



(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)



1-0028816

(51)⁷ C07D 209/82; C07D 403/04; C07D
209/00

(13) B

(21) 1-2019-04865

(22) 04/09/2019

(45) 25/07/2021 400

(43) 25/11/2019 380A

(73) 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, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Trần Quốc Toàn (VN); Lưu Văn Chính (VN); Hoàng Thị Bích (VN); Nguyễn Mạnh Cường (VN); Phạm Minh Quân (VN); Phạm Quốc Long (VN).

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ HỢP CHẤT 1-METOXY-3-METYL-9H-CARBAZOL TỪ RỄ CÂY CƠM RƯỢU TRÁI HẸP (GLYCOSMIS STENOCARPA)

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình phân lập và tinh chế hợp chất 1-metoxi-3-metyl-9H-carbazol (murrayafoline A) từ rễ cây cơm rượu trái hẹp (*Glycosmis stenocarpa*), quy trình bao gồm các bước: a) xử lý nguyên liệu; b) thủy phân nguyên liệu; c) chiết hợp chất murrayafoline A; d) tạo phức hợp chất murrayafoline A với β -CD; e) chiết thu hồi hợp chất murrayafoline A và f) tinh chế hợp chất murrayafoline A. Quy trình sử dụng các phương pháp kết hợp là: thủy phân nguyên liệu bằng enzym laccase thô từ nấm *G. Lucidum*; tạo phức với β -cyclodextrin và kết tinh hợp chất murrayafoline A trong dung môi n-hexan/axeton để thu hợp chất 1-metoxi-3-metyl-9H-carbazol với hiệu suất thu hồi hợp chất murrayafoline A tinh sạch so với hợp chất murrayafoline A có trong nguyên liệu lên tới ~ 80%.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa sinh nhằm phân lập, tinh chế các hợp chất giàu hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ thiên nhiên. Cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình ứng dụng enzym kết hợp cyclodextrin trong phân lập và tinh chế hợp chất 1-metoxi-3-metyl-9H-carbazol (Murrayafoline A hoặc muA) từ rễ cây cơm rượu trái hẹp (*Glycosmis stenocarpa*).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo thống kê của tổ chức Y tế thế giới (WHO), trên thế giới hiện nay có trên 14 triệu người mắc ung thư và số người tử vong hàng năm do ung thư là 8,2 triệu người/năm. Việt Nam hiện nay là một trong những nước có tốc độ mắc ung thư ngày càng cao với trung bình mỗi ngày có trên 300 người chết vì ung thư. Cùng với sự phát triển của các phương pháp điều trị ung thư mới sử dụng các kỹ thuật và thiết bị hiện đại, các thuốc & chế phẩm điều trị, hỗ trợ điều trị và phòng ngừa ung thư mới luôn là yêu cầu cấp thiết được đặt ra cho các nhà nghiên cứu.

Trong những năm vừa qua, các nhà nghiên cứu không ngừng nỗ lực tìm kiếm các chất có hoạt tính sinh học cao, trong đó hoạt tính phòng ngừa và hỗ trợ điều trị ung thư rất được quan tâm. Trong số các hợp chất đã được nghiên cứu, hợp chất murrayafoline A được phân lập lần đầu vào năm 1985 và tại Việt Nam vào năm 2005 từ cây cơm rượu trái hẹp (*Glycosmis stenocarpa*) thể hiện các hoạt tính sinh học phong phú, đặc biệt là hoạt tính tiêu diệt tế bào ung thư theo cơ chế apoptosis. Các nghiên cứu đã xác định hợp chất này có tác dụng đối với nhiều dòng tế bào đã được thử nghiệm, trong đó có tác dụng rất tốt đối với các dòng tế bào ung thư biểu mô (KB), ung thư phổi (LU-1), ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP), ung thư máu (HL-60) với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,97; 0,74; 0,68 & 0,64; tương đương với elipticine (IC_{50} với các dòng tế bào này lần lượt là: 0,89; 0,72; 0,70 & 0,66). Tuy nhiên, khác với elipticine, các nghiên cứu *in vivo* cho thấy murrayafoline A hầu như không thể hiện độc tính đối với động vật thử nghiệm. Đánh giá *in vivo* đối với hoạt tính chống ung thư trên dòng tế bào LLU (Lewis Lung Carcinoma) cho thấy hợp chất này ở liều dùng 100mg/kgP/ngày không những có khả năng ức chế sự phát triển của các tế

bào ung thư, làm cho thể tích khối u giảm tới 91,4% mà còn có khả năng diệt tế bào ung thư (16,67% số động vật thử nghiệm không còn u, khỏe mạnh trở lại và hoạt động bình thường).

Cây com rượu trái hẹp (*Glycosmis stenocarpa* (Drake) Tan.) thuộc họ Rutaceae. Đây là loài có thân gỗ nhỏ, cao 1 m, tại Việt Nam thường mọc ở vùng rừng núi các tỉnh trung du và miền núi phía bắc như Cúc Phương – Ninh Bình; Chí Linh – Hải Dương, Bắc Giang, Quảng Ninh Các hợp chất đã được phân lập chủ yếu từ cây này là alkanoids như murrayafoline A, murrayanin, bisisomahanin ... trong đó hợp chất murrayafoline A chiếm 0,3-0,4% khối lượng.

Các nghiên cứu phân lập hợp chất 1-metoxyl-3-metyl-9H-carbazol từ nguyên liệu đều sử dụng kết hợp các phương pháp chiết xuất, trích ly và sắc ký khác nhau. Năm 2001, Sukari và cộng sự đã tiến hành chiết tách và phân lập murrayfoline A từ rễ của cây *Murraya* sử dụng các phương pháp sắc ký khác nhau và xác định cấu trúc bằng kỹ thuật quang phổ như IR, NMR và MS. Bột rễ khô được chiết xuất bằng cách ngâm chiết liên tiếp với ete dầu hỏa, clorofom và metanol. Dịch chiết bằng ete dầu hỏa được cô quay loại dung môi. Cao chiết ete dầu hỏa thô được đưa vào sắc ký cột chân không trên silica gel và rửa giải bằng hỗn hợp ete dầu mỏ, ete dầu hỏa / CHCl_3 , CHCl_3 và cuối cùng là CHCl_3 / MeOH để thu được 27 phần. Trong đó, phân đoạn 12 của sắc ký cột tạo ra murrayafoline A - ở dạng dầu nhớt màu nâu.

Năm 2016, Trần Quốc Toàn và cộng sự đã tiến hành phân tách murrayfoline A từ rễ của cây com rượu trái hẹp (*Glycosmis stenocarpa*) Việt Nam. Trong nghiên cứu của mình, nhóm tác giả đã nghiên cứu hai phương pháp tách và tinh chế murrayafoline A và phát triển phương pháp HPLC để xác định hàm lượng của nó trong nguyên liệu thực vật và dịch chiết metanol. Để chiết tách và phân lập murrayfoline A, bột rễ khô *G. stenocarpa* được chiết siêu âm với metanol thu được cao chiết metanol thô màu đen. Cao chiết metanol thô sau đó được hoà trong MeOH: H_2O (1: 1, thể tích / thể tích) và được chiết phân bố bằng n-hexan, etyl axetat và n-butanol. Một nửa cao chiết ở phần n-hexan được đưa vào sắc ký cột để thu được murrayfoline A. Nửa còn lại của cao chiết n-hexan được tiến chưng cất hơi nước để thu murrayfolin A. Kết quả thu được cho thấy, hiệu suất của Murrayafoline A sử dụng phương pháp chưng cất hơi nước cao hơn 1,5 lần so với phương pháp tách sử dụng sắc ký cột. Nhóm tác giả cũng đã phát triển phương pháp HPLC áp

dụng để xác định hàm lượng Murrayafoline A trong nguyên liệu và chiết xuất *G. Stenocarpa*. Hàm lượng Murrayafoline A được xác định là 0,38% (khối lượng) trong rễ và 16,69% (khối lượng) trong cao chiết methanol của *G. stenocarpa*.

Phương pháp này có ưu điểm là không phải sử dụng các phương pháp sắc ký đắt tiền, tuy nhiên thời gian cần thiết cho một quá trình là dài và lượng murrayafoline A chưa được chiết triệt để.

Do đó, để phát triển được nguồn nguyên liệu để cung cấp hợp chất có hoạt tính sinh học từ thực vật cho ngành y dược để phát triển được phẩm nhằm điều trị các bệnh nan y thì cần thiết phải cải tiến các quy trình chiết đã biết để có hiệu suất chiết thu hồi cao hơn. Cụ thể là cần cải tiến quy trình chiết tách và phân lập hợp chất 1-metoxyl-3-metyl-9H-carbazol từ rễ cây Cơm rượu trái hẹp (*Glycosmis stenocarpa*) một cách hiệu quả hơn

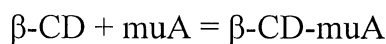
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết vấn đề này, các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng trong rễ cây cơm rượu trái hẹp có thành phần chính là xenlulozơ và lignoxenlulozơ. Đây là các polyme thiên nhiên, thành phần chính cấu tạo nên lớp vỏ tế bào rễ cây cơm rượu trái hẹp. Các hợp chất thứ cấp alkanoit như murrayafoline A, murrayanin,..., nằm trong tế bào cũng như trong mạng lưới lignoxenlulozơ, để phân lập được các hợp chất này cần phải có các tác động từ bên ngoài phá vỡ lớp cấu trúc polyme phức tạp này. Các nghiên cứu về phân lập muA trước đây sử dụng phương pháp nhiệt hoặc sóng siêu âm làm tác nhân để phá vỡ chúng, tuy nhiên chúng chưa thực sự triệt để nên hiệu quả phân lập muA còn chưa cao (< 70%).

Các tác giả cũng nhận thấy rằng, chủng nấm *G. Lucidum* thường sống ký sinh trên các cây thân gỗ. Trong quá trình sinh trưởng và phát triển của mình chúng cần phải tiết ra các enzym để phân hủy các tế bào vỏ gỗ giàu xenlulozơ và lignoxenlulozơ thành các chất đơn giản dễ hấp thu. Lợi dụng tính chất đó, các tác giả sử dụng dịch enzym laccasa thô thu được từ dịch lọc môi trường nuôi cấy chủng nấm *G. Lucidum* làm tác nhân phân giải các xenlulozơ và lignoxenlulozơ để giải phóng murrayafoline A ra môi trường tự do, từ đó dễ dàng sử dụng một lượng nhỏ n-hexan để chiết xuất và làm giàu murrayafoline A. Cặn chiết n-hexan thu được là

một hỗn hợp các chất không tan trong nước, thành phần chủ yếu là các alkanoids như murrayafoline A (>30%), murrayanin, mahanin, bisisomahanin, v.v..

Mặt khác, khi nghiên cứu tính toán, các tác giả xác định kích thước phân tử của murrayafoline A trong khoảng 4-9 angstrom (Å) rất phù hợp với kích thước lỗ của phân tử β -cyclodextrin (7,8 Å), do đó dễ dàng xảy ra quá trình tạo phức giữa β -cyclodextrin (β -CD) và hợp chất murrayafoline A:



Quá trình tạo phức trên là quá trình xảy ra thuận nghịch, khi ở nhiệt độ thấp quá trình sẽ dịch chuyển về bên phải để tạo ra phức bền giữa muA và β -CD, ngược lại khi ở nhiệt độ cao sẽ xảy ra quá trình phá hủy phức để giải phóng β -CD và muA tự do. Trong sáng chế này, các tác giả đã nghiên cứu ứng dụng tính chất tạo phức giữa muA và β -CD để làm giàu murrayafoline A từ cặn chiết n-hexan.

Cụ thể, quy trình tổng thể phân lập và tinh chế murrayafoline A từ rễ cây com rượu trái hẹp được tiến hành như sau:

- a) xử lý nguyên liệu rễ cây com rượu trái hẹp sau khi thu hoạch được rửa sạch, thái nhỏ và sấy khô đến độ ẩm nằm trong khoảng từ 10 đến 12%, tiếp đó rễ khô được nghiền mịn đến kích thước dưới 0,1 mm, sau đó được bổ sung dung dịch HCl 0,01M theo tỉ lệ 1:4 (trọng lượng : thể tích) và ngâm trong 6h, sau khi xử lý, bột rễ được bổ sung thêm nước đến tỉ lệ 1:10 (khối lượng bột nguyên liệu : thể tích dung môi), sau đó đun sôi trong 10 phút rồi để nguội đến nhiệt độ phòng;
- b) điều chỉnh pH của hỗn hợp sau khi để nguội về khoảng độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 5,5 rồi bổ sung enzym laccasa thô thu được từ dịch lọc môi trường nuôi cấy nấm *G. Lucidum* (hoạt độ 180-190 UI) theo tỉ lệ enzym/ cơ chất là 9 : 1000 (thể tích : trọng lượng), tiếp đó nâng dần và giữ nhiệt độ ổn định ở 50°C trong thời gian 2 giờ;
- c) chiết hỗn hợp sau thủy phân đã để nguội đến nhiệt độ phòng với n-hexan theo tỉ lệ 10:1 (thể tích) trong ba lần, thu pha hữu cơ và tiến hành loại bỏ dung môi bằng máy cô cất chân không để thu được cặn chiết n-hexan giàu hợp chất murrayafoline A;
- d) lắc đều cặn chiết n-hexan với dung dịch β -CD (5:1) bão hòa ở 20°C trong thời gian 1 giờ, quá trình được lặp lại 3 lần, thu pha nước chứa phức của β -CD và hợp chất murrayafoline A;

e) nâng nhiệt độ pha nước thu được lên 40°C và bổ sung n-hexan với tỉ lệ bằng 1/5 thể tích dung dịch, lắc đều trong 30 phút rồi thu pha hữu cơ, lặp lại quá trình 3 lần, tái sử dụng lại pha nước, cô pha hữu cơ dưới áp suất giảm để thu được hợp chất murrayafoline A thô;

f) hòa tan hợp chất murrayafoline A thô đến bão hòa trong dung dịch n-hexan/axeton (70/1) ở 45°C, sau đó làm lạnh từ từ đến 0°C, giữ yên trong 4 giờ, lọc thu kết tủa và rửa lại bằng n-hexan lạnh, sau đó sấy khô đến trọng lượng không đổi để thu được hợp chất murrayafoline A tinh khiết có hàm lượng > 98%.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ tóm tắt các bước của quy trình ứng dụng enzym kết hợp cyclodextrin trong phân lập và tinh chế hợp chất 1-metoxi-3-metyl-9H-carbazol (Murrayafoline A hoặc muA) từ rễ cây cơm rượu trái hẹp (*Glycosmis stenocarpa*)

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả sáng chế chứ không nhằm làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Sáng chế đề cập đến quy trình chiết hợp chất 1-metoxi-3-metyl-9H-carbazol từ rễ cây cơm rượu trái hẹp (*Glycosmis stenocarpa*), quy trình theo sáng chế bao gồm các bước: a) xử lý nguyên liệu; b) thủy phân nguyên liệu; c) chiết muA; d) tạo phức muA với β -CD; e) chiết thu hồi muA và f) tinh chế muA.

Trong bước xử lý nguyên liệu, rễ cây cơm rượu trái hẹp sau khi thu hoạch được rửa sạch, thái nhỏ và sấy khô đến độ ẩm nằm trong khoảng từ 10 đến 12%. Rễ khô sau đó được nghiền mịn đến kích thước dưới 0,1 mm sau đó được bổ sung dung dịch HCl 0,01M theo tỉ lệ 1:4 (trọng lượng : thể tích) và ngâm trong 6h để làm trương nở các polyme thiên nhiên như xenlulozơ và lignoxenlulozơ. Bột rễ sau khi xử lý được bổ sung thêm nước đến tỉ lệ 1:10 (khối lượng bột nguyên liệu : thể tích dung môi/ g:ml) sau đó đun sôi trong 10 phút rồi để nguội đến nhiệt độ phòng để diệt men và diệt khuẩn.

Trong bước thủy phân nguyên liệu, hỗn hợp sau khi để nguội được điều chỉnh pH về khoảng 5-5,5 rồi bổ sung enzym laccaza thô thu được từ dịch lọc môi trường nuôi cấy nấm *G. Lucidum* (hoạt độ 180-190 UI) theo tỉ lệ enzym/ cơ chất là

9 : 1000 (thể tích (ml)/ khối lượng (g)). Nâng dần và giữ nhiệt độ ổn định ở 50°C trong 2h. Mục đích của bước này là sử dụng enzyme phân lập từ nấm để thủy phân các polyme thiên nhiên như xenlulozơ và lignoxenlulozơ cấu tạo nên màng tế bào thành các cấu trúc nhỏ hơn, giải phóng muA trong tế bào rễ cây com rượu trái hẹp ra môi trường tự do để quá trình chiết muA bằng n-hexan được dễ dàng và có hiệu quả cao hơn

Trong bước chiết muA, hỗn hợp sau thủy phân được để nguội đến nhiệt độ phòng và tiến hành chiết với n-hexan theo tỉ lệ 10:1 (thể tích/thể tích) trong ba lần. Thu lấy pha hữu cơ và tiến hành loại bỏ dung môi bằng máy cô cất chân không để thu được cặn chiết n-hexan giàu murrayafoline A. Mục đích của bước này là sử dụng n-hexan, dung môi hòa tan tốt murrayafoline A để chiết murrayafoline A từ hỗn hợp sau khi thủy phân rễ cây com rượu trái hẹp.

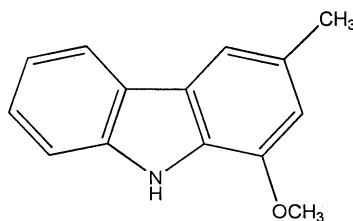
Trong bước tạo phức với β -CD, cặn chiết n-hexan được lắc đều với dung dịch β -CD (5/1) bão hòa ở 20°C trong 1 giờ, quá trình được lặp lại 3 lần, thu lấy pha nước chứa phức của β -CD và muA. Mục đích của bước này là tiến hành tạo phức bọc giữa muA và β -CD, phức này hòa tan trong pha nước vì vậy có thể dễ dàng loại bỏ một lượng lớn các tạp chất có trong cặn chiết n-hexan

Trong bước chiết thu hồi muA, pha nước thu được tiếp tục được nâng nhiệt độ lên 40°C và bổ sung n-hexan với tỉ lệ bằng 1/5 thể tích dung dịch. Lắc đều trong 30 phút rồi thu lấy pha hữu cơ, quá trình được lặp lại 3 lần. Pha nước được tái sử dụng lại. Pha hữu cơ được cô cạn dưới áp suất giảm ta thu được muA thô. Mục đích của bước này là nâng nhiệt độ để giải phóng muA dạng phức với β -CD tan trong nước thành muA dạng tự do tan trong n-hexan; cô cạn dung dịch n-hexan để thu được muA thô

Trong bước tinh chế, muA thô được đem hòa tan bão hòa trong dung dịch n-hexan/axeton (70/1) ở 45°C sau đó làm lạnh từ từ đến 0°C, giữ yên trong 4h. Lọc thu kết tủa và rửa lại bằng n-hexan lạnh sau đó đem sấy khô đến khối lượng không đổi thu được muA tinh khiết có hàm lượng > 98%.

Kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo điểm nóng chảy, đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR và xác định công thức phân tử, kết quả như sau:

Hợp chất murrayafoline A thu được có cấu trúc hóa học như sau:



Các thông số hóa lý của 1-metoxi-3-metyl-9H-carbazol:

- + Công thức phân tử: $C_{14}H_{13}NO$
- + Khối lượng phân tử: 211 g/mol
- + Chất rắn, màu trắng vô định hình
- + Phổ khối lượng phun mù điện tử ESI m/z : 234 $[M + Na]^+$

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: quy trình cụ thể phân lập và tinh chế murrayafoline A từ rễ cây cơm rượu trái hẹp (*G.stenocarpa*) được tiến hành như sau:

10 kg rễ cây cơm rượu trái hẹp tươi sau thu hoạch được rửa sạch, thái nhỏ và sấy khô ở nhiệt độ $80^{\circ}C$ đến độ ẩm 12%. Nghiền nhỏ trong máy nghiền búa đến kích thước 0,1mm thu được 2,5kg bột rễ cây cơm rượu trái hẹp có hàm lượng muA là 0,38% (HPLC). Bột sau khi nghiền được bổ sung 10 lít dung dịch HCl 0,01M và ngâm trong 6h. Sau đó tiếp tục bổ sung 15 lít nước sạch, khuấy đều và đun sôi trong 10 phút rồi để nguội đến nhiệt độ phòng.

Hỗn hợp sau khi để nguội được điều chỉnh pH về khoảng 5-5,5 bằng hệ đệm axetat, khuấy đều rồi bổ sung từ từ 22,5ml dịch enzym laccaza thô (hoạt độ 190 UI) thu được từ dịch lọc môi trường nuôi cấy nấm *G. Lucidum*. Tăng từ từ nhiệt độ hỗn hợp lên $50^{\circ}C$, khuấy đều ở tốc độ 50 – 80 rpm trong 2h.

Hỗn hợp được để nguội đến nhiệt độ phòng rồi bổ sung 2,5 lít n-hexan, khuấy đều trong 15 phút rồi để yên đến khi phân lớp hoàn toàn, thu lấy pha hữu cơ phía trên. Lặp lại quá trình 3 lần sau đó gom toàn bộ pha hữu cơ rồi tiến hành loại bỏ dung môi bằng máy cô cất chân không thu được 127g cặn chiết n-hexan

Cặn chiết n-hexan được lắc đều với dung dịch 635ml dung dịch β -CD bão hòa (18,5g/lít) ở $20^{\circ}C$ trong 1 giờ, thu lấy pha nước chứa phức của β -CD và muA. Quá trình được lặp lại 3 lần, gom chung tất cả pha nước thu được 1905ml dung dịch chứa phức muA và β -CD.

Dung dịch thu được tiếp tục được nâng nhiệt độ lên 40°C và bổ sung 380ml n-hexan. Lắc đều trong 30 phút rồi thu lấy pha hữu cơ, quá trình được lặp lại 3 lần. Pha nước được tái sử dụng lại. Gôm chung pha hữu cơ rồi cô cạn dưới áp suất giảm bằng máy cô cất chân không thu được 12,7g muA thô dưới dạng dầu đặc.

MuA thô được đem hòa tan trong 32 ml dung dịch n-hexan/axeton (70/1) ở 45°C sau đó làm lạnh từ từ đến 0°C, giữ yên trong 4 giờ. Lọc thu kết tủa và rửa lại bằng n-hexan lạnh sau đó đem sấy khô đến khối lượng không đổi thu được 7,54g muA tinh khiết có hàm lượng > 98%. Các dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân của hợp chất muA thu được như sau:

^1H NMR (500MHz, CDCl_3), δ_{H} (ppm): 2,65 (s, 3 H); 4,06 (s, 3 H); 6,83 (s, 1 H); 7,28–7,35 (m, 1 H); 7,48–7,50 (m, 2 H); 7,60 (s, 1 H); 8,14 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H), 8,27 (br. s, 1 H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ_{C} (ppm): 22,4; 55,9; 108,2; 111,4; 113,0; 119,6; 120,9; 124,0; 124,8; 125,9; 128,5; 129,9; 139,9; 145,8.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế này đưa ra quy trình công nghệ phân lập và tinh sạch hợp chất 1-metoxi-3-metyl-9H-carbazol từ rễ cây cơm rượu trái hẹp (*Glycosmis stenocarpa*). Quy trình được mô tả bởi sáng chế hiệu quả, có khả năng phân lập hợp chất murrayafoline A lên tới ~ 80% so với lượng murrayafoline A có trong nguyên liệu với độ sạch lên tới trên 98% (HPLC). Các quy trình khác được mô tả có hiệu suất phân lập chỉ vào khoảng 60%, vì vậy đây là một quy trình hiệu quả mở ra một hướng điều chế mới tạo nguồn nguyên liệu tốt cho ngành dược phẩm và thực phẩm chức năng.

Quy trình sáng chế này dựa trên đặc tính của nguyên liệu là rễ cây cơm rượu trái hẹp dễ dàng bị thủy phân bởi enzym laccasa của nấm *G. Lucidum* cũng như khả năng tạo phức của murrayafoline A với β -cyclodextrin. Đây là những đặc tính tạo nên tính khác biệt nên có hiệu quả thu hồi murrayafoline A – một hợp chất có hoạt tính tốt cho tim mạch cũng như có hiệu quả cao trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư. Do đó, quy trình được mô tả bởi sáng chế này có vai trò thiết thực trong định hướng nghiên cứu và ứng dụng hoạt chất này vào các lĩnh vực y học, dược phẩm và thực phẩm chức năng để phục vụ đời sống.

Quy trình được mô tả bởi sáng chế giúp nâng cao hiệu quả phân tách murrayafoline A. Quy trình này giúp giảm một lượng lớn các loại dung môi hữu cơ và hóa chất sử dụng, đồng thời trong quá trình thực hiện đều có khả năng tái sử dụng dung môi n-hexan và dung dịch β -cyclodextrin. Vì vậy, khi áp dụng sáng chế này sẽ thu được nhiều lợi ích về kinh tế cũng như môi trường.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập và tinh chế hợp chất 1-metoxi-3-metyl-9H-carbazol (hợp chất murrayafoline A) từ rễ cây com rượu trái hẹp (*Glycosmis stenocarpa*) theo phương pháp thủy phân bởi enzym và tạo phức với β -cyclodextrin, quy trình này bao gồm các bước:

- a) xử lý nguyên liệu rễ cây com rượu trái hẹp sau khi thu hoạch được rửa sạch, thái nhỏ và sấy khô đến độ ẩm nằm trong khoảng từ 10 đến 12%, tiếp đó rễ khô được nghiền mịn đến kích thước dưới 0,1mm, sau đó được bổ sung dung dịch HCl 0,01M theo tỉ lệ 1:4 (trọng lượng : thể tích) và ngâm trong 6 giờ, sau khi xử lý, bột rễ được bổ sung thêm nước đến tỉ lệ 1:10 (khối lượng bột nguyên liệu : thể tích dung môi), sau đó đun sôi trong 10 phút rồi để nguội đến nhiệt độ phòng;
- b) điều chỉnh pH của hỗn hợp sau khi để nguội về khoảng độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 5,5 rồi bổ sung enzym laccasa thô thu được từ dịch lọc môi trường nuôi cấy nấm *G. Lucidum* (hoạt độ 180-190 UI) theo tỉ lệ enzym/ cơ chất là 9 : 1000 (thể tích : trọng lượng), tiếp đó nâng dần và giữ nhiệt độ ổn định ở 50°C trong thời gian 2 giờ;
- c) chiết hỗn hợp sau thủy phân đã để nguội đến nhiệt độ phòng với n-hexan theo tỉ lệ 10:1 (thể tích : thể tích) trong ba lần, thu pha hữu cơ và tiến hành loại bỏ dung môi bằng máy cô cất chân không để thu được cặn chiết n-hexan giàu hợp chất murrayafoline A;
- d) lắc đều cặn chiết n-hexan với dung dịch β -CD (5:1/ khối lượng : thể tích) bão hòa ở 20°C trong thời gian 1 giờ, quá trình được lặp lại 3 lần, thu pha nước chứa phức của β -CD và hợp chất murrayafoline A;
- e) nâng nhiệt độ pha nước thu được lên 40°C và bổ sung n-hexan với tỉ lệ bằng 1/5 thể tích dung dịch, lắc đều trong 30 phút rồi thu pha hữu cơ, lặp lại quá trình 3 lần, tái sử dụng lại pha nước, cô pha hữu cơ dưới áp suất giảm để thu được hợp chất murrayafoline A thô;
- f) hòa tan hợp chất murrayafoline A thô đến bão hòa trong dung dịch n-hexan/axeton (70/1) ở 45°C, sau đó làm lạnh từ từ đến 0°C, giữ yên trong 4 giờ, lọc thu kết tủa và rửa lại bằng n-hexan lạnh, sau đó sấy khô đến trọng lượng không đổi để thu được hợp chất murrayafoline A tinh khiết có hàm lượng > 98%.

Hình 1: Sơ đồ quy trình phân lập và tinh chế theo sáng chế

