



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0044423

(51)^{2022.01} C07D 311/00; A61K 31/00; A61P 35/00 (13) B

(21) 1-2022-07616

(22) 22/11/2022

(45) 25/03/2025 444

(43) 27/01/2023 418A

(71) Trường Đại học Giao thông Vận tải (VN)

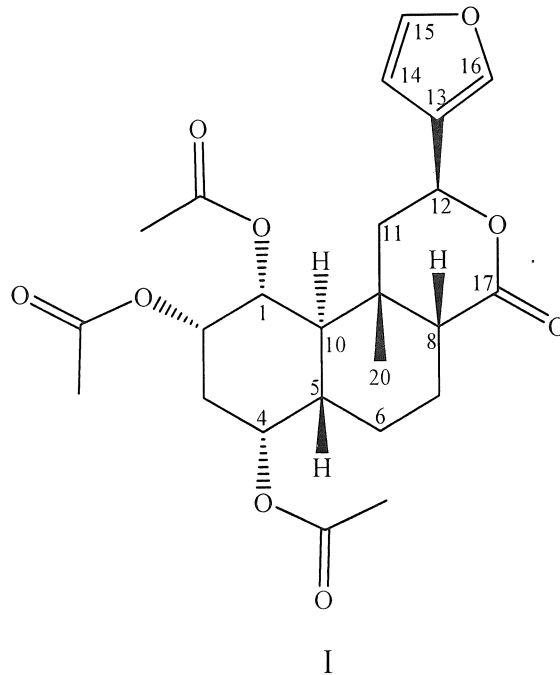
Số 3 đường Cầu Giấy, phường Láng Thượng, quận Đống Đa, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Mai (VN); Bùi Thị Mai Anh (VN); Trần Thúy Nga (VN); Vũ Thị Xuân (VN); Phan Văn Kiệm (VN).

(54) HỢP CHẤT TINOSINODANE CÓ TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM VÀ PHƯƠNG
PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI DÂY ĐAU XƯƠNG TINOSPORA
SINENSIS

(21) 1-2022-07616

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất tinosinodane có công thức (I) và phương pháp phân lập hợp chất này từ lá *T. sinensis* thu hái tại Phúc Yên, Vĩnh Phúc. Hợp chất tinosinodane có tác dụng kháng viêm. Hợp chất tinosinodane và phương pháp phân lập 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 hỗ trợ điều trị các triệu chứng viêm.



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 kháng viêm nhằm nghiên cứu ứng dụng để ức chế, điều trị các triệu chứng viêm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập và tác dụng kháng viêm của hợp chất clerodane dinorditerpenoid mới từ lá loài dây đau xương *Tinospora sinensis* (Lour.) Merr. ở Việt Nam.

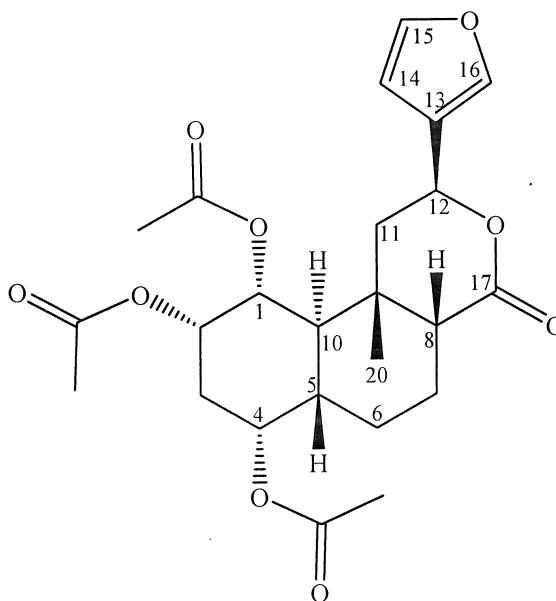
Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc nghiên cứu, phát hiện các hợp chất mới có hoạt tính sinh học từ thiên nhiên nhằm bảo vệ sức khỏe của con người là một trong những nhiệm vụ quan trọng đặt ra cho các nhà khoa học. Viêm là căn bệnh rất phổ biến ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Viêm là một đáp ứng bảo vệ cơ thể của hệ miễn dịch trước sự tấn công của tác nhân bên ngoài (vi sinh vật, tác nhân hóa, lý, cơ) hoặc của tác nhân bên trong (hoại tử do thiếu máu cục bộ, bệnh tự miễn). Đây là một đáp ứng miễn dịch tự nhiên. Quá trình viêm thường kèm theo các triệu chứng sưng, nóng, đỏ và đau, do các mạch máu giãn nở, đưa nhiều máu đến nơi tổn thương. Các bạch cầu cũng theo mạch máu xâm nhập vào mô, tiết các chất nhằm tiêu diệt hoặc trung hòa các tác nhân gây tổn thương. Khi viêm không lành sẽ có thể trở thành viêm mạn tính. Các sản phẩm thuốc có nguồn gốc tự nhiên đóng vai trò quan trọng đối với sức khỏe con người trong việc phòng ngừa và điều trị các bệnh viêm nhiễm. Đã từ lâu chúng được sử dụng để chữa các bệnh về viêm như: sốt, đau dạ dày, viêm khớp,... Theo tổng kết của một số công bố về hóa dược cho thấy các terpenoid, flavonoid, saponin và các hợp chất phenol và polyphenolic có nguồn gốc thiên nhiên đều có hoạt tính chống viêm. Lá loài dây đau xương *Tinospora sinensis* (*T. sinensis*) cũng thường được sử dụng để điều trị viêm. Do vậy, việc điều tra, nghiên cứu về thành phần lá loài dây đau xương *T. sinensis*, đặc biệt là phát hiện ra hợp chất tinosinodane mới từ lá loài *T. sinensis* sẽ có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao. Nghiên cứu này sẽ góp phần làm rõ giá trị cũng như công dụng của loài dây đau xương *T. sinensis*. Vì vậy, sẽ góp phần tích cực vào việc khai thác và sử dụng một cách hợp lý nguồn tài nguyên thiên nhiên của đất nước.

Trong khuôn khổ nghiên cứu, tập thể tác giả sáng chế đã đi sâu nghiên cứu thành phần hóa học của loài dây đau xương *T. sinensis* và đã phân lập được một hợp chất có cấu trúc hóa học mới là tinosinodane. Hợp chất tinosinodane thuộc nhóm hợp chất clerodane dinorditerpenoid, khác với các hợp chất clerodane dinorditerpenoid đã công bố trước đây từ loài *T. sinensis* hay từ loài khác trong chi *Tinospora* như *T. sagittata*. Cụ thể, các hợp chất clerodane dinorditerpenoid phân lập từ loài *T. sagittata* có nhóm thế hydro hoặc nhóm chức carbonyl ($=O$) tại vị trí C-1, nhóm thế hydro hoặc nhóm glycoside tại vị trí C-2, nhóm chức carbonyl ($=O$) tại vị trí C-4 là khác với nhóm thế acetoxyl (CH_3COO-) tại các vị trí C-1, C-2, C-4 của hợp chất tinosinodane. Các hợp chất clerodane dinorditerpenoid cũng được phân lập trước đây từ loài *T. sinensis* nhưng cấu trúc của chúng có nhóm thế hydroxy tại vị trí C-1, C-2, nhóm thế glucoside tại vị trí C-4 và nhóm thế hydroxy ở vị trí C-8 là khác với nhóm thế acetoxyl (CH_3COO-) tại vị trí C-1, C-2, C-4 và không có nhóm hydroxy ở vị trí C-8 ở hợp chất tinosinodane. Đây là một phát hiện hoàn toàn mới, hợp chất tinosinodane thuộc lớp chất nhiên có tác dụng ức chế sự sản sinh NO, ứng dụng để ức chế, điều trị các triệu chứng viêm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập và tác dụng kháng viêm của các hợp chất tinosinodane và chưa được phát hiện từ trước đến nay trên thế giới. Hợp chất này cũng được đánh giá tác dụng kháng viêm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đưa ra phương pháp phân lập hợp chất tinosinodane mới từ lá loài *T. sinensis*, có công thức (I)



I

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến hợp chất mới thuộc khung clerodane dinorditerpenoid là tinosinodane có công thức (I). Hợp chất tinosinodane theo sáng chế thể hiện tác dụng kháng viêm có thể sử dụng để phát triển thành các sản phẩm hỗ trợ điều trị các bệnh có tác nhân gây viêm.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp phân lập hợp chất tinosinodane có công thức (I) từ lá loài *T. sinensis*. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập hợp chất tinosinodane trên, bao gồm các bước:

(i) Mẫu lá cây *T. sinensis* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần 60 phút.

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

(iii) Cặn chiết metanol được hòa tan với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là 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 cặn chiết *n*-hexan (L1), diclometan (L2), etyl axetat (L3) và dịch chiết nước (L4). Cặn chiết *n*-hexan (L1) được tiến hành phân tách 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 (A) trong *n*-hexan (H) là H/A tỉ lệ 50/1 → 2,5/1 thu được năm phân đoạn ký hiệu lần lượt từ L1A đến L1E.

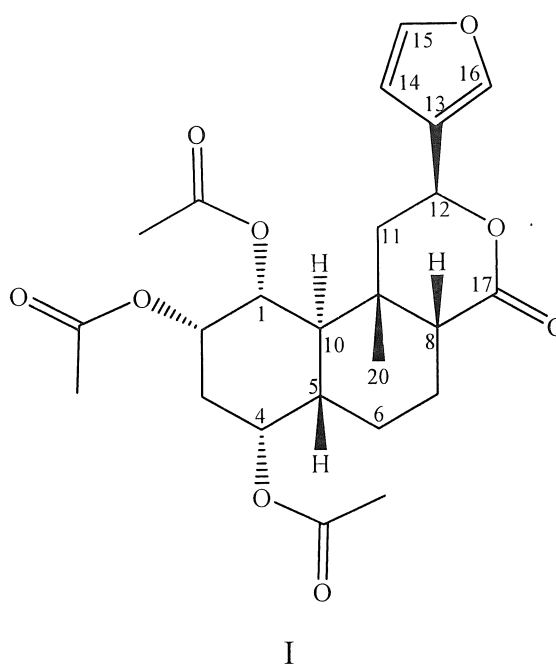
(iv) Phân đoạn L1D được tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 µm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỉ lệ 1,5/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ L1D1 đến L1D4.

(v) Hợp chất tinosinodane có công thức (I) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn L1D2 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere M-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi MeCN 50% trong nước.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mẫu lá *T. sinensis* được thu tại Phúc Yên, Vĩnh Phúc tháng 05 năm 2020. Tên khoa học được giám định bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Mẫu tiêu bản (NCCT-TSL93) được lưu giữ tại Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Mẫu *T. sinensis* 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 metanol 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 trắng 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 hơi 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 hợp chất tinosinodane có công thức (I):



Hợp chất tinosinodane có cấu trúc hóa học mới. Các thông số hóa lý của hợp chất này như sau:

Hợp chất tinosinodane có công thức (I):

+ Công thức phân tử: $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_9$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 462$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 56,0^\circ$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 463,1963 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công $[\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_9]^+$, 463,1963);

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất tinosinodane có công thức (I) từ lá *T. sinensis* như sau:

(i) Mẫu lá cây *T. sinensis* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần 60 phút.

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

(iii) Cặn chiết metanol được hòa tan với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là 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 cặn chiết *n*-hexan (L1), diclometan (L2), etyl axetat (L3) và dịch chiết nước (L4). Cặn chiết *n*-hexan (L1) được tiến hành phân tách trên cột sắc ký 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 axeton (A) trong *n*-hexan (H) là H/A tỷ lệ 50/1 → 2,5/1 thu được năm phân đoạn ký hiệu lần lượt từ L1A đến L1E.

(iv) Phân đoạn L1D được tiến hành phân tách sắc ký 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 1,5/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ L1D1 đến L1D4.

(v) Hợp chất tinosinodane có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn L1D2 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere M-80 (150 × 20 mm), điều kiện dung môi MeCN 50% trong nước.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập hợp chất tinosinodane từ lá *T. sinensis*.

Mẫu lá cây *T. sinensis* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn (3,0 kg). Sau đó, bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°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 cặn chiết metanol (150 g).

Cặn chiết metanol được hòa tan với nước cất (2 lít) rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là 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 cặn chiết *n*-hexan (L1, 100 g), diclometan (L2, 2,7 g), etyl axetat (L3, 2,6 g) và dịch chiết nước (L4). Cặn chiết *n*-hexan (L1, 100 g) được tiến hành phân tách trên cột sắc ký (Φ 8 cm, L 50 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 axeton trong *n*-hexan là H/A tỷ lệ 50/1 → 2,5/1 thu được năm phân đoạn, ký hiệu

lần lượt từ L1A đến L1E. Phân đoạn L1D được tiến hành phân tách sắc ký trên cột sắc ký (Φ 4 cm, L 60 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μ m, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải MeOH/nước cất tỉ lệ 1,5/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, kí hiệu từ L1D1 đến L1D4. Hợp chất: tinosinodane (**I**) (13,0 mg) thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng từ phân đoạn L1D2 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere M-80 (150 $\times$ 20 mm), điều kiện dung môi MeCN 50% trong nước.

Hợp chất: tinosinodane có công thức (**I**).

- + Chất bột vô định hình màu trắng;
- + Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 56,0^\circ$ (c 0,1, MeOH);
- + Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại m/z 463,1963 $[M+H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{24}H_{31}O_9]^+$, 463,1963);
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR (δ , ppm) của hợp chất tinosinodane

C	$\delta_C^{a)}$	$\delta_H^{a)} (\text{mult.}, J = \text{Hz})$
1	73,2	4,96 (dd, 11,4, 3,6)
2	68,5	5,32 (br dd, 3,6, 3,0)
3	31,5	1,84 (dt, 16,2, 3,0, β) 2,26 (dt, 16,2, 3,6, α)
4	70,3	4,90 (q, 3,0)
5	38,5	1,77 (m)
6	25,1	1,50 (m)
7	21,4	1,73 (m, α) 2,40 (m, β)
8	51,2	2,34 (dd, 4,2, 2,4)
9	35,4	-
10	35,3	2,57 (dd, 11,4, 11,4)
11	43,7	1,78 (m, β) 2,45 (dd, 14,4, 3,6, α)
12	71,0	5,65 (dd, 12,0, 3,0)
13	125,5	-
14	108,2	6,41 (dd, 1,2, 0,6)
15	143,9	7,43 (d, 1,2)
16	139,2	7,46 (d, 0,6)
17	171,6	-
20	21,8	1,14 (s)
1-OAc	169,5	-
	21,2	1,96 (s)
2-OAc	170,6	-
	21,4	2,07 (s)
4-OAc	170,2	-

	21,3	2,08 (s)
--	------	----------

^{a)} Đo trong dung môi CDCl₃, Ac, acetyl

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

Hợp chất tinosinodane theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính kháng viêm như sau:

• *Xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào macrophage RAW 264.7*

- Tế bào RAW 264.7 được đưa vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 2×10^5 tb/giếng và nuôi trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂ trong 24h.
- Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3h.
- Tế bào sau đó được ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2h trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (1 µg/mL) trong 24h.
 - Một số giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm. Trong khi đối chứng dương được sử dụng là N^G-Metyl-L-arginine axetat (L-NMMA) (Hãng Sigma) ở các nồng độ 100; 20; 4 và 0,8 µg/mL.
- Nitrite (NO₂⁻), được xem là chỉ thị cho việc tạo NO, sẽ được xác định nhờ bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể là, 100 µL môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 µL Griess reagent: 50 µL of 1% (w/v) sulfanilamide trong 5% (v/v) phosphoric acid và 50 µL 0,1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước.
- Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrite sẽ được đo bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank).
- Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO₂ và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).
- Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định nhờ công thức :

$$\% \text{ ức chế } = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{sample}} / \text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] * 100$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

• *Phép thử sinh học xác định khả năng gây độc tế bào bằng MTT*

- Chất thử (20 μ l) được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ tương tự nồng độ của thí nghiệm NO.
- Sau khi điều chỉnh để có mật độ tế bào phù hợp, hút 180 μ L tế bào vào các giếng của khay 96 giếng đã có chất thử. Trên cùng một đĩa thử, bố trí một số giếng để làm đối chứng không có mẫu thử, chỉ có dung môi pha mẫu là DMSO 10%.
- Để đĩa nuôi cấy vào trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂, nuôi trong thời gian 72 giờ.
- Sau 72 giờ, 10 μ l MTT (nồng độ cuối cùng là 5 mg/mL) được cho vào mỗi giếng.
- Sau 4h, loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 50 μ l (DMSO) 100%.
- Giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm bằng máy quang phổ.
- Lượng tế bào sống sót sẽ được tính theo công thức:

$$\% \text{ tế bào sống} = \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{blank})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{blank})}$$

Kết quả được biểu thị trên Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Kết quả hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của hợp chất tinosinodane trên tế bào BV2 được kích thích bằng LPS

Hợp chất	IC ₅₀ (μ M)	% ức chế tế bào (%)
1	33,0 $\pm$ 2,0	87,2 $\pm$ 6,0
L-NMMA	10,2 $\pm$ 1,7	89,9 $\pm$ 4,8

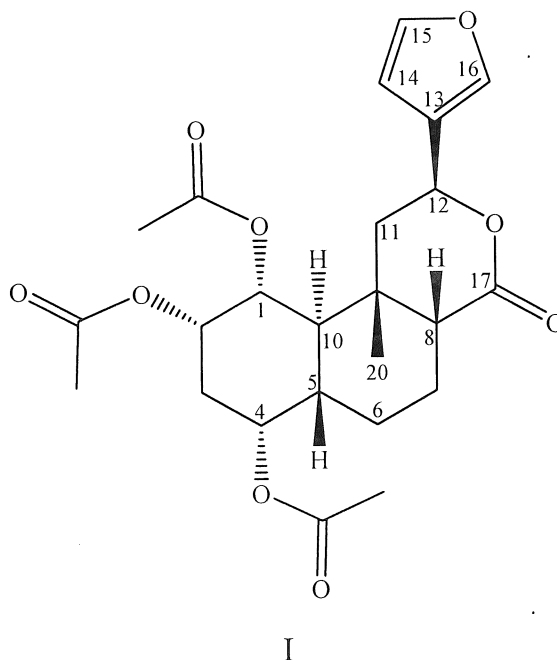
N^G-Metyl-L-arginine axetat (L-NMMA) là chất đối chứng dương

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất mới, tinosinodane từ lá *T. sinensis* thu hái tại Phúc Yên, Vĩnh Phúc. Hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng viêm tốt so với chất đối chứng L-NMMA. 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 hỗ trợ điều trị viêm dựa trên việc khai thác nguồn dược liệu quý, sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất tinosinodane có công thức (I):



2. Phương pháp phân lập hợp chất tinosinodane có công thức (I) theo điểm 1 từ lá *T. sinensis*, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) Mẫu lá cây *T. sinensis* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được ngâm chiết siêu âm với metanol 3 lần ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần 60 phút.

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

(iii) Cặn chiết metanol được hòa tan với nước cất rồi chiết phân bố lần lượt bằng dung môi *n*-hexan, rồi đến diclometan và sau cùng là 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 cặn chiết *n*-hexan (L1), diclometan (L2), etyl axetat (L3) và dịch chiết nước (L4). Cặn chiết *n*-hexan (L1) được tiến hành phân tách 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 (A) trong *n*-hexan (H) là H/A tỉ lệ 50/1 → 2,5/1 thu được năm phân đoạn ký hiệu lần lượt từ L1A đến L1E.

(iv) Phân đoạn L1D được tiến hành phân tách sắc ký 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 tỉ lệ 1,5/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu từ L1D1 đến L1D4.

(v) Hợp chất tinosinodane có công thức (1) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn L1D2 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere M-80 (150×20 mm), điều kiện dung môi MeCN 50% trong nước.