



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11) 
2-0001786

(51)⁷ **A61K 35/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00022

(22) 05.08.2015

(67) 1-2015-02847

(45) 27.08.2018 365

(43) 25.11.2015 332

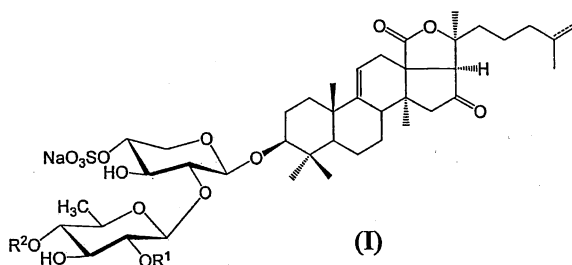
(73) **VIỆN HÓA SINH BIỂN, VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT
NAM (VN)**

18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Châu Văn Minh (VN), Nguyễn Xuân Cường (VN), Lê Thị Viên (VN), Trần Thị
Hong Hạnh (VN), Nguyễn Phương Thảo (VN), Đỗ Thị Thảo (VN), Nguyễn Văn
Thanh (VN), Nguyễn Hoài Nam (VN), Đỗ Công Thung (VN), Phan Văn Kiệm (VN)**

(54) **HỢP CHẤT TRITECPEN SAPONIN CÓ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO VÀ
PHƯƠNG PHÁP CHIẾT HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI HẢI SÂM - CERCODEMAS
ANCEPS**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất tritecpen saponin có công thức chung (I) và phương pháp chiết hợp chất này từ loài hải sâm *Cercodemas anceps*. Hợp chất tritecpen saponin này có hoạt tính kháng năm dòng tế bào ung thư người thử nghiệm, là tế bào ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư vú (MCF7), ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (Hep-G2) và ung thư da (SK-Mel2). Phương pháp theo giải pháp hữu ích rất là hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các dược phẩm chữa bệnh ung thư chứa hợp chất này cũng như các dẫn xuất của nó.



trong đó nếu $R^1 = \text{HO} \begin{array}{c} \text{HO} \\ \text{HO} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{HO} \\ \text{HO} \end{array}$ thì $R^2 = \text{HO} \begin{array}{c} \text{HO} \\ \text{HO} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{HO} \\ \text{HO} \end{array}$ và Δ^{25} , hoặc

nếu $R^1 = \text{H}$ thì $R^2 = \text{HO} \begin{array}{c} \text{HO} \\ \text{HO} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{HO} \\ \text{HO} \end{array}$, hoặc

nếu $R^1 = \text{H}$ thì $R^2 = \text{HO} \begin{array}{c} \text{HO} \\ \text{HO} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{HO} \\ \text{HO} \end{array}$ và Δ^{25} , hoặc

nếu $R^1 = \text{H}$ thì $R^2 = \text{H}$, hoặc

nếu $R^1 = \text{H}$ thì $R^2 = \text{H}$ và Δ^{25} .

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất tritecpen saponin mới có hoạt tính sinh học ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư người là ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư vú (MCF7), ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (Hep-G2) và ung thư da (SK-Mel2). Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến phương pháp chiết các hợp chất tritecpen saponin này từ loài hải sâm *Cercodemas anceps*.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên đã và đang nhận được rất nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học trong và ngoài nước trong việc nghiên cứu và phát triển thành các dược phẩm chữa bệnh cho người do có nhiều ưu điểm như cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học đa dạng, dễ được hấp thụ và chuyển hóa trong cơ thể cũng như độc tính thấp. Ung thư là một căn bệnh nan y mà cho tới nay việc chữa trị vẫn còn gặp nhiều khó khăn. Theo các số liệu thống kê gần đây, tỷ lệ người mắc bệnh ung thư ngày càng gia tăng. 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.

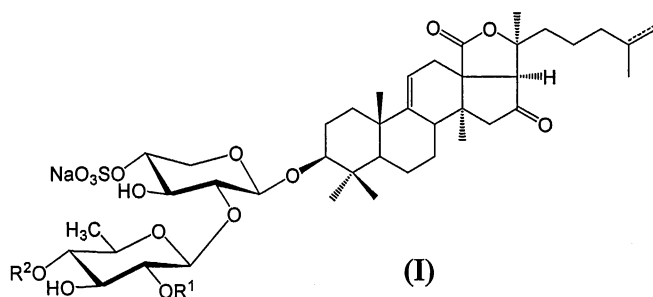
Hải sâm là một trong những sinh vật biển có tầm quan trọng về mặt kinh tế ở các nước thuộc Châu Á, nơi nhiều loài được sử dụng trong y học cổ truyền hoặc được ăn như những thực phẩm bổ dưỡng. Về mặt phân loại học, hải sâm bao gồm sáu bộ chính (Apodida, Elasipodida, Aspidochirotida, Molpadiida, Dendrochirotida và Dactylochirotida) với 25 họ, khoảng 200 giống và trên 1400 loài. Hải sâm được tìm thấy ở mọi vùng biển, tuy nhiên phổ biến nhất ở các rạn san hô nhiệt đới nước nông. Mặc dù nhiều lớp chất đã được phân lập từ các loài hải sâm, các hợp chất saponin là thành phần chính và phổ biến nhất. Nhìn chung, các hợp chất saponin được ghi nhận là các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính cao và saponin từ hải sâm đã được khẳng định rõ ràng về hoạt tính chống ung thư của chúng. *Cercodemas anceps* (tên đồng danh

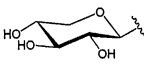
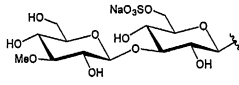
Colochirus anceps, họ Cucumariidae, bộ Dendrochirotrida) là loài hải sâm có màu hồng, màu vàng - hồng, kích thước nhỏ, dài khoảng 5-7 cm, thân hình trụ, thon nhọn về phía hậu môn. Có 4 đường gờ chạy dọc cơ thể, các gai mềm chạy dọc 4 đường gờ. Nằm dọc theo các gờ là các rãnh (4 rãnh) nhẵn. Xúc tu bao quanh miệng, phân nhánh giống cây. Có ba dây chân ống màu đỏ ở mặt dưới. Cơ quan hậu môn thường được bao quanh bởi 5 tấm răng dẹt.

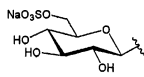
Trong lĩnh vực tìm kiếm các chất chống ung thư, việc tìm kiếm, sàng lọc và đánh giá các chất có khả năng ức chế và tiêu diệt các tế bào khối u chủ yếu dựa trên khả năng gây độc các dòng tế bào khối u thực nghiệm gây ung thư là vô cùng quan trọng. Thuộc khuôn khổ chương trình nghiên cứu trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam “Nghiên cứu tiềm năng về dược liệu biển vùng Đông Bắc Việt Nam”, các tác giả giải pháp hữu ích đã đi sâu nghiên cứu loài hải sâm *Cercodemas anceps* và đã phân lập được năm hợp chất tritecpen saponin mới đặt tên là cercodemasoit A-E thể hiện hoạt tính mạnh kháng năm dòng tế bào ung thư người thử nghiệm là ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư vú (MCF7), ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (Hep-G2) và ung thư da (SK-Mel2). Phương pháp chiết năm hợp chất cercodemasoit A-E từ loài hải sâm *Cercodemas anceps* được đề cập theo giải pháp hữu ích để thực hiện và cho hiệu suất cao.

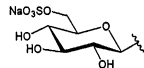
Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất hợp chất tritecpen saponin chiết được từ loài hải sâm *Cercodemas anceps* có công thức chung (I):



trong đó nếu $R^1 =$  thì $R^2 =$  và Δ^{25} , hoặc

nếu $R^1 = H$ thì $R^2 =$ , hoặc

nếu $R^1 = H$ thì $R^2 =$  và Δ^{25} , hoặc

nếu $R^1 = H$ thì $R^2 = H$, hoặc

nếu $R^1 = H$ thì $R^2 = H$ và Δ^{25} .

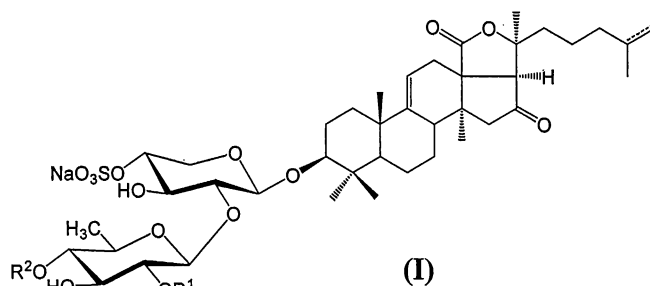
Các hợp chất tritecpen saponin theo giải pháp hữu ích thể hiện hoạt tính mạnh kháng năm dòng tế bào ung thư người thử nghiệm là tế ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư vú (MCF7), ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (Hep-G2) và ung thư da (SK-Mel2). Hoạt tính này tương đương hoặc cao hơn khi so với hợp chất tritecpen có cấu trúc tương tự đã biết.

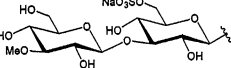
Mục đích khác của giải pháp hữu ích là đề xuất phương pháp chiết hợp chất tritecpen saponin từ loài hải sâm *Cercodemas anceps*. Phương pháp theo giải pháp hữu ích đơn giản, dễ thực hiện và cho hiệu suất cao.

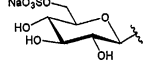
Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

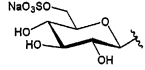
Mẫu hải sâm *Cercodemas anceps* Selenka, 1867, thuộc họ Cucumariidae. Mẫu tươi hải sâm được tiến hành loại bỏ nội tạng, cắt nhỏ sau đó tiến hành chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất theo các phương pháp mô tả dưới đây: sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck 1,05715) và RP18 F_{254S} (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% 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 pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (240-430 mesh, Merck). Silica gel pha đảo YMC (30-50 μ m, Fuji Silysia Chemical Ltd.). Độ quay cực được đo trên máy JASCO P-2000. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruker AM500. Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS được đo trên máy MicroQ-TOF III mass spectrometer.

Theo một phương án, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất tritecpen saponin có công thức chung (I):



trong đó nếu $R^1 =$  thì $R^2 =$  và Δ^{25} , hoặc

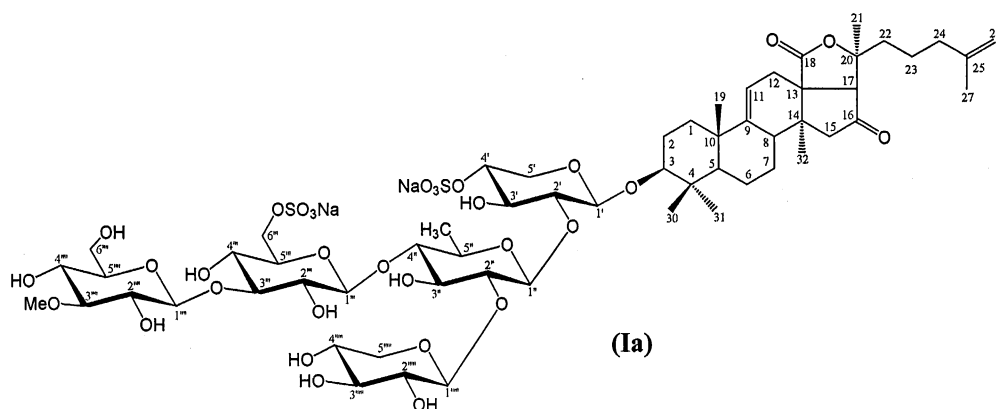
nếu $R^1 = H$ thì $R^2 =$ , hoặc

nếu $R^1 = H$ thì $R^2 =$  và Δ^{25} , hoặc

nếu $R^1 = H$ thì $R^2 = H$, hoặc

nếu $R^1 = H$ thì $R^2 = H$ và Δ^{25} .

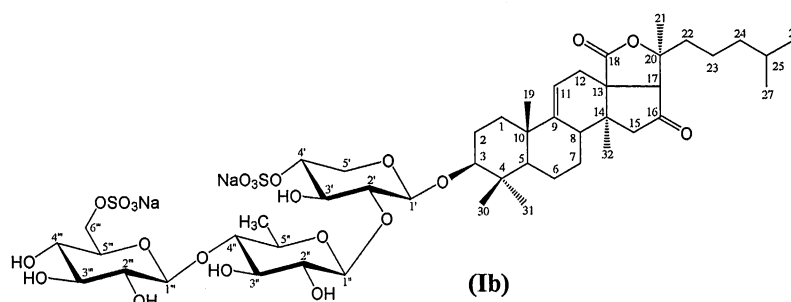
Theo một phương án được ưu tiên, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất 3-O-{3-O-metyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-6-O-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-O-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on có công thức (Ia):



Hợp chất 3-O-{3-O-metyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-6-O-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-O-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on này được đặt tên là cercodemasoit A.

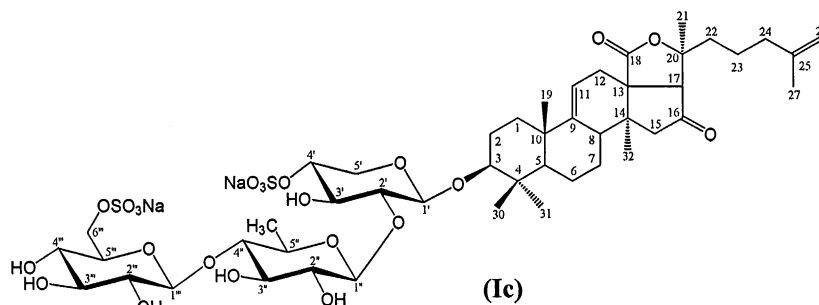
Theo một phương án được ưu tiên khác, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất 3-O-{6-O-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-O-sulfat-

β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on có công thức (Ib):



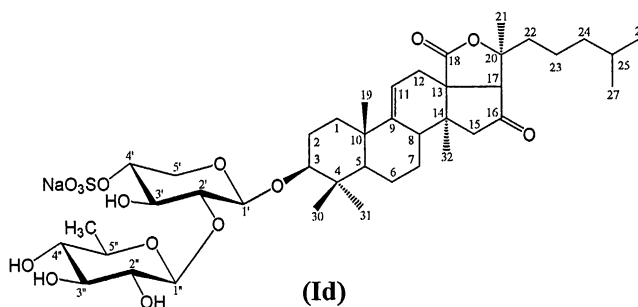
Hợp chất 3-*O*-{6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on này được đặt tên là cercode masoit B.

Theo một phương án được ưu tiên khác, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất 3-*O*-{6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on có công thức (Ic):



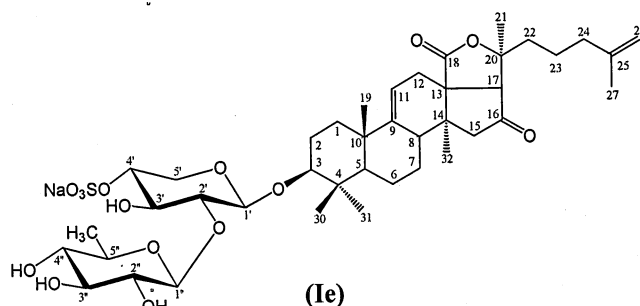
Hợp chất 3-*O*-{6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on này được đặt tên là cercode masoit C.

Theo một phương án được ưu tiên khác, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất 3-*O*-{ β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on có công thức (Id):



Hợp chất 3-*O*-{ β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on này được đặt tên là cercodemasoit D.

Theo một phương án được ưu tiên khác, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất 3-*O*-{ β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on có công thức (Ie):



Hợp chất 3-*O*-{ β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on này được đặt tên là cercodemasoit E.

Theo một phương án khác, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp chiết hợp chất tritecpen saponin có hoạt tính gây độc tế bào từ loài hải sâm *Cercodemas anceps*, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- mẫu tươi hải sâm *Cercodemas anceps* được tiến hành loại bỏ nội tạng, cắt nhỏ, sau đó chiết ngâm 3 lần, mỗi lần 6 giờ, với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C;
- gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được ở bước a) 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 A;
- hòa tan dịch cô A với nước cất rồi chiết phân bố bằng dung môi diclorometan 3 lần theo tỷ lệ 1/1 về thể tích thu được lớp nước (ký hiệu là B) và dịch cô diclorometan (ký hiệu là C) sau khi loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm;
- dịch cô C được tiến hành phân tách trên hệ thống sắc ký lỏng trung áp MPLC với cột nhồi silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải gradient nồng độ diclorometan/metanol theo tỷ lệ từ 100/1 đến 1/1 về thể tích thu được bảy phân đoạn ký hiệu lần lượt từ C1 đến C7 tương ứng với các nồng độ diclorometan/metanol theo tỷ lệ 100/1, 80/1, 50/1, 30/1, 10/1, 5/1 và 1/1 về thể tích;
- phân đoạn C6 được tiến hành phân lập trên sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel

pha thường và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là diclorometan/metanol/nước theo tỷ lệ 4/1/0,1 về thể tích thu được năm phân đoạn nhỏ hơn ký hiệu lần lượt từ C6A đến C6E; và

f) phân đoạn C6A được tinh chế trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là YMC sử dụng hệ dung môi rửa giải metanol/nước theo tỷ lệ 2/1 về thể tích thu được hợp chất 3-*O*-{ β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on (**Id**) và hợp chất 3-*O*-{ β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on (**Ie**) dưới dạng chất bột màu trắng.

Theo một phương án khác nữa, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp chiết hợp chất tritecpen saponin có hoạt tính gây độc tế bào nêu trên, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chiết hợp chất có công thức (**Ib**) và (**Ic**) bằng cách tinh chế phân đoạn C6C thu được từ bước e) trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là YMC sử dụng hệ dung môi rửa giải metanol/nước theo tỷ lệ 1,5/1 về thể tích thu được hợp chất 3-*O*-{6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on (**Ib**) và hợp chất 3-*O*-{6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on (**Ic**) dưới dạng chất bột màu trắng.

Theo một phương án, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp chiết hợp chất tritecpen saponin có hoạt tính gây độc tế bào nêu trên, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chiết hợp chất có công thức (**Ia**) bằng cách tiến hành sắc ký lớp nước B thu được ở bước c) trên cột nhồi Diaion HP-20 rửa giải tăng dần nồng độ metanol trong nước (0, 25, 50, 75 và 100%), loại bỏ phần rửa giải bằng nước 100% thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ B1 đến B4 tương ứng với các nồng độ metanol trong nước là 25, 50, 75 và 100%; phân đoạn B4 được phân tách trên hệ thống sắc ký lỏng trung áp MPLC với cột nhồi silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải diclorometan/metanol/nước theo tỷ lệ 4/1/0,1 về thể tích thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn ký hiệu lần lượt từ B4A đến B4D; phân đoạn B4C được tinh chế trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là YMC sử dụng hệ dung môi rửa giải metanol/nước tỷ lệ 1/1,5 về thể tích thu được hợp chất 3-*O*-{3-*O*-metyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-quinopyranosyl-

(1→2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on (**Ia**) dưới dạng chất bột màu trắng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1

Chiết hợp chất cercodemasoit A-E từ loài hải sâm Cercodemas anceps

Mẫu tươi hải sâm *Cercodemas anceps* được tiến hành loại bỏ nội tạng, cắt nhỏ (15 kg), sau đó chiết ngâm 3 lần, mỗi lần 6 giờ, với rượu metylic (20 lít) ở nhiệt độ 50°C.

Gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được 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 A (290 g).

Hòa tan dịch cô A với nước cất (2 lít) rồi chiết phân bố bằng dung môi diclorometan 3 lần theo tỷ lệ 1/1 về thể tích thu được lớp nước (ký hiệu là B) và dịch cô diclorometan (ký hiệu là C, 110,2 g) sau khi loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm;

Lớp nước B được tiến hành sắc ký trên cột nhồi Diaion HP-20 (Φ 10 cm, L 80 cm) rửa giải tăng dần nồng độ metanol trong nước (0, 25, 50, 75 và 100%, mỗi mức nồng độ 2 lít), loại bỏ phần rửa giải bằng nước 100% thu được bốn phân đoạn tương ứng ký hiệu lần lượt B1 (25,0 g), B2 (15,1 g), B3 (11,3 g) và B4 (5,1 g);

Phân đoạn B4 (5 g) được phân tách trên hệ thống sắc ký lỏng trung áp MPLC với cột nhồi silica gel pha thường (Biotage® KP-SIL 100 g) sử dụng hệ dung môi rửa giải diclorometan/metanol/nước theo tỷ lệ 4/1/0,1 về thể tích thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn ký hiệu là B4A (1,3 g), B4B (0,9 g), B4C (1,0 g) và B4D (1,7 g).

Phân đoạn B4C (1,0 g) được tinh chế trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là YMC sử dụng hệ dung môi rửa giải metanol/nước theo tỷ lệ 1/1,5 về thể tích thu được 150 mg hợp chất 3-*O*-{3-*O*-metyl- β -D-glucopyranosyl-(1→3)-6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1→4)-[β -D-xylopyranosyl-(1→2)]- β -D-quinopyranosyl-(1→2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on (**Ia**) dưới dạng chất bột màu trắng.

Dịch cô C (110,2 g) được tiến hành phân tách trên hệ thống sắc ký lỏng trung

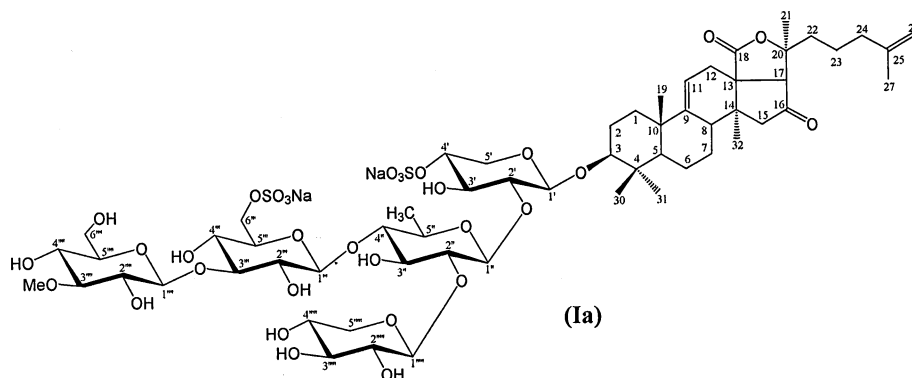
áp MPLC với cột nhồi silica gel pha thường (Biotage® KP-SIL 340 g) sử dụng hệ dung môi rửa giải gradient nồng độ diclorometan/metanol theo tỷ lệ từ 100/1 đến 1/1 về thể tích thu được bảy phân đoạn ký hiệu là C1 (15,2 g), C2 (18,2 g), C3 (15,5 g), C4 (16,8 g), C5 (12,7 g), C6 (11,5 g) và C7 (20,1 g).

Phân đoạn C6 (11,5 g) được tiến hành phân lập trên sắc ký cột (Φ 6 cm, L 60 cm) với chất hấp phụ là silica gel pha thường và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là diclorometan/metanol/nước theo tỷ lệ 4/1/0,1 về thể tích (3 lít) thu được năm phân đoạn nhỏ hơn ký hiệu là C6A (2,5 g), C6B (1,5 g), C6C (1,8 g), C6D (2,5 g) và C6E (3,1 g).

Phân đoạn C6A (2,5 g) được tinh chế trên cột sắc ký ái lực (Φ 3 cm, L 80 cm) với chất hấp phụ là YMC sử dụng hệ dung môi rửa giải metanol/nước theo tỷ lệ 2/1 về thể tích (1,5 lít) thu được 100 mg hợp chất 3-*O*-{ β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on (**Id**) và 95 mg hợp chất 3-*O*-{ β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on (**Ie**) dưới dạng chất bột màu trắng;

Phân đoạn C6C (1,8 g) được tinh chế trên cột sắc ký ái lực (Φ 2,5 cm, L 80 cm) với chất hấp phụ là YMC sử dụng hệ dung môi rửa giải metanol/nước theo tỷ lệ 1,5/1 về thể tích (1,0 lít) thu được 115 mg hợp chất 3-*O*-{6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on (**Ib**) và 105 mg hợp chất 3-*O*-{6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on (**Ic**) dưới dạng chất bột màu trắng.

Hợp chất 3-*O*-{3-*O*-metyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on (cercodemasoit A) thu được có công thức (**Ia**):



Công thức phân tử: $C_{59}H_{90}Na_2O_{32}S_2$;

Khối lượng phân tử: $M = 1420$;

Các thông số vật lý:

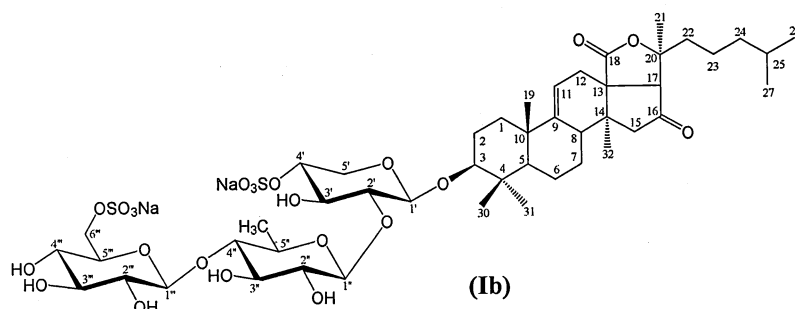
+ Chất bột màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22} - 12,5$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS tại m/z 1443,4557 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết 1443,4550 cho công thức $C_{59}H_{90}Na_3O_{32}S_2$;

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

Hợp chất 3-*O*-{6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on (cercodemasoit B) thu được có công thức **(Ib)**:



Công thức phân tử: $C_{47}H_{72}Na_2O_{23}S_2$;

Khối lượng phân tử: $M = 1114$;

Các thông số vật lý:

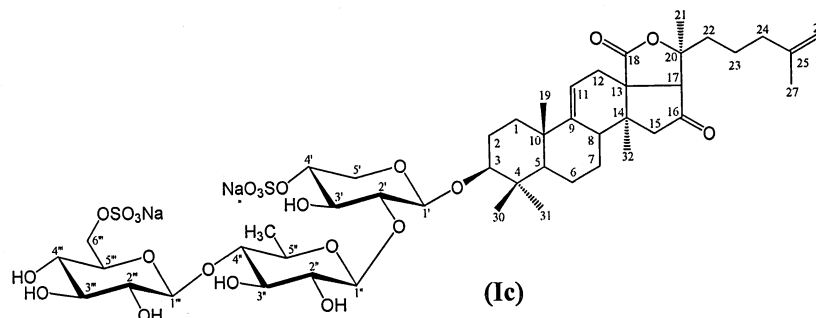
+ Chất bột màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22} - 18,3$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS tại m/z 1137,3559 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết 1137,3593 cho công thức $C_{47}H_{72}Na_3O_{23}S_2$;

+ Số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 1.

Hợp chất 3-*O*-{6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on (cercodemasoit C) thu được có công thức (**1c**):



Công thức phân tử: $C_{47}H_{70}Na_2O_{23}S_2$;

Khối lượng phân tử: $M = 1112$;

Các thông số vật lý:

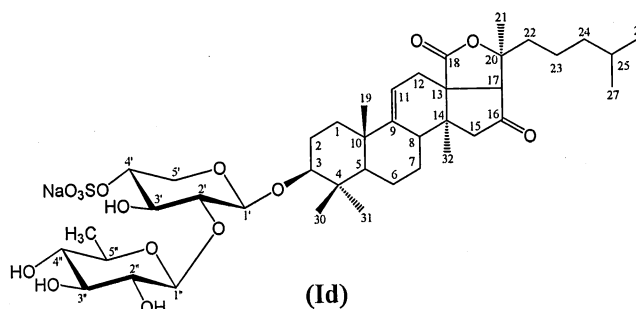
+ Chất bột màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22} -19,5$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS tại m/z 1135,3424 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết 1135,3437 cho công thức $C_{47}H_{70}Na_3O_{23}S_2$;

+ Số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 1.

Hợp chất 3-*O*-{ β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on (cercodemasoit D) thu được có công thức (**Id**):



Công thức phân tử: $C_{41}H_{63}NaO_{15}S$;

Khối lượng phân tử: $M = 850$;

Các thông số vật lý:

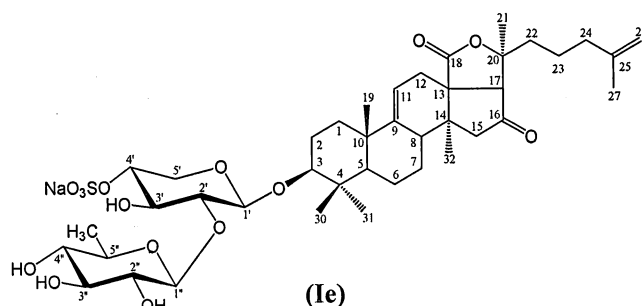
+ Chất bột màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22} -30,5$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS tại m/z 873,3569 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết 873,3678 cho công thức $C_{41}H_{63}Na_2O_{15}S$;

+ Số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 2.

Hợp chất 3- O - $\{\beta$ -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4- O -sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on (cercodemasoit E) thu được có công thức (Ie):



Công thức phân tử: $C_{41}H_{61}NaO_{15}S$;

Khối lượng phân tử: $M = 848$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22} -31,3$ (c 0,1, MeOH);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS tại m/z 871,3419 $[M+Na]^+$, tính toán lý thuyết 871,3521 cho công thức $C_{41}H_{61}Na_2O_{15}S$;

+ Số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 2.

Bảng 1. Số liệu phổ ^1H -NMR (pyridine- d_5 , 500 MHz) và ^{13}C -NMR (pyridine- d_5 , 125 MHz) của hợp chất cercodemasoit A (**Ia**), cercodemasoit B (**Ib**) và cercodemasoit C (**Ic**)

C	Cercodemasoide A (Ia)		Cercodemasoide B (Ib)		Cercodemasoide C (Ic)	
	δ_{C}	δ_{H} ($J = \text{Hz}$)	δ_{C}	δ_{H} ($J = \text{Hz}$)	δ_{C}	δ_{H} ($J = \text{Hz}$)
1	35,9	1,30 m/1,71 m	36,2	1,44 m/1,86 m	36,2	1,42 m/1,84 m
2	26,6	1,80 m/2,03 m	27,0	1,96 m/2,20 m	27,0	1,94 m/2,18 m
3	88,5	3,11 dd (4,0, 12,0)	88,6	3,21 dd (4,0, 11,5)	88,6	3,20 dd (4,0, 11,5)
4	39,7	-	39,8	-	39,8	-
5	52,6	0,82 br d (12,0)	52,8	0,94 br d (12,0)	52,8	0,92 br d (12,0)
6	20,8	1,43 m/1,56 m	21,1	1,52 m/1,70 m	21,1	1,52 m/1,70 m
7	28,2	1,20 m/1,56 m	28,50	1,27 m/1,61 m	28,5	1,26 m/1,60 m
8	38,5	3,15 m	38,7	3,27 m	38,7	3,26 m
9	150,9	-	151,3	-	151,3	-
10	39,4	-	39,7	-	39,7	-
11	110,9	5,26 br d (5,0)	111,1	5,32 br s	111,1	5,33 br s
12	31,4	2,44 dd (5,0, 17,5) 2,56 br d (17,5)	32,1	2,52 m	32,1	2,51 m
13	55,6	-	55,7	-	55,7	-
14	41,8	-	42,1	-	42,1	-
15	51,8	2,13 d (16,0) 2,37 d (16,0)	52,0	2,28 (16,0) 2,41 (16,0)	52,0	2,22 (16,0) 2,39 (16,0)
16	213,6	-	213,1	-	213,1	-
17	61,0	2,82 s	61,4	2,82 s	61,3	2,82 s
18	176,2	-	176,1	-	176,0	-
19	21,8	1,28 s	21,1	1,41 s	21,1	1,40 s
20	83,2	-	83,2	-	83,1	-
21	26,6	1,38 s	26,8	1,42 s	26,8	1,41 s
22	38,1	1,55 m/1,72 m	39,1	1,64 m/1,81 m	38,5	1,66 m/1,82 m
23	22,0	1,45 m/1,72 m	22,2	1,47 m/1,64 m	22,4	1,53 m/1,81 m
24	37,7	1,89 m	39,3	1,12 m	38,0	2,00 m
25	145,3	-	27,9	1,49 m	145,6	-
26	110,3	4,70 d (2,0)	22,6	0,85 d (6,5)	110,5	4,79 br s
27	22,0	1,61 s	22,6	0,84 d (6,5)	22,3	1,70 s
30	16,5	1,02 s	16,5	1,03 s	16,5	1,02 s
31	27,8	1,18 s	28,0	1,24 s	27,9	1,23 s
32	20,4	0,87 s	20,7	0,92 s	20,7	0,91 s
1'	104,6	4,71 d (7,5)	105,2	4,68 d (7,0)	105,2	4,68 d (7,0)
2'	81,2	3,99*	82,9	4,01*	83,0	4,01*
3'	75,3	4,33 t (9,0)	75,5	4,30*	75,4	4,31*
4'	75,7	5,06*	76,1	5,12 m	76,0	5,14 m
5'	64,2	3,85* 4,80 dd (5,0, 12,0)	64,2	3,70 dd (9,0, 11,5) 4,67 dd (5,5, 11,5)	64,1	3,68 dd (9,0, 11,5) 4,65 dd (5,5, 11,5)
1''	101,9	5,26 d (8,0)	105,0	4,98 d (8,0)	105,0	4,97 d (8,0)
2''	83,1	3,89*	76,1	3,90*	75,9	3,91*
3''	74,6	3,98*	74,9	4,01*	74,9	4,03*

4''	87,0	3,36 t (9,0)	88,3	3,50 t (9,0)	88,4	3,48 t (9,0)
5''	70,5	3,55 dd (6,0, 9,0)	71,6	3,75 dd (6,0, 9,0)	71,6	3,73 dd (6,0, 9,0)
6''	17,7	1,54 d (6,0)	18,1	1,68 d (6,0)	18,2	1,66 d (6,0)
1'''	104,2	4,72 d (7,5)	105,6	4,85 d (7,0)	105,6	4,83 d (7,0)
2'''	73,3	3,83*	74,7	3,99*	74,7	4,00*
3'''	86,1	4,18 t (9,0)	78,0	4,19 t (9,0)	78,1	4,18 t (9,0)
4'''	69,3	3,78 t (9,0)	72,1	3,93*	72,2	3,92*
5'''	75,0	4,12*	75,7	4,31*	75,6	4,31*
6'''	67,3	4,60 dd (7,0, 12,0) 5,05*	68,2	4,84 dd (6,0, 12,0) 5,31 br d (12,0)	68,2	4,85 dd (6,0, 12,0) 5,32 br d (12,0)
1''''	104,7	5,23 d (8,0)				
2''''	74,6	3,87*				
3''''	87,2	3,65 t (9,0)				
4''''	70,2	3,94*				
5''''	77,7	3,90*				
6''''	61,7	4,10* 4,39 br d (12,0)				
OMe	60,5	3,79 s				
1'''''	105,6	5,08 d (7,5)				
2'''''	74,9	3,95*				
3'''''	76,4	4,06 t (9,0)				
4'''''	70,0	4,00*				
5'''''	66,8	3,60 t (11,0) 4,25 dd (4,5, 11,0)				

*tín hiệu bị chồng lấp. Toàn bộ số liệu phổ được xác định trên cơ sở kết quả phổ HSQC, HMBC, COSY và ROESY.

Bảng 2. Số liệu phổ ^1H -NMR (pyridine- d_5 , 500 MHz) và ^{13}C -NMR (pyridine- d_5 , 125 MHz) của hợp chất cercodemasoit D (**Id**) và cercodemasoit E (**Ie**)

C	Cercodemasoide D (Id)		Cercodemasoide E (Ie)	
	δ_{C}	δ_{H} (J = Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J = Hz)
1	36,3	1,45 m/1,85 m	36,3	1,43 m/1,84 m
2	27,0	1,98 m/2,20 m	27,0	1,97 m/2,20 m
3	88,7	3,25 dd (4,0, 11,5)	88,7	3,25 dd (4,0, 11,5)
4	40,0	-	40,0	-
5	52,9	0,95 br d (12,0)	52,9	0,93 br d (12,0)
6	21,1	1,55 m/1,72 m	21,1	1,52 m/1,70 m
7	28,5	1,26 m/1,60 m	28,5	1,25 m/1,55 m
8	38,7	3,26 m	38,7	3,26 m
9	151,3	-	151,3	-
10	39,7	-	39,7	-
11	111,1	5,32 d (2,0)	111,1	5,32 d (2,0)
12	32,1	2,50 m	32,1	2,50 m
13	55,7	-	55,7	-
14	42,1	-	42,1	-

15	52,0	2,25 d (16,0) 2,40 d (16,0)	52,0	2,22 d (16,0) 2,38 d (16,0)
16	213,1	-	213,5	-
17	61,4	2,81 s	61,4	2,81 s
18	176,0	-	176,0	-
19	21,1	1,41 s	21,1	1,40 s
20	83,2	-	83,1	-
21	26,8	1,41 s	26,8	1,40 s
22	39,1	1,63 m/1,80 m	38,5	1,67 m/1,82 m
23	22,2	1,35 m/1,63 m	22,4	1,52 m/1,82 m
24	39,3	1,13 m	38,0	2,00 m
25	28,1	1,47 m	145,6	-
26	22,6	0,85 d (6,5)	110,5	4,78 br s
27	22,6	0,84 d (6,5)	22,2	1,96 s
30	16,7	1,14 s	16,7	1,14 s
31	28,0	1,30 s	28,1	1,30 s
32	20,7	0,91 s	20,7	0,90 s
1'	105,4	4,76 d (7,0)	105,4	4,76 d (7,0)
2'	83,2	4,14 dd (7,0, 9,0)	83,2	4,13 dd (7,0, 9,0)
3'	75,7	4,35 t (9,0)	75,7	4,36 t (9,0)
4'	76,3	5,15 m	76,1	5,16 m
5'	64,4	3,80* 4,85 dd (5,5, 11,5)	64,4	3,80* 4,84 dd (5,0, 11,5)
1''	105,0	5,18 d (7,5)	106,0	5,17 d (7,5)
2''	77,1	4,07 dd (7,5, 9,0)	77,1	4,07 dd (7,5, 9,0)
3''	77,7	4,16 t (9,0)	77,5	4,15 t (9,0)
4''	76,7	3,75 t (9,0)	76,7	3,74 t (9,0)
5''	73,4	3,80*	73,4	3,80*
6''	18,6	1,68 d (6,0)	18,6	1,67 d (6,0)

*tín hiệu bị chồng lấp. Toàn bộ số liệu phổ được xác định trên cơ sở kết quả phổ HSQC, HMBC, COSY và ROESY.

Ví dụ 2

Thử nghiệm về tác dụng dược lý của các hợp chất cercodemasoit A-E

Năm hợp chất cercodemasoit A-E theo giải pháp hữu ích được thử nghiệm về hoạt tính gây độc tế bào bằng phương pháp SRB như sau:

Các dòng tế bào ung thư được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường nuôi cấy DMEM (Dulbeco'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.

Năm hợp chất cercodemasoit A-E 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 20, 4, 0,8, và 0,16 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 Table Curve, 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 3:

Bảng 3: Kết quả hoạt tính gây độc tế bào *in vitro*

Hợp chất	Giá trị IC ₅₀ (µM)				
	LNCaP	MCF7	KB	Hep-G2	SK-Mel2
Cercodemasoit A	0,23±0,03	0,20±0,03	0,04±0,01	0,07±0,01	0,24±0,06
Cercodemasoit B	1,19±0,11	0,56±0,05	0,25±0,05	0,97±0,14	1,47±0,17
Cercodemasoit C	1,92±0,22	1,03±0,13	0,32±0,03	4,69±0,31	1,25±0,22
Cercodemasoit D	2,11±0,13	1,09±0,08	0,48±0,05	2,05±0,21	4,09±0,26
Cercodemasoit E	3,30±0,20	1,33±0,33	1,37±0,15	6,08±0,74	7,36±0,46
Ellipticine ^a	1,99±0,16	1,95±0,12	2,07±0,12	1,71±0,16	2,15±0,24

^aChất chuẩn dương

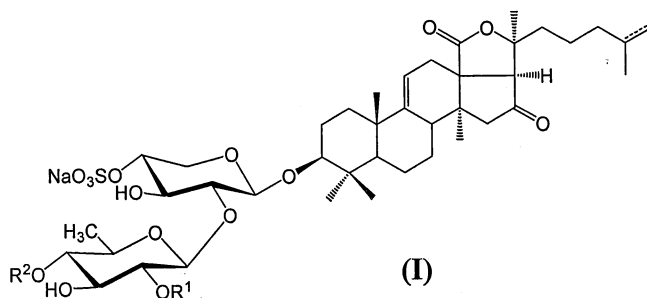
Như vậy, hợp chất hợp chất tritecpen saponin cercodemasoit A-E có hoạt tính mạnh trên tất cả 05 dòng tế bào ung thư đã thử nghiệm. Hoạt tính này tương đương, hoặc cao hơn khi so với hợp chất tritecpen có cấu trúc tương tự đã biết.

Hiệu quả của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp chiết được hợp chất tritecpen saponin mới cercodemasoit A-E từ loài hải sâm *Cercodemas anceps* ở Việt Nam. Hợp chất này có hoạt tính mạnh kháng năm dòng tế bào ung thư thử nghiệm là tế ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư vú (MCF7), ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (Hep-G2) và ung thư da (SK-Mel2). Giải pháp hữu ích 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 hải sâm quý, sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức chung (I):



trong đó nếu $R^1 =$ thì $R^2 =$ và Δ^{25} , hoặc

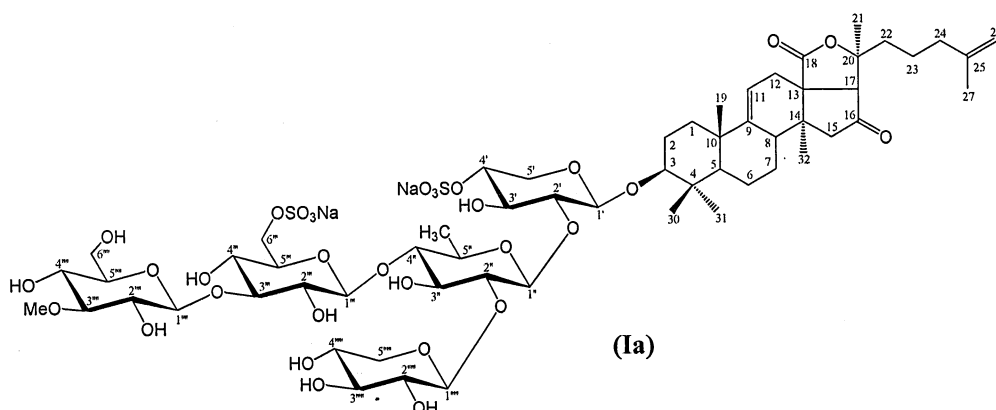
nếu $R^1 = H$ thì $R^2 =$, hoặc

nếu $R^1 = H$ thì $R^2 =$ và Δ^{25} , hoặc

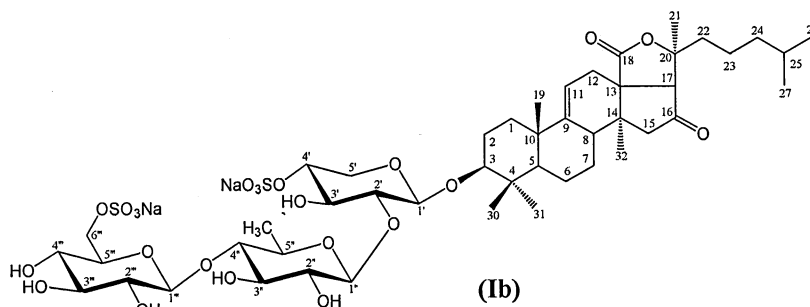
nếu $R^1 = H$ thì $R^2 = H$, hoặc

nếu $R^1 = H$ thì $R^2 = H$ và Δ^{25} .

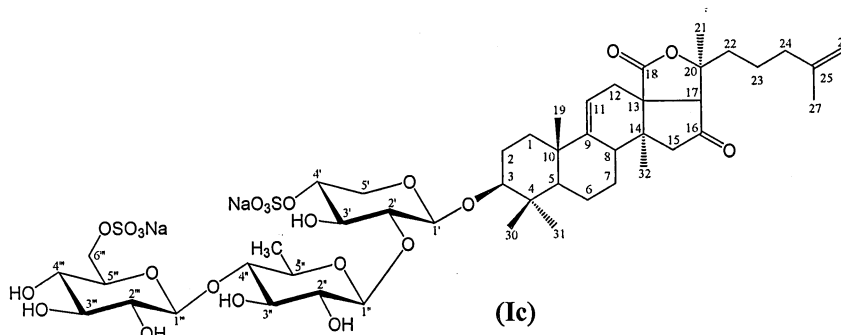
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là 3-O-{3-O-metyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-6-O-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-O-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on có công thức (Ia)



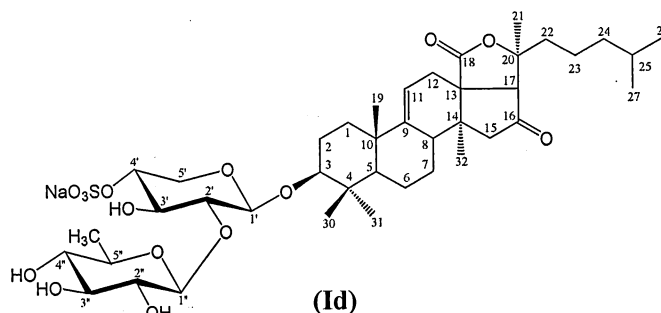
3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là 3-O-{6-O-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-O-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on có công thức (Ib):



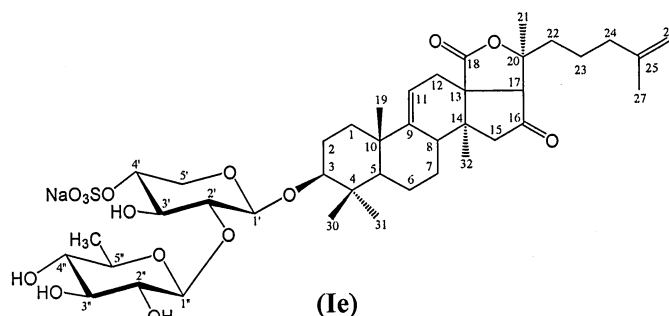
4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là 3-*O*-{6-*O*-sulfat-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-quinopyranosyl-(1→2)-4-*O*-sulfat-β-D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3-β-ol-16-on có công thức **(Ic)**:



5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là 3-*O*-{β-D-quinopyranosyl-(1→2)-4-*O*-sulfat-β-D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3-β-ol-16-on có công thức **(Id)**:



6. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là 3-*O*-{β-D-quinopyranosyl-(1→2)-4-*O*-sulfat-β-D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3-β-ol-16-on có công thức **(Ie)**:



7. Phương pháp chiết hợp chất tritecpen saponin có hoạt tính gây độc tế bào từ loài hải sâm *Cercodemas anceps*, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) mẫu tươi hải sâm *Cercodemas anceps* được tiến hành loại bỏ nội tạng, cắt nhỏ, sau đó chiết ngâm 3 lần, mỗi lần 6 giờ, với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C;
- b) gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được ở bước a) 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 A;
- c) hòa tan dịch cô A với nước cất rồi chiết phân bố bằng dung môi diclorometan 3 lần theo tỷ lệ 1/1 về thể tích thu được lớp nước (ký hiệu là B) và dịch cô diclorometan (ký hiệu là C) sau khi loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm;
- d) dịch cô C được tiến hành phân tách trên hệ thống sắc ký lỏng trung áp MPLC với cột nhồi silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải gradient nồng độ diclorometan/metanol theo tỷ lệ từ 100/1 đến 1/1 về thể tích thu được bảy phân đoạn ký hiệu lần lượt từ C1 đến C7 tương ứng với các nồng độ diclorometan/metanol theo tỷ lệ 100/1, 80/1, 50/1, 30/1, 10/1, 5/1 và 1/1 về thể tích;
- e) phân đoạn C6 được tiến hành phân lập trên sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha thường và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là diclorometan/metanol/nước theo tỷ lệ 4/1/0,1 về thể tích thu được năm phân đoạn nhỏ hơn ký hiệu lần lượt từ C6A đến C6E; và
- f) phân đoạn C6A được tinh chế trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là YMC sử dụng hệ dung môi rửa giải metanol/nước theo tỷ lệ 2/1 về thể tích thu được hợp chất 3-O- $\{\beta$ -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-O-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on (**Id**) và hợp chất 3-O- $\{\beta$ -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-O-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on (**Ie**) dưới dạng chất bột màu trắng.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chiết hợp chất có công thức (Ib) và (Ic) bằng cách tinh chế phân đoạn C6C thu được từ bước e) trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là YMC sử dụng hệ dung môi rửa giải metanol/nước theo tỷ lệ 1,5/1 về thể tích thu được hợp chất 3-O- $\{6$ -O-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-O-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-

holosta-9(11)-en-3- β -ol-16-on (**Ib**) và hợp chất 3-*O*-{6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on (**Ic**) dưới dạng chất bột màu trắng.

9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chiết hợp chất có công thức (**Ia**) bằng cách tiến hành sắc ký lớp nước B thu được ở bước c) trên cột nhồi Diaion HP-20 rửa giải tăng dần nồng độ metanol trong nước (0, 25, 50, 75 và 100%), loại bỏ phần rửa giải bằng nước 100% thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ B1 đến B4 tương ứng với các nồng độ metanol trong nước là 25, 50, 75 và 100%; phân đoạn B4 được phân tách trên hệ thống sắc ký lỏng trung áp MPLC với cột nhồi silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải diclorometan/metanol/nước theo tỷ lệ 4/1/0,1 về thể tích thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn ký hiệu lần lượt từ B4A đến B4D; phân đoạn B4C được tinh chế trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là YMC sử dụng hệ dung môi rửa giải metanol/nước tỷ lệ 1/1,5 về thể tích thu được hợp chất 3-*O*-{3-*O*-metyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-6-*O*-sulfat- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-quinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4-*O*-sulfat- β -D-xylopyranosyl}-holosta-9(11),25-dien-3- β -ol-16-on (**Ia**) dưới dạng chất bột màu trắng.