



(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) 
2-0002006

(51)⁷ **C07H 15/00, A23L 1/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00382

(22) 12.01.2017

(67) 1-2017-00105

(45) 25.04.2019 373

(43) 27.03.2017 348

(73) 1. **HOÀNG THU HÀ (VN)**

Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội, Nhà G7, 144 Xuân Thủy, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

2. **PHAN MINH GIANG (VN)**

Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, 19 Lê Thánh Tông, thành phố Hà Nội

3. **VŨ MINH TRANG (VN)**

Trường đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội, Nhà G7, 144 Xuân Thủy, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Hoàng Thu Hà (VN), Phan Minh Giang (VN), Vũ Minh Trang (VN), Nguyễn Hoàng Tùng Lâm (VN), Đoàn Ngọc Hiếu (VN), Hồ Thảo Nguyên (VN)

(54) **QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT HOẠT CHẤT SINH HỌC AXIT KAURENOIC TỪ
VỎ QUẢ NA BẰNG PHƯƠNG PHÁP HÓA HỌC**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết hoạt chất sinh học axit kaurenoic từ vỏ quả na bằng phương pháp hóa học bao gồm các bước:

(i) xử lý nguyên liệu;

(ii) chiết axit kaurenoic trong vỏ quả na bằng diclometan để thu được dịch chiết cô đặc;

(iii) hòa tan dịch chiết cô đặc thu được nêu trên bằng lượng diclometan vừa đủ để thu được dung dịch chứa axit kaurenoic;

(iv) chiết lỏng-lỏng dung dịch chứa axit kaurenoic bằng bazơ để thu được pha nước chứa muối kaurenoat;

(v) axit hóa pha nước thu được để chuyển hóa muối kaurenoat thành axit kaurenoic;

(vi) chiết lỏng-lỏng bằng dung môi diclometan để thu được axit kaurenoic thô; và

(vii) kết tinh lại axit kaurenoic để thu được axit kaurenoic sạch.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết hoạt chất sinh học axit kaurenoic từ vỏ quả na bằng phương pháp hóa học.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Axit kaurenoic có cấu trúc hóa học thuộc nhóm các chất ent-kauran diterpenoit và có nhiều tác dụng sinh học như chống viêm, kháng khuẩn, chống tăng sinh và khối u. Hợp chất này do đó có giá trị được dùng làm các tác nhân được thiên nhiên trong điều trị các bệnh viêm, nhiễm khuẩn và ung thư. Trong công nghiệp, hợp chất này có thể làm các tiền chất để tổng hợp các hóa chất có giá trị được dùng và là nguyên liệu đầu cho sinh tổng hợp đường stevia dành cho bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường và phytohormon gibberellin dùng cho nông nghiệp xanh.

Axit kaurenoic chưa được thương mại hóa rộng rãi do thiếu các công nghệ chiết từ thực vật và chi phí của các quy trình tổng hợp là cao. Các phương pháp đã biết để chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học từ thực vật chủ yếu là sử dụng các rượu, sau đó sử dụng sắc ký cột.

Gần đây, axit kaurenoic đã được tìm thấy trong vỏ quả na của Việt Nam. Na là loài cây ăn quả có giá trị dinh dưỡng ở Việt Nam, và được trồng ở nhiều vùng trong cả nước. Tuy nhiên, hiện vẫn chưa có quy trình công nghệ chiết axit kaurenoic từ vỏ của nó.

Vỏ quả na là phế thải nông nghiệp, do đó việc phát triển được một quy trình để phân lập hiệu quả axit kaurenoid từ vỏ quả na có ý nghĩa về kinh tế và môi trường.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Do có vấn đề nêu trên, mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình chiết hoạt chất sinh học axit kaurenoid từ vỏ quả na một cách kinh tế và hiệu quả bằng phương pháp hóa học.

Quy trình chiết hoạt chất sinh học axit kaurenoid từ vỏ quả na bằng phương pháp hóa học bao gồm các bước sau:

- (i) xử lý nguyên liệu: vỏ quả na được làm sạch và làm khô;
- (ii) chiết axit kaurenoid trong vỏ quả na bằng dung môi diclometan bằng cách: ngâm vỏ quả na trong dung môi diclometan tại nhiệt độ thường trong thời gian tối thiểu là 3 ngày, tách bỏ phần vỏ để thu được dịch chiết chứa chủ yếu là axit kaurenoid có lẫn các tạp chất hữu cơ, sau đó làm bay hơi dung môi diclometan, thu được dịch chiết cô đặc;
- (iii) hòa tan dịch chiết cô đặc thu được ở bước (ii) bằng lượng diclometan vừa đủ để hòa tan hết dịch chiết này, thu được dung dịch chứa axit kaurenoid trong diclometan;
- (iv) chiết lỏng-lỏng dung dịch chứa axit kaurenoid trong diclometan bằng dung dịch bazơ để điều chỉnh độ pH của dung dịch nằm trong khoảng từ 9 đến 11, thu pha nước ở bên trên chứa chủ yếu muối kaurenoid, còn pha hữu cơ ở bên dưới chứa nhiều tạp chất có thể tiếp tục được chiết thêm một hoặc một vài lần

nữa bằng dung dịch bazơ theo cách như nêu trên, sau đó trộn tất cả các pha nước chứa chủ yếu muối kaurenolat với nhau;

(v) axit hóa pha nước chứa chủ yếu muối kaurenolat bằng axit để điều chỉnh độ pH dung dịch về khoảng 1, là điều kiện tối ưu để chuyển hóa hoàn toàn muối kaurenolat thành kết tủa axit kaurenol;

(vi) chiết lỏng-lỏng dung dịch chứa kết tủa axit kaurenol bằng dung môi diclometan ở nhiệt độ thường, tỷ lệ thể tích của dung môi diclometan so với dung dịch chứa kết tủa nằm trong khoảng từ 0,3 đến 1, lọc lấy pha hữu cơ ở bên dưới chứa chủ yếu là axit kaurenol, còn pha nước ở bên trên được chiết lại bằng diclometan thêm một hoặc một vài lần nữa theo điều kiện giống như nêu trên, trộn các pha hữu cơ ở bên dưới chứa chủ yếu là axit kaurenol thu được ở các lần chiết với nhau, bay hơi dung môi diclometan trong điều kiện lạnh để thu được axit kaurenol thô dạng tinh thể đục; và

(vii) kết tinh lại axit kaurenol trong axeton, lọc tách phần dung dịch, thu được axit kaurenol sạch dạng bột màu trắng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh sắc ký bản mỏng thể hiện sự có mặt của axit kaurenol trong dịch chiết từ vỏ quả na.

Hình 2 là phổ khối phun mù điện tử ESI-MS (ESI-MS: m/z 301,3 $[M-H]^-$) của axit kaurenol thu được từ ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích.

Hình 3 là phổ 1H -NMR (1H -NMR ($CDCl_3$) của axit kaurenol thu được từ ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích.

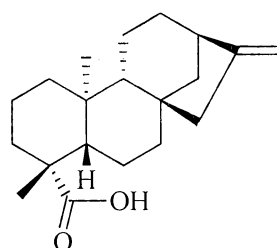
Hình 4 là phổ ^{13}C -NMR (^{13}C -NMR/DEPT ($CDCl_3$) của axit kaurenol thu được từ ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Cây na có tên khoa học là *Annona squamosa* L., thuộc họ Annonaceae.

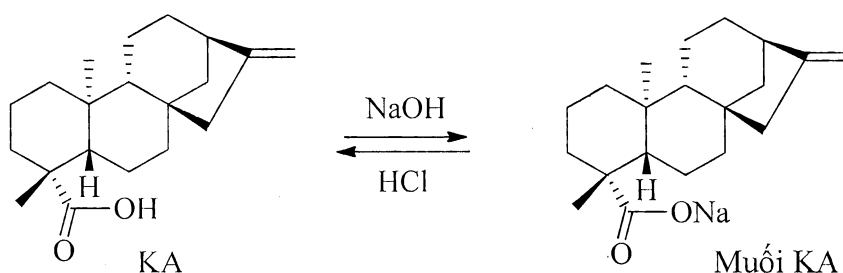
Dựa trên phân tích thành phần, vỏ quả na chứa axit kaurenoic và các chất hữu cơ thiên nhiên khác không có tính axit. Các tác giả đã lần đầu tiên xây dựng được một quy trình chiết hóa học có hiệu quả sử dụng axit-bazơ để phân lập axit kaurenoic từ vỏ quả na bằng cách điều chỉnh độ pH của pha nước trong các bước chiết hai pha lỏng (chiết lỏng-lỏng).

Công thức cấu tạo của axit kaurenoic (KA) là:



Axit kaurenoic

Ý tưởng phân lập axit kaurenoic bằng cách chiết được thể hiện rõ hơn qua sơ đồ sau:



Tan trong pha hữu cơ

Tan trong pha nước

Theo ý tưởng này, axit kaurenoic được điều chỉnh bằng kiềm và axit để thay đổi độ hòa tan tương đối và hệ số phân bố của nó trong pha hữu cơ và trong pha

nước, nhờ đó tách được axit kaurenoic ra khỏi các hợp chất trung tính khác với độ tinh khiết cao.

Quy trình chiết hoạt chất sinh học axit kaurenoic từ vỏ quả na bằng phương pháp hóa học theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước sau:

(i) Xử lý nguyên liệu: vỏ quả na được làm sạch và phơi khô dưới bóng râm hoặc được sấy bằng phương pháp sấy thông thường với nhiệt độ sấy không quá 60°C.

(ii) Chiết axit kaurenoic trong vỏ quả na bằng dung môi diclometan: ngâm vỏ quả na trong dung môi diclometan (CH_2Cl_2) tại nhiệt độ thường trong thời gian tối thiểu là 3 ngày, lượng dung môi sử dụng ít nhất là vừa đủ ngập nguyên liệu.

Nếu ngâm ít hơn 3 ngày thì không chiết được hết axit kaurenoic, giới hạn trên của thời gian ngâm không cần quy định cụ thể.

Sau thời gian chiết, tách bỏ phần vỏ, thu được dịch chiết chứa chủ yếu là axit kaurenoic có lẫn các tạp chất hữu cơ, làm bay hơi dung môi diclometan, thu được dịch chiết cô đặc.

Ngoài diclometan, có thể sử dụng metanol. Đây là hai dung môi phổ biến trong công nghiệp, có số lượng lớn, giá thành phải chăng. Tuy nhiên, diclometan chiết tốt axit kaurenoic, lượng tạp chất ít hơn khi chiết bằng metanol, diclometan dễ bay hơi và dễ thu hồi hơn metanol.

(iii) Hòa tan dịch chiết cô đặc thu được ở bước (ii) bằng lượng diclometan tối thiểu, tức là lượng vừa đủ để hòa tan hết dịch chiết này, thu được dung dịch chứa axit kaurenoic trong diclometan.

(iv) Chiết lỏng-lỏng dung dịch chứa axit kaurenoic trong diclometan bằng dung dịch bazơ để điều chỉnh độ pH của dung dịch nằm trong khoảng từ 9 đến 11, tốt hơn là 10.

Nếu $\text{pH} < 9$ thì không chuyển hóa hoàn toàn được axit kaurenoic thành muối kaurenoat. Nếu $\text{pH} > 11$ thì lượng axit dùng trong bước tiếp theo đây là quá lớn. Dung dịch bazơ được sử dụng có thể là dung dịch bazơ của kim loại kiềm hoặc kiềm thổ. Thời gian chiết, không cần quy định cụ thể, cho tới khi quan sát thấy sự phân lớp ổn định là được.

Sau thời gian chiết, lấy pha nước ở trên chứa chủ yếu muối kaurenoat, còn pha hữu cơ ở bên dưới chứa nhiều tạp chất có thể tiếp tục được chiết thêm một hoặc một vài lần nữa bằng dung dịch bazơ theo cách như nêu trên, sau đó trộn tất cả các pha nước chứa chủ yếu muối kaurenoat với nhau.

(v) Axit hóa pha nước chứa chủ yếu muối kaurenoat bằng axit để điều chỉnh độ pH dung dịch về khoảng 1, là điều kiện tối ưu để chuyển hóa hoàn toàn muối kaurenoat thành axit kaurenoic. Sau phản ứng, xuất hiện kết tủa axit kaurenoic. Thời gian axit hóa không cần quy định cụ thể, cho tới khi kết thúc phản ứng thì thôi. Axit được sử dụng trong bước này có thể là HCl, HBr, HI, tuy nhiên giải pháp hữu ích không chỉ giới hạn ở các axit này.

(vi) Chiết lỏng-lỏng dung dịch chứa kết tủa axit kaurenoic bằng dung môi diclometan

Quá trình chiết được tiến hành tại nhiệt độ thường cho đến khi sự phân lớp ổn định, thường từ 3 đến 5 phút, tỷ lệ thể tích của dung môi diclometan so với dung dịch chứa kết tủa nằm trong khoảng từ 0,3 đến 1, tốt hơn là bằng 0,5. Sau

thời gian chiết, lọc lấy pha hữu cơ ở bên dưới chứa chủ yếu là axit kaurenoic, còn pha nước ở bên trên được chiết lại bằng diclometan thêm một hoặc một vài lần nữa theo điều kiện giống như nêu trên, trộn các pha hữu cơ chứa axit kaurenoic thu được từ các lần chiết với nhau. Bay hơi dung môi diclometan trong điều kiện lạnh, thu được axit kaurenoic thô dạng tinh thể đục.

(vii) Kết tinh lại axit kaurenoic trong axeton

Hòa tan axit kaurenoic trong axeton, để cho đến khi sự kết tinh ổn định, rồi lọc tách phần dung dịch thu được axit kaurenoic sạch dạng bột màu trắng. Lượng axeton được sử dụng trong bước này là đủ để hòa tan axit kaurenoic thô. Các diclometan được sử dụng có nồng độ từ 90 đến 95%.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sẽ được giải thích tiếp bằng các ví dụ và phương án minh họa sau. Tuy nhiên, các ví dụ này không nhằm làm giới hạn phạm vi của giải pháp hữu ích. Các cải biến sẽ dễ dàng được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và chúng sẽ nằm trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Quy trình tách chiết axit kaurenoic từ vỏ quả na

(i) Xử lý nguyên liệu

Vỏ quả na được làm sạch và phơi khô dưới bóng râm.

(ii) Chiết axit kaurenoic trong vỏ quả na bằng dung môi diclometan

Ngâm 1kg vỏ quả na đã phơi khô trong dung môi diclometan 95% tại nhiệt độ thường trong thời gian 3 ngày, lượng dung môi sử dụng vừa đủ ngập mẫu.

Sau thời gian chiết, tách bỏ phần vỏ, thu được dịch chiết, làm bay hơi dung môi diclometan trong không khí, thu được 4,92g dịch chiết cô đặc.

Việc kiểm tra xem trong dịch chiết cô đặc thu được có axit kaurenoic hay không được xác định bằng phương pháp sắc ký bản mỏng. Phương pháp này được tiến hành như sau:

Giấy sắc ký nhôm: Merck silica gel 60 F₂₅₄, kích thước 20x20cm

Dịch chiết cô đặc (0,5mg/ml diclometan) được chấm lên giấy, mỗi chấm 10ml

Chất chuẩn axit kaurenoic dạng lỏng được chấm lên giấy 10ml

Lấy hexan và etyl axetat theo tỉ lệ 9:1, cho vào cốc chuyên dụng làm sắc ký bản mỏng.

Đặt giấy vào cốc theo chiều thẳng đứng, đáy nắp.

Dung môi sẽ chạy từ từ theo chiều từ dưới lên trên. Khi dung môi vừa đến đỉnh tờ giấy, nhanh chóng gấp giấy ra ngoài và để khô.

Xịt đều tờ giấy với vanillin rồi hơi nóng ở 120°C.

Phản hiện màu của chất chuẩn có cùng màu sắc, độ cao và hình dáng với phần dịch chiết. Kết luận trong dịch chiết có chứa axit kaurenoic.

Hình ảnh thể hiện sự hiện màu trên sắc ký lớp mỏng được thể hiện trên hình 1.

(iii) Hòa tan dịch chiết cô đặc thu được ở bước (ii) bằng lượng diclometan tối thiểu, đủ để hòa tan hết dịch chiết cô đặc này, thu được dung dịch chứa axit kaurenoic trong diclometan.

(iv) Chiết lỏng-lỏng dung dịch chứa axit kaurenoid trong diclometan bằng dung dịch NaOH 20% để điều chỉnh độ pH của dung dịch về khoảng 10.

Sau thời gian chiết, tách bỏ pha hữu cơ ở bên dưới chứa nhiều tạp chất, lấy pha nước ở bên trên chứa chủ yếu muối kaurenoid có màu trắng đục. Pha hữu cơ bên dưới tiếp tục được chiết thêm hai lần nữa bằng dung dịch dung dịch NaOH 20% theo cách như nêu trên, sau đó trộn tất cả các pha nước chứa chủ yếu muối kaurenoid với nhau.

(v) Axit hóa pha nước chứa chủ yếu muối kaurenoid thu được bằng axit HCl 30% để điều chỉnh độ pH dung dịch về khoảng 1. Thời gian axit hóa, không cần quy định cụ thể, cho tới khi kết thúc phản ứng.

(vi) Chiết lỏng-lỏng dung dịch chứa kết tủa axit kaurenoid bằng dung môi diclometan.

Quá trình chiết được tiến hành tại nhiệt độ thường cho đến khi sự phân lớp ổn định, khoảng 4 phút, tỷ lệ thể tích của dung môi diclometan so với dung dịch chứa kết tủa là 0,5. Sau thời gian chiết, lọc lấy pha hữu cơ ở bên dưới chứa chủ yếu là axit kaurenoid, còn pha nước ở bên trên được chiết lại bằng diclometan thêm hai lần nữa theo điều kiện giống như nêu trên. Trộn tất cả các pha hữu cơ chứa chủ yếu là axit kaurenoid với nhau. Bay hơi dung môi diclometan trong điều kiện lạnh, thu được 3,32g axit kaurenoid thô dạng tinh thể đục.

(vii) Kết tinh lại axit kaurenoid trong axeton

Hòa tan 3,32g axit kaurenoid thô thu được trong axeton, để cho đến khi sự kết tinh ổn định, lọc tách phần dung dịch thu được 2,25g axit kaurenoid sạch dạng bột màu trắng.

Đặc trưng cấu trúc của sản phẩm axit kaurenoic thu được từ ví dụ được thể hiện trên phổ ESI-MS thu được bằng máy đo phổ khối Xevo TQ ESI-MS, phổ ^1H NMR và phổ ^{13}C NMR thu được bằng máy đo cộng hưởng từ hạt nhân Bruker 500 MHz NMR sử dụng dung môi CDCl_3 , các phổ này được thể hiện trên các hình vẽ từ 2 đến 4.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

1. Quy trình chiết axit kaurenoic bao gồm các bước thân thiện với môi trường, kinh tế và đơn giản. Cụ thể là:

- Có thể tái chế vỏ quả na là phế thải nông nghiệp và sẵn có ở Việt Nam thành các chất hữu ích cho ngành dược phẩm (để sản xuất thuốc chống bệnh tiểu đường và bệnh ung thư) và cho nông nghiệp (để làm các hormon thực vật).

- Dung môi diclometan có nhiệt độ sôi thấp có thể được tái sử dụng.

- Quá trình chiết được tiến hành tại nhiệt độ thường.

- Phương pháp chiết theo giải pháp hữu ích được phát triển dựa trên sự khác biệt về tính axit của axit kaurenoic để tách nó khỏi các thành phần trung tính khác (không có tính axit) từ vỏ quả na mà không cần đến phương pháp sắc ký.

- Quá trình chiết sử dụng axit-bazơ chỉ cần hai bước chiết lỏng-lỏng.

- Hệ thống chiết đơn giản và có thể được thiết kế ở các quy mô khác nhau

2. Quy trình theo giải pháp hữu ích có thể triển khai trong thực tế với quy mô lớn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chiết hoạt chất sinh học axit kaurenoic từ vỏ quả na bằng phương pháp hóa học bao gồm các bước:

(i) xử lý nguyên liệu: vỏ quả na được làm sạch và làm khô;

(ii) chiết axit kaurenoic trong vỏ quả na bằng dung môi diclometan bằng cách ngâm vỏ quả na trong dung môi diclometan ở nhiệt độ thường trong thời gian tối thiểu là 3 ngày, tách bỏ phần vỏ để thu được dịch chiết chứa chủ yếu là axit kaurenoic có lẫn các tạp chất hữu cơ, làm bay hơi dung môi diclometan để thu được dịch chiết cô đặc;

(iii) hòa tan dịch chiết cô đặc thu được ở bước (ii) bằng lượng diclometan vừa đủ để hòa tan hết dịch chiết này, thu được dung dịch chứa axit kaurenoic trong diclometan;

(iv) chiết lỏng-lỏng dung dịch chứa axit kaurenoic trong diclometan bằng dung dịch bazơ để điều chỉnh độ pH của dung dịch nằm trong khoảng từ 9 đến 11, thu pha nước chứa chủ yếu muối kaurenoat, còn pha hữu cơ chứa nhiều tạp chất ở bên dưới có thể tiếp tục được chiết thêm một hoặc một vài lần nữa bằng dung dịch bazơ theo cách như nêu trên, sau đó trộn tất cả các pha nước chứa chủ yếu muối kaurenoat với nhau;

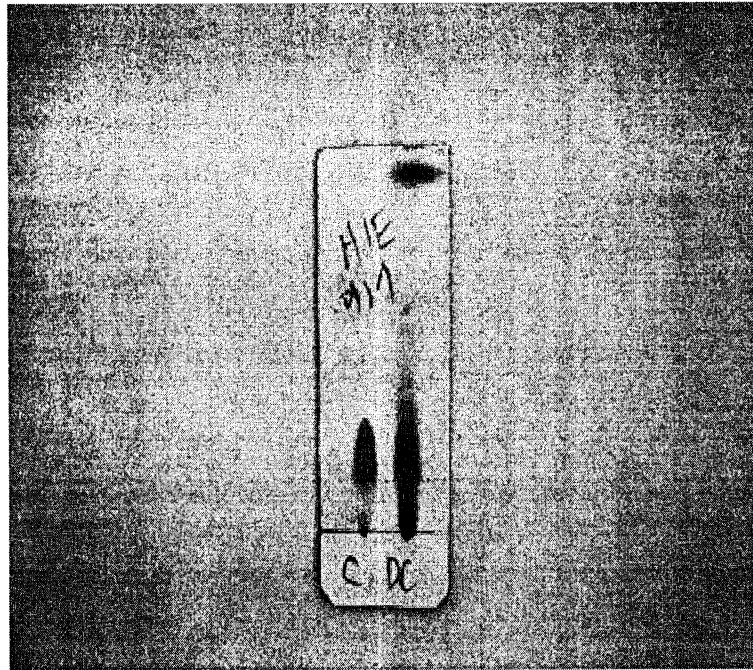
(v) axit hóa pha nước chứa chủ yếu muối kaurenoat bằng axit để điều chỉnh độ pH dung dịch về khoảng 1 để chuyển hóa hoàn toàn muối kaurenoat thành kết tủa axit kaurenoic;

(vi) chiết lỏng-lỏng dung dịch chứa kết tủa axit bằng dung môi diclometan ở nhiệt độ thường, tỷ lệ thể tích của dung môi diclometan so với dung dịch chứa

kết tủa nằm trong khoảng từ 0,3 đến 1, lọc lấy pha hữu cơ ở bên dưới chứa chủ yếu là axit kaurenoic, còn pha nước ở bên trên được chiết lại bằng diclometan thêm một hoặc một vài lần nữa theo điều kiện giống như nêu trên, trộn các pha hữu cơ ở bên dưới chứa chủ yếu là axit kaurenoic thu được ở các lần chiết với nhau, bay hơi dung môi diclometan trong điều kiện lạnh để thu được axit kaurenoic thô dạng tinh thể đục; và

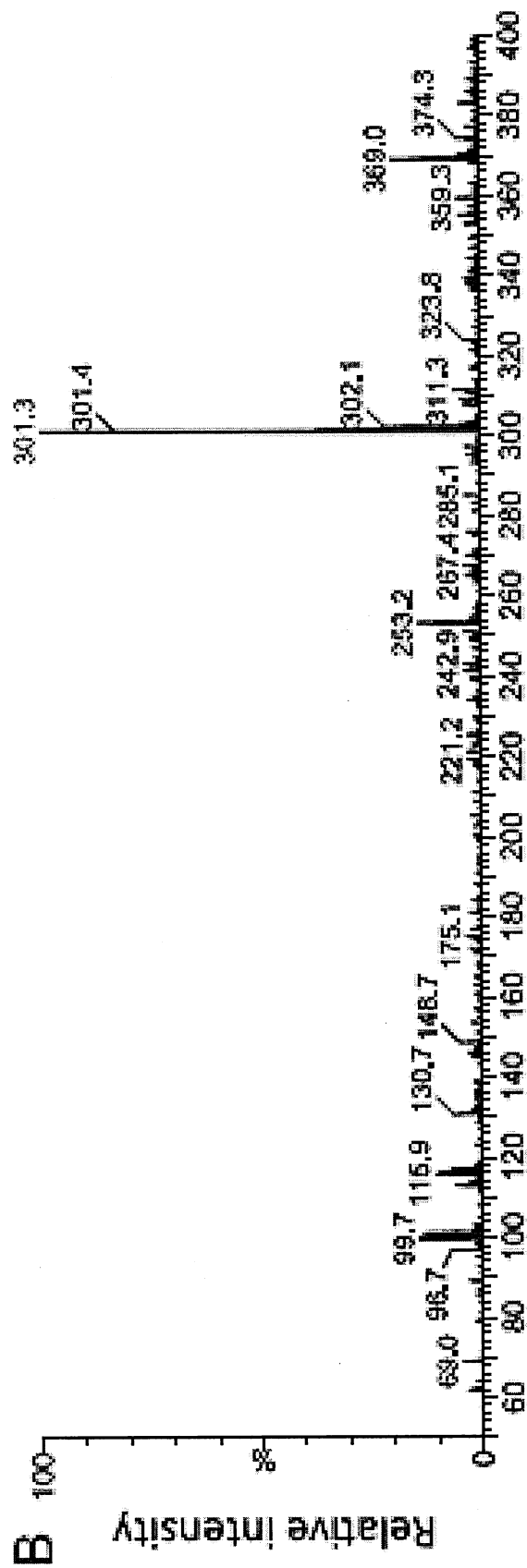
(vii) kết tinh lại axit kaurenoic trong axeton, lọc tách phần dung dịch để thu được axit kaurenoic sạch dạng bột màu trắng.

2006



Hình 1

ESI-MS



Hình 2



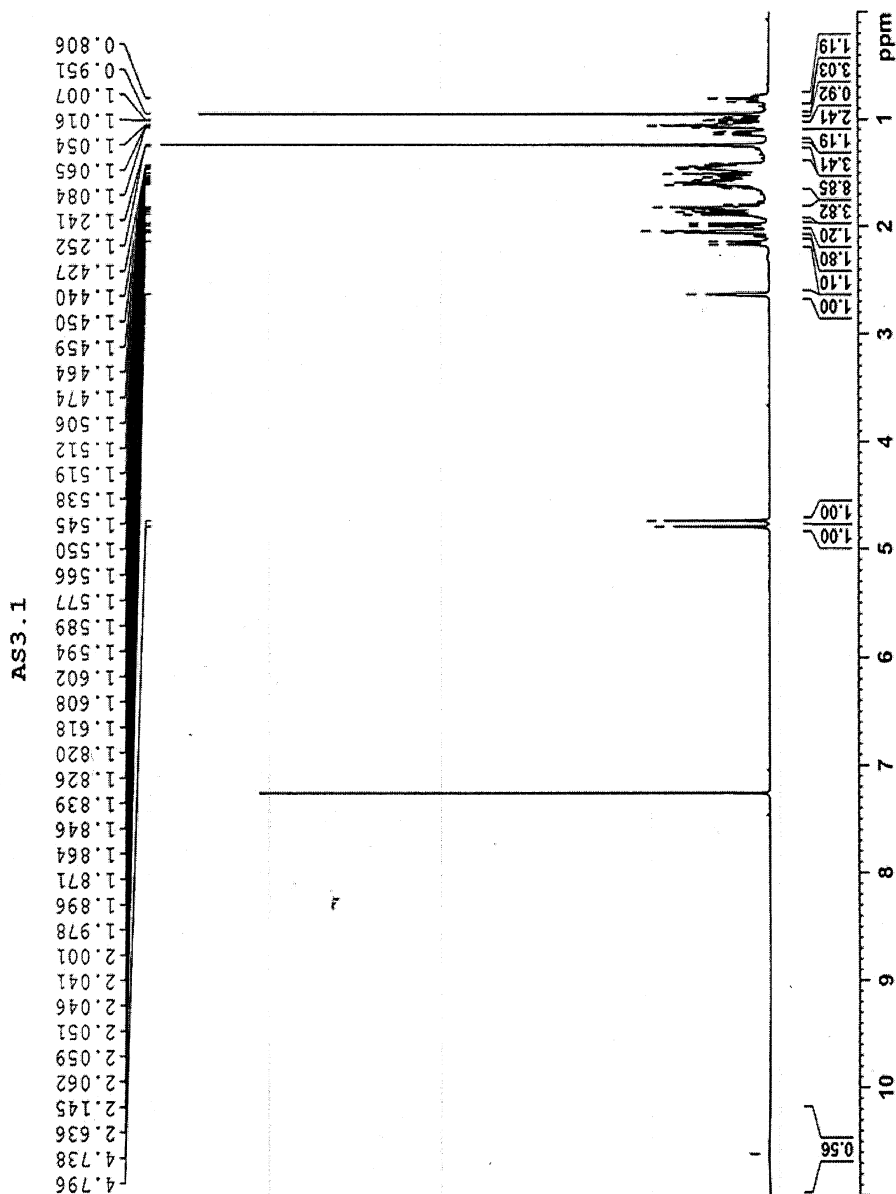
```

Current Data Parameters
=====
NAME          73-AS3.1
EXPNO         10
PROCNO        1

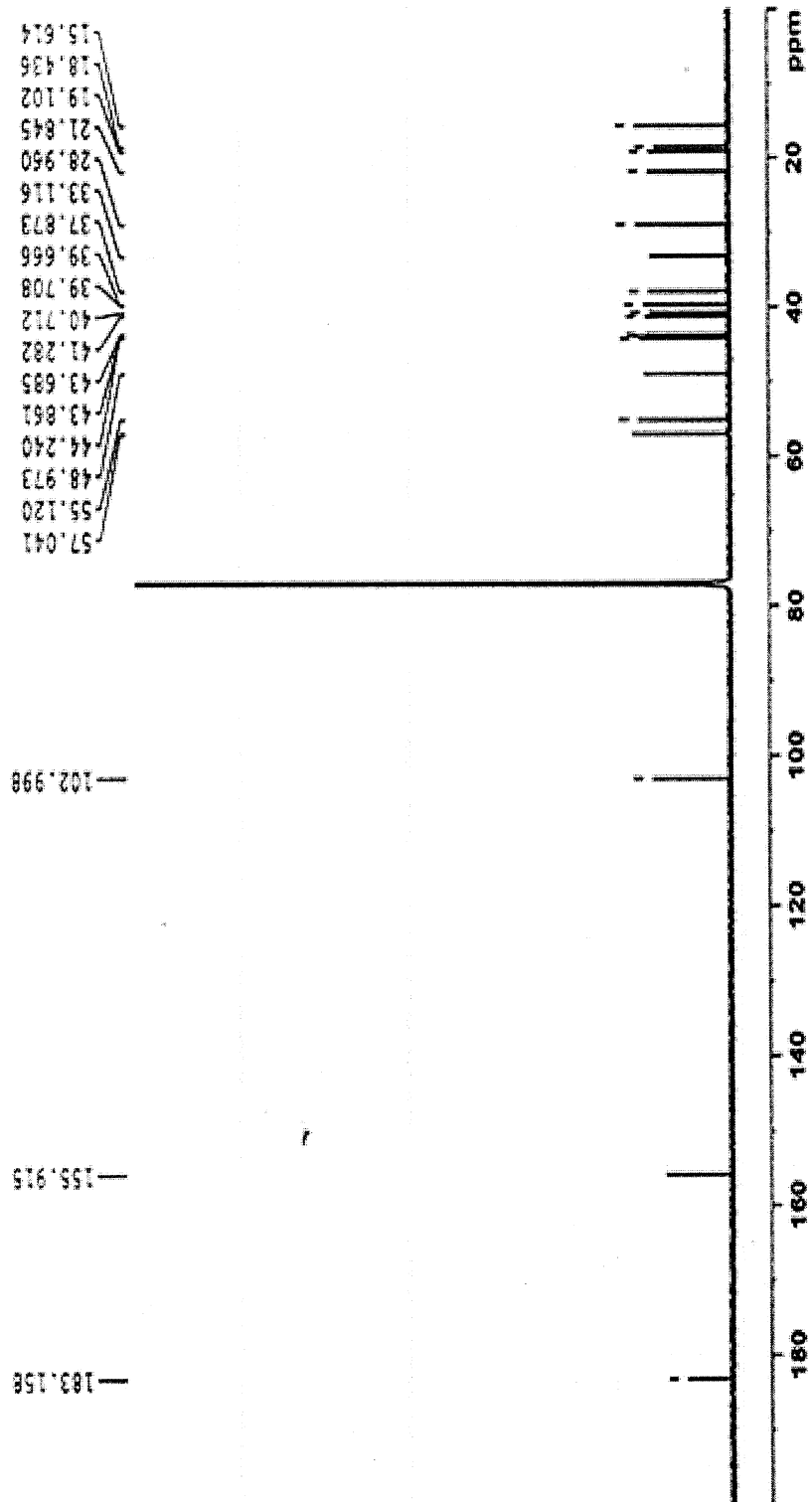
F2 - Acquisition Parameters
=====
Date_         20160505
Time          15.16
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO BB/
PULPROG       zgpg30
TD            65536
FIDRES        0.152588 Hz
AQ            3.2767999 sec
RG            131.38
DS            2
SOLVENT       CDCl3
NS            64
DS            2
SWH           10000.000 Hz
F1DRES        0.152588 Hz
F2DRES        0.152588 Hz
RG            3.2767999 sec
AQ            131.38
DE            50.000 usec
WDW            EM
SSB            0
GB            0
PC            1.00
=====
CHANNEL f1
=====
SFO1          500.1330885 MHz
NUC1          1H
P1            9.50 usec
PL1           24.00000000 W

F2 - Processing parameters
=====
SI            32768
SF            500.1330885 MHz
WDW            EM
SSB            0
GB            0
PC            1.00
=====

```



Hình 3

$^{13}\text{C-NMR}$ 

Hình 4