



(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)



1-0030145

(51)⁷ A61K 35/00

(13) B

(21) 1-2018-01898

(22) 04/05/2018

(45) 25/11/2021 404

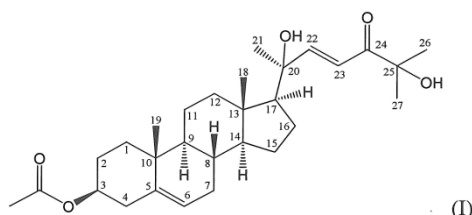
(43) 25/11/2019 380A

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

(72) Châu Văn Minh (VN); Nguyễn Hoài Nam (VN); Ninh Thị Ngọc (VN); Trần Thị
Hong Hạnh (VN); Nguyễn Xuân Cường (VN); Nguyễn Văn Thanh (VN); Đỗ Thị
Thảo (VN); Đỗ Công Thung (VN); Phan Văn Kiệm (VN).

(54) HỢP CHẤT STEROIT CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG TẾ BÀO UNG THƯ VÀ
PHƯƠNG PHÁP CHIẾT HỢP CHẤT NÀY TỪ SAN HÔ SỪNG (VERRUCELLA
CORONA)

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất steroid có công thức (I) dưới đây và phương pháp chiết
hợp chất này từ san hô sừng (Verrucella corona) sinh sống ở các vùng biển Việt Nam. Hợp
chất này có hoạt tính gây độc tế bào ung thư tốt trên tám dòng tế bào ung thư được thử
nghiệm là ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư gan (HepG2), ung thư biểu mô (KB),
ung thư vú (MCF7), ung thư da (SK-Mel2), ung thư máu (HL-60), ung thư phổi (LU-1) và
ung thư ruột (SW480).



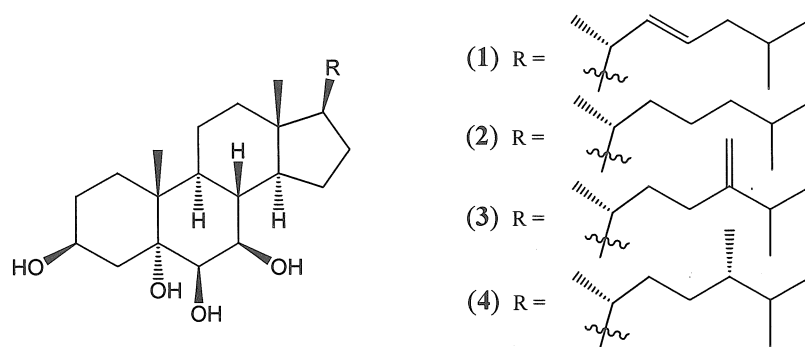
Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa học, cụ thể là sáng chế đề cập đến hợp chất steroid (22*E*)-3 β ,20,25-trihydroxycholest-5,22-dien-24-on-3-axetat (được đặt tên là verrucorosterone) có hoạt tính kháng tế bào ung thư và phương pháp chiết hợp chất này từ san hô sừng *Verrucella corona* sinh sống ở các vùng biển Việt Nam.

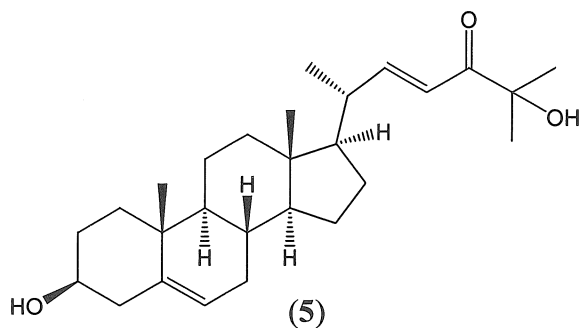
Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các loài san hô sừng đã và đang nhận được sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới bởi sự đa dạng về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của chúng. Trong số các loài san hô sừng, *Verrucella* là một giống còn rất ít được nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học. Theo dữ liệu tra cứu sử dụng Scifinder, hiện chưa có nghiên cứu nào được công bố về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học loài *Verrucella corona*.

Hiện tại, chỉ có một số công trình đã công bố về hóa học và hoạt tính sinh học của các loài thuộc giống *Verrucella*. Năm 2010, tài liệu Ling-Ling Sun et al., *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38, 1085–1087 mô tả phương pháp phân lập 10 hợp chất steroid từ loài *Verrucella umbraculum*. Tuy nhiên, không có số liệu về hoạt tính sinh học của các hợp chất này được công bố. Đến năm 2014, tài liệu Fei Cao et al., *Helvetica Chimica Acta*, 2014, 97(6), 900-908 mô tả phương pháp phân lập 9 hợp chất polyhydroxysteroid từ loài *V. umbraculum*. Trong đó, các hợp chất verumbsteroid A (1), cholestan-3 β ,5 α ,6 β ,7 β -tetrol (2), ergost-24(28)-en-3 β ,5 α ,6 β ,7 β -tetrol (3) và (24*S*)-ergostan-3 β ,5 α ,6 β ,7 β -tetrol (4) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên năm dòng tế bào ung thư là HL-60, K562, HeLa, A-549 và HCT-116 với giá trị IC₅₀ trong khoảng từ 2,76 đến 9,62 μ M. Các hợp chất này đều có chung cấu trúc nhân steroid với năm nhóm OH tại các vị trí 3 β ,5 α ,6 β ,7 β .



Ngoài ra, tài liệu: Riming Huang et al., *Chemistry of Natural Compounds*, 2012, 48(3), 516-517 mô tả sáu hợp chất diterpen khung briaran là robustolide A, renillafoulin A, erythrolide B 9, 4-deacetyljunceellolide D, junceellonoid D và frajunolide A phân lập được từ loài *Verrucella umbraculum*; và tài liệu: Riming Huang et al., *Natural Product Research*, 2013, 27(4-5), 319-322 mô tả ba hợp chất có chứa nitơ là 9-acetyl-1,3,7-trimethyl-pyrimidinedion, cafein và 1,3-dimethylpyrimidin-2,4(1H,3H)-dion cũng được phân lập từ loài này. Tuy nhiên, vẫn không có số liệu về hoạt tính sinh học của các hợp chất trên được công bố.



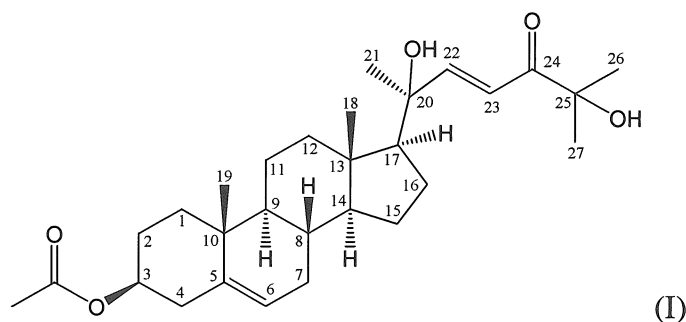
Trong khuôn khổ hợp phần dự án nghiên cứu tìm kiếm các chất có khả năng chống ung thư từ dược liệu san hô ở vùng biển Trung Bộ Việt Nam, nhóm nghiên cứu đã đi sâu nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào ung thư của loài san hô sừng (*Verrucella corona*) thu tại vùng biển Vịnh Mốc, Quảng Trị vào tháng 5 năm 2016 và phân lập được một hợp chất steroid mới được đặt tên là verrucorosterone. Đây là lần đầu tiên một nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài này được thực hiện. Hợp chất verrucorosterone theo sáng chế có cấu trúc mạch nhánh độc đáo với sự có mặt của hai nhóm OH tại C-20 và C-25, liên kết đôi dạng *trans* tại C-22/C-23 và nhóm keton tại C-24. Theo dữ liệu tra cứu sử dụng Scifinder, trên toàn thế giới hiện chưa có hợp chất steroid nào được công bố có

cấu trúc mạch nhánh giống với mạch nhánh của hợp chất verrucorosterone. Hợp chất (22*E*)-3 β ,25-dihydroxycholest-5,22-dien-24-on (5) có cấu trúc tương tự như verrucorosterone với sự mất đi nhóm OH tại C-20 và nhóm axetyl tại C-3 đã được mô tả trong tài liệu: Ruth D. Coldwell et al., *Steroids*, 1990, 55(10), 418-432. Tuy nhiên, hợp chất này thu được là một sản phẩm trung gian của quá trình tổng hợp và cũng chưa có số liệu nào về hoạt tính sinh học của nó được công bố.

Trong lĩnh vực tìm kiếm các chất chống ung thư, việc tìm kiếm, sàng lọc và đánh giá các chất có khả năng ức chế và tiêu diệt các tế bào ung thư dựa trên khả năng gây độc các dòng tế bào ung thư thực nghiệm là vô cùng quan trọng. Như vậy, hợp chất verrucorosterone theo sáng chế có cấu trúc hóa học độc đáo và thể hiện hoạt tính tốt trên tám dòng tế bào ung thư được thử nghiệm là ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư gan (HepG2), ung thư biểu mô (KB), ung thư vú (MCF7), ung thư da (SK-Mel2), ung thư máu (HL-60), ung thư phổi (LU-1) và ung thư ruột (SW480). Phương pháp chiết hợp chất verrucorosterone từ loài san hô sừng (*Verrucella corona*) được đề cập theo sáng chế để thực hiện, đảm bảo độ lặp lại và cho hiệu suất cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế nhằm góp phần nghiên cứu và phân lập các hoạt chất có hoạt tính gây độc tế bào ung thư, tạo tiền đề quan trọng trong việc bào chế dược phẩm góp phần phòng và điều trị ung thư từ hoạt chất phân lập được. Để đạt được mục đích này, theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất steroid được phân lập từ san hô sừng (*Verrucella corona*) có công thức (I):



Hợp chất steroid mới (verrucorosterone) theo sáng chế thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư tốt trên tám dòng tế bào ung thư được thử nghiệm là ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư gan (HepG2), ung thư biểu mô (KB), ung thư vú (MCF7),

ung thư da (SK-Mel2), ung thư máu (HL-60), ung thư phổi (LU-1) và ung thư ruột (SW480).

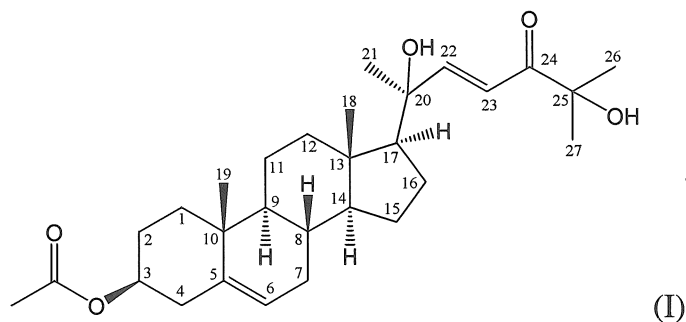
Sáng chế cũng đề xuất phương pháp chiết hợp chất steroid từ san hô sừng (*Verrucella corona*). Phương pháp theo sáng chế đơn giản, có độ ổn định và hiệu suất cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết với các ví dụ và các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên các ví dụ và các phương án thực hiện này chỉ nhằm làm rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

San hô sừng có tên khoa học là *Verrucella corona* được thu gom tại Vịnh Mốc, Quảng Trị. Tên khoa học được giám định tại Viện Tài nguyên và Môi trường Biển. Mẫu san hô sừng sau khi thu gom được tiến hành rửa sạch, xay nhỏ, chiết, phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất theo các phương pháp mô tả dưới đây: Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715), RP18 F254s (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu. Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là Silicagel pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (240-430 mesh, Merck). Silicagel pha đảo YMC*GEL (ODS-A, 12 nm S-150 µm, YMC Co., Ltd.). Sắc ký lỏng trung áp (MPLC) được thực hiện trên máy Biotage - Isolera One. Độ quay cực được đo trên máy JASCO P-2000. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy AVANCE III HD 500. Phổ khối lượng phân giải cao HR-QTOF-MS được đo trên máy Agilent 6530 Accurate-Mass spectrometer.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất steroid được chiết từ San hô sừng (*Verrucella corona*) có công thức (I):



Hợp chất steroid này có danh pháp hóa học là (22*E*)-3β,20,25-trihydroxycholest-5,22-dien-24-on-3-axetat. Các thông số hoá lý của hợp chất này là như sau:

Công thức phân tử: $C_{29}H_{44}NaO_5$;

Khối lượng phân tử: $M = 472$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22} -45$ (c 0.10, $CHCl_3$);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-QTOF-MS tại m/z 473,3265 $[M+H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{29}H_{45}O_5^+$, 473.3262) và 495.3079 $[M+Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{29}H_{44}NaO_5^+$, 495.3081);

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp chiết hợp chất steroid có công thức (I) từ san hô sừng (*Verrucella corona*) bao gồm các bước:

(i) chiết xuất san hô sừng (*Verrucella corona*) bằng cách chiết xuất san hô sừng đã được xay thành bột bằng rượu metylic theo tỷ lệ khối lượng bột san hô sừng/thể tích rượu metylic là 1/2, chiết 3 lần trong điều kiện siêu âm, mỗi lần chiết trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng thu được dịch chiết;

(ii) thu dịch nước (VC-W) bằng cách lọc dịch chiết thu được ở bước (i), cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô, hòa tan dịch cô với nước theo tỷ lệ khối lượng dịch cô/thể tích nước là 1/10, sau đó chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan 1 lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, lớp nước được tiến hành cất loại bỏ *n*-hexan dưới áp suất giảm thu được dịch nước, ký hiệu là VC-W;

(iii) phân tách để thu các phân đoạn bằng cách chiết phân bố VC-W bằng etyl axetat 3 lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, lớp etyl axetat được tiến hành cất loại bỏ dung môi dưới

áp suất giảm thu được cạn chiết, tiếp theo phân tách cạn chiết trên sắc ký lỏng trung áp (MPLC) sử dụng cột nhồi silica gel, pha động gradient *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ từ 50:1 đến 1:1 về thể tích thu được 6 phân đoạn ký hiệu từ VC-E1 đến VC-E6 tương ứng với các nồng độ *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 50/1, 25/1, 13/1, 7/1, 3/1, 1/1 về thể tích;

(iv) thu các phân đoạn nhỏ bằng cách phân lập phân đoạn VC-E4 trên MPLC sử dụng cột nhồi silica gel pha đảo RP-18, pha động gradient MeOH/H₂O theo tỷ lệ từ 2:1 đến 100:1 về thể tích thu được 10 phân đoạn nhỏ hơn lần lượt được ký hiệu là VC-E4A đến VC-E4J tương ứng với các nồng độ MeOH/H₂O theo tỷ lệ 2/1, 3/1, 4/1, 5/1, 6/1, 8/1, 10/1, 20/1, 30/1, 100/1 về thể tích; và

(v) thu hợp chất steroid bằng cách phân lập phân đoạn VC-E4F trên sắc ký trên cột với chất hấp phụ là silicagel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ VC-E4/silica gel = 1/20 về khối lượng) và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là CH₂Cl₂/EtOAc với tỷ lệ về thể tích là 7/1 thu được 8 phân đoạn nhỏ hơn lần lượt được ký hiệu là VC-E4F1 đến VC-E4F8, tiếp theo tinh chế phân đoạn VC-E4F5 bằng sắc ký cột YMC rửa giải bằng hệ dung môi MeOH/H₂O theo tỷ lệ là 6/1 về thể tích thu được hợp chất steroid dưới dạng chất bột màu trắng.

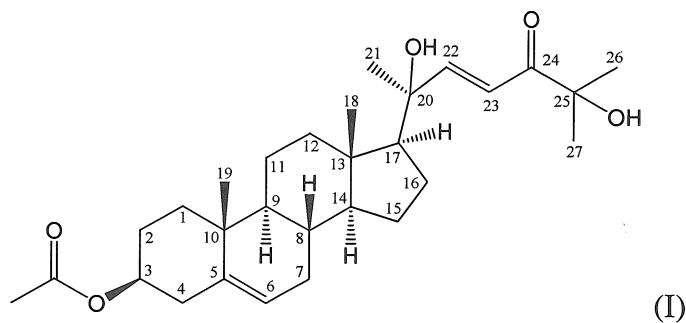
Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chiết hợp chất verrucorosterone từ san hô sừng (*Verrucella corona*)

Mẫu khô san hô sừng (*Verrucella corona*) được xay nhỏ thu bột, cân 8kg bột và chiết 3 lần bằng rượu metylic (mỗi lần 16 lít) trong điều kiện siêu âm, mỗi lần trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các dịch chiết trong rượu metylic được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là dịch cô VC-M (500 g). Hòa tan dịch cô VC-M với nước cất (5 lít) rồi chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan 1 lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, lớp nước được tiến hành cất loại bỏ *n*-hexan (còn sót) dưới áp suất giảm để thu được dịch nước, ký hiệu là dịch VC-W. Dịch VC-W được tiếp tục chiết phân bố bằng ethyl axetat 3 lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, lớp ethyl axetat được tiến hành cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cạn chiết ký hiệu là VC-E (60 g).

Cặn VC-E (60 g) được tiến hành phân tách trên sắc ký lỏng trung áp (MPLC) sử dụng cột nhồi silica gel (Biotage® KP-SIL 340 g), pha động gradient *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ từ 50:1 đến 1:1 về thể tích thu được 6 phân đoạn ký hiệu từ VC-E1 đến VC-E6 tương ứng với các nồng độ *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 50/1, 25/1, 13/1, 7/1, 3/1, 1/1 về thể tích. Phân đoạn VC-E4 (20 g) được tiếp tục tiến hành phân lập trên MPLC sử dụng cột nhồi silica gel pha đảo RP-18 (Biotage® KP-C18-HS 120 g), pha động gradient MeOH/H₂O theo tỷ lệ từ 2:1 đến 100:1 về thể tích thu được 10 phân đoạn nhỏ hơn lần lượt được ký hiệu là VC-E4A đến VC-E4J tương ứng với các nồng độ MeOH/H₂O theo tỷ lệ 2/1, 3/1, 4/1, 5/1, 6/1, 8/1, 10/1, 20/1, 30/1, 100/1 về thể tích. Phân đoạn VC-E4F (2,5 g) được tiếp tục tiến hành phân lập trên sắc ký trên cột (Φ 2,5 cm, L 80 cm) với chất hấp phụ là silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ VC-E4/silica gel = 1/20 về khối lượng) và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là CH₂Cl₂/EtOAc với tỷ lệ về thể tích là 7/1 thu được 8 phân đoạn nhỏ hơn lần lượt được ký hiệu là VC-E4F1 đến VC-E4F8. Tinh chế phân đoạn VC-E4F5 (150 mg) bằng sắc ký cột YMC (Φ 1,0 cm, L 80 cm) rửa giải bằng hệ dung môi MeOH/H₂O với tỷ lệ về thể tích là 6/1 thu được 20 mg hợp chất verrucorosterone dưới dạng chất bột màu trắng.

Hợp chất (22*E*)-3β,20,25-trihydroxycholest-5,22-dien-24-on-3-axetat (verrucorosterone) thu được có công thức (I):



Các thông số hoá lý của hợp chất này là như sau:

Công thức phân tử: C₂₉H₄₄NaO₅;

Khối lượng phân tử: M = 472;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ -45 (c 0.10, CHCl_3);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-QTOF-MS tại m/z 473,3265 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{O}_5^+$, 473.3262) và 495.3079 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{NaO}_5^+$, 495.3081);

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

Bảng 1. Số liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất verrucorosterone có công thức (I).

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ dạng tín hiệu ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	37,0	1,03 m/1,85 m	
2	27,7	1,58 m/1,86 m	
3	73,9	4,60 m	
4	38,1	2,31 m	
5	139,7	-	
6	122,4	5,37 br s	4, 8, 10
7	31,7	1,55 m/1,97 m	
8	31,3	1,46 m	
9	49,9	0,96 dt (5,0, 12,5)	
10	36,6	-	
11	20,8	1,45 m/1,53 m	
12	40,1	1,28 m/2,09 m	
13	43,1	-	
14	56,5	1,02 m	
15	23,3	1,65 m	
16	23,9	1,14 m/1,65 m	
17	59,8	1,65 m	
18	14,1	0,78 s	12, 13, 14, 17
19	19,3	1,01 s	1, 5, 9, 10
20	76,1	-	
21	29,0	1,38 s	17, 20, 22
22	155,6	7,21 d (15,0)	20, 21, 23, 24
23	118,1	6,63 d (15,0)	20, 22, 24
24	202,9	-	
25	75,4	-	
26	26,3	1,39 s	24, 25, 27
27	26,3	1,40 s	24, 25, 26
3-OAc	170,5	-	
	21,4	2,03 s	
25-OH	-	3,96 s	24, 25, 26, 27

^aĐo trong CDCl_3 , ^b125 MHz, ^c500 MHz.

Ví dụ 2: Thử nghiệm tác dụng gây độc tế bào ung thư của hợp chất verrucorosterone

Hợp chất verrucorosterone theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính gây độc tế bào bằng phương pháp SRB (Monks A. et al. *Journal of the National Cancer Institute*, 1991, 83(11), 757-766.) như sau:

Các dòng tế bào ung thư được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường nuôi cấy DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) với thành phần kèm theo gồm L-glutamin 2mM, 1,5 g/L natri bicacbonat, 4,5 g/L glucoza, HEPES 10 mM và natri pyruvat 1,0mM, ngoài ra bổ sung huyết thanh bê tươi 10% (FBS - Fetal Bovine Serum, GIBCO). Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂.

Hợp chất verrucorosterone được pha ở nồng độ gốc là 4 mg/ml trong dimethylsulfoxit (DMSO) 10%. Sau đó được pha loãng để có nồng độ cuối cùng trong giếng thử là 20 µg/ml trong các phép thử sàng lọc. Ở các phép thử xác định nồng độ ức chế 50% sự phát triển tế bào ung thư (IC₅₀), các chất được tiếp tục pha loãng để tạo loạt nồng độ 100, 20, 4 và 0,8 µg/ml bằng DMSO 10%. Các tế bào ung thư được nuôi trong phiên vi lượng 96 giếng, được thử chất, nhuộm bằng SRB (sulforhodamin B) và đo hàm lượng protein tổng số ở bước sóng 515 nm bằng máy đọc vi phiên (Microplate Reader, BioRad). Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{[\text{OD}_{(\text{chất thử})} - \text{OD}_{(\text{ngày 0})}] \times 100}{\text{OD}_{(\text{đối chứng âm})} - \text{OD}_{(\text{ngày 0})}}$$

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \% \text{ sống sót}$$

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác của thí nghiệm và của dữ liệu. DMSO 10% là dung môi pha chất được sử dụng như đối chứng âm. Ellipticine (Sigma) được sử dụng làm đối chứng dương và được thử nghiệm ở các nồng độ 10,0, 2,0, 0,4 và 0,08 µg/ml. Sau quá trình xử lý số liệu bằng phần mềm TableCurve 2Dv4, các giá trị IC₅₀ đã được tính toán và cho thấy độ tin cậy cao (sai số $p < 0,01$). Kết quả được nêu trong Bảng 2:

Bảng 2: Kết quả hoạt tính gây độc tế bào *in vitro*

Hợp chất	Giá trị IC ₅₀ (μM)							
	LNCaP	HepG2	KB	MCF-7	SK-Mel2	HL-60	LU-1	SW480
Verrucorosterone	19,48±1,05	17,01±1,52	17,75±2,41	13,61±0,86	14,06±1,55	18,91±0,84	12,85±1,11	13,92±1,64
Ellipticine ^a	1,71±0,24	1,67±0,28	1,42±0,12	1,54±0,20	1,50±0,16	1,67±0,08	1,87±0,08	1,99±0,16

^aChất chuẩn dương

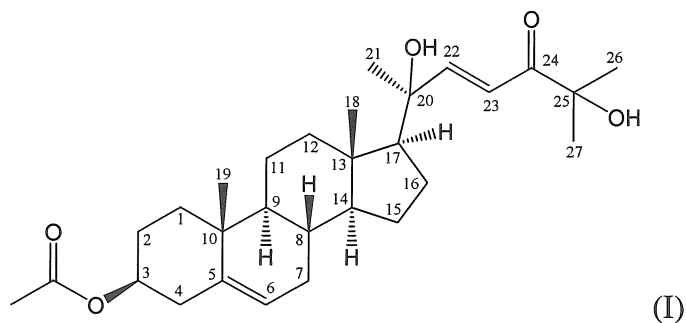
Như vậy, hợp chất verrucorosterone có biểu hiện hoạt tính tốt trên tất cả 8 dòng tế bào ung thư đã thử nghiệm.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết được hợp chất steroid mới verrucorosterone từ san hô sừng (*Verrucella corona*) thu ở vùng biển Vịnh Mốc, Quảng Trị. Hợp chất này có hoạt tính gây độc tế bào ung thư tốt trên tám dòng tế bào ung thư được thử nghiệm là ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư gan (HepG2), ung thư biểu mô (KB), ung thư vú (MCF7), ung thư da (SK-Mel2), ung thư máu (HL-60), ung thư phổi (LU-1) và ung thư ruột (SW480). Sáng chế này tạo cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng gây độc tế bào ung thư từ nguồn dược liệu biển quý và sẵn có trong nước, cụ thể là loài san hô sừng (*Verrucella corona*) phân bố rộng rãi và có trữ lượng dồi dào ở vùng biển Trung Bộ Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất steroid được chiết từ san hô sừng (*Verrucella corona*) có công thức (I):



2. Phương pháp chiết hợp chất steroid có công thức (I) từ san hô sừng (*Verrucella corona*) bao gồm các bước:

(i) chiết xuất san hô sừng (*Verrucella corona*) bằng cách chiết xuất san hô sừng đã được xay thành bột bằng rượu metylic theo tỷ lệ khối lượng bột san hô sừng/thể tích rượu metylic là 1/2, chiết 3 lần trong điều kiện siêu âm, mỗi lần chiết trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng thu được dịch chiết;

(ii) thu dịch nước (VC-W) bằng cách lọc dịch chiết thu được ở bước (i), cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô, hòa tan dịch cô với nước theo tỷ lệ khối lượng dịch cô/thể tích nước là 1/10, sau đó chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan 1 lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, lớp nước được tiến hành cất loại bỏ *n*-hexan dưới áp suất giảm thu được dịch nước, ký hiệu là VC-W;

(iii) phân tách để thu các phân đoạn bằng cách chiết phân bố VC-W bằng etyl axetat 3 lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, lớp etyl axetat được tiến hành cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết, tiếp theo phân tách cặn chiết trên sắc ký lỏng trung áp (MPLC) sử dụng cột nhồi silica gel, pha động gradient *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ từ 50:1 đến 1:1 về thể tích thu được 6 phân đoạn ký hiệu từ VC-E1 đến VC-E6 tương ứng với các nồng độ *n*-hexan/axeton theo tỷ lệ 50/1, 25/1, 13/1, 7/1, 3/1, 1/1 về thể tích;

(iv) thu các phân đoạn nhỏ bằng cách phân lập phân đoạn VC-E4 trên MPLC sử dụng cột nhồi silica gel pha đảo RP-18, pha động gradient MeOH/H₂O theo tỷ lệ từ

2:1 đến 100:1 về thể tích thu được 10 phân đoạn nhỏ hơn lần lượt được ký hiệu là VC-E4A đến VC-E4J tương ứng với các nồng độ MeOH/H₂O theo tỷ lệ 2/1, 3/1, 4/1, 5/1, 6/1, 8/1, 10/1, 20/1, 30/1, 100/1 về thể tích; và

(v) thu hợp chất steroid bằng cách phân lập phân đoạn VC-E4F trên sắc ký trên cột với chất hấp phụ là silicagel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ VC-E4/silica gel = 1/20 về khối lượng) và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là CH₂Cl₂/EtOAc với tỷ lệ về thể tích là 7/1 thu được 8 phân đoạn nhỏ hơn lần lượt được ký hiệu là VC-E4F1 đến VC-E4F8, tiếp theo tinh chế phân đoạn VC-E4F5 bằng sắc ký cột YMC rửa giải bằng hệ dung môi MeOH/H₂O theo tỷ lệ là 6/1 về thể tích thu được hợp chất steroid dưới dạng chất bột màu trắng.