



(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) 
2-0002138

(51)⁷ **C07H 1/08, A61K 35/56**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00388

(22) 12.10.2015

(67) 1-2015-03798

(45) 25.10.2019 379

(43) 25.04.2017 349

(73) 1. VIỆN HÓA HỌC CÁC HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN - VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)

Nhà 1H, số 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

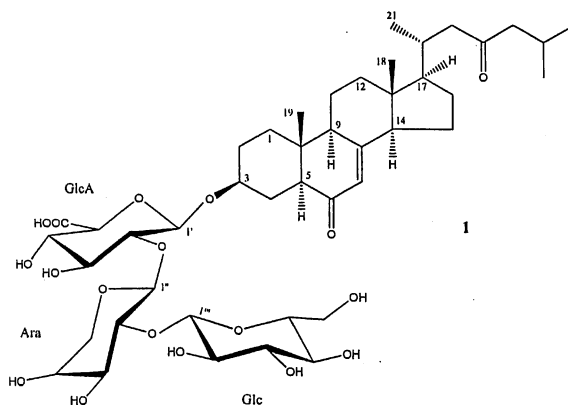
2. VIỆN HÓA SINH HỮU CƠ THÁI BÌNH DƯƠNG, PHÂN VIỆN VIỆN ĐÔNG VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC LIÊN BANG NGÀ (RU)

Pr. 100-let Vladivostoku 159, 690022 Vladivostok, Russian Federation

(72) Alla A. Kicha (RU), Natalia V. Ivanchina (RU), Trịnh Thị Thu Hương (VN), Anatoly I. Kalinovskiy (RU), Pavel S. Dmitrenok (RU), Timofey V. Malyarenko (RU), Ekaterina S. Menchinskaya (RU), Ekaterina A. Yurchenko (RU), Evgeny A. Pislyagin (RU), Dmitry L. Aminin (RU), Phạm Quốc Long (VN), Valentin A. Stonik (RU),

(54) **PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT HỢP CHẤT (20R)-3BETA-O {-BETA-D-GLUCOPYRANOSYL-(1->2)-ALPHA-L-ARABINOPYRANOSYL -(1->2)-BETA-D-GLUCURONOPYRANOSYL}-5ALPHA-CHOLEST-7-EN-6,23-DION TỪ LOÀI SAO BIỂN ECHINASTER LUZONICUS**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp tách chiết hợp chất (20R)-3 β -O-{ β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucuronopyranosyl}-5 α -cholest-7-en-6,23-dion (luzonicoside F) từ loài sao biển *Echinaster luzonicus* có công thức (1). Hợp chất theo giải pháp hữu ích là một glycosit steroid, thuộc lớp chất steroid phân cực có cấu trúc rất đặc biệt bao gồm một chuỗi trisacarit đính tại vị trí C-3 của Δ^7 -3 β -hydroxysteroid aglycon và sự hiện diện của một đơn vị axit glucuronic trong mạch hydrat cacbon và có phổ rộng các hoạt tính sinh học thú vị như gây độc tế bào, tán huyết, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, giảm đau.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên từ sinh vật biển có cấu trúc mới. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất (20*R*)-3 β -*O*-{ β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucuronopyranosyl}-5 α -cholest-7-en-6,23-dion (luzonicoside F) và phương pháp chiết hợp chất này từ loài sao biển *Echinaster luzonicus*.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Biển và đại dương chiếm 71% bề mặt trái đất, chứa đựng nguồn tài nguyên sinh vật biển đa dạng với gần 500.000 loài động, thực vật và vi sinh vật. Môi trường sinh thái biển với những đặc thù riêng đã tạo nên sự phong phú và đa dạng về sinh học, hóa học và hoạt tính sinh học. Các nghiên cứu trên thế giới trong những năm gần đây cho thấy các hợp chất tách chiết được từ sinh vật biển thể hiện nhiều hoạt tính sinh học rất phong phú như kháng khuẩn, kháng nấm, kháng sinh, chống sốt rét, chống ung thư, kìm hãm HIV và điều biến miễn dịch. Đây là một tiềm năng lớn cung cấp dược liệu và mô hình cấu trúc các chất có hoạt tính sinh học cao cho ngành Hóa dược. Chính vì vậy, ngay từ nửa cuối thế kỷ 20 đã hình thành ngành Dược học biển, nghiên cứu khai thác các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học cao từ sinh vật biển sử dụng vào mục đích dược học.

Việt Nam được thiên nhiên ưu đãi với hơn 1 triệu km² vùng biển, có khí hậu nhiệt đới gió mùa, mật độ sông dày đặc, là những điều kiện tốt cho hệ sinh vật biển đa dạng về chủng loại và giàu về trữ lượng. Kể từ những năm 1970, ở Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu về các hợp chất thiên nhiên từ nguồn gốc sinh vật biển. Song, so với nguồn tài nguyên sinh vật biển phong phú thì tập hợp những công trình trong nước còn quá ít ỏi, tản mát và chủ yếu là nghiên cứu về phương diện sinh học. Trong 10 năm trở lại đây, lĩnh vực nghiên cứu hoạt chất sinh vật biển ở Việt Nam đã thu được nhiều thành tựu đáng kể. Cùng với các kết quả trên lĩnh vực nghiên cứu cơ bản điều tra và sàng lọc nguồn hoạt chất biển, nhóm tác giả (Phạm Quốc Long và Cs.)

thuộc Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên đã nghiên cứu sàng lọc cũng như triển khai hàng loạt các sản phẩm biển axit béo đa nối đôi Omega3 (PUFAs) như: sản phẩm thực phẩm chức năng Cốt thoái vương có tác dụng hỗ trợ giảm đau xương khớp, làm chậm quá trình thoái hóa khớp và hỗ trợ điều trị thoái hóa đốt sống; sản phẩm Catosal chiết xuất từ rong biển có tác dụng đào thải kim loại nặng...

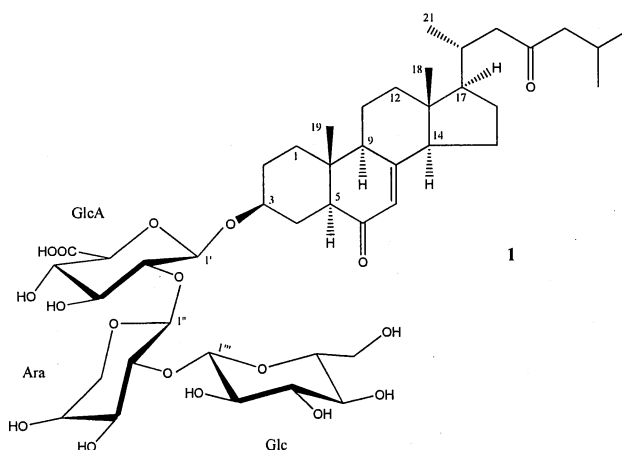
Tiếp tục các công trình nghiên cứu hợp chất thiên nhiên biển có hoạt tính sinh học, với mục đích tạo cơ sở khoa học để có thể đánh giá đúng giá trị được dụng đích thực của nguồn tài nguyên sinh vật biển cũng như nhằm định hướng khai thác các hoạt chất có triển vọng, các tác giả giải pháp hữu ích đã đi sâu nghiên cứu về hóa học đối tượng Sao biển (*Echinaster luzonicus*), thuộc ngành Da gai (Echindermata). Kết quả nghiên cứu đã tìm ra một hợp chất có cấu trúc mới, lần đầu tiên được tìm thấy trong tự nhiên. Cấu trúc của hợp chất này có một số đặc điểm rất độc đáo, bao gồm một chuỗi trisacarit gắn ở vị trí C-3 của Δ^7 -3 β -hydroxysteroid aglycon và sự hiện diện của một đơn vị axit glucuronic trong mạch hydrat cacbon. Hợp chất này thuộc lớp chất steroid phân cực có phổ rộng các hoạt tính sinh học thú vị, như gây độc tế bào, tán huyết, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, giảm đau.

Tài liệu “Starfish saponins: Structure of luzonicoside, a further steroidal cyclic glycoside from the pacific starfish *Echinaster luzonicus*” (tạp chí Experimentia, 1982, Vol.38, Riccio et al., trang 68 – 70), bộc lộ phương pháp phân lập và xác định cấu trúc của 1 hợp chất mới và 6 hợp chất đã biết từ loài sao biển *Echinaster luzonicus*. Cụ thể hơn, tài liệu này đề cập đến hợp chất là muối natri của một glucosid steroid vòng, bao gồm một chuỗi vòng chứa 3 đơn vị đường giữa C-3 và C-6 của Δ^7 -3 β , 6 β -dihydroxysteroid aglycon có cấu trúc tương tự như hợp chất nêu trong giải pháp hữu ích. Tuy nhiên, tài liệu này không bộc lộ một cách chi tiết các công đoạn của phương pháp phân lập hợp chất này. Hiện nay, có rất nhiều phương pháp đã được sử dụng để tách chiết các hợp chất thiên nhiên từ mẫu sinh vật biển, chẳng hạn như đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền giải pháp hữu ích Việt Nam số 1-2010-03127 mô tả phương pháp tách chiết hợp chất polyhydrosteroid từ loài sao biển *Archaster typicus* bằng cách ngâm chiết mẫu trong etanol, loại bỏ dung môi thu được dịch cô, tách chiết bằng hệ dung môi CHCl_3 :EtOH sau đó tiếp tục tách bằng cách sử dụng RP-HPLC với hệ dung môi rửa giải là EtOH:H₂O:1N NH₄OAc với các tỷ lệ 55:44:1, 70:29:1 và 65:34:1. Tài liệu “Two new steroid glucosides from the Far East starfish *Hippasteria kurilensis*”

(13.02.2009) cũng đã bộc lộ phương pháp tách chiết hợp chất steroid glucosit từ sao biển *Hippasteria kurilensis* bằng cách chiết mẫu sao biển trong ethanol, thu dịch cô ethanol sau đó tách chiết bằng hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$, định tính các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng TLC với hệ dung môi $\text{BuOH}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ là 4:1:2, phân tách phân đoạn bằng hệ dung môi $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:1\text{N NH}_4\text{OAc}$. Tuy nhiên, việc phân lập các chất phân cực, đặc biệt là từ đối tượng sinh vật biển, là rất khó khăn bởi nó đòi hỏi phải loại bỏ được phần muối vô cơ và các tạp chất phân cực khác. Ngoài ra, các chất steroid phân cực lại thường tồn tại ở dạng hỗn hợp phức tạp trong dịch chiết từ động vật và rất khó để phân lập. Do đó, vẫn có nhu cầu tìm kiếm phương pháp tách chiết và phân lập áp dụng trong nghiên cứu mẫu sinh vật biển, đặc biệt là đối với loài sao biển *Echinaster luzonicus* nhằm thu được các hợp chất glycosit steroid vòng, nhóm chất phân cực có cấu trúc đặc biệt rất hiếm gặp trong sinh vật biển và có nhiều phổ hoạt tính sinh học như gây độc tế bào, tán huyết, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, giảm đau, đặc biệt rất hiệu quả trong việc phòng và chống ung thư.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp tách chiết hợp chất $(20R)\text{-}3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-arabinopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-glucuronopyranosyl}\}\text{-}5\alpha\text{-cholest-7-en-6,23-dion}$ (luzonicoside F) có công thức cấu tạo (1) từ loài sao biển *Echinaster luzonicus*:



Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Phương pháp tách chiết hợp chất $(20R)\text{-}3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-arabinopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-glucuronopyranosyl}\}\text{-}5\alpha\text{-cholest-7-en-6,23-dion}$ (luzonicoside F) có công thức cấu tạo (1) từ loài sao biển *Echinaster luzonicus* theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước sau:

(i) thu gom mẫu sinh vật biển tươi, bảo quản trong -18°C , thái nhỏ rồi ngâm chiết bằng etanol 2 lần (tỷ lệ nguyên liệu (kg):dung môi (lít) là 1:2) ở nhiệt độ trong phòng;

(ii) gộp các dịch chiết etanol thu được ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô etanol, ký hiệu là dịch cô A1;

(iii) chiết phân bố dịch cô A1 bằng hỗn hợp dung môi $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (tỷ lệ 1/1 theo thể tích), tách loại phần dịch CHCl_3 , phần dịch EtOH được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô A2;

(iv) tiến hành phân tách dịch cô A2 trên cột sắc ký sử dụng chất hấp phụ là silica gel (silica gel KSK, cỡ hạt 50-160 μm , kích thước cột 3x25 cm) với hỗn hợp dung môi rửa giải là $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ có tỷ lệ về thể tích là 8:1, 6:1, 4:1, 1:1, 1:4, 0:1 thu được 8 phân đoạn nhỏ, kí hiệu: F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8;

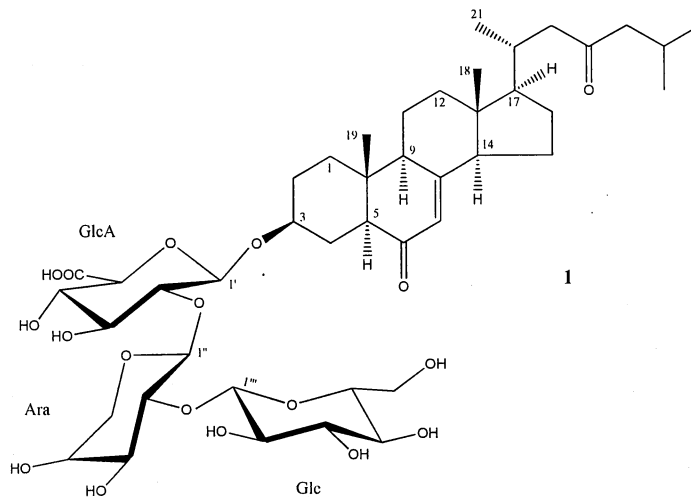
(v) tiến hành phân tích định tính 8 phân đoạn thu được bằng sắc ký lớp mỏng (TLC, kích thước 4,5x6,0 cm, silica gel 5-17 μm) sử dụng hệ dung môi n-BuOH:EtOH:H₂O (4:1:2 theo thể tích) xác định được 2 phân đoạn F7 (R_f 0,76; 0,61) và F8 (R_f 0,59; 0,48) chứa các hợp chất steroid phân cực;

(vi) tiến hành tinh chế phân đoạn chứa các hợp chất steroid phân cực F7 sử dụng phương pháp sắc ký cột với chất hấp phụ là florisil (cỡ hạt 200-300 mesh, kích thước cột 3x5cm), hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ có tỷ lệ về thể tích là 4:1, 1:1, 1:4, 0:1 thu được phân đoạn F7';

(vii) hòa tan phân đoạn F7' trong metanol và tiến hành phân lập sử dụng phương pháp sắc ký lỏng cao áp RP-HPLC (với chất hấp phụ là C-18, kích thước cột 0,4 x 110 mm, điều kiện chạy cột: tốc độ dòng 2,5ml/ph), dung môi rửa giải là hỗn hợp dung môi EtOH:H₂O:1M NH_4OAc với tỷ lệ về thể tích là 55:44:1, thu được 6 phân đoạn, ký hiệu lần lượt là: F7'-1, F7'-2, F7'-3, F7'-4, F7'-5, F7'-6;

(viii) tiếp tục hòa tan phân đoạn F7'-1 trong metanol và tiến hành tinh chế sử dụng phương pháp sắc ký lỏng cao áp RP-HPLC (với chất hấp phụ là C-18, kích thước cột 0,4x110 mm, điều kiện chạy cột: tốc độ dòng 1,5ml/ph), dung môi rửa giải là hỗn hợp dung môi EtOH:H₂O:1M NH_4OAc với tỷ lệ về thể tích là 58:41:1, thu được hợp chất (20R)-3 β -O-{ β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucuronopyranosyl}-5 α -cholest-7-en-6,23-dion (luzonicoside F) ở dạng rắn, vô định hình.

Hợp chất (20*R*)-3 β -O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucuronopyranosyl}-5 α -cholest-7-en-6,23-dion (luzonicoside F) thu được theo phương pháp của giải pháp hữu ích có công thức cấu tạo (1) sau:



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

Công thức phân tử: $C_{44}H_{68}O_{18}$;

Khối lượng phân tử: $M = 884$;

Các thông số vật lý:

+ Chất vô định hình, màu trắng;

+ Độ quay cực: $[\alpha]_D^{20} -10,9$ (c 0,1, MeOH)

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS m/z : 907,4295 $[M + Na]^+$, (phân tích nguyên tố cho công thức $C_{44}H_{68}O_{18}Na$: 907,4298);

Hợp chất (20*R*)-3 β -O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucuronopyranosyl}-5 α -cholest-7-en-6,23-dion (luzonicoside F) có công thức cấu tạo (1) từ loài sao biển *Echinaster luzonicus* theo giải pháp hữu ích là một glycosit steroid, thuộc lớp chất steroid phân cực có cấu trúc rất đặc biệt bao gồm một chuỗi trisaccharide đính tại vị trí C-3 của Δ^7 -3 β -hydroxysteroid aglycon và sự hiện diện của một đơn vị axit glucuronic trong mạch hydrat cacbon và có phổ rộng các hoạt tính sinh học thú vị, như: gây độc tế bào, tán huyết, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, giảm đau. Do đó, hợp chất này có thể được sử dụng để làm mẫu cho việc tổng hợp và bán tổng hợp các chế phẩm có thể sử dụng trong y, dược nhằm phòng và điều trị các bệnh ung thư.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phương pháp chiết hợp chất (20R)-3 β -O-{ β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucuronopyranosyl}-5 α -cholest-7-en-6,23-dion (luzonicoside F) có công thức cấu tạo (1) từ loài sao biển *Echinaster luzonicus*.

Mẫu sao biển tươi (1,0 kg), sau khi thu thập được bảo quản trong -18°C, đem thái nhỏ rồi ngâm chiết 2 lần (mỗi lần 3 ngày) với ethanol (2,0 lít/1 lần) ở nhiệt độ phòng. Gộp các dịch chiết ethanol, cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, thu được dịch cô A1 (90g). Dịch cô A1 được chiết phân bố 3 lần bằng hỗn hợp dung môi CHCl₃ (500ml/1 lần) và EtOH (500 ml/1 lần). Loại bỏ các phần dịch chiết CHCl₃, phần dịch EtOH được cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô A2 (8,5 g). Dịch cô A2 được tiến hành phân tách trên cột sắc ký sử dụng chất hấp phụ là silica gel pha thường (silica gel KSK, cỡ hạt 50-160 μ m Krasnodar, Russia; kích thước cột 3x25 cm) với hỗn hợp dung môi rửa giải là CHCl₃:EtOH có tỷ lệ về thể tích tương ứng là 8:1 (2,0 lít), 6:1 (1,0 lít), 4:1 (1,0 lít), 1:1 (1,0 lít), 1:4 (1,5 lít), 0:1 (1,0 lít) thu được 8 phân đoạn nhỏ, kí hiệu: F1 (0,81 g), F2 (1,12 g), F3 (0,93 g), F4 (0,77 g), F5 (0,62 g), F6 (0,43 g), F7 (0,61 g), F8 (0,12 g). Phân tích định tính 8 phân đoạn thu được bằng sắc ký lớp mỏng TLC (kích thước bản mỏng 4,5x6,0 cm) với chất hấp phụ là silica gel pha thường (cỡ hạt 5–17 μ m) sử dụng hệ dung môi n-BuOH:EtOH:H₂O (có tỷ lệ tương ứng về thể tích là 4:1:2) xác định được phân đoạn F7 (R_f 0,76; 0,61) và F8 (R_f 0,59; 0,56) chứa các hợp chất steroid phân cực.

Phân đoạn F7 được tiến hành tinh chế sử dụng phương pháp sắc ký cột (kích thước cột 30 x 50 mm) với chất hấp phụ là florisil (cỡ hạt 200–300 mesh, Aldrich Chemical Co.), hệ dung môi CHCl₃:EtOH có tỷ lệ về thể tích tương ứng là 4:1 (1,0 lít), 1:1 (0,6 lít), 1:4 (0,6 lít), 0:1 (0,8 lít), thu được phân đoạn F7' (480 mg).

Phân đoạn F7' (480 mg) được hòa tan trong metanol (1,5 ml) và tiến hành phân lập sử dụng phương pháp sắc ký lỏng cao áp RP-HPLC (với chất hấp phụ là C-18, kích thước cột 0,4x110 mm, điều kiện chạy cột: tốc độ dòng 2,5ml/ph), dung môi rửa giải là hỗn hợp dung môi EtOH:H₂O:1M NH₄OAc với tỷ lệ về thể tích là 55:44:1, thu được 6 phân đoạn, ký hiệu lần lượt là: phân đoạn F7'-1 (201,5 mg), F7'-2 (25,4 mg), F7'-3 (132,1 mg), F7'-4 (114,6 mg), F7'-5 (34,6 mg), F7'-6 (41,1 mg).

Phân đoạn F7'-1 (10,0 mg) được hòa tan trong metanol (100 μ l) và tiến hành tinh chế sử dụng phương pháp sắc ký lỏng cao áp RP-HPLC (với chất hấp phụ là C-

18, kích thước cột 0,4 x 110 mm, điều kiện chạy cột: tốc độ dòng 1,5ml/ph), dung môi rửa giải là hỗn hợp dung môi EtOH:H₂O:1M NH₄OA_c với tỷ lệ về thể tích là 58:41:1, thu được 1,0 mg hợp chất (20*R*)-3β-*O*-{β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl}-5α-cholest-7-en-6,23-dion (luzonicoside F), ở dạng rắn, vô định hình.

Qua các dữ kiện phổ (1D-, 2D-NMR), hợp chất luzonicoside F được khẳng định là chất hoàn toàn sạch. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của hợp chất luzonicoside F được đưa ra trong Bảng 1 và 2.

Bảng 1: Dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR (δ, ppm) của hợp chất 1

STT C	δ _C	δ _H (J Hz)	STT C	δ _C	δ _H (J Hz)
1	37,7	1,84 m	14	56,6	2,19 m
		1,41 m	15	23,6	1,66 m
2	29,8	1,96 m			1,55 m
		1,45 m	16	28,8	1,95 m
3	78,8	3,77 m			1,36 m
4	27,4	2,30 m	17	57,2	1,42 m
		1,39 m	18	12,7	0,67 s
5	54,5	2,34 dd (3,6; 12,2)	19	13,5	0,85 s
6	202,4		20	33,7	2,01 m
7	123,5	5,65 t (2,2)	21	20,3	0,94 d (6,6)
8	166,7	-	22	51,0	2,49 dd (3,0; 16,4)
9	51,2	2,30 m			2,21 dd (9,7; 16,4)
10	39,4	-	23	213,6	-
11	22,8	1,86 m	24	53,3	2,31 d (6,7)
		1,68 m	25	25,6	2,09 sept (6,8)
12	39,9	2,14 m	26	22,8	0,89 d (6,7)
		1,48 m	27	22,9	1,91 d (6,7)
13	45,9	-			

Bảng 2. Số liệu phổ ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, (δ , ppm) của các đường trong hợp chất
luzonicoside F

C No.	δ_{C}	δ_{H} (J Hz)
GlcA		
1'	101,2; CH	4,60; d (7,5)
2'	84,2; CH	3,33; m
3'	77,3; CH	3,62; t (9,0)
4'	73,0; CH	3,51; m
5'	76,1; CH	3,62; m
6'	176,8; C	
Ara		
1''	103,8; CH	4,69; d (6,2)
2''	81,4; CH	3,84; dd (6,3; 7,9)
3''	73,7; CH	3,79; dd (3,5; 7,9)
4''	68,9; CH	3,84; m
5''	66,1; CH ₂	3,95; dd (4,5; 12,3) 3,52; dd (2,3; 12,4)
Glc		
1'''	105,5; CH	4,61; d (8,0)
2'''	75,6; CH	3,24; dd (8,0; 9,0)
3'''	77,9; CH	3,36; t (9,0)
4'''	71,2; CH	3,30; m
5'''	78,6; CH	3,33; m
6'''	62,5; CH ₂	3,89; dd (2,0; 12,2) 3,71; dd (5,3; 12,1)

Đo trong CD₃OD-d₄; ^1H 700.13 MHz; ^{13}C 176.04 MHz

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất (20*R*)-3 β -O-{ β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucuronopyranosyl}-5 α -cholest-7-en-6,23-dion (luzonicoside F) và phương pháp tách chiết hợp chất này từ loài sao biển *Echinaster luzonicus*. Phương pháp tách chiết này giúp tách chiết các chất steroid phân cực thường rất khó phân lập được từ các loài sinh vật biển, đặc biệt là đối với loài sao

biển *Echinaster luzonicus*. Hợp chất thu được bằng phương pháp này có phổ rộng các hoạt tính sinh học như gây độc tế bào, tán huyết, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, giảm đau. Đồng thời, phương pháp này cũng 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 HỘ

1. Phương pháp tách chiết hợp chất (20*R*)-3 β -*O*-{ β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucuronopyranosyl}-5 α -cholest-7-en-6,23-dion từ loài sao biển *Echinaster luzonicus* bao gồm các bước sau:

(i) thu gom mẫu sinh vật biển tươi, bảo quản trong -18°C, thái nhỏ rồi ngâm chiết bằng etanol 2 lần (tỷ lệ nguyên liệu (kg):dung môi (lít) là 1:2) ở nhiệt độ trong phòng;

(ii) gộp các dịch chiết etanol thu được ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô etanol, ký hiệu là dịch cô A1;

(iii) chiết phân bố dịch cô A1 bằng hỗn hợp dung môi CHCl₃: EtOH (tỷ lệ 1/1 theo thể tích) tách loại phần dịch CHCl₃, phần dịch EtOH được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô A2;

(iv) tiến hành phân tách dịch cô A2 trên cột sắc ký sử dụng chất hấp phụ là silica gel (silica gel KSK, cỡ hạt 50-160 μ m, kích thước cột 3x25 cm) với hỗn hợp dung môi rửa giải là CHCl₃:EtOH có tỷ lệ về thể tích 8:1, 6:1, 4:1, 1:1, 1:4, 0:1 thu được 8 phân đoạn nhỏ, kí hiệu: F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8;

(v) tiến hành phân tích định tính 8 phân đoạn thu được bằng sắc ký lớp mỏng (TLC, kích thước 4,5x6,0 cm, silica gel 5-17 μ m) sử dụng hệ dung môi n-BuOH:EtOH:H₂O (4:1:2 theo thể tích) xác định được 2 phân đoạn F7 (R_f 0,76; 0,61) và F8 (R_f 0,59; 0,48) chứa các hợp chất steroid phân cực;

(vi) tiến hành tinh chế phân đoạn chứa các hợp chất steroid phân cực F7 sử dụng phương pháp sắc ký cột với chất hấp phụ là florisil (cỡ hạt 200-300 mesh, kích thước cột 3x5cm), hệ dung môi CHCl₃:EtOH có tỷ lệ về thể tích là 4:1, 1:1, 1:4, 0:1 thu được phân đoạn F7';

(vii) hòa tan phân đoạn F7' trong metanol và tiến hành phân lập sử dụng phương pháp sắc ký lỏng cao áp RP-HPLC (với chất hấp phụ là C-18, kích thước cột 0,4 x 110 mm, điều kiện chạy cột: tốc độ dòng 2,5ml/ph), dung môi rửa giải là hỗn hợp dung môi EtOH:H₂O:1M NH₄OA_c với tỷ lệ về thể tích là 55:44:1, thu được 6 phân đoạn, ký hiệu lần lượt là: F7'-1, F7'-2, F7'-3, F7'-4, F7'-5, F7'-6; và

(viii) tiếp tục hòa tan phân đoạn F7'-1 trong metanol và tiến hành tinh chế sử dụng phương pháp sắc ký lỏng cao áp RP-HPLC (với chất hấp phụ là C-18, kích thước cột 0,4 x 110 mm, điều kiện chạy cột: tốc độ dòng 1,5ml/ph), dung môi rửa giải là hỗn hợp dung môi EtOH:H₂O:1M NH₄OA_c với tỷ lệ về thể tích là 58:41:1, thu được hợp

chất $(20R)-3\beta-O-\{\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-arabinopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-glucuronopyranosyl}\}-5\alpha\text{-cholest-7-en-6,23-dion}$ ở dạng rắn, vô định hình.