(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) **1-0032318**

(51)[2020.01] **C07D 413/00**; C07D 413/02; C07D 207/00

(13) **B**

(21) 1-2020-05842

(22) 13/10/2020

(45) 25/06/2022 411

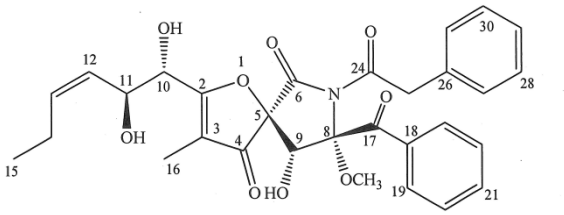
(43) 25/12/2020 393

(73) Trường Đại học Y Dược Hải Phòng (VN)
72A, Nguyễn Bỉnh Khiêm, quận Ngô Quyền, thành phố Hải Phòng

(72) Cao Đức Tuấn (VN); Nguyễn Văn Hùng (VN); Nguyễn Văn Khải (VN); Đoàn Thị Mai Hương (VN); Lê Thị Hồng Minh (VN); Phạm Văn Cường (VN); Hoàng Thị Hồng Liên (VN).

(54) HỢP CHẤT ALKALOIT CÓ TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ VI NẤM ASPERGILLUS FUMIGATUS M580 CÓ NGUỒN GỐC TỪ LOÀI HẢI SÂM COLOCHIRUS QUADRANGULARIS TROSCHEL, 1846

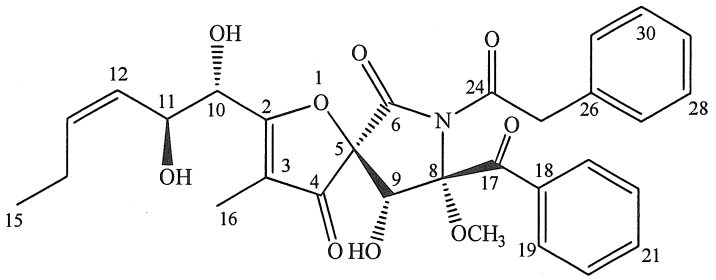
(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất alkaloit có công thức (**I**) và phương pháp phân lập hợp chất này từ vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 có nguồn gốc từ loài hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846. Hợp chất alkaloit theo sáng chế có tác dụng kháng khuẩn đối với chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* và nấm men *Candida albicans*. Hợp chất alkaloit và phương pháp phân lập hợp chất này theo sáng chế rất hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các sản phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị.



(I)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên có tác dụng kháng khuẩn. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất alkaloit có công thức (**I**):



(**I**).

và phương pháp phân lập hợp chất này từ vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 có nguồn gốc từ loài hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Biển và đại dương thế giới chiếm 71% diện tích trái đất, là nguồn tài nguyên vô cùng đáng quý do ở đó có tới 34 trong số 36 ngành sinh vật trên trái đất sinh sống, với hơn 300.000 loài động thực vật như rong biển, ruột khoang, rêu biển, thân mềm, các loài vi khuẩn biển, v.v. Ngoài vai trò to lớn trong ngành công nghiệp thực phẩm, những sản phẩm của đại dương cũng đang bước đầu được nghiên cứu và sử dụng trong ngành công nghiệp dược. Trong nhiều năm gần đây, với sự hỗ trợ của các kỹ thuật tiên tiến, các chất có hoạt tính sinh học từ thiên nhiên đã dần dần được phân lập, xác định cấu trúc, mô tả rõ đặc điểm của hợp chất, đánh giá hoạt tính sinh học, nghiên cứu tiền lâm sàng và nghiên cứu lâm sàng. Rất nhiều thuốc mới có nguồn gốc sinh vật biển đã có mặt trên thị trường do các hãng dược lớn trên thế giới cung cấp.

Việt Nam nằm ở ven bờ biển Đông với hơn 3.260 km chiều dài bờ biển chạy dọc từ Bắc vào Nam, hàng nghìn hòn đảo ven biển, đặc biệt có hai quần đảo Trường Sa và Hoàng Sa nằm giữa biển Đông. Điều kiện địa lý đó đã đem lại nhiều thuận lợi, tiềm năng về nguồn tài nguyên thiên nhiên phong phú cho đất nước, tạo nên hệ sinh vật biển vô cùng phong phú, dồi dào cả về trữ lượng và thành phần loài với 12.000 loài bao gồm 2.038

loài cá, 6.000 loài động vật đáy, 635 loài rong biển và hàng ngàn loài động thực vật phù du, v.v. Tuy vậy ở Việt Nam, trong khoảng 30 năm trở lại đây, nguồn tài nguyên phong phú này mới bắt đầu thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học. Trong số các loài động thực vật biển đã được nghiên cứu, nhiều hợp chất được phân lập thể hiện hoạt tính sinh học cao và đáng quý như hoạt tính gây độc tế bào, hoạt tính ức chế các dòng tế bào ung thư thử nghiệm, hoạt tính chống oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn, v.v. Do đó, việc điều tra, nghiên cứu về vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 có nguồn gốc từ loài hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846, đặc biệt là phát hiện ra các hợp chất alkaloit mới từ vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 sẽ có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao. Vì vậy, sẽ góp phần tích cực vào việc khai thác và sử dụng một cách hợp lý nguồn tài nguyên thiên nhiên của đất nước.

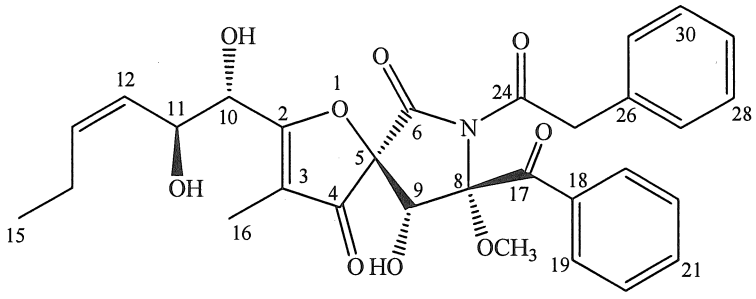
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết

Mục đích của sáng chế là tìm kiếm các hợp chất mới có phổ hoạt tính rộng từ nguồn tài nguyên biển. Cụ thể hơn, mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất alkaloit có tác dụng kháng khuẩn và phương pháp phân lập hợp chất này từ vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 có nguồn gốc từ loài hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846

Cách thức giải quyết vấn đề

Để đạt được mục đích nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất alkaloit mà là (5*S*,8*S*,9*R*)-8-benzoyl-2-((1*S*,2*S*,*Z*)-1,2-dihydroxyhex-3-en-1-yl)-9-hydroxy-8-metoxy-3-metyl-7-(2-phenylaxetyl)-1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-en-4,6-dion có công thức (**I**):



(I)

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp phân lập hợp chất có công thức (**I**) trên đây từ vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 có nguồn gốc từ loài hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846, phương pháp này bao gồm các bước:

i) thu gom mẫu hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846 vào trong ống vô trùng, bảo quản trên đá và sử dụng để phân lập vi nấm trong vòng 24h;

ii) phân lập và xác định chủng nấm mà là chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 bằng cách sử dụng phân tích trình tự gen 18S rRNA và bảo quản ở -80 °C;

iii) lên men sinh khối dạng lỏng chủng M580, trong đó:

chuẩn bị môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) lỏng và PDA rắn bằng cách cân, đong chính xác từng thành phần nguyên vật liệu, hóa chất, khuấy tan và điều chỉnh pH =7, trong đó môi trường PDA lỏng và PDA rắn bao gồm các thành phần sau đây:

Môi trường PDA lỏng		**Môi trường PDA rắn**	
Tinh bột khoai tây	1581g	Tinh bột khoai tây	3g
Đường dextroza	1054g	Đường dextroza	2g
Muối biển nhân tạo	1581g	Muối biển nhân tạo	3g
Nước cất	47,8L	Aga	800g
		Nước cất	0,1L

rót môi trường PDA rắn vào đĩa petri chứa 15 mL môi trường để kiểm tra độ thuần khiết và hoạt hóa của chủng;

rót môi trường PDA lỏng lần lượt vào bình tam giác có thể tích 250 mL chứa 50 mL môi trường để nhân giống cấp 1, bình tam giác có thể tích 5L chứa 2,5L môi trường để nhân giống cấp 2 và 20 bình tam giác có thể tích 5L có chứa 2,5L môi trường để nuôi lượng lớn, các bình chứa môi trường sau khi chuẩn bị được khử trùng ở 121°C trong 30 phút;

lấy ống giữ chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 bảo quản ở -80 °C đem rã đông từ từ trên đá, sau đó cấy chấm trên đĩa petri chứa 15 mL môi trường PDA đặc, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 7 ngày;

từ đĩa petri tiến hành nhân giống cấp 1 bằng cách cấy 1 khuẩn lạc vào bình tam giác thể tích 250mL chứa 50 mL môi trường PDA lỏng, sau đó nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 10 ngày để thu được dịch nhân giống cấp 1;

từ dịch nhân giống cấp 1 tiến hành nhân giống cấp 2 bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 1 vào bình tam giác chứa 2,5L môi trường PDA lỏng theo tỷ lệ 1:50 (theo thể tích) và nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 10 ngày;

tiến hành lên men lượng lớn ở trạng thái lỏng bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 2 vào 20 bình tam giác có chứa 2,5L môi trường PDA lỏng đã chuẩn bị sẵn theo tỷ lệ thể

tích 1:50, nuôi ở nhiệt độ 28 °C, lắc 100 vòng/phút trong 14 ngày để thu được sản phẩm nước lên men của chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580;

iv) chiết sản phẩm nước lên men với etyl axetat (5 × 40 L), dịch chiết etyl axetat được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết etyl axetat;

v) tiến hành phân tách cặn chiết etyl axetat trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan (40/1, 20/1, 10/1, 5/1, 1/1) thu được năm phân đoạn, lần lượt ký hiệu là ML1A - ML1E;

vi) tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn ML1C được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được năm phân đoạn nhỏ hơn, lần lượt ký hiệu là ML1C1 - ML1C5; và

vii) phân tách hợp chất (5*S*,8*S*,9*R*)-8-benzoyl-2-((1*S*,2*S*,*Z*)-1,2-dihydroxyhex-3-en-1-yl)-9-hydroxy-8-metoxy-3-metyl-7-(2-phenylaxetyl)-1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-en-4,6-dion có công thức (**I**) ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn ML1C3 bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere H-80 (250 × 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 40% trong nước.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế, trên cơ sở đã nghiên cứu thành phần hóa học của vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 có nguồn gốc từ loài hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846 và phân lập thành công hợp chất alkaloit từ loài này, đề xuất hợp chất có cấu trúc hóa học mới, cụ thể là hợp chất (5*S*,8*S*,9*R*)-8-benzoyl-2-((1*S*,2*S*,*Z*)-1,2-dihydroxyhex-3-en-1-yl)-9-hydroxy-8-metoxy-3-metyl-7-(2-phenylaxetyl)-1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-en-4,6-dion. Đây là một phát hiện hoàn toàn mới, hợp chất này thuộc lớp chất alkaloit và chưa được phát hiện từ trước đến nay trên thế giới. Hợp chất này cũng được đánh giá tác dụng kháng khuẩn đối với chủng *Enterococcus faecalis* và nấm men *Candida albicans* và sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn sau đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế còn được mô tả thông qua các phương án cụ thể minh họa và mô tả chi tiết hơn nữa cho sáng chế. Ngoài ra, cần phải hiểu rằng, các phương án cụ thể sau đây được mô tả chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế và sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể này. Rõ ràng là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực

này, trên cơ sở các nội dung mô tả trong bản mô tả này, có thể thực hiện các phương án tương đương mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế như được mô tả trong yêu cầu bảo hộ kèm theo sau đây.

Trong bản mô tả này, các giá trị số nên được hiểu là bao gồm cả nghĩa "khoảng", cụ thể là chỉ chính giá trị số đó cũng như các giá trị số nằm trong khoảng ± 10%, tốt hơn là ± 5%, và tốt nhất là 0% của giá trị số đó.

Ngoài ra, trong bản mô tả nay, mẫu hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846 được thu tại đảo Cô Tô-Thanh Lân, Việt Nam vào ngày 19 tháng 8 năm 2019 ở độ sâu 14m, tọa độ địa lý 21°02′23″-107°45′40″.

Về cơ bản, để phân lập hợp chất theo sáng chế, mẫu hải sâm được thu trong ống vô trùng Falcon 50 mL, bảo quản trên đá và sử dụng để phân lập vi nấm trong vòng 24h. Chủng M580 được phân lập từ mẫu hải sâm trên và được xác định là vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 bằng cách sử dụng phân tích trình tự gen 18S rRNA. Chủng vi nấm biển này đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số MW015802 và được lưu giữ tại Trường Đại học Y Dược Hải Phòng và Viện Hóa sinh biển – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ở nhiệt độ -80 ^{o}C. Quá trình lên men được ủ ở 28 °C và thu sản phẩm lên men được vào ngày thứ 14. Cụ thể, quá trình lên men sinh khối dạng lỏng chủng M580 được tiến hành như sau:

chuẩn bị môi trường PDA (Potato Dextroza Agar) lỏng và PDA rắn bằng cách cân, đong chính xác từng thành phần nguyên vật liệu, hóa chất, khuấy tan và điều chỉnh pH =7, trong đó môi trường PDA lỏng và PDA rắn bao gồm các thành phần sau đây:

Môi trường PDA lỏng		**Môi trường PDA rắn**	
Tinh bột khoai tây	1581g	Tinh bột khoai tây	3g
Đường dextroza	1054g	Đường dextroza	2g
Muối biển nhân tạo	1581g	Muối biển nhân tạo	3g
Nước cất	47,8L	Aga	800g
		Nước cất	0,1L

rót môi trường PDA rắn vào đĩa petri chứa 15 mL môi trường để kiểm tra độ thuần khiết và hoạt hóa của chủng;

rót môi trường PDA lỏng lần lượt vào bình tam giác có thể tích 250 mL chứa 50 mL môi trường để nhân giống cấp 1, bình tam giác có thể tích 5L chứa 2,5L môi trường

để nhân giống cấp 2 và 20 bình tam giác có thể tích 5L có chứa 2,5L môi trường để nuôi lượng lớn, các bình chứa môi trường sau khi chuẩn bị được khử trùng ở 121°C trong 30 phút;

lấy ống giữ chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 bảo quản ở -80 °C đem rã đông từ từ trên đá, sau đó cấy chấm trên đĩa petri chứa 15 mL môi trường PDA đặc, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 7 ngày;

từ đĩa petri tiến hành nhân giống cấp 1 bằng cách cấy 1 khuẩn lạc vào bình tam giác thể tích 250mL chứa 50 mL môi trường PDA lỏng, sau đó nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 10 ngày để thu được dịch nhân giống cấp 1;

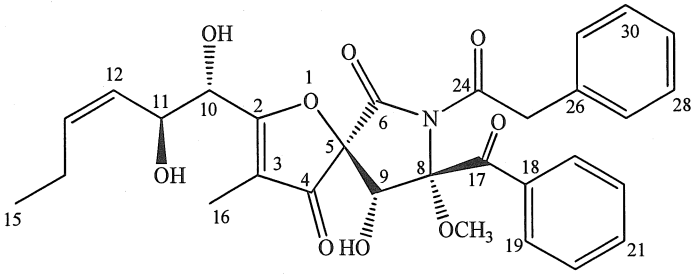
từ dịch nhân giống cấp 1 tiến hành nhân giống cấp 2 bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 1 vào bình tam giác chứa 2,5L môi trường PDA lỏng theo tỷ lệ 1:50 (theo thể tích) và nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 10 ngày;

tiến hành lên men lượng lớn ở trạng thái lỏng bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 2 vào 20 bình tam giác có chứa 2,5L môi trường PDA lỏng đã chuẩn bị sẵn theo tỷ lệ thể tích 1:50, nuôi ở nhiệt độ 28 °C, lắc 100 vòng/phút trong 14 ngày để thu được sản phẩm nước lên men của chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580.

Sản phẩm nước lên men trên đây (50 L) được chiết với etyl axetat. Dịch chiết etyl axetat này được tiến hành phân lập và xác định cấu trúc hóa học theo các phương pháp mô tả dưới đây: Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn (loại DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715) hoặc RP18 F254s (Merck)). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng từ từ đến khi hiện màu. Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel hoặc pha đảo. Silica gel có cỡ hạt là 40-63 μm (230-400 mesh, Merck). Pha đảo RP-18 (30 - 50 μm, Fuji silysia Chemical Ltd). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruker AM500 FT NMR. Phổ khối lượng phân giải cao được đo trên máy Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS.

Hợp chất alkaloit theo sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất alkaloit có công thức (**I**):



(I)

Hợp chất alkaloit trên đây theo sáng chế là các hợp chất có cấu trúc hóa học mới. Các thông số hóa lý của các hợp chất này như sau:

Hợp chất này có danh pháp tiếng Anh là: (5*S*,8*S*,9*R*)-8-benzoyl-2-((1*S*,2*S*,*Z*)-1,2-dihydroxyhex-3-en-1-yl)-9-hydroxy-8-methoxy-3-methyl-7-(2-phenylacetyl)-1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-ene-4,6-dione có công thức (**I**).

+ Công thức phân tử: $C_{30}H_{31}NO_9$;

+ Khối lượng phân tử: M = 549;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25} - 32,8^o$ (*c* 0,1, $CHCl_3$);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại *m/z* 584.1666 $[M+^{35}Cl]^-$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{31}NO_9Cl]^-$, 584,1693.

Phương pháp phân lập theo sáng chế

Theo khía cạnh thứ khác, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập hợp chất alkaloit trên đây từ vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 có nguồn gốc từ loài hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846, phương pháp này bao gồm các bước:

i) thu gom mẫu hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846 vào trong ống vô trùng, bảo quản trên đá và sử dụng để phân lập vi nấm trong vòng 24h;

ii) phân lập và xác định chủng nấm mà là chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 bằng cách sử dụng phân tích trình tự gen 18S rRNA và bảo quản ở -80 ^oC;

iii) lên men sinh khối dạng lỏng chủng M580, trong đó:

chuẩn bị môi trường thạch khoai tây dextroza (Potato Dextroza Agar – PDA) lỏng và PDA rắn bằng cách cân, đong chính xác từng thành phần nguyên vật liệu, hóa chất, khuấy tan và điều chỉnh pH =7, trong đó môi trường PDA lỏng và PDA rắn bao gồm các thành phần sau đây:

Môi trường PDA lỏng		Môi trường PDA rắn	
Tinh bột khoai tây	33g	Tinh bột khoai tây	1500g
Đường dextroza	22g	Đường dextroza	1000g
Muối biển nhân tạo	33g	Muối biển nhân tạo	1500g
Nước cất	1,12L	Aga	800g
		Nước cất	45,2L

rót môi trường PDA rắn vào đĩa petri chứa 15 mL môi trường để kiểm tra độ thuần khiết và hoạt hóa của chủng;

rót môi trường PDA lỏng lần lượt vào bình tam giác có thể tích 250 mL chứa 50 mL môi trường để nhân giống cấp 1, bình tam giác có thể tích 5L chứa 2,5L môi trường để nhân giống cấp 2 và 20 bình tam giác có thể tích 5L có chứa 2,5L môi trường để nuôi lượng lớn, các bình chứa môi trường sau khi chuẩn bị được khử trùng ở 121°C trong 30 phút;

lấy ống giữ chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 bảo quản ở -80 °C đem rã đông từ từ trên đá, sau đó cấy chấm trên đĩa petri chứa 15 mL môi trường PDA đặc, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 7 ngày;

từ đĩa petri tiến hành nhân giống cấp 1 bằng cách cấy 1 khuẩn lạc vào bình tam giác thể tích 250mL chứa 50 mL môi trường PDA lỏng, sau đó nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 10 ngày để thu được dịch nhân giống cấp 1;

từ dịch nhân giống cấp 1 tiến hành nhân giống cấp 2 bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 1 vào bình tam giác chứa 2,5L môi trường PDA lỏng theo tỷ lệ 1:50 (theo thể tích) và nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 10 ngày;

tiến hành lên men lượng lớn ở trạng thái lỏng bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 2 vào 20 bình tam giác có chứa 2,5L môi trường PDA lỏng đã chuẩn bị sẵn theo tỷ lệ thể tích 1:50, nuôi ở nhiệt độ 28 °C, lắc 100 vòng/phút trong 14 ngày để thu được sản phẩm nước lên men của chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580;

iv) chiết sản phẩm nước lên men với etyl axetat (5 × 40 L), dịch chiết etyl axetat được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết etyl axetat;

v) tiến hành phân tách cặn chiết etyl axetat trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan (40/1, 20/1, 10/1, 5/1, 1/1) thu được năm phân đoạn, lần lượt ký hiệu là ML1A - ML1E;

vi) tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn ML1C được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được năm phân đoạn nhỏ hơn, lần lượt ký hiệu là ML1C1 - ML1C5; và

vii) phân tách hợp chất (5*S*,8*S*,9*R*)-8-benzoyl-2-((1*S*,2*S*,*Z*)-1,2-dihydroxyhex-3-en-1-yl)-9-hydroxy-8-metoxy-3-metyl-7-(2-phenylaxetyl)-1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-en-4,6-dion có công thức (**I**) ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn ML1C3 bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere H-80 (250 × 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 40% trong nước.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập hợp chất alkaloit từ vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 có nguồn gốc từ loài hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846

Mẫu hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846 được thu tại đảo Cô Tô-Thanh Lân, Việt Nam vào ngày 19 tháng 8 năm 2019 ở độ sâu 14m, tọa độ địa lý 21°02′23″-107°45′40″. Mẫu được thu trong ống vô trùng Falcon 50 mL, bảo quản trên đá và sử dụng để phân lập vi nấm trong vòng 24h. Chủng M580 được phân lập từ mẫu hải sâm trên và được xác định là vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 bằng cách sử dụng phân tích trình tự gen 18S rRNA. Chủng vi nấm biển này đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số MW015802 và được lưu giữ tại Trường Đại học Y Dược Hải Phòng và Viện Hóa sinh biển – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ở nhiệt độ -80 ^{o}C. Quá trình lên men được ủ ở 28 °C và thu được vào ngày thứ 14 theo phương pháp đã được công bố của Lê Thị Hồng Minh vào năm 2019, có cải tiến.

Cụ thể, quá trình lên men sinh khối dạng lỏng chủng M580 được tiến hành như sau:

chuẩn bị môi trường thạch khoai tây dextroza (Potato Dextroza Agar – PDA) lỏng và PDA rắn bằng cách cân, đong chính xác từng thành phần nguyên vật liệu, hóa chất, khuấy tan và điều chỉnh pH =7, trong đó môi trường PDA lỏng và PDA rắn bao gồm các thành phần sau đây:

Môi trường PDA lỏng		Môi trường PDA rắn	
Tinh bột khoai tây	33g	Tinh bột khoai tây	1500g
Đường dextroza	22g	Đường dextroza	1000g
Muối biển nhân tạo	33g	Muối biển nhân tạo	1500g
Nước cất	1,12L	Aga	800g
		Nước cất	45,2L

rót môi trường PDA rắn vào đĩa petri chứa 15 mL môi trường để kiểm tra độ thuần khiết và hoạt hóa của chủng;

rót môi trường PDA lỏng lần lượt vào bình tam giác có thể tích 250 mL chứa 50 mL môi trường để nhân giống cấp 1, bình tam giác có thể tích 5L chứa 2,5L môi trường để nhân giống cấp 2 và 20 bình tam giác có thể tích 5L có chứa 2,5L môi trường để nuôi lượng lớn, các bình chứa môi trường sau khi chuẩn bị được khử trùng ở 121°C trong 30 phút;

lấy ống giữ chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 bảo quản ở -80 °C đem rã đông từ từ trên đá, sau đó cấy chấm trên đĩa petri chứa 15 mL môi trường PDA đặc, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 7 ngày;

từ đĩa petri tiến hành nhân giống cấp 1 bằng cách cấy 1 khuẩn lạc vào bình tam giác thể tích 250mL chứa 50 mL môi trường PDA lỏng, sau đó nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 10 ngày để thu được dịch nhân giống cấp 1;

từ dịch nhân giống cấp 1 tiến hành nhân giống cấp 2 bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 1 vào bình tam giác chứa 2,5L môi trường PDA lỏng theo tỷ lệ 1:50 (theo thể tích) và nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 10 ngày;

tiến hành lên men lượng lớn ở trạng thái lỏng bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 2 vào 20 bình tam giác có chứa 2,5L môi trường PDA lỏng đã chuẩn bị sẵn theo tỷ lệ thể tích 1:50, nuôi ở nhiệt độ 28 °C, lắc 100 vòng/phút trong 14 ngày để thu được sản phẩm nước lên men của chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580.

Nước lên men (50 L) được chiết với etyl axetat (5 × 40 L). Dịch chiết etyl axetat được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết etyl axetat (15,0 g). Cặn chiết etyl axetat được phân tách trên cột sắc ký (Φ 8 cm,L 50 cm) với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan (40/1, 20/1, 10/1, 5/1,

1/1) thu được năm phân đoạn, ML1A (1,1 g), ML1B (0,5 g), ML1C (1,3 g), ML1D (0,4 g) và ML1E (2,2 g).

Phân đoạn ML1C được phân tách trên cột sắc ký (Φ 4 cm,L 60 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được năm phân đoạn nhỏ hơn, ML1C1 (0,38 g), ML1C2 (0,32 g), ML1C3 (0,22 g), ML1C4 (0,03 g) và ML1C5 (0,1 g).

Hợp chất: (5*S*,8*S*,9*R*)-8-benzoyl-2-((1*S*,2*S*,*Z*)-1,2-dihydroxyhex-3-en-1-yl)-9-hydroxy-8-metoxy-3-methyl-7-(2-phenylaxetyl)-1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-en-4,6-dion có công thức (**I**) thu được ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn ML1C3 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere H-80 (250 × 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 40% trong nước.

Hợp chất công thức (**I**) có các đặc trưng sau đây:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$ – 32.8° (*c* 0,1, $CHCl_3$);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-MS-ESI tại *m/z* 584.1666 $[M+^{35}Cl]^-$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{31}NO_9Cl]^-$, 584.1693;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Số liệu phổ ^1H- NMR và ^{13}C-NMR (δ, ppm) của hợp chất có công thức (**I**)

C	δ_C [a)]	δ_H [a)] (mult., *J* = Hz)	C	δ_C [a)]	δ_H [a)] (mult., *J* = Hz)
2	186.0	-	16	6.0	1.67 (s)
3	113.6	-	17	195.1	-
4	196.7	-	18	132.5	-
5	92.7	-	19, 23	130.7	8.30 (d, 8.5)
6	167.1	-	20, 22	128.6	7.47 (t, 8.5)
8	90.7	-	21	134.7	7.63 (t, 8.5)
9	73.4	4.67 (s)	24	176.8	-
10	70.6	4.58 (d, 5.0)	25	41.1	3.64 (s)
11	70.7	4.75 (dd, 9.0, 5.0)	26	133.5	-
12	126.4	5.29 (dd, 9.0, 9.5)	27, 31	129.4	7.27 (d, 8.0)
13	137.0	5.59 (m)	28, 30	127.3	7.26 (t, 8.0)
14	21.4	2.13 (m)	29	128.7	7.32 (t, 8.0)
15	14.1	0.98 (t, 7.5)	8-OCH_3	51.8	3.38 (s)

[a)] Đo trong $CDCl_3$

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác dụng dược lý của hợp chất alkaloit

Hợp chất alkaloit theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính kháng khuẩn đối với chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* và nấm men *Candida albicans* như sau:

Hợp chất thu được trong ví dụ 1 được thử hoạt tính đối với 2 chủng vi khuẩn gram (–) (*Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella enterica* ATCC13076), 2 chủng vi khuẩn gram (+) (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 và 1 chủng nấm (*Candida albicans* ATCC10231).

Hoạt tính kháng vi sinh vật được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ của Hadacek (2000). Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật nhằm đánh giá mức độ kháng vi sinh vật kiểm định của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Hợp chất có công thức I được pha loãng trong DMSO ở các dải nồng độ giảm dần: 256µg/mL, 128µg/mL, 64µg/mL, 32µg/mL, 16µg/mL, 8µg/mL, 4µg/mL và 2µg/mL, sau đó được thử hoạt tính với dung dịch chứa vi khuẩn hoặc nấm với nồng độ $5x10^5$ CFU/mL. Đối chứng được sử dụng là streptomycin. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Kết quả hoạt tính kháng khuẩn

Hợp chất	MIC (µg/mL)				
	Gram (+)		Gram (-)		men
	E. faecalis ATCC29921	*S. aureus* ATCC25923	*E. coli* ATCC25922	*S. enterica* ATCC13076	*C. albicans* ATCC10231
Hợp chất (I)	64	-	-	-	128
Streptomycin	256	256	32	128	-

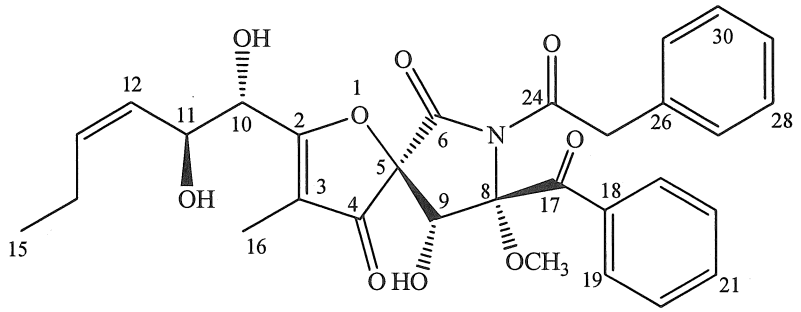
(-) hợp chất không thể hiện hoạt tính (MIC >256 µg/mL)

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất, (5*S*,8*S*,9*R*)-8-benzoyl-2-((1*S*,2*S*,*Z*)-1,2-dihydroxyhex-3-en-1-yl)-9-hydroxy-8-metoxy-3-metyl-7-(2-phenylaxetyl)-1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-en-4,6-dion từ vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 có nguồn gốc từ loài hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846. Hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với chủng gram (+) *Enterococcus faecalis* và nấm men *Candida albicans* cao hơn so với chất chuẩn đối chứng streptomycin. Sáng chế này tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo.

Yêu cầu bảo hộ

1. Hợp chất alkaloit mà là (5*S*,8*S*,9*R*)-8-benzoyl-2-((1*S*,2*S*,*Z*)-1,2-dihydroxyhex-3-en-1-yl)-9-hydroxy-8-metoxy-3-metyl-7-(2-phenylaxetyl)-1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-en-4,6-dion có công thức (**I**):



(**I**)

2. Phương pháp phân lập hợp chất theo điểm 1 từ vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 có nguồn gốc từ loài hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846, phương pháp này bao gồm các bước:

i) thu gom mẫu hải sâm *Colochirus quadrangularis* Troschel, 1846 vào trong ống vô trùng, bảo quản trên đá và sử dụng để phân lập vi nấm trong vòng 24h;

ii) phân lập và xác định chủng nấm mà là chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 bằng cách sử dụng phân tích trình tự gen 18S rRNA và bảo quản ở -80°C;

iii) lên men sinh khối dạng lỏng chủng M580, trong đó:

chuẩn bị môi trường thạch khoai tây dextroza (Potato Dextrose Agar – PDA) lỏng và PDA rắn bằng cách cân, đong chính xác từng thành phần nguyên vật liệu, hóa chất, khuấy tan và điều chỉnh pH =7, trong đó môi trường PDA lỏng và PDA rắn bao gồm các thành phần sau đây:

Môi trường PDA lỏng		Môi trường PDA rắn	
Tinh bột khoai tây	33g	Tinh bột khoai tây	1500g
Đường dextroza	22g	Đường dextroza	1000g
Muối biển nhân tạo	33g	Muối biển nhân tạo	1500g
Nước cất	1,12L	Aga	800g
		Nước cất	45,2L

rót môi trường PDA rắn vào đĩa petri chứa 15 mL môi trường để kiểm tra độ thuần khiết và hoạt hóa của chủng;

rót môi trường PDA lỏng lần lượt vào bình tam giác có thể tích 250 mL chứa 50 mL môi trường để nhân giống cấp 1, bình tam giác có thể tích 5L chứa 2,5L môi trường để nhân giống cấp 2 và 20 bình tam giác có thể tích 5L có chứa 2,5L môi trường để nuôi lượng lớn, các bình chứa môi trường sau khi chuẩn bị được khử trùng ở 121°C trong 30 phút;

lấy ống giữ chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580 bảo quản ở -80 °C đem rã đông từ từ trên đá, sau đó cấy chấm trên đĩa petri chứa 15 mL môi trường PDA đặc, nuôi tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong 7 ngày;

từ đĩa petri tiến hành nhân giống cấp 1 bằng cách cấy 1 khuẩn lạc vào bình tam giác thể tích 250mL chứa 50 mL môi trường PDA lỏng, sau đó nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 10 ngày để thu được dịch nhân giống cấp 1;

từ dịch nhân giống cấp 1 tiến hành nhân giống cấp 2 bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 1 vào bình tam giác chứa 2,5L môi trường PDA lỏng theo tỷ lệ 1:50 (theo thể tích) và nuôi lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 10 ngày;

tiến hành lên men lượng lớn ở trạng thái lỏng bằng cách bổ sung dịch nhân giống cấp 2 vào 20 bình tam giác có chứa 2,5L môi trường PDA lỏng đã chuẩn bị sẵn theo tỷ lệ thể tích 1:50, nuôi ở nhiệt độ 28 °C, lắc 100 vòng/phút trong 14 ngày để thu được sản phẩm nước lên men của chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* M580;

iv) chiết sản phẩm nước lên men với etyl axetat (5 × 40 L), dịch chiết etyl axetat được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết etyl axetat;

v) tiến hành phân tách cặn chiết etyl axetat trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan (40/1, 20/1, 10/1, 5/1, 1/1) thu được năm phân đoạn, lần lượt ký hiệu là ML1A - ML1E;

vi) tiến hành phân tách sắc ký phân đoạn ML1C được trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical

Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/1 về thể tích, thu được năm phân đoạn nhỏ hơn, lần lượt ký hiệu là ML1C1 - ML1C5; và

vii) phân tách hợp chất (5*S*,8*S*,9*R*)-8-benzoyl-2-((1*S*,2*S*,*Z*)-1,2-dihydroxyhex-3-en-1-yl)-9-hydroxy-8-metoxy-3-metyl-7-(2-phenylaxetyl)-1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-en-4,6-dion có công thức (**I**) ở dạng bột vô định hình từ phân đoạn ML1C3 bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J's sphere H-80 (250 × 20 mm), điều kiện dung môi axetonitril 40% trong nước.