



(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)



1-0026463

(51)⁷ A23L 1/30; A61Q 19/00; C07D 307/80; (13) B
A61K 8/97

(21) 1-2013-03329

(22) 22/04/2011

(86) PCT/JP2011/059926 22/04/2011

(87) WO/2012/144064 A1 26/10/2012

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/12/2013 309A

(73) MORINAGA & CO., LTD. (JP)

33-1, Shiba 5-Chome, Minato-ku, Tokyo, 1088403, Japan

(72) SANO Shoko (JP); SUGIYAMA Kenkichi (JP).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM CHỨA SCIRPUSIN B

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa scirpusin B, chế phẩm này thu được từ nguyên liệu tự nhiên và chứa hàm lượng scirpusin B cao và phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B này. Chế phẩm chứa scirpusin B được sản xuất bằng phương pháp chiết từ hạt quả chanh leo. Trong quá trình chiết scirpusin B, hạt quả chanh leo được nghiền, và sau đó bổ sung ít nhất một dung môi được chọn từ dung môi rượu chứa nước và dung môi keton chứa nước vào nguyên liệu đã được nghiền, từ đó chiết scirpusin B hòa vào dung môi.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa scirpusin B, cụ thể là chế phẩm chứa scirpusin B thu được từ hạt quả chanh leo, và phương pháp sản xuất chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chanh leo là thực vật thuộc chi Lạc tiên (*Passiflora*), họ Lạc tiên (*Passifloraceae*), còn được gọi là Lạc tiên trứng (phiên âm theo tiếng Nhật là *Kudamono tokeisou*). Quả chanh leo có vị ngọt và chua, là trái cây ăn được, ép nước để uống, hoặc được bổ sung vào thực phẩm hoặc đồ uống như thạch hoặc bánh ngọt để làm tăng hương vị. Hạt quả chanh leo cứng và được loại bỏ khỏi quả khi ép quả. Thậm chí nếu ăn hoặc uống cả quả lẫn hạt thì do hạt có vỏ bao cứng và khó bị tiêu hóa, nên hạt cũng được bài tiết nguyên vẹn ra khỏi cơ thể.

Thông thường, hạt quả chanh leo được loại bỏ mà không sử dụng. Tuy nhiên, người nộp đơn sáng chế đã báo cáo rằng dịch chiết từ hạt quả chanh leo có thể được sử dụng hiệu quả làm thành phần hoạt tính để ức chế sản sinh melanin hoặc làm thành phần hoạt tính để tăng cường sản sinh collagen (Tài liệu viện dẫn sáng chế 1 và 2). Người nộp đơn sáng chế cũng báo cáo rằng thành phần hoạt tính được đề cập là pixeatanol, pixeatanol là hợp chất polyphenol (Tài liệu viện dẫn sáng chế 3)

Liên quan đến scirpusin B, là một chất nhị trùng (dime) của pixeatanol, đã có báo cáo rằng chất này có hoạt tính kháng HIV (Tài liệu viện dẫn sáng chế 1), có hoạt tính loại bỏ anion supeoxit (Tài liệu viện dẫn sáng chế 2), có hoạt tính ức chế

hoạt động α -amilaza (Tài liệu viện dẫn phi sáng chế 3) và có hoạt tính ức chế xantin oxidaza (Tài liệu viện dẫn phi sáng chế 4)

Tài liệu viện dẫn sáng chế

Tài liệu viện dẫn sáng chế 1: Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2009-102298

Tài liệu viện dẫn sáng chế 2: Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2009-102299

Tài liệu viện dẫn sáng chế 3: Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2010-30911

Tài liệu viện dẫn phi sáng chế

Tài liệu viện dẫn phi sáng chế 1: Guo-xun Yang, Jin-tao Zhou, Ya-zun Li và Chang-qi Hu "Anti-HIV Bioactive stilbene dimers of *Caragana rosea*" Planta. Med. 71 (2005), trang 569-571.

Tài liệu viện dẫn phi sáng chế 2: Ting Xiang, Toshio Uno, Fumino Ogino, Cuoqian Ai, Jie Duo và Ushio Sankawa "Antioxidant constituents of *Caragana tibetica*" Chem. Pharm. Bull. 53 (9) (2005), trang 1204-1206.

Tài liệu viện dẫn phi sáng chế 3: Kyoko Kobayashi, Tamaki Ishihara, Eriko Khono, Toshio Miyase và Fumihiko Yoshizaki "Constituents of stem bark of *Callistemon rigidus* showing inhibitory effects on mouse α -amylase activity" Bioi. Pharm. Bull, 29 (6), (2006) trang 1275-1277.

Tài liệu viện dẫn phi sáng chế 4: G. Schmeda-Hirschmann, M. I. Gutierrez, J. I. Loyola và J. Zuniga "Biological activity and xanthine oxidase inhibitors from *Scirpus californicus* (C. A. Mey.) Steud" Phytotherapy Research, 10, (1996) trang 683-685.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Từ quan điểm chung về an toàn thực phẩm, scirpusin B được bổ sung vào thực phẩm hoặc đồ uống như thực phẩm chức năng hoặc thực phẩm bổ dưỡng ưu tiên là thu được từ sản phẩm tự nhiên. Tuy nhiên, các sản phẩm tự nhiên chứa scirpusin B đã biết thông thường có hàm lượng scirpusin B thấp, và cũng chỉ có thể thu được chế phẩm chứa scirpusin B có hàm lượng scirpusin B rất thấp.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm chứa scirpusin B thu được từ sản phẩm tự nhiên và chứa hàm lượng scirpusin B cao và phương pháp sản xuất chế phẩm này.

Kết quả của nghiên cứu chuyên sâu nhằm đạt được mục đích nêu trên, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng hạt quả chanh leo, vốn thường bị loại bỏ không sử dụng, có chứa hàm lượng scirpusin B phong phú, và đã hoàn thành sáng chế.

Cụ thể là, chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế khác biệt ở chỗ chế phẩm này được thu từ hạt quả chanh leo và có chứa scirpusin B.

Theo chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế, có thể đề xuất chế phẩm chứa scirpusin B với hàm lượng cao và thu được từ sản phẩm tự nhiên. Do chế phẩm này thu được từ sản phẩm tự nhiên, chế phẩm này thích hợp để bổ sung vào mỹ phẩm, dược phẩm, thực phẩm và đồ uống như thực phẩm chức năng hoặc thực phẩm bổ dưỡng.

Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế bao gồm các bước: bổ sung ít nhất một dung môi được chọn từ dung môi rượu chứa nước và dung môi keton chứa nước vào hạt quả chanh leo; và chiết scirpusin B vào trong dung môi.

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế, do có ít nhất một dung môi được chọn từ dung môi rượu chứa nước và dung môi keton chứa nước được bổ sung vào hạt quả chanh leo, và chiết scirpusin B vào trong dung môi, nên có thể sản xuất chế phẩm chứa hàm lượng scirpusin B cao, thu được từ sản phẩm tự nhiên, với hiệu suất cao.

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế, tốt hơn là, hạt quả chanh leo là hạt quả chanh leo chưa tinh chế hoặc hạt thu được bằng cách sấy khô hạt quả chanh leo chưa tinh chế.

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B, dung môi rượu chứa nước ưu tiên là dung dịch etanol chứa nước, hoặc dung dịch 1,3-butylen glycol chứa nước, hoặc dung môi keton chứa nước ưu tiên là dung dịch axeton chứa nước. Theo cách này, hiệu suất chiết scirpusin B được cải thiện hơn nữa.

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế, sau khi chiết, dung môi có thể được loại bỏ, hoặc được cô đặc thêm, phun sấy khô, sấy đông khô, lọc hoặc được xử lý bằng phương pháp khác.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thực phẩm hoặc đồ uống được bổ sung scirpusin B thu được từ hạt quả chanh leo.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất mỹ phẩm được bổ sung scirpusin B thu được từ hạt quả chanh leo.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Theo chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế, có thể đề xuất chế phẩm chứa hàm lượng scirpusin B cao và thu được từ sản phẩm tự nhiên. Do chế phẩm này có

nguồn gốc từ sản phẩm tự nhiên, chế phẩm này thích hợp để bổ sung vào mỹ phẩm, dược phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống như thực phẩm chức năng hoặc thực phẩm bổ dưỡng. Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế, do có ít nhất một dung môi được chọn từ dung môi rượu chứa nước và dung môi keton chứa nước được bổ sung vào hạt quả chanh leo, và scirpusin B được chiết vào trong dung môi, nên có thể sản xuất chế phẩm chứa hàm lượng scirpusin B cao, thu được từ sản phẩm tự nhiên, với hiệu suất cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sắc ký đồ phân tích định lượng bằng HPLC của scirpusin B từ hạt quả chanh leo.

Fig.2 thể hiện quang phổ khối của scirpusin B từ hạt quả chanh leo.

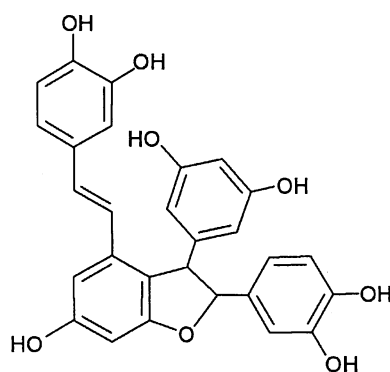
Fig.3 là sắc ký đồ HPLC của phân đoạn của dịch chiết từ hạt quả chanh leo.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế thu được từ hạt quả chanh leo và chứa scirpusin B. Chế phẩm chứa scirpusin B này có thể ở dạng lỏng, rắn, bán rắn, hoặc dạng gel và hàm lượng scirpusin B có trong chế phẩm chứa scirpusin B tốt hơn là nằm trong khoảng, ví dụ, từ 1×10^{-6} đến 99,9% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng, ví dụ, từ 1×10^{-4} đến 20% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng, ví dụ, từ 1×10^{-3} đến 5% khối lượng. Hàm lượng scirpusin B tính theo hàm lượng chất rắn tốt hơn là nằm trong khoảng, ví dụ, từ 0,01 đến 99,9% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng, ví dụ, từ 0,05 đến 30%, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng, ví dụ, từ 0,1 đến 20% khối lượng.

Scirpusin B có công thức hóa học (1) như sau:

Công thức hóa học 1



(1)

Chanh leo là thực vật thuộc chi Lạc tiên (*Passiflora*), họ Lạc tiên (*Passifloraceae*), còn được gọi là Lạc tiên trứng (phiên âm theo tiếng Nhật là *Kudamono tokeisou*). Quả chanh leo có vị ngọt và chua, là trái cây ăn được, ép nước để uống, hoặc được bổ sung vào thực phẩm hoặc đồ uống như thạch hoặc bánh ngọt để làm tăng hương vị. Hạt quả chanh leo cứng và được loại bỏ khỏi quả khi ép quả. Thậm chí nếu ăn hoặc uống cả quả lẫn hạt thì do hạt có vỏ bao cứng và khó bị tiêu hóa, nên hạt cũng được bài tiết nguyên vẹn ra khỏi cơ thể. Sáng chế dựa trên việc phát hiện ra rằng hạt quả chanh leo, vốn thường bị loại bỏ mà không sử dụng, có chứa scirpusin B. Hạt quả chanh leo được sử dụng trong sáng chế không gây ra các vấn đề về an toàn khi được bổ sung vào thực phẩm hoặc đồ uống như thực phẩm chức năng hoặc thực phẩm bổ dưỡng, do dựa trên kinh nghiệm thông thường sử dụng quả chanh leo.

Chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế tốt hơn là thu được bằng phương pháp trong đó, ví dụ, hạt quả chanh leo chưa tinh chế hoặc đã được sấy khô được sử dụng trực tiếp hoặc được nghiền, và tiến hành chiết bằng cách sử dụng nhiều dung môi. Để tăng hiệu suất chiết, hạt quả chanh leo có thể được đưa vào xử lý hóa học như phân

hủy bằng axit hoặc kiềm hoặc phân hủy bằng enzym trước khi chiết. Ngoài ra, theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế như được mô tả chi tiết dưới đây, có thể thu được chế phẩm chứa hàm lượng scirpusin B cao với hiệu suất đặc biệt lớn, và do đó chế phẩm tốt nhất là thu được bằng cách sử dụng phương pháp tương ứng này.

Dưới đây là phần mô tả phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế.

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế có thể sử dụng hạt quả chanh leo chưa tinh chế hoặc đã được sấy khô. Để tăng hiệu suất chiết, hạt quả chanh leo có thể được nghiền, ép dầu hoặc xử lý hóa học như phân hủy bằng axit hoặc kiềm hoặc phân hủy bằng enzym trước khi chiết. Quá trình nghiền có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị nghiền đã biết. Hạt quả chanh leo có hàm lượng dầu cao, và do đó có thể trở thành hỗn hợp bột nhão sau khi nghiền.

Tiếp theo, bổ sung ít nhất một loại dung môi được chọn từ dung môi rượu chứa nước và dung môi keton chứa nước vào hạt chanh leo, và scirpusin B được chiết vào trong dung môi. Tốt hơn là, quá trình chiết được thực hiện trong khi, ví dụ, khuấy, lắc hoặc gia nhiệt đến hồi lưu.

Dung môi chứa nước với dung môi chẳng hạn như etanol, metanol, propanol, và 1,3-butylen glycol có thể được sử dụng làm dung môi rượu chứa nước; dung dịch etanol chứa nước và dung dịch 1,3-butylen glycol chứa nước được đặc biệt ưu tiên. Dung môi chứa nước với dung môi chẳng hạn như axeton, metyl etyl keton, dietyl keton, và cloaxeton có thể được sử dụng làm dung môi keton chứa nước; dung dịch axeton chứa nước được đặc biệt ưu tiên.

Liên quan đến hàm lượng nước, dung dịch etanol chứa nước chứa hàm lượng etanol tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20 đến 99,9% thể tích, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 40 đến 99,9% thể tích, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 60 đến 80% thể tích. Dung dịch 1,3-butylen glycol chứa nước chứa hàm lượng 1,3-butylen glycol tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 90% thể tích, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 20 đến 60% thể tích, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 30 đến 50% thể tích. Dung dịch axeton chứa nước chứa hàm lượng axeton tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20 đến 99,9% thể tích, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 40 đến 99,9% thể tích, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 60 đến 80% thể tích. Không mong muốn hàm lượng nước nằm ngoài các khoảng giá trị nêu trên vì quá trình chiết scirpusin B sẽ có hiệu suất kém. Để đơn giản hóa cách thể hiện hàm lượng nước của dung môi chứa nước, ví dụ, dung dịch etanol 80% thể tích, dung dịch này chứa 20% thể tích nước sẽ được gọi là “dung dịch etanol chứa nước 80%.” Tương tự, ví dụ, dung dịch etanol 70% thể tích, dung dịch này chứa 30% thể tích nước sẽ được gọi là “dung dịch etanol chứa nước 70%”. Tương tự, ví dụ, dung dịch 1,3-butylen glycol 30% thể tích, dung dịch này chứa 70% thể tích nước sẽ được gọi là “dung dịch BG chứa nước 70%.”. Tương tự, ví dụ, dung dịch axeton 70% thể tích, dung dịch này chứa 30% thể tích nước sẽ được gọi là “dung dịch axeton chứa nước 70%.”

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế, quá trình chiết có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị lắc đã biết. Tốt hơn là, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15 đến 40⁰C và thời gian lắc nằm trong khoảng từ 0,5 đến 3 giờ. Quá trình chiết này có thể được thực hiện bằng cách lắc đi kèm với rung siêu âm. Theo cách này, hạt chanh leo mà đã được nghiền và đưa vào tiếp xúc với dung môi được

rung một cách hiệu quả, có thể làm tăng hiệu suất chiết scirpusin B vào trong dung môi từ hạt quả chanh leo. Có thể áp dụng lắc đi kèm với rung siêu âm, ví dụ, thiết bị siêu âm đã biết.

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế, quá trình chiết có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã biết để gia nhiệt đến hồi lưu sử dụng dung môi rượu chứa nước hoặc dung môi keton chứa nước nêu trên. Tốt hơn là, nhiệt độ gia nhiệt nằm trong khoảng từ 60 đến 95°C và thời gian hồi lưu nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ.

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế, dung môi có thể được chưng cất để loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm sau khi chiết. Bằng cách đó có thể thu được chế phẩm không chứa dung môi hữu cơ, và có thể tạo ra chế phẩm tuân thủ các tiêu chuẩn về an toàn thỏa đáng và các tiêu chuẩn tương tự làm thành phần thực phẩm được bổ sung vào thực phẩm hoặc đồ uống như thực phẩm chức năng hoặc thực phẩm bổ dưỡng.

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo sáng chế, quá trình chiết có thể được thực hiện theo nhiều giai đoạn nhờ sử dụng nhiều dung môi. Do đó, có thể sản xuất chế phẩm chứa hàm lượng scirpusin B cao với hiệu suất cao hơn.

Cụ thể là, ví dụ, nghiền hạt quả chanh leo. Sau đó, bổ sung hoặc dung môi rượu chứa nước hoặc dung môi keton chứa nước nêu trên, thực hiện lắc, gia nhiệt đến hồi lưu hoặc quy trình tương tự; và scirpusin B được chiết vào trong dung môi và thu được dịch chiết thứ nhất. Hỗn hợp thu được được tách bằng ly tâm hoặc biện pháp khác thành dịch chiết và phần cặn không được thu hồi làm dịch chiết. Dung môi còn lại trong số hai dung môi nêu trên mà không được lựa chọn trước đó được bổ sung vào

phần cặn này, thực hiện lắng, gia nhiệt đến hồi lưu hoặc quy trình tương tự; và scirpusin B được chiết vào trong dung môi, và thu được dịch chiết thứ hai. Sau đó, trộn dịch chiết thứ nhất với dịch chiết thứ hai. Hiển nhiên là, dịch chiết thứ hai có thể được sử dụng riêng làm dịch chiết hạt quả chanh leo.

Do việc thực hiện quá trình chiết theo nhiều giai đoạn sử dụng nhiều dung môi, và đưa hạt quả chanh leo vào quá trình chiết thứ nhất sử dụng dung môi rượu chứa nước hoặc dung môi keton chứa nước, có thể làm cho đặc tính vật lý và các đặc tính khác của hạt quả chanh leo thay đổi theo cách mà thích hợp cho quá trình chiết nên có thể mong muốn là hiệu suất chiết trong quá trình chiết xuất thứ hai tiếp theo được cải thiện, không chỉ trong trường hợp sử dụng dung môi rượu chứa nước hoặc dung môi keton chứa nước nêu trên, mà còn trong trường hợp sử dụng dung môi khác.

Hàm lượng scirpusin B chứa trong dịch chiết từ hạt quả chanh leo thu được từ phương pháp nêu trên tốt hơn là nằm trong khoảng, ví dụ, từ 1×10^{-6} đến 99,9% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1×10^{-4} đến 20% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1×10^{-3} đến 5% khối lượng. Hàm lượng scirpusin B được chứa tính theo hàm lượng chất rắn tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 99,9% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 30%, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20% khối lượng. Chế phẩm chứa scirpusin B có thể ở dạng lỏng thu được bằng cách sử dụng trực tiếp dịch chiết hoặc cô đặc dịch chiết. Chế phẩm chứa scirpusin B có thể ở dạng bột thu được bằng cách sấy đông khô hoặc sấy phun. Chế phẩm chứa scirpusin B không chỉ giới hạn ở các dạng này. Các chất không hòa tan có trong dịch chiết có thể được loại bỏ một cách thích hợp, ví dụ, bằng cách lọc. Các chất không hòa tan này có thể được nghiền thêm thành các hạt mịn.

Dịch chiết đầu tiên từ hạt quả chanh leo thu được như nêu trên có thể được cất phân đoạn và tinh chế, bằng cách sử dụng scirpusin B làm chất chỉ thị, bằng phương pháp, ví dụ, phương pháp trao đổi ion, sắc ký rây phân tử trên cột, HPLC, lọc gel, tách dùng màng, và sản phẩm có thể được sử dụng làm chế phẩm chứa scirpusin B.

Cụ thể là, khi scirpusin B từ hạt quả chanh leo được đưa vào HPLC phân tích trong các điều kiện dưới đây, scirpusin B được rửa giải trong vùng lân cận 12,54 phút (xem Fig.1: hợp chất được rửa giải trong vùng lân cận 8,9 phút trên Fig.1 là piceatanol). Thực hiện đo khối phổ lượng bằng cách sử dụng thiết bị đo khối phổ, thu được tín hiệu của dạng ion âm được thể hiện ở tỷ số m/z là 485 (xem Fig.2).

Các điều kiện HPLC

Cột: ODS-3, đường kính: 4,6mm, chiều dài: 150mm (hãng GL Sciences)

Nhiệt độ cột: 45°C

Các điều kiện rửa giải: tốc độ dòng: 0,75mL/phút, 15% axetonitril (0 phút) → 40% axetonitril (20 phút) → 45% axetonitril (25 phút)

Phát hiện bằng UV: 280nm

Do đó, theo sáng chế, có thể thực hiện cất phân đoạn và tinh chế thích hợp đồng thời xác nhận sự có mặt của scirpusin B từ hạt chanh leo bằng cách sử dụng các phương pháp phân tích đã nêu ở trên làm ví dụ và điều chế chế phẩm chứa scirpusin B từ hạt chanh leo có hàm lượng scirpusin B cao.

Scirpusin B thu được từ hạt chanh leo có thể được bổ sung vào đó chất nền hoặc chất mang được dùng để làm thành dạng viên nén, thuốc hạt, thuốc bột, dung dịch thuốc, bột thuốc, hạt thuốc, viên nang, thạch, v.v., và có thể được sử dụng làm

được phẩm, hoặc được làm thành dạng thuốc mỡ, kem, gel, mặt nạ đắp mặt, thuốc sức bôi ngoài da, mỹ phẩm, v.v., và được sử dụng làm mỹ phẩm.

Cũng có thể bổ sung scirpusin B thu được từ hạt chanh leo vào thực phẩm để nâng cao sức khỏe, bổ sung dinh dưỡng, hoặc vào thực phẩm chức năng, v.v. và sử dụng. Ví dụ về các thực phẩm này bao gồm: bánh kẹo ngọt như sôcôla, bánh quy, kẹo cao su, kẹo, bánh quy, kẹo gôm, và bánh kẹo dạng thỏi; ngũ cốc; đồ uống như bột để pha thành đồ uống, đồ uống không cồn, đồ uống sữa, đồ uống dinh dưỡng, đồ uống có ga, và đồ uống có thạch; và đồ tráng miệng lạnh như kem hoặc kem trái cây. Các ví dụ được ưu tiên khác bao gồm mì sợi như mì sợi mỏng được làm từ bột kiều mạch (soba), mì ống (mỳ Ý), mì sợi được làm từ lúa mì (udon và somen). Các dạng thực phẩm để tăng cường sức khỏe và bổ sung dinh dưỡng có thể ở dạng bột, dạng hạt, viên nang, xi-rô, viên nén, hoặc viên nén bao đường.

Trong trường hợp bổ sung scirpusin B thu được từ hạt chanh leo vào thực phẩm hoặc đồ uống hoặc mỹ phẩm và sử dụng, hàm lượng scirpusin B có trong thực phẩm hoặc đồ uống hoặc mỹ phẩm tốt hơn là nằm trong khoảng từ, ví dụ, 1×10^{-6} % đến 50% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng, ví dụ, 1×10^{-4} % đến 20% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ, ví dụ, 1×10^{-3} % đến 5% khối lượng. Hàm lượng scirpusin B được chứa tính theo hàm lượng chất rắn tốt hơn là nằm trong khoảng từ, ví dụ, 0,01 đến 80% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ, ví dụ, 0,05 đến 30% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ, ví dụ, 0,1 đến 20% khối lượng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế được mô tả cụ thể bằng các ví dụ, tuy nhiên các ví dụ này không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1- Thu hồi, tinh chế và xác định scirpusin B từ quả chanh leo

Bổ sung 200ml dung dịch axeton 80% vào 60g chất đã được nghiền (đi qua sàng mắt lưới 30 đến 60) thu được bằng cách sấy đông khô và nghiền hạt chanh leo, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng; và thu được dịch chiết dạng lỏng của hạt. Cắt phân đoạn dịch lỏng này bằng phương pháp HPLC sử dụng cột ODS. Các điều kiện phân đoạn theo phương pháp HPLC như sau:

- Cột: ODS-3, đường kính 20 mm, chiều dài 150 mm (hãng GL Sciences)
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ trong phòng
- Các điều kiện rửa giải: tốc độ dòng 5ml/phút, 10% axetonitril (0 phút) → 50% axetonitril (70 phút) → 80% axetonitril (75 phút) → 80% axetonitril (90 phút)
- Phát hiện bằng UV: 280 nm

Fig.3 thể hiện sắc ký đồ HPLC tương ứng. Kết quả là, quan sát thấy đỉnh lớn nhất trong vùng lân cận ở thời gian lưu là 51 phút, và quan sát thấy đỉnh thứ hai trong vùng lân cận ở thời gian lưu là 57 phút.

Đặc tính của chất trong thành phần được rửa giải trong vùng lân cận ở thời gian lưu là 57 phút được xác định như sau:

Đầu tiên, phân đoạn mà được rửa giải trong vùng lân cận ở thời gian lưu là 57 phút được phân tách, sau đó tinh chế đến độ tinh khiết khoảng 97% bằng cách sử dụng thêm phương pháp HPLC. Đưa phần thu được vào HPLC/đo khối phổ (thiết bị Agilent

1100 LC/MC System; do hãng Agilent Technologies sản xuất) và phân tích NMR. Kết quả như sau

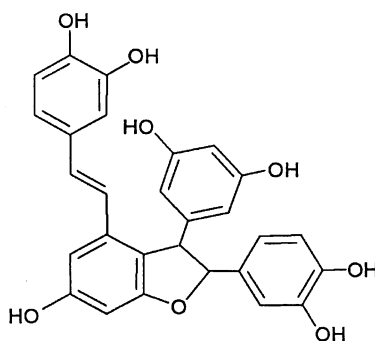
ESI:m/z485(M⁺);

¹H NMR(CD₃OD, 500MHz): δ4,38 (1H,d, J=6,0Hz), δ5,32 ((1H,d, J=6,0Hz), δ6,19 (2H,d, J=2,2Hz), δ6,21 (1H, t, J=2,0Hz), δ6,30 (1H, d, J=6,0Hz), 6,58 (1H, d, J=16,1Hz), 6,62 (1H, dd, J=2,2, 8,5Hz) 6,66 (1H, d, J=1,9Hz), δ6,68 (1H, d, J=7,8Hz), 6,74 (1H,d, J=2,2Hz) 6,78 (1H, d, J=8,2Hz), 6,81 (1H, d, J=16,4Hz), δ6,80 (1H, d, J=1,9Hz);

¹³C NMR: (CD₃OD, 125MHz): δ: 58,1, 94,8, 96,8, 102,2, 104,4, 107,3x2, 113,6, 114,0, 116,2x2, 116,3, 118,4, 119,8, 120,0, 123,6,δ: 130,9, 131,0, 134,9, 137,0, 146,3, 146,4, 146,5, 146,6, 147,6, 159,8x3, 162,7.

Kết quả phân tích NMR ở trên cho thấy rằng chất này là scirpusin B được biểu diễn bằng công thức hóa học (1) dưới đây.

Công thức hóa học 2



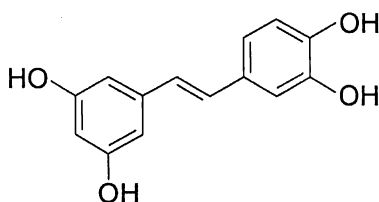
(1)

Số đo góc quay quang học (bằng máy đo phân cực JASCO P-2200) của thành phần được rửa giải trong vùng lân cận của thời gian 57 phút là $[\alpha]_D^{23}$: 0,0°, và trong kết quả của phổ hấp thụ hồng ngoại thu được bằng cách sử dụng thiết bị đo phổ hồng

ngoại JASCO FT/IR-6200 Fourier-Transform Infrared Spectrometer, đỉnh hấp thụ hiển thị tại 1605cm^{-1} , 1520cm^{-1} , 1445cm^{-1} , 1339cm^{-1} , 1282cm^{-1} , 1197cm^{-1} , 1156cm^{-1} , 1116cm^{-1} , và 1002cm^{-1} . Các kết quả này không mâu thuẫn với các kết quả xác định nêu trên. Các kết quả phân tích NMR, góc quay quang học, phổ hấp thụ hồng ngoại, vv. của scirpusin B cũng được nêu trong tài liệu của Kyoko Kobayashi và các đồng tác giả,; Biol. Pharm. Bull. 29 (6), (2006), trang 1275-1277.

Thành phần được rửa giải trong vùng lân cận của thời gian lưu 51 phút được xác định riêng là pixeatanol có công thức cấu tạo (2) như sau:

Công thức hóa học 3



(2)

Theo như trên, thấy rằng đỉnh trong vùng lân cận của thời gian 57 phút thu được bằng phương pháp phân tích HPLC phần chiết hạt tương ứng với scirpusin B, và hạt chanh leo này có chứa lượng lớn scirpusin B. Không phát hiện thấy scirpusin B trong vỏ hoặc phần thịt của chanh leo.

Ví dụ 2- Chiết xuất scirpusin B từ hạt quả chanh leo

Thẩm định phương pháp chiết xuất scirpusin B từ hạt quả chanh leo. Cụ thể là, thẩm định hiệu suất chiết scirpusin B bằng các phương pháp chiết như được trình bày dưới đây.

(1) Chiết lặc bằng cách sử dụng dung dịch etanol chứa nước và dung dịch axeton chứa nước

Bổ sung 200mL dung dịch etanol chứa nước 80% vào 60g hạt đã nghiền và lắc ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút để thực hiện chiết, và lấy dịch nổi thu được. Lặp lại bước này hai lần. Sau đó, bổ sung 200mL dung dịch axeton chứa nước 80% vào phần cặn rắn thu được và lắc ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút để thực hiện chiết, và lấy dịch nổi thu được. Lặp lại bước này ba lần. Sau đó, cô đặc dịch chiết lỏng, dịch chiết lỏng này thu được bằng cách kết hợp các dịch nổi đã lấy, đưa đến thể tích không đổi là 200mL sử dụng dung dịch etanol chứa nước 80%, và đưa 10µl chất lỏng này vào phân tích bằng phương pháp HPLC. Tạo ra một đường cong hiệu chuẩn bằng cách sử dụng mẫu đã được tinh chế trước đến độ tinh khiết cao (97%), và định lượng hàm lượng scirpusin B có trong dịch chiết.

(2) Chiết bằng cách gia nhiệt đến hồi lưu sử dụng dung dịch etanol chứa nước

Bổ sung 3 lít dung dịch etanol chứa nước nồng độ 80%, 90%, hoặc 95% vào 300g hạt đã nghiền, và thực hiện chiết bằng cách gia nhiệt đến hồi lưu trong 90 phút ở nhiệt độ 92°C. Sau đó, cô đặc dịch chiết lỏng thu được, đưa đến thể tích không đổi là 200mL sử dụng dung dịch etanol chứa nước 80%, và đưa 10µl chất lỏng này vào phân tích bằng phương pháp HPLC. Sau đó, định lượng hàm lượng scirpusin B có trong dịch chiết lỏng bằng cách sử dụng đường cong hiệu chuẩn đã tạo ra trước đó.

3) Chiết bằng cách khuấy sử dụng 1,3-butylen glycol (dung dịch BG chứa nước)

Bổ sung khoảng 100ml dung dịch BG chứa nước nồng độ 20%, 40%, 50%, 60%, hoặc 80% vào 10g hạt đã được sấy khô bằng khí nóng hoặc được nghiền thêm, và thực

hiện chiết bằng cách gia nhiệt và khuấy trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 80°C. Đưa một phần của dịch chiết lỏng thu được vào phân tích bằng phương pháp HPLC, và định lượng hàm lượng scirpusin B có trong dịch chiết lỏng sử dụng đường cong hiệu chuẩn đã tạo ra trước đó.

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng 1 và bảng 2 dưới đây. Trong bảng 1, kết quả thử nghiệm được thể hiện được chuyển đổi thành (A) hàm lượng (mg) của scirpusin B chiết được từ 100g hạt sử dụng trong quá trình chiết, hoặc (B) hàm lượng scirpusin B (% khối lượng) có trong hàm lượng chất rắn trong dịch chiết lỏng.

Bảng 1

	Scirpusin B	
	[A] Hàm lượng [mg] chứa trong 100g hạt	[B] Hàm lượng [% khối lượng] chứa trong hàm lượng chất rắn trong dịch chiết lỏng
Chiết lắ	283	2,5
Dung dịch etanol chứa nước 80% hồi lưu	246	2,1
Dung dịch etanol chứa nước 90% hồi lưu	363	3,2
Dung dịch etanol chứa nước 95% hồi lưu	220	1,9

Như được thể hiện trong bảng 1, chiết được 220mg đến 363mg scirpusin B trên mỗi 100g hạt quả chanh leo. Hàm lượng chứa trong hàm lượng chất rắn của dịch chiết lỏng theo từng phương pháp chiết là 2,5% khối lượng theo phương pháp lắ chiết, 2,1% khối lượng theo phương pháp chiết bằng gia nhiệt đến hồi lưu sử dụng dung dịch etanol chứa nước 80%, 3,2% khối lượng theo phương pháp chiết bằng gia nhiệt đến hồi lưu sử dụng dung dịch etanol chứa nước 90%; và 1,9% khối lượng theo phương

pháp chiết bằng gia nhiệt đến hồi lưu sử dụng dung dịch etanol chứa nước 95%. Do đó, khi so sánh các phương pháp chiết, scirpusin B được chiết hiệu suất nhất bằng phương pháp gia nhiệt đến hồi lưu sử dụng dung dịch etanol chứa nước 90%. Khi hàm lượng scirpusin B trong hạt chanh leo được chuyển đổi từ giá trị tương ứng với hiệu suất chiết lớn nhất, phát hiện rằng hạt chanh leo chứa hàm lượng scirpusin lớn, ví dụ, ít nhất khoảng 0,36% khối lượng. Cũng phát hiện rằng scirpusin B có thể được chiết một cách hiệu quả.

Trong bảng 2, các kết quả thử nghiệm được thể hiện được chuyển đổi thành (A) hàm lượng (mg) của scirpusin B chiết được từ 100g hạt sử dụng trong quá trình chiết, hoặc (B) hàm lượng scirpusin B $\mu\text{g/ml}$ có trong dịch chiết lỏng.

Bảng 2

Nồng độ BG	Scirpusin B	
	[A] Hàm lượng (mg) chứa trong 100g hạt	[B] Hàm lượng ($\mu\text{g/ml}$) chứa trong dịch chiết lỏng
Dung dịch BG chứa nước 20%	185	223
Dung dịch BG chứa nước 40%	401	485
Dung dịch BG chứa nước 50%	92,6	61,7
Dung dịch BG chứa nước 60%	313	378
Dung dịch BG chứa nước 80%	260	314

* Trong trường hợp chỉ sử dụng dung dịch BG chứa nước 50%, các hạt không được nghiền.

Như được thể hiện trong bảng 2, chiết được 92,6mg đến 401mg scirpusin B trên mỗi 100g hạt quả chanh leo bằng phương pháp chiết theo cách khuấy sử dụng 1,3-butylen glycol (dung dịch BG chứa nước). Đối với kết quả thu được dùng dung dịch BG chứa nước 50%, thực hiện chiết từ nguyên hạt không bị nghiền. Mặc dù hiệu suất chiết giảm đi một phần, nhưng khẳng định được rằng có thể chiết mà không cần nghiền.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

bổ sung dung môi chiết vào hạt quả chanh leo;

chiết scirpusin B vào trong dung môi; và

cắt phân đoạn và/hoặc tinh chế scirpusin B chiết được để thu được chế phẩm chứa scirpusin B với hàm lượng scirpusin B tính theo hàm lượng chất rắn ít nhất là 0,1% khối lượng.

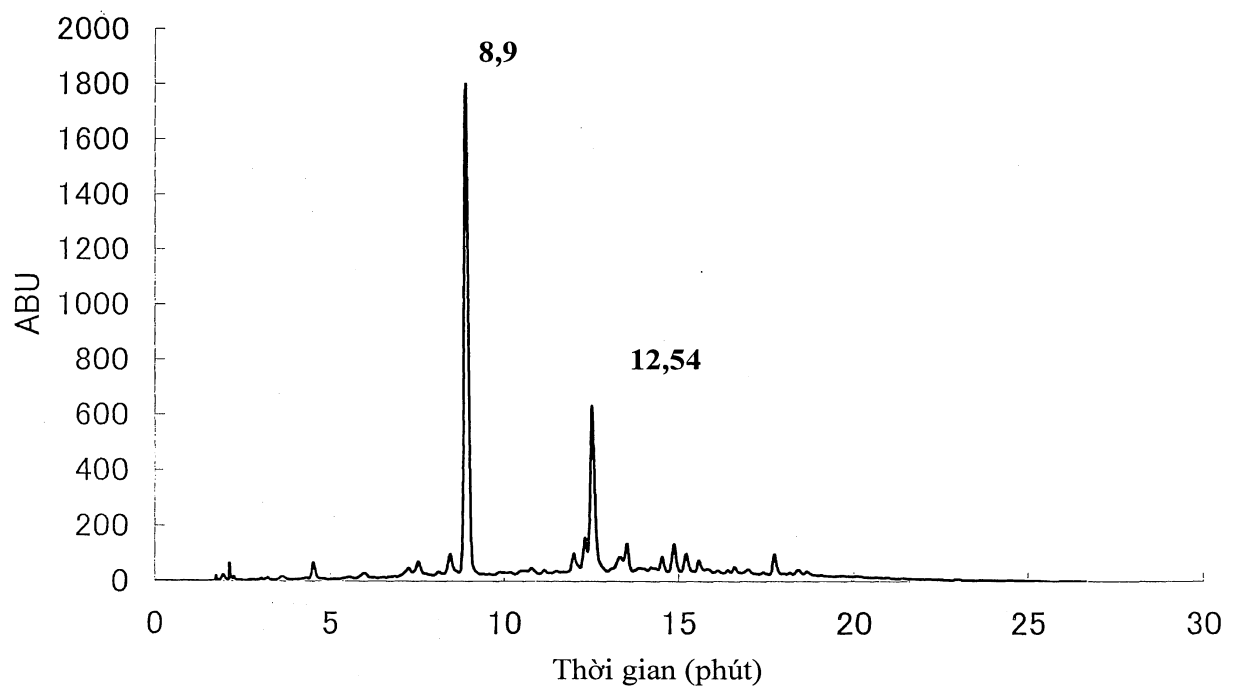
2. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo điểm 1, trong đó hạt quả chanh leo là hạt quả chanh leo chưa tinh chế hoặc hạt thu được bằng cách sấy khô hạt quả chanh leo chưa tinh chế.

3. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo điểm 1, trong đó dung môi là dung dịch etanol chứa nước, dung dịch 1,3-butylen glycol chứa nước hoặc dung dịch axeton chứa nước.

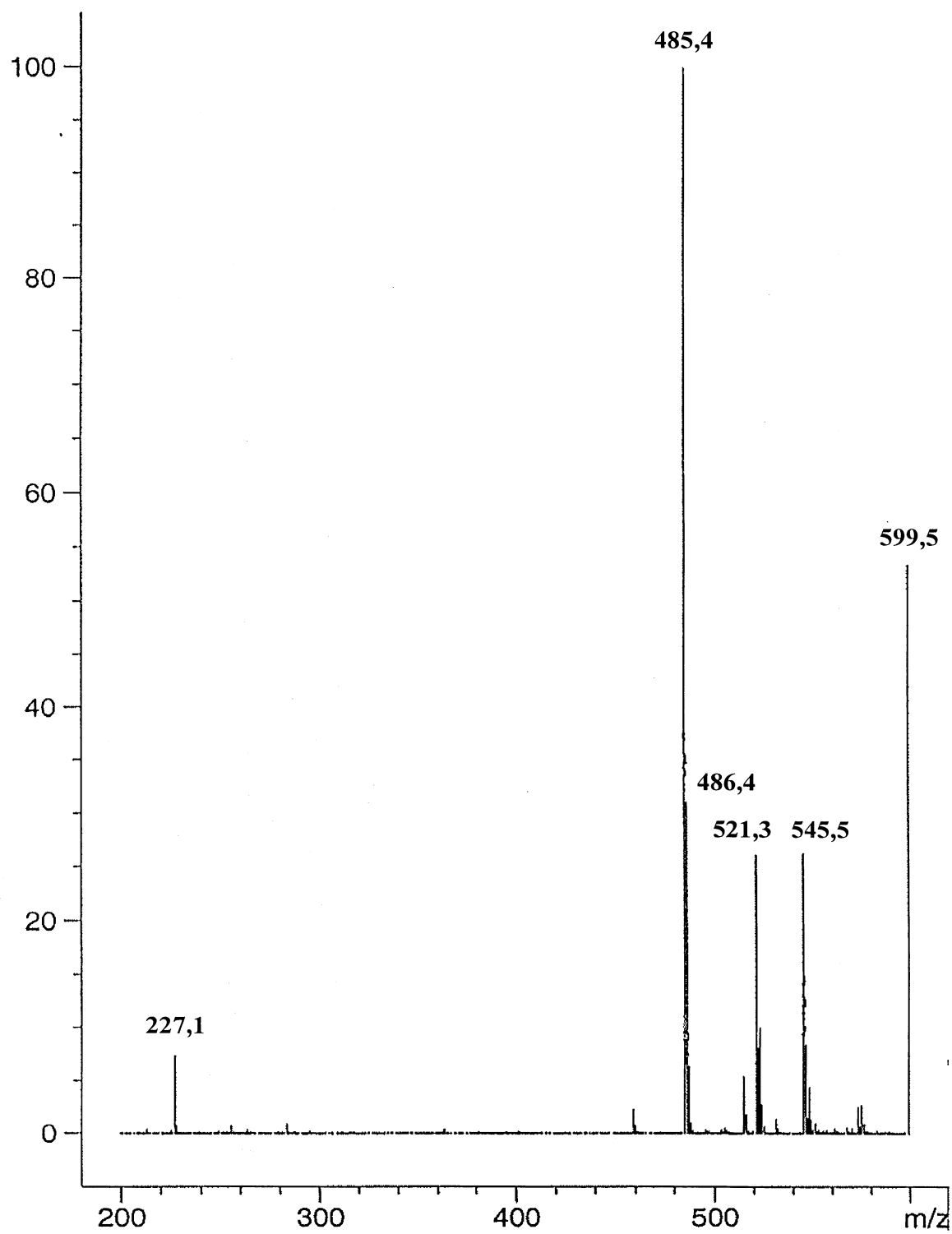
4. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo điểm 1, trong đó dung môi được chung cất để loại bỏ sau khi chiết.

5. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa scirpusin B theo điểm 1, trong đó bước cắt phân đoạn và/hoặc tinh chế bao gồm việc sử dụng scirpusin B làm chất chỉ thị, bằng phương pháp trao đổi ion, sắc ký rây phân tử trên cột (size exclusion column chromatography), HPLC, lọc gel hoặc tách bằng màng.

[Fig.1]



[Fig.2]



[Fig.3]

