



(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)



1-0023564

(51)⁷

C12P 17/04; A61Q 19/02; C12R 1/85; (13) **B**
A61K 8/49; C07D 307/92

(21) 1-2014-00351

(22) 29/07/2013

(86) PCT/JP2013/070518 29/07/2013

(87) WO2014/080666A1 30/05/2014

(30) 2012-257994 26/11/2012 JP

(45) 27/04/2020 385

(43) 25/09/2015 330A

(73) SHALOM CO., LTD. (JP)

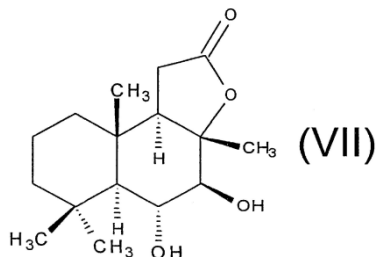
3041-6, Aza tachizawa, Shibokusa, Oshino-mura, Minamitsuru-gun, Yamanashi,
401-0511, Japan

(72) KON Tatsuhiko (JP)

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) HỢP CHẤT ĐITERPEN, CHẤT LÀM TRẮNG DA CHỨA HỢP CHẤT
ĐITERPEN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất điterpen có công thức (VII) là hợp chất điterpen mới có tác dụng làm trắng da. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chất làm trắng da chứa hợp chất điterpen có công thức (VII) và phương pháp sản xuất hợp chất điterpen này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất diterpen mới, chất làm trắng da chứa hợp chất diterpen và phương pháp sản xuất hợp chất diterpen này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Màu da phụ thuộc vào sắc tố melanin có trong da. Sự xuất hiện của các đốm, tàn nhang và sự hình thành sắc tố sau khi cháy nắng dường như là do lượng lắng đọng sắc tố melanin bị tạo ra quá mức bởi UV hoặc tác nhân tương tự. Khi tyrosinaza tác động đến tyrosin trong các tế bào melanin, tyrosin bị biến đổi thành dihydroxyphenylalanin, dihydroxyphenylalaninquinon, dihydroxyphenylalanincrom, và sau đó thành indolquinon, và cuối cùng bị oxy hóa và polyme hóa để trở thành melanin có màu nâu sẫm. Do đó, đối với các thành phần ức chế sự tự tạo ra tàn nhang và các đốm trong cơ thể, cần phải xem xét đến việc ức chế quy trình sản xuất melanin hoặc làm trắng hoặc tẩy melanin đã tạo ra. Các hợp chất đã biết là các chất ức chế hoạt tính tyrosinaza là axit kojic, axit elagic, các hợp chất lưu huỳnh như glutathion, và các chế phẩm hydroquinon, và các hợp chất đã biết là các tác nhân để làm trắng hoặc tẩy melanin đã tạo ra là hydro peroxit, axit ascorbic và các dẫn xuất của chúng. Bên cạnh đó, nằm trong số các hợp chất có tác dụng ức chế sự sản xuất melanin, các chất ức chế sự sản xuất melanin có thể được sử dụng, như nerolidol, isophytol, và geranyllinalool chứa cấu trúc riêng phần là 1-en-3-ol (Tài liệu sáng chế 1) và 13-oxo-14, 15-dinor-8-(17)-labdan được tổng hợp từ nguyên liệu ban đầu là manool (Tài liệu sáng chế 2).

Mặt khác, chiết phẩm từ stevia đã được thông báo là chứa một thành phần làm trắng da (Tài liệu sáng chế 3). Stevia là một loại cây lâu năm thuộc chi *Stevia* của họ Asteraceae có nguồn gốc từ Nam phi. Stevia là một loại cây làm các thành phần tạo ngọt, là các steviol glycosit có khả năng tạo ngọt gấp 300 lần so với khả năng tạo ngọt của sucroza và được sử dụng thay cho đường trong các thực phẩm ăn kiêng, các thực đơn dùng cho bệnh nhân bị bệnh đái tháo đường, và các bệnh tương tự. Các steviol glycosit bao gồm các thành phần như steviosit, rebaudiosit A, rebaudiosit C và dulcosit A. Trong tài liệu sáng chế 3, việc đánh giá được thực hiện về các mức độ ức chế hoạt tính tyrosinaza của phân đoạn chiết trong nước, phân đoạn chiết trong 50% etanol và

phân đoạn chiết trong etanol từ các lá stevia (sản phẩm đã được làm khô) và đã cho thấy rằng các phân đoạn tương ứng có mức độ ức chế hoạt tính tyrosinaza nằm trong khoảng từ 50 đến 58% và tuyệt đối an toàn cho da và có tác dụng làm trắng da.

Ngoài ra, còn có một chất ức chế sự sản xuất melanin có chứa chiết phẩm từ stevia (Tài liệu sáng chế 4). Việc đánh giá được thực hiện với dung dịch chiết đã được tạo ra bằng cách chiết sản phẩm của lá và thân của stevia đã được nghiền thành bột mịn cùng với dung dịch etanol 50% và đã cho thấy rằng dung dịch chiết này có mức độ ức chế sự sản xuất melanin khoảng 20% và có tác dụng ức chế cao hơn so với axit kojic có mức độ ức chế sự sản xuất melanin khoảng 10%.

Hơn thế nữa, cũng có một mỹ phẩm làm trắng da có chứa sophoraflavanon G, xentaureidin và axit ascorbic (Tài liệu sáng chế 5). Đã biết rằng xentaureidin có thể được chiết từ stevia, cỏ thi, yacon, và tương tự, và 1,6g sản phẩm vô định hình chứa xentaureidin được tạo ra từ 5 kg rễ và thân stevia. Mỹ phẩm làm trắng da này được mô tả là có tác dụng làm tăng tác dụng ức chế sự sản xuất melanin của axit ascorbic bởi xentaureidin và sophoraflavanon G để biểu hiện các tác động ngăn ngừa và cải thiện sự hình thành sắc tố một cách không bình thường do viêm và có tác động thứ cấp là cho phép cải thiện đáng kể tình trạng của bề mặt da sau khi tình trạng viêm giảm.

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Patent Nhật số 3236130.

Tài liệu sáng chế 2: Patent Nhật số 4235602.

Tài liệu sáng chế 3: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Kokai số H09-77636.

Tài liệu sáng chế 4: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Kokai số H11-335233.

Tài liệu sáng chế 5: Patent Nhật số 4471722.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Tuy nhiên, các tác động ức chế sự tổng hợp melanin của axit kojic, axit elagic, và các axit tương tự là cực kỳ thấp. Khi hàm lượng thành phần được tăng lên để tạo ra một tác động thỏa đáng, thì sẽ có một giới hạn về tỷ lệ trộn do khả năng hòa tan và các yếu tố tương tự. Ngoài ra, các thành phần được mô tả trong Tài liệu sáng chế 1 và Tài liệu sáng chế 2 đều là các sản phẩm tổng hợp. Do các thành phần làm trắng da có tác động đến da của người, nên tốt hơn là sử dụng thành phần có nguồn gốc tự nhiên để có

tính an toàn mỹ mẫn.

Do vậy, khi tập trung vào stevia ăn được để đảm bảo tính an toàn, các chiết phẩm trong etanol của các lá stevia khô đã biết là có tác dụng ức chế hoạt tính tyrosinaza, như được thể hiện trong Tài liệu sáng chế 3 và Tài liệu sáng chế 4. Ở đây, trong trường hợp sử dụng chiết phẩm trong chế phẩm dùng ngoài da hoặc chỗ tương tự, thì được ưu tiên nếu sử dụng thành phần tinh khiết không chứa các tạp chất bất kỳ khác, nhằm loại bỏ các thành phần dị ứng và các thành phần tương tự. Tuy nhiên, Tài liệu sáng chế 3 tính toán mức độ ức chế hoạt tính tyrosinaza bằng cách sử dụng sản phẩm đông khô nhanh của dung dịch chiết trong etanol như vốn có và không nhận diện hợp chất bất kỳ. Ngoài ra, Tài liệu sáng chế 4 cũng không chỉ ra hợp chất cụ thể bất kỳ. Do đó, việc phát triển một hợp chất mới có tác dụng làm trắng da mỹ mẫn đã và đang là điều mong muốn.

Hơn thế nữa, Tài liệu sáng chế 5 mô tả tác dụng của một thành phần phức hợp được tạo ra bởi việc kết hợp các tác dụng ức chế sự sản xuất melanin của xentaureidin được chiết xuất từ stevia, sophoraflavanon G được chiết xuất từ cây đậu và axit ascorbic, trong đó chỉ duy nhất một thành phần, như xentaureidin, không có tác dụng ức chế sự sản xuất melanin bất kỳ. Do vậy, được mong muốn nếu phát triển một hợp chất mới mà bản thân nó có tác dụng làm trắng da.

Ngoài ra, được mong muốn nếu chất làm trắng da có thể được sử dụng rộng rãi trong nhiều ứng dụng khác nhau, như làm các mỹ phẩm cơ bản và trang điểm và có thể phủ ổn định. Do đó, mong muốn có một phương pháp sản xuất chất làm trắng da như vậy với chi phí thấp.

Vì có các vấn đề nêu trên, một mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất mới có tính an toàn mỹ mẫn và tác dụng làm trắng da mỹ mẫn.

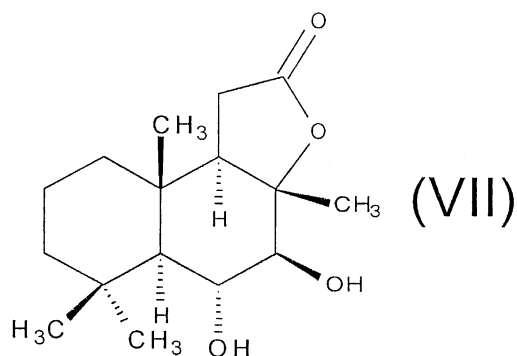
Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm làm trắng da chứa hợp phần hữu hiệu là hợp chất mới có tác dụng làm trắng da mỹ mẫn.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất hợp chất mới có tác dụng làm trắng da mỹ mẫn.

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu cây stevia một cách chi tiết và đã thấy rằng chất lỏng lên men được tạo ra bởi việc lên men cây stevia bằng nấm men chứa một

thành phần khác với các thành phần của cây stevia, và dung dịch lên men bằng nấm men và cây stevia này chứa hợp chất diterpen biểu hiện tác dụng ức chế sự sản xuất melanin cực kỳ cao và có thể sử dụng được làm chất làm trắng da do nó có tính gây độc tế bào thấp, nhờ đó đã tạo ra sáng chế này.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất hợp chất diterpen có công thức (VII) sau đây hoặc muối được dụng của nó.



Ngoài ra, sáng chế đề xuất chất làm trắng da chứa hợp phần hữu hiệu là hợp chất diterpen có công thức (VII) ở trên hoặc muối được dụng của nó.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hợp chất diterpen, khác biệt ở chỗ, nó bao gồm bước tạo ra sản phẩm lên men từ nấm men và cây stevia bằng cách lên men cây stevia hoặc chiết phẩm từ cây stevia bằng nấm men và bước thu hồi hợp chất diterpen có công thức (VII) ở trên từ sản phẩm lên men bằng nấm men và cây stevia.

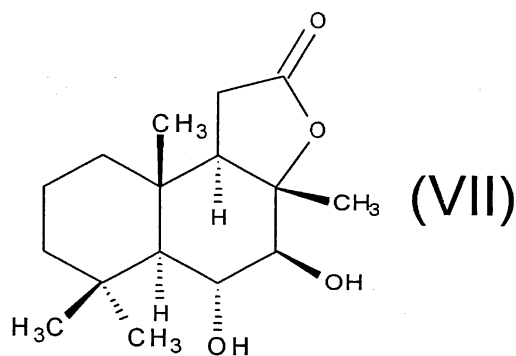
Sáng chế đề xuất hợp chất diterpen mới có công thức (VII). Hợp chất này biểu hiện tác dụng ức chế sự sản xuất melanin mỹ mãn và có thể sử dụng được làm chất làm trắng da.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ minh họa các bước tách và các sản lượng trong quy trình sản xuất hợp chất có công thức (VII) trong Ví dụ 1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất hợp chất diterpen có công thức (VII) dưới đây hoặc muối được dụng của nó.



Trong bản mô tả, thuật ngữ “muối được dụng” chỉ một dạng của muối là hợp chất theo sáng chế, có thể chấp nhận được về mặt dược lý và hầu như không độc cho các đối tượng dùng muối này. Các muối được dụng của hợp chất diterpen bao hàm các muối công bazơ hoặc các muối cộng axit có hệ số tỷ lượng thông thường có nguồn gốc từ các axit hữu cơ hoặc vô cơ hoặc các bazơ vô cơ không độc thích hợp. Các ví dụ về các axit vô cơ thích hợp bao gồm các axit halogen như axit clohydric, axit sulphuric, và axit phosphoric. Các ví dụ về các axit hữu cơ thích hợp bao gồm các axit cacbonic, các axit phosphoric, và các axit sulfonic, như axit axetic, axit propionic, axit glycolic, axit lactic, axit hydroxybutyl, axit malic, axit maleic, axit malonic, axit salixylic, axit fumaric, axit succinic, axit adipic, axit tartric, axit xitric, axit glutaric, axit 2- hoặc 3-glyxerophosphoric, và các axit vô cơ khác đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để tạo ra muối theo một phương pháp thông thường, muối được tạo ra bởi việc cho tiếp xúc dạng bazơ tự do của một hợp chất với một lượng thỏa đáng của axit được mong muốn. Các hợp chất chứa phần tử thay thế axit cũng có thể tạo ra muối bằng cách sử dụng bazơ vô cơ hoặc hữu cơ. Các ví dụ không nhằm giới hạn về các bazơ thích hợp để tạo ra các muối bao gồm các bazơ vô cơ như các hydroxit của các kim loại kiềm hoặc kiềm thổ (ví dụ, natri, kali, lithi, canxi, hoặc magie) và các bazơ có nguồn gốc từ các hydroxit amoni (ví dụ, các hydroxit amoni bậc bốn như tetrametyl amoni hydroxit). Ngoài ra, các muối được tạo ra từ các amin được dụng cũng được xét đến, như amoniac, alkylamin, hydroxyl alkylamin, N-metylglucamin, benzylamin, piperidin, và pyrrolidin. Các hợp chất nhất định, như các hợp chất có nhóm carboxyl hoặc nhóm phenol hydroxyl, có tính axit. Các muối phenol có thể được tạo ra bằng cách gia nhiệt hợp chất có tính axit và bất kỳ trong số các bazơ nêu trên cùng với nhau theo các phương pháp đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Hợp chất nêu trên có thể được tạo ra bởi quá trình tổng hợp hoá học, và ví dụ, có thể được chiết xuất từ sản phẩm lên men bằng nấm men của cây stevia. Theo một phương án đối với cây stevia, chiết phẩm từ cây stevia có thể được sử dụng là đã được điều chế từ trước bởi việc chiết xuất các steviol glycosit và các loại khác từ cây stevia nhờ sử dụng một dung môi như nước. Đặc biệt, theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hợp chất diterpen, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm bước tạo ra sản phẩm lên men từ nấm men và cây stevia bằng cách lên men cây stevia hoặc chiết phẩm từ cây stevia bằng nấm men và bước thu hồi hợp chất diterpen có công thức (VII) từ sản phẩm lên men bằng nấm men và cây stevia.

Nấm men là một vi sinh vật sản xuất cacbon đioxit và rượu từ đường. tác động này được sử dụng để tạo ra các dịch lỏng như rượu xa-kê Nhật bản, bia, và rượu vang, các thực phẩm lên men như sữa đậu nành, tương, pho mát, và kim chi, và bánh mì. Các tác giả sáng chế đã tiến hành phân tích chi tiết dung dịch lên men bằng nấm men được tạo ra bởi việc lên men cây stevia bằng nấm men và đã chỉ ra rằng việc tạo ra hợp chất diterpen có công thức (VII) là một thành phần không có trong cây stevia và có tác dụng làm trắng da cực kỳ mỹ mãn. Tốt hơn, nếu nấm men được sử dụng là loài *Saccharomyces*.

Cây stevia (tên khoa học: *Stevia rebaudiana*) được sử dụng theo sáng chế là một loại cây lâu năm thuộc chi *Stevia* của họ Asteraceae có nguồn gốc từ Nam phi. Các terpenoit glycosit như steviosit và rebaudiosit A được chiết xuất từ cây stevia được sử dụng làm chất làm ngọt và hiện cũng được trồng ở Châu Á như Nhật, Trung quốc, và Hàn quốc. Đặc biệt theo sáng chế, *Stevia Revaudiana Bertoni* và các thực vật cây cùng họ với nó có thể được sử dụng một cách thích hợp. Các ví dụ khác về cây stevia có thể sử dụng được gồm thân và các lá của cây stevia, toàn bộ các phần của cây stevia trước khi nở hoa, và rễ và hoa của cây stevia trưởng thành.

Thuật ngữ “chiết phẩm từ cây stevia”, là mục đích của quá trình lên men, chỉ chiết phẩm được tạo ra bởi quá trình chiết xuất một thành phần đặc thù từ cây stevia nhờ sử dụng nước hoặc dung môi khác. Cây stevia chứa các steviol glycosit có thể sử dụng được làm chất làm ngọt, như các steviol glycosit thô được tạo ra bởi việc chiết xuất các steviol glycosit đậm đặc từ cây stevia nhờ sử dụng nước. Sáng chế có thể sử dụng các steviol glycosit thô như vậy làm chiết phẩm từ cây stevia. Ngay cả trong trường hợp quá trình lên men được tiến hành bằng cách bổ sung nấm men vào chiết

phẩm từ cây stevia, giải pháp theo sáng chế vẫn có thể cho phép thu hồi hợp chất diterpen từ sản phẩm lên men.

Để làm cây stevia được mô tả ở trên, cây stevia thô được thu hoạch ở một thời điểm thích hợp có thể sử dụng hoặc cây stevia được làm khô sau khi thu hoạch cũng có thể được sử dụng. Sản phẩm đã làm khô này là mỹ mãn về khả năng lưu trữ và là thích hợp. Khi nấm men được bổ sung vào stevia đã được làm khô, cây được cắt thành các mẫu nhỏ hoặc được nghiền thành bột tới kích cỡ được định trước bằng cách cắt ngắn, nghiền thành bột, hoặc các phương pháp khác và hỗn hợp này được khuấy, quá trình lên men bắt đầu. Tốt hơn là, cây stevia được sử dụng bằng cách phân riêng các lá và thân của nó.

Khi sản phẩm đã làm khô này được dùng làm nguyên liệu, nước và nấm men được bổ sung bột stevia đã làm khô được tạo ra bằng cách cắt thành các mẫu nhỏ hoặc nghiền thành bột, tiếp đó hỗn hợp này được khuấy và để yên, nhờ đó quá trình lên men có thể được bắt đầu. Lượng nước cần bổ sung chỉ là lượng cần thiết cho quá trình lên men, và đủ để bổ sung một lượng nước cho phép bột được thấm ướt toàn bộ. Cây stevia trước khi lên men có tính ngọt do sự có mặt của các terpenoit glycosit, nhưng khi quá trình lên men xảy ra, tính ngọt bị mất. Theo sáng chế, sự mất tính ngọt được xem như một chỉ báo về sự kết thúc quá trình lên men. Sự mất tính ngọt như vậy xảy ra ở thời điểm từ hai tới ba tuần ở nhiệt độ trong phòng. Nấm men có thể được bổ sung khi bắt đầu cũng như trong quá trình lên men.

Theo sáng chế, quá trình lên men có thể được thực hiện không những bằng cách bổ sung nấm men vào cây stevia mà còn bằng cách sử dụng chiết phẩm từ cây stevia là dung dịch chiết xuất đun sôi được tạo ra bởi việc đun sôi chiết phẩm từ cây stevia đã làm khô được nghiền thành bột, dung dịch ngâm được tạo ra bởi việc ngâm nó trong nước nóng, hoặc một phân đoạn được định trước được chiết xuất từ cây stevia bằng nước hoặc một dung môi khác và bổ sung nấm men vào nó. Ngay cả trong trường hợp này, việc kết thúc quá trình lên men có thể nhận diện được bởi sự mất tính ngọt.

Tiếp theo, sản phẩm lên men bằng nấm men và cây stevia được làm khô. Sản phẩm lên men bằng nấm men stevia chứa nấm men, và việc làm khô sản phẩm lên men có thể cho phép dừng hoạt tính của nấm men. Tốt hơn, nếu việc làm khô được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5 đến 35°C bằng cách làm khô bằng không khí,

làm khô tự nhiên, hoặc một phương pháp khác. Sự phân hủy, sự thoái biến và/hoặc các quá trình khác của các hợp chất được bao gồm trong sản phẩm lên men từ nấm men và cây stevia có thể tránh được.

Sản phẩm lên men bằng nấm men và cây stevia bao gồm hợp chất diterpen theo sáng chế.

Để làm dung môi chiết cho hợp chất diterpen, một dung môi phân cực hoặc dung môi không phân cực có thể được sử dụng. Theo cách khác, hỗn hợp của hai dung môi này có thể được sử dụng. Các ví dụ về dung môi chiết bao gồm nước, các rượu có từ 1 đến 12 nguyên tử cacbon có thể có mạch nhánh, như metanol, etanol, propanol, và butanol, các rượu đa chức như etylen glycol, propylen glycol, và rượu butylen, các keton như axeton và metyl etyl keton, các este như metyl axetat và etyl axetat, các ete như tetrahydrofuran và dietyl ete, các polyete như polyetylen glycol, các halocacbon như điclorometan, clorofom, và cacbon tetraclorea, các hydrocacbon như hexan, xyclohexan, và ete dầu mỏ, các hydrocacbon thơm như benzen và toluen, pyridin, cacbon đioxit siêu tới hạn, các dầu và mỡ, sáp, và các dầu khác. Chúng có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng kết hợp của chúng.

Theo sáng chế, được ưu tiên nếu sử dụng rượu. Các rượu thích hợp gồm các rượu hóa trị một có từ 1 tới 5 nguyên tử cacbon, trong số đó etanol là được ưu tiên đặc biệt. Rượu có thể là rượu trong nước chứa nước. Trong trường hợp sử dụng rượu trong nước, tốt hơn nếu rượu này có nồng độ nằm trong khoảng từ 30 đến 99% (thể tích/thể tích), và tốt hơn nữa là từ 50 đến 90% (thể tích/thể tích). Quá trình chiết xuất bằng rượu hoặc rượu trong nước được tiến hành một cách thích hợp bằng cách bổ sung dung môi với lượng nằm từ 0,1 đến 100 phần khối lượng, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 tới 50 phần khối lượng cho 1 phần khối lượng (khối lượng khô) của sản phẩm lên men bằng nấm men và cây stevia và sau đó ngâm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5 đến 35°C trong khoảng thời gian từ 3 đến 30 ngày.

Sau khi ngâm sản phẩm lên men trong rượu hoặc rượu trong nước, chất rắn và dung dịch chiết được tách bằng cách ly tâm, lọc, hoặc tương tự. Dung dịch chiết này chứa hợp chất diterpen theo sáng chế. Ví dụ, hợp chất này có thể được tách bằng cách loại bỏ dung môi của dung dịch chiết và sau đó tách chất rắn và dung dịch chiết bởi việc thực hiện phân bố lỏng-lỏng, sắc ký cột, sắc ký lỏng, lọc gel, xử lý bằng cacbon

đã hoạt hóa, chưng cất tinh, và/hoặc tương tự ở dạng một mình hoặc ở dạng kết hợp. Chúng có thể được chọn khi cần tùy thuộc vào loại dung môi chiết được sử dụng và tương tự. Do hợp chất diterpen là một thành phần ưa chất béo, nên hợp chất này có thể được tách một cách hiệu quả bằng cách chiết xuất bằng một dung môi ưa chất béo có khả năng hoà tan hợp chất diterpen và sau đó tinh chế chiết phẩm này.

Các ví dụ về dung môi ưa chất béo có khả năng hoà tan hợp chất diterpen như vậy bao gồm các halocacbon như điclorometan, clorofom, và cacbon tetraclorea, các hydrocacbon như hexan, xyclohexan, và ete dầu mỏ, và các hydrocacbon thơm như benzen và toluen. Theo sáng chế, clorofom có thể được sử dụng một cách thích hợp. Điều này là do quá trình chiết xuất bằng dung môi có thể được áp dụng cho các hệ thống có công suất lớn và cũng mỹ mãn về hiệu quả thu hồi hợp chất diterpen. Dung dịch chiết xuất bằng dung môi ưa chất béo có thể sử dụng được làm phân đoạn ưa chất béo bằng cách loại bỏ dung môi. Theo cách khác, dung dịch chiết xuất bằng dung môi ưa chất béo có thể được rửa bằng nước và sau đó dung môi ưa chất béo có thể được sử dụng để tạo ra phân đoạn ưa chất béo.

Theo một phương án về các dung môi ưa chất béo, dung dịch hỗn hợp dung môi ưa chất béo/dung môi ưa nước có thể được sử dụng để chiết xuất được điều chế bằng cách bổ sung dung môi ưa nước với lượng nằm trong khoảng từ 60 đến 100 phần thể tích, như nước, rượu có từ 1 tới 3 nguyên tử cacbon như metanol hoặc etanol, rượu đa chức như etylen glycol, keton như axeton hoặc metyl etyl keton, este như metyl axetat hoặc etyl axetat, ete như tetrahydrofuran hoặc dietyl ete, hỗn hợp của bất kỳ trong số các dung môi này, hoặc tương tự, cho 100 phần khối lượng của dung môi ưa chất béo. Dung môi ưa chất béo và dung môi ưa nước có thể được phân tách thành hai lớp bởi việc để yên hỗn hợp của chúng sau khi trộn. Bằng cách kết hợp một dung môi ưa chất béo như vậy và một dung môi ưa nước như vậy, đối tượng được mong muốn có thể được chuyển vào lớp dung môi ưa chất béo, cũng như axit axetic và các thành phần tan trong nước khác được bao gồm trong sản phẩm lên men bằng nấm men và cây stevia có thể được chuyển vào lớp dung môi ưa nước. Dung môi ưa chất béo như vậy có thể là clorofom, và dung môi ưa nước như vậy có thể là nước hoặc metanol. Khi dung dịch hỗn hợp được điều chế bằng cách trộn clorofom và nước theo tỷ lệ 9: từ 3,5 tới 5 (tỷ lệ thể tích) được để yên sau khi chiết xuất, dung dịch này được phân tách thành lớp clorofom và lớp nước. Do đó, thành phần được mong muốn có thể được thu hồi trong

lớp clorofom, cũng như dung môi ưa nước có thể được chuyển vào lớp nước, nhờ đó tách thành phần được mong muốn ra khỏi các thành phần tan trong nước một cách dễ dàng.

Hợp chất diterpen mới theo sáng chế có thể được thu hồi từ phân đoạn ưa chất béo nhờ sử dụng phương pháp đã biết. Để tinh chế, ví dụ, bằng cách sử dụng sắc ký cột silicagel hoặc sắc ký cột đảo pha, hợp chất diterpen có thể được tách ra khỏi các thành phần khác trên cơ sở sự khác nhau về tính phân cực hoặc tùy thuộc vào trọng lượng phân tử. Theo cách khác, việc tinh chế bởi sự khác nhau về độ tan hoặc tương tự có thể được thực hiện nhờ sử dụng một loạt dung môi có độ tan khác nhau. Hợp chất diterpen theo sáng chế có tác dụng ức chế sự sản xuất melanin mỹ mãn. Do vậy, thành phần được mong muốn có thể được tinh chế bằng cách kiểm tra sự có mặt hay không của các tạp chất trong các phân đoạn tương ứng bằng TLC và các kỹ thuật khác và đồng thời đánh giá các tác dụng ức chế sự sản xuất melanin của nó để sử dụng các kết quả như một chỉ báo.

Theo khía cạnh thứ ba của sáng chế là đề xuất chất làm trắng da chứa hợp phần hữu hiệu là hợp chất diterpen có công thức (VII). Hợp chất diterpen theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế có tác dụng ức chế sự sản xuất melanin mỹ mãn và tính gây độc tế bào thấp, như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả ở dưới. Do đó, hợp chất này có thể sử dụng được làm chất ức chế sự sản xuất melanin và chất làm trắng da. Chất làm trắng da theo sáng chế có thể để cung cấp qua da như bôi, cũng như để cấp qua đường miệng, bao gồm cung cấp qua miệng và cung cấp dưới lưỡi.

Các ví dụ về các dạng liều lượng để sử dụng bên ngoài của chất làm trắng da bao gồm thuốc mỡ, các dịch lỏng, chế phẩm phun, cao dán, các dầu và mỡ, và bột. Chất làm trắng da có thể bất kỳ trong số các mỹ phẩm cơ bản như kem dưỡng da, nhũ tương, kem bôi, và kem đắp, các mỹ phẩm trang điểm như nền trang điểm, kem chống nắng, kem nền, và phấn bôi mặt, các chế phẩm làm sạch như dầu gội đầu và chất tẩy trang, và tương tự. Lượng hợp chất diterpen để trộn trong các chất làm trắng da này có thể được chọn theo nhu cầu tùy thuộc vào chất nền, và nằm trong khoảng từ 0,000001 đến 20% khối lượng, tốt hơn là từ 0,00001 đến 10% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,0001 đến 5% khối lượng, và cụ thể là tốt hơn là từ 0,0001 đến 3% khối lượng.

Để làm các thành phần khác để tạo ra chất làm trắng da, các thành phần được

trộn trong các thành phần làm trắng da thông thường như các mỹ phẩm, quasi-drug (gần như thuốc), và dược phẩm có thể được trộn tùy thuộc vào dạng liều lượng và tương tự. Các ví dụ về các thành phần như vậy bao gồm các chất bảo quản như paraoxy methyl benzoat, paraoxy propyl benzoat, phenoxyetanol, và thymol, các chất chống oxy hóa như natri hydro sulfite, axit ascorbic, tocopherol, dibutyl hydroxyltoluen, dinatri edetat hydrat, và benzotriazol, các chất hoạt động bề mặt như glyceryl monostearat, sorbitan monostearat, poly(oxyetylen) dầu thầu dầu đã hydro hóa 60, và polysorbat 60, các chất điều chỉnh pH như axit citric hydrat, natri xitrat hydrat, men, diisopropanolamin, axit axetic, và natri axetat hydrat, chất làm ẩm, các chất làm đặc, các chất độn vô cơ, các chất tạo màu, các chất tạo hương vị, các chất hấp thụ UV, các chất hoạt hóa tế bào, và các thành phần bổ dưỡng cho da khác. Ngoài ra, chất nền và tương tự có thể được bổ sung khi cần để điều chế bất kỳ trong số chế phẩm lỏng để sử dụng bên ngoài, chế phẩm rắn để sử dụng bên ngoài, chất phun xịt, thuốc mỡ, kem bôi, kem gel, cao dán, và các loại khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

(1) Tạo ra sản phẩm lên men bằng nấm men và cây stevia

Cây stevia đã làm khô được tạo ra bằng cách làm khô thân và lá của cây stevia (tên khoa học: *Stevia rebaudiana*) được thu hoạch từ Hokkaido ở Nhật đã được nghiền thành các mảnh nhỏ có kích cỡ khoảng 1cm hoặc nhỏ hơn. 2000g cây stevia đã nghiền thành bột này được bổ sung 45g nấm men (*Saccharomyces*) và 4500g nước, và khi hỗn hợp này được khuấy dưới điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 35°C, quá trình lên men được bắt đầu. Hỗn hợp này được để yên ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 35°C trong 14 ngày để thực hiện quá trình lên men. Việc mất tính ngọt của sản phẩm lên men, sẽ được xem là kết thúc quá trình lên men. Sản phẩm quá trình lên men thu được được làm khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 35°C trong 10 ngày, và quá trình lên men bằng nấm men được dừng lại.

(2) Chiết bằng ethanol trong nước

Toàn bộ lượng sản phẩm lên men đã được làm khô được bổ sung vào lượng gồm 28,5% (thể tích/thể tích) ethanol gấp 10 lần khối lượng của sản phẩm, và trong khi khuấy nhẹ hỗn hợp này, ethanol được thấm vào sản phẩm ở nhiệt độ trong phòng trong

vài ngày. Sau khi thẩm, hỗn hợp này được lọc qua bộ lọc có kích cỡ lưới lọc khoảng 140. Phần dịch lọc thu được được cô dưới áp suất giảm (60mmHg) ở khoảng 60°C và được hấp phụ vào trong cột DIAION-HP20, tiếp đó được rửa giải bằng dung dịch etanol trong nước 85,5%. Dung dịch thu được được sử dụng làm dung dịch chiết etanol trong nước.

(3) Chiết bằng clorofom

Dung môi được chưng cất ra khỏi dung dịch chiết etanol trong nước, và sau đó chiết phẩm thu được (40g) được sử dụng là sản phẩm lên men stevia, mà 1000mL clorofom được bổ sung vào đó để thực hiện quá trình chiết xuất ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 23 đến 28°C (nhiệt độ trong phòng). Phần cặn được lọc ra, và lớp clorofom được cất phân đoạn. Sau đó, dung môi được chưng cất ra để tạo ra dung dịch chiết clorofom (12,1g).

(4) Phân lập đối tượng được mong muốn

Dung dịch chiết clorofom (12,1g) thu được ở trên (3) được tách thành 10 phân đoạn bằng cách sắc ký cột silicagel sắc ký cột với các điều kiện tách ở dưới (1).

Các điều kiện tách (1):

Cột: đường kính trong 7cm, cao 22cm

Chất độn: silicagel (Silica Gel 60 N (dạng hình cầu, trung tính), cỡ hạt nằm trong khoảng từ 63 đến 210 μ m, được sản xuất bởi hãng KANTO CHEMICAL Co., Inc.), 320g

Dung môi rửa giải: các dung dịch hỗn hợp của clorofom:metanol = 100:1 $\rightarrow$ 50:1 $\rightarrow$ 30:1 $\rightarrow$ 15:1 $\rightarrow$ 7:1 $\rightarrow$ 5:1 $\rightarrow$ 0:1 được sử dụng làm các dung môi rửa giải, 1000mL của mỗi dung dịch này được cấp lần lượt vào cột, và 200mL của mỗi dung dịch này được thu gom dưới dạng phân đoạn.

Các phân đoạn được thu gom: các chất trong bình cầu tương ứng được thu gom bằng cách cất phân đoạn được tiến hành TLC (MERCK Silica Gel 60 F₂₅₄). Trong phép TLC, sau khi hiện hình đĩa TLC bằng dung môi clorofom:metanol=10:1, đĩa này được phun bằng 50% axit sulphuric và được gia nhiệt ở 110°C để phát hiện các vết hợp chất. Trên cơ sở các kết quả phát hiện, dung dịch chiết được cất phân đoạn thành 10 phân đoạn từ a tới j có các vết tương đương. Bảng 1 thể hiện các sản lượng của các

phân đoạn tương ứng.

Phân đoạn d (1,784mg) được tách thành 6 phân đoạn bằng cách sắc ký cột silicagel có các điều kiện tách được thể hiện ở dưới (2).

Các điều kiện tách (2):

Cột: đường kính trong 5,2cm, cao 20cm

Chất độn: silicagel (Silica Gel 60 N (dạng hình cầu, trung tính), cỡ hạt nằm trong khoảng từ 63 đến 210 μ m, được sản xuất bởi hãng KANTO CHEMICAL Co., Inc.), 160g

Dung môi rửa giải: các dung dịch hỗn hợp của n-hexan: axeton = 7:1 $\rightarrow$ 4:1 $\rightarrow$ 2:1 $\rightarrow$ 1:1 $\rightarrow$ 0:1 được sử dụng làm các dung môi rửa giải, 700mL của mỗi dung dịch này được cấp lần lượt vào trong cột này, và 150mL của mỗi dung dịch này được thu gom dưới dạng phân đoạn.

Các phân đoạn được thu gom: các chất trong bình cầu tương ứng được thu gom bằng cách cắt phân đoạn được tiến hành TLC (MERCK Silica Gel 60 F₂₅₄). Trong phép TLC, sau khi hiện hình đĩa TLC bằng dung môi clorofom:metanol = 10:1, đĩa này được phun bằng 50% axit sulphuric và được gia nhiệt ở 110°C để phát hiện các vết hợp chất. Trên cơ sở các kết quả phát hiện, phân đoạn d được cắt phân đoạn thành 6 phân đoạn từ d-1 tới d-6 có các vết tương đương. Sự kết tủa xuất hiện trong phân đoạn d-4 và sau đó được lọc ra. Do phần dịch lọc (d-4-fil.) của phân đoạn d-4 và phân đoạn d-5 được quan sát là có các vết có các giá trị RF tương đương của TLC, d-4-fil., và d-5 cùng được kết hợp thành một phân đoạn. Phân đoạn này được gọi là “d-(4, 5)”. Sản lượng của d-(4, 5) là 380,9mg. d-(4, 5) được thực hiện để phân lập một vết chính trong quá trình tách dưới đây (3).

Phân đoạn d-(4, 5) (380,9mg) được cắt phân đoạn thành 7 phân đoạn bằng cách sắc ký cột silicagel có các điều kiện tách được thể hiện ở dưới (3).

Cột: đường kính trong 1,0cm, cao 21cm

Chất độn: silicagel (YMC GEL ODS-A, 12 nm, S-75 μ m, AA12S75), 16g

Dung môi rửa giải: các dung dịch hỗn hợp của nước:metanol = 5:5 (100mL) $\rightarrow$ 4:6 (100mL) $\rightarrow$ 3:7 (100mL) $\rightarrow$ 2:8 (100mL) $\rightarrow$ 0:1 (100mL) được sử dụng làm các

dung môi rửa giải, 700mL của mỗi dung dịch này được cấp lần lượt vào trong cột này, và 20mL của mỗi dung dịch này được thu gom dưới dạng phân đoạn.

Các phân đoạn được thu gom: các chất trong bình cầu tương ứng được thu gom bằng cách cất phân đoạn được tiến hành TLC (MERCK Silica Gel 60 F₂₅₄). Trong phép TLC, sau khi hiện hình đĩa TLC bằng dung môi nước:metanol =10:1, đĩa này được phun bằng 50% axit sulphuric và được gia nhiệt ở 110°C để phát hiện các vết hợp chất. Trên cơ sở các kết quả phát hiện, phân đoạn này được cất phân đoạn thành 7 phân đoạn từ d-(4, 5)-1 tới d-(4, 5)-7 có các vết tương đương. Phân đoạn d-(4, 5)-3 được quan sát là có một vết đơn, và sau đó dung môi của phân đoạn này được chưng cất ra để tạo ra bột màu trắng (29,1mg), nó được ký hiệu là Hợp chất VII.

(5) Xác định cấu trúc

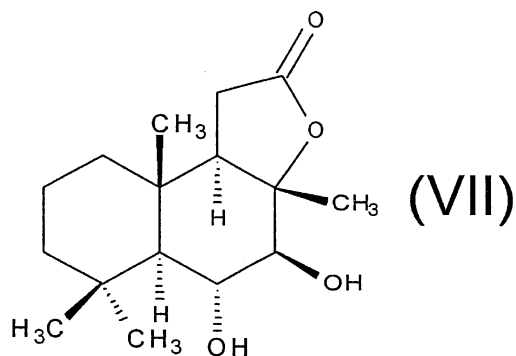
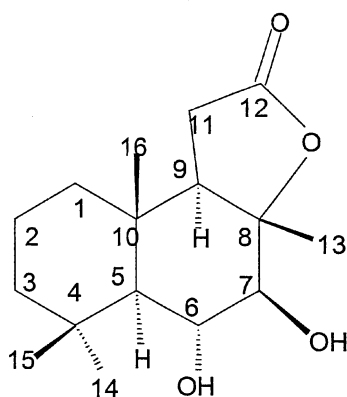
Bột màu trắng này được tiến hành phân tích ¹H-NMR và ¹³C-NMR. Bảng 1 thể hiện các kết quả. Từ các mẫu hình tín hiệu trong phép phân tích ¹H-NMR và ¹³C-NMR, có thể thấy rằng hợp chất này có 16 nguyên tử cacbon và nhân A và nhân B của nó có cùng cấu trúc với các nhân của sterebin A đã được công bố là được tách ra từ stevia, đồng thời nhân C- và các nhân kế tiếp có cấu trúc khác nhau. Do vậy, sự hiệu chỉnh giữa HMQC và HMBC được kiểm tra một cách chi tiết, kết quả là sự hiệu chỉnh với HMBC được thể hiện trong Bảng 1 được quan sát, nhờ đó hợp chất này cuối cùng được xác định là hợp chất diterpen có công thức (VII) ở dưới. Khung chính và các chỉ số vị trí của hợp chất này được chỉ ra trong Bảng 1 ở dưới.

Bảng 1

Dữ liệu NMR của Hợp chất VII trong CDCl_3

Vị trí	δC	đa vạch	δH (đa vạch, J tính theo Hz)	^1H - ^1H COSY	NOESY	HMBC
1	39,1	CH_2	1,07 (1H, m) 1,42 (1H, m)			9, 18
2	17,9	CH_2	1,25 (1H, m) 1,48 (1H, m)			
3	43,2	CH_2	1,24 (1H, m) 1,47 (1H, m)			1
4	33,9	qC				
5	58,9	CH	1,28 (1H, m)	6	7, 9	6, 10
6	73,0	CH	3,73 (1H, m)	5	13, 15	7
7	81,5	CH	3,70 (1H, m)		5, 9, 14	6
8	87,7	qC				
9	56,2	CH	2,01 (1H, dd, J= 14,7, 6,7)		5, 7	1, 5, 8, 10, 11, 16
10	35,4	qC				
11 α β	28,4	CH_2	2,29 (1H, dd, J= 16,1, 6,8) 2,49 (1H, dd, J= 16,1, 14,7)			8, 12 9, 12
12	176,3	qC				

13	17,9	CH ₃	1,35 (3H, s)		6, 11 β , 16	7, 8, 9
14	35,7	CH ₃	1,17 (3H, s)		7	3, 4
15	22,1	CH ₃	1,00 (3H, s)		6	3, 4, 14
16	16,4	CH ₃	0,97 (3H, s)		6, 11 β , 13	1, 9



Ví dụ 2

Liên quan tới hợp chất được tạo ra ở Ví dụ 1, số lượng tế bào u melanin B16 sống được đếm, và lượng sản xuất melanin cho mỗi dung dịch được đo, nhờ đó tính toán được lượng sản xuất melanin cho mỗi tế bào sống ($\text{ng}/10^4$ tế bào) theo các phương pháp đo dưới đây để tính toán lượng sản xuất melanin trên số lượng tế bào và mức độ sản xuất melanin so với đối chứng. Ngoài ra, nồng độ melanin bởi hợp chất có công thức (VII) theo lượng sản xuất melanin ($\text{ng}/10^4$ các tế bào) cho mỗi tế bào sống

trong đối chứng được tính toán. Bảng 2 thể hiện các kết quả. Nồng độ của hợp chất là 100 μ M, và 1000 μ M axit kojic để so sánh được xử lý theo cùng cách.

(Phương pháp đo)

Các phương pháp để tính toán lượng sản xuất melanin trên số lượng tế bào và mức độ sản xuất melanin so với đối chứng là như sau.

Môi trường được loại bỏ ra khỏi các tế bào u melanin của chuột nhắt B16 đã được nuôi cấy qua đêm trong đĩa 6 lỗ, mỗi lỗ này được bổ sung 2mL môi trường 10%-FBS-DMEM (nồng độ cuối của DMSO được sử dụng để hoà tan mẫu: 0,1%) theophylline (nồng độ cuối: 10mM) được cho vào nó và mẫu có nồng độ được mong muốn được bổ sung.

Các tế bào được nuôi cấy ở 37°C với sự có mặt của 5% CO₂ trong 72 giờ. Sau đó, môi trường được loại bỏ và các tế bào được rửa hai lần bằng nước muối được đệm phosphat đẳng trương độ pH 7,4 (PBS). Mỗi lỗ này được bổ sung 200 μ l dung dịch 0,25% trypsin-EDTA để xử lý bằng trypsin; sau đó, 1mL môi trường được bổ sung vào đó; và toàn bộ lượng dung dịch tế bào được thu gom trong ống ly tâm loại 15mL. Sau khi quay ly tâm dung dịch tế bào này với 1000 vòng/phút trong 5 phút, dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và 2mL PBS được bổ sung để tạo ra huyền phù một lần nữa, 200 μ l huyền phù này được chuyển vào vi ống để đếm số lượng tế bào nhờ sử dụng máy đếm tế bào (SCEPTER (nhãn hiệu hàng đã đăng ký) được sản xuất bởi hãng Milipore Corporation). Dung dịch tế bào còn lại cũng được ly tâm trong cùng một điều kiện, tiếp đó dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ, và 1mL 1M NaOH được bổ sung, tiếp đó là xử lý trong bể nước ở 80°C trong 1 giờ. Mức độ hấp thụ của phần cô chất dung giải tế bào được đo ở bước sóng 475nm nhờ sử dụng IMMUNO MINI NJ-2300 (được sản xuất bởi hãng Cosmo Bio Co., Ltd.) để tính toán lượng sản xuất melanin trên số lượng tế bào. Melanin tổng hợp (được sản xuất bởi hãng Sigma-Aldrich Co. LLC.) đã hòa tan trong 1M NaOH được sử dụng cho đường cong chuẩn. Dữ liệu được đại diện bởi mức độ sản xuất melanin trên số lượng tế bào và phần trăm tế bào sống khi các giá trị của nhóm đối chứng (môi trường được bổ sung 1mM theophylline) được xem là 100%, và dữ liệu tương ứng được trình bày theo giá trị $\pm$ độ lệch chuẩn (n = 3). Ngoài ra, việc phân tích biến số (ANOVA) và thử nghiệm đa so sánh (Phương pháp Dunnet) được sử dụng cho phép phân tích thống kê.

Bảng 2

	Đối chứng	Axit kojic (1000 μ M)	Hợp chất có công thức (VII) (100 μ M)
Lượng sản xuất melanin (μ g/ml)	$71,6 \pm 6,3$	$32,7 \pm 1,1$	$13,0 \pm 3,3$
Số lượng tế bào sống ($\times 10^4$ /ml)	$84,4 \pm 1,7$	$91,3 \pm 0,9$	$80,7 \pm 2,8$
Khả năng sống sót tế bào (%)	100	$108,2 \pm 1,1$	$95,6 \pm 3,3$
Lượng sản xuất melanin (ng/ 10^4 các tế bào)	$849,2 \pm 91,9$	$358,1 \pm 13,4$	$162,1 \pm 43,8$
Nồng độ melanin so với đối chứng (%)	100	$42,2 \pm 1,6^{***}$	$19,1 \pm 5,2^{***}$

***: sai khác đáng kể so với đối chứng ($p < 0,001$)

Sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án được mô tả ở trên, và các cải biến khác nhau và các ứng dụng có thể được đưa ra. Ngoài ra, các dấu hiệu riêng lẻ của ở trên phương án có thể được kết hợp tự do với nhau.

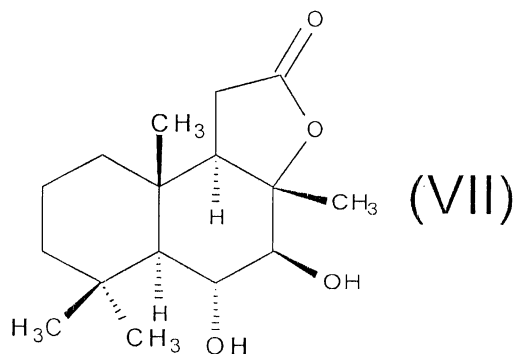
Sáng chế này dựa trên cơ sở đơn yêu cầu cấp patent Nhật No. 2012-257994 nộp ngày 26/11/2012, mà toàn bộ Phần mô tả, Yêu cầu bảo hộ, và các hình vẽ được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

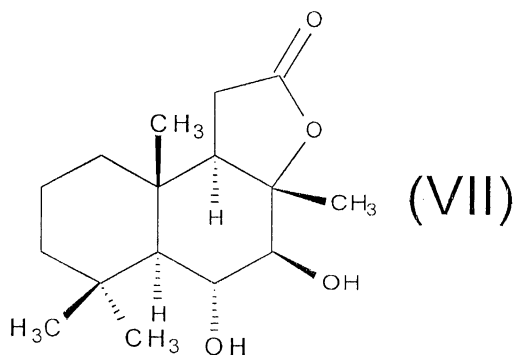
Hợp chất diterpen mới theo sáng chế có mức độ sản xuất melanin thấp hơn so với axit kojic đã biết là một chất ức chế sự sản xuất melanin và do vậy có thể biểu hiện tác dụng làm trắng da mỹ mãn, cũng như mỹ mãn về tính an toàn và hữu ích do hợp chất diterpen là hợp chất có nguồn gốc từ sản phẩm tự nhiên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất diterpen có công thức (VII) hoặc muối được dụng của nó:



2. Chất làm trắng da chứa hợp chất diterpen có công thức (VII) hoặc muối được dụng của nó:

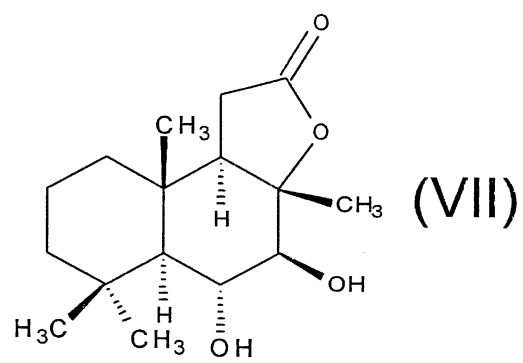


3. Phương pháp sản xuất hợp chất diterpen, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước:

tạo ra sản phẩm lên men từ nấm men và cây stevia bằng cách lên men cây stevia hoặc chiết phẩm từ cây stevia bằng nấm men; và

thu hồi hợp chất diterpen có công thức (VII) từ sản phẩm lên men bằng nấm men và cây stevia:

23564



[FIG.1]

