



(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) 
2-0001832

(51)⁷ **C07D 309/30, C12P 1/02**

(13) **Y**

(21) 2-2012-00212

(22) 26.09.2012

(45) 25.09.2018 366

(43) 25.07.2013 304

(73) **VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC - VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT
NAM (VN)**

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

(72) **Quyên Đình Thi (VN), Đỗ Thị Tuyên (VN), Nguyễn Thị Hoài Trâm (VN), Đỗ Thị
Thanh Huyền (VN)**

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT LOVASTATIN (AXIT MENVINOLINIC DẠNG
LACTON HÓA)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chuyển hóa axit mevinolinic sang dạng lacton hóa (lovastatin). Lovastatin được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp lacton hóa bao gồm một số phương pháp tinh sạch, tách chiết axit mevinolinic mà được sinh tổng hợp từ chủng *A. terreus* bằng phương pháp lên men rắn trong môi trường chứa 20% cám gạo, 1% lactoza, 6% bột đậu tương, 1,5% khoáng czapek (%w/v), pH 5,5 với các thông số kỹ thuật như thời gian lên men là 11 ngày, pH nằm trong khoảng từ 5 đến 6 và độ ẩm ban đầu nằm trong khoảng từ 50% đến 60%. Với việc kết tinh axit mevinolinic qua các cột MPLC, HPLC, axit này đã được tiến hành lacton hóa để tạo ra lovastatin dưới các điều kiện như: Gia nhiệt phản ứng đến 70°C và khuấy trong 30 phút; Làm lạnh phản ứng xuống 0°C và khuấy trong 2 giờ; Lọc thu tinh thể và rửa với isopropanol 43,5%; sấy khô tinh thể trong chân không ở nhiệt độ 40°C, thu được tinh thể lovastatin với hiệu suất đạt 96,4%, độ sạch 99,4%. Phương pháp lacton hóa này có ưu điểm là đơn giản, hiệu quả, giá thành thấp, hàm lượng lovastatin thu được cao với độ sạch cao, không sử dụng các hóa chất độc hại, và được dùng để áp dụng ở quy mô sản xuất công nghiệp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực hóa sinh, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất lovastatin (axit mevinolinic dạng lacton hóa).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Lovastatin cùng một số thuốc khác như simvastatin, atorvastatin... đều là các thuốc thuộc nhóm statin. Các thuốc trong nhóm này đều là tiền chất, vào trong cơ thể được chuyển hóa thành chất có hoạt tính mới gây tác dụng hạ lipit máu, được hấp thu nhanh qua đường tiêu hóa, được chuyển hóa qua gan, thải trừ chủ yếu qua phân, nằm trong khoảng từ 5% đến 20% qua thận. Các thuốc thuộc nhóm làm hạ lipoprotein máu chủ yếu bằng cách ức chế cạnh tranh với enzym xúc tác cho phản ứng tổng hợp cholesterol nên làm giảm lượng cholesterol. Hiệu lực tác dụng của các thuốc trong nhóm khác nhau và phụ thuộc vào liều dùng. Do đó, các statin thường được chỉ định phải kết hợp với chế độ ăn giảm cholesterol máu trong điều trị bệnh tăng cholesterol máu nguyên phát. Ngoài ra còn được chỉ định trong dự phòng các chứng tai biến mạch vành, chứng nhồi máu cơ tim, bệnh xơ. Lovastatin là statin tự nhiên có nguồn gốc từ nấm. Lovastatin được sản xuất quy mô công nghiệp được bắt đầu từ năm 1980 từ chủng *A. terreus* ATCC 20542 với tên thương mại là Mevacor (Merk) (Albers-Schonberg *et al.*, 1980; Albers-schonberg 1982; Alberts 1988).

Với các tác dụng tích cực trong điều trị bệnh của lovastatin, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu để sản xuất lovastatin dạng thương phẩm phục vụ vào mục đích y dược. Nhằm điều chế lovastatin để làm thuốc điều trị bệnh mỡ máu, sau khi chọn lựa sàng lọc các chủng giống sinh tổng hợp lovastatin cao từ chủng tự nhiên và chủng đột biến (Đỗ Thị Tuyên *et al.*, 2011) chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu lựa chọn các phương pháp lên men để nâng cao hiệu suất tổng hợp và chiết xuất lovastatin từ chủng *A. terreus* theo phương pháp lên men chìm quy mô pilot với thiết bị lên men 20L, là bước đầu cho việc sản xuất lovastatin dùng để sản xuất thuốc chống ngưng tập lipit trong máu (Lê Thanh Hoàng *et al.*, 2011). Tuy nhiên quá trình lên men chỉ sinh tổng hợp một lượng nhỏ lovastatin. Sản phẩm chính của quá trình lên men chủng *A. terreus*

là axit menvinolinic, dạng β -hydroxyl axit của lovastatin. Để nhận được lovastatin, phải tách axit menvinolinic ra khỏi sản phẩm nuôi cấy bằng dung môi hữu cơ. Sau đó trong môi trường xúc tác axit, axit menvinolinic được lacton hóa tạo ra lovastatin.

Một số quy trình tách lovastatin dạng lacton thông qua quá trình lacton hóa dạng axit trong dịch lên men và tinh sạch đã được nghiên cứu. Monaghan và cộng sự (1980) đã đưa ra quy trình tách lovastatin (dạng lacton hóa) từ dịch lên men chủng *A. terreus* trong môi trường dịch bắp, 2% lactoza, 0,5% trọng lượng/thể tích cao nấm men, pH 6,8 ở 28°C, 11 ngày. Dịch lên men sau đó được chiết bằng etyl axetat, cô chân không ở 30°C, tách chiết 2 lần bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi etyl axetat:metylen clorua tỷ lệ 30:70 và tỷ lệ 50:50; giải hấp bằng etyl axetat 100% hoặc axeton 100%, tinh chế thêm, làm khô, nghiền với metylen clorua, lọc và thu lovastatin (Monaghan et al., 1980, Kumar et al., 2006). Phương pháp này không áp dụng được ở quy mô công nghiệp do nhiều công đoạn, chi phí tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lọc gel, siêu lọc/thẩm thấu ngược cao và hiệu suất thu hồi thấp.

Trong quy trình của Vaishnav và cộng sự (2007), lovastatin được tách chiết từ dịch lên men chủng *A. terreus* ở 28 đến 30°C, từ 220 đến 260 giờ trong môi trường gồm từ 1 đến 6% nguồn cacbon, 0,2 đến 6% nguồn nitơ, muối khoáng, dextroza, sucroza, natri axetat, axit xitric. Dịch lên men được lacton hóa để tạo ra lovastatin thô bằng cách hòa tan axit menvinolinic trong metanol-nước, làm lạnh đến 2°C, pH 3,5 bằng H_3PO_4 , chiết phân bố trong dung môi toluen ở nhiệt độ 60°C trong 12 giờ, rửa bằng dung dịch 2,5% Na_2CO_3 , rửa bằng nước, cô kiệt ở 40°C thu được cặn chiết, kết tinh cặn chiết trong toluen, thu được lovastatin thô; tinh sạch lovastatin bằng dung môi diclometan, tỷ lệ diclometan và lovastatin từ 1 đến 10 lần, tốt hơn là từ 2 đến 7 lần, khuấy trong 5 đến 30 phút, tốt hơn là 10 phút, bổ sung dung môi kỵ nước, tốt hơn là toluen ở nhiệt độ 55°C (lên xuống 5°C), trong 60 phút, lọc thu dịch lọc, làm lạnh dịch lọc xuống từ 0 đến 10°C (tốt hơn là 3 đến 2°C) để kết tinh lovastatin, lọc thu tinh thể; rửa với axeton lạnh và sấy trong chân không ở 40 đến 60°C, lặp lại ít nhất 2 lần để thu được sản phẩm có độ sạch lớn hơn 99%. Quy trình cho thấy axit menvinolinic được chuyển hóa tạo ra các dẫn xuất statin sau một chuỗi phản ứng este hóa, đồng phân hóa, khử hóa và các bước chiết, tách, kết tinh phân đoạn. Đây cũng là phương pháp tốn nhiều công sức và qua rất nhiều bước trung gian, dẫn đến hiệu suất thu hồi lovastatin thấp.

Ở Việt Nam, lĩnh vực sản xuất hoạt chất thứ cấp lovastatin trên quy mô công nghiệp còn rất mới mẻ, đặc biệt là quy trình chuyển hóa axit menvinolinic thành lovastatin. Đã có một số quy trình lên men lỏng từ chủng *A. terreus* ATCC 20542 trên quy mô 20 lít sử dụng nguyên liệu glucoza và pepton (Lê Thanh Hoàng *et al*, 2011) tuy nhiên năng suất chỉ đạt 200mg/L.

Hay các nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở mức độ nghiên cứu sinh tổng hợp lovastatin từ chủng *A. terreus* và sau đó được tinh sạch từ dịch lên men thô này bằng một quy trình thường gồm: sắc ký lớp mỏng, sắc ký cột silicagel và sắc ký lỏng cao áp. Quá trình tinh sạch này tốn nhiều thời gian và không đặc hiệu nên việc tách chiết phải qua nhiều bước.

Sản phẩm chủ yếu của quá trình lên men chủng *A. terreus* là axit menvinolinic, dạng mở vòng lacton-hydroxycarboxylat. Axit menvinolinic và dạng muối tương ứng của nó có thể được tách từ sản phẩm lên men và được lacton hóa trong môi trường axit thành lovastatin. Ngược lại dạng lacton hóa- lovastatin cũng có thể được phá vỡ vòng lacton trở thành dạng muối hydroxycarboxylat trong môi trường kiềm. Nếu mở vòng lacton bằng các ancol như metanol, etanol, propanol, butanol hay phenyl, dimethylamin, axetyl amin sẽ tạo ra este tương ứng. Dược phẩm dùng ở dạng đã đóng vòng lacton.

Trong nội dung của giải pháp hữu ích, sau khi nghiên cứu chiết tách axit menvinolinic từ sản phẩm lên men theo phương pháp lên men bề mặt bằng cách chiết bánh lên men rắn với các dung môi hữu cơ, chiết phân bố và cuối cùng là chạy sắc ký và kết tinh sản phẩm. Sản phẩm thu được đạt yêu cầu để sử dụng ở giai đoạn tiếp theo là lacton hóa để chuyển hóa axit menvinolinic thành lovastatin. Quy trình chuyển hóa axit menvinolinic sang dạng lacton hóa đáp ứng được yêu cầu đặt ra là đơn giản, kinh tế, sử dụng các dung môi ít độc hại có thể ứng dụng trong sản xuất ở quy mô công nghiệp.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để giải quyết các tồn tại nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất lovastatin với hiệu suất cao bao gồm các bước:

- Tách chiết axit menvinolinic từ cao nấm thu được sau khi lên men chủng *A. terreus* sinh tổng hợp axit menvinolinic trong môi trường chứa 20% cám gạo, 1% lactoza, 6% bột đậu tương, 1,5% khoáng czapek (% w/v), pH 5,5 với các

thông số kỹ thuật như thời gian lên men 11 ngày, pH nằm trong khoảng từ 5 đến 6 và độ ẩm ban đầu nằm trong khoảng từ 50% đến 60% bằng phương pháp sắc ký điều chế MPLC và HPLC, độ sạch đạt 70%;

- Lacton hóa axit menvinolinic để tạo ra sản phẩm lovastatin thô: hòa tan axit menvinolinic trong metanol-nước rồi làm lạnh xuống nhiệt độ 20°C, pH của sản phẩm được chỉnh về pH 3,5 bằng axit H₃PO₄; tiến hành chiết phân bố trong dung môi toluen, ở nhiệt độ 60°C trong 12 giờ, trong khí quyển nitơ; rửa bằng dung dịch natri bicacbonat 2,5%, rửa bằng nước để loại bỏ các muối vô cơ và các tạp chất khác, cô kiệt ở 40°C để thu được cặn chiết, cặn chiết được kết tinh trong toluen, cặn này chính là lovastatin ở dạng lacton đã được đóng vòng;
- Tinh sạch lovastatin: sử dụng dung môi diclometan, theo tỷ lệ diclometan : tinh thể lovastatin là 2:7 (v/w), khuấy trong 10 phút; sau đó pha hỗn hợp với dung môi toluen ở nhiệt độ 60°C trong 60 phút, lọc thu dịch; làm lạnh dịch lọc xuống 2°C để kết tinh lovastatin; lọc thu tinh thể, rửa với axeton lạnh và sấy trong chân không ở 40°C để thu sản phẩm có độ sạch đạt trên 99,5%.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Sắc ký lớp mỏng (TLC) dịch lên men thu hồi axit menvinolinic: (1-4): mẫu chiết lên men, 5: mẫu chuẩn lovastatin

Hình 2. Sắc ký lớp mỏng (TLC) dịch lên men thu hồi sau khi lacton tạo sản phẩm lovastatin (1: lovastatin tinh sạch; 2: lovastatin thô; 3: lovastatin chuẩn)

Hình 3. (A) Phổ ¹³C-NMR của lovastatin; (B) Phổ ¹H-NMR của lovastatin

Hình 4. Quy trình lacton hóa và tinh sạch lovastatin

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quá trình lacton hóa axit menvinolinic tạo ra lovastatin

Sau khi lên men thu được axit menvinolinic, hòa tan axit menvinolinic trong metanol- nước rồi làm lạnh xuống nhiệt độ 20°C, pH của sản phẩm cũng được chỉnh về pH 3,5 bằng axit H₃PO₄. Ở các giá trị pH của phản ứng cao hơn 3,5 sẽ nhận được nhiều lovastatin hơn, ở các giá trị pH < 2,0 tạo ra nhiều tạp chất do đó mà hiệu suất của lovastatin giảm, hiệu suất thu nhận lovastatin thấp nhất ở pH 4,5 do tốc độ lacton hóa ở pH này thấp nhất. Khoảng giá trị pH cho hiệu suất lacton hóa cao nhất là từ 3,4 đến 3,6.

Chọn toluen làm dung môi để thêm vào sản phẩm lên men trong số các dung môi kỵ nước có chứa vòng thơm như toluen, xylen và các dung môi là các dẫn xuất halogen diclometan, clorofom. Tiếp đó gia nhiệt hỗn hợp của toluen và dịch lên men đến nhiệt độ 66°C và duy trì ở nhiệt độ này trong 12 giờ trong môi trường khí trơ không có oxy để quá trình lacton hóa diễn ra hoàn toàn.

Một số tài liệu đã dẫn chứng rằng môi trường khí trơ làm tăng hiệu suất lacton hóa (Jakubcova *et al.*, 2000). Trong số các khí trơ như khí nitơ, heli, argon lựa chọn nitơ làm môi trường xúc tác. Hơi nitơ được sục vào hỗn hợp, sau đó hỗn hợp được gia nhiệt đến 60°C. Kết quả phản ứng lacton trong môi trường nitơ đã làm tăng hiệu suất lacton hóa từ 4% đến 5%, đạt 76,76% so với khi thực hiện phản ứng trong khí quyển là 71,41%.

Pha hữu cơ sau đó được tách ra khỏi hỗn hợp trên phễu chiết 80L. Phần sản phẩm lên men được chiết lại với toluen ở nhiệt độ 60°C trong khí quyển nitơ. Pha hữu cơ cũng được chiết lại với toluen trong khí quyển nitơ.

Pha hữu cơ nhận được từ dịch chiết hoặc sau khi chiết bánh nấm (dịch chiết 1) được xử lý với dung dịch kiềm natri bicacbonat 2,5% theo tỉ lệ dịch chiết : dung dịch natri bicacbonat = 9:1(v/v), sau đó rửa lại với nước để loại bỏ hết các muối vô cơ và các tạp chất khác thu được dịch chiết 2. Tiếp đó tiến hành chưng cất dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 40°C thu được cặn. Kết tinh chất rắn này trong toluen, lọc thu được tinh thể rắn, sấy khô trong chân không ở nhiệt độ 40°C. Quá trình kết tinh lovastatin trong toluen và lọc thu tinh thể này loại bỏ được các tạp chất không phân cực được tạo ra từ quá trình lên men và lacton hóa axit menvinolinic.

Tinh sạch lovastatin thô

Lovastatin thô thu được sau khi lacton hóa cần phải tinh chế tiếp do còn chứa nhiều tạp chất bởi trong quá trình lên men nấm để thu được axit menvinolinic rất nhiều các chất dinh dưỡng vô cơ và hữu cơ đã được bổ sung vào môi trường nuôi cấy, nhiều trong số các chất này cũng tham gia vào quá trình lacton hóa axit menvinolinic và sinh ra nhiều tạp chất.

Chúng tôi đã nghiên cứu và thử nghiệm quy trình tinh sạch lovastatin đơn giản sử dụng các dung môi thông dụng và ít độc hại khi được áp dụng ở quy mô lớn hơn như

sản xuất pilot hay sản xuất công nghiệp. Chúng tôi đã lựa chọn hệ dung môi để tinh chế lovastatin là hỗn hợp dung môi của alkyl halogenua với dung môi kỵ nước.

Trước tiên, lovastatin được hòa tan trong dung môi alkyl halogenua, thông thường là diclometan, theo tỉ lệ 2 : 7, v/w. Khuấy hỗn hợp trong 10 phút để hòa tan hoàn toàn lovastatin, lọc bỏ phần tạp chất không tan. Pha loãng hỗn hợp với dung môi thơm kỵ nước theo tỉ lệ 4-6 lần v/w tính theo khối lượng ban đầu của lovastatin, ở đây chúng tôi lựa chọn toluen, rồi gia nhiệt phản ứng đến 60°C. Lọc thu phần dịch, cô kiệt dưới áp suất giảm. Kết tinh lovastatin trong toluen lạnh ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 2°C. Cuối cùng lọc thu tinh thể và sấy khô tinh thể trong chân không ở nhiệt độ 40°C. Lặp lại quy trình tinh chế lovastatin như trên 2 lần thu được sản phẩm có độ sạch đạt trên 99%, đạt yêu cầu dược dụng.

Tiếp đó lovastatin sạch tiếp tục được tinh sạch bằng cách hòa tan lovastatin sạch trong ancôl ưa nước. Trong số nhiều ancôl ưa nước như metanol, etanol, isopropanol chúng tôi lựa chọn isopropanol. Tỉ lệ dung môi : khối lượng lovastatin là 6. Gia nhiệt hỗn hợp đến 70°C trong thời gian 30 phút. Tiếp đó làm lạnh hỗn hợp xuống 0°C và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ này trong 2 giờ để lovastatin kết tinh hoàn toàn. Lọc, rửa với isopropanol thu tinh thể, sấy chân không ở nhiệt độ 40°C.

Quá trình kết tinh lại lovastatin trong isopropanol đã nâng độ sạch của sản phẩm lên 99,3%, loại bỏ hết tạp chất và đạt yêu cầu dược dụng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Nghiên cứu tách chiết axit mevinolinic từ cao nấm bằng phương pháp sắc ký điều chế MPLC

Bột cao nấm được hòa tan trong metanol với nồng độ 1 g/ml, lọc loại bỏ phần cặn trước khi bơm vào cột tách sắc ký lọc gel. Chúng tôi đã khảo sát và xây dựng điều kiện tách sắc ký điều chế MPLC như sau:

- + Cột tách: ID 2,5 × 200cm, $V_0 = 980\text{mL}$,
- + Pha tĩnh: Sephadex LH 20
- + Pha động: metanol
- + Tốc độ dòng pha động: 10mL/phút;

- + Lượng dung dịch mẫu đưa lên cột tách: 10mL (~ 10g cao nấm). Các phân đoạn sắc ký được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng với chất chuẩn lovastatin.
- Dung môi triển khai: etyl axetat : metanol, tỉ lệ 7 : 3, v/w
- Thuốc hiện: Von's

Gộp các phân đoạn có sản phẩm. Cô kiệt loại dung môi dưới áp suất giảm thu được chất dầu. Điều chỉnh pH của dịch dầu về giá trị 6,5 bằng KOH 0,2M rồi lắ chiết với etyl axetat. Lọc thu pha etyl và cô kiệt loại dung môi dưới áp suất giảm. Kết quả từ 10g cao nấm, chúng tôi đã phân lập được 3g axit menvinolinic thô. Hiệu suất tách trên cột 30%, độ sạch 70% (xác định trên bằng phân tích vạch trên bản mỏng theo phương pháp sắc ký bản mỏng).

Ví dụ 2: Nghiên cứu tách chiết axit menvinolinic từ cao nấm bằng phương pháp sắc ký điều chế HPLC

Dựa vào kết quả sắc ký lọc gel trên cột tách với pha tĩnh Sephadex LH 20, cột tách: ID 2,5×200cm, chúng tôi đã nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện tách axit menvinolinic trên cột sắc ký lọc gel với pha tĩnh Sephadex LH 20, cột tách ID 300 × L1000mL với điều kiện tách sắc ký điều chế HPLC như sau:

- + Cột tách: ID 300 × L1000mL
- + Pha tĩnh: Sephadex LH 20
- + Pha động: metanol
- + Tốc độ dòng pha động: 50mL/phút;
- + Lượng dung dịch mẫu đưa lên cột tách: 50mL (~50g cao nấm). Các phân đoạn sắc ký được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng với chất chuẩn lovastatin.
- dung môi triển khai: etyl axetat : metanol, tỉ lệ 7 : 3, v/w
- thuốc hiện: Von's

Kết quả hình 1 cho thấy sản phẩm thu được sau lên men chủ yếu là dạng axit menvinolinic, độ sạch sau khi tách chiết điều chế đạt tương đối là 70%.

Gộp các phân đoạn có sản phẩm. Cô kiệt loại dung môi dưới áp suất giảm thu được chất dầu. Điều chỉnh pH của dịch dầu về giá trị 6,5 bằng KOH 0,2M rồi lắ chiết với etyl axetat. Lọc thu pha etyl và cô kiệt loại dung môi dưới áp suất giảm. Kết quả từ 50g bột cao nấm, chúng tôi đã phân lập được 14g axit menvinolinic thô. Hiệu suất tách trên cột 28 %, độ sạch 70%.

Ví dụ 3: Kết tinh axit menvinolinic

Chất rắn thu được sau khi sắc ký cột lọc gel được hòa tan lại trong etanol, để bay dung môi bằng cách đặt vial có chứa sản phẩm kết tinh lại trong etanol trong desicator có chất làm khan là P_2O_5 cho đến khi dung môi bay hơi hoàn toàn thu được tinh thể màu trắng ngà. Đo điểm nóng chảy của chất rắn này trên máy đo điểm chảy Melting point Buechi M-450, chất rắn thu được có $M_p = 155^\circ\text{C} - 160^\circ\text{C}$.

Như vậy, bằng cách chiết sản phẩm lên men với metanol và tiếp theo là tách axit menvinolinic bằng phương pháp sắc ký điều chế HPLC trên cột với pha tĩnh Sephadex LH 20, pha động metanol, chúng tôi đã phân lập được axit menvinolinic thô với hiệu suất tách khoảng 30%, độ sạch 70%, đạt yêu cầu để sử dụng cho bước tiếp theo là lacton hóa axit menvinolinic trong môi trường axit để thu được lovastatin.

Ví dụ 4: Tinh sạch lovastatin

Chuẩn bị một bình phản ứng 1L, cho vào bình 640mL isopropanol. Cho vào bình phản ứng 106,7mg lovastatin thô. Gia nhiệt phản ứng đến 70°C và khuấy ở nhiệt độ này trong 30 phút. Làm lạnh phản ứng xuống 0°C và khuấy ở nhiệt độ này trong 2 giờ. Lọc thu tinh thể và rửa với 43,5mL isopropanol. Sấy khô tinh thể trong chân không ở 40°C , thu được 102,2mg tinh thể lovastatin, hiệu suất 96,4 %, độ sạch 99,3%.

Sản phẩm tinh thể có các đặc điểm sau:

- Nhiệt độ nóng chảy: $170^\circ\text{C} - 171^\circ\text{C}$
- Khối lượng phân tử: 404g
- Công thức rút gọn: $C_{24}H_{36}O_5$

Bằng quy trình tách và tinh chế sử dụng diclometan và toluen, các tạp chất trong sản phẩm lovastatin trong quá trình lên men và lacton hóa đã từng bước được loại bỏ và hàm lượng các chất này trong ngưỡng cho phép của sản phẩm lovastatin được dụng. Ưu điểm của phương pháp này là đơn giản, hiệu quả, giá thành thấp, hàm lượng lovastatin thu được cao với độ sạch cao, không sử dụng các hóa chất độc hại, dễ dàng áp dụng ở quy mô sản xuất pilot hoặc quy mô công nghiệp.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

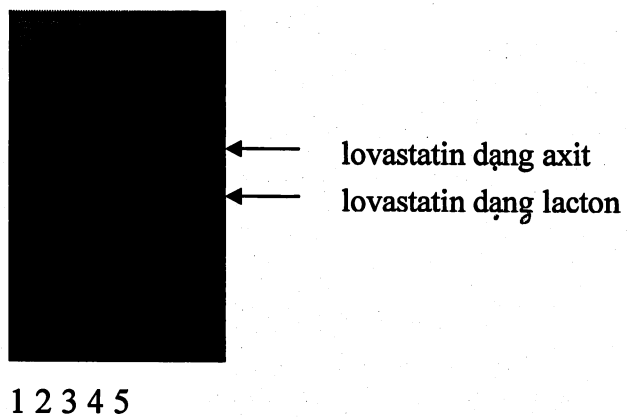
Quy trình của giải pháp hữu ích tạo ra hoạt chất thứ cấp lovastatin từ việc chuyển hóa axit menvinolinic được lên men trong môi trường lên men rắn từ chủng *A. terreus*

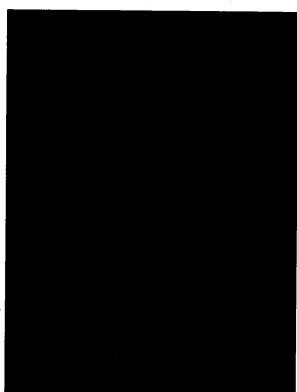
bằng phương pháp lacton hóa. Sản phẩm lovastatin ở dạng lacton hóa sẽ ổn định hơn, bền hơn và không bị phân hủy khi được lưu hành trên thị trường.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình sản xuất lovastatin bao gồm các bước:

- **Tách chiết axit menvinolinic** từ cao nấm thu được sau khi lên men chủng *A. terreus* sinh tổng hợp axit menvinolinic trong môi trường chứa 20% cám gạo, 1% lactoza, 6% bột đậu tương, 1,5% khoáng czapek (%w/v), pH 5,5 với các thông số kỹ thuật như thời gian lên men 11 ngày, pH nằm trong khoảng từ 5 đến 6 và độ ẩm ban đầu nằm trong khoảng từ 50% đến 60% bằng phương pháp sắc ký điều chế MPLC và HPLC với các thông số kỹ thuật cột tách: ID 2,5 × 200cm, $V_0 = 980\text{mL}$; tốc độ dòng: 10mL/phút (đối với MPLC) và ID 300 × L1000mL; 50mL/phút (đối với HPLC); hệ dung môi: etyl axetat: metanol = 7 : 3 (v/w), hiệu suất tách trên cột 30%, độ sạch đạt 70%;
- **Lacton hóa axit menvinolinic để tạo ra sản phẩm lovastatin thô**: hòa tan axit menvinolinic trong metanol - nước rồi làm lạnh xuống nhiệt độ 20°C, pH của sản phẩm được chỉnh về pH 3,5 bằng axit H_3PO_4 ; tiến hành chiết phân bố trong dung môi toluen ở nhiệt độ 60°C trong 12 giờ; rửa bằng dung dịch kiềm natri bicacbonat 2,5%, rửa bằng nước để loại bỏ các muối vô cơ và các tạp chất khác, cô kiệt ở 40°C thu được cặn chiết, cặn chiết được kết tinh trong toluen, cặn này chính là lovastatin ở dạng lacton đã được đóng vòng (lovastatin thô);
- **Tinh sạch lovastatin**: sử dụng dung môi diclometan, theo tỷ lệ diclometan : tinh thể lovastatin là 2:7 (v/w), khuấy trong 10 phút; sau đó pha hỗn hợp với dung môi toluen ở nhiệt độ 60°C trong 60 phút, lọc thu dịch; làm lạnh dịch lọc xuống 2°C để kết tinh lovastatin; lọc thu tinh thể, rửa với axeton lạnh và sấy trong chân không ở 40°C, thu được sản phẩm có độ sạch đạt trên 99,5%.

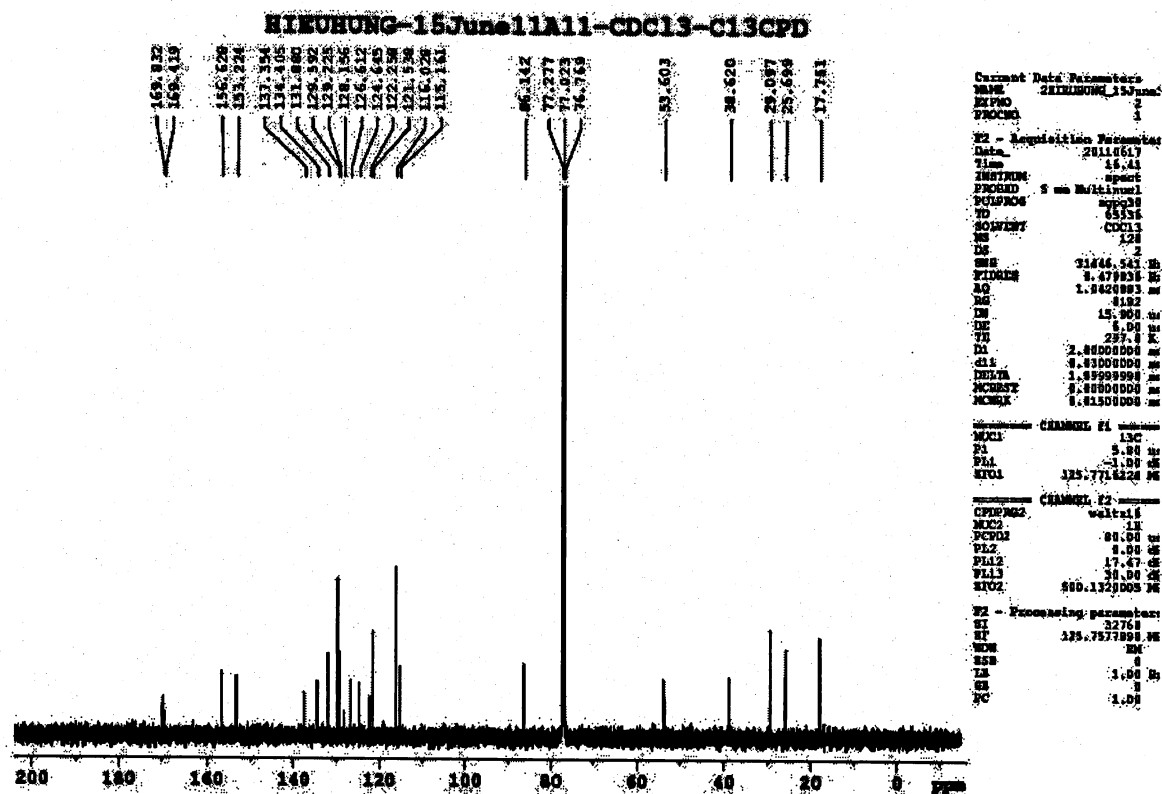
Hình 1

Hình 2

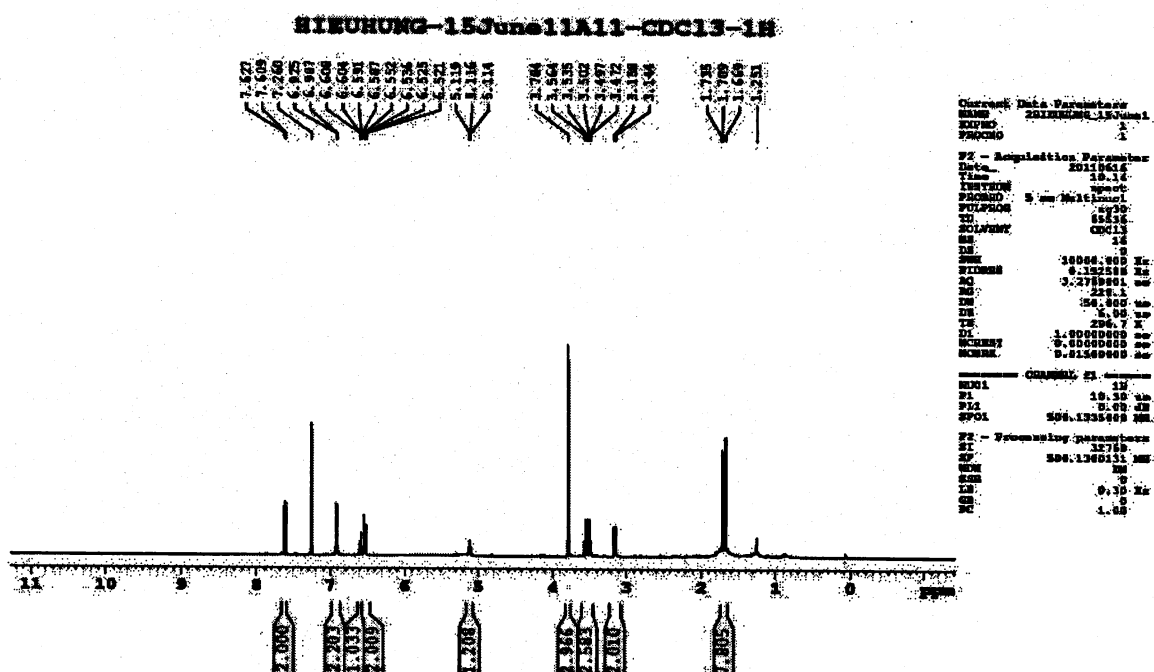
lovastatin dạng lacton

1 2 3 4

Hình 3



A



B

Hình 4

