



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0022170

(51)⁷ **C07C 39/21, A23L 1/30, A61K 8/97,**
A61Q 19/00, B01D 11/02, C07C 37/82

(13) **B**

(21) 1-2011-02634

(22) 03.04.2009

(86) PCT/JP2009/056945 03.04.2009

(87) WO2010/113315A1 07.10.2010

(45) 25.11.2019 380

(43) 25.05.2012 290

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

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

(72) MATSUI, Yuko (JP), KAMEI, Masanori (JP), SUGIYAMA, Kenkichi (JP)

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

(54) **CHẾ PHẨM CHỨA PIXEATANOL VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa pixeatanol là chế phẩm thu được từ nguyên liệu tự nhiên và chứa hàm lượng pixeatanol cao và phương pháp sản xuất chế phẩm này. Chế phẩm này chứa hàm lượng pixeatanol nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 99,9% theo khối lượng thu được bằng cách chiết hạt quả chanh leo. Quá trình chiết pixeatanol bao gồm các bước: nghiền hạt quả chanh leo thành bột, bổ sung ít nhất một dung môi được chọn trong số dung môi có thành phần chính là rượu trong nước và dung môi có thành phần chính là keton trong nước vào bột này và khuấy hỗn hợp để chiết pixeatanol hòa tan vào trong dung môi. Trong trường hợp này, tốt hơn là, quá trình chiết được thực hiện theo phương pháp bậc thang bằng cách sử dụng cả dung môi có thành phần chính là rượu trong nước và dung môi có thành phần chính là keton trong nước.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa pixeatanol, chế phẩm này chứa pixeatanol thu được từ hạt quả chanh leo (*Passiflora edulis*), và phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo tài liệu phi sáng chế 1 dưới đây, resveratrol và pixeatanol là các hợp chất polyphenol thu được từ nho, có tác dụng ức chế quá trình sản sinh melanin bởi các tế bào sản sinh melanin. Tuy nhiên, cần sử dụng thuốc thử có trên thị trường để thực hiện thử nghiệm khẳng định tác dụng này, và tài liệu này không đề cập đến chế phẩm chứa pixeatanol hoặc hoạt chất tương tự thu được từ nguyên liệu tự nhiên như nho.

Trong khi đó, theo tài liệu sáng chế 1 dưới đây, resveratrol được cô đặc và thu gom một cách chọn lọc, có hiệu quả, và với chi phí thấp từ dịch chiết rễ của cây cốt khí củ (*Reynoutria japonica* Houtt. var. *japonica*). Ngoài ra, tài liệu sáng chế 2 dưới đây đề cập đến dịch chiết quả nam việt quất (cowberry) chứa resveratrol. Hơn nữa, các tài liệu sáng chế 3 và 4 dưới đây đề cập đến dịch chiết từ quả chanh leo (họ Lạc tiên *Passifloraceae*, chi Lạc tiên *Passiflora* sp.), cụ thể là dịch chiết vỏ quả chanh leo và sử dụng dịch chiết này trong thực phẩm, chế phẩm bổ sung dinh dưỡng, và trong lĩnh vực y học.

Tuy nhiên, không có dấu hiệu kỹ thuật nào được mô tả trong các tài liệu nêu trên đề cập đến chế phẩm chứa hàm lượng pixeatanol cao, thu được từ nguyên liệu tự nhiên.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

[PTL 1] JP 2005-281179 A

[PTL 2] JP 2009-13159 A

[PTL 3] JP 2007-302659 A

[PTL 4] JP 2007-531734 A

Tài liệu phi sáng chế

[NPL1] Takako Yokozawa and You Jung Kim, Piceatannol Inhibits Melanogenesis by Its Antioxidative Actions, Biological & Pharmaceutical Bulletin Vol. 30 (2007) No. 11 p2007-2011.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Từ góc độ về an toàn thực phẩm, ưu tiên là piceatannol thu được từ nguyên liệu tự nhiên để bổ sung vào thực phẩm hoặc đồ uống như thực phẩm chức năng hoặc thực phẩm bổ dưỡng. Tuy nhiên, cho đến nay, nguyên liệu tự nhiên chứa hàm lượng piceatannol cao vẫn chưa được biết đến. Các nguyên liệu tự nhiên như nho chứa hàm lượng piceatannol rất thấp.

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

Các tác giả sáng chế đã nỗ lực nghiên cứu để đạt được mục đích nêu trên. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng hạt quả chanh leo (*Passiflora edulis*), là nguyên liệu chứa hàm lượng piceatannol cao mà chưa từng được ứng dụng do trước đây nguyên liệu này thường bị loại bỏ, do đó, hoàn thiện sáng chế.

Cụ thể là, chế phẩm chứa piceatannol theo sáng chế thu được từ hạt quả chanh leo và chứa hàm lượng piceatannol nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 99,9% theo khối lượng.

Theo sáng chế có thể sản xuất chế phẩm chứa piceatannol từ nguyên liệu tự nhiên và chứa hàm lượng piceatannol cao. Chế phẩm này thu được từ nguyên liệu tự nhiên, và do đó, được trộn thích hợp vào mỹ phẩm, thuốc, thực phẩm hoặc đồ uống như thực phẩm chức năng hoặc thực phẩm bổ dưỡng.

Đồng thời, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm chứa piceatannol bao gồm các bước: nghiền hạt quả chanh leo thành bột; bổ sung ít nhất một dung môi được chọn từ các dung môi có thành phần chính là rượu trong nước và dung môi có thành phần chính là keton trong nước; và khuấy hỗn hợp để chiết piceatannol hòa tan vào dung môi.

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo sáng chế, có thể sản xuất chế phẩm chứa hàm lượng pixeatanol cao, thu được từ nguyên liệu tự nhiên, với hiệu suất lớn bởi vì pixeatanol được chiết từ hạt quả chanh leo nhờ sử dụng dung môi có thành phần chính là rượu trong nước hoặc dung môi có thành phần chính là keton trong nước.

Tốt hơn là, phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo sáng chế bao gồm các bước: nghiền hạt quả chanh leo thành bột; bổ sung một dung môi bất kỳ trong số hai loại dung môi là dung môi có thành phần chính là rượu trong nước và dung môi có thành phần chính là keton trong nước vào bột này; khuấy hỗn hợp để chiết pixeatanol hòa tan vào dung môi, bằng cách đó thu được dịch chiết lần một; bổ sung dung môi còn lại không được chọn trong bước trên trong số dung môi có thành phần chính là rượu trong nước và dung môi có thành phần chính là keton trong nước vào phần bã không được thu làm dịch chiết; khuấy hỗn hợp để chiết pixeatanol hòa tan vào dung môi, bằng cách đó thu được dịch chiết lần hai; trộn dịch chiết lần một với dịch chiết lần hai. Theo phương án này, có thể sản xuất chế phẩm chứa hàm lượng pixeatanol cao với hiệu suất cao hơn do quá trình chiết xuất được thực hiện theo phương pháp bậc thang với nhiều dung môi.

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol của sáng chế, tốt hơn là, hạt quả chanh leo là hạt thô hoặc đã được sấy khô, thu được bằng cách sấy khô hạt thô.

Ngoài ra, theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol của sáng chế, tốt hơn là, dung môi có thành phần chính là rượu trong nước là dung dịch nước etanol, hoặc dung môi có thành phần chính là keton trong nước là dung dịch nước axeton. Tốt hơn là, đối với hàm lượng nước, dung dịch nước etanol chứa hàm lượng etanol nằm trong khoảng từ 20 đến 99,9% theo thể tích, và dung dịch nước axeton chứa hàm lượng axeton nằm trong khoảng từ 20 đến 99,9% theo thể tích. Các phương án này cho hiệu suất chiết pixeatanol cao hơn.

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol của sáng chế, tốt hơn là, quá trình khuấy trong từng dung môi được thực hiện bằng cách rung siêu âm hoặc lắc. Phương án này cho hiệu suất chiết pixeatanol cao hơn.

Ngoài ra, tốt hơn là, phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo sáng chế còn bao gồm bước chưng cất loại dung môi trong điều kiện áp suất giảm sau khi chiết.

Thực phẩm hoặc đồ uống được bổ sung chế phẩm chứa pixeatanol, chế phẩm này thu được từ hạt quả chanh leo và chứa pixeatanol với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 99,9% theo khối lượng có thể thu được.

Mỹ phẩm được bổ sung chế phẩm chứa pixeatanol, chế phẩm này thu được từ hạt quả chanh leo và chứa pixeatanol với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 99,9% theo khối lượng có thể thu được.

Các ưu điểm của sáng chế

Theo sáng chế, chế phẩm chứa pixeatanol có thể được sản xuất từ nguyên liệu tự nhiên và chứa hàm lượng pixeatanol cao. Chế phẩm này có nguồn gốc từ nguyên liệu tự nhiên và do đó, được trộn thích hợp vào mỹ phẩm, thuốc, thực phẩm hoặc đồ uống như thực phẩm chức năng hoặc thực phẩm bổ dưỡng. Đồng thời, theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol của sáng chế, có thể sản xuất chế phẩm thu được từ nguyên liệu tự nhiên và chứa hàm lượng pixeatanol cao với hiệu suất lớn nhờ sử dụng dung môi có thành phần chính là rượu trong nước hoặc dung môi có thành phần chính là keton trong nước làm dung môi để chiết pixeatanol từ hạt quả chanh leo. Ngoài ra, quá trình chiết xuất có thể được thực hiện theo phương pháp bậc thang với nhiều dung môi, từng loại dung môi này là các dung môi có thành phần chính là rượu trong nước hoặc dung môi có thành phần chính là keton trong nước, do đó, sản xuất chế phẩm với hiệu suất cao hơn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện sắc ký đồ HPLC của dịch chiết từ hạt (A), vỏ quả (B), và thịt quả (C).

Fig.2 là biểu đồ thể hiện quang phổ khối (A) và quang phổ UV (B) của thành phần được rửa giải ở khoảng 41 phút trong phân tích HPLC theo Fig.1.

Fig.3 là biểu đồ thể hiện quang phổ khối (A) và quang phổ UV (B) của resveratrol (khối lượng phân tử: 228).

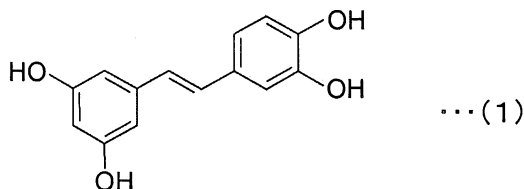
Fig.4 là biểu đồ thể hiện quang phổ khối (A) và quang phổ UV (B) của pixeatanol (khối lượng phân tử: 244).

Fig.5 là biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của hàm lượng nước trong dung môi có thành phần chính là dung dịch nước etanol (A) hoặc dung dịch nước axeton (B) đến hiệu suất chiết pixeatanol.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm chứa pixeatanol theo sáng chế là chế phẩm thu được từ hạt quả chanh leo và chứa pixeatanol với lượng nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 99,9% theo khối lượng. Chế phẩm này có thể ở dạng lỏng, rắn, bán rắn, hoặc gel chẳng hạn và có thể là chính hạt quả chanh leo hoặc sản phẩm hạt được xử lý như bột nhão thu được bằng cách nghiền hạt hoặc bột thu được bằng cách nghiền sản phẩm hạt đông khô. Tốt hơn là, hàm lượng pixeatanol tính theo hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 99,9% theo khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,01 đến 50% theo khối lượng, tốt nhất là từ 0,1 đến 10% theo khối lượng.

Pixeatanol có công thức cấu tạo (1) như sau:



Pixeatanol có công thức cấu tạo nêu trên là *trans*-pixeatanol có cấu trúc trong đó hai nhóm phenyl được liên kết thông qua nhóm *trans*-alken, nhưng theo sáng chế, pixeatanol còn bao gồm *cis*-pixeatanol có cấu trúc trong đó hai nhóm phenyl được liên kết thông qua nhóm *cis*-alken trong công thức cấu tạo nêu trên.

Chanh leo (*Passiflora edulis*) là thực vật thuộc họ Lạc tiên của chi Lạc tiên và còn được gọi là Lạc tiên trứng (phiên âm theo tiếng Nhật là *Kudamonotokeisou*). Quả chanh leo có vị chua ngọt và có thể ăn được mà không cần chế biến hoặc có thể uống được dưới dạng nước ép, hoặc được sử dụng làm chất điều hương để bổ sung vào thực phẩm hoặc đồ uống như thạch hoặc bánh ngọt. Hạt quả chanh leo là hạt cứng và thường được loại bỏ khi sử dụng quả để sản xuất nước ép hoặc sản phẩm tương tự, và thậm chí nếu ăn hoặc uống cả quả lẫn hạt thì hạt cũng được bài tiết ra khỏi cơ thể do

hạt có vỏ bao cứng và khó tiêu hóa. Sáng chế dựa trên việc phát hiện ra rằng hạt quả chanh leo chứa hàm lượng pixeatanol cao, mà chưa từng được ứng dụng do trước đây nguyên liệu này thường bị loại bỏ. Lưu ý rằng, nếu hạt quả chanh leo được sử dụng trong sáng chế được bổ sung vào thực phẩm hoặc đồ uống như thực phẩm chức năng hoặc thực phẩm bổ dưỡng, sẽ không gây ra các vấn đề về độ an toàn, do dựa trên kinh nghiệm sử dụng quả chanh leo làm thực phẩm trước đây.

Tốt hơn là, chế phẩm chứa pixeatanol theo sáng chế có thể thu được, ví dụ, theo phương pháp bao gồm các bước: nghiền hạt quả chanh leo thô hoặc đã được sấy khô thành bột và tiến hành chiết xuất pixeatanol nhờ sử dụng một dung môi trong số nhiều dung môi. Để tăng hiệu suất chiết, hạt quả chanh leo có thể được xử lý hóa học thích hợp 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 pixeatanol của sáng chế như được mô tả dưới đây, có thể thu được chế phẩm chứa hàm lượng pixeatanol cao với hiệu suất đặc biệt lớn, và do đó, tốt nhất là chế phẩm được sản xuất theo phương pháp này.

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

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol của sáng chế, trước tiên, hạt quả chanh leo được nghiền thành bột. Hạt quả chanh leo được sử dụng có thể là hạt thô hoặc đã được sấy khô, và để tăng hiệu suất chiết, có thể thực hiện bước xử lý hóa học như phân hủy bằng axit hoặc kiềm hoặc phân hủy bằng enzym trước khi chiết. Quá trình nghiền hạt quả có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị nghiền đã biết. Lưu ý rằng, hạt quả chanh leo có hàm lượng dầu cao, và do đó, hạt có thể trở thành dạng bột nhão sau khi nghiền thành bột.

Tiếp theo, bổ sung ít nhất một loại dung môi được chọn từ dung môi có thành phần chính là rượu trong nước và dung môi có thành phần chính là keton trong nước vào hạt chanh leo đã nghiền thành bột, và khuấy hỗn hợp để chiết pixeatanol hòa tan vào dung môi.

Dung môi có thành phần chính là rượu trong nước có thể được sử dụng, bao gồm các dung môi trong nước như dung dịch nước etanol, dung dịch nước metanol, dung dịch nước propanol, và dung dịch nước etanol được đặc biệt ưu tiên. Trong khi đó, dung môi có thành phần chính là keton trong nước có thể được sử dụng, bao gồm

các dung môi trong nước như dung dịch nước axeton, dung dịch nước methyl ethyl keton, dung dịch nước diethyl keton, và dung dịch nước cloaxeton, và dung dịch nước axeton được đặc biệt ưu tiên.

Về hàm lượng nước, tốt hơn là, dung dịch nước etanol chứa hàm lượng etanol nằm trong khoảng từ 20 đến 99,9% theo thể tích, tốt hơn nữa là từ 40 đến 99,9% theo thể tích, tốt nhất là từ 60 đến 80% theo thể tích, và tốt hơn là, dung dịch nước axeton chứa hàm lượng axeton nằm trong khoảng từ 20 đến 99,9% theo thể tích, tốt hơn nữa là từ 40 đến 99,9% theo thể tích, tốt nhất là từ 60 đến 80% theo thể tích. Nếu hàm lượng etanol hoặc axeton không nằm trong các khoảng giá trị nêu trên, hiệu suất chiết pixeatanol có thể giảm, nên không được ưu tiên. Lưu ý rằng, để đơn giản hóa cách thể hiện hàm lượng nước của dung môi trong nước, ví dụ, dung dịch chứa 80% thể tích etanol và 20% thể tích nước được gọi là “dung dịch nước etanol 80%.” Ngoài ra, ví dụ, dung dịch chứa 70% thể tích etanol và 30% thể tích nước được gọi là “dung dịch nước etanol 70%” Ngoài ra, ví dụ, dung dịch chứa 70% thể tích axeton và 30% thể tích nước được gọi là “dung dịch nước axeton 70%.”

Theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol của sáng chế, tốt hơn là, quá trình khuấy trong từng dung môi trong số các dung môi nêu trên được thực hiện bằng cách rung siêu âm hoặc lắc. Quá trình này có thể làm cho bột hạt chanh leo được rung và tiếp xúc hiệu quả với từng dung môi trong số các dung môi nêu trên, và do đó, có thể làm tăng hiệu suất chiết pixeatanol từ hạt quả chanh leo vào trong từng dung môi trong số các dung môi nêu trên. Quá trình rung siêu âm có thể được thực hiện bằng thiết bị siêu âm đã biết. Quá trình lắc có thể được thực hiện bằng thiết bị lắc đã biết.

Ngoài ra, theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol của sáng chế, tốt hơn là, dung môi nêu trên được chưng cất để loại bỏ ở điều kiện áp suất giảm sau khi chiết. Do đó, có thể tạo ra chế phẩm không chứa dung môi hữu cơ, tuân thủ các tiêu chuẩn an toàn và các tiêu chuẩn tương tự của nguyên liệu 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 pixeatanol của sáng chế, quá trình chiết xuất có thể được thực hiện theo phương pháp bậc thang với nhiều dung môi. Điều này có thể tạo ra chế phẩm chứa hàm lượng pixeatanol cao và hiệu suất cao hơn.

Cụ thể là, ví dụ, nghiền hạt quả chanh leo thành bột, sau đó bổ sung một dung môi bất kỳ trong số hai dung môi là dung môi có thành phần chính là rượu trong nước và dung môi có thành phần chính là keton trong nước nêu trên vào bột này, và khuấy hỗn hợp để chiết pixeatanol hòa tan vào dung môi, bằng cách đó thu được dịch chiết lần một. Thực hiện quá trình ly tâm hoặc biện pháp tương tự để tách dịch chiết và phần bã không được thu làm dịch chiết, và bổ sung dung môi còn lại không được chọn trong bước trên trong số dung môi có thành phần chính là rượu trong nước và dung môi có thành phần chính là keton trong nước vào phần bã này, và khuấy hỗn hợp để chiết pixeatanol hòa tan vào dung môi, bằng cách đó thu được dịch chiết lần hai. Sau đó, trộn dịch chiết lần một với dịch chiết lần hai. Hiển nhiên là, dịch chiết lần hai có thể được sử dụng riêng làm dịch chiết hạt quả chanh leo.

Ngoài ra, nếu hạt quả chanh leo được đưa vào quá trình xử lý chiết xuất lần một bằng dung môi có thành phần chính là rượu trong nước hoặc dung môi có thành phần chính là keton trong nước nêu trên, thì đặc tính như độ cứng của hạt được xem là thay đổi thành một đặc tính thích hợp cho quá trình chiết. Do đó, quá trình xử lý chiết xuất lần hai tiếp theo có thể mong muốn để cải thiện hiệu suất chiết không chỉ trong trường hợp sử dụng dung môi có thành phần chính là rượu trong nước hoặc dung môi có thành phần chính là keton trong nước nêu trên mà còn trong trường hợp sử dụng dung môi khác. Ngoài ra, như được thể hiện trong các ví dụ dưới đây, hiệu suất chiết cao trong trường hợp sử dụng dung môi có thành phần chính là rượu trong nước hoặc dung môi có thành phần chính là keton trong nước nêu trên được cho là do ảnh hưởng của hàm lượng nước có trong dung môi. Do đó, nếu hạt quả chanh leo được đưa vào quá trình xử lý chiết xuất lần một với nước hoặc dung môi trong nước, sau đó quá trình xử lý chiết xuất lần hai có thể mong muốn để cải thiện hiệu suất chiết không chỉ trong trường hợp sử dụng dung môi có thành phần chính là rượu trong nước hoặc dung môi có thành phần chính là keton trong nước nêu trên mà còn trong trường hợp sử dụng dung môi khác.

Dịch chiết hạt quả chanh leo thu được bằng phương pháp nêu trên có thể được sử dụng để điều chế chế phẩm chứa pixeatanol ở dạng lỏng và không cần xử lý thêm hoặc sau khi cô đặc. Dịch chiết này còn có thể được tạo bột bằng cách sấy đông khô hoặc sấy phun để điều chế chế phẩm chứa pixeatanol ở dạng bột. Dạng điều chế của dịch chiết không chỉ giới hạn ở các dạng này. Các chất không hòa tan có trong dịch

chiết có thể được loại bỏ thích hợp bằng cách lọc hoặc các biện pháp tương tự. Ngoài ra, các chất không hòa tan này có thể được nghiền thành các hạt mịn.

Ngoài ra, dịch chiết lần một từ hạt quả chanh leo thu được như được mô tả nêu trên có thể được tách phân đoạn và tinh chế dựa trên chỉ số pixeatanol bằng các phương pháp trao đổi ion, sắc ký cột rây phân tử, HPLC, lọc gel, tách dùng màng, hoặc các phương pháp tương tự để điều chế chế phẩm chứa pixeatanol.

Cụ thể là, ví dụ, như được thể hiện trong các ví dụ dưới đây, khi chế phẩm được chiết từ hạt quả chanh leo được đưa vào phân tích HPLC trong các điều kiện dưới đây, pixeatanol được rửa giải ở khoảng 41 phút. Trong khi đó, khi phân tích khối phổ phân được rửa giải sử dụng thiết bị khối phổ, tín hiệu của dạng ion âm được thể hiện ở tỷ số m/z 243.

Các điều kiện HPLC

Cột: Mightysil RP-18 GP 150-4,6, đường kính: 4,6mm, chiều dài: 150mm (do KANTO CHEMICAL CO., INC. sản xuất)

Nhiệt độ cột: 40°C

Các điều kiện rửa giải: tốc độ dòng: 1mL/phút, 0% metanol→30% metanol (60 phút)

Phát hiện bằng UV: 280nm

Do đó, theo sáng chế, có thể điều chế được chế phẩm chứa pixeatanol, chế phẩm này thu được từ hạt quả chanh leo và chứa hàm lượng pixeatanol cao, bằng phương pháp tách phân đoạn và tinh chế thích hợp dựa trên các tính chất vật lý của pixeatanol được lấy làm ví dụ nêu trên.

Nếu cần, chế phẩm chứa pixeatanol theo sáng chế có thể được bổ sung chất nền hoặc chất mang dược dụng và được sử dụng làm thuốc ở dạng viên nén, thuốc hạt, thuốc bột, dung dịch thuốc, bột thuốc, hạt thuốc, viên nang, thạch, hoặc các dạng bào chế tương tự, hoặc có thể được sử dụng làm mỹ phẩm ở dạng thuốc mỡ, kem, gel, miếng đắp da, thuốc súc, mỹ phẩm, hoặc các dạng bào chế tương tự.

Trong khi đó, chế phẩm chứa pixeatanol theo sáng chế có thể được bổ sung vào thực phẩm để nâng cao sức khỏe như chế phẩm bổ sung dinh dưỡng, thực phẩm chức năng, hoặc các sản phẩm tương tự trước khi sử dụng. Ví dụ về các thực phẩm này bao

gồm: bánh kẹo như sôcôla, bánh quy, kẹo gôm, kẹo, bánh quy dẹt, kẹo dẻo, hoặc 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. Ngoài ra, các ví dụ được ưu tiên 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). Trong trường hợp bổ sung vào thực phẩm để tăng cường sức khỏe, chế phẩm bổ sung dinh dưỡng, và các sản phẩm tương tự, chế phẩm theo sáng chế có thể ở dạng bột, dạng hạt, viên nang, xi-rô, viên nén, hoặc viên nén bao đường.

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

Ví dụ 1: Phát hiện và định tính pixeatanol từ quả chanh leo

Cấu tạo của quả chanh leo gồm 3 phần là vỏ quả, thịt quả, và hạt, và các phần này được sấy đông khô riêng và nghiền thành bột bằng thiết bị nghiền (thiết bị “Sample mill type SK-M,” do KYORITSU RIKO K.K. sản xuất), sau đó chiết các phân tương ứng bằng dung dịch nước etanol 80%. Ly tâm sản phẩm thu được, sau đó, tách và cô đặc các dịch nổi bằng cách làm bay hơi, và dịch chiết đậm đặc thu được được sấy đông khô để thu được bột. Hòa tan bột này vào nước để thu được dịch chiết. Sau đó, pha loãng các dịch chiết hạt, dịch chiết vỏ quả, và dịch chiết thịt quả này sao cho các nồng độ tính theo hàm lượng chất rắn của mỗi dịch chiết này tương ứng là 0,01g/mL, 0,1g/mL, và 0,1g/mL, và lấy 5 μ L để tiến hành phân tích HPLC.

Các điều kiện phân tích đối với HPLC là như được mô tả dưới đây.

Cột: Mightysil RP-18 GP 150-4,6, đường kính: 4,6mm, chiều dài: 150mm (do KANTO CHEMICAL CO., INC. sản xuất)

Nhiệt độ cột: 40°C

Các điều kiện rửa giải: tốc độ dòng: 1mL/phút, 0% metanol→30% metanol (60 phút)

Phát hiện bằng UV: 280nm

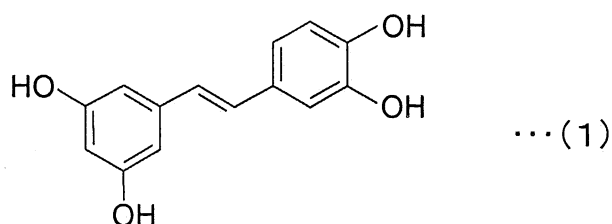
Các hình vẽ từ Fig.1A đến Fig.1C thể hiện sắc ký đồ HPLC của các dịch chiết tương ứng nêu trên. Kết quả là, như được thể hiện trên FIG.1A, trong trường hợp dịch

chiết hạt, phát hiện được đỉnh sắc ký ở khoảng 41 phút. Mặt khác, trong các trường hợp dịch chiết vỏ quả và dịch chiết thịt quả, không thể phát hiện được đỉnh sắc ký ở khoảng 41 phút thông qua nồng độ chất rắn tính theo thể tích bơm mẫu lớn gấp 10 lần so với thể tích bơm mẫu của dịch chiết hạt.

Sau đó, xác định các đặc tính của thành phần có trong dịch chiết hạt và được rửa giải ở thời gian lưu là khoảng 41 phút được mô tả nêu trên như được mô tả dưới đây.

Trước tiên, đo quang phổ khối của thành phần này sử dụng thiết bị đo khối phổ/HPLC (do THERMO ELECTRON Co., Ltd sản xuất., thiết bị “Thermo-LCQ-MS/MS”) (FIG.2A). Mặc dù phép đo được thực hiện theo cả dạng ion dương và ion âm, nhưng phát hiện ra ion được ưu tiên là dạng ion âm, và do đó, dữ liệu này được sử dụng. Kết quả, tín hiệu chính ở tỷ số m/z 243 là $(M-H)^-$, và các đỉnh sắc ký khác ở các tỷ số m/z 279 và m/z 487 có thể phát hiện được tương ứng là $(M+2H_2O-H)^-$ và $(M \times 2-H)^-$. Do đó, khối lượng phân tử của thành phần này có thể xác định được là 244. Ngoài ra, khi đo quang phổ UV của thành phần này, phát hiện được các cực đại hấp thụ (λ_{max}) ở các bước sóng 220nm, 304nm, và 322nm (Fig.2B).

Các kết quả đo khối phổ và quang phổ UV được phát hiện là tương tự với các kết quả phân tích resveratrol (khối lượng phân tử: 228), là polyphenol có trong vỏ lạc (xem Fig.3A và Fig.3B). Ngoài ra, để khẳng định lại điều này, tiến hành hấp phụ thành phần này vào polyvinylpolypyrrolidon (polyvinylpolypyrrolidone - PVPP), là nhựa có khả năng hấp phụ polyphenol. Hơn nữa, đỉnh sắc ký ở khoảng 41 phút được phát hiện là có thời gian lưu ngắn đối với cột pha đảo so với thời gian lưu của resveratrol ở cùng các điều kiện HPLC. Tất các kết quả này khẳng định rằng thành phần có trong dịch chiết hạt nêu trên và được rửa giải ở thời gian lưu khoảng 41 phút là pixeatanol (khối lượng phân tử: 244), có công thức cấu tạo (1) như sau và có khối lượng phân tử lớn hơn so với của resveratrol bằng một nhóm hydroxy.



Sau đó, phân tích hợp chất pixeatanol tinh khiết (do Sigma-Aldrich Corporation sản xuất) bằng HPLC ở cùng các điều kiện như được mô tả nêu trên để khẳng định thêm các giá trị quang phổ khối và quang phổ UV (các hình vẽ FIG.4A và FIG.4B). Các kết quả cho thấy rằng tất cả các giá trị thời gian lưu trên biểu đồ sắc ký HPLC và đặc tính khối phổ và quang phổ UV là tương ứng với các kết quả nêu trên.

Điều này khẳng định rằng đỉnh sắc ký ở khoảng 41 phút trong phân tích HPLC đối với dịch chiết hạt nêu trên là pixeatanol, và hạt quả chanh leo chứa hàm lượng pixeatanol cao. Mặt khác, pixeatanol không phát hiện được từ vỏ và thịt quả của quả chanh leo.

Ví dụ 2: Chiết xuất pixeatanol từ hạt quả chanh leo (1)

Thẩm định phương pháp chiết xuất pixeatanol từ hạt quả chanh leo. Cụ thể là, xác định hiệu suất chiết của hai loại hạt quả chanh leo (trồng tại Nhật Bản và tại các nước khác) sử dụng các dung môi khác nhau.

(1) Chiết bằng dung dịch nước etanol 80%

Bổ sung 50mL dung dịch nước etanol 80% vào 5g bột hạt, và thực hiện chiết siêu âm trong 30 phút. Thu lấy dịch nổi, và lặp lại quy trình chiết hai lần nữa (tổng cộng ba lần). Kết hợp các dịch chiết thu được, và điều chỉnh thể tích đến 200mL bằng dung dịch nước etanol 80%, và lấy 10 μ L dung dịch này để tiến hành phân tích HPLC. Sau đó, định lượng pixeatanol có trong dịch chiết theo phương pháp thông thường, bằng cách ấn định diện tích dưới đỉnh sắc ký của phân tích HPLC theo đường chuẩn dựa trên các nồng độ của chuẩn pixeatanol. Lưu ý rằng, resveratrol cũng được định lượng để tham chiếu theo phương pháp tương tự như được mô tả nêu trên.

(2) Chiết bằng dung dịch nước axeton 70%

Bổ sung 50mL dung dịch nước axeton 70% vào phần bã thu được sau khi chiết bằng dung dịch nước etanol 80% được mô tả nêu trên, và thực hiện chiết siêu âm trong 30 phút. Thu lấy dịch nổi, và lặp lại quy trình chiết hai lần nữa (tổng cộng ba lần). Kết hợp các dịch chiết thu được, và điều chỉnh thể tích đến 200mL bằng dung dịch nước axeton 70%, sau đó định lượng pixeatanol và resveratrol có trong dịch chiết theo phương pháp tương tự như được mô tả nêu trên.

(3) Chiết bằng etyl axetat

Quá trình chiết xuất được thực hiện đối với hạt quả chanh leo (trồng tại các nước khác như được đề cập ở trên) theo phương pháp tương tự như trong trường hợp chiết bằng dung dịch nước ethanol 80% ngoại trừ sử dụng dung môi là etyl axetat, và định lượng pixeatanol và resveratrol chiết được từ 5g bột của hạt được sấy đông khô.

(4) Chiết bằng diclometan

Quá trình chiết xuất được thực hiện đối với hạt quả chanh leo (trồng tại các nước khác như được đề cập ở trên) theo phương pháp tương tự như trong trường hợp chiết bằng dung dịch nước ethanol 80% ngoại trừ sử dụng dung môi là diclometan, và định lượng pixeatanol và resveratrol chiết được từ 5g bột của hạt được sấy đông khô.

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 1. Lưu ý rằng, Bảng 1 thể hiện các giá trị thu được bằng cách chuyển đổi các kết quả của hiệu suất chiết thành hàm lượng pixeatanol và resveratrol chiết được từ 100g bột của hạt được sấy đông khô.

Bảng 1

	Pixeatanol chiết được (mg) được chuyển thành lượng pixeatanol trên 100g hạt được sấy đông khô							
	Mẫu quả chanh leo 1 (trồng tại Nhật Bản)			Mẫu quả chanh leo 2 (trồng tại các nước khác)				
Dung môi chiết	Dung dịch nước ethanol 80% (A)	Dung dịch nước axeton 70% (B)	Tổng (A+B)	Dung dịch nước ethanol 80% (A)	Dung dịch nước axeton 70% (B)	Tổng (A+B)	Etyl axetat	Diclometan
Pixeatanol	63	280	343	65	255	320	14,3	Không phát hiện được
Resveratrol (tham chiếu)	5	10	15	3	15	18	0,6	Không phát hiện được

Như được thể hiện trong bảng 1, thậm chí từ phần bã thu được sau khi chiết bằng dung dịch nước ethanol 80%, pixeatanol được chiết với lượng lớn hơn so với trong trường hợp chiết bằng dung dịch nước ethanol 80%. Mặt khác, trong trường hợp chỉ chiết bằng etyl axetat, hiệu suất chiết thấp, trong khi đó, trong trường hợp chỉ chiết bằng diclometan, không phát hiện được pixeatanol và resveratrol. Do đó, rõ ràng là khi chiết bằng dung dịch nước axeton 70% sẽ thu được hiệu quả cao nhất. Ngoài ra, rõ ràng là khi kết hợp chiết bằng dung dịch nước ethanol 80% và dung dịch nước axeton 70% cũng thu được hiệu suất chiết cao hơn.

Ví dụ 3: Chiết pixeatanol từ hạt quả chanh leo (2)

Thăm định thêm phương pháp chiết xuất pixeatanol từ hạt quả chanh leo. Cụ thể là, khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng nước trong các dung môi có thành phần chính là etanol hoặc axeton đến hiệu suất chiết.

Để khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng nước, pixeatanol và resveratrol chiết được từ 5g bột của hạt quả chanh leo được sấy đông khô (trồng tại các nước khác) được định lượng bằng cách sử dụng etanol hoặc axeton có hàm lượng nước khác nhau làm dung môi chiết theo phương pháp tương tự như trong Ví dụ 2. Lưu ý rằng, dung môi bất kỳ được sử dụng trong ví dụ 2 nêu trên, etyl axetat và diclometan, có độ tương thích với nước kém, và do đó, không thể điều chế được các dung môi có cùng hàm lượng nước như các dung môi có thành phần chính là etanol trong nước hoặc axeton.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 2 dưới đây. Ngoài ra, các kết quả của pixeatanol được thể hiện bằng biểu đồ trên Fig.5. Lưu ý rằng bảng 2 và Fig.5 thể hiện các giá trị thu được bằng cách chuyển đổi các kết quả của hiệu suất chiết thành các lượng pixeatanol và resveratrol chiết được từ 100g bột của hạt được sấy đông khô.

Bảng 2

Lượng pixeatanol chiết được (mg) được chuyển đổi thành lượng pixeatanol trên 100g hạt được sấy đông khô					
Etanol			Axeton		
Hàm lượng nước (được thể hiện theo tỷ lệ phần trăm thể tích etanol)	Pixeatanol	Resveratrol	Hàm lượng nước (được thể hiện theo dạng tỷ lệ phần trăm thể tích axeton)	Pixeatanol	Resveratrol
0	Không phát hiện được	Không phát hiện được	0	Không phát hiện được	Không phát hiện được
20	3,8	0,6	20	27,5	0,8
40	20,8	0,8	40	101,5	3,0
60	33,0	1,5	70	214,4	7,2
80	56,5	2,2	*	*	*
100	7,0	1,1	100	10,7	1,0

*: không có dữ liệu

Như được thể hiện trong bảng 2 và trên Fig.5, trong trường hợp sử dụng etanol, khi chiết bằng dung dịch nước etanol 80% sẽ thu được hiệu quả cao nhất. Trong khi

đó, trong trường hợp sử dụng axeton, chiết bằng dung dịch nước axeton 70% sẽ thu được hiệu quả cao nhất.

Ví dụ 4

Các dịch chiết thu được sau khi loại dung môi trong ví dụ 2 nêu trên (thu được từ quả chanh leo trồng tại các nước khác) được cân để xác định hàm lượng pixeatanol theo hàm lượng chất rắn. Các giá trị thu được được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

Dung môi chiết	Dung dịch nước ethanol 80%	Dung dịch nước axeton 70%
Hàm lượng pixeatanol (% theo khối lượng) tính theo hàm lượng chất rắn trong dịch chiết	2,6	3,7

Như được thể hiện trong Bảng 3, trong trường hợp chiết bằng dung dịch nước ethanol 80%, nồng độ pixeatanol tính theo hàm lượng chất rắn thu được là 2,6 mg/100mg dịch chiết (2,6% theo khối lượng). Trong khi đó, trong trường hợp chiết bằng dung dịch nước axeton 70%, sau khi chiết bằng dung dịch nước ethanol 80%, nồng độ pixeatanol tính theo hàm lượng chất rắn thu được là 3,7 mg/100mg dịch chiết (3,7% theo khối lượng). Do đó, rõ ràng là khi chiết bằng dung dịch nước axeton 70% có thể thu được lượng pixeatanol lớn hơn (như được thể hiện trong các ví dụ 2 và 3) và độ tinh khiết pixeatanol cao hơn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa pixeatanol, chế phẩm này là chiết xuất từ hạt quả chanh leo (*Passiflora edulis*) và chứa pixeatanol với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 50% khối lượng tính theo hàm lượng chất rắn, trong đó chiết xuất này có thể thu được bằng cách chiết với dung môi trong nước, trong đó chế phẩm này được dùng để trộn thích hợp vào mỹ phẩm, thuốc, và thực phẩm hoặc đồ uống như thực phẩm chức năng hoặc thực phẩm bổ dưỡng.

2. Chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm 1, trong đó dung môi trong nước là dung môi có thành phần chính là rượu trong nước hoặc dung môi có thành phần chính là keton trong nước.

3. Chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dung môi trong nước là dung dịch nước etanol hoặc dung dịch nước axeton.

4. Chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm 3, trong đó dung dịch nước etanol chứa etanol với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 99,9% thể tích.

5. Chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm 3, trong đó dung dịch nước axeton chứa axeton với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 99,9% thể tích.

6. Chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 5, trong đó chế phẩm này chứa pixeatanol với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10% khối lượng tính theo hàm lượng chất rắn.

7. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol, phương pháp này bao gồm các bước:

bổ sung dung môi trong nước vào hạt quả chanh leo đã được nghiền thành bột; và

khuấy hỗn hợp này để chiết pixeatanol hòa tan vào dung môi.

8. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm 7, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

bổ sung dung môi có thành phần chính là rượu trong nước hoặc dung môi có thành phần chính là keton trong nước vào hạt quả chanh leo; và

khuấy hỗn hợp này để chiết pixeatanol hòa tan vào dung môi.

9. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm 7 hoặc 8, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

bổ sung một dung môi bất kỳ trong số các dung môi có thành phần chính là rượu trong nước và dung môi có thành phần chính là keton trong nước vào hạt quả chanh leo;

khuấy hỗn hợp này để chiết pixeatanol hòa tan vào dung môi, bằng cách đó thu được dịch chiết lần một;

bổ sung dung môi còn lại trong số dung môi có thành phần chính là rượu trong nước và dung môi có thành phần chính là keton trong nước không được chọn trong bước trên vào phần bã không được thu gom làm dịch chiết;

khuấy hỗn hợp này để chiết pixeatanol hòa tan vào dung môi, bằng cách đó thu được dịch chiết lần hai; và

trộn dịch chiết lần một với dịch chiết lần hai.

10. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 9, trong đó hạt quả chanh leo là hạt thô hoặc hạt đã được sấy khô, thu được bằng cách sấy khô hạt quả chanh leo thô.

11. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 10, trong đó dung môi có thành phần chính là rượu trong nước là dung dịch nước etanol, hoặc dung môi có thành phần chính là keton trong nước là dung dịch nước axeton.

12. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm 11, trong đó dung dịch nước etanol chứa etanol với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 99,9% theo thể tích.

13. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm 11, trong đó dung dịch nước axeton chứa axeton với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 99,9% theo thể tích

14. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 13, trong đó quá trình khuấy từng dung môi được thực hiện bằng cách rung siêu âm hoặc lắc.

15. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 14, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chưng cất loại dung

môi trong điều kiện áp suất giảm sau khi chiết.

16. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 15, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước nghiền chiết xuất từ hạt quả chanh leo thành bột bằng cách sấy đông khô hoặc sấy phun.

17. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 16, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước lọc để loại hợp chất không tan có trong dịch chiết hạt quả chanh leo.

18. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 17, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cắt phân đoạn và tinh chế dịch chiết sơ bộ từ hạt quả chanh leo để cô đặc pixeatanol có trong dịch chiết.

19. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 18, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bào chế chế phẩm này làm mỹ phẩm hoặc thuốc.

20. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa pixeatanol theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 18, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước trộn chế phẩm chứa pixeatanol vào thực phẩm và đồ uống.

FIG. 1A

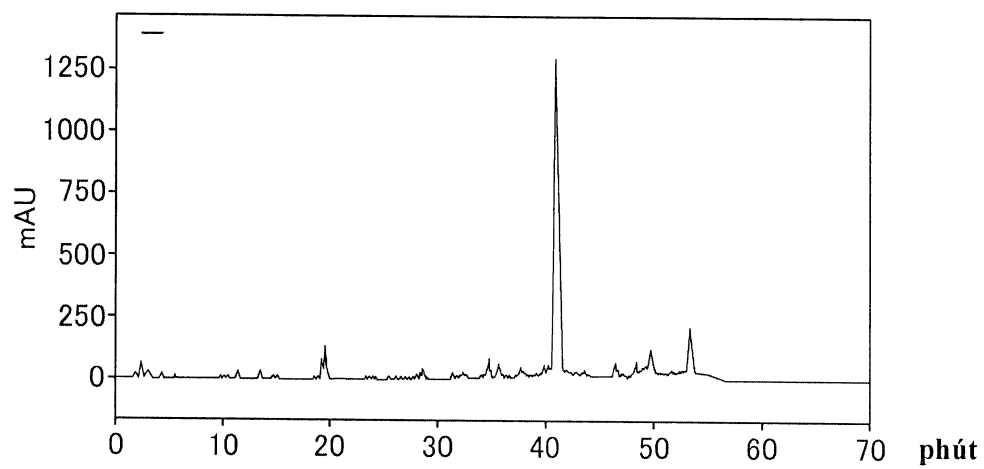


FIG. 1B

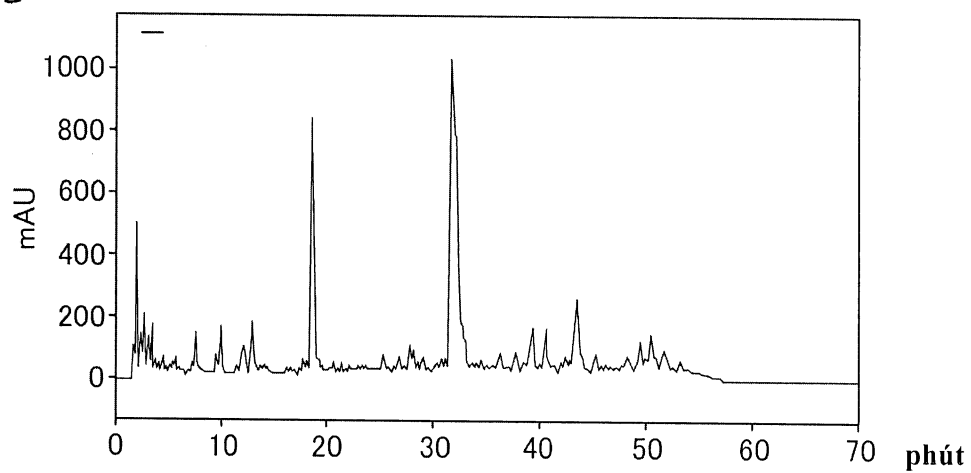


FIG. 1C

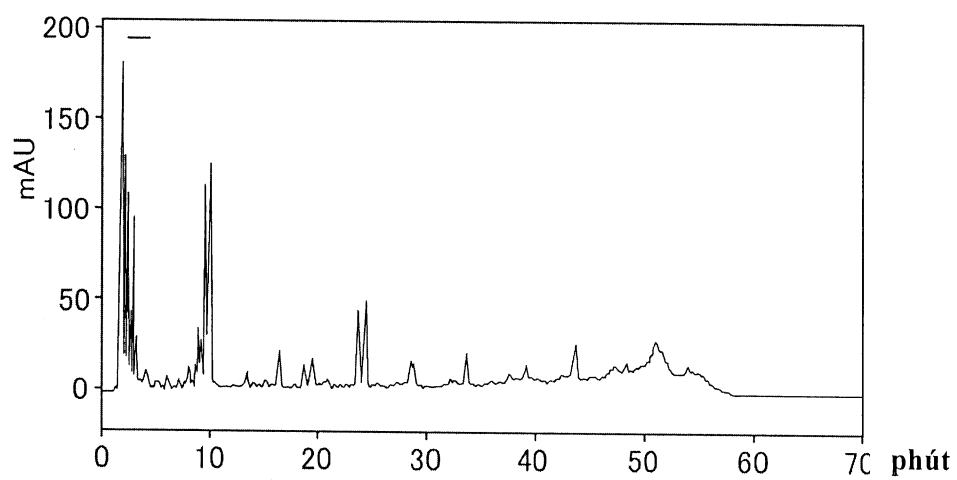
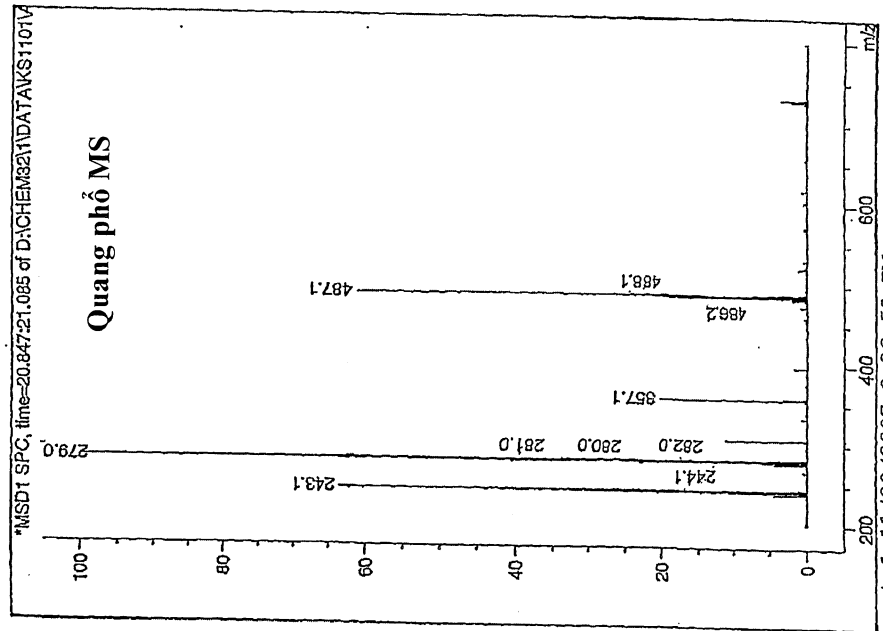


FIG. 2A

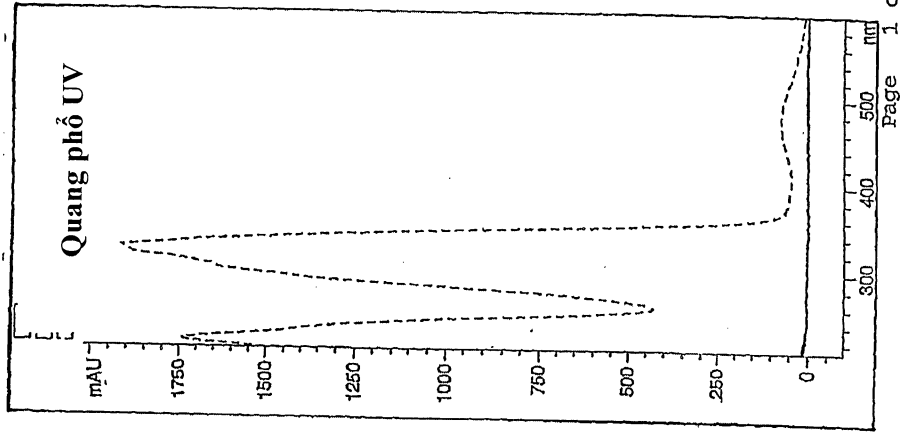
Quang phổ MS



Instrument 1 11/20/2007 2:38:59 PM

FIG. 2B

Phổ tham chiếu (a) + Góc



Page 1 of 1

FIG. 3B

Phổ tham chiếu (a) + Góc

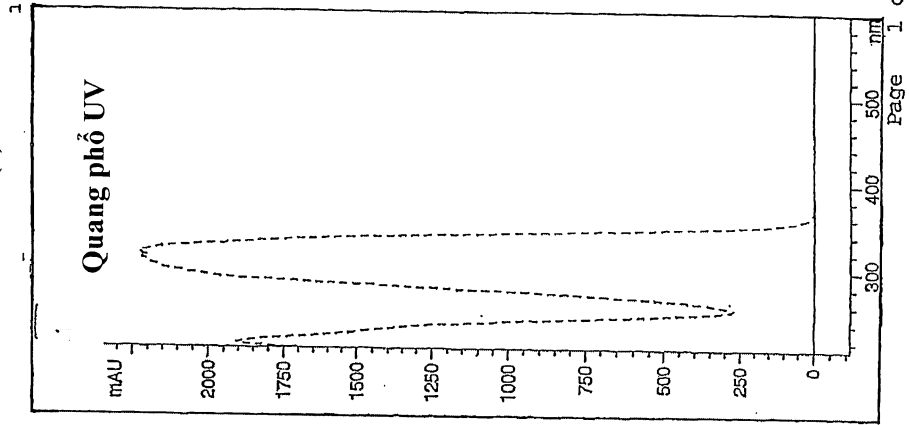
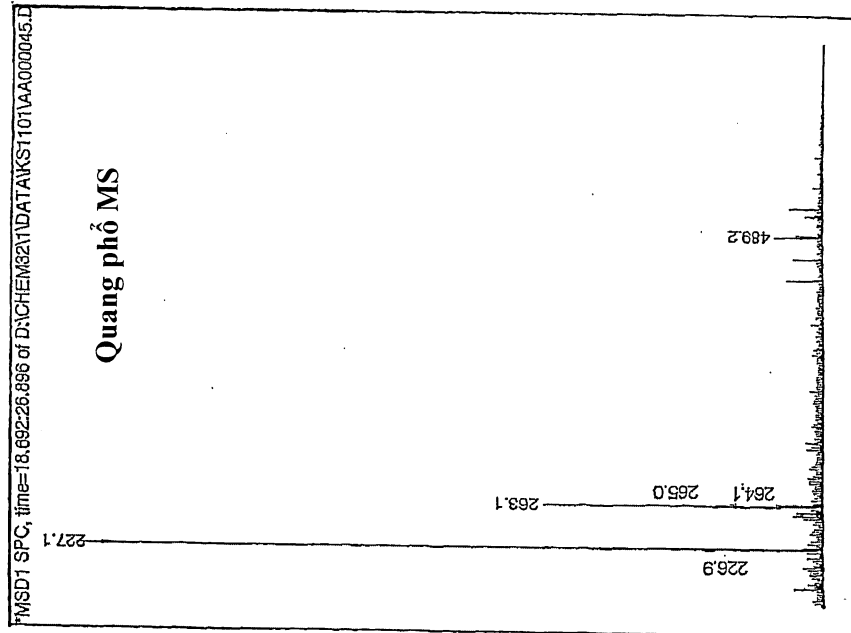


FIG. 3A

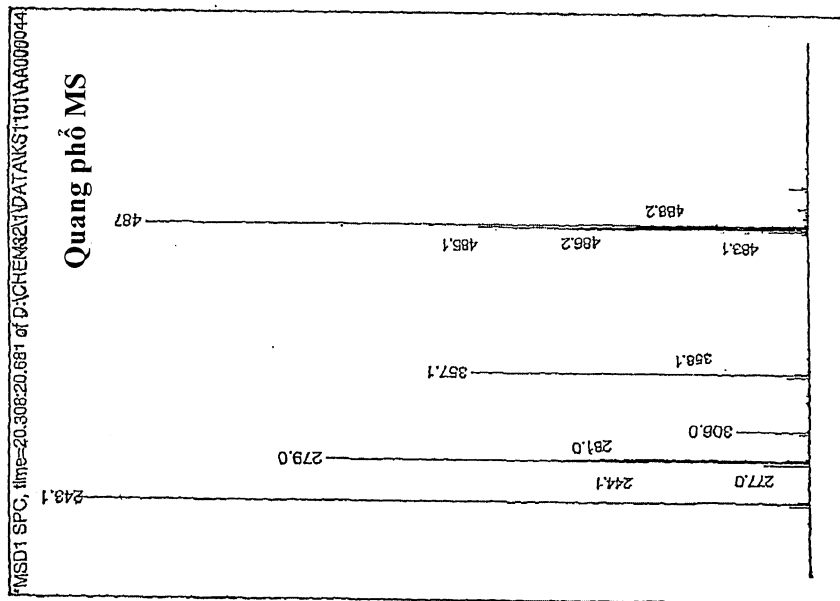
Quang phổ MS



Instrument 1 11/21/2007 10:37:43 AM

FIG. 4A

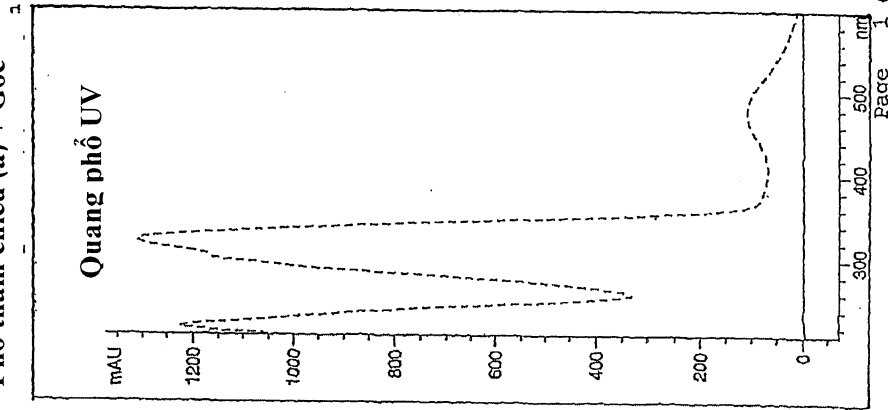
Quang phổ MS



Instrument 1 11/20/2007 4:26:10 PM

FIG. 4B

Phổ tham chiếu (a) + Góc



Page 1 of 1

FIG. 5A

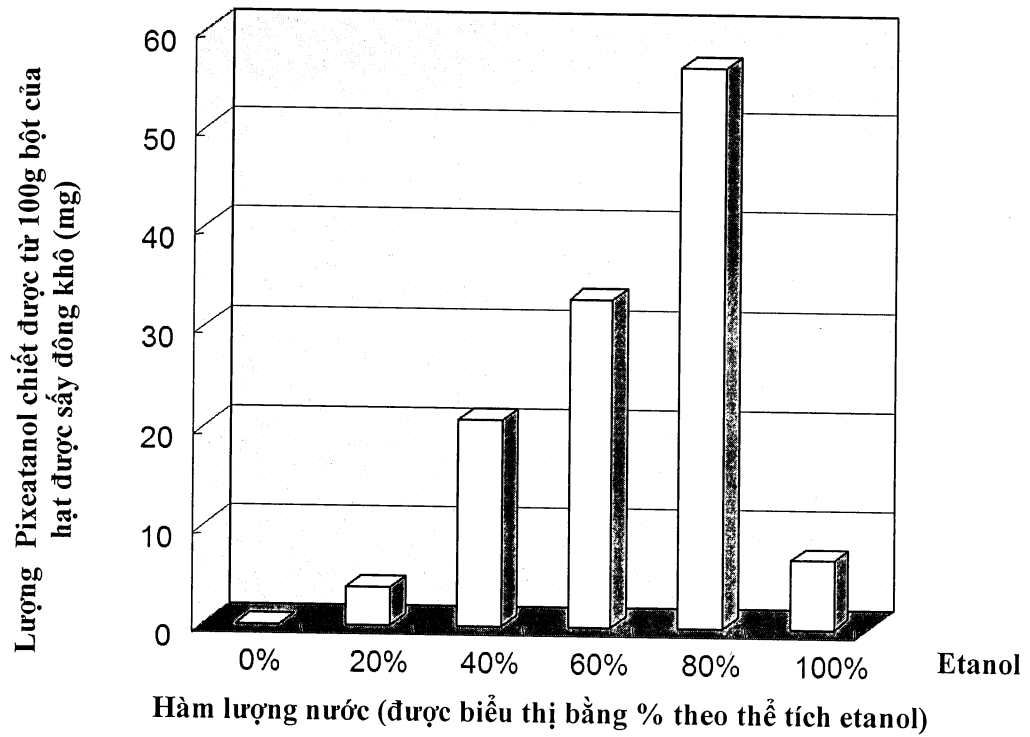


FIG. 5B

