



(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 **1-0020227**

(51)⁷ **C07C 35/00, A61K 31/045, 36/074** (13) **B**

(21) 1-2015-04563

(22) 27.11.2015

(45) 25.12.2018 369

(43) 25.01.2016 334

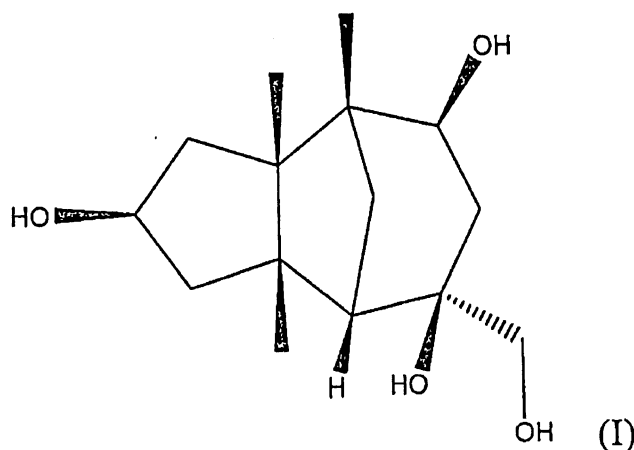
(73) **VIỆN HÓA SINH BIỂN, VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)**

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

(72) **Nguyễn Hải Đăng (VN), Châu Văn Minh (VN), Nguyễn Tiến Đạt (VN), Nguyễn Phương Đại Nguyên (VN), Phạm Thanh Bình (VN)**

(54) **HỢP CHẤT GYMNOMITRAN-3ALPHA,5ALPHA,9BETA,15-TETROL VÀ PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT HỢP CHẤT NÀY TỪ NẤM LINH CHI GANODERMA LUCIDUM (LEYSS. EX FR.) KARST**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol có công thức (I) được tách chiết từ nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss.ex Fr.) Karst và phương pháp tách chiết hợp chất này từ nấm linh chi. Hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol có tác dụng diệt các dòng tế bào ung thư phổi kháng thuốc A549 và ung thư tiền liệt tuyến PC3.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol được tách chiết từ nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. Hợp chất này có tác dụng diệt các tế bào ung thư phổi kháng thuốc A549 và ung thư tiền liệt tuyến PC3. Vì vậy, hợp chất này có thể được sử dụng trong việc phòng ngừa và điều trị bệnh ung thư. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tách chiết hợp chất này từ nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.

Tình trạng kỹ thuật sáng chế

Nấm linh chi có tên khoa học là *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst, thuộc họ Nấm lim (Ganodermataceae). Theo đông y, nấm linh chi có vị nhạt, tính ấm, có tác dụng bồi bổ giúp khí huyết lưu thông, bảo can (bảo vệ gan), giải độc, cường tâm, kiện não (bổ não), tiêu đờm, lợi tiểu, ích vị và làm tăng sức cho tế bào hấp thụ khí oxy tốt hơn. Các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của nấm linh chi cho thấy các thành phần phổ biến và được xem là có nhiều tác dụng hoạt tính sinh học nhất là polysacarit, triterpenoid, meroterpenoid, protein... Trong đó các polysacarit có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh, chống thiếu máu cục bộ trên não chuột [Zhou, et al., Neuroprotective effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cerebral ischemic injury in rats. Journal of Ethnopharmacology, 131, 154-164 (2010)] và bảo vệ thần kinh, chống chấn thương cột sống [Gokce, et al., Neuroprotective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides against traumatic spinal cord injury in rats. Injury, 46, 2146-2155 (2015)]. Nghiên cứu thực nghiệm khác nhau và thử nghiệm lâm sàng hiện đại khác nhau cho thấy các hợp chất này có tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, chống khối u và các hoạt động điều hòa miễn dịch [Mizushima, et al., Lucidenic acid O and lactone, new terpene

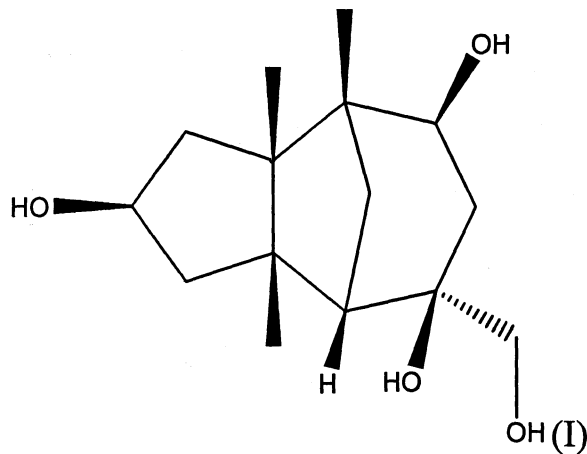
inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete, *Ganoderma lucidum*. *Bioorg Med Chem*, 7, 2047-2052 (1999); Jones, et al., Antioxidant and antitumor activity of *Ganoderma lucidum* Reishi (Aphylllophoromycetidae) from South India. *Int J Med Mushr*, 2, 195-200 (2000); Lakshmi, et al., Antiperoxidative, anti-inflammatory, and antimutagenic activities of ethanol extract of the mycelium of *Ganoderma lucidum* occurring in South India. *Teratog Carcinog Mutagen*, 1, 85-97 (2003)]. Tuy nhiên, các nghiên cứu vẫn chưa bao quát hết được các thành phần hóa học và tác dụng sinh học của nấm linh chi, vì vậy mà vẫn mong muốn có các nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm ra các hợp chất mới có hoạt tính điều trị bệnh từ nấm linh chi này.

Nhóm hợp chất gymnomitran sesquiterpen đã được phân lập từ loài nấm *Antrodiella albocinnamonea*. Theo đó, hợp chất có khung gymnomitran sesquiterpen phân lập từ loài *A. albocinnamonea* có hoạt tính gây độc tế bào ung thư phổi A549, tuy nhiên hoạt tính này không đáng kể [Chen, et al., New triquinane and gymnomitrane sesquiterpenes from fermentation of the basidiomycete *Antrodiella albocinnamonea*. *Fitoterapia*, 102, 61-66 (2015)]. Một số hợp chất gymnomitran phân lập từ các loài rêu tản có khung cấu trúc khác so với hợp chất đề xuất [Warmers, et al., Gymnomitrane-type sesquiterpenes of the liverwort *Gymnomitrium obtusum* and *Reboulia hemisphaerica*. *Phytochemistry*, 52, 1501-1505 (1999); Adio, et al., Volatile components from European liverworts *Marsupella emarginata*, *M. aquatica* and *M. alpina*. *Phytochemistry*, 61, 79-91 (2002)]. Hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol được phân lập từ phân đoạn chiết etyl axetat không trùng lặp với các nghiên cứu phân lập các hợp chất từ nấm trước đây [Bình và các đồng tác giả., Hợp chất farnesyl hydroquinon phân lập từ nấm linh chi. *Tạp chí Dược liệu*, 20(6), 333-336 (2015)]. Hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol lần đầu tiên được chúng tôi phát hiện và công bố là hợp chất mới [Bình, et al., A new cytotoxic gymnomitrane sesquiterpene from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Natural Product Communications*, 10(11), 1911-1912 (2015)].

Bản chất kỹ thuật sáng chế

Mục đích của sáng chế nhằm phân tách được hoạt chất có hoạt tính điều trị bệnh từ nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.

Sáng chế đề xuất hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol được tách chiết từ nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst, có công thức (I):



Hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol này có tác dụng diệt các tế bào ung thư phổi kháng thuốc A549 và ung thư tiền liệt tuyến PC3.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp tách chiết hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol có công thức (I) từ nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. Phương pháp này bao gồm các bước:

(1) thu gom phần thể quả nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst, sau đó thái nhỏ, phơi khô dưới bóng râm và xay thành bột;

(2) ngâm chiết phần bột thu được ở bước (1) bằng dung môi metanol theo tỷ lệ 1/3 (trọng lượng/thể tích) từ 1 đến 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 16-20 giờ ở nhiệt độ trong khoảng từ 25°C đến 30°C, sau đó gộp các phần dịch chiết metanol thu được và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được dạng dịch cô đặc I;

(3) hòa tan dịch cô đặc I trong nước cất theo tỷ lệ trong khoảng 1/10 đến 1/15 (theo trọng lượng/thể tích) để thu được dung dịch IA, rồi chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan theo tỷ lệ dung môi *n*-hexan : dung dịch IA là 1/2 (theo thể tích) từ 1 đến 5 lần, sau đó tách loại phần dung môi nằm bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới;

(4) chiết phân bố phần dung dịch nước thu được ở bước (3) bằng dung môi ethyl axetat theo tỷ lệ dung môi hữu cơ : dịch nước là $\frac{1}{2}$ (theo thể tích) từ 1 đến 5 lần, sau đó tách loại phần dung môi nằm bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới;

(5) phần dung dịch nước ở bước (4) được lọc qua cột diaion HP-20, rửa loại tạp bằng nước sau đó rửa giải bằng dung môi metanol. Cát loại dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô đặc II;

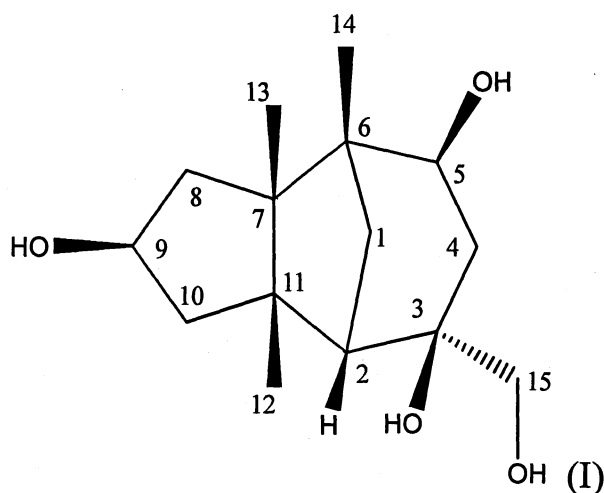
(6) tách phân đoạn dịch cô đặc II thu được ở bước (5) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/20 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/metanol theo các tỷ lệ 100/1, 50/1, 20/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 (theo thể tích). Thu gom phân đoạn được rửa giải từ hệ dung môi điclorometan/metanol với tỷ lệ 1/1 rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô đặc III;

(7) tách phân đoạn dịch cô đặc III thu được ở bước (6) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/40 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/metanol theo tỷ lệ 8/1 (theo thể tích). Dựa trên sắc ký lớp mỏng silica gel pha thường với hệ dung môi điclorometan-metanol 1/1 (theo thể tích), thu gom các phân đoạn có vết chất ở khoảng $R_f=0,45$, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô đặc IV;

(8) tinh chế dịch cô đặc IV thu được ở bước (7) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/100 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/axeton theo tỷ lệ 1/1 (theo thể tích), thu được hợp chất tinh khiết gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol dưới dạng chất rắn màu trắng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol thu được từ nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst có công thức cấu tạo (I):



Hợp chất (I) có các tính chất như sau:

- Chất rắn màu trắng;
- Công thức phân tử: $C_{15}H_{26}O_4$;
- Khối lượng phân tử 270 g/mol.

Phương pháp tách chiết hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol này từ nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst gồm các bước như sau:

Phần thể quả nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst được thu gom, rửa sạch, sau đó thái nhỏ, phơi khô dưới bóng râm và xay thành bột;

Tiến hành ngâm chiết phần bột thu được bằng dung môi hữu cơ theo tỷ lệ 1/3 (theo trọng lượng/thể tích) từ 1 đến 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 16-20 giờ ở nhiệt độ trong khoảng từ 25°C đến 30°C. Dung môi hữu cơ thường được sử dụng là metanol, etanol hoặc axeton. Dung môi được ưu tiên sử dụng là metanol. Sau đó, gộp các phần dịch chiết metanol thu được và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được dạng dịch cô đặc I;

Dịch cô đặc I được hoà trong nước cất theo tỷ lệ trong khoảng 1/10 đến 1/15 (theo trọng lượng/thể tích) để thu được dung dịch IA, rồi chiết phân bố bằng dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp, không tan hoặc ít tan trong nước theo tỷ lệ dung môi hữu cơ: dung dịch IA là 1/2 (theo thể tích) từ 1 đến 5 lần. Dung môi thường được sử dụng là ete dầu hỏa, *n*-hexan, xăng công nghiệp và dietyl ete. Dung môi được ưu tiên sử dụng là *n*-hexan. Sau đó, tách bỏ phần dung môi nằm phía bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm phía bên dưới;

Tiến hành chiết phân bố phần dung dịch nước thu được ở bước trên bằng dung môi etyl axetat theo tỷ lệ dung môi hữu cơ : dịch nước là 1/2 (theo thể tích) từ 1 đến 5 lần, tách loại phần dung môi nằm bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới;

Phần dung dịch nước thu được ở trên được lọc qua cột diaion HP-20, rửa loại tạp bằng nước sau đó rửa giải bằng dung môi metanol. Cát loại dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô đặc II;

Tiến hành tách phân đoạn dịch cô đặc II thu được trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm , theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/20 (theo khối lượng). Cột nhồi có đường kính trong là 4,0 cm. Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/metanol theo các tỷ lệ 100/1, 50/1, 20/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 (theo thể tích), sau đó thu gom phân đoạn được rửa giải từ hệ dung môi điclorometan/metanol tỷ lệ 1/1, rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô đặc III;

Dịch cô đặc III thu được ở trên tiếp tục được tách phân đoạn trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường với cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm , theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/40 (theo khối lượng). Cột nhồi có đường kính trong là 2,0 cm, rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/metanol theo tỷ lệ 8/1 (theo thể tích). Dựa trên sắc ký lớp mỏng silica gel pha thường với hệ dung môi điclorometan-metanol 1/1 (theo thể tích), thu gom các phân đoạn có vết chất ở khoảng $R_f=0,45$, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô đặc IV;

Bước cuối cùng là tinh chế dịch cô đặc IV thu được trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường với cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm , theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/100 (theo khối lượng), cột được dùng sắc ký có đường kính trong là 1,5 cm. Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/axeton theo tỷ lệ 1/1 (theo thể tích), thu được hợp chất tinh khiết gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol dưới dạng chất rắn màu trắng.

Thiết bị được dùng để cất loại dung môi dưới áp suất giảm là thiết bị cất quay thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp sắc ký

cột và sắc ký lớp mỏng pha thường được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 và RP18 F254 (do công ty Merck của Đức cung cấp) đều là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phương pháp tách chiết hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol theo sáng chế từ nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst cho phép tách chiết được hợp chất này một cách tinh khiết từ nhiều hợp chất có trong mẫu nấm linh chi. Hoạt chất đã được thử nghiệm và cho thấy tác dụng diệt tế bào ung thư phổi kháng thuốc A549 và ung thư tiền liệt tuyến PC3.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được giải thích tiếp bằng các ví dụ và phương án minh họa sau. Tuy nhiên các ví dụ này không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các cải biến sẽ dễ dàng thực hiện bởi các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và chúng sẽ nằm trong phạm vi ý tưởng của sáng chế và của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Tách chiết hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol

Phần thể quả của nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst, sau đó thái nhỏ, phơi khô dưới bóng râm và xay thành bột. Ngâm chiết 800 g bột này bằng 2,4 lít dung môi metanol thực hiện với 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 16-20 giờ ở nhiệt độ trong khoảng từ 25°C đến 30°C, sau đó gộp các phần dịch chiết metanol thu được và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được 40 g dạng dịch cô đặc I;

Hòa tan dịch cô đặc I trong 600 ml nước cất, rồi chiết phân bố bằng 300 ml dung môi *n*-hexanx 3 lần, sau đó tách loại phần dung môi hexan nằm bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới và tiếp tục chiết phân bố bằng dung môi etyl axetat x 3 lần, mỗi lần chiết với 300 ml. Sau khi tách loại lớp dung môi etyl axetat nằm bên trên thu được phần dịch nước bên dưới (600 ml).

Phần dung dịch nước thu được ở trên được lọc qua cột diaion HP-20 (600 g), rửa loại tạp bằng nước rồi rửa giải bằng dung môi metanol. Cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 3,3 g dịch cô đặc II;

Tách phân đoạn dịch cô đặc II thu được trên cột sắc ký với 66g chất hấp phụ silica gel pha thường cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm , cột nhồi có đường kính trong 2,0 cm. Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/metanol theo các tỷ lệ 100/1, 50/1, 20/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 (theo thể tích), sau đó thu gom phân đoạn được rửa giải từ hệ dung môi điclorometan/metanol với tỷ lệ 1/1, rồi cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được 1,2 g dịch cô đặc III;

Tách phân đoạn dịch cô đặc III trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường (48 g) với cỡ hạt nằm trong khoảng 40-63 μm , cột nhồi có đường kính trong là 1,5 cm. Thực hiện rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/metanol theo tỷ lệ 8/1 (theo thể tích). Dựa trên sắc ký lớp mỏng silica gel pha thường với hệ dung môi điclorometan-metanol 1/1 (theo thể tích), thu gom các phân đoạn có vết chất ở khoảng $R_f=0,45$, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 20 mg dịch cô đặc IV;

Kết thúc quá trình là tinh chế dịch cô đặc IV trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường (2 g) với kích thước hạt nằm trong khoảng 40-63 μm , cột nhồi có đường kính trong là 1,0 cm. Tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/axeton theo tỷ lệ 1/1 (theo thể tích), thu được 1,5 mg hợp chất tinh khiết gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol dưới dạng chất rắn màu trắng.

Cấu trúc hóa học của gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol được xác định bằng các số liệu phổ khối lượng và phổ cộng hưởng từ hạt nhân như sau:

- Phổ khối lượng HR-ESI-MS m/z : 269,1744 [M-H]⁻.

- Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ_H 0,99 (3H, br s, H-14), 1,15 (3H, br s, H-13), 1,24 (1H, m, H_b-1), 1,28 (3H, br s, H-12), 1,34 (1H, m, H_b-8), 1,46 (1H, d, $J = 15,0$ Hz, H_b-10), 1,62 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-2), 1,88 (1H, m, H_a-1), 1,92 (2H, m, H-4), 2,97 (1H, dd, $J = 4,5, 15,0$ Hz, H_a-8), 3,44 (1H, m, H_a-10), 3,50 (2H, m, H-15), 3,57 (1H, dd, $J = 8,0, 11,5$ Hz, H-5), 4,46 (1H, m, H-9).

- Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ_C 40,3 (C-1), 51,5 (C-2), 75,3 (C-3), 37,3 (C-4), 77,9 (C-5), 48,4 (C-6), 54,0 (C-7), 42,7 (C-8), 77,4 (C-9), 44,3 (C-10), 55,9 (C-11), 29,7 (C-12), 24,7 (C-13), 20,2 (C-14), 69,0 (C-15).

Ví dụ 2: Thử nghiệm tác dụng diệt tế bào ung thư

Tế bào ung thư phổi kháng thuốc A549 và tế bào ung thư tuyến tiền liệt PC3 được nuôi giữ trong môi trường RPMI 1640 ở tủ ấm 37°C, 5% CO₂ có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò FBS, penicillin (100 đơn vị/ml) và streptomycin sulphat (100 µg/ml). Sau đó chúng được cấy chuyển vào phiên 96 giếng với mật độ 2×10^5 tế bào/199 µl/giếng và ủ trong 4 giờ. Hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol thu được theo sáng chế được hòa tan trong dung dịch dimethylsulfoxit (DMSO) đến các nồng độ 20,0 và 6,0 mg/ml. Chuyển 1 µl dung dịch chứa hợp chất này ở mỗi nồng độ vào các giếng của phiên 96 giếng chứa các tế bào đã nuôi cấy ở trên, khi đó nồng độ cuối của chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol là 100 và 30 µg/ml. Sau khi được ủ tiếp trong 72 giờ, bổ sung vào mỗi giếng 20µl dung dịch 3-(4,5-đimethylthiazol-2-yl)-2,5-điphenyl tetrazolium bromit (MTT, đã pha sẵn thành 5 mg/ml trong nước cất), ủ tiếp 4 giờ ở 37°C và 5% CO₂. Sau đó hút bỏ hết môi trường ở các giếng, kết tủa formazan ở đáy giếng được hòa tan trong 200 µl isopropanol và đo mật độ quang ở bước sóng 570 nm bằng thiết bị đọc phiên vi lượng. Tác dụng diệt tế bào ung thư được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ diệt tế bào} = [\text{OD}_{\text{DMSO}} - \text{OD}_{\text{mẫu}}] / \text{OD}_{\text{DMSO}} \times 100$$

Trong đó: OD_{mẫu} là trị số mật độ quang của giếng được ủ với mẫu chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol.

OD_{DMSO} là trị số mật độ quang của giếng ủ với 1 µl DMSO, không ủ với mẫu chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol.

Kết quả được chỉ ra trong bảng sau:

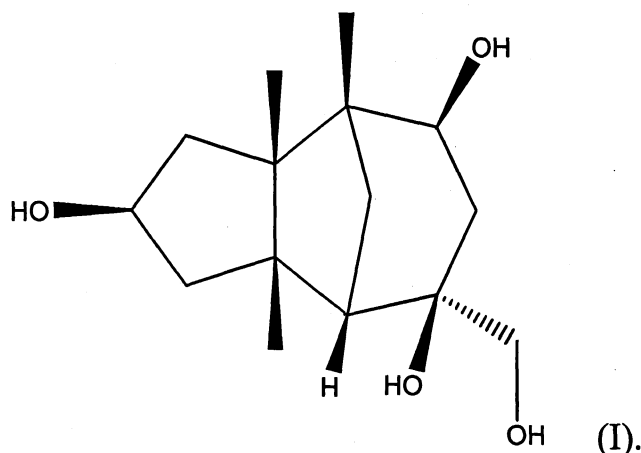
Nồng độ chất thử	% Ức chế tế bào	
	A549	PC3
30 µg/ml	18,8	52,5
100 µg/ml	41,9	70,0

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol được tách chiết từ nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss.ex Fr.) Karst, hợp chất này có tác dụng diệt tế bào ung thư phổi kháng thuốc A549 và tế bào ung thư tuyến tiền liệt PC3.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol tách chiết từ nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss.ex Fr.) Karst có công thức (I):



2. Phương pháp tách chiết hợp chất gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol theo điểm 1, trong đó phương pháp này gồm các bước:

(1) thu gom phần thể quả của nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Leyss.ex Fr.) Karst, sau đó thái nhỏ, phơi khô dưới bóng râm và xay thành bột;

(2) ngâm chiết phần bột thu được ở bước (1) bằng dung môi metanol theo tỷ lệ 1/3 (trọng lượng/thể tích) từ 1 đến 5 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 16-20 giờ ở nhiệt độ trong khoảng từ 25°C đến 30°C, sau đó gộp các phần dịch chiết metanol thu được và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được dạng dịch cô đặc I;

(3) hòa tan dịch cô đặc I trong nước cất theo tỷ lệ trong khoảng 1/10 đến 1/15 (theo trọng lượng/thể tích) để thu được dung dịch IA, chiết phân bố bằng dung môi *n*-hexan theo tỷ lệ dung môi *n*-hexan : dung dịch IA là 1/2 (theo thể tích) từ 1 đến 5 lần, sau đó tách loại phần dung môi nằm bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới;

(4) chiết phân bố phần dung dịch nước thu được ở bước (3) bằng dung môi ethyl axetat theo tỷ lệ dung môi hữu cơ : dịch nước là 1/2 (theo thể tích) từ 1 đến

5 lần, sau đó tách loại phần dung môi nằm bên trên và giữ lại phần dung dịch nước nằm bên dưới;

(5) phần dung dịch nước ở bước (4) được lọc qua cột diaion HP-20, rửa loại tạp bằng nước sau đó rửa giải bằng dung môi metanol, sau đó cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô đặc II;

(6) tách phân đoạn dịch cô đặc II thu được ở bước (5) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/20 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/metanol theo các tỷ lệ 100/1, 50/1, 20/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 (theo thể tích), tiếp đó thu gom phân đoạn được rửa giải từ hệ dung môi điclorometan/metanol với tỷ lệ 1/1, cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô đặc III;

(7) tách phân đoạn dịch cô đặc III thu được ở bước (6) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/40 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/metanol theo tỷ lệ 8/1 (theo thể tích), tiếp đó thu gom các phân đoạn có vết chất ở khoảng $R_f=0,45$, dựa trên sắc ký lớp mỏng silica gel pha thường với hệ dung môi điclorometan/metanol 1/1 (theo thể tích), cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô đặc IV;

(8) tinh chế dịch cô đặc IV thu được ở bước (7) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường theo tỷ lệ dịch cô đặc/chất hấp phụ là 1/100 (theo khối lượng), rửa giải bằng hệ dung môi điclorometan/axeton theo tỷ lệ 1/1 (theo thể tích) thu được hợp chất tinh khiết gymnomitran-3 α ,5 α ,9 β ,15-tetrol dưới dạng chất rắn màu trắng.