



(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) 
2-0001785

(51)⁷ **A61K 31/35, 31/366, 31/497, C07D
493/08, 493/10**

(13) **Y**

(21) 2-2015-00012

(22) 14.01.2015

(45) 27.08.2018 365

(43) 25.03.2015 324

(73) **LÊ TUẤN ANH (VN)**

Số 3, ngách 1/5, ngõ 1, đường Âu Cơ, phường Quảng An, quận Tây Hồ, thành phố Hà Nội.

(72) Lê Tuấn Anh (VN), Trịnh Hồng Anh (VN), Cao Minh Hưng (VN), Hoàng Văn Hà (VN)

(54) **PHƯƠNG PHÁP CHIẾT HỢP CHẤT ENT-7BETA-HYDROXY
-15-OXOKAUR-16-EN-18-YL AXETAT TỪ LÁ CÂY KHỔ SÂM CHO LÁ
(CROTON TONKINENSIS GAGNEP) BẰNG CÁCH SỬ DỤNG NĂNG LƯỢNG
VI SÓNG**

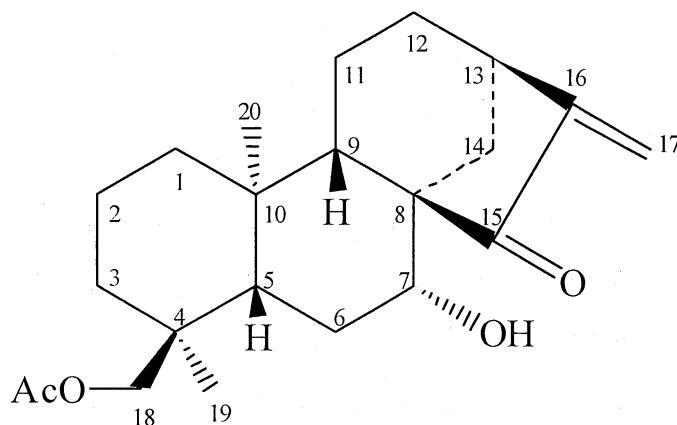
(57) Giải pháp hữu ích đề cập tới phương pháp chiết hợp chất ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat từ lá cây khổ sâm cho lá (Croton tonkinensis Gagnep) bằng cách sử dụng năng lượng vi sóng. Theo giải pháp hữu ích này, phương pháp chiết được tiến hành dưới tác dụng của năng lượng vi sóng tại nhiệt độ sôi của dung môi.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập tới phương pháp chiết hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* từ lá cây khỗ sâm cho lá bằng cách sử dụng năng lượng vi sóng. Giải pháp này góp phần tiết kiệm thời gian, tiết kiệm dung môi và nâng cao hiệu suất chiết xuất. Theo giải pháp hữu ích này, phương pháp chiết được tiến hành dưới tác dụng của năng lượng vi sóng tại nhiệt độ sôi của dung môi.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* (tạm gọi là hợp chất **CT-1**) là một *ent*-kauran diterpenoit chiết từ lá cây khỗ sâm cho lá. Hợp chất này có tác dụng kháng tế bào ung thư *in vitro* và *in vivo*, đã được sử dụng làm nguyên liệu sản xuất thực phẩm chức năng và dược phẩm (xem tài liệu, ví dụ, Phan Minh Giang., Phan T. S., Hamada Y., Otsuka H. (2005), “Cytotoxic Diterpenoids from Vietnamese Medicinal Plant *Croton tonkinensis* Gagnep.”, Chem. Pharm. Bull., 53 (3), pp. 296 – 300; Giang PM, Son PT, Lee JJ, Otsuka H(2004), “Four *ent*-kaurane-type diterpenoids from *Croton tonkinensis* Gagnep.”, Chem. Pharm. Bull., 52, pp. 879–882).



Công thức của *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* (**CT-1**)

Các phương pháp thường dùng để chiết hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* từ lá cây khỗ sâm cho lá là phương pháp chiết ngâm kiệt, chiết nóng với dung môi là metanol hoặc etanol.

Phương pháp ngâm kiệt được thực hiện bằng cách nghiền nhỏ lá khỗ sâm đã phơi khô, ngâm trong metanol. Sau 3 ngày, lọc lấy dịch chiết, phần bã tiếp tục ngâm lần thứ 2 trong metanol trong 3 ngày, lọc lấy dịch chiết và bỏ phần bã. Gộp dịch chiết của 2 lần chiết để phân lập hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* bằng sắc ký cột (xem tài liệu: Phan Minh Giang, Phan Tổng Sơn (2011), “Xác định hoạt chất *ent-kauranditerpenoid* trong cây Khỗ sâm cho lá (*Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao”, Tạp chí Dược học, 8, tr. 29-33). Nhược điểm của phương pháp này là tốn dung môi, tốn thời gian, hiệu suất chiết chưa cao, dung môi metanol rất độc.

Phương pháp chiết nóng trên máy cô quay được thực hiện bằng cách nghiền nhỏ lá khỗ sâm cho lá, chiết nóng trên máy cô quay bằng etanol, chiết 3 lần, mỗi lần trong 03 giờ. Gộp dịch chiết của 3 lần chiết, cô dung môi, phân lập hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* bằng sắc ký cột. Phương pháp này tiết kiệm thời gian và hiệu suất chiết cao hơn so với phương pháp chiết ngâm kiệt.

Phương pháp sử dụng vi sóng trong các quy trình chiết các hợp chất có trong tự nhiên đã được sử dụng (xem tài liệu: Delazar A, Nahar L, Hamedeyazdan S, Sarker SD. “Microwave-assisted extraction in natural products isolation”, Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology Volume 864, 2012, pp 89-115 và tài liệu: Cardoso-Ugarte GA, Juárez-Becerra GP, Sosa-Morales ME, López-Malo A, “Microwave-assisted extraction of essential oils from herbs”. J Microw Power Electromagn Energy. 2013;47(1):63-72). Phương pháp này là sử dụng năng lượng vi sóng tác dụng lên môi trường chứa các tiểu phân dược liệu và dung môi phân cực, các phân tử dung môi và các chất phân cực sẽ dao động và nóng lên nhanh chóng làm tăng khả năng hòa tan các chất vào dung môi. Thêm vào đó, vi sóng cũng làm phá hủy cấu trúc vách tế bào thực vật làm các chất tan giải phóng trực tiếp vào dung môi chiết làm cho quá trình chiết chuyển thành hòa tan đơn giản. Điều này làm cho quy trình diễn ra trong thời gian ngắn hơn, tiết kiệm dung môi và nâng cao hiệu suất so với các phương pháp chiết thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như được đề cập trên đây.

Cho đến nay chưa có tài liệu nào mô tả quy trình chiết xuất hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* từ lá cây khổ sâm cho lá bằng cách sử dụng năng lượng vi sóng. Các tác giả sáng chế đã tiến hành quy trình chiết hợp chất này bằng cách sử dụng năng lượng vi sóng để rút ngắn thời gian chiết, cải thiện hiệu suất và tiết kiệm dung môi, giảm chi phí sản xuất.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm tìm ra được phương pháp chiết hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* từ lá cây khổ sâm cho lá có hiệu suất cao, tiết kiệm thời gian và dung môi.

Vì vậy, theo một phương án, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp chiết hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* từ lá cây khổ sâm cho lá bằng cách sử dụng năng lượng vi sóng, phương pháp này có thể khắc phục được những hạn chế như tốn thời gian, tốn dung môi và hiệu suất chiết thấp.

Giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp chiết hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* từ lá cây khổ sâm cho lá bao gồm các công đoạn sau:

- a) thu gom lá cây khổ sâm cho lá đã phơi khô;
- b) nghiền nhỏ lá khổ sâm đạt kích thước khoảng 0,5cm;
- c) nạp lá khổ sâm đã nghiền nhỏ vào bình chiết, bổ sung EtOH 96° hoặc MeOH, đặt bình chiết vào trong thiết bị vi sóng có công suất 850W có gắn sinh hàn hồi lưu, cấp năng lượng vi sóng, tiến hành chiết ba lần với tổng thời gian cho mỗi lần chiết là từ 10 đến 20 phút; gom dịch chiết của ba lần chiết;
- d) cô dịch chiết và phân lập được hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* bằng sắc ký cột từ cặn chiết thu được, kết tinh lại để thu được sản phẩm tinh khiết.

Theo phương án của giải pháp hữu ích, thời gian chiết của quy trình chiết được rút ngắn xuống còn từ 10 đến 20 phút, trong khi hiệu suất sản phẩm thu được cao hơn so với các phương pháp chiết ngâm kiệt hoặc chiết nóng trên máy cô quay đã biết.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đưa ra quy trình chiết được mô tả chi tiết như sau:

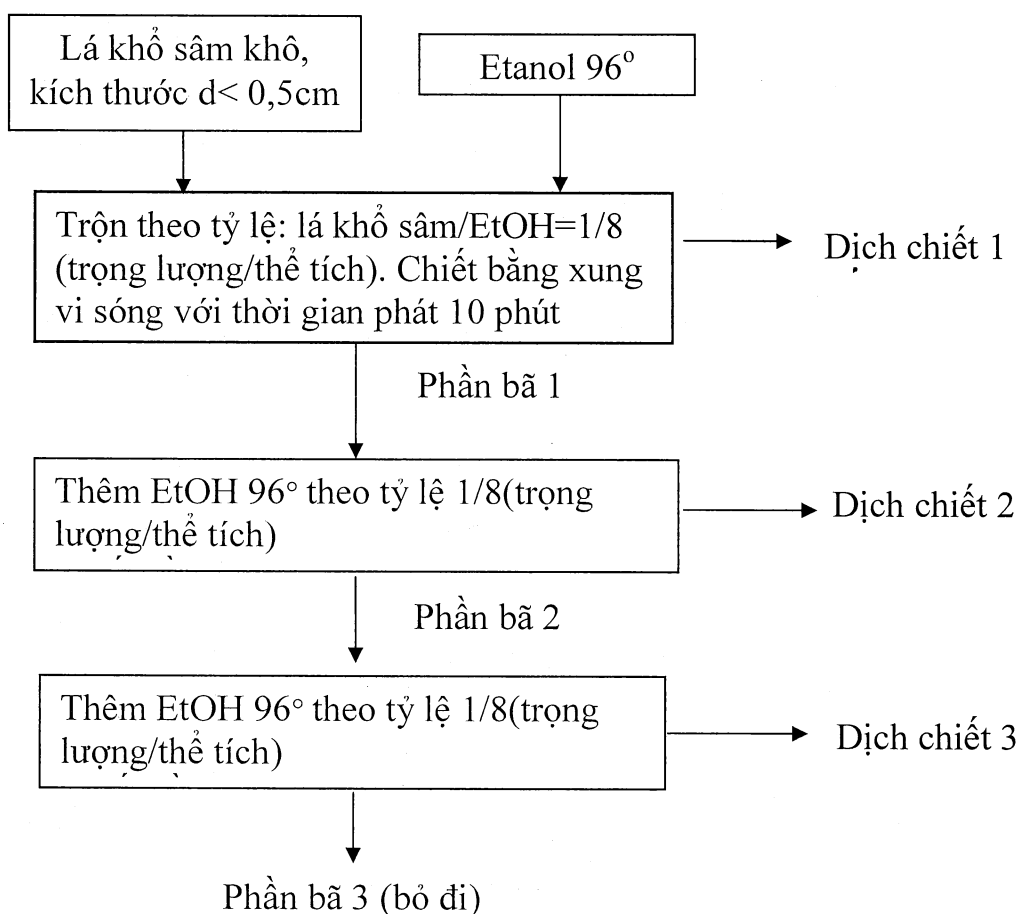
Lá khô sâm cho lá sau khi thu hoạch được phân loại và loại bỏ tạp, phơi khô, nghiền nhỏ lá khô sâm đến kích thước khoảng 0,5cm.

Cho bột lá khô sâm vào bình chiết, sau đó thêm dung môi chiết EtOH 96° hoặc MeOH, lắc đều, sau đó đặt bình chiết vào trong thiết bị tạo vi sóng có gắn sẵn sinh hàn hồi lưu.

Quá trình chiết được thực hiện bằng cách cấp năng lượng xung vi sóng có chế độ kiểm soát nhiệt độ bằng cảm biến với nhiệt độ tối đa là 70°C, mẫu bột lá khô sâm được chiết ba lần bằng dung môi chiết EtOH 96° hoặc MeOH nêu trên, mỗi lần chiết có tổng thời gian phát vi sóng là từ 10 đến 20 phút. Thu được ba dịch chiết.

Kết hợp ba dịch chiết của cả 3 lần chiết, định lượng *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* bằng HPLC. Dịch chiết thu gom được cô để loại dung môi, thu được cặn chiết.

Theo phương án của giải pháp hữu ích, dung môi chiết được sử dụng là EtOH hoặc MeOH.



Sơ đồ quá trình chiết bằng vi sóng

Phân lập, tinh chế *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* bằng sắc ký cột:

Phân chiết EtOH (hoặc MeOH) được hòa với nước cất, sau đó chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần, *n*-hexan, diclometan, etyl axetat cho các dịch chiết hữu cơ tương ứng. Các dịch chiết này được làm khan bằng Na₂SO₄ sau đó được cất loại kiệt dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết tương ứng *n*-hexan, diclometan, etyl axetat. Cặn chiết lá khô sâm cho lá thu được từ phân đoạn diclometan của dịch chiết EtOH (hoặc MeOH) được dùng để tiến hành phân lập.

Chuẩn bị cột sắc ký:

- Cột thủy tinh có khóa, đường kính 10 cm, chiều dài 90 cm, rửa sạch, sấy khô, cố định cột trên giá theo chiều thẳng đứng.
- Chất nhồi cột: Silicagel 60 (Merck) cỡ hạt 40-63 μ m. Nhồi cột theo phương pháp nhồi cột ướt.
- Dung môi rửa giải: *n*-Hexan – EtOAc (4:1) đẳng dòng.
- Nhồi cột: Cho một lượng *n*-hexan vừa đủ ngập bề mặt silicagel 4-5 cm, phân tán đều trong cốc có dung tích 1000 ml, khuấy đều, để yên và ngâm trong 24 giờ. Loại hết bọt khí rồi đổ thành dòng từ từ vào thành cột vừa đổ vừa gõ nhẹ. Rửa thành cột bằng *n*-hexan. Ổn định cột bằng cách mở khóa cột cho dung môi chảy qua cho đến khi lượng silicagel trên cột nén xuống ở mức không đổi. Cho lượng dịch chảy đến khi cách bề mặt silicagel khoảng 3 cm.

Tiến hành quy trình chiết

- Đưa cặn chiết lên cột: Cặn chiết được hòa tan trong lượng tối thiểu MeOH, bổ sung một ít silicagel 60 (Merck) đã hoạt hóa, trộn đều. Sấy ở 50⁰C cho bay hết MeOH, nếu thấy vón cục thì có thể dùng chày và cối sứ nghiền nhỏ để có được hạt silicagel đã tẩm chất là mịn nhất. Nhồi hạt silicagel đã tẩm cặn lên cột.

- Rửa giải: Triển khai dung môi qua cột với tốc độ 0,5 ml/phút. Lấy các phân đoạn vào bình nón sạch (đã tráng cồn để khô), mỗi phân đoạn 250 ml. Kiểm tra các bình hứng bằng sắc ký bản mỏng (TLC), những bình giống nhau được gộp lại, cất loại dung môi thu được 3 phân đoạn (F1, F2, F3), trong đó phân đoạn F2 có chất kết tinh. Phân đoạn F2 đem kết tinh lại nhiều lần trong hệ dung môi *n*-Hexan – EtOAc thu được chất kết tinh *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* có độ tinh khiết 96% (tính theo diện tích pic trên sắc ký đồ HPLC).

Hoạt chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* có thể được kết hợp với các tá dược và/hoặc chất phụ gia khác nhau để bào chế/sản xuất các sản phẩm bao gồm dược phẩm và thực phẩm chức năng, góp phần giải quyết việc làm và tăng thêm thu nhập cho người dân.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích được mô tả cụ thể hơn bằng các ví dụ minh họa được thể hiện dưới đây. Tuy nhiên, cần hiểu rằng giải pháp hữu ích này không chỉ giới hạn ở các ví dụ dưới đây.

Ví dụ 1: Quy trình chiết hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* từ lá cây khổ sâm cho lá bằng phương pháp của giải pháp hữu ích.

Lá khổ sâm cho lá được phơi khô, nghiền nhỏ đến kích thước khoảng 0,5cm. 50 g bột lá khổ sâm cho lá được cho vào bình chiết, thêm 400ml EtOH 96 độ. Đặt bình chiết vào thiết bị vi sóng công suất 850W, có gắn ống sinh hàn hồi lưu. Tiến hành chiếu vi sóng, thời gian chiếu vi sóng cho mỗi lần chiết là 10 phút. Sau lần chiết đầu tiên thu được dịch chiết 1. Tiến hành chiết thêm hai lần nữa, lần lượt thu dịch chiết 2 và dịch chiết 3, kết hợp ba dịch chiết. Dịch chiết kết hợp của 3 lần được cô, thu được cặn chiết. Tách sắc ký cột cặn chiết thu được bằng hệ dung môi *n*-Hexan – EtOAc, tỷ lệ: 3:1, thu được hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* kết tinh trong phân đoạn rửa giải. Sau đó kết tinh lại 03 lần trong dung môi diclometan thu được tinh thể **CT-1** (*ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat*) màu trắng, có độ tinh khiết 96% (theo dữ liệu HPLC).

Hàm lượng **CT-1** đạt 594,88 mg/l

Ví dụ 2: Quy trình chiết hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* từ lá cây khổ sâm cho lá bằng phương pháp chiết nóng trên máy cô quay.

Lá cây khổ sâm cho lá đã phơi khô được xay nhỏ với kích thước khoảng 0,5cm. Hòa 50g lá Khổ sâm đã được xay nhỏ vào 400ml EtOH 96°, đưa hỗn dịch vào máy quay thực hiện chiết nóng trong 3 giờ. Lọc lấy dịch chiết, phần bã còn lại tiếp tục hòa với 400ml EtOH 96°, thực hiện quy trình tương tự, lặp lại 2 lần. Gộp dịch chiết thu được từ 3 lần. Tách sắc ký cột cặn chiết thu được bằng hệ dung môi *n*-Hexan – EtOAc, tỷ lệ: 3:1, thu được hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* kết tinh trong phân đoạn rửa giải. Sau đó kết tinh lại 03 lần trong dung môi diclometan thu được tinh thể

CT1 - *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* màu trắng, có độ tinh khiết 96% (theo dữ liệu HPLC)

Hàm lượng **CT-1** đạt 510,08 mg/l

Như vậy, thời gian chiết bằng phương pháp sử dụng năng lượng vi sóng được rút ngắn 18 lần (*3 giờ xuống 10 phút*) so với phương pháp chiết nóng trên máy cô quay, và hàm lượng chất **CT-1** thu được tăng khoảng 16,6% (594,88 mg/l so với 510,08 mg/l).

Ví dụ 3: Quy trình chiết ngấm kiệt sử dụng dung môi MeOH

Cành nhỏ và lá cây Khổ sâm cho lá được ngâm chiết với metanol ở nhiệt độ phòng trong 03 ngày, sau đó lọc thu dịch lọc MeOH; quy trình này được lặp lại 3 lần. Gộp các dịch MeOH lại và cất loại kiệt MeOH dưới áp suất giảm cho một phần chiết MeOH (kí hiệu là **CT**). Để phân tách phần chiết MeOH thành các nhóm chất theo độ phân cực, phần chiết này được chiết hai pha lỏng lần lượt giữa nước với các dung môi có độ phân cực tăng dần *n*-hexan, điclorometan và etyl axetat để cho các dịch chiết hữu cơ tương ứng. Làm khô các dịch chiết này bằng Na₂SO₄ rồi cất loại kiệt dung môi dưới áp suất giảm để thu nhận các phần chiết hữu cơ. Quy trình này phân tách các hợp chất hữu cơ trong cành nhỏ và lá cây Khổ sâm cho lá thành 4 lớp: lớp các hợp chất tan trong *n*-hexan (**CTH**, hiệu suất chiết 1,25% so với lượng nguyên liệu khô), lớp các hợp chất tan trong điclorometan (**CTD**, 0,47%), lớp các hợp chất tan trong etyl axetat (**CTE**, 0,05%) và lớp các hợp chất phân cực tan trong nước (**CTN**, 0,63%). Sự phân tách này tạo điều kiện thuận lợi cho việc lựa chọn các phương pháp sắc ký khi phân tích định tính, định lượng và phân lập hợp chất **CT1** - *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat*. Hàm lượng chất **CT-1** trong cành nhỏ và lá cây Khổ sâm cho lá được xác định là 293,05 μ g/g (xem tài liệu: Phan Minh Giang, Phan Tổng Sơn (2011), “Xác định hoạt chất *ent-kauranditerpenoid* trong cây Khổ sâm cho lá (*Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae) bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao”, Tạp chí Dược học, 8, tr. 29-33). Để tiện so sánh, có thể quy đổi hàm lượng này tương đương khoảng 293,05 mg/l.

Như vậy, khi chiết bằng năng lượng vi sóng với dung môi etanol trong 10 phút thu được chất **CT-1** với lượng lớn hơn, bằng khoảng 200% lượng **CT-1** thu được khi chiết bằng phương pháp ngấm kiệt với dung môi metanol trong 3 ngày (594,88 mg/l so với 293,05 mg/l).

Lợi ích của giải pháp hữu ích

Sản phẩm *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* thu được theo phương pháp của giải pháp hữu ích có hiệu suất cao hơn so với các phương pháp chiết nóng bằng cách cô quay cũng như phương pháp chiết ngấm kiệt sử dụng dung môi MeOH, độ tinh khiết 96%. Chi phí đầu tư cho thiết bị vi sóng không cao, dẫn tới sản phẩm có giá thành chấp nhận được trên thị trường. Đồng thời, đây cũng là một giải pháp nhằm khuyến khích thay đổi cơ cấu cây trồng của người nông dân ở nước ta.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp chiết hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* từ lá cây khổ sâm cho lá (*Croton tonkinensis* Gagnep) bằng cách sử dụng vi sóng, bao gồm các bước sau:
 - a) thu gom lá cây khổ sâm cho lá đã phơi khô;
 - b) nghiền nhỏ lá khổ sâm đến kích thước khoảng 0,5cm;
 - c) nạp lá khổ sâm đã nghiền nhỏ vào bình chiết, bổ sung EtOH 96°, đặt bình chiết vào trong thiết bị vi sóng có công suất 850W có gắn sinh hàn, cấp năng lượng vi sóng, tiến hành chiết ba lần với tổng thời gian cho mỗi lần chiết là 10 phút; gom dịch chiết của ba lần chiết;
 - d) cô dịch chiết và phân lập được hợp chất *ent-7 β -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl axetat* bằng sắc ký cột từ cặn chiết thu được, kết tinh lại để thu được sản phẩm tinh khiết.
2. Phương pháp theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, trong bước c) dung môi sử dụng là MeOH thay cho EtOH.