



(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)



**2-0002473**

(51) A61K 36/38  
2018.01

(13) **Y**

---

(21) 2-2018-00462

(22) 14/11/2018

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/01/2019 370A

(73) Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)  
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Đỗ Thị Tuyên (VN); Lê Minh Trí (VN); Đoàn Thanh Huyền (VN); Hoàng Thanh Thi  
(VN); Lưu Hồng Hạnh (VN); Trần Trọng Quân (VN).

---

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT PHYTOSOM MANGOSTIN TỪ VỎ QUẢ MĂNG CỤT  
(*GARCINIA MANGOSTANA* L.)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phytosom mangostin từ vỏ quả măng  
cụt (*Garcinia Mangostana* L.), trong đó quy trình này bao gồm các bước: tinh sạch hoạt  
chất  $\alpha$ - mangostin từ vỏ quả măng cụt; thu hỗn hợp chứa  $\alpha$ - mangostin; và thu phức chất  
phytosom mangostin.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất phytosom mangostin từ vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L.).

### Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hoạt chất  $\alpha$ -mangostin là một chất được tách chiết từ vỏ quả măng cụt, chiếm hàm lượng rất cao trong vỏ quả khoảng 0,02 % đến 0,2 % trọng lượng khô. Chất được biết đến với danh pháp quốc tế là: 1,3,6-trihydroxy-7-metoxi-2,8-bis (3-metylbut-2-enyl) xanten-9-on, có công thức phân tử là  $C_{24}H_{26}O_6$  và khối lượng phân tử 410,46 g/mol. Là tinh thể có màu vàng, có nhiệt độ nóng chảy khoảng từ 181,6-182,6 °C, chất được coi là gần như không tan trong nước do nồng độ tan rất thấp chỉ khoảng  $2,03 \times 10^{-4}$  mg/L ở 25°C (Aisha et al., 2012), tuy nhiên lại có thể tan trong các chất như rượu, axeton, clorofom, etyl axetat (Phùng Thị Mỹ Hạnh (2011)).

Hoạt chất  $\alpha$ -mangostin có cấu trúc điển hình của một hợp chất xanton. Trong đó các hợp chất xanton được biết đến như là các chất chống oxi hóa mạnh, có cấu trúc mạch phẳng gồm các vòng 6 cacbon nối với nhau bởi nhóm carboxyl và nguyên tử oxi tạo thành khung xương chính của phân tử. Cấu trúc này có dạng giống cấu trúc của chromono. Tuy nhiên thay vì chỉ có một vòng 6 cacbon thì xanton có hai vòng 6 cacbon ở hai bên. Khung xương chính được nối với các mạch bên khác nhau tạo thành nhiều loại xanton có đặc tính vật lý, hóa học, sinh học khác nhau. Ngày nay, người ta đã tìm được hơn 200 loại dẫn xuất xanton khác nhau, với 60 loại xanton có trong vỏ quả măng cụt (Mai Thị Hiên., 2011). Dựa trên cấu trúc khung xương của hợp chất xanton, cấu trúc  $\alpha$ -mangostin có thêm một nhóm metoxyl (- O - CH<sub>3</sub>), hai nhóm isoprenyl (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) và ba nhóm chức hydroxyl (- OH ). Trong đó nhóm isoprenyl đóng vai trò quan trọng trong việc giúp  $\alpha$ - mangostin có hoạt tính kháng khuẩn (Jun và cộng sự, 2013; Sineewan và cộng sự 2016).

Để đi sâu tìm hiểu về cơ chế tác dụng cũng như khả năng ứng dụng của các xanton thì việc tinh sạch các chất này là vấn đề cần phải quan tâm hàng đầu. Đến nay đã có gần 60 dẫn xuất xanton khác nhau trong măng cụt được tinh sạch và xác định cấu trúc (Dictionary of Natural Products-DNP on CD-Rom, Version 15:1, Chapman & Hall/CRC 1982-2007). Mặc dù vậy, chúng vẫn chưa trở thành những chế phẩm hóa chất thương mại. Vì thế, việc nghiên cứu với các chất này đều phải bắt đầu bằng việc tách và tinh sạch chúng từ nguồn nguyên liệu tự nhiên.

Để tinh sạch các xanton, phần lớn các phòng thí nghiệm đều bắt đầu bằng việc sử dụng dịch chiết với etanol hay metanol. Các xanton sẽ được tinh sạch từ các dịch chiết này bằng phương pháp sắc ký trên các cột silica gel sử dụng các hệ dung môi hữu cơ có tỉ lệ phân cực khác nhau để đẩy dần các chất này ra khỏi cột (Peres *et al.*, 2000 ). Nhìn chung, việc tinh sạch các chất này là rất phức tạp, tốn kém và hiệu suất thu hồi còn thấp.

Do tính tan của hoạt chất mangostin trong nước kém (chỉ đạt 0,2  $\mu\text{g/ml}$ ) (Aisha *et al.*, 2012). thời gian bán hủy của các hoạt chất trong cơ thể ngắn, sinh khả dụng thấp, Hoạt chất có độ tan và hệ số phân bố, kích thước phân tử lớn ít thích hợp để được hấp thu qua màng sinh học. Chính vì vậy cần phải sử dụng quy trình sản xuất phytosom mangostin để thu được phức chất phytosom mangostin có tính sinh khả dụng cao.

#### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Mục đích của giải pháp hữu ích là nhằm giải quyết các tồn tại nêu trên. Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất phytosom mangostin từ vỏ quả măng cụt (*Garcinia Mangostana* L.), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Tinh sạch hoạt chất  $\alpha$ - mangostin thu được từ vỏ quả măng cụt;

b) Thu hỗn hợp chứa  $\alpha$ - mangostin bằng cách hòa tan  $\alpha$ - mangostin vào metanol thu dung dịch A, hòa tan phosphatidylcholin vào diclometan thu dung dịch B, phối trộn dung dịch A và dung dịch B theo tỷ lệ dung dịch A:dung dịch B là 1:1 (thể tích/thể tích), đun cách thủy hồi lưu trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ 40<sup>0</sup>C được khuấy với tốc độ 150 vòng/phút thu hỗn hợp chứa  $\alpha$ - mangostin; và

c) Thu phức chất phytosom mangostin bằng cách cắt cô chân không hỗn hợp chứa  $\alpha$ - mangostin ở nhiệt độ 40°C, chiết phân bố trong dung môi n- hexan ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ, ly tâm thu kết tủa, sau đó rửa kết tủa bằng n- hexan lạnh và sấy ở nhiệt độ 400°C trong 2 giờ thu được phytosom mangostin.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Hình 1 thể hiện phổ hồng ngoại của mẫu  $\alpha$ - mangostin

Hình 2 thể hiện phổ hồng ngoại của phức chất phytosom mangostin

Hình 3 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn của phytosom mangostin đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (1: mẫu đối chứng; 3-4: mẫu  $\alpha$ -mangostin nồng độ tương ứng 200  $\mu$ g, 400  $\mu$ g; 2-5: mẫu phytosom mangostin nồng độ 200  $\mu$ g, 400  $\mu$ g).

#### **Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích**

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết, chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Việc tạo chế phẩm  $\alpha$ -mangostin là hoàn toàn chủ động với các bước đơn giản, cùng nguồn nguyên liệu thiên nhiên dồi dào, môi trường nuôi cấy chi phí thấp, không thải ra bên ngoài các chất độc hại, tuy nhiên do một số nhược điểm của các hoạt chất nên đã hạn chế tác dụng của hoạt chất như tính tan của hoạt chất mangostin trong nước kém (chỉ đạt 0,2  $\mu$ g/ml), thời gian bán hủy trong cơ thể ngắn, độ sinh khả dụng thấp, hoạt chất có độ tan và hệ số phân bố, kích thước phân tử lớn ít thích hợp để được hấp thu qua màng sinh học. Kỹ thuật phytosom bằng phương pháp bốc hơi dung môi để tạo ra chế phẩm phytosom mangostin có tác dụng làm tăng tính khả dụng của hoạt chất, đặc biệt là tăng hoạt tính kháng khuẩn so với hoạt chất mangostin ban đầu.

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm phytosom mangostin từ vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L.), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Tinh sạch hoạt chất  $\alpha$ - mangostin thu được từ vỏ quả măng cụt;

Bột nguyên liệu vỏ quả măng cụt sau khi được chiết bằng etanol 96 % trong 4 giờ ở 60°C, thu được cao chiết etanol tổng số. Cao chiết này được chiết với n-hexan sau khi đã hòa trở lại với nước, thu được  $\alpha$ -mangostin thô ở pha dung môi. Tiếp theo dịch chiết có chứa mangostin thô này sẽ được tinh sạch qua cột sắc ký với hệ dung môi động clorofom: axeton theo tỉ lệ 20:1; 10:1 và 0:1. Các phân đoạn được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng TLC, xuất hiện băng ngang chuẩn  $\alpha$ -mangostin (Chromadex) với  $R_f = 0,88$  trên hệ dung môi diclometan : metanol (theo tỉ lệ 96 : 4).

b) Thu hỗn hợp chứa  $\alpha$ -mangostin bằng cách hòa tan  $\alpha$ -mangostin vào metanol thu dung dịch A theo tỷ lệ, hòa tan phosphatidylcholin vào diclometan thu dung dịch B, phối trộn dung dịch A và dung dịch B theo tỷ lệ dung dịch A:dung dịch B là 1:1 (thể tích/thể tích), đun cách thủy hồi lưu trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ 40°C được khuấy với tốc độ 150 vòng/phút thu hỗn hợp chứa  $\alpha$ - mangostin.

c) Thu phức chất phytosom mangostin bằng cách cất cô chân không hỗn hợp chứa  $\alpha$ - mangostin ở nhiệt độ 40°C, chiết phân bố trong dung môi n- hexan ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ, ly tâm thu kết tủa, sau đó rửa kết tủa bằng n- hexan lạnh và sấy ở nhiệt độ 40°C trong 2 giờ thu được phytosom mangostin.

#### **Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích**

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

#### **Ví dụ 1: Quy trình sản xuất phytosom mangostin từ vỏ quả măng cụt**

10 g bột nguyên liệu vỏ quả măng cụt sau khi được chiết bằng etanol 96 % trong 4 giờ ở 60°C, thu được 1,2g cao chiết etanol tổng số. Cao chiết này được chiết với n - hexan sau khi đã hòa trở lại với nước. Hỗn hợp chiết trong n- hexan được lắc 200 vòng trong 3 giờ, cất cô quay, thu pha trên chứa hoạt chất  $\alpha$ -mangostin. Dịch chiết này tiếp tục được tinh sạch qua cột sắc ký với hệ dung môi động clorofom: axeton theo tỉ lệ 20:1; 10:1 và 0:1. Các phân đoạn được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng TLC, xuất hiện băng ngang chuẩn  $\alpha$ -mangostin (Chromadex) với  $R_f = 0,88$  trên hệ dung môi diclometan : metanol (theo tỉ lệ 96 : 4) (Hình 1). Kết quả cho thấy các phân đoạn từ 9-16 xuất hiện duy nhất một băng ngang chuẩn với  $\alpha$ -mangostin (Chromadex), và không

xuất hiện băng phụ, điều này chứng tỏ sau khi qua cột silica gel, đã thu được  $\alpha$ -mangostin hoàn toàn sạch, với  $R_f = 0,88$  khi chạy TLC trên hệ dung môi diclometan : metanol là 96 : 4.

Hoạt chất  $\alpha$ -mangostin được hòa tan trong 80 ml metanol, phosphatidylcholin cũng được hòa tan vào 80 ml diclometan. Trộn hai dung dịch trên vào bình cầu rồi đun cách thủy hồi lưu trong các thời gian 3 giờ và ở nhiệt độ  $40^{\circ}\text{C}$ , tốc độ quay khuấy từ 150 vòng/phút. Sau đó cô quay dung dịch để loại bỏ dung môi, tủa chế phẩm bằng việc bổ sung 50 ml n-hexan rồi đem ly tâm thu cặn. Rửa chế phẩm bằng n-hexan lạnh (2 lần), để khô ở nhiệt độ phòng rồi sấy ở  $400^{\circ}\text{C}$  trong 2 giờ, thu được chế phẩm phytosom mangostin là chất bột mịn màu vàng.

Bảng 1. Hiệu suất của quá trình điều chế phytosom mangostin

| Mẫu | $\alpha$ -mangostin<br>(S) (g) | phosphatidylcholin<br>(P) (g) | Tỷ lệ KL<br>(S: P) | Lượng phức<br>phytosom (g) | Hiệu suất<br>( % ) |
|-----|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
| 1   | 0,5                            | 0,5                           | 1: 1               | $0,689 \pm 0,06$           | 68,9               |
| 2   | 0,5                            | 1                             | 1:2                | $0,46 \pm 0,02$            | 30,6               |
| 3   | 0,5                            | 1,5                           | 1:3                | $1,41 \pm 0,13$            | 70,5               |

Kết quả ở bảng 1, nhận thấy hiệu suất quá trình điều chế phytosom mangostin đạt 68,9% với tỉ lệ hoạt chất  $\alpha$ -mangostin và phosphatidylcholin là 1:1 (w/w). Trong khi đó ở tỷ lệ 1:3, hiệu suất chỉ đạt 70,5% mặc dù đã tăng lượng phosphatidylcholin gấp 3 lần. Do vậy tỷ lệ khối lượng 1:1 là phù hợp nhất và có hiệu quả kinh tế hơn hẳn so với các tỷ lệ 1:2 và 1:3.

Trong khoảng  $3599 - 1750 \text{ cm}^{-1}$ , xuất hiện 1 đỉnh mới trong phức phytosom mangostin (Hình 2) ở  $1733,89 \text{ cm}^{-1}$ . Điều này chứng tỏ có sự hình thành liên kết H giữa mangostin và phospholipid (phosphatidylcholin) trong quá trình tạo phytosom. Trong khoảng từ  $1643,12 - 585,01 \text{ cm}^{-1}$ , xuất hiện nhiều đỉnh mới ở  $874,46 \text{ cm}^{-1}$  phức (Hình 2), chứng tỏ sự có mặt của phospholipid trong phức (Hình 2). Trong biểu đồ  $\alpha$ -

mangostin (Hình 1) và phức phytosom mangostin (Hình 2), một số đỉnh từ 3 miền dao động có vị trí tương quan thể hiện lớp phospholipid bao phía ngoài quanh mangostin, điều này dẫn đến sự thay đổi số liệu như ở (Hình 1), có những đỉnh đặc trưng ở vị trí giống nhau chứng tỏ sự tham gia của phospholipid trong phức phytosom mangostin.

Ví dụ 2: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn chế phẩm phytosom mangostin từ vỏ quả măng cụt

Dịch nuôi hoạt hóa của chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* được trải đều lên mặt đĩa thạch LB, sau đó đục giếng thạch và bổ sung 100  $\mu$ l hoạt chất  $\alpha$ -mangostin và phytosom mangostin đã được hòa tan với metanol ở các nồng độ khác nhau vào các giếng để hàm lượng đạt được trong các giếng lần lượt là 200  $\mu$ g, 400  $\mu$ g. Đối chứng sử dụng là 100  $\mu$ l metanol. Mẫu được ủ 24 giờ ở 37°C, sau đó quan sát các vòng kháng khuẩn ở các giếng và so sánh. Kết quả sau khi ủ 24 giờ ở 37°C, cả  $\alpha$ -mangostin và phytosom mangostin đều có hoạt tính kháng vi khuẩn *S. aureus*. Kết quả cho thấy ở mẫu đối chứng không có hoạt tính kháng khuẩn, các giếng còn lại đã xuất hiện vòng kháng khuẩn. ở nồng độ 200  $\mu$ g, phytosom mangostin cho đường kính vòng kháng là  $2,1 \pm 0,01$  cm còn  $\alpha$ -mangostin cho đường kính vòng kháng là  $1,2 \pm 0,02$  cm. Ở nồng độ 400  $\mu$ g vòng kháng khuẩn đạt  $2,3 \pm 0,015$  cm (mẫu phytosom mangostin) và  $1,5 \pm 0,01$  cm (mẫu  $\alpha$ -mangostin) (Hình 3).

#### **Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản và dễ thực hiện. Phức chất phytosom mangostin thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích làm tăng tính khả dụng của hoạt chất, tăng hoạt tính kháng khuẩn so với hoạt chất mangostin. Chế phẩm sẽ ổn định hơn, bền hơn và không bị phân hủy khi được lưu hành trên thị trường.

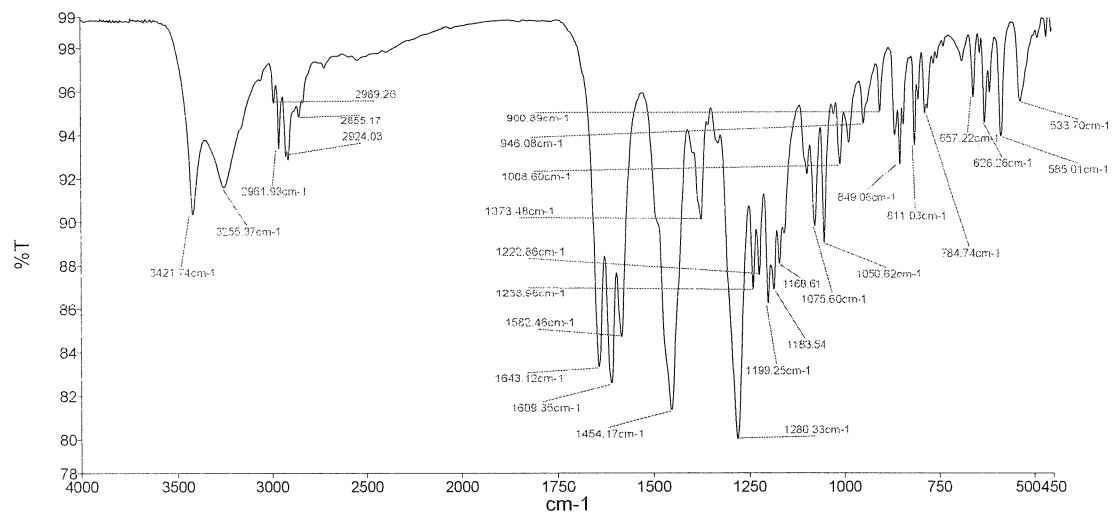
## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất phytosom mangostin từ vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L.), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

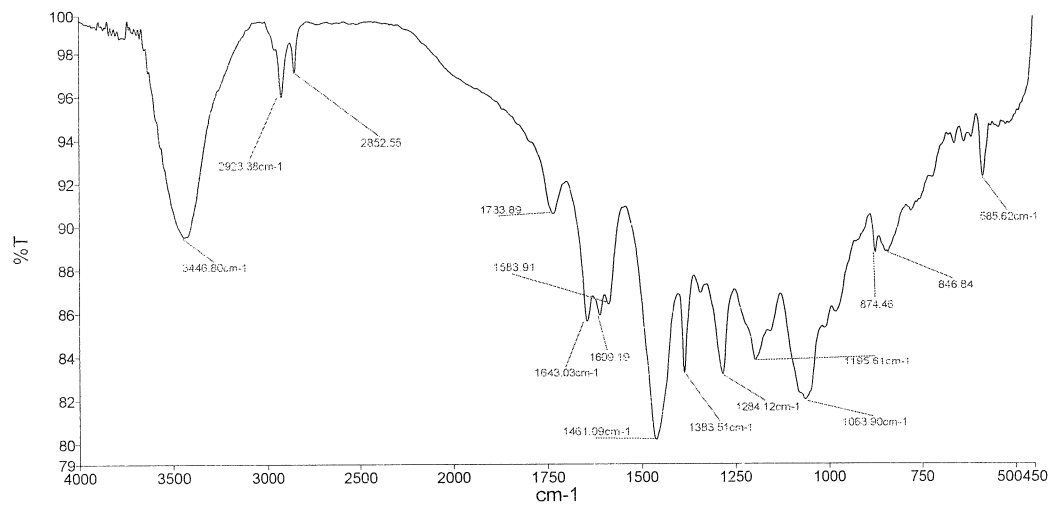
a) Tinh sạch hoạt chất  $\alpha$ - mangostin thu được từ vỏ quả măng cụt;

b) Thu hỗn hợp chứa  $\alpha$ - mangostin bằng cách hòa tan  $\alpha$ - mangostin vào metanol thu dung dịch A, hòa tan phosphatidylcholin vào diclometan thu dung dịch B, phối trộn dung dịch A và dung dịch B theo tỷ lệ dung dịch A:dung dịch B là 1:1 (thể tích/thể tích), đun cách thủy hồi lưu trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ 40<sup>0</sup>C được khuấy với tốc độ 150 vòng/phút thu hỗn hợp chứa  $\alpha$ - mangostin; và

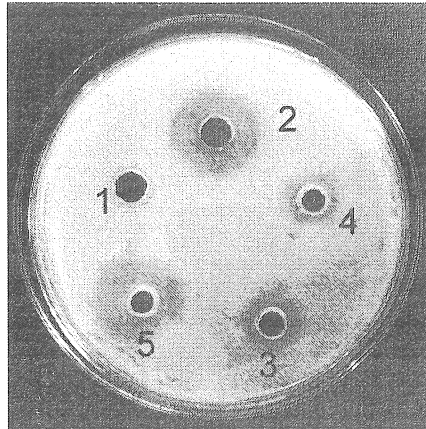
c) Thu phức chất phytosom mangostin bằng cách cất cô chân không hỗn hợp chứa  $\alpha$ - mangostin ở nhiệt độ 40°C, chiết phân bố trong dung môi n- hexan ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ, ly tâm thu kết tủa, sau đó rửa kết tủa bằng n- hexan lạnh và sấy ở nhiệt độ 400°C trong 2 giờ thu được phytosom mangostin.



Hình 1



Hình 2



Hình 3