene 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-thevetopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-oleandropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranoside (gymsylosit E).. Nhóm hợp chất này thuộc lớp chất steroid có dạng khung pregnan. Đây là một phát hiện hoàn toàn mới, các hợp chất gymsylosit A-E chưa được phát hiện từ trước đến nay trên thế giới. Tất cả các hợp chất này đã được đánh giá tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza và α -amylaza. Các hợp chất gymsylosit B, C, D ức chế α -amylaza với các giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 113,0 đến 176,2 μ M. Bên cạnh đó, phương pháp phân lập các hợp chất gymsylosit từ dây thìa canh *Gymnema sylvestre* 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 tiểu đường.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các hợp chất gymsylosit phân lập từ loài dây thìa canh *Gymnema sylvestre*, có công thức Ia-Ie sau:



Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các hợp chất gymosylosit bao gồm gymosylosit A; gymosylosit B; gymosylosit C; gymosylosit D; gymosylosit E. Các hợp chất gymosylosit theo sáng chế thể hiện tác dụng ức chế enzym α -amylaza và enzym α -glucosidaza có thể sử dụng để phát triển các sản phẩm điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp phân lập các hợp chất gymosylosit có công thức Ia-Ie từ loài dây thìa canh *Gymnema sylvestre*. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập các hợp chất gymosylosit trên đây bao gồm các bước:

(i) mẫu cây dây thìa canh *Gymnema sylvestre* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được ngâm chiết 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 60 phút;

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

(iii) hòa tan dịch cô GS với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến cloroform và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết cloroform được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô cloroform, ký hiệu là dịch cô GS2;

(iv) dịch cô GS2 được tiến hành phân tách 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) với hỗn hợp

dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỉ lệ 100/1-0/1) thu được bảy phân đoạn ký hiệu lần lượt từ GS-2A đến GS-2G;

(v) hòa tan phân đoạn GS-2F vào hỗn hợp dung môi cloroform/rượu metylic với tỷ lệ 2/1 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 GS-2F/silica gel = 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải cloform/rượu metylic (11/1, v/v), thu được bốn phân đoạn ký hiệu là GS-2F1 đến GS-2F4;

(vi) hòa tan phân đoạn GS-2F1 bằng lượng tối thiểu rượu metylic rồi tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký ái lực 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 rượu metylic/nước cất tỉ lệ 4/1 về thể tích, tạo ra năm phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ GS-2F1A đến GS-2F1D, các hợp chất: gymosylosit A và gymosylosit B thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn GS-2F1B khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (150 $\times$ 200 mm), điều kiện dung môi axetonitril 40% trong nước, các hợp chất: gymosylosit c và gymosylosit D thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn GS-2F1D khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC trên cột J'sphere H-80 (150 $\times$ 200 mm), điều kiện dung môi là 40% axetonitril trong nước;

(vii) phân đoạn GS-2G được sắc ký trên cột pha đảo (RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , Fuji silysia Chemical Ltd.) để cho bốn phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ GS-2G1 đến GS-2G4, phân đoạn GS-2G3 được sắc ký trên hệ thống HPLC, dung môi axetonitril 42% trong nước cho hợp chất gymosylosit E dưới dạng bột vô định hình.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Sơ đồ thể hiện tác dụng ức chế enzyme α -glucosidaza của dịch cô rượu metylic (500 $\mu\text{g/ml}$) và các hợp chất gymosylosit (200 μM) phân lập từ loài *G. sylvestre*.

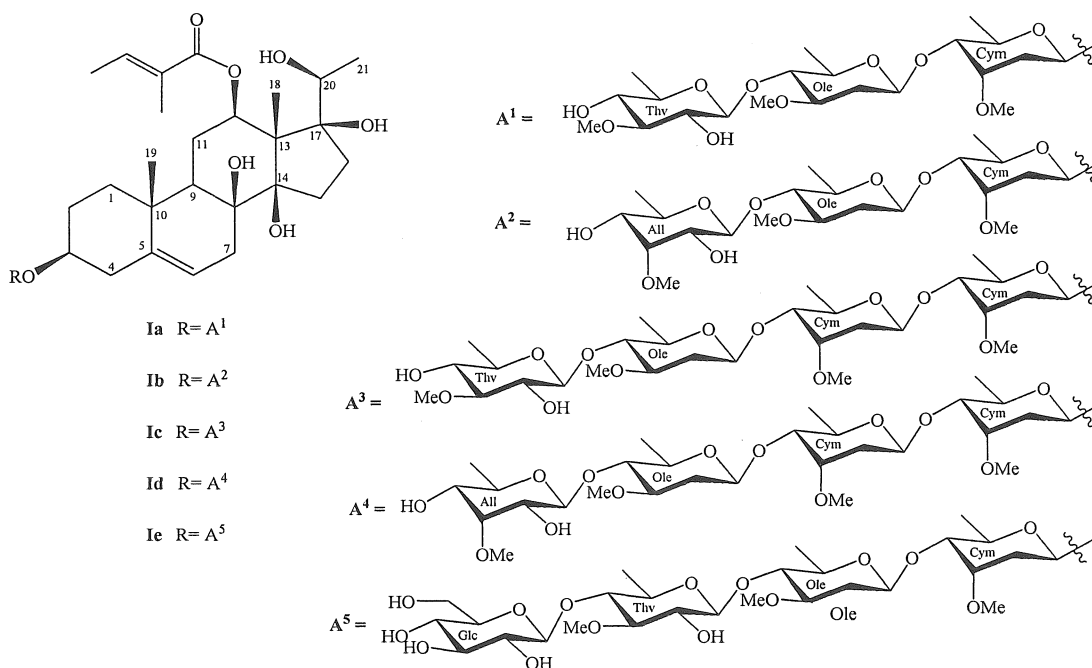
Hình 2. Sơ đồ thể hiện tác dụng ức chế enzyme α -amylaza của dịch cô rượu metylic (500 $\mu\text{g/ml}$) và các hợp chất gymosylosit (200 μM) phân lập từ loài *G. Sylvestre*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mẫu dây thìa canh *Gymnema sylvestre* được thu tại Hải Hậu, Nam Định tháng 11 năm 2015. Tên khoa học được giám định bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Mẫu tiêu bản (NCCT-P20) được lưu giữ tại phòng Nghiên cứu cấu trúc, Viện Hóa sinh biển. Mẫu cây dây thìa canh tươi *Gymnema sylvestre* (40 kg) được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột, sau đó bột này (4,0 kg) được chiết ngâm bằng

siêu âm 3 lần, mỗi lần 60 phút, 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: 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 254nm và 365nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 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 Varian 400 MHz. 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 gymsylosit A-E:



Các hợp chất gymsylosit 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 gymsylosit A:

+ Công thức phân tử: C₄₇H₇₆O₁₇;

+ Khối lượng phân tử: M = 912;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ - 20,0° (*c* 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 935,4986 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{47}H_{76}O_{17}Na]^+$, 935,4975;

Hợp chất gymsylosit B:

+ Công thức phân tử: $C_{47}H_{76}O_{17}$;

Khối lượng phân tử: $M = 912$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ + 35,0° (*c* 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 935,4996 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{47}H_{76}O_{17}Na]^+$, 935,4975 ;

Hợp chất gymsylosit C:

+ Công thức phân tử: $C_{54}H_{88}O_{20}$;

Khối lượng phân tử: $M = 1056$;

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ + 80,0° (*c* 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 1079,5761 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{54}H_{88}O_{20}Na]^+$, 1079,5769 ;

Hợp chất gymsylosit D:

+ Công thức phân tử: $C_{54}H_{88}O_{20}$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 1056$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ + 58.7 ° (*c* 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 1079,5778 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{54}H_{88}O_{20}Na]^+$, 1079,5769;

Hợp chất gymsylosit E:

+ Công thức phân tử: $C_{54}H_{88}O_{20}$;

Khối lượng phân tử: $M = 1074$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22} +54,0^\circ$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 1097,5530 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{54}H_{88}O_{20}Na]^+$, 1097,5503.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập các hợp chất gymnosylosit A-E từ loài dây thìa canh *Gymnema sylvestre* gồm các bước sau:

(i) mẫu cây dây thìa canh *Gymnema sylvestre* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được ngâm chiết 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C , mỗi lần tối thiểu 60 phút.

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

(iii) hòa tan dịch cô GS với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến cloroform và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết diclometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô cloroform, ký hiệu là dịch cô GS2;

(iv) dịch cô GS2 được tiến hành phân tách 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) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỉ lệ 100/1-0/1) thu được bảy phân đoạn ký hiệu lần lượt từ GS-2A đến GS-2G;

(v) hòa tan phân đoạn GS-2F vào hỗn hợp dung môi cloroform/rượu metylic với tỷ lệ 2/1 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 GS-2F/silica gel = 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải cloform/rượu metylic (11/1, v/v), thu được bốn phân đoạn ký hiệu là GS-2F1 đến GS-2F4;

(vi) hòa tan phân đoạn GS-2F1 bằng lượng tối thiểu rượu metylic rồi tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký ái lực 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 rượu metylic/nước cất tỉ lệ 4/1 về thể tích, tạo ra năm phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ GS-2F1A đến GS-2F1D. Các hợp chất: gymnosylosit A và gymnosylosit B thu được ở dạng bột vô định

hình từ phân đoạn GS-2F1B khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (150 × 200 mm), điều kiện dung môi axetonitril 40% trong nước. Các hợp chất gymnosylosit C và gymnosylosit D thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn GS-2F1D khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC trên cột J'sphere H-80 (150 × 200 mm), điều kiện dung môi là 40% axetonitril trong nước;

(vii) phân đoạn GS-2G được sắc ký trên tách trên cột pha đảo (RP-18, cỡ hạt 30 - 50 µm, Fuji silysia Chemical Ltd.) để cho bốn phân đoạn nhỏ hơn ký hiệu từ GS-2G1 đến GS-2G4. Phân đoạn GS-2G3 được sắc ký trên hệ thống HPLC, dung môi axetonitril 42% trong nước cho hợp chất gymnosylosit E dưới dạng bột vô định hình.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập các hợp chất gymnosylosit A-E từ loài dây thìa canh *Gymnema sylvestre*.

Mẫu cây dây thìa canh khô, nghiền thành bột (4,0 kg) được ngâm chiết 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 60 phút, rồi lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô rượu metylic, ký hiệu là dịch cô GS (450,0 g);

Dịch cô GS được phân bố với nước cất (2 lít) rồi chiết lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, cloroform và etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết cloroform được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô cloroform, ký hiệu là dịch cô GS2 (60,0 g);

Dịch cô GS2 được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực (Φ 10 cm, chiều dài cột nhồi 5 cm) với chất hấp phụ là silica gel (Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan (*n*-hexan/axeton 100/1-0/1) rồi rửa cột bằng rượu metylic thu được bảy phân đoạn ký hiệu lần lượt từ GS-2A đến GS-2G;

Hòa tan phân đoạn GS-2F (4,3 g) vào hỗn hợp dung môi diclometan/rượu metylic với tỷ lệ 2/1 về thể tích và tiến hành phân lập trên cột sắc ký ái lực (Φ 8 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là silica gel (Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck, tỷ lệ GS-2F/silica gel = 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải cloform/rượu metylic 11/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn ký hiệu là GS-2F1 đến GS-2F4.

Phân đoạn GS-2F1 (2,8 g) được hòa tan bằng lượng tối thiểu rượu metylic rồi tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực (Φ 4 cm, L 60 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (RP-

18, cỡ hạt 30 - 50 μm , Fuji silysia Chemical Ltd.), hệ dung môi rửa giải rượu metylic/nước tỉ lệ 4/1 về thể tích, tạo ra năm phân đoạn nhỏ kí hiệu từ GS-2F1A đến GS-2F1D. Các hợp chất: gymosylosit A (17,0 mg) và gymosylosit B (8,7 mg) thu được từ phân đoạn GS-2F1B (200,0 mg) khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (150 $\times$ 200 mm), dung môi axetonitril 40% trong nước. Các hợp chất gymosylosit C (5,0 mg) và gymosylosit D (5,0 mg) thu được từ phân đoạn GS-2F1D (100 mg) trên cột J'sphere H-80 (150 $\times$ 200 mm), dung môi 40% axetonitril trong nước.

Phân đoạn GS-2G (6,8 g) được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực (Φ 5 cm, L 60 cm) sử dụng pha đảo pha đảo (RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , Fuji silysia Chemical Ltd.) để cho bốn phân đoạn nhỏ hơn, GS-2G1 đến GS-2G4. Tinh chế phân đoạn GS-2G3 (100 mg) trên hệ thống HPLC, dung môi axetonitril 42% trong nước cho hợp chất gymosylosit E (14,0 mg).

Hợp chất gymosylosit A, tên thường gọi là gymosylosit A.

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ - 20,0° (*c* 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 935,4986 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{17}\text{Na}]^+$, 935,4975;

+ 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 (δ , ppm) của hợp chất gymosylosit A

C	$^a, ^b\delta_{\text{C}}$	$^a, ^c\delta_{\text{H}}$ (dạng píc, $J = \text{Hz}$)	C	$^a, ^b\delta_{\text{C}}$	$^a, ^c\delta_{\text{H}}$ (dạng píc, $J = \text{Hz}$)
1	39,8	1,09 (m)/1,80 (m)	5	12,2	1,85 (s)
2	30,2	1,57 (m)/1,84 (m)	Cym		
3	79,2	3,50 (m)	1	97,2	4,84 (br d, 9,6)
4	39,8	2,20 (m)/2,33 (m)	2	36,6	1,52 (m)/2,05 (m)
5	140,0	-	3	78,5	3,82 (m)
6	120,0	5,32 (br s)	4	83,8	3,24 (m)
7	35,2	2,11 (m)	5	69,9	3,79 (m)
8	74,9	-	6	18,5	1,19 (d, 6,0)
9	44,7	1,49 (m)	3-OMe	58,5	3,42 (s)
10	38,0	-	Ole		
11	26,0	1,63 (m)/2,00 (m)	1	102,6	4,57 (br d, 9,2)
12	75,1	4,68 (dd, 4,0, 11,6)	2	37,6	1,40 (m)/2,30 (m)
13	57,6	-	3	80,2	3,36 (m)
14	89,3	-	4	84,1	3,18 (m)
15	34,3	1,83 (m)/1,88 (m)	5	72,5	3,36 (m)

16	33,5	1,74 (m)	6	18,9	1,35 (d, 6,0)
17	89,1	-	3-OMe	57,6	3,39 (s)
18	11,2	1,53 (s)	Thv		
19	18,5	1,13 (s)	1	104,3	4,41 (br d, 8,0)
20	71,5	3,45 (m)	2	75,6	3,18 (m)
21	18,9	1,05 (d, 6,4)	3	87,7	3,00 (t, 6,8)
12- <i>O</i> -Tig			4	76,6	3,00 (t, 6,8)
1	169,1	-	5	73,2	3,25 (m)
2	130,0	-	6	18,1	1,25 (d, 6,0)
3	139,5	6,98 (q, 7,2)	3-OMe	61,0	3,60 (s)
4	14,5	1,80 (d, 7,2)			

^aĐo trong CD₃OD, ^b100 MHz, ^c400 MHz, cym: β -D-cymaropyranosyl, ole: β -D-oleandropyranosyl, thv: β -D-thevetopyranosyl

Hợp chất gymosylit B:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22} + 35,0^\circ$ (*c* 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại *m/z* 935,4996 [M+Na]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₄₇H₇₆O₁₇Na]⁺, 935,4975 ;

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

Bảng 2. Số liệu phổ ¹H- NMR và ¹³C-NMR (δ , ppm) của hợp chất gymosylit B

C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (dạng píc, <i>J</i> = Hz)	C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (dạng píc, <i>J</i> = Hz)
1	39,8	1,09 (m)/1,79 (m)	5	12,1	1,85 (s)
2	30,2	1,56 (m)/1,84 (m)	Cym		
3	79,3	3,50 (m)	1	97,2	4,85 (br d, 9,6)
4	39,8	2,20 (m) 2,33 (m)	2	36,7	1,53 (m)/2,04 (m)
5	140,0	-	3	78,5	3,83 (m)
6	120,0	5,32 (br s)	4	83,8	3,24 (m)
7	35,2	2,12 (m)	5	70,0	3,79 (m)
8	75,0	-	6	18,5	1,19 (d, 6,0)
9	44,7	1,48 (m)	3-OMe	58,5	3,42 (s)
10	38,0	-	Ole		
11	26,0	1,62 (m) 2,00 (m)	1	102,6	4,56 (br d, 6,8)
12	75,2	4,68 (m)	2	37,5	1,39 (m)/2,30 (m)
13	57,6	-	3	80,4	3,36 (m)
14	89,3	-	4	84,0	3,17 (m)
15	34,3	1,82 (m) 1,91 (m)	5	72,6	3,35 (m)
16	33,5	1,75 (m)	6	19,0	1,34 (d, 6,0)

17	89,2	-	3-OMe	57,5	3,39 (s)
18	11,2	1,53 (s)	All		
19	18,5	1,14 (s)	1	102,2	4,70 (d, 7,6)
20	71,5	3,44 (m)	2	73,6	3,29 (m)
21	18,9	1,04 (d, 6,4)	3	83,8	3,60 (m)
12- <i>O</i> -Tig			4	75,0	3,16 (m)
1	169,2	-	5	71,2	3,64 (m)
2	130,1	-	6	18,5	1,21 (d, 6,0)
3	139,6	6,98 (q, 7,2)	3-OMe	62,5	3,58 (s)
4	14,5	1,80 (d, 7,2)			

^aĐo trong CD₃OD, ^b100 MHz, ^c400 MHz, cym: β -D-cymaropyranosyl, ole: β -D-oleandropyranosyl, all: 6-deoxy-3-*O*-methyl- β -D-allopyranosyl

Hợp chất gymosylit C:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22} + 80,0^\circ$ (*c* 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại *m/z* 1079,5761 [M+Na]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₅₄H₈₈O₂₀Na]⁺, 1079,5769;

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

Bảng 3. Số liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR (δ , ppm) của hợp chất gymosylit C

C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (dạng pic, <i>J</i> = Hz)	C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (dạng pic, <i>J</i> = Hz)
1	39,8	1,09 (m)/1,80 (m)	3	78,5	3,82 (m)
2	30,1	1,57 (m)/1,83 (m)	4	83,8	3,23 (m)
3	79,3	3,49 (m)	5	70,1	3,79 (m)
4	39,8	2,19 (m)/2,33 (m)	6	18,5	1,18 (d, 6,4)
5	140,0	-	3-OMe	58,5	3,42 (s)
6	119,9	5,33 (br s)	Cym II		
7	35,2	2,12 (m)	1	101,2	4,78 (br d, 9,6)
8	75,0	-	2	36,4	1,55 (m)/2,10 (m)
9	44,7	1,49 (m)	3	78,6	3,82 (m)
10	38,0	-	4	83,9	3,23 (m)
11	25,9	1,62 (m) 2,00 (m)	5	69,9	3,79 (m)
12	75,2	4,70 (4,0, 9,6)	6	18,6	1,21 (d, 6,0)
13	57,6	-	3-OMe	58,4	3,42 (s)
14	89,2	-	Ole		
15	34,3	1,81 (m)/1,89 (m)	1	102,6	4,58 (br d, 8,4)
16	33,5	1,74 (m)	2	37,6	1,40 (m)/2,30 (m)
17	89,3	-	3	80,2	3,36 (m)
18	11,2	1,52 (s)	4	84,1	3,18 (m)
19	18,5	1,14 (s)	5	72,5	3,35 (m)

20	71,6	3,46 (m)	6	18,9	1,36 (d, 5,6)
21	18,9	1,06 (d, 6,4)	3-OMe	57,5	3,41 (s)
12- <i>O</i> -Tig			Thv		
1	169,1	-	1	104,3	4,42 (d, 8,0)
2	130,1	-	2	75,6	3,18 (m)
3	139,6	7,00 (q, 6,8)	3	87,7	3,00 (m)
4	14,5	1,81 (d, 6,8)	4	76,6	3,00 (m)
5	12,1	1,87 (s)	5	73,2	3,25 (m)
Cym I			6	18,1	1,27 (d, 6,0)
1	97,2	4,84 (br d, 9,6)	3-OMe	61,1	3,60 (s)
2	36,6	1,55 (m)/2,05 (m)			

^aĐo trong CD₃OD, ^b100 MHz, ^c400 MHz, cym: β -D-cymaropyranosyl, ole: β -D-oleandropyranosyl, thv: β -D-thevetopyranosyl

Hợp chất gymosylit D:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22} + 58.7^\circ$ (*c* 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại *m/z* 1079,5778 [M+Na]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₅₄H₈₈O₂₀Na]⁺, 1079,5769;

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

Bảng 4. Số liệu phổ ¹H- NMR và ¹³C-NMR (δ , ppm) của hợp chất gymosylit D

C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (dạng píc, <i>J</i> = Hz)	C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (dạng píc, <i>J</i> = Hz)
1	39,8	1,07 (m)/1,79 (m)	3	78,5	3,82 (m)
2	30,2	1,57 (m)/1,83 (m)	4	83,8	3,24 (m)
3	79,3	3,50 (m)	5	69,8	3,78 (m)
4	39,8	2,18 (m)/2,33 (m)	6	18,3	1,17 (d, 6,4)
5	140,0	-	3-OMe	58,4	3,41 (s)
6	120,0	5,32 (br s)	Cym II		
7	35,2	2,11 (m)	1	101,2	4,77 (br d, 9,6)
8	74,9	-	2	36,4	1,54 (m)/2,04 (m)
9	44,7	1,49 (m)	3	78,4	3,82 (m)
10	38,0	-	4	83,8	3,24 (m)
11	26,0	1,63 (m)/2,00 (m)	5	69,9	3,78 (m)
12	75,1	4,67 (m)	6	18,6	1,19 (d, 5,6)
13	57,6	-	3-OMe	58,5	3,40 (s)
14	89,3	-	Ole		
15	34,3	1,80 (m)/1,88 (m)	1	102,6	4,56 (br d, 9,2)
16	33,5	1,74 (m)	2	37,5	1,40 (m)/2,30 (m)
17	89,1	-	3	80,3	3,35 (m)
18	11,2	1,53 (s)	4	83,7	3,18 (m)
19	18,6	1,13 (s)	5	72,5	3,35 (m)

20	71,5	3,46 (m)	6	18,9	1,35 (d, 6,0)
21	19,0	1,05 (d, 6,0)	3-OMe	57,4	3,39 (s)
12- <i>O</i> -Tig			All		
1	169,1	-	1	102,2	4,70 (d, 8,0)
2	130,1	-	2	73,5	3,29 (m)
3	139,5	6,98 (q, 7,2)	3	83,9	3,60 (m)
4	14,6	1,81 (d, 7,2)	4	75,0	3,16 (m)
5	12,2	1,85 (s)	5	71,2	3,63 (m)
Cym I			6	18,6	1,21 (d, 6,0)
1	97,2	4,83 (br d, 9,6)	3-OMe	62,5	3,58 (s)
2	36,6	1,54 (m)/2,04 (m)			

^aĐo trong CD₃OD, ^b100 MHz, ^c400 MHz, cym: β -D-cymaropyranosyl, ole: β -D-oleandropyranosyl, all: 6-deoxy-3-*O*-methyl- β -D-allopyranosyl

Hợp chất gymsylosit E:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ 54,0 ° (*c* 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại *m/z* 1097,5530 [M+Na]⁺, tính toán lý thuyết 1097,5503 cho công thức [C₅₄H₈₈O₂₀Na]⁺

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

Bảng 5. Số liệu phổ ¹H- NMR và ¹³C-NMR (δ , ppm) của hợp chất gymsylosit E

C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (dạng píc, <i>J</i> = Hz)	C	^{a,b} δ_C	^{a,c} δ_H (dạng píc, <i>J</i> = Hz)
1	39,8	1,08 (m)/1,80 (m)	2	36,7	1,53 (m)/2,05 (m)
2	30,2	1,58 (m)/1,84 (m)	3	78,5	3,81 (m)
3	79,3	3,50 (m)	4	83,8	3,24 (m)
4	39,8	2,20 (m)/2,33 (m)	5	69,9	3,80 (m)
5	140,0	-	6	18,4	1,19 (d, 6,4)
6	120,0	5,32 (br s)	3-OMe	58,5	3,42 (s)
7	35,2	2,11 (m)	Ole		
8	74,9	-	1	102,6	4,57 (d, 9,2)
9	44,7	1,49 (m)	2	37,6	1,40 (m)/2,30 (m)
10	38,0	-	3	80,3	3,35 (m)
11	25,9	1,63 (m)/2,00 (m)	4	84,1	3,18 (m)
12	75,1	4,68 (m)	5	72,6	3,38 (m)
13	57,6	-	6	18,8	1,36 (d, 7,2)
14	89,3	-	3-OMe	57,6	3,39 (s)
15	34,3	1,83 (m)/1,90 (m)	Thv		
16	33,5	1,75 (m)	1	104,2	4,43 (d, 7,6)
17	89,1	-	2	75,2	3,23 (m)
18	11,2	1,53 (s)	3	86,3	3,17 (m)
19	18,6	1,12 (s)	4	82,9	3,30 (m)

20	71,5	3,45 (m)	5	72,5	3,38 (m)
21	18,9	1,05 (d, 6,4)	6	18,5	1,36 (d, 7,2)
12- <i>O</i> -Tig			3-OMe	61,2	3,60 (s)
1	169,1	-	Glc		
2	130,1	-	1	104,3	4,41 (d, 7,6)
3	139,5	6,98 (q, 7,2)	2	75,6	3,15 (m)
4	14,5	1,80 (d, 7,2)	3	78,3	3,23 (m)
5	12,2	1,85 (s)	4	71,8	3,20 (m)
Cym			5	77,9	3,31 (m)
1	97,2	4,84 (br d, 9,6)	6	63,2	3,62 (m)/3,84 (m)

^aĐo trong CD₃OD, ^b100 MHz, ^c400 MHz, cym: β -D-cymaropyranosyl, ole: β -D-oleandropyranosyl, thv: β -D-thevetopyranosyl, glc: β -D-glucopyranosyl

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác dụng được lý của các hợp chất gymsylosit

Các hợp chất gymsylosit theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza như sau:

Hoạt tính ức chế α -glucosidaza được thực hiện dựa trên phản ứng thủy phân 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranosit (p NPG) thành đường glucoza và p-nitrophenol, hợp chất có màu vàng, dưới xúc tác của enzym α -glucosidaza, Khi mẫu thử có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza, sự tạo thành hợp chất p-nitrophenol sẽ giảm, do vậy mật độ quang (OD) của p-nitrophenol so với mẫu đối chứng, không bị ức chế sẽ giảm theo. Mật độ quang (OD) của p-nitrophenol sinh ra sau phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm và được dùng để đánh giá hoạt động ức chế enzym của mẫu thử. Nồng độ ức chế 50%, IC₅₀ được xây dựng trên 5 nồng độ thử nghiệm. Giá trị IC₅₀ được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 5,0. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

Trong mỗi giếng nghiên cứu chứa: 50 μ L mẫu thử và 100 μ L dung dịch enzym α -glucosidaza được ủ 25°C trong 5 phút, tiếp tục bổ sung 50 μ L 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranosit (p NPG), đo trên máy ELISA ở bước sóng 405 nm, Chất chuẩn dương (*positive control*) acarbose được dùng để kiểm soát độ ổn định và đánh giá hoạt tính ức chế tương đương. Các phép thử được lặp lại 3 lần. Acarbose được sử dụng làm chất đối chứng dương.

Kết quả được biểu thị trên Hình 1.

Ví dụ 3: Thử nghiệm về tác dụng dược lý của các hợp chất gymnosylosit

Các hợp chất gymnosylosit theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính ức chế enzym α -amylaza như sau:

Hoạt tính ức chế enzym α -amylaza được thực hiện dựa vào phản ứng tạo màu của tinh bột xanh Starch azure (Brilliant Blue R) với dung dịch đệm Tris dưới xúc tác của enzym α -amylaza. Khi mẫu thử có hoạt tính ức chế enzym α -amylaza: sự phân cắt liên kết α -1,4 của thành phần amiloza và amilopectin trong tinh bột bị cản trở, sự tạo thành các polysacarit nhỏ, disacarit glucoza và chất mang màu xanh (Brilliant Blue R) giảm. Giá trị IC_{50} được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 5.0. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau: Trong một ống mẫu có chứa 100 μ L mẫu, 100 μ L tinh bột xanh và 50 μ L enzym α -amylaza, sau đó ủ ở $37^{\circ}C$ trong 15 phút, tiếp tục 250 μ L axit axetic dùng để phản ứng, ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó hút 200 μ L dịch trong vào hai giếng, đo trên máy ELISA ở bước sóng 595 nm. Các phép thử được lặp lại 3 lần. Acarbose được sử dụng làm chất đối chứng dương.

Kết quả được thể hiện ở Hình 2.

Các hợp chất gymnosylosit B-D có tác động ức chế α -amylaza với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 113,0 đến 176,2 μ M, so với các đối chứng dương, acarbose, giá trị IC_{50} là $72,4 \pm 0,8$ μ M.

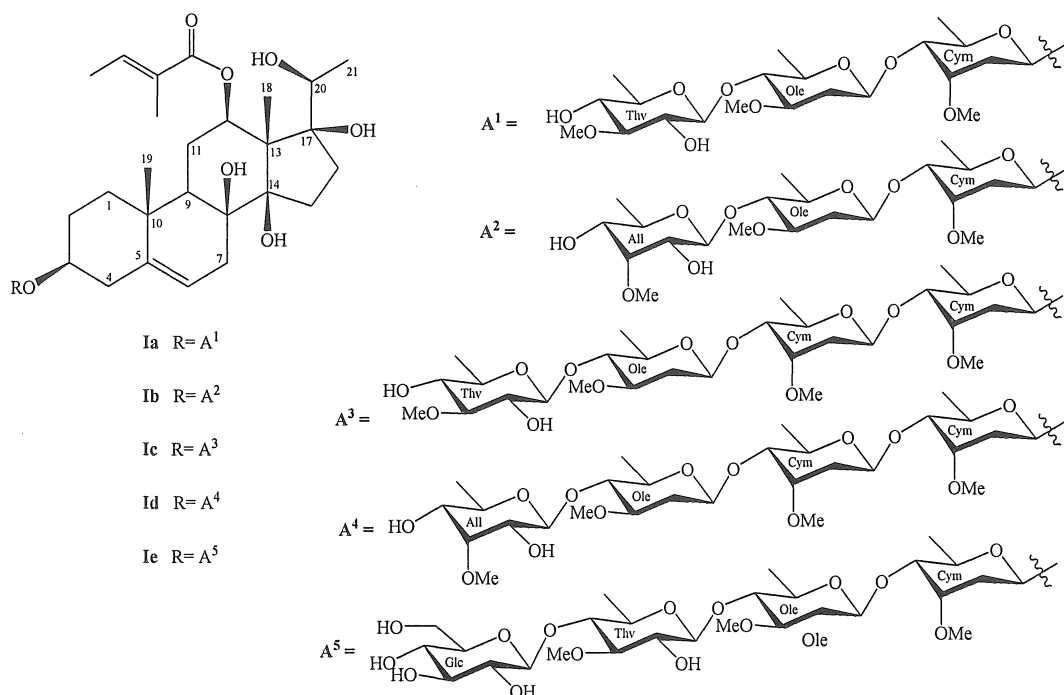
Kết quả này có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao, tạo cơ sở để nghiên cứu phát triển các dược phẩm mới có tác dụng điều trị bệnh đái tháo đường từ loài dây thìa canh.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập các hợp chất mới, gymnosylosit A-E từ cây dây thìa canh *Gymnema sylvestre* thu hái ở Hải Lộc, Hải Hậu, Nam Định. Tất cả các hợp chất này đã được đánh giá tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza và α -amylaza. Các hợp chất gymnosylosit B-D ức chế α -amylaza với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 113,0 đến 176,2 μ 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 đái tháo đường 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 gymnsylosit A-E có công thức sau:



2. Phương pháp chiết các hợp chất gymnsylosit A-E theo điểm 1 từ loài dây thìa canh *Gymnema sylvestre*, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) mẫu cây dây thìa canh *Gymnema sylvestre* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được ngâm chiết 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 60 phút;

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

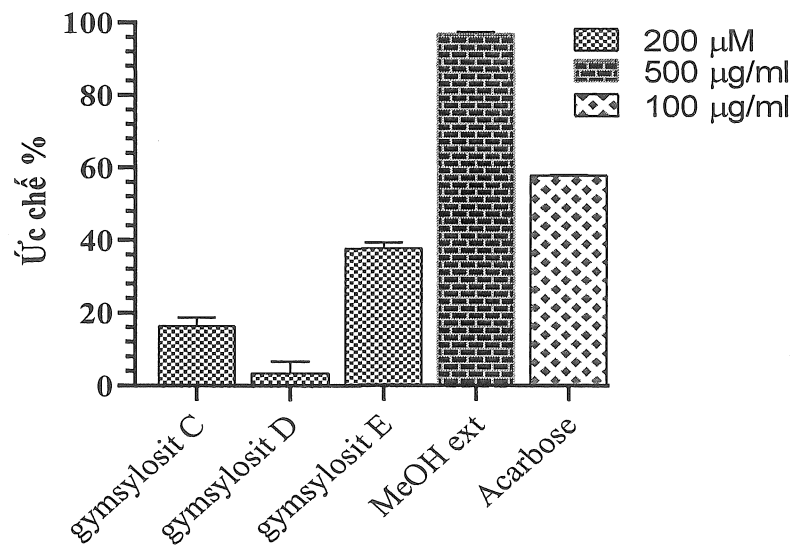
(iii) hòa tan dịch cô GS với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến cloroform và sau cùng là etyl axetat, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết diclometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô cloroform, ký hiệu là dịch cô GS2;

(iv) dịch cô GS2 được tiến hành phân tách 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) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỉ lệ 100/1-0/1) thu được bảy phân đoạn ký hiệu lần lượt từ GS-2A đến GS-2G;

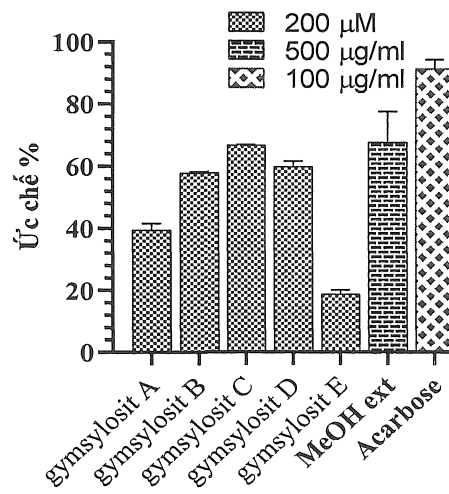
(v) hòa tan phân đoạn GS-2F vào hỗn hợp dung môi cloroform/rượu metylic với tỷ lệ 2/1 về thể tích và tiến hành phân tách trên sắc ký trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), tỷ lệ GS-2F/silica gel = 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải cloroform/rượu metylic (11/1, v/v), thu được bốn phân đoạn ký hiệu là GS-2F1 đến GS-2F4.

(vi) hòa tan phân đoạn GS-2F1 bằng lượng tối thiểu rượu metylic rồi tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký ái lực 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 rượu metylic/nước cất tỉ lệ 4/1 về thể tích, tạo ra năm phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ GS-2F1A đến GS-2F1D, các hợp chất gymosylosit A và gymosylosit B thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn GS-2F1B khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (150 $\times$ 200 mm), điều kiện dung môi axetonitril 40% trong nước, các hợp chất gymosylosit C và gymosylosit D thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn GS-2F1D khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC trên cột J'sphere H-80 (150 $\times$ 200 mm), điều kiện dung môi là 40% axetonitril trong nước;

(vii) phân đoạn GS-2G được sắc ký trên tách trên cột pha đảo (RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , Fuji silysia Chemical Ltd.) để cho bốn phân đoạn nhỏ hơn, GS-2G1-GS-2G4, phân đoạn GS-2G3 được sắc ký trên hệ thống HPLC, dung môi axetonitril 42% trong nước cho hợp chất gymosylosit E dưới dạng bột vô định hình.



Hình 1



Hình 2