



(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) 
1-0020106

(51)⁷ **A61K 35/00, C07D 493/00, A61K 35/56** (13) **B**

(21) 1-2015-02898

(22) 10.08.2015

(45) 25.12.2018 369

(43) 27.02.2017 347

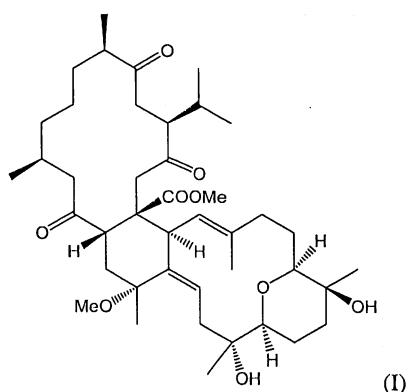
(73) **VIỆN HÓA SINH BIỂN - VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)**

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 Hồng Hạnh (VN), Nguyễn Phương Thảo (VN), Đỗ Thị Thảo (VN), Nguyễn Văn Thanh (VN), Nguyễn Xuân Cường (VN), Trần Thu Hương (VN), Đỗ Công Thung (VN), Phan Văn Kiệm (VN)**

(54) **HỢP CHẤT BISCEMBRANOIT CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG TẾ BÀO UNG THƯ VÀ PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI SAN HÔ MỀM SARCOPHYTON PAUCIPLICATUM**

(57) **Sáng chế đề cập đến hợp chất biscembranoit có công thức (I).**



Hợp chất biscembranoit này có hoạt tính kháng tám dòng tế bào ung thư người thử nghiệm là tế bào ung thư gan (HepG2), ung thư máu (HL-60), ung thư biểu mô (KB), ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư phổi (LU-1), ung thư vú (MCF7), ung thư da (SK-Me12) và ung thư ruột (SW480). Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tách chiết hợp chất biscembranoit này từ loài san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực các hợp chất thiên nhiên, cụ thể sáng chế đề cập đến hợp chất biscembranoit mới là metyl (1*S*,2*R*,6*R*,8*S*,11*S*,15*R*,18*S*,21*S*,22*S*,23*E*,27*S*,28*S*)-2,28-dihydroxy-6-methoxy-2,6,11,15,24,28-hexamethyl-9,16,19-trioxo-18-(propan-2-yl)-31-oxatetracyclo [25.3.1.0⁵,22.0⁸,21]hentriaconta-4,23-dien-21-carboxylat (được đặt tên là sarcophytolide M) có hoạt tính sinh học ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư gan (HepG2), ung thư máu (HL-60), ung thư biểu mô (KB), ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư phổi (LU-1), ung thư vú (MCF7), ung thư da (SK-Mel2) và ung thư ruột (SW480). Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tách chiết hợp chất biscembranoit này từ loài san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

San hô mềm thuộc giới Động vật (Animalia), ngành Ruột khoang (Coelenterata), lớp San hô (Anthozoa), phân lớp san hô tám tia (Octocorallia), thuộc bộ san hô mềm (Alcyonacea), họ Alcyoniidae. Cơ thể chúng có cấu tạo đơn giản bao gồm miệng, khoang tiêu hóa, 8 xúc tu (hoặc bội số của 8) bao quanh miệng và chúng liên kết các cá thể (polyp) bằng mô liên kết với nhau thành dạng tập đoàn, được nâng đỡ bởi các vi xương nhỏ nằm rải rác trong cơ thể, các vi xương này có kích thước hiển vi không liên kết với nhau nên cơ thể san hô rất mềm. San hô mềm với vai trò là quần xã sinh vật dưới biển có sinh khối lớn và phân bố với diện tích rộng có vai trò sinh thái quan trọng đối với các sinh vật biển trong cân bằng sinh thái và đa dạng sinh học. Trong đó, san hô mềm thuộc các giống *Cespitularia*, *Clavularia*, *Gersemia*, *Lobophytum*, *Nephthea*, *Sarcophyton* và *Sinluaria* là phổ biến nhất.

Các công trình nghiên cứu đã công bố cho thấy, thành phần hóa học chính của các loài san hô mềm thuộc giống *Sarcophyton* là các hợp chất diterpen dạng

khung cembranoit, các hợp chất steroid mang nhiều nhóm hydroxy và các hợp chất biscembranoit (theo tài liệu “Dictionary of Natural Products”). Biscembranoit là một lớp chất tetracepenoit có cấu trúc hóa học độc đáo với cấu trúc bộ khung ba vòng 14-6-14. Sự thay đổi về cấu trúc của các hợp chất thuộc dạng khung này chủ yếu xuất hiện ở vòng C với mật độ oxy hóa cao và sự tạo vòng tri-, penta- và hexaepoxy. Lớp chất này thể hiện nhiều hoạt tính sinh học đáng quan tâm như gây độc tế bào, kháng viêm và kháng vi sinh vật kị khí. Zhifang Xi và cộng sự (Helvetica Chimica Acta, 2013, tập 96, số 12, trang 2218-2227) đã phân lập được hợp chất Sarcophytolide G-L thuộc lớp biscembranoit từ loài san hô mềm *Sarcophyton elegans*. Các hợp chất này thể hiện hoạt tính ức chế tế bào khối u thấp đối với các dòng tế bào ung thư đại trực tràng (HCT-8), tế bào ung thư biểu mô tế bào gan (Bel7402), tế bào ung thư dạ dày (BGC823), tế bào ung thư phổi (A549) và tế bào ung thư buồng trứng (A2780) với giá trị $IC_{50} > 50\mu M$.

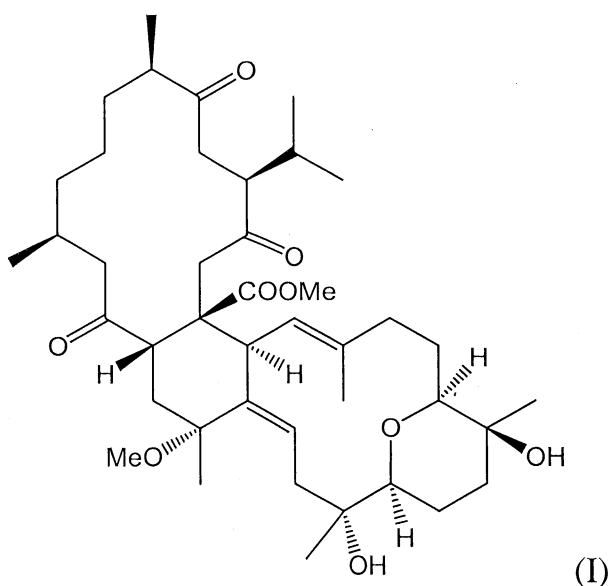
Việc tìm kiếm, sàng lọc và đánh giá các chất có khả năng ức chế và tiêu diệt các tế bào khối u chủ yếu dựa trên khả năng gây độc các dòng tế bào khối u thực nghiệm gây ung thư là vô cùng quan trọng trong lĩnh vực tìm kiếm và phát triển các thuốc hỗ trợ và điều trị ung thư. Hơn thế nữa, việc tiếp cận các hợp chất có khả năng kháng tế bào ung thư từ các loài sinh vật biển ở nước ngoài thường gặp nhiều khó khăn cho các nghiên cứu sản xuất thuốc điều trị ung thư trong nước do giá thành cao. Do đó, vẫn có nhu cầu tìm kiếm các hợp chất mới có hoạt tính kháng tế bào ung thư có nguồn gốc từ các loài sinh vật biển có nguồn gốc trong nước nhằm đáp ứng được nhu cầu nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất thiên nhiên thuộc lớp biscembranoit có hoạt tính kháng tế bào ung thư, có nguồn gốc từ loài san hô mềm được thu nhận tại vùng biển Việt Nam.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất biscembranoit được tách chiết từ loài san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum* có công thức cấu tạo (I), thể hiện hoạt tính kháng tám dòng tế bào ung thư người thử nghiệm là tế bào ung thư gan (HepG2), ung thư máu (IHL-60), ung thư biểu mô (KB), ung thư tuyến tiền liệt

(LNCaP), ung thư phổi (LU-1), ung thư vú (MCF7), ung thư da (SK-Mel2) và ung thư ruột (SW480).



Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất phương pháp tách chiết hợp chất bisembranoid có công thức (I) từ loài san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum*.

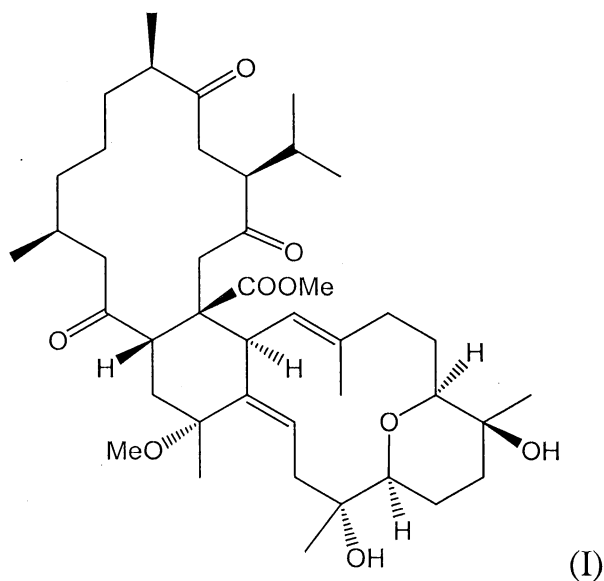
Mô tả chi tiết sáng chế

Mẫu san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum*, thuộc họ Alcyoniidae được sử dụng trong sáng chế do Viện Tài nguyên và Môi trường biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Mẫu san hô mềm sau khi thu được tiến hành làm khô trong điều kiện lạnh âm sâu, nghiền nhỏ thành bột và 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) 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% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu. Sắc ký cột (CC) 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 µm, Fuji Silysia Chemical). Độ quay cực được đo trên máy JASCO P-2000. Phổ cộng hưởng

từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruker DRX500.

Hợp chất biscembranoit được tách chiết từ loài san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum* có công thức cấu tạo (I) sau:



Hợp chất methyl (1S,2R,6R,8S,11S,15R,18S,21S,22S,23E,27S,28S)-2,28-dihydroxy-6-methoxy-2,6,11,15,24,28-hexamethyl-9,16,19-trioxo-18-(propan-2-yl)-31-oxatetracyclo[25.3.1.0⁵,²².0⁸,²¹]hentriaconta-4,23-dien-21-carboxylat này được đặt tên là sarcophytolide M. Các thông số hoá lý của hợp chất này là như sau:

Công thức phân tử: C₄₂H₆₆O₉;

Khối lượng phân tử: M = 714;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} + 45$ (c 0,1, CHCl₃);

+ Phổ khối lượng phân giải cao tại m/z 737,4539 [M+Na]⁺, tính toán lý thuyết 737,4599 cho công thức C₄₂H₆₆NaO₉;

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

Bảng 1. Số liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của hợp chất biscembranoit có công (I)

C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ Dạng pic ($J = \text{Hz}$)	HMBC (H → C)
1	50,9	-	
2	42,0	3,74 dd (3,5, 13,5)	
3	213,9	-	

4	53,6	2,46 dd (1,5, 20,0) 3,12 dd (10,5, 20,0)	3, 5, 19
5	27,3	1,72 m	
6	37,4	1,04 m	
7	25,5	1,14/1,30 m	
8	33,9	1,51 m	6, 7, 9, 18
9	47,6	2,54 dd (7,0, 14,5)	8, 10, 18
10	213,6	-	
11	31,3	1,88 dd (1,5, 17,0) 2,98 dd (9,5, 17,0)	10, 12, 13, 15
12	51,7	3,09 m	
13	208,3	-	
14	45,7	2,68 d (18,5) 3,22 d (18,5)	1, 2, 13, 20
15	28,9	2,31 m	
16	17,6	0,72 d (7,0)	12, 15, 17
17	21,3	1,01 d (7,0)	12, 15, 16
18	17,5	1,11 d (7,0)	8, 9, 10
19	22,3	0,83 d (7,0)	4, 5, 6
20	174,3	-	
21	47,8	3,38 d (11,0)	1, 2, 14, 22, 23, 33, 34, 35
22	124,0	5,34 d (11,0)	24, 38
23	136,9	-	
24	38,9	1,67/2,38 m	
25	28,6	1,54/1,62 m	
26	85,2	3,51 dd (3,0, 9,5)	27, 28
27	69,6	-	
28	30,9	1,40/1,61 m	26, 30, 39
29	20,2	1,52/1,65 m	
30	69,1	3,45 dd (3,5, 12,0)	31
31	74,1	-	
32	37,5	2,01 dd (2,5, 14,5) 2,61 dd (11,5, 14,5)	30, 31, 33
33	126,5	5,77 dd (2,0, 11,5)	21, 32
34	135,5	-	
35	74,9	-	
36	39,5	1,58 dd (3,5, 15,0) 1,94 dd (13,5, 15,0)	
37	22,1	1,26 s	34, 35, 36
38	19,4	1,79 s	22, 23, 24
39	25,3	1,07 s	26, 27, 28

40	24,0	1,27 s	30, 31, 32
COOMe	51,1	3,49 s	20
35-OMe	48,7	3,07 s	35

^aĐo trong CDCl₃, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

Phương pháp tách chiết hợp chất biscembranoit có công thức (I) từ loài san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum* theo sáng chế được tiến hành như mô tả dưới đây.

Tiến hành đông khô mẫu san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum* rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được chiết 3 lần, mỗi lần 2 giờ với rượu metylic trong đó tỷ lệ rượu metylic/bột san hô mềm là 2/1 (thể tích/trọng lượng) trên thiết bị chiết siêu âm.

Gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được lại, lọc qua giấy lọc và cô quay để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là dịch cô A.

Hòa tan dịch cô A với nước cất trong đó tỷ lệ nước cất/dịch cô A là 20/1 (thể tích/trọng lượng), sau đó chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan và sau đó là diclorometan, mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích. Dịch chiết diclorometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô diclorometan, ký hiệu là dịch cô B.

Dịch cô B được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel pha thường (Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ etyl axetat trong *n*-hexan. Trong đó tỷ lệ *n*-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/1, 70/1, 30/1, 10/1, 1/1 thu được 7 phân đoạn ký hiệu lần lượt là từ B-1 đến B-7.

Phân đoạn B-7 được tiến hành phân lập trên hệ thống sắc ký lỏng trung áp sử dụng cột nhồi silica gel pha đảo C-18 rửa giải gradient tăng dần nồng độ axeton trong nước với tỷ lệ thể tích axeton/nước từ 1/2 đến 3/1 thu được 6 phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt từ B-7-A đến B-7-F.

Tiến hành hòa tan phân đoạn B-7-D vào hỗn hợp dung môi metanol/nước với tỷ lệ 3/1 theo thể tích và tiến hành phân lập trên cột sắc ký nhồi sephadex LH-

20 và sử dụng pha động là hỗn hợp dung môi metanol/nước với tỷ lệ 3/1 theo thể tích thu được 5 phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt từ B-7-D-1 đến B-7-D-5.

Tiến hành hòa tan phân đoạn B-7-D-3 vào hỗn hợp dung môi metanol/nước với tỷ lệ 2,5/1 về thể tích và tiến hành phân lập trên sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha đảo YMC RP-18 (cỡ hạt 30–50 μ m, trong đó tỷ lệ phân đoạn B-7-D-3/tỷ lệ bột silica gel YMC là 1/20 theo khối lượng) và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là metanol/nước với tỷ lệ 2,5/1 theo thể tích. Dịch rửa giải ra khỏi cột được hứng riêng biệt vào các ống nghiệm theo thể tích 10 ml/ống. Kiểm tra sự có mặt của các hợp chất trong các ống nghiệm bằng bản sắc ký lớp mỏng silica gel pha đảo với hệ dung môi metanol/nước với tỷ lệ 3,0/1 theo thể tích và gom các ống nghiệm có vết chất trùng nhau lại, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được hợp chất bismembranoit có công thức (I) dưới dạng chất bột màu trắng.

Hợp chất bismembranoit có công thức (I) thu được từ loài san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum* có hoạt tính kháng tế bào ung thư gan (HepG2), ung thư máu (HL-60), ung thư biểu mô (KB), ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư phổi (LU-1), ung thư vú (MCF7), ung thư da (SK-Mel2) và ung thư ruột (SW480) với giá trị IC₅₀ lần lượt là 36,64 $\pm$ 0,16 μ M; 26,90 $\pm$ 2,96 μ M; 23,16 $\pm$ 2,99 μ M; 30,60 $\pm$ 4,21 μ M; 32,44 $\pm$ 1,99 μ M; 39,09 $\pm$ 3,97 μ M; 15,31 $\pm$ 0,80 μ M và 44,01 $\pm$ 1,51 μ M.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa thêm bằng các ví dụ sau. Các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa mà không nhằm làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế này.

Ví dụ 1

Chiết hợp chất bismembranoit có công thức (I) từ loài san hô mềm Sarcophyton pauciplicatum

Mẫu san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum* Verseveldt & Benayahu (Alcyoniidae) sau khi thu thập được tiến hành đông khô trên máy FreeZone-Labconco rồi nghiền thành bột mịn (2,5kg), sau đó bột này được chiết 3 lần, mỗi lần 2 giờ, với rượu metylic (5 lít/lần) trên thiết bị chiết siêu âm Elma S 120H.

Gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được lại, lọc qua giấy lọc và cô quay để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm trên máy cô quay EYELA N-1200a thu được dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là dịch cô A (160 g).

Hòa tan 160g dịch cô A với 3,2 lít nước cất rồi chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan sau đó là dung môi diclorometan, mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần, mỗi lần 3,2 lít dung môi, dịch chiết diclorometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm trên máy cô quay EYELA N-1200a thu được dịch cô diclorometan, ký hiệu là dịch cô B (82,0 g).

Dịch cô B (82,0 g) được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực (Φ 10 cm, L 80 cm) với chất hấp phụ là silica gel pha thường (Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ etyl axetat trong *n*-hexan. Trong đó tỷ lệ *n*-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/1, 70/1, 30/1, 10/1, 1/1 thu được 7 phân đoạn ký hiệu lần lượt là từ B-1 đến B-7.

Phân đoạn	Hệ dung môi <i>n</i> -hexan/etyl axetat (theo thể tích)	Thể tích phân đoạn (ml)	Khối lượng (g)
B-1	100/1	1000	14,5
B-2	100/1	500	5,0
B-3	70/1	500	5,8
B-4	70/1	500	5,0
B-5	30/1	500	7,0
B-6	10/1	500	9,0
B-7	1/1	2000	35,0

Phân đoạn B-7 (35,0 g) được tiến hành phân lập trên hệ thống sắc ký lỏng trung áp sử dụng cột nhồi silica gel pha đảo C-18 (Biotage® SNAP KP-C18-HS 400g) rửa giải gradient tăng dần nồng độ axeton trong nước với tỷ lệ thể tích axeton/nước từ 1/2 đến 3/1 thu được 6 phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt từ B-7-A đến

B-7-F.

Phân đoạn	Khối lượng (g)
B-7-A	7,0
B-7-B	6,5
B-7-C	6,0
B-7-D	3,5
B-7-E	4,0
B-7-F	8,0

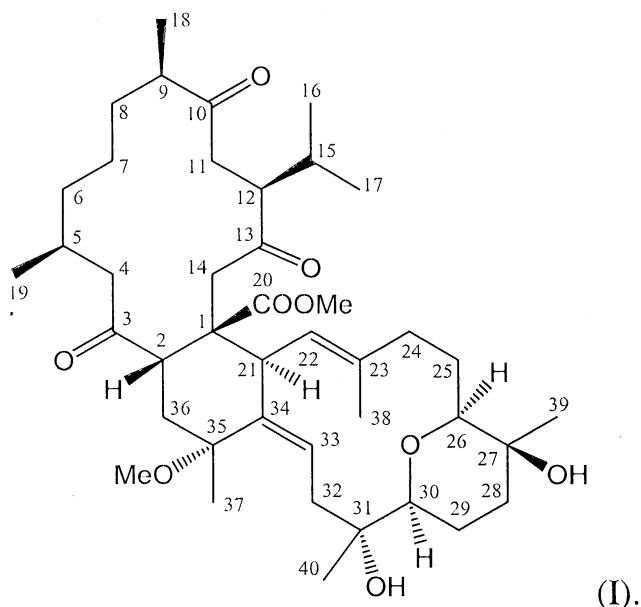
Hòa tan phân đoạn B-7-D (3,5 g) vào 5ml hỗn hợp dung môi metanol/nước với tỷ lệ 3/1 theo thể tích và tiến hành phân lập trên cột sắc ký (Φ 2,5cm, L 50cm) nhồi sephadex LII-20 và sử dụng pha động là 900 ml hỗn hợp dung môi metanol/nước với tỷ lệ 3/1 theo thể tích thu được 5 phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt từ B-7-D-1 đến B-7-D-5.

Phân đoạn	Thể tích phân đoạn (ml)	Khối lượng (g)
B-7-D-1	100	0,5
B-7-D-2	150	0,7
B-7-D-3	300	1,2
B-7-D-4	150	0,6
B-7-D-5	200	0,5

Hòa tan phân đoạn B-7-D-3 (1,2 g) vào 2,5ml hỗn hợp dung môi metanol/nước với tỷ lệ 2,5/1 theo thể tích và tiến hành phân lập trên cột sắc ký (Φ 2,5 cm, L 80 cm) với chất hấp phụ là silica gel pha đảo YMC RP-18 (cỡ hạt 30–50 μ m, trong đó tỷ lệ phân đoạn B-7-D-3/tỷ lệ bột silica gel YMC là 1/20 theo khối lượng) và sử dụng 600ml hỗn hợp dung môi rửa giải là metanol/nước với tỷ lệ 2,5/1 theo thể tích. Dịch rửa giải ra khỏi cột được hứng riêng biệt vào các ống

nghiệm theo thể tích 10 ml/ống. Kiểm tra sự có mặt của các hợp chất trong các ống nghiệm bằng bản sắc ký lớp mỏng silica gel pha đảo với hệ dung môi metanol/nước với tỷ lệ 3,0/1 theo thể tích và gom các ống nghiệm có vết chất trùng nhau lại, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được hợp chất biscembranoit có công thức (I) (khối lượng 95 mg) dưới dạng chất bột màu trắng.

Hợp chất thu được được xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân cho thấy hợp chất này là hợp chất biscembranoit mới có tên là methyl (1*S*,2*R*,6*R*,8*S*,11*S*,15*R*,18*S*,21*S*,22*S*,23*E*,27*S*,28*S*)-2,28-dihydroxy-6-methoxy-2,6,11,15,24,28-hexamethyl-9,16,19-trioxo-18-(propan-2-yl)-31-oxatetracyclo[25.3.1.0⁵,²².0⁸,²¹]hentriaconta-4,23-dien-21-carboxylat (được đặt tên là sarcophytolide M) có công thức (I):



Ví dụ 2

Thử nghiệm về tác dụng dược lý của hợp chất biscembranoit có công thức (I)

Hợp chất biscembranoit có công thức (I) theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính kháng tế bào ung thư bằng phương pháp thử SRB 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 2mM L-glutamin, 1,5 g/L natri bicarbonat, 4,5 g/L glucoza, 10 mM HEPES và 1,0 mM natri pyruvat, ngoài ra bổ sung huyết thanh bê tươi 10% (FBS - Fetal

Bovine Serum, GIBCO). Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỷ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂.

Hợp chất biscembranoit có công thức (I) 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 100 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 dãy nồng độ 100, 20, 4,0 và 0,8 µg/ml. Các tế bào ung thư được nuôi trong phiên vi lượng 96 giếng, được thử chất nhuộm bằng SRB (sulforhodamine 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 trong Bảng 2.

Bảng 2: Kết quả hoạt tính kháng tế bào ung thư *in vitro* của hợp chất biscembranoit có công thức (I)

Dòng tế bào ung thư	Giá trị IC ₅₀ (µM)	
	Hợp chất biscembranoit có công thức (I)	Ellipticine
LNCaP (tuyến tiền liệt)	30,60±4,21	1,99±0,16
MCF7 (vú)	39,09±3,97	1,95±0,12
KB (biểu mô)	23,16±2,99	2,07±0,12
HepG2 (gan)	36,44±0,16	1,71±0,16
SK-Mel-2 (da)	15,31±0,80	2,15±0,24

HL-60 (máu)	26,90±2,96	2,15±0,16
SW480 (ruột)	44,01±1,51	1,95±0,28
LU-1 (phổi)	32,44±1,99	1,71±0,28

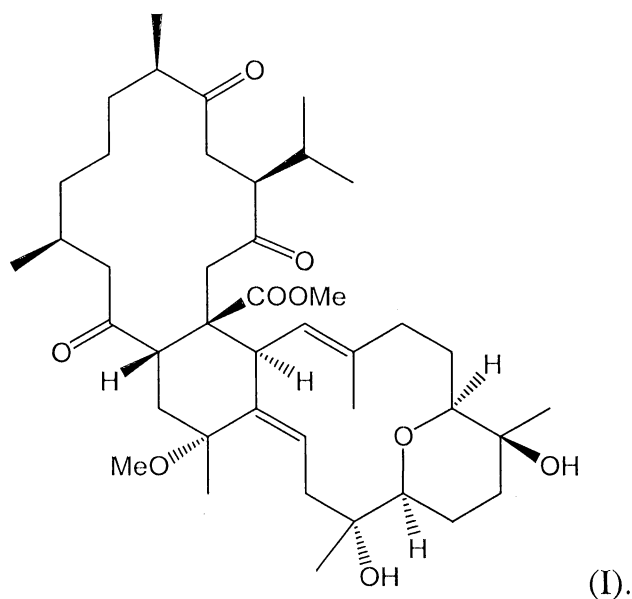
Kết quả cho thấy, hợp chất biscembranoit có công thức (I) có biểu hiện hoạt tính trên tất cả các dòng tế bào ung thư đã thử nghiệm.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết được hợp chất biscembranoit mới có công thức (I) (được đặt tên là sarcophytolide M) từ loài san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum*. Hợp chất này có hoạt tính kháng tám dòng tế bào ung thư người thử nghiệm là tế bào ung thư gan (HepG2), ung thư máu (HL-60), ung thư biểu mô (KB), ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư phổi (LU-1), ung thư vú (MCF7), ung thư da (SK-Mel2) 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 phòng và điều trị bệnh ung thư dựa trên việc khai thác nguồn dược liệu biển quý giá và sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

YÊU CẦU BẢO HIỆU

1. Hợp chất biscembranoit có công thức cấu tạo (I) được tách chiết từ loài san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum* có hoạt tính kháng tế bào ung thư gan (HepG2), ung thư máu (HL-60), ung thư biểu mô (KB), ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư phổi (LU-1), ung thư vú (MCF7), ung thư da (SK-Mel2) và ung thư ruột (SW480)



2. Phương pháp tách chiết hợp chất biscembranoit có công thức (I) theo điểm 1 từ loài san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum*, phương pháp này gồm các bước:

- (i) đông khô mẫu san hô mềm *Sarcophyton pauciplicatum* rồi nghiền thành bột mịn, sau đó bột này được chiết 3 lần, mỗi lần 2 giờ với rượu metylic, trong đó tỷ lệ rượu metylic/bột san hô mềm là 2/1 (thể tích/trọng lượng) trên thiết bị chiết siêu âm;
- (ii) gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cô quay để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là dịch cô A;
- (iii) hòa tan dịch cô A với nước cất theo tỷ lệ 1/20 (trọng lượng/thể tích) sau đó chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan và diclorometan, mỗi dung môi tiến hành chiết 3 lần với tỷ lệ 1/1 theo thể tích, dịch chiết diclorometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô diclorometan, ký hiệu là dịch cô B;

- (iv) dịch cô B được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel pha thường (Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ etyl axetat trong *n*-hexan, trong đó tỷ lệ *n*-hexan/etyl axetat theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/1, 70/1, 30/1, 10/1, 1/1 thu được 7 phân đoạn ký hiệu lần lượt là từ B-1 đến B-7;
- (v) phân đoạn B-7 được tiến hành phân lập trên hệ thống sắc ký lỏng trung áp sử dụng cột nhồi silica gel pha đảo C-18 rửa giải gradient tăng dần nồng độ axeton trong nước với tỷ lệ thể tích axeton/nước từ 1/2 đến 3/1 thu được 6 phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt từ B-7-A đến B-7-F;
- (vi) hòa tan phân đoạn B-7-D vào hỗn hợp dung môi metanol/nước với tỷ lệ 3/1 theo thể tích và tiến hành phân lập trên cột sắc ký nhồi sephadex LH-20 và sử dụng pha động là hỗn hợp dung môi metanol/nước với tỷ lệ 3/1 về thể tích thu được năm phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt từ B-7-D-1 đến B-7-D-5; và
- (vii) hòa tan phân đoạn B-7-D-3 vào hỗn hợp dung môi metanol/nước với tỷ lệ 2,5/1 theo thể tích và tiến hành phân lập trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha đảo YMC RP-18 (cỡ hạt 30–50 μ m, trong đó tỷ lệ phân đoạn B-7-D-3/tỷ lệ bột silica gel YMC là 1/20 theo khối lượng) và sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải là metanol/nước với tỷ lệ 2,5/1 theo thể tích; sau đó hứng riêng biệt dịch rửa giải ra khỏi cột vào các ống nghiệm theo thể tích 10 ml/ống và kiểm tra sự có mặt của các hợp chất trong các ống nghiệm bằng bản sắc ký lớp mỏng silica gel pha đảo với hệ dung môi metanol/nước với tỷ lệ 3,0/1 theo thể tích rồi gom các ống nghiệm có vết chất trùng nhau lại, tiếp đó cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được hợp chất biscembranoit có công thức (I) dưới dạng chất bột màu trắng.