



(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)



1-0037619

(51)^{2020.01} C08B 37/00; A61P 3/10

(13) B

(21) 1-2021-05745

(22) 16/09/2021

(45) 27/11/2023 428

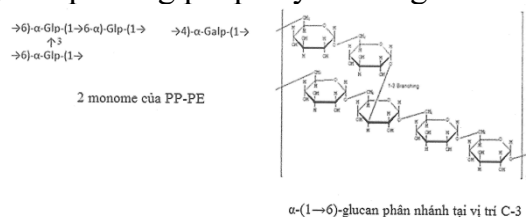
(43) 25/11/2021 404

(73) Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Nhà A18,18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Thành Thị Thu Thủy (VN); Quách Thị Minh Thu (VN); Đặng Vũ Lương (VN); Ngô Văn Quang (VN); Nguyễn Thị Nụ (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT POLYSACARIT TỪ QUẢ BÍ ĐỎ BAO GỒM A- (1 → 3, 6)-GLUCAN VÀ A- (1 → 4) -GALACTAN LÀM THỰC PHẨM CHỨC NĂNG HỖ TRỢ ĐIỀU TRỊ TIỂU ĐƯỜNG VÀ HỢP CHẤT POLYSACARIT THU ĐƯỢC TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến việc tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên từ thực vật có cấu trúc mới và có hoạt tính sinh học tốt. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất polysacarit từ quả bí đỏ bao gồm α - (1 → 3, 6)-glucan và α -(1 → 4) -galactan từ loài bí đỏ *Cucurbita pepo* ở Việt Nam, hợp chất này có khả năng ức chế enzym α -glucosidaza và α -amylaza, làm giảm mức đường huyết và cải thiện tổn thương mô tuyến tụy của chuột bị tiểu đường. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến hợp chất polysacarit thu được từ phương pháp này có công thức I:



trong đó n là số nguyên lớn hơn 5.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến việc tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên từ thực vật có cấu trúc mới và có hoạt tính sinh học. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập hợp chất polysacarit có cấu trúc mới bao gồm α - (1 $\rightarrow$ 3, 6)-glucan và α - (1 $\rightarrow$ 4) -galactantừ loài bí đỏ *Cucurbita pepo* ở Việt Nam, hợp chất này có khả năng ức chế enzym α -glucosidaza và α -amylaza; làm giảm mức đường huyết và cải thiện tổn thương mô tuyến tụy của chuột bị tiểu đường. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến hợp chất polysacarit thu được từ phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tiểu đường là một bệnh chuyển hóa gây ra các vấn đề nghiêm trọng về sức khỏe (H.W.Baynest, (2015), Journal of Diabetes and Metabolism, 6(5), pp.1-9). Hiện nay, một số liệu pháp đã được sử dụng để điều trị bệnh tiểu đường bao gồm tiêm insulin và uống thuốc, tuy nhiên, các liệu pháp này có một số tác dụng phụ có hại (S.A.Mohamad, (2016), Journal of Taibah University Medical Sciences, 11(4), pp.317-329). Do đó, việc tìm kiếm các chất chống tiểu đường hiệu quả và an toàn hơn là cần thiết. Thuốc và thực phẩm chức năng từ các sản phẩm tự nhiên đã được phát hiện là có hiệu quả trong điều trị bệnh tiểu đường (D.K.Patel, S.K.Prasad, R. Kumar et al., (2012), Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(4), pp.320-330; P.O.Osadebe, E.U.Odoh, P.F.Uzor, British Journal of Pharmaceutical Research, (2014), 4(17), pp.2075-2095).

Cây bí đỏ là một loại cây dây thuộc họ bầu bí Cucurbitaceae, chi *Cucurbita*. Theo thống kê của Trung tâm dữ liệu thực vật Việt Nam, trên thế giới họ bầu bí có

120 chi, 1000 loài, phân bố tập trung ở vùng nhiệt đới. Việt Nam có 23 chi, 50 loài, trong đó có 3 loài bí đỏ là *C. pepo*, *C. maxima* và *C. moschata*. Bí đỏ đã được sử dụng để kiểm soát bệnh tiểu đường như một liệu pháp dân gian ở Châu Á và Bắc Mỹ (A.Bayat, F.Azizi-Soleiman, M.Heidari-Beni et al., (2016), International Journal of Preventive Medicine, 7(1), 30; A.Mahmoodpoor, M.Medghalchi, H.Nazemiyeh et al., (2018), Adv.Pharm.Bull., 8(2), pp.347–351; G.G.Adams, S.Imran, S.Wang et al., (2012), Food Chemistry, 134(4), pp.1919-1925). Nó chứa nhiều thành phần có hoạt tính sinh học như protein, alkaloit, flavonoit, sterol, axit béo, enzym và polysacarit. Bí đỏ cũng là một nguồn phong phú các chất dinh dưỡng và vitamin đặc biệt là β -caroten, các thành phần này có trong thịt, hạt và lá. Các thành phần kháng sinh khác nhau bao gồm các thành phần chống nấm đã được phân lập từ các bộ phận khác nhau của cây bí đỏ. Do vậy, bí đỏ được coi là thực phẩm vàng bởi nó có chứa nhiều chất có lợi cho sức khỏe (A.H.Dar, S.A.Sofi, S.Rafiq, (2017), International Journal of Food Science and Nutrition, pp.168-173); M.Yadav, S.Jain, R.Tomar et al., (2010), Nutrition Research Reviews, 23, pp.184–190; J.M.Dotto, J.S.Chach, (2020), Scientific African, 10, e005758-10).

Polysacarit là một polyme tự nhiên tồn tại trong động vật, thực vật và vi sinh vật, chúng có các hoạt tính sinh học phong phú như gây độc tế bào, chống vi-rút, chống oxy hóa và điều hòa miễn dịch (Thuy.T.T.Thanh, Thu.M.T.Quach, NuT.Nguyen et al., (2016), International Journal of Biological Macromolecules, 93(A), pp.695-702; Y.Liu, Y.Sun, G. Huang, (2018), International Journal of Biological Macromolecules, 111, pp.780-786; F.Chen, G.Huang, (2018), International Journal of Biological Macromolecules, 112, pp.211-216; Van T.T.Tran, Bang H.Truong, Vy N.H.Tran et al., (2018), Natural Product Research, 32(19), pp.2291-2296). Gần đây, polysacarit chiết tách từ bí đỏ (pumpkin polysaccharide) đã được chú ý nhiều do độc tính thấp và các hoạt tính sinh học có ích của chúng như hạ lipid máu, tăng cường hệ miễn dịch, giảm cholesterol, chống

ung thư và chống oxy hóa, trong đó đáng chú ý nhất là hoạt tính hạ đường huyết (H.Song, Z.Sun, (2017), *Biotech.*, 7, pp.159-204; L.Wang, F.Liu, A.Wang et al., (2017), *Food Hydrocolloids*, 66, pp.357-364; L.Chen, G.Huang, (2018), *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, pp.770-774). Nghiên cứu của Jin và cộng sự (H.Jin, Y.J.Zhang, J.X.Jiang et al., (2013), *Journal of food and drug analysis*, 21, pp.184 -189) cho thấy polysacarit từ bí đỏ *Cucurbita moschata* có tác dụng đáng kể đối với chuột mắc bệnh tiểu đường, mức đường huyết của chuột giảm 52,3% sau khi điều trị bằng pumpkin polysacarit. Nghiên cứu khác (S.Wang, A.Lu, L.Zhang et al., (2017), *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, pp.182–187) chỉ ra rằng việc sử dụng pumpkin polysacarit từ *Cucurbita moschata* làm giảm đáng kể mức đường huyết và làm cho insulin của chuột bị tiểu đường trở lại mức bình thường. Polysacarit từ bí đỏ *Cucurbita moschata* cũng cho thấy tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza khá mạnh (Y.Song, Y.Zhang, T.Zhou et al., (2012), *International Journal of Food Science and Technology*, 47, pp.357–361).

Hiện nay, các nghiên cứu về polysacarit từ bí đỏ chủ yếu tập trung vào chiết tách và làm sáng tỏ thành phần hóa học, kết quả cho thấy polysacarit từ bí đỏ bao gồm các đường glucoza, arabinoza, galactoza, rhamnoza... Tuy nhiên, dữ liệu liên quan đến việc xác định cấu trúc hóa học của chúng vẫn còn hạn chế (Van T.T.Tran, Bang H.Truong, Vy N.H.Tran et al., (2018), *Natural Product Research*, 32(19), pp.2291-2296; H.Song, Z.Sun, (2017), *Biotech.*, 7 pp.159-204; L.Wang, F.Liu, A.Wang et al., (2017), *Food Hydrocolloids*, 66, pp.357-364; S.Wang, A.Lu, L.Zhang et al., (2017), *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, pp.182–187). Trong một công trình đã được công bố (Y.Song, J.Li, X.Hu et al., (2011), *Macromolecular Research*, 19(11), pp.1172-1178), các tác giả đã nghiên cứu cấu trúc của polysacarit từ bí đỏ *Cucurbita pepo* mua từ một khu chợ địa phương ở Bắc Kinh, Trung Quốc. Kết quả cho thấy polysacarit từ bí đỏ *Cucurbita*

pepo ở Trung Quốc có cấu trúc hóa học gồm chủ yếu $\rightarrow 2,6$ -galactosa, $\rightarrow 4,6$ -glucoza, $\rightarrow 3$ -glucoza.

Qua tổng quan tài liệu các nghiên cứu trên thế giới cho thấy thành phần chính có hoạt tính hạ đường huyết của quả bí đỏ chính là các polysacarit với hàm lượng khá lớn khoảng 4-10% trọng lượng nguyên liệu khô (H.Song, Z.Sun, (2017), *Biotech.*, 7 pp.159-204; L.Wang, F.Liu, A.Wang et al., (2017), *Food Hydrocolloids*, 66, pp.357-364; H.Jin, Y.J.Zhang, J.X.Jiang et al., (2013), *Journal of food and drug analysis*, 21, pp.184 -189; Y.Song, Y.Zhang, T.Zhou et al., (2012), *International Journal of Food Science and Technology*, 47, pp.357–361). Ở Việt Nam, trong dân gian đã sử dụng các quả họ bầu bí như mướp đắng để điều trị bệnh tiểu đường rất hiệu quả, có nhiều bài thuốc kiểm soát bệnh tiểu đường từ các cây này đã được sử dụng (Phùng Thanh Hương và Nguyễn Xuân Thắng, (2002), *Tạp chí dược học*, 1, Tr.22-25; Phạm Văn Thanh (2001), *Luận án Tiến sĩ*, Viện dược liệu). Tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào về polysacarit từ quả bí đỏ nói riêng cũng như các thành phần khác từ quả bí đỏ nói chung với mục đích tạo thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường được nghiên cứu từ quả bí đỏ được trồng ở Việt Nam.

Hiện nay, số lượng người mắc chứng tiểu đường đang ngày càng tăng lên và có xu hướng trẻ hóa về độ tuổi. Do đó, rất cần có các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên, giúp bệnh nhân mắc chứng tiểu đường có thêm sự lựa chọn an toàn cho sức khỏe.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tách chiết polysacarit từ thịt quả bí đỏ *Cucurbita pepo* làm thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường cho người hiệu quả cao.

Polysacarit thu được từ quả bí đỏ theo sáng chế có cấu trúc mới bao gồm α - (1 $\rightarrow$ 3, 6)-glucan và α - (1 $\rightarrow$ 4) -galactan.

Polysacarit thu được từ quả bí đỏ theo sáng chế có khả năng ức chế enzym α -glucosidaza và α -amylaza; làm giảm mức đường huyết và cải thiện tổn thương mô tuyến tụy của chuột bị tiểu đường.

Polysacarit thu được từ quả bí đỏ theo sáng chế có hàm lượng cao (8,1% theo trọng lượng thịt bí đỏ khô) có hoạt tính tốt và do vậy có tiềm năng lớn để ứng dụng sản xuất thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập hợp chất polysacarit từ quả bí đỏ bao gồm α - (1 $\rightarrow$ 3, 6)-glucan và α - (1 $\rightarrow$ 4) – galactan làm thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị tiểu đường và hợp chất polysacarit thu được từ phương pháp này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh tụy của chuột bị tiểu đường trước và sau khi được sử dụng polysacarit từ quả bí đỏ (PP-PE). Ảnh parafin tuyến tụy của chuột (a) Nhóm đối chứng không mắc bệnh tiểu đường; đảo nhỏ Langerhan với đặc điểm tế bào bình thường. (b) Nhóm đối chứng bệnh tiểu đường; các đảo nhỏ Langerhan bị giảm khối lượng và số lượng, kèm theo sự thoái hóa (c) Chuột tiểu đường được điều trị bằng Chlorpropamide (100 mg / kg); cho thấy sự phục hồi đảo nhỏ Langerhan, cấu trúc tế bào trở về bình thường. (d) Chuột tiểu đường được điều trị bằng PP-PE (100 mg / kg): cho thấy sự phục hồi và tái tạo cấu trúc tế bào của đảo Langerhan.

Hình 2 thể hiện kết quả đo GPC của polysacarit từ quả bí đỏ (PP-PE). Kết quả cho thấy PP-PE điển hình cho polyme tự nhiên thể hiện ở trọng lượng phân tử lớn $M_w = 2,4 \times 10^4$ g/mol và có sự đa phân tán cao thể hiện ở sự phân bố trọng lượng phân tử $M_w/M_n = 2,08$.

Hình 3 thể hiện phổ IR của polysacarit từ quả bí đỏ (PP-PE). Phổ IR có các dải đặc trưng cho mẫu polysacarit: tín hiệu khoảng 3000 cm^{-1} thể hiện dao động hóa trị của nhóm -OH ; tín hiệu khoảng 2900 cm^{-1} là dao động hóa trị của nhóm -C-H ; tín hiệu trong vùng từ $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động liên kết của nhóm C-OH và các dao động của liên kết glycosit (C-O-C).

Hình 4 thể hiện phổ NMR của polysacarit từ quả bí đỏ (PP-PE). A: phổ một chiều ^1H , B: phổ một chiều ^{13}C , C: hai chiều COSY, D: phổ hai chiều HSQC, E: phổ hai chiều HMBC. Các phổ một chiều ^1H và ^{13}C có độ phân dải tương đối tốt đối với mẫu polysacarit; các phổ hai chiều COSY, HSQC và HMBC có các tín hiệu rõ ràng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đã tận dụng được nguồn nguyên liệu bí đỏ có sản lượng lớn trong tự nhiên của Việt Nam.

Phương pháp phân lập hợp chất polysacarit từ quả bí đỏ bao gồm α - (1 $\rightarrow$ 3, 6)-glucan và α - (1 $\rightarrow$ 4) – galactan làm thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị tiểu đường bao gồm các bước:

(i) xử lý tạo bột bí đỏ nguyên liệu:

Bí đỏ *Cucurbita pepo* được gọt vỏ, bỏ hạt, cùi (thịt) được thái thành lát, phơi trong bóng râm, sấy ở nhiệt độ $<50^\circ\text{C}$ rồi nghiền thành bột, thu bột bí đỏ. Việc thực hiện nghiền cùi bí đỏ có thể áp dụng các phương pháp nghiền thông thường được sử dụng trong lĩnh vực, tùy theo điều kiện thực tế.

(ii) chiết tách thu polysacarit thô:

Bột bí đỏ được chiết trong dung môi là nước cất với tỷ lệ bột bí đỏ:nước cất = 1:20 (khối lượng/thể tích) ở 80°C trong 4 giờ, lặp lại 2 lần và gom dịch chiết thu được lại, thu được dịch chiết bí đỏ.

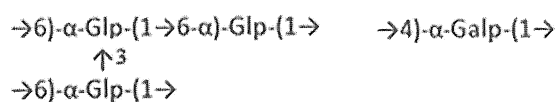
Dịch chiết được cô quay giảm bớt nước sau đó loại béo bằng cách cho n-hexan vào dịch chiết với tỷ lệ n-hexan: dịch chiết = 1:3 (thể tích/thể tích), loại bỏ dịch n-hexan (dịch nổi ở trên), thu được dịch chiết loại béo.

Dịch chiết loại béo được rửa bằng cồn 96° ở điều kiện tỷ lệ cồn: dịch chiết loại béo là 4:1 (thể tích/thể tích), để dịch qua đêm ở nhiệt độ thấp (khoảng 5°C). Ly tâm dịch với tốc độ 9000 vòng/phút trong 20 phút, gạn lấy rửa, rửa rửa 2 lần bằng cồn 96°, sấy rửa ở 50°C đến khối lượng không đổi, thu được polysacarit thô.

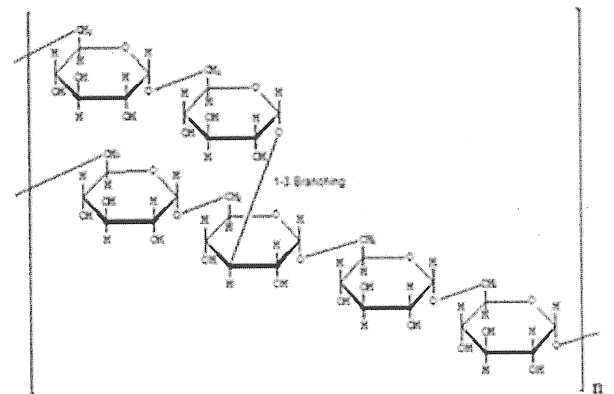
(iii) xử lý thu polysacarit sạch:

Hòa tan hoàn toàn polysacarit thô trong nước cất, loại protein bằng phương pháp Sevag (G.L.Huang, F.Chen, W.Yang et al., (2021), Trends in Food Science and Technology, 109, pp.564-568) cụ thể như sau: cho hỗn hợp dung môi clorofom: butanol = 5: 1 (thể tích/thể tích) vào dung dịch polysacarit theo tỷ lệ dung dịch : hỗn hợp dung môi = 4: 1 (thể tích/thể tích), lọc bỏ kết tủa tạo thành, sau đó tiến hành tinh chế dung dịch bằng màng thẩm tách MWCO 10kDa (Thermo Scientific– USA) dưới vòi nước chảy trong 72 giờ. Kết tủa polysacarit bằng cồn 96°, ly tâm, rửa rửa bằng cồn, sấy ở 50°C đến khối lượng không đổi, thu được hợp chất polysacarit từ quả bí đỏ bao gồm α - (1 $\rightarrow$ 3, 6)-glucan và α - (1 $\rightarrow$ 4) – galactan (PP-PE).

Hợp chất polysacarit từ quả bí đỏ bao gồm α - (1 $\rightarrow$ 3, 6)-glucan và α - (1 $\rightarrow$ 4) – galactan (PP-PE) thu được từ quả bí đỏ có công thức I dưới đây:



2 monome của PP-PE



α -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan phân nhánh tại vị trí C-3

trong đó n là số nguyên lớn hơn 5

Hợp chất polysacarit từ quả bí đỏ bao gồm α - (1 $\rightarrow$ 3, 6)-glucan và α - (1 $\rightarrow$ 4) – galactan (PP-PE) thu được từ quả bí đỏ theo sáng chế có cấu trúc mới bao gồm α - (1 $\rightarrow$ 3, 6)-glucan và α -(1 $\rightarrow$ 4)-galactan, có trọng lượng phân tử $M_w = 2,4 \times 10^4$ g/mol và sự phân bố trọng lượng phân tử $M_w/M_n = 2,08$.

Mẫu PP-PE được nghiên cứu xác định cấu trúc dựa vào 3 phương pháp sắc ký thẩm thấu gel GPC, phổ hồng ngoại IR (Phổ hồng ngoại được đo trên máy FT-IR Affinity-1S SHIMADZU) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR (Phổ NMR đo trên máy Bruker AVANCE Neo 600MHz với dung môi D_2O ở nhiệt độ $70^\circ C$, sử dụng DSS làm chất chuẩn nội với kỹ thuật đo khử tín hiệu của nước).

Bảng 1. Số liệu phổ 1H - NMR, ^{13}C -NMR (δ , ppm) của hợp chất PP-PE

Gốc	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6a,b
$\rightarrow$ 3,6)- α - Glc- (1 $\rightarrow$	100,45/4,96 102,26/5,34	74,13/3,55	76,12/3,71	72,50/3,49	72,93/3,88	68,66/ 3,93;3,77
$\rightarrow$ 4)- α - Galp- (1 $\rightarrow$	102,26/5,35	74,26/3,63	75,91/3,94	80,00/3,62	74,00/3,82	63,33/ 3,86;3,79

Đo trong D_2O , 600 MHz (1H -NMR) 150 MHz (^{13}C -NMR) ở $70^\circ C$

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chiết tách polysacarit từ nguyên liệu bí đỏ

Quả bí đỏ *Cucurbita pepo* thu thập ở Đà Lạt, Lâm Đồng. Bí đỏ được gọt vỏ, bỏ hạt, cùi (thịt) được thái thành lát, phơi trong bóng râm, sấy ở nhiệt độ $<50^\circ C$ đến khối lượng không đổi, nghiền nhỏ thành bột, thu bột bí đỏ.

Cân chính xác 20g bột bí đỏ, ngâm chiết trong 400ml nước cất ở $80^\circ C$ trong 4 giờ, lặp lại 2 lần, gom dịch chiết, thu được dịch chiết bí đỏ.

Dịch chiết được cô quay giảm bớt nước sau đó loại béo bằng cách cho n-hexan vào dịch chiết với tỷ lệ n-hexan: dịch chiết = 1:3 (thể tích/thể tích), loại bỏ dịch n-hexan (dịch nổi ở trên), thu được 300ml dịch chiết loại béo.

Dịch chiết loại béo được rửa bằng cồn 96° ở điều kiện tỷ lệ cồn: dịch chiết loại béo là 4:1 (thể tích/thể tích), để dịch qua đêm ở nhiệt độ thấp (khoảng 5°C). Ly tâm dịch với tốc độ 9000 vòng/phút trong 20 phút, gạn lấy rửa, rửa rửa 2 lần bằng cồn 96°.

(iii) xử lý thu polysacarit sạch:

Hòa tan hoàn toàn polysacarit thô trong nước cất, loại protein bằng phương pháp Sevag (G.L.Huang, F.Chen, W.Yang et al., (2021), Trends in Food Science and Technology, 109, pp.564-568) cụ thể như sau: cho hỗn hợp dung môi clorofom: butanol = 5: 1 (thể tích/thể tích) vào dung dịch polysacarit theo tỷ lệ dung dịch : hỗn hợp dung môi = 4: 1 (thể tích/thể tích), lọc bỏ kết tủa tạo thành, sau đó tiến hành tinh chế dung dịch bằng màng thẩm tách MWCO 10kDa (Thermo Scientific– USA) dưới vòi nước chảy trong 72 giờ. Kết tủa polysacarit bằng cồn 96°, ly tâm, rửa rửa bằng cồn, sấy ở 50°C đến khối lượng không đổi, thu được hợp chất polysacarit từ quả bí đỏ bao gồm α - (1 $\rightarrow$ 3, 6)-glucan và α - (1 $\rightarrow$ 4) – galactan (PP-PE)

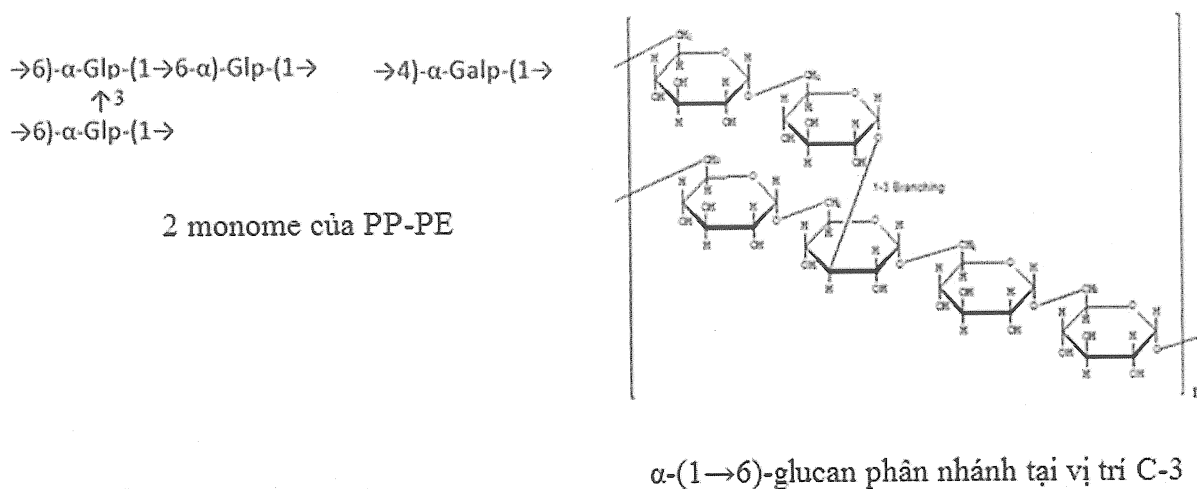
Khối lượng PP-PE thu được sau bước này là 1,62 g, đạt hiệu suất chiết tách là 8,1% (% so với trọng lượng bột bí đỏ nguyên liệu).

Kết quả đo GPC (Hình 2) cho thấy mẫu PP-PE có trọng lượng phân tử trung bình $M_w = 24.000$ g/mol và sự phân bố trọng lượng phân tử trung bình $M_w/M_n = 2,08$.

Phổ IR: Phổ IR của mẫu PP-PE (Hình 3) thể hiện các dải hấp thụ đặc trưng cho polysacarit có nguồn gốc từ bí đỏ.

Phổ NMR của mẫu PP-PE (Hình 4) thể hiện các tín hiệu cộng hưởng đặc trưng cho polysacarit có nguồn gốc từ bí đỏ.

Cấu trúc hóa học của PP-PE là hợp chất có công thức I dưới đây:



trong đó n là số nguyên lớn hơn 5.

Ví dụ 2: Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidaza và α -amylaza của hợp chất polysacarit (PP-PE) thu được theo Ví dụ 1.

Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidaza và α -amylaza của hoạt chất nghiên cứu được thực hiện theo các phương pháp đã công bố (P.Salehi, B.Asghar, M.A.Esmaeili et al., (2013), Journal of Medicinal Plants Research, 7(6), pp.257-266; T.Manaharan, D.Appleton, H.M.Cheng et al., (2012), Food Chemistry, 132, pp.1802-1807). Khả năng ức chế enzyme α -glucosidaza và α -amylaza của mẫu thử được xác định theo công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - (A_{\text{mẫu thử}} / A_{\text{đối chứng}} * 100)$$

Trong đó: $A_{\text{đối chứng}} = OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{blank}}$

$$A_{\text{mẫu thử}} = OD_{\text{mẫu thử}} - OD_{\text{blank mẫu thử}}$$

Giá trị IC_{50} được xác định nhờ phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

Kết quả cho thấy PP-PE ở nồng độ 5, 10, 25, 50 và 100 mg/mL lần lượt thể hiện $3,84 \pm 0,83$, $7,88 \pm 0,83$, $15,37 \pm 1,83$, $26,90 \pm 0,67$ và $43,23 \pm 2,99\%$ đối với

hoạt tính ức chế α -glucosidaza và $4,18 \pm 1,79$, $9,86 \pm 0,98$, $15,54 \pm 2,18$, $28,18 \pm 0,93$ và $47,69 \pm 0,98\%$, đối với hoạt tính ức chế α -amylaza. Acarboza ở các nồng độ 5, 10, 25, 50, và 100 mg / mL được sử dụng làm chất đối chứng.

Bảng 2. Giá trị IC_{50} của PP-PE và acarboza đối với sự ức chế α -amylaza và α -glucosidaza

TT	Mẫu	IC_{50} (mg/mL)	
		α -glucosidaza	α -amylaza
1	Acarboza	$64,04 \pm 2,21$	$71,53 \pm 1,67$
2	PP-PE	$110,32 \pm 7,08$	$103,06 \pm 1,60$

Giá trị được biểu thị bằng giá trị trung bình $\pm$ SD ($n = 3$).

Kết quả Bảng 2 chỉ ra rằng PP-PE thể hiện hoạt tính ức chế enzym α -glucosidaza và α -amylaza rất tốt với giá trị IC_{50} lần lượt là $110,32 \pm 7,08$ và $103,06 \pm 1,60$ mg / mL.

Ví dụ 3: Hoạt tính hạ đường huyết trên động vật thực nghiệm

Được tiến hành theo phương pháp của Okokon và cộng sự (J.E.Okokon, A.L.Bassey and J.Obot, (2006), Afr. J. Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 3(2), pp.21–26), Sivalingam và Sriram (G.Sivalingam, N.Sriram, (2013), International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 4(3), pp.1196-1201).

Phương pháp gây tăng đường huyết

Đường huyết của chuột được gây tăng bằng cách tiêm Alloxan monohydrate liều đơn 150 mg/ kg (pha trong nước muối sinh lý 0,9%). Chuột đã nhịn đói 18 giờ trước khi tiêm Alloxan. Sau một giờ tiêm Alloxan chuột được ăn trở lại.

Đánh giá hoạt tính hạ đường huyết

Sau 72 giờ tiêm Alloxan monohydrate, mức đường huyết trong máu được xác định bằng thiết bị đo đường huyết OneTouch Ultra. Những con chuột có mức

đường huyết trong máu lớn hơn 150 mg/ dL thì được chọn để nghiên cứu và được phân thành 4 lô (6 con/ lô):

- Lô 1 (Đối chứng thường): uống nước.
- Lô 2 (Đối chứng bệnh lý): uống nước.
- Lô 3 (Chứng tham khảo): uống chlorpropamide liều 100 mg/ kg/ ngày.
- Lô 4 (Mẫu thử): uống mẫu liều 100 mg/kg/ngày.

Cho chuột uống mẫu thử hoặc nước trong 7 ngày. Sau 7 ngày xác định mức đường huyết trong máu. Đánh giá tác dụng của hoạt chất dựa vào sự giảm nồng độ glucoza trong huyết thanh trước và sau khi cho uống hoạt chất.

Phân tích thống kê

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($\pm$ SD). Dữ liệu được phân tích thống kê bằng ANOVA. Giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa.

Kết quả xác định mức đường huyết trong máu của các lô chuột trước và sau khi cho uống mẫu được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3: Nồng độ đường huyết trong máu chuột trước và sau khi thí nghiệm

TT	Nhóm	Mức đường huyết trong máu (mg/dL)	
		Trước khi uống	Sau 7 ngày uống
1	Đối chứng thường	112,44 $\pm$ 3,15	124,142 $\pm$ 3,28
2	Đối chứng bệnh lý	352,80 $\pm$ 94,15	346,20 $\pm$ 93,03
3	Chứng tham khảo: uống chlorpropamit liều 100 mg/ kg/ ngày	345,00 $\pm$ 86,79	179,40* $\pm$ 32,77
4	Mẫu thử: uống mẫu liều 100 mg/kg/ngày.	345,60 $\pm$ 36,25	243,00* $\pm$ 31,81

*Giá trị được biểu thị bằng giá trị trung bình $\pm$ SD ($n = 6$). * ($p < 0.05$)*

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy: Sau 7 ngày uống mẫu thử (PP-PE) liều 100 mg/kg/ ngày thì mức đường huyết trong máu đã giảm từ 345,6 mg/ dL giảm xuống còn 243,0 mg/ dL (giảm 29,8%).

Ví dụ 5: Nghiên cứu mô bệnh học

Các tụy chuột được giữ trong dung dịch formalin 10%. Sau khi cố định, các mô được ngâm trong parafin, các phần rắn được cắt dày 5 μ m và nhuộm bằng kỹ thuật Hematoxylin-Eosin (HE) (B.S.Harris, T.R.Kasser, R.J.Martin, (1986), J Nutr; 116, pp.2536–2546). Các mặt cắt được quan sát dưới kính hiển vi để xem sự thay đổi mô bệnh học.

Kết quả cho thấy chuột tiểu đường được điều trị bằng PP-PE (100 mg / kg) có sự phục hồi và tái tạo rõ rệt cấu trúc tế bào của đảo Langerhan của tụy. Điều đó có nghĩa khi điều trị bằng PP-PE, tụy chuột bị tiểu đường đã có sự hồi phục rõ rệt. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Hình 1.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đã phân lập được hợp chất polysacarit có cấu trúc mới từ loài bí đỏ *Cucurbita pepo* ở Việt Nam, hợp chất này có khả năng ức chế enzym α -glucosidaza và α -amylaza; làm giảm mức đường huyết và cải thiện tổn thương mô tuyến tụy của chuột bị tiểu đường.

Sáng chế cho thấy hàm lượng polysacarit trong quả bí đỏ rất cao và thể hiện hoạt tính chống tiểu đường rất tốt. Thêm nữa, bí đỏ là loại thực phẩm rất phổ biến ở nước ta.

Đồng thời, sáng chế này cũng tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo hướng tới tạo ra các sản phẩm chứa polysacarit từ quả bí đỏ trong điều trị bệnh tiểu đường. Hơn thế nữa hiệu quả của sáng chế còn mang lại

không chỉ ở khía cạnh kinh tế trong khai thác nguồn thực vật phổ biến ở Việt Nam mà còn mang lại công ăn việc làm cho người lao động.

Tài liệu tham khảo

1. H.W.Baynest, Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus, Journal of Diabetes and Metabolism, 6(5) (2015), 1-9.
2. S. A. Mohamad, Diabetes and oral therapies: A review of oral therapies for diabetes mellitus, Journal of Taibah University Medical Sciences, 11(4) (2016), 317-329.
3. D.K.Patel, S.K. Prasad, R. Kumar, S. Hemalatha, An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(4) (2012), 320-330.
4. P. O. Osadebe, E. U. Odoh, P. F. Uzor, Natural Products as Potential Sources of Antidiabetic Drugs, British Journal of Pharmaceutical Research, 4(17) (2014), 2075-2095.
5. A. Bayat, F. Azizi-Soleiman, M. Heidari-Beni, A. Feizi, B. Iraj, R. Ghiasvand, and G. Askari, Effect of *Cucurbita ficifolia* and Probiotic Yogurt Consumption on Blood Glucoza, Lipid Profile, and Inflammatory Marker in Type 2 Diabetes, International Journal of Preventive Medicine, 7(1) (2016), 30.
6. A. Mahmoodpoor, M. Medghalchi, H. Nazemiyeh, P. Asgharian, K. Shadvar, and H. Hamishehkar, Effect of *Cucurbita Maxima* on Control of Blood Glucoza in Diabetic Critically Ill Patients, Adv Pharm Bull., 8(2) (2018), 347–351.
7. G.G.Adams, S.Imran, S.Wang, A.Mohammad, M. S. Kok, D. A.Gray, G. A.Channell, S. E. Harding, Extraction, isolation and characterisation of oil bodies from pumpkin seeds for therapeutic use, Food Chemistry, 134(4) (2012), 1919-1925.
8. A. H. Dar, S A Sofi, S. Rafiq, Pumpkin the Functional and therapeutic ingredient: A review, International Journal of Food Science and Nutrition, (2017), 168-173.
9. M. Yadav, S. Jain, R. Tomar, G. B. K. S. Prasad and H. Yadav. Medicinal and biological potential of pumpkin: an updated review, Nutrition Research Reviews, 23 (2010), 184–190.
10. J. M. Dotto, J. S. Chach, The potential of pumpkin seeds as a functional food ingredient: A review, Scientific African, 10 (2020), e00575.
11. T. T. T. Thanh, T. M. T. Quach, T. N. Nguyen, D. V. Luong, M. L. Bui, T. T. V. Tran, Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca*, International Journal of Biological Macromolecules, 93(A) (2016), 695-702. .

12. Y. Liu, Y. Sun, G. Huang, Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharites, *International Journal of Biological Macromolecules*, 111 (2018), 780-786.
13. F. Chen, G. Huang, Preparation and immunological activity of polysaccharites and their derivatives, *International Journal of Biological Macromolecules*, 112 (2018), 211-216.
14. V.T.T. Van Tran, B.H. Truong, N.H.V. Tran, T. M. T. Quach, T. N. Nguyen, M. L. Bui, Y. Yuguchi & T.T.T. Thanh, Structure, conformation in aqueous solution and antimicrobial activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva reticulata*, *Natural Product Research* 32 (19) (2018), 2291-2296.
15. H. Song, Z. Sun, Hypolipidaemic and hypoglycaemic properties of pumpkin polysaccharites, *Biotech.* 7 (2017), 159-204.
16. L. Wang, F. Liu, A. Wang, Z. Yu, Y. Xu, Y. Yang, Purification, characterization and bioactivity determination of a novel polysaccharit from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds, *Food Hydrocolloids*, 66 (2017), 357-364.
17. L. Chen, G. Huang, Extraction, characterization and antioxidant activities of pumpkin polysaccharit, *International Journal of Biological Macromolecules*, 118 (2018), 770-774.
18. H. Jin, Y.J. Zhang, J.X. Jiang, L.Y. Zhu, P. Chen, J. Li, H.Y. Yao, Studies on the extraction of pumpkin components and their biological effects on blood glucoza of diabetic mice, *Journal of food and drug analysis* 21 (2013), 184 -189.
19. S. Wang, A. Lu, L. Zhang, M. Shen, T. Xu, W. Zhan, H. Jin, Y. Zhang, W. Wang, Extraction and purification of pumpkin polysaccharites and their hypoglycemic effect, *International Journal of Biological Macromolecules*, 98 (2017), 182–187.
20. Y. Song, Y. Zhang, T. Zhou, H. Zhang, X. Hu & Q .Li, A preliminary study of monosaccharide composition and α -glucosidaza inhibitory effect of polysaccharites from pumpkin (*Cucurbita moschata*) fruit, *International Journal of Food Science and Technology*, (47) (2012), 357–361.
21. Y. Song, J. Li, X. Hu, Y. Ni, and Q. Li, Structural Characterization of a Polysaccharit Isolated from Lady Godiva Pumpkins (*Cucurbita pepo* lady godiva), *Macromolecular Research*, 19(11) (2011), 1172-1178.
22. Phùng Thanh Hương và Nguyễn Xuân Thắng, (2002) Tác dụng hạn chế tăng glucoza huyết của thân cây mướp đắng trên một số mô hình gây tăng glucoza thực nghiệm, *Tạp chí dược học*, 1, 22-25

23. Phạm Văn Thanh (2001). Tác dụng hạ đường huyết của quả cây mướp đắng (*Momordica charantia*), Luận án TS dược học, Viện dược liệu, Hà Nội.
24. G. L. Huang, F. Chen, W. Yang, H. Huang, Preparation, deproteinization and comparison of bioactive polysaccharits, Trends in Food Science and Technology, 109 (2021), 564-568.
25. P. Salehi, B. Asghar, M.A. Esmaceli, H. Dehghan, I. Ghazi, α -Glucosidaza and α -amylaza inhibitory effect and antioxidant activity of ten plant extracts traditionally used in Iran for diabetes, Journal of Medicinal Plants Research, 7(6) (2013), 257-266.
26. T. Manaharan, D. Appleton, H.M. Cheng, U.D, Palanisamy. Flavonoits isolated from *Syzygium aqueum* leaf extract as potential antihyperglycaemic agents, Food Chemistry, 132 (2012), 1802-1807.
27. J. E. Okokon, A. L. Bassey and J. Obot, Antidiabetic activity of ethanolic leaf extract of *Croton zambesicus* muell.(thunder plant) in alloxan diabetic rats, Afr. J. Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 3(2) (2006), 21 – 26.
28. G. Sivalingam, N. Sriram, Anti-diabetic activity of *Ribes nigrum* fruit extract in alloxan induced diabetic rats, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 4(3) (2013), 1196-1201.
29. B.S. Harris, T.R. Kasser, R.J. Martin, Dynamics of recovery of body composition after overfeeding, food restriction or starvation of mature female rats, J Nutr; 116 (1986), 2536–2546.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phân lập hợp chất polysacarit từ quả bí đỏ bao gồm α - (1 $\rightarrow$ 3, 6)-glucan và α - (1 $\rightarrow$ 4) – galactan làm thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị tiểu đường bao gồm các bước:

(i) xử lý tạo bột bí đỏ nguyên liệu:

bí đỏ *Cucurbita pepo* được gọt vỏ, bỏ hạt, cùi (thịt) được thái thành lát, phơi trong bóng râm, sấy ở nhiệt độ $<50^{\circ}\text{C}$ rồi nghiền thành bột, thu bột bí đỏ;

(ii) chiết tách thu polysacarit thô:

bột bí đỏ được chiết trong dung môi là nước cất với tỷ lệ bột bí đỏ: nước cất = 1:20 (khối lượng/thể tích) ở 80°C trong 4 giờ, lặp lại 2 lần và gom dịch chiết thu được lại, thu được dịch chiết bí đỏ;

dịch chiết được cô quay giảm bớt nước sau đó loại béo bằng cách cho n-hexan vào dịch chiết với tỷ lệ n-hexan: dịch chiết = 1:3 (thể tích/thể tích), loại bỏ dịch n-hexan là dịch nổi ở trên, thu được dịch chiết loại béo;

dịch chiết loại béo được rửa bằng cồn 96° ở điều kiện tỷ lệ cồn: dịch chiết loại béo là 4:1 (thể tích/thể tích), để dịch qua đêm ở nhiệt độ thấp;

ly tâm dịch với tốc độ 9000 vòng/phút trong 20 phút, gạn lấy rửa, rửa rửa 2 lần bằng cồn 96° , sấy rửa ở 50°C đến khối lượng không đổi, thu được polysacarit thô;

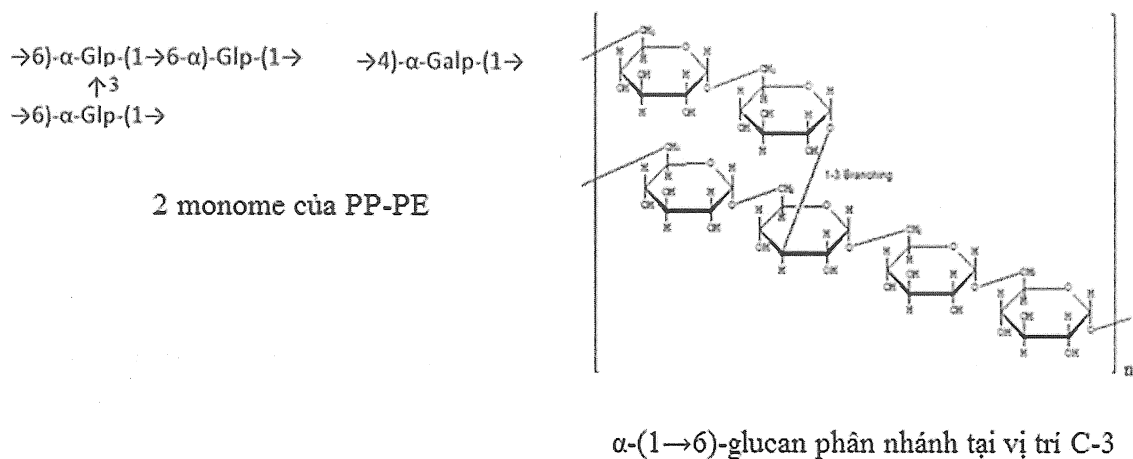
(iii) xử lý thu polysacarit sạch:

hòa tan hoàn toàn polysacarit thô trong nước cất, loại protein bằng phương pháp Sevag cụ thể như sau: cho hỗn hợp dung môi clorofom: butanol = 5: 1 (thể tích/thể tích) vào dung dịch polysacarit theo tỷ lệ dung dịch: hỗn hợp dung môi = 4:

1 (thể tích/thể tích), lọc bỏ kết tủa tạo thành, sau đó tiến hành tinh chế dung dịch bằng màng thẩm tách MWCO 10 kDa dưới vòi nước chảy trong 72 giờ;

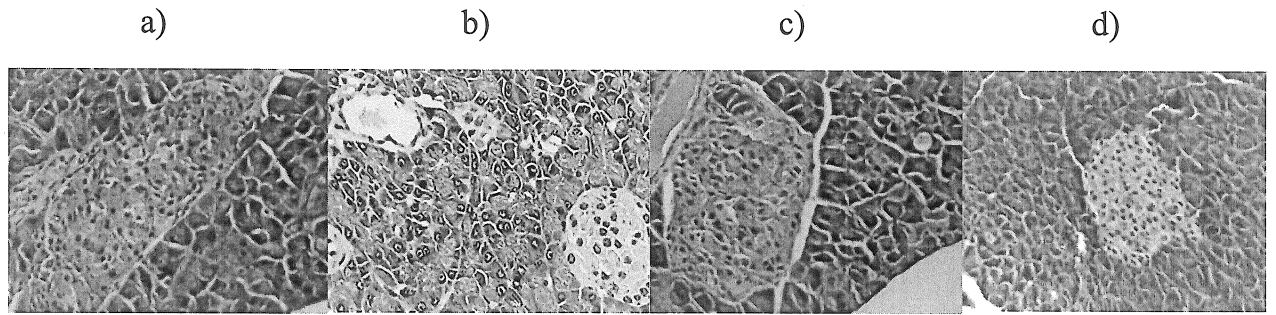
kết tủa polysacarit bằng cồn 96°, ly tâm, rửa tủa bằng cồn, sấy ở 50°C đến khối lượng không đổi, thu được hợp chất polysacarit từ quả bí đỏ bao gồm α - (1 $\rightarrow$ 3, 6)-glucan và α - (1 $\rightarrow$ 4) – galactan.

2. Hợp chất polysacarit từ quả bí đỏ bao gồm α - (1 $\rightarrow$ 3, 6)-glucan và α - (1 $\rightarrow$ 4) – galactan thu được từ phương pháp theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức I dưới đây:

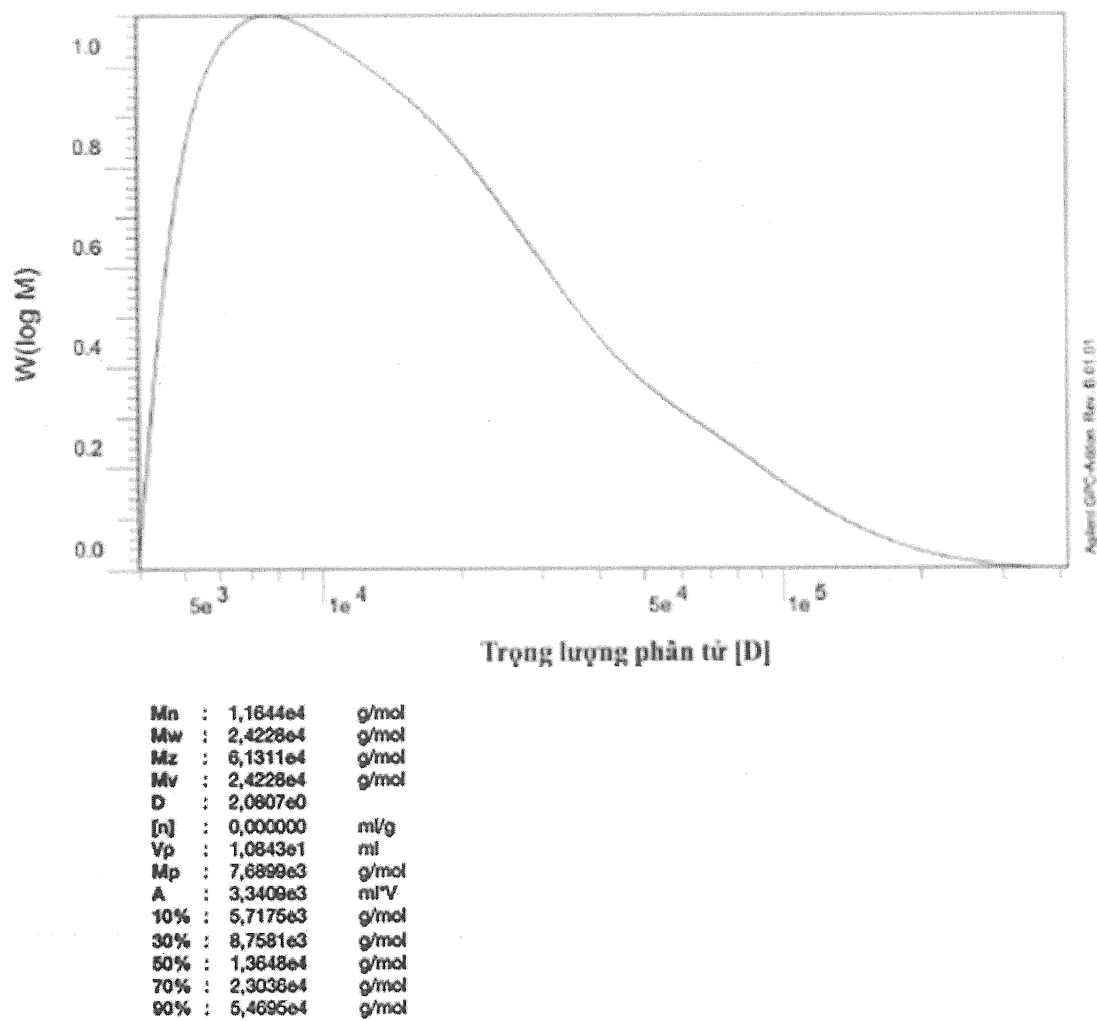


trong đó n là số nguyên lớn hơn 5,

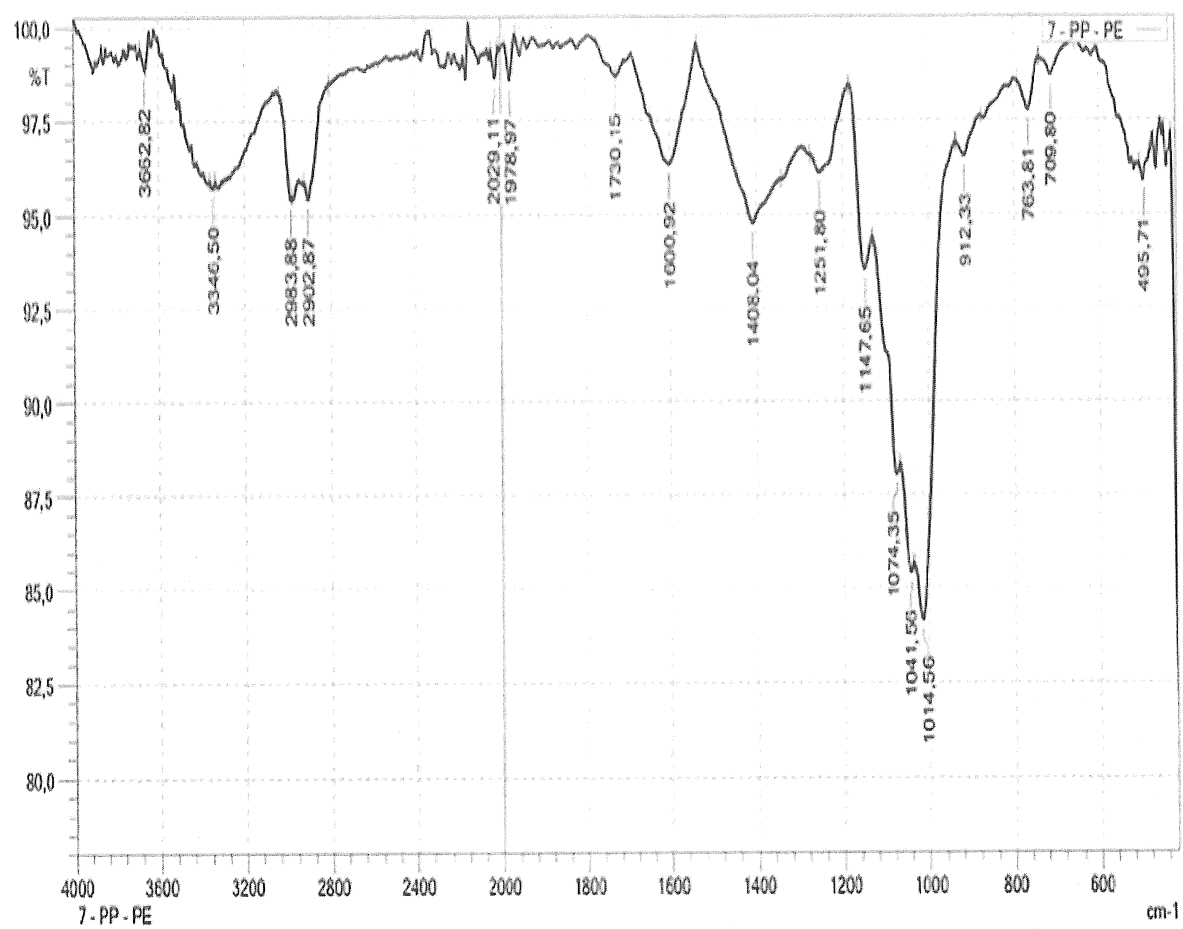
và hợp chất này có sắc ký đồ thẩm thấu gel GPC như được thể hiện trên Hình 2, phổ hồng ngoại IR như được thể hiện trên Hình 3, và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR như được thể hiện trên Hình 4.



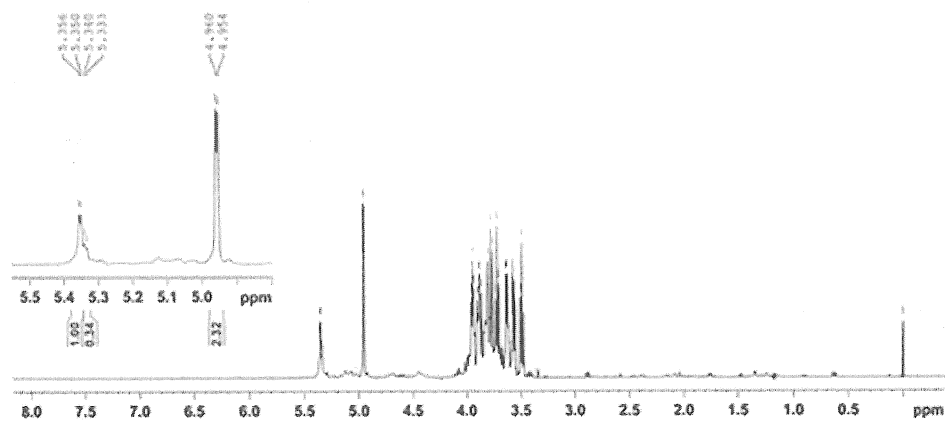
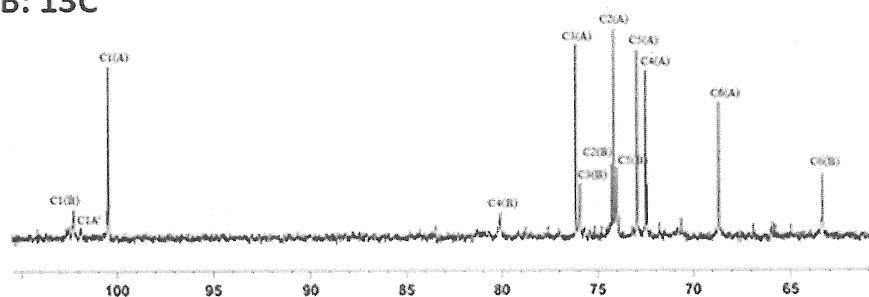
Hình 1



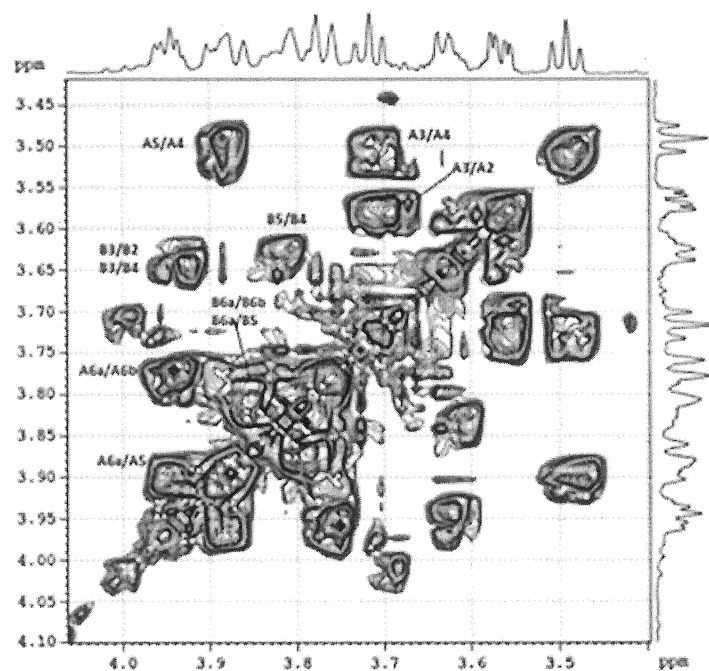
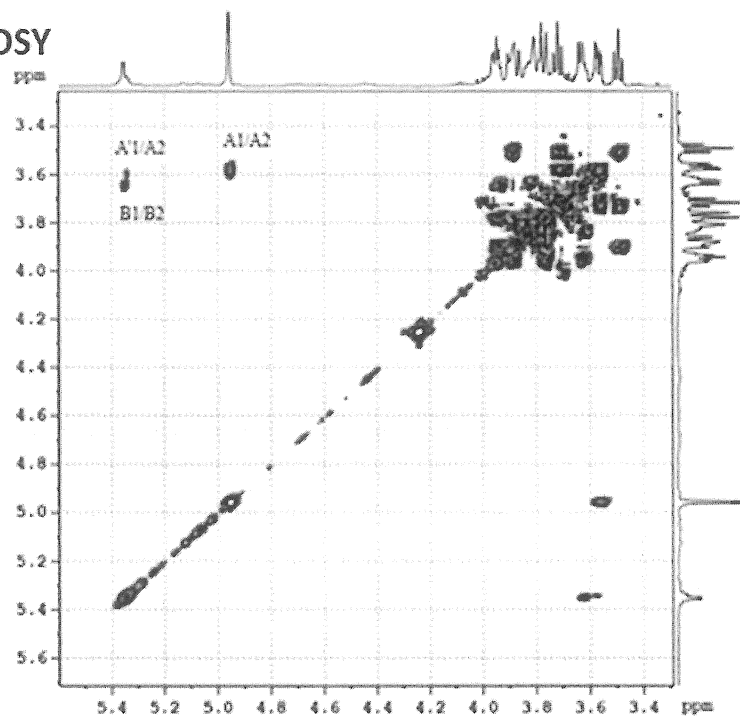
Hình 2



Hình 3

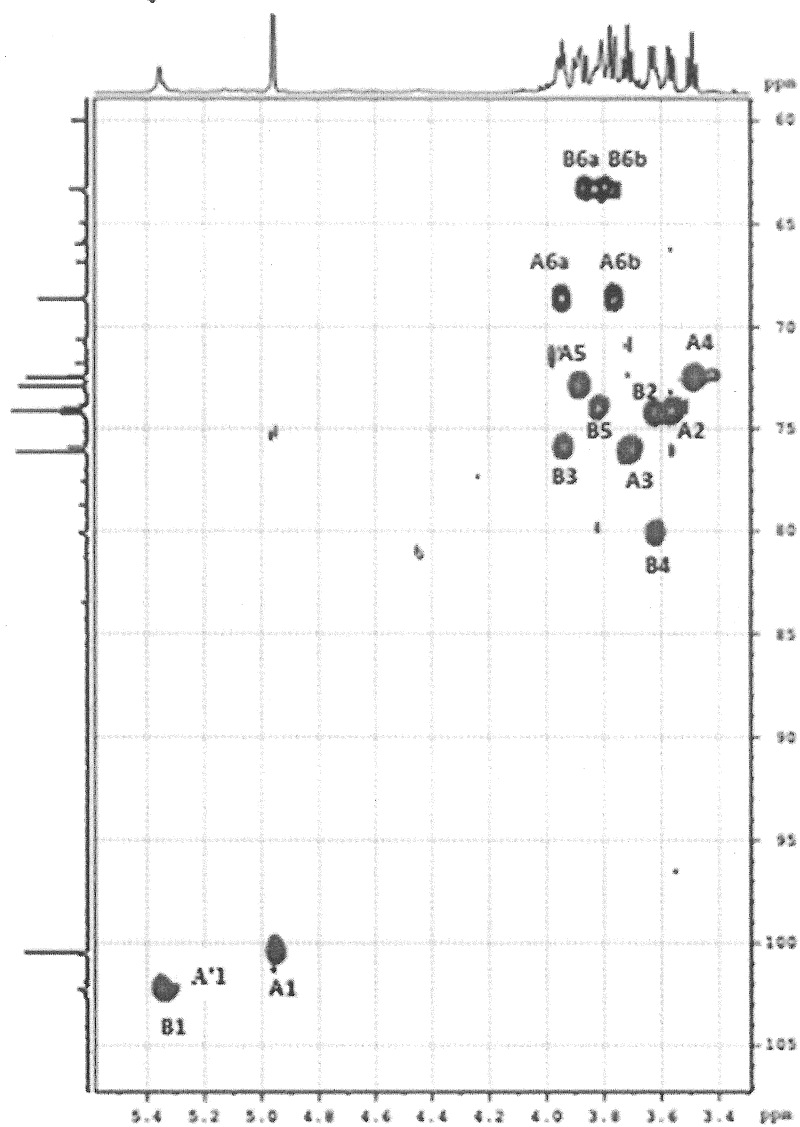
A: ^1H **B: ^{13}C** **Hình 4**

C: COSY



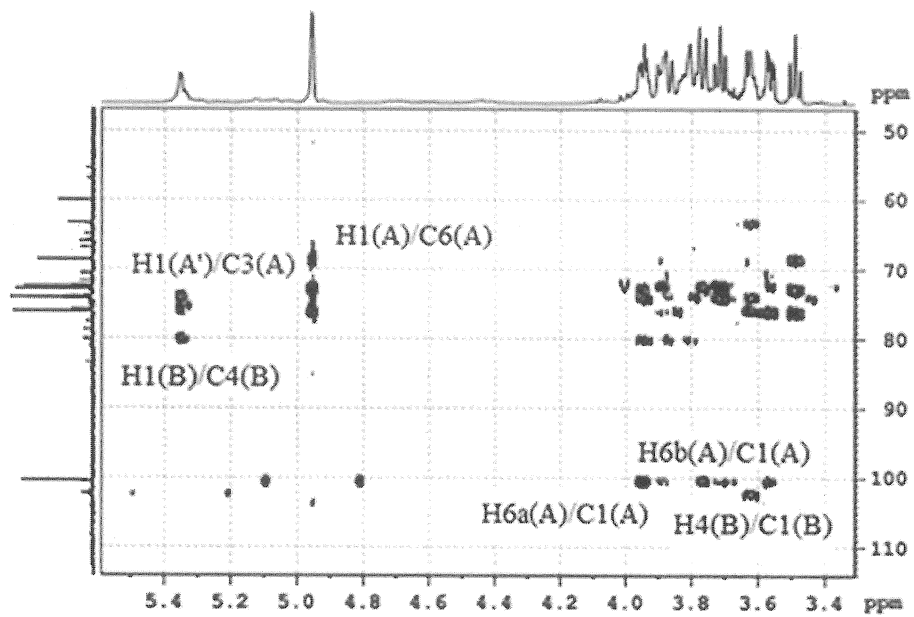
Hình 4 (tiếp)

D: HSQC



Hình 4 (tiếp)

E: HMBC



Hình 4 (tiếp)