



(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)



2-0002832

(51) **C07H 1/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00269

(22) 14/06/2019

(67) 1-2019-03174

(45) 25/03/2022 408

(43) 26/08/2019 377A

(73) Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Nhà 1H, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Nguyễn Mạnh Cường (VN); Tô Đạo Cường (VN); Trần Thu Hường (VN); Hoàng Thị Ngọc Ánh (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT HỖN HỢP POLYPHENOL CÓ TÁC DỤNG ỨC CHẾ ENZYM SEH TỪ HẠT CHANH LEO TÍM (*PASSIFLORA EDULIS* SIMS)

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp polyphenol có tác dụng ức chế enzym sEH từ hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis*). Quy trình theo sáng chế bao gồm các bước: chuẩn bị nguyên liệu; chiết bột hạt bằng Tween 20; thu bã hạt; chiết bã hạt bằng Tween 80; và thu hỗn hợp polyphenol. Bằng cách chiết siêu âm sử dụng lần lượt Tween 20 và Tween 80, quy trình theo sáng chế đã chiết được hỗn hợp polyphenol có tác dụng ức chế mạnh enzym sEH. Hỗn hợp polyphenol từ hạt Chanh leo tím thu được theo quy trình của sáng chế này có thể được phát triển thành dược phẩm và thực phẩm chức năng trong điều trị các bệnh viêm, miễn dịch và tim mạch.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ hóa sinh và các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp polyphenol từ hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis*) và hỗn hợp thu được từ quy trình này có tác dụng ức chế enzym SEH có thể phát triển thành được phẩm và thực phẩm chức năng trong điều trị các bệnh viêm, miễn dịch và tim mạch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo ước tính của Tổ chức Y tế thế giới, hàng năm trên thế giới có khoảng 17,5 triệu người tử vong liên quan đến các bệnh về tim mạch và là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trên toàn cầu. Điều này rất nguy hiểm vì tim và hệ mạch đóng vai trò quan trọng sống còn trong cơ thể con người. Tim và hệ mạch có chức năng cung cấp oxy và dưỡng chất cho các tổ chức, đồng thời mang các chất cần đào thải chuyển cho các cơ quan, bộ phận có trách nhiệm đào thải ra ngoài, vận chuyển các hormone, các enzym đến các cơ quan và điều hòa thân nhiệt, v/v.. Có nhiều phương pháp để điều trị tim mạch và một trong những phương pháp hay được sử dụng phổ biến hiện nay là sử dụng thuốc. Tuy nhiên, thuốc điều trị tim mạch thường có nguồn gốc tổng hợp, nhiều tác dụng phụ và đắt.

Do đó, việc tìm kiếm các nguồn dược liệu có nguồn thảo dược thay thế cho các loại thuốc tổng hợp đã được quan tâm nghiên cứu. Đối với hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis*), các tác giả đã phát hiện ra tác dụng điều trị tim mạch tốt của thành phần dịch chiết từ hạt Chanh leo tím (Sano, S., Sugiyama, K., Ito, T., Katano, Y., Ishihata, A. Identification of the strong vasorelaxing substance scirpusin B, a dimer of piceatannol, from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds. J. Agric. Food Chem., 2011, 59, 6209-6213). Ngoài ra, piceatannol-một hoạt chất chính được tìm thấy trong hạt Chanh leo tím có tác dụng cải thiện hệ thống mạch, làm giãn mạch, giảm huyết áp, chống tăng cholesterol trong máu, chống rối loạn nhịp tim và chống xơ vữa động mạch (Tang, Y. L., Chan, S. W. Review: A review of the Pharmacological Effects of Piceatannol on Cardiovascular Diseases. Phytother. Res., 2014, 28, 1581-1588).

Trong các công bố đã biết, phương pháp chiết chủ yếu sử dụng các hệ dung môi hexan, chloroform, etyl axetat, axeton, metanol, etanol bằng cách ngâm, chiết hồi lưu, chiết Soxhlet, chiết siêu tới hạn, v.v.. Tuy nhiên, các phương pháp chiết này có nhược điểm là tốn năng lượng, thời gian chiết kéo dài và sử dụng dung môi độc hại. Hiệu suất thu hồi các cao chiết và hoạt chất không cao, khó áp dụng để phát triển trong ngành công nghiệp sản xuất dược.

Các tác giả đã nghiên cứu và nhận thấy rằng, hoạt chất của hạt Chanh leo tím tập trung chủ yếu ở các thành phần polyphenol, các thành phần này khi chiết bằng các dung môi, ví dụ etyl axetat, axeton, metanol, etanol trong thời gian dài các hợp chất nhiều khả năng bị biến đổi tạo thành các hợp chất chuyển hóa khác, điều này không những ảnh hưởng đến hiệu suất chiết mà còn tác động lớn đến tác dụng sinh học của hỗn hợp thu được.

Trong những năm gần đây, có một số công bố liên quan đến tác dụng của các chất hoạt động bề mặt, cụ thể là ảnh hưởng của sức căng bề mặt của các chất hoạt động bề mặt ảnh hưởng lớn đến tác dụng sinh học của các hợp chất polyphenol từ dược liệu. Ví dụ, trong quá trình nghiên cứu chiết xuất tổng polyphenol từ loài táo ở Iran, chất hoạt động bề mặt Brij35 được chứng minh có hiệu suất chiết và hàm lượng

tổng polyphenol cao, có khả năng chống oxy hóa tốt hơn phương pháp chiết bằng dung môi metanol thông thường (Reza Hosseinzadeh, Plos one, 2013, 8, 1-7). Trong một số công bố cho thấy ảnh hưởng của dung môi đối với hoạt tính sinh học của polyphenol từ táo đỏ, chanh và xoài. Kết quả cho thấy chất hoạt động bề mặt Brij-58, Triton X-114 cho hiệu suất chiết cao hơn hẳn các dung môi thông thường, và đặc biệt không làm mất hoạt tính sinh học của hoạt chất được chiết. Tuy nhiên, chưa có chất hoạt động bề mặt tương tự nào được áp dụng cho việc chiết polyphenol từ hạt Chanh leo tím.

Do đó, cần có phương pháp chiết với dung môi cải tiến có khả năng chiết đặc hiệu các polyphenol của hạt Chanh leo tím có tác dụng sinh học là ức chế enzyme sEH để có thể phát triển thành dược phẩm và thực phẩm chức năng trong điều trị các bệnh viêm, miễn dịch và tim mạch.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là sáng chế đề xuất quy trình sản xuất hỗn hợp polyphenol có tác dụng ức chế enzyme sEH từ hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis*) và hỗn hợp polyphenol có tác dụng ức chế enzyme sEH thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp polyphenol có tác dụng ức chế enzyme sEH từ hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis*), sau đó rửa sạch bằng nước cất, loại bỏ tạp chất, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C và xay hạt thành bột;

b) chiết bột hạt Chanh leo tím bằng cách bổ sung phần bột thu được ở bước a) vào Tween 20 nồng độ từ 0,5 đến 2% theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích), tiến hành chiết bã hạt trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 20 đến 40 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C, sau đó lọc loại bỏ dịch chiết Tween 20 và thu bã hạt sau khi sấy khô;

c) chiết bã hạt Chanh leo tím bằng cách bổ sung phần bã thu được ở bước b) vào Tween 80 nồng độ từ 5 đến 10% theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết bã hạt trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 20 đến 40 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C;

d) thu dịch chiết bằng cách ly tâm hỗn hợp chiết với tốc độ nằm trong khoảng từ 10.000-15.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ hoàn toàn phần cặn thu dịch chiết; và

e) thu hỗn hợp polyphenol bằng cách cất quay loại bỏ dung môi đến khối lượng không đổi thu được hỗn hợp polyphenol chứa hai hoạt chất chính bao gồm *trans-piceatannol* và *scirpusin B* có tác dụng ức chế enzyme sEH ở dạng bột màu tím than.

Theo một phương án ưu tiên của quy trình theo sáng chế, trong đó nhiệt độ chiết được thực hiện ở 60°C với Tween 80 nồng độ 10% trong điều kiện siêu âm.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hỗn hợp polyphenol có tác dụng ức chế enzyme sEH thu được từ quy trình theo sáng chế, trong đó hỗn hợp này chứa hai hoạt chất chính bao gồm *trans-piceatannol* và *scirpusin B*.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hàm lượng polyphenol là 1332,83 mg GAE/g cao chiết khô.

Hỗn hợp polyphenol thu được từ quy trình theo sáng chế có thể được phát triển thành dược phẩm và thực phẩm chức năng trong điều trị các bệnh viêm, miễn dịch và tim mạch.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Sắc ký đồ hỗn hợp polyphenol thu được sau khi phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối phổ khối (HPLC/MS) tại bước sóng $\lambda = 320$ nm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả một cách chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ minh họa cụ thể, tuy nhiên các phương án thực hiện và các ví dụ minh họa cụ thể này chỉ nhằm làm rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Cây Chanh leo tím có tên khoa học là *Passiflora edulis* Sims thuộc họ Lạc tiên (Passifloraceae), cây Chanh leo tím còn có tên gọi là Dây mát, Chanh dây, Mác mát. Cây Chanh leo tím thường phân bố ở cao nguyên, khí hậu mát, là loài bản địa (Phạm Hoàng Hộ. Cây cỏ Việt Nam. NXB Trẻ, Quyển 1, 1999, Tr. 556) và được trồng rộng rãi ở Châu Mỹ, Châu Phi và Châu Á (trong đó có Việt Nam). Hạt Chanh leo tím được sử dụng làm nguyên liệu theo sáng chế là hạt sấy khô (hạt tươi được tách sau khi thu hái quả chín và sấy khô).

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất hỗn hợp polyphenol có tác dụng ức chế enzym sEH từ hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis* Sims) và hỗn hợp polyphenol có tác dụng ức chế enzyme sEH thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp polyphenol có tác dụng ức chế enzym sEH từ hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis* Sims), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột hạt Chanh leo tím bằng Tween 20; c) thu bã hạt sau chiết; d) chiết bã hạt bằng Tween 80; e) thu dịch chiết; và f) thu hỗn hợp polyphenol.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis* Sims) được tách từ quả, loại bỏ tạp chất, hạt lép, sau đó rửa sạch bằng nước cất, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C và xay hạt thành bột. Bột hạt có màu nâu, mùi thơm đặc trưng. Nhiệt độ sấy hạt Chanh leo tím không được vượt quá 70°C vì nếu nhiệt độ quá cao, các hợp chất polyphenol có trong quả rất dễ bị phân hủy.

Trong bước chiết bột hạt Chanh leo tím, quá trình chiết này trước tiên được thực hiện với Tween 20 để loại bỏ dầu và thu bã hạt, sau đó quá trình chiết bã hạt tiếp tục được thực hiện với Tween 80. Theo sáng chế, bằng cách sử dụng Tween 80 với nồng độ tối ưu, các thành phần polyphenol thu được có hoạt tính sinh học. Mặc dù việc chiết này có thể sử dụng các dung môi như etyl axetat, etanol, metanol để chiết, tuy nhiên, bất ngờ là với dung môi, ví dụ etanol, mặc dù tỷ lệ chiết các hợp chất polyphenol tổng số khá cao, nhưng hoạt tính sinh học lại thấp. Ngược lại, với hệ dung môi etyl axetat, hiệu suất chiết các hợp chất polyphenol lại rất thấp, chỉ đạt 2,15%.

Theo đó, các tác giả đã nghiên cứu vào phát hiện ra rằng, một số hợp chất polyphenol sẽ bị biến tính nhanh nếu quá trình ngâm chiết kéo dài hoặc sử dụng các dung môi có độ phân cực khác nhau. Khi đó lượng polyphenol thu được sẽ giảm và tăng lượng các hợp chất không mong muốn khác. Hay nói cách khác, ví dụ, với dung môi etanol, lượng polyphenol thu được có thể lớn, nhưng các thành phần có hoạt tính sinh học lại giảm. Hay nói cách khác, khi đó quá trình chiết là không đặc hiệu.

Các tác giả bất ngờ phát hiện ra rằng, bằng cách cải tiến dung môi chiết đối với hạt Chanh leo tím, các tác giả đã thu được hỗn hợp polyphenol có hoạt tính ức chế enzym sEH. Theo đó, các tác giả thấy rằng, dung môi tối ưu để chiết các hợp chất polyphenol có trong hạt Chanh leo tím là chất hoạt động bề mặt Tween 80 nồng độ từ 5 đến 10%. Tốt hơn là Tween 80 có nồng độ 6, 7, 8 hoặc 9%.

Tween 80 còn gọi là Poly Sorbat 80 có tên danh pháp IUPAC là poly oxyetylen (20) monoleat sorbitan. Tween 80 là một dung dịch tổng hợp tan tốt trong nước và các

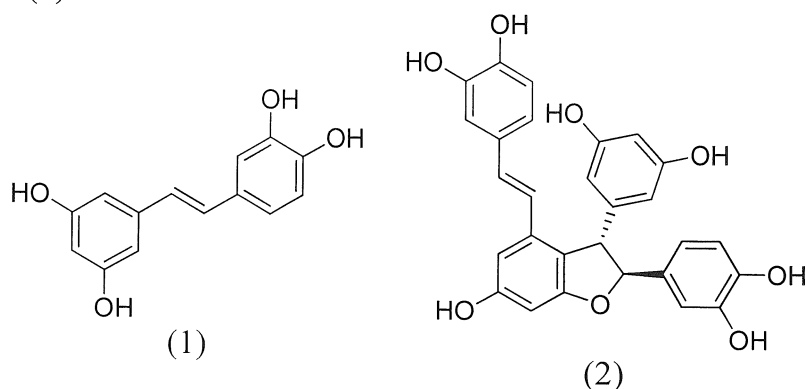
dung môi hữu cơ, được sử dụng như một phụ gia giúp ổn định trạng thái kem, sữa, tạo nên một lớp liên kết, pha phân tán giúp ổn định, củng cố trạng thái của sản phẩm, giảm thiểu độ tan chảy. Theo sáng chế, Tween 80 được pha với nước cất tạo dung dịch có nồng độ từ 5 đến 10% làm dung môi chiết.

Theo đó, bột hạt Chanh leo tím được bổ sung vào Tween 20 có nồng độ từ 0,5 đến 2% theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích), tiến hành chiết điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 20 đến 40 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C, sau đó lọc loại bỏ dịch chiết Tween 20 và thu bã hạt.

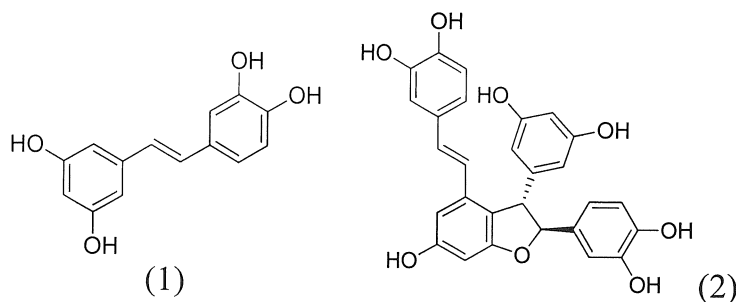
Trong bước chiết bằng Tween 80 có nồng độ từ 5 đến 10%, bã hạt được bổ sung vào Tween 80 có nồng độ từ 5 đến 10% theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích). Điều kiện chiết được thực hiện trong điều kiện chiết siêu âm để rút ngắn quá trình chiết và bảo vệ được các thành phần có hoạt tính trong hỗn hợp chiết. Thời gian chiết siêu âm từ 20 đến 40 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C. Nhiệt độ chiết không được vượt quá 70°C vì nếu vượt quá nhiệt độ này, một số hoạt chất sẽ bị phân hủy. Tốt hơn là nhiệt độ chiết là 60°C trong điều kiện chiết với dung môi chiết là Tween 80 nồng độ 10% trong điều kiện chiết siêu âm. Điều kiện chiết siêu âm được thực hiện trong thiết bị siêu âm có công suất 180-220 W, tần số 40-60 kHz.

Trong bước thu dịch chiết, hỗn hợp chiết được ly tâm với tốc độ nằm trong khoảng từ 10 000-15 000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ hoàn toàn phần cặn thu dịch chiết. Quá trình này nhằm tách phần bã và thu phần dịch chiết.

Trong bước thu hỗn hợp polyphenol, tiến hành loại bỏ dung môi chiết bằng thiết bị cất quay chân không. Quá trình này nhằm loại bỏ dung môi, nhưng không làm biến tính thành phần hoạt chất thu được. Quá trình cô này được thực hiện đến khối lượng không đổi thu được hỗn hợp polyphenol. Hỗn hợp polyphenol này ở dạng bột màu tím than chứa hai hoạt chất chính bao gồm *trans*-piceatannol có công thức (1) và scirpusin B có công thức (2).



Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hỗn hợp polyphenol có tác dụng ức chế enzyme sEH thu được từ quy trình theo sáng chế, trong đó hỗn hợp này chứa hai hoạt chất chính bao gồm *trans*-piceatannol có công thức (1) và scirpusin B có công thức (2) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó hàm lượng polyphenol là 1332,83 mg GAE/g cao chiết khô.

Hỗn hợp polyphenol thu được từ quy trình theo sáng chế thích hợp sử dụng để sản xuất dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng để ức chế enzym sEH. Các thử nghiệm cho thấy hỗn hợp theo sáng chế có tác dụng ức chế enzym sEH.

Theo một phương án ưu tiên, dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng để ức chế enzym sEH có thể phối trộn hỗn hợp polyphenol theo sáng chế với các loại thảo dược và chất mang dược dụng. Các chất mang này không chỉ giới hạn ở các tá dược như nước, các chất độn như sucroza hoặc tinh bột, các chất kết dính như dẫn xuất xenluloza, chất pha loãng, chất gây rắn, chất tăng cường hấp thu hoặc chất làm ngọt. Dược phẩm theo sáng chế có thể được điều chế bằng phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực dược, có thể được phối chế dưới dạng bột, viên nén, viên nang, phiến, hạt hoặc chế phẩm dạng lỏng khác nhưng không chỉ giới hạn ở các dạng này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chiết hỗn hợp polyphenol từ hạt Chanh leo tím (Passiflora edulis Sims) bằng Tween 80.

Hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis* Sims) được thu hái, loại bỏ tạp chất và rửa sạch bằng nước cất, sấy khô ở nhiệt độ 50°C, sau đó hạt được xay thành bột kích thước 1-2 mm.

Phần bột hạt được chuyển vào thiết bị chiết siêu âm, Tween 20 nồng độ 2% được bổ sung theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5 (khối lượng/thể tích). Thời gian siêu âm 40 phút, nhiệt độ chiết 70°C. Sau khi chiết, hỗn hợp được đem lọc để loại bỏ dịch chiết, Tween 20 và thu bã hạt. Quá trình chiết siêu âm bằng Tween 20 được thực hiện 3 lần.

Phần bã hạt sau đó được chuyển vào thiết bị chiết siêu âm (công suất 180-220 W và tần số 40-60 kHz), Tween 80 nồng độ 10% được bổ sung theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5 (khối lượng/thể tích). Thời gian siêu âm 30 phút, nhiệt độ chiết 60°C. Sau khi chiết siêu âm, hỗn hợp được đem ly tâm ở tốc độ 12,000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ hoàn toàn phần cặn. Quá trình chiết siêu âm được thực hiện 3 lần.

Tiếp đó đưa dịch chiết thu được sau khi ly tâm vào thiết bị cất quay chân không đến khi khối lượng không đổi thu hỗn hợp polyphenol (PES-1).

Sản phẩm được thử nghiệm hoạt tính sinh học và xác định thành phần. Kết quả sắc ký đồ sau khi phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối phổ khối tại bước sóng $\lambda = 320$ nm được thể hiện trên Hình 1. Thành phần được xác định với hàm lượng polyphenol tổng là 1332,83 mg GAE/g cao chiết khô và chứa hai hợp chất chính có tên là *trans*-piceatannol và scirpusin B. Kết quả thành phần hỗn hợp polyphenol được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1: Thành phần của hỗn hợp polyphenol theo sáng chế

Pic	Thời gian lưu (phút)	Hợp chất xác định	Công thức phân tử (Khối lượng phân tử, MW)	Phổ khối (ESI) $[M-H]^-$
15	12,851	<i>Trans</i> -piceatannol	$C_{14}H_{12}O_4$ (MW = 244)	$[M-H]^- = 243,0$
17	13,382	Scirpusin B	$C_{28}H_{22}O_8$ (MW = 486)	$[M-H]^- = 485,7$

Ví dụ 2: Chiết hỗn hợp polyphenol từ hạt Chanh leo tím (Passiflora edulis Sims) bằng các dung môi khác.

Để đánh giá hiệu suất chiết và hàm lượng hỗn hợp polyphenol thu được từ hạt Chanh leo tím, tiến hành chiết với các dung môi khác nhau. Phương pháp chiết như

trong Ví dụ 1, chỉ thay Tween 80 nồng độ 10% bằng lần lượt các dung môi etanol 96°, metanol, etyl axetat và nước.

Kết quả thu được các hỗn hợp tương ứng bao gồm hỗn hợp chiết bằng etanol 96° (PES-2), hỗn hợp chiết bằng metanol (PES-3), hỗn hợp chiết bằng etyl axetat (PES-4) và hỗn hợp chiết bằng nước (PES-5). Kết quả hiệu suất chiết được thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 2. Hiệu suất chiết hỗn hợp từ hạt Chanh leo tím bằng các dung môi khác nhau.

Hỗn hợp chiết	Ký hiệu	Hiệu suất chiết (%)
Tween 80 (10%)	PES-1	10,24
Etanol 96°	PES-2	8,28
Metanol	PES-3	6,09
Etyl axetat	PES-4	3,50
Nước	PES-5	2,15

Kết quả Bảng 2 cho thấy mẫu nghiên cứu PES-2 cho hiệu suất chiết khá cao (8,28%). Mẫu PES-1 khi sử dụng Tween 80 kết hợp với siêu âm cho hiệu suất chiết cao nhất, lên tới 10,24%. Mẫu PES-5 (chiết bằng nước) cho hiệu suất chiết thấp nhất (2,15%).

Mặc dù mẫu PES-2 cho hiệu suất chiết gần bằng PES-1, nhưng kiểm tra sắc ký đồ sau khi phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối phổ khối tại bước sóng $\lambda = 320$ nm cho thấy thành phần của các hỗn hợp chiết này khác nhau, cụ thể thành phần *trans*-piceatannol và scirpusin B thấp hơn và xuất hiện các pic khác. Do đó, cần hiểu rằng, quá trình chiết bằng etanol không những hiệu suất không bằng Tween 80 mà còn đưa vào một lượng các thành phần không có tác dụng sinh học do etanol là một dung môi mạnh.

Kết quả xác định hàm lượng polyphenol tổng bằng phương pháp Folin-Ciocalteu được thể hiện trên Bảng 3. Cụ thể các bước tiến hành như sau: lấy 0,5 mL dịch chiết hoặc dung dịch axit gallic chuẩn (có nồng độ từ 0,05÷3,0 mg/mL) thêm vào 2,5 mL Folin – Ciocalteu (10%, thể tích/thể tích), lắc đều. Sau 4 phút, thêm vào 2mL dung dịch Na_2CO_3 bão hoà, lắc đều, ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng được đo ở bước sóng 760 nm. Axit gallic được sử dụng như là chất chuẩn tham khảo và kết quả được quy tương đương theo số milligam axit gallic/1 gam cao chiết khô.

Bảng 3. Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) của các hỗn hợp chiết từ hạt Chanh leo tím

Hỗn hợp chiết	Ký hiệu	TPC (mg GAE/g cao chiết khô)
Tween 80	PES-1	1332,83
Etanol 96°	PES-2	563,39
Metanol	PES-3	576,98
Etyl axetat	PES-4	249,52
Nước	PES-5	129,02

Trong các mẫu thử nghiệm, PES-2 và PES-3 có hàm lượng polyphenol tổng khá cao (563,39 mg GAE/g cao chiết khô và 576,98 mg GAE/g cao chiết khô), PES-1 (Tween 80) có hàm lượng polyphenol tổng cao nhất lên tới 1332,83 mg GAE/g cao chiết khô và PES-5 có hàm lượng polyphenol tổng thấp nhất (129,02 mg GAE/g cao chiết khô). Như vậy, sử dụng Tween 80 để chiết cho phép thu được hỗn hợp polyphenol không những có hiệu suất chiết cao mà còn có hàm lượng polyphenol tổng cao vượt trội so với các dung môi chiết thông thường. Điều này cho thấy hiệu quả vượt

trội của hỗn hợp thu được khi chiết bằng Tween 80 so với các dung môi thông dụng khác.

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính ức chế enzym sEH của các hỗn hợp chiết từ hạt Chanh leo tím (Passiflora edulis Sims)

Để xác định hoạt tính ức chế enzym sEH của các hỗn hợp chiết từ hạt Chanh leo tím thu được từ Ví dụ 2, tiến hành thử nghiệm theo phương pháp của Bai và cộng sự (Bai MM, Shi W, Tian JM, Lei M, Kim JH, Sun YN, Kim YH, Gao JM. Soluble epoxide hydrolase inhibitory and anti-inflammatory components from the leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver (Duzhong). *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2015, 63, 2198–2205) có một số điều chỉnh cho phù hợp. 130 μL dung dịch enzym sEH tái tổ hợp của người (62,5 ng/mL) được pha với dung dịch đệm (25 mM Bis-TrisHCl, pH 7,0 chứa 0,1 mg/mL BSA) rồi hoà tan với 20 μL phối tử (được pha loãng trong MeOH), và sau đó 50 μL PHOME ở các dải nồng độ khác nhau của mẫu thử hoặc mẫu đối chứng (AUDA) được lần lượt thêm vào. Phản ứng sEH được thực hiện ở 37°C trong 1 giờ. Lượng sản phẩm được chuyển đổi từ cơ chất của enzym được xác định bằng phương pháp đo huỳnh quang (bộ lọc kích thích 330 nm và bộ lọc phát xạ tại bước sóng $\lambda = 465$ nm) bằng máy Tecan (Mannedorf, Thụy Sĩ).

Tác dụng ức chế enzym sEH cho mỗi mẫu được tính như sau:

$$\text{sEH (\%)} = 100 - [(S_{60} - S_0 / C_{60} - C_0) \times 100]$$

Trong đó C_{60} và S_{60} là huỳnh quang của chất đối chứng và mẫu thử sau 60 phút, S_0 và C_0 là huỳnh quang của chất đối chứng và mẫu thử ở 0 phút.

Bảng 4. Hoạt tính ức chế enzym sEH của các hỗn hợp chiết từ hạt Chanh leo tím

Hỗn hợp chiết	Ký hiệu	% ức chế sEH (tại nồng độ 100 μM)
Tween 80	PES-1	$88,2 \pm 0,7$
Etanol 96°	PES-2	$64,7 \pm 0,4$
Metanol	PES-3	$60,2 \pm 0,3$
Etyl axetat	PES-4	$81,4 \pm 3,3$
Nước	PES-5	< 50
AUDA	ĐC	$68,9 \pm 0,3$

Kết quả thể hiện trên Bảng 4 cho thấy tại nồng độ 100 μM , 04 mẫu nghiên cứu (PES-1, PES-2, PES-3 và PES-4) đều thể hiện khả năng ức chế enzym sEH tốt với giá trị trong khoảng 60,2 - 88,2%. Hai mẫu nghiên cứu (PES-1 và PES-4) có tác dụng ức chế enzym sEH mạnh hơn so với chất đối chứng tham khảo (ĐC), AUDA (68,9%). Trong đó, PES-1 có tác dụng ức chế enzym sEH mạnh nhất (88,2%). Điều này minh chứng cho thấy tác dụng chiết đặc hiệu các hoạt chất có đặc tính ức chế enzym sEH của Tween 80 được sử dụng theo sáng chế.

Như vậy, từ những kết quả trên cho thấy bằng cách chiết siêu âm sử dụng Tween-80 (một chất hoạt động bề mặt được sử dụng trong thực phẩm và dược phẩm) cho phép chiết được hỗn hợp polyphenol có hiệu suất cao, có tác dụng ức chế mạnh enzym sEH từ hạt Chanh leo tím.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

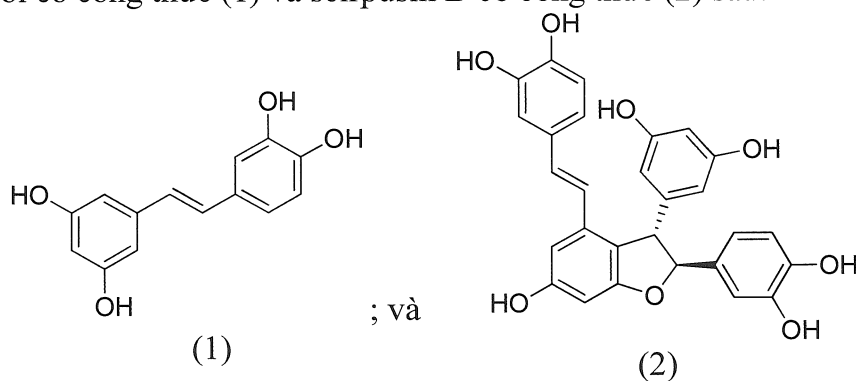
Quy trình sản xuất của sáng chế cho phép sản xuất hỗn hợp polyphenol có hoạt tính sinh học, cụ thể là có tác dụng ức chế enzym sEH từ hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis*) với hiệu suất chiết cao và tác dụng sinh học vượt trội. Điều này cho phép sử dụng hỗn hợp polyphenol làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất sản phẩm có tác dụng điều trị các bệnh viêm, miễn dịch và tim mạch.

Hỗn hợp polyphenol thu được từ quy trình theo sáng chế đã được chứng minh có hoạt tính ức chế mạnh enzym sEH. Bằng cách chiết siêu âm sử dụng Tween-80 trong điều kiện chiết tối ưu, quy trình theo sáng chế cho phép thu được hỗn hợp polyphenol bao gồm 2 hoạt chất chính. Quy trình theo sáng chế thu được hỗn hợp polyphenol có thể phối hợp với các thảo dược để phát triển thành dược phẩm và thực phẩm chức năng trong điều trị các bệnh viêm, miễn dịch và tim mạch.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất hỗn hợp polyphenol có tác dụng ức chế enzym sEH từ hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis* Sims), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hạt Chanh leo tím (*Passiflora edulis* Sims), sau khi rửa sạch bằng nước cất, loại bỏ tạp chất, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C và xay hạt thành bột;
- chiết bột hạt Chanh leo tím bằng cách bổ sung phần bột thu được ở bước a) vào Tween 20 nồng độ từ 0,5 đến 2% theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích), tiến hành chiết siêu âm trong 40 phút, nhiệt độ chiết ở 70°C, sau đó lọc loại bỏ dịch chiết Tween 20 và thu bã hạt;
- chiết bã hạt Chanh leo tím bằng cách bổ sung phần bã thu được ở bước b) vào Tween 80 nồng độ từ 5 đến 10% theo tỷ lệ 1/5 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 20 đến 40 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 50 đến 70°C;
- thu dịch chiết bằng cách ly tâm hỗn hợp chiết với tốc độ nằm trong khoảng từ 10.000-15.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ hoàn toàn phần cặn thu dịch chiết;
- thu hỗn hợp polyphenol bằng cách cất quay loại bỏ Tween 80 đến khối lượng không đổi thu được hỗn hợp polyphenol chứa hai hoạt chất chính bao gồm *trans*-piceatannol có công thức (1) và scirpusin B có công thức (2) sau:



có tác dụng ức chế mạnh enzym sEH.

HÌNH 1

