



(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) 
2-0002096

(51)⁷ **C07H 17/07, 1/08**

(13) **Y**

(21) 2-2017-00268

(22) 30.08.2017

(45) 25.09.2019 378

(43) 27.11.2017 356

(73) **VIỆN HÓA HỌC - VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)**
A18, số 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Nguyễn Thị Thu Hà (VN), Nguyễn Văn Tuyến (VN), Nguyễn Thanh Trà (VN), Bá
Thị Châm (VN), Lê Thị Tú Anh (VN), Đặng Thị Tuyết Anh (VN), Nguyễn Tiến Đạt
(VN)**

(54) **QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT HỖN HỢP CHỨA HỢP CHẤT VITEXIN VÀ
ISOVITEXIN TỪ VỎ HẠT ĐẬU XANH (VIGNA RADIATA)**

(57) **Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách chiết hỗn hợp chứa hợp chất
vitexin và isovitexin từ vỏ hạt đậu xanh (*Vigna radiata*).**

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ thực vật. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách chiết hỗn hợp giàu hai hoạt chất vitexin và isovitexin từ vỏ hạt đậu xanh (*Vigna radiata*) thuộc chi đậu (*Vigna*), họ đậu (Fabaceae). Hỗn hợp theo giải pháp hữu ích chứa hai hợp chất vitexin và isovitexin có hoạt tính ức chế enzym 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A reductaza (HMGR), một enzym đóng vai trò rất quan trọng trong việc khởi phát hình thành cholesterol nội sinh và làm tăng hàm lượng cholesterol trong máu.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Loài đậu xanh hay đỗ xanh có tên la tinh là *Vigna radiata*, cây thảo, mọc đứng, sống hàng năm, ít phân cành, cao 50- 60cm. Thân cành hơi có cạnh và rãnh, phủ đầy lông mềm. Lá kép mọc so le, gồm 3 lá chét hình trái xoan tam giác, gốc tròn, đầu nhọn, dài 5-11cm, rộng 4-9 cm, mặt trên màu lục sẫm, mặt dưới nhạt, gân 3 tỏa ra từ gốc, cuống lá dài 10-15cm. Cụm hoa mọc ở kẽ lá thành chùm, hoa nhiều màu vàng nhạt hoặc màu lục, đài hình chuông, nhẵn, tràng có cánh cò rộng, cánh thìa hình liềm, cánh bên có tai nhọn, nhị 2 bó, bầu có lông. Quả đậu, hình trụ, dài 5-10cm, lúc đầu có lông, sau nhẵn, hạt nhiều, màu lục. Mùa hoa: tháng 3-5, mùa quả: tháng 6-8. Bộ phận thường dùng là hạt (Viện Dược liệu, Những cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, NXB Khoa học Kỹ thuật, tr. 771-774, 2004).

Loài đậu xanh có nguồn gốc ở Ấn Độ và Trung Á, từ đó được phổ biến sang nhiều khu vực khác của châu Á và trên thế giới. Cây đậu xanh có khả năng thích ứng rộng, chịu hạn khá và có thể thích nghi với các vùng có điều kiện khắc nghiệt. Ở châu Á cây đậu xanh được trồng nhiều ở các quốc gia như: Ấn Độ, Pakistan, Bangladesh, SriLanka, Nepal, Trung Quốc, Mianma, Thái Lan, Việt Nam, Campuchia, Lào, Philippines, Malaysia và Indonesia. Sau này cây đậu xanh còn được trồng ở Trung Phi, các vùng khô và nóng ở Nam Âu, phía Đông Bắc châu Úc, Nam Mỹ và miền Nam Hoa Kỳ. Đậu xanh là cây thực phẩm quan trọng thứ 3, sau cây đậu tương và cây lạc. Ngày càng nhiều các nghiên cứu khoa học cho thấy tác dụng tích cực của hạt đậu xanh đối với sức khỏe con

người. Cây đậu xanh là một vị thuốc quý giá mà thiên nhiên ban tặng và được mệnh danh là “thực phẩm của tương lai”.

Theo Đông y, hạt đậu xanh có vị ngọt, hơi tanh, tính mát, không độc, có tác dụng điều hòa ngũ tạng, mát gan và buồn mật, bổ nguyên khí, chữa lở loét, làm sáng mắt. Theo Y học hiện đại, đậu xanh có thành phần dinh dưỡng rất cao với nhiều vitamin, axit folic và các khoáng chất, là nguồn cung cấp chất xơ hòa tan loại bỏ các độc tố trong cơ thể, ngăn ngừa các bệnh ung thư. Trong đậu xanh còn có thành phần hạ mỡ máu hữu hiệu, giúp cho cơ thể phòng chống chứng xơ cứng động mạch và bệnh cao huyết áp, đồng thời làm ổn định lượng đường trong máu nên rất tốt cho người mắc bệnh đái tháo đường. Chuyên gia dinh dưỡng tại Đại học Kentucky - Lexington (Mỹ) và là tác giả của chương trình “Magic Bean” - hạt đậu xanh kỳ diệu, đã thực hiện rất nhiều nghiên cứu và ghi nhận nếu sử dụng đậu xanh nấu chín mỗi ngày có thể hạ thấp 20% lượng cholesterol trong 3 tuần, giảm đến 40% nguy cơ mắc bệnh tim mạch và huyết áp. Các nghiên cứu trong những năm gần đây đã chỉ ra rằng hạt đậu xanh có các chất chuyển hóa thứ cấp phong phú hơn và hoạt tính sinh học đa dạng hơn dạng hạt ban đầu (Kim DK et al., *Plant Foods Hum Nutr.*, 67, pp. 71–75, 2012).

Nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy hạt và mầm hạt đậu xanh chứa chủ yếu các hợp chất flavonoid, với thành phần chủ yếu là vitexin (apigenin-8-C- β -glucopyranoside) và isovitexin (apigenin-6-C- β -glucopyranoside), chiếm hàm lượng lần lượt khoảng 51,1 và 51,7 mg/g; 12 axit phenolic; 21 axit hữu cơ và 16 chất béo đã được phát hiện bằng phương pháp sắc ký khí/phổ khối (GC/MS) (Dongyan Tanget al., *Chemistry Central Journal*, 8:4, 2014).

Trong các ghi chép cổ, đậu xanh được biết đến với tác dụng giải độc và thanh lọc cơ thể. Trên mô hình thực nghiệm, các protein, peptitpolypeptit, polysacarit và polyphenol từ hạt, mầm và vỏ của đậu xanh đều cho thấy hoạt tính chống oxy hóa tiềm năng. Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết này trên hệ DPPH và 2,2'-azino-di-(3-ethyl-2,3-dihydrobenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) lần lượt là $11,33 \pm 0,24$ và $36,65 \pm 0,63$ mmol/g (Lee JH et al., *Int J Food Sci Tech.*, 46, pp. 2513–2519, 2011). Các nhà khoa học đã chứng minh khả năng giữ gốc tự do của 100g đậu xanh tương đương với 36,3g trà xanh khô và 1462 mg vitamin C. Hoạt chất vitexin ức chế khoảng 60% gốc tự do DPPH ở 100 mg/mL và ngăn chặn một cách có hiệu quả các tế bào da chết do tia UV gây ra (Kim JH et al., *Arch Pharm Res.*, 28(2), pp. 195–202, 2005).

Trên mô hình tăng lipit máu, thử thử nghiệm được cho ăn một hỗn hợp 70% bột đậu xanh và mầm đậu xanh và kết quả làm giảm triệu chứng của bệnh động mạch vành (Li ZX., Chin J Cardiol., 3, pp. 228–231, 1981). Khi nghiên cứu trên chuột khỏe mạnh được ăn dịch chiết đậu xanh trong 7 ngày, hàm lượng cholesterol tổng số đã giảm đáng kể. Tác dụng này được cho là do thành phần phytosterol của đậu xanh, chúng có khả năng ngăn ngừa sinh tổng hợp và hấp thu cholesterol (Zhang HMM et al., Lishizhen Med Mat Med Res., 6, pp. 34–35, 1995). Ở liều 600 mg peptit/kg thể trọng, sau khi chuột được tiêm dịch chiết mầm và hạt đậu xanh từ 3-9 giờ đã làm giảm đáng kể huyết áp tâm thu và duy trì trong thời gian thử nghiệm từ tuần 1 đến tuần 4 (Hsu GSW et al., J. Food Biochem., 35(1), pp. 278–288, 2011). Tác giả Yao Y và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu năm 2008 về tác dụng điều trị của dịch chiết mầm và vỏ hạt đậu xanh trên 2 loại chuột bị bệnh đái tháo đường. Các lô chuột được uống trong 5 tuần với nồng độ dịch chiết mầm đậu xanh là 2 g/kg và vỏ hạt đậu xanh là 3 g/kg thể trọng. Kết quả cho thấy có sự giảm lượng glucoza, cholesterol tổng số, triglycerit và urê máu, đồng thời nồng độ của insulin ở cả 2 lô chuột còn cải thiện rõ rệt (Yao Y et al., J Agric Food Chem., 56(19), pp. 8869–8873, 2008).

Đậu xanh được chứng minh có khả năng chống tăng sinh tế bào qua thử nghiệm MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] trên dòng tế bào ung thư biểu mô (CAL27) và một số dòng tế bào ung thư khác như DU145, SK-OV-3, MCF-7, và HL-60) (Xu B et al., Food Chem., 134(3), pp. 1287–1296, 2012). Ở nồng độ 10 mmol/L và sau 72 giờ, trypsin phân lập từ hạt đậu xanh có khả năng làm giảm xấp xỉ 50% sự di căn và tăng sinh của dòng tế bào ung thư ruột kết (SW480) so với nhóm đối chứng (Zhao YR., Nat Sci Ed., 1(29), 2012).

Các nhà nghiên cứu đã phân tích tác dụng chống viêm của dịch chiết cùi hạt đậu xanh bao gồm các polyphenol, axit gallic, vitexin, và isovitexin trên đại thực bào của chuột. Kết quả hoạt động của các đại thực bào giảm rõ rệt thông qua việc ngăn ngừa biểu hiện gen gây viêm (Yeap SK et al., BioMed Res In., pp. 1–7, 2012). Điều này cho thấy dịch chiết ethanol có tiềm năng rất lớn để cải thiện các triệu chứng lâm sàng của các bệnh liên quan đến viêm, như bệnh dị ứng và bệnh đái tháo đường (Bellik Y et al, Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery, 6(2), pp. 147–158, 2012). Ở nồng độ 20 mg/mL, genistein, axit phytic và axit syringic đã gây phản ứng miễn dịch, thúc đẩy sản xuất IFN- γ , mở ra nhiều triển vọng trong việc sử dụng hạt đậu xanh

để bào chế thuốc miễn dịch (Cherng J-M et al., Food Chem., 104(2), pp. 613–618, 2007).

Dịch chiết polyphenol từ mầm đậu xanh cũng được chứng minh có hoạt tính kháng vi khuẩn *Helicobacter pylori* và chủng loại nấm như *Rhizoctonia solani*, *Coprinus comatus*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Botrytis cinerea* và *F. Oxysporum* (Randhir R et al., Process Biochem., 39, pp. 637–646, 2004). Dịch chiết từ vỏ đậu xanh thể hiện khả năng kháng khuẩn trên mô hình *in vitro* và *in vivo* (Lee CH et al., Mol Med., 18(1), pp. 1437–1448, 2012).

Ở nước ta, đậu xanh đã được trồng từ lâu đời ở các vùng đồng bằng, trung du và miền núi suốt từ Bắc đến Nam. Đậu xanh không chỉ là thực phẩm mà còn được sử dụng làm thuốc chữa bệnh. Sách "Nam dược thần hiệu" của danh Y Tuệ Tĩnh viết: "Đậu xanh không độc, thanh nhiệt, có thể làm sạch mát nước tiểu, chữa lở loét, làm sáng mắt, trị được nhiều bệnh", v.v., đề cập đến tác dụng chữa bệnh của đậu xanh, đặc biệt là vấn đề giải độc, sách "Bản thảo cương mục" của Lý Thời Trân (đời Minh) có ghi nếu ăn uống bị ngộ độc, buồn bực trong người, có thể dùng đậu xanh để chữa trị. Loại thực phẩm này có tác dụng giải độc khi uống nhầm thuốc (thủy ngân, thạch tín...); uống thuốc quá liều (ô đầu, phụ tử...); giải độc do ngộ độc thức ăn, ngộ độc sắn, nấm.v.v..

Các nghiên cứu về vỏ hạt đậu xanh ở nước ta cho đến nay cũng không có nhiều. Nhóm nghiên cứu của Trần Lê Văn Hiền và cộng sự đã công bố thành phần hóa học của chủ yếu trong vỏ hạt đậu xanh là flavonoid, với các hoạt chất chính là vitexin và isovitexin có tác dụng bảo vệ cơ thể khỏi chất phóng xạ, chống đột biến nhiễm sắc thể, ức chế rõ các phản ứng peroxid hóa trong cơ thể (Trần Văn Hiền, Kỷ yếu các công trình nghiên cứu khoa học, Viện y học cổ truyền Việt Nam, 1998). Trong một nghiên cứu khác năm 2010, tác giả Nguyễn Thị Hương cũng đã phân lập được hai hoạt chất vitexin và isovitexin từ vỏ của loài đậu này (Nguyễn Thị Hương, khóa luận tốt nghiệp, Đại học Dược, 2011). Tuy nhiên đây cũng chỉ là công trình công bố về thành phần hóa học của vỏ hạt đậu xanh. Cho đến nay, chưa có công bố cụ thể nào về quy trình tách chiết, cũng như nghiên cứu về hoạt tính ức chế enzym HMGR của hỗn hợp chứa hoạt chất vitexin và isovitexin từ hạt đậu xanh.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình tách chiết hỗn hợp chứa hai hợp chất vitexin và isovitexin từ vỏ hạt đậu xanh, với hàm lượng hai hợp chất vitexin và isovitexin trên 80%. Hỗn hợp này có hoạt tính ức chế enzym HMGR, là enzym đóng vai trò rất quan trọng, quyết định phản ứng khử 3-hydroxy-3-metylglutaryl-coenzym A (HMG-CoA) thành axit mevalonic, một tiền chất của cholesterol. Đây là enzym khởi phát giúp hình thành cholesterol nội sinh và làm tăng lượng cholesterol trong máu.

Cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình tách chiết hỗn hợp chứa hợp chất vitexin và isovitexin từ vỏ hạt đậu xanh (*Vigna radiata*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

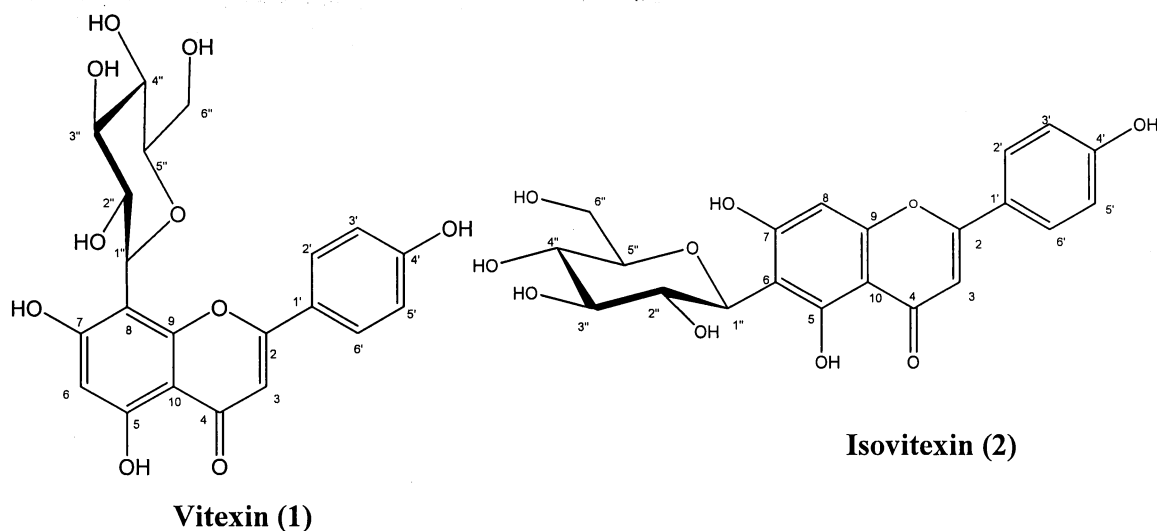
i) phơi khô vỏ hạt đậu xanh, sau đó ngâm chiết vỏ hạt đậu đã phơi khô với dung môi cồn 70% bằng siêu âm trong 30 phút ở 45°C theo tỉ lệ 1/3 (trọng lượng/thể tích), tiến hành ngâm chiết lặp lại 3 lần; sau đó lọc lấy phần dịch chiết, cất loại hoàn toàn dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết cồn; phần cặn này được phân bố lại trong hỗn hợp cồn nước, chiết với dung môi *n*-hexan hai lần, thu phần dịch *n*-hexan để cất loại dung môi thu được cặn *n*-hexan; tiếp theo, axit hóa phần cồn nước bằng axit HCl 1% và chiết với etylaxetat 4 lần, thu lấy phần dịch etylaxetat, cất loại dung môi thu được cặn etylaxetat;

ii) sắc ký cột silica gel cặn chiết etylaxetat thu được ở bước (i) với hệ dung môi EtOAc/MeOH theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/0; 95/5; 90/10; 75/25; 50/50; 40/60; 20/80; 0/100 thu được 8 phân đoạn chính kí hiệu từ F1 đến F8;

iii) phân lập phân đoạn F3 thu được ở bước (ii) trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH theo tỉ lệ thể tích 95/5; 90/10; 80/20; 70/30; 60/40; 50/50; 0/100, thu được 7 phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt là F3.1 đến F3.7.

iv) tinh chế phân đoạn F3.5 thu được ở bước iii) trên cột Sephadex LH-20 với dung môi metanol thu được hỗn hợp chứa hợp chất vitexin và isovitexin dưới dạng chất rắn màu vàng;

Công thức của hai hợp chất vitexin và isovitexin là như sau:



Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Quy trình tách chiết hỗn hợp giàu hợp chất vitexin (1) và isovitexin (2) từ vỏ hạt đậu xanh.

Hình 2: Thể hiện dữ liệu phổ NMR của hợp chất vitexin (1) và isovitexin (2)

Hình 3: Mô tả một số hợp chất flavonoid phân lập từ vỏ hạt đậu xanh (*Vigna radiata*).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách chiết hỗn hợp chứa hợp chất vitexin và isovitexin từ vỏ hạt đậu xanh (*Vigna radiata*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) phơi vỏ hạt đậu xanh (thường là phơi trong bóng mát), sau đó ngâm chiết vỏ khô thu được với dung môi cồn 70% bằng siêu âm theo tỉ lệ 1/3 (trọng lượng/thể tích) trong 30 phút ở 45°C, ngâm chiết lặp lại 3 lần, sau đó lọc lấy phần dịch. Phần dịch chiết được cô chân không dưới điều kiện áp suất giảm để loại hoàn toàn dung môi và thu được cặn chiết còn. Phần cặn thu được được phân bố lại trong hỗn hợp cồn nước, sau đó chiết với dung môi n-hexan/2 lần, thu phần dịch n-hexan để cất loại dung môi thu được cặn n-hexan; tiếp theo, axit hóa phần cồn nước bằng axit HCl 1% và chiết với etylaxetat 4 lần, thu lấy phần dịch etylaxetat, cất loại dung môi thu được cặn etylaxetat;

ii) chạy sắc ký cột silica gel cặn chiết etylaxetat thu được ở bước (i) nêu trên với hệ dung môi EtOAc/MeOH theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/0; 95/5; 90/10; 75/25; 50/50; 40/60; 20/80; 0/100 thu được 8 phân đoạn chính kí hiệu từ F1 đến F8 (bảng 1).

Bảng 1: Các phân đoạn của cột cặn etyl axetat

STT	Phân đoạn	Tỉ lệ thể tích hệ dung môi (theo thể tích)
1	F1	EtOAc/MeOH 100/0
2	F2	EtOAc/MeOH 95/5
3	F3	EtOAc/MeOH 90/10
4	F4	EtOAc/MeOH 75/25
5	F5	EtOAc/MeOH 50/50
6	F6	EtOAc/MeOH 40/60
7	F7	EtOAc/MeOH 20/80
8	F8	EtOAc/MeOH 0/100

iii) chạy sắc ký cột silica gel phân đoạn F3 thu được ở bước (ii) với hệ dung môi CH_2Cl_2 /metanol theo tỉ lệ thể tích lần lượt là 95/5; 90/10; 80/20; 70/30; 60/40; 50/50; 0/100 thu được 7 phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt là F3.1-F3.7;

iv) tinh chế phân đoạn F3.5 thu được ở bước (iii) trên cột Sephadex LH-20 với dung môi metanol thu được hỗn hợp dưới dạng chất rắn màu vàng.

Hỗn hợp được nghiên cứu thành phần hóa học, kết quả cho thấy hỗn hợp chứa hai hợp chất vitexin và isovitexin với hàm lượng lớn hơn 80% tính theo tổng hàm lượng của hỗn hợp.

Hỗn hợp thu được được đánh giá hoạt tính ức chế enzym HMGR. Kết quả cho thấy hỗn hợp này có hoạt tính ức chế enzym HMGR mạnh với giá trị IC_{50} là 2,14 $\mu\text{g/ml}$. Hai hợp chất vitexin và isovitexin được phân lập từ hỗn hợp này cũng thể hiện hoạt tính ức chế enzym HMGR ở mức độ yếu hơn với giá trị IC_{50} lần lượt là 83,1 $\mu\text{g/ml}$ và 66,36 $\mu\text{g/ml}$.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được minh họa bằng các ví dụ cụ thể, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích làm rõ, nhưng không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của giải pháp này.

Các ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích tiến hành đo điểm nóng chảy bằng máy đo điểm nóng chảy hiệu Boetius. Phổ khối phun mù electron (ESI-MS) được đo trên máy ghi phổ khối Agilent 1100. Các phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được ghi trên máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân hiệu Bruker Avance 500 MHz với TMS là chất chuẩn nội. Sắc ký cột được thực hiện trên chất mang là silicagel (hệ dung môi rửa giải với

độ phân cực tăng dần) và sephadex LH-20. Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng silicagel Merck 60 F254, dày 0,25 mm.

Các hóa chất được sử dụng trong các ví dụ gồm: enzym HMGR, cơ chất 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA), NADPH, EDTA, dithiothreitol DTT, chất tham chiếu pravastatin do hãng Sigma cung cấp. Độ hấp thụ quang được đo trên máy quang phổ Biotech.

Ví dụ 1 : Quy trình tách chiết hỗn hợp chứa hợp chất vitexin và isovitexin từ vỏ hạt đậu xanh

i) Vỏ hạt đậu xanh (7 kg) thu mua trên thị trường được phơi khô tự nhiên. Sau đó, nguyên liệu này được ngâm chiết với cồn 70% bằng siêu âm trong 30 phút ở 45°C/3 lần, theo tỉ lệ 1/3 (trọng lượng/thể tích). Dịch chiết sau đó được lọc, cất loại hoàn toàn dung môi dưới áp suất giảm để thu được 1500 g cặn chiết cồn; Cặn EtOH tổng được phân bố lại trong hỗn hợp cồn nước, sau đó chiết với dung môi *n*-hexan/2 lần, thu phần dịch *n*-hexan để cất loại dung môi thu được cặn *n*-hexan (120 g). Tiếp theo, axit hóa phần cồn nước bằng axit HCl 1% và chiết với etylaxetat 4 lần, thu lấy phần dịch EtOAc, cất loại dung môi thu được cặn etyl axetat (680 g). Loại bỏ nước ở phần dịch còn lại thu được cặn nước (800 g).

ii) Sắc ký cột silicagel cặn chiết etyl axetat thu được ở bước (i) với hệ dung môi EtOAc/MeOH theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/0; 95/5; 90/10; 75/25; 50/50; 40/60; 20/80; 0/100 thu được 8 phân đoạn chính kí hiệu từ F1 đến F8 (bảng 2).

Bảng 2: Các phân đoạn của cột cặn etyl axetat

STT	Phân đoạn	Tỉ lệ thể tích hệ dung môi	Khối lượng các phân đoạn (g)
1	F1	EtOAc/MeOH 100/0	350
2	F2	EtOAc/MeOH 95/5	58
3	F3	EtOAc/MeOH 90/10	26
4	F4	EtOAc/MeOH 75/25	49
5	F5	EtOAc/MeOH 50/50	57
6	F6	EtOAc/MeOH 40/60	25
7	F7	EtOAc/MeOH 20/80	25
8	F8	EtOAc/MeOH 0/100	50

iii) phân đoạn F3 (26g) được phân lập trên cột sắc ký silicagel với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ theo tỉ lệ thể tích lần lượt là 95/5; 90/10; 80/20; 70/30; 60/40; 50/50; 0/100, thu được 7 phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt là F3.1-F3.7 (bảng 3).

iv) lấy phân đoạn F3.5 (3,9g) được tinh chế trên cột sephadex LH-20 với dung môi metanol thu được hỗn hợp (1,9g) chứa 2 hợp chất vitexin và isovitexin dưới dạng chất rắn màu vàng.

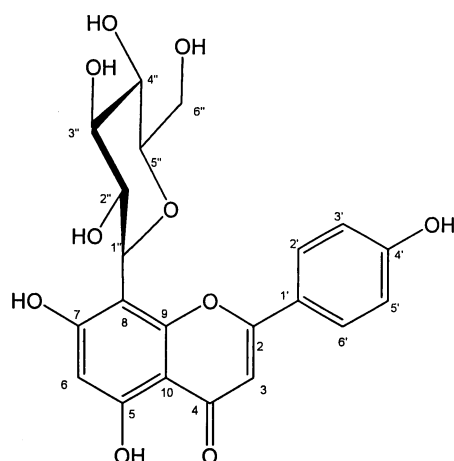
Bảng 3: Các phân đoạn nhỏ của phân đoạn F3

STT	Phân đoạn	Tỉ lệ hệ dung môi Diclometan/metanol (theo thể tích)	Khối lượng các phân đoạn (g)
1	F3.1	95/5	1,4
2	F3.2	90/10	3,1
3	F3.3	80/20	2,9
4	F3.4	70/30	2,2
5	F3.5	60/40	3,9
6	F3.6	50/50	3,4
7	F3.7	0/100	7,7

Ví dụ 2. Phân lập hai hợp chất vitexin và isovitexin từ hỗn hợp thu được

Lấy 20 mg hỗn hợp thu được ở trên để thực hiện phân tách trên bản mỏng điều chế TLC, sử dụng hệ dung môi EtOAc/MeOH (9/1) thu được 9,78 mg hợp chất (1) dưới dạng chất bột màu vàng và 6,77 mg hợp chất (2) dưới dạng chất bột màu vàng. Hợp chất (1) được xác định là 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymetyl)oxan-2-yl]chromen-4-one, còn gọi là vitexin, có điểm nóng chảy 247-249°C. Hợp chất (2) được xác định là 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymetyl)oxan-2-yl]chromen-4-one, còn gọi là isovitexin, có điểm nóng chảy 220-221°C. Cấu trúc hóa học của các hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ NMR 1D và 2D, phổ khối lượng ESI-MS, phổ hồng ngoại.

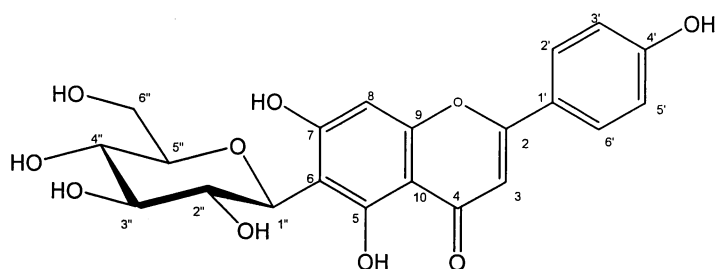
- Hợp chất 1: Vitexin



CTPT: $C_{21}H_{20}O_{10}$

ESI-MS m/z 433 $[M+H]^+$

- Hợp chất 2: Isovitexin



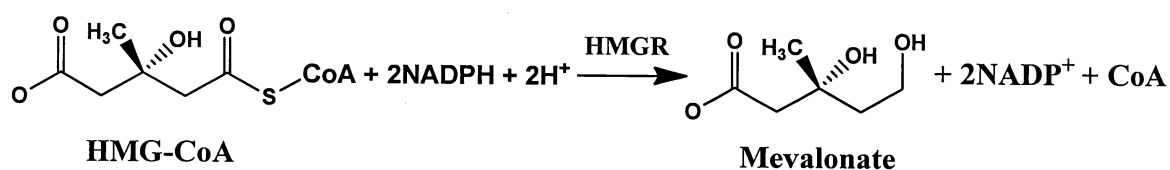
CTPT: $C_{21}H_{20}O_{10}$

ESI-MS m/z 433 $[M+H]^+$

Ví dụ 3: Đánh giá hoạt tính ức chế enzym HMGR của hỗn hợp chứa hợp chất vitexin và isovitexin và các hợp chất vitexin và isovitexin được tinh sạch.

Nguyên lý của phương pháp:

Cơ chất HMG-CoA và NADPH được chuyển thành mevalonat và $NADP^+$ dưới tác động của enzym HMGR. Sự kìm hãm hoạt động của enzym này sẽ làm giảm quá trình oxy hóa NADPH thành $NADP^+$. Khả năng ức chế hoạt động enzym HMGR của một chất được xác định thông qua độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng ở bước sóng 340 nm.



Quy trình thí nghiệm:

Thí nghiệm xác định hoạt tính ức chế HMGR *in vitro* của mẫu được thực hiện trên đĩa 96 giếng với tổng thể tích phản ứng là 200 μ l. Hỗn hợp phản ứng gồm: 181 μ l đệm kali phosphat pH 7,4 (200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 10 mM dithiothreitol DTT); 4 μ l NADPH (400 μ M); 12 μ l HMG-CoA (400 μ M); 1 μ l chất thử ở các nồng độ khác nhau; 2 μ l HMG-CoA reductaza. Trộn thật kĩ phản ứng và đo độ hấp thụ ở bước sóng 340nm. Trong đó, mẫu đối chứng không chứa chất thử; mẫu đối chứng: enzym được thay bằng đệm phản ứng. Chất tham khảo là Pravastatin.

Phần trăm ức chế hoạt độ của enzym HMGR mẫu thử được tính theo công thức:

$$\% \text{ ức chế} = [\text{Abs}_{340} (\text{đối chứng}) - \text{Abs}_{340} (\text{mẫu thử})] / \text{Abs}_{340} (\text{đối chứng}) \times 100\%$$

Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% hoạt độ enzym) được tính toán theo phần mềm máy tính excel table curve.

Hỗn hợp chứa hợp chất vitexin và isovitexin và các hợp chất vitexin và isovitexin đã tinh sạch được đánh giá hoạt tính ức chế enzym HMGR. Kết quả cho thấy hỗn hợp theo giải pháp hữu ích có hoạt tính ức chế enzym HMGR mạnh với giá trị IC_{50} là 2,14 μ g/ml. Hai hợp chất vitexin và isovitexin được tinh sạch từ hỗn hợp này cũng thể hiện hoạt tính ức chế enzym HMGR ở mức độ yếu hơn với giá trị IC_{50} lần lượt là 83,1 và 66,36 μ g/ml (bảng 4).

Bảng 4. Thử nghiệm hoạt tính ức chế enzym HMGR

Chất thử	% ức chế hoạt tính của enym HMGR ở các nồng độ (μ g/ml)				Giá trị IC_{50} (μ g/ml)
	100	25	5	1	
Hỗn hợp theo sáng chế	73	66	65	44	2,14
Vitexin	74	12	6	0	83,1
Isovitexin	86	14	9	0	66,36

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích đã thu nhận được hỗn hợp giàu hai hợp chất vitexin và isovitexin từ vỏ hạt đậu xanh (*Vigna radiata*). Quy trình được thực hiện đơn giản và hiệu quả nhằm thu được hỗn hợp giàu hai hợp chất vitexin và isovitexin với hàm lượng lớn hơn 80% tính theo tổng hàm lượng của hỗn hợp thu được. Hỗn hợp này thể hiện khả năng ức chế enzym HMGR mạnh với giá trị IC_{50} là 2,14 μ g/ml, là

tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm phát triển và sử dụng hỗn hợp này trong hỗ trợ điều trị bệnh tăng cholesterol máu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tách chiết hỗn hợp chứa hợp chất vitexin và isovitexin từ vỏ hạt đậu xanh (*Vigna radiata*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) phơi khô vỏ hạt đậu xanh, sau đó ngâm chiết vỏ hạt đậu đã phơi khô với dung môi cồn 70% bằng siêu âm trong 30 phút ở 45°C theo tỉ lệ 1/3 (trọng lượng/thể tích), tiến hành ngâm chiết lặp lại 3 lần; sau đó lọc lấy phần dịch chiết, cất loại hoàn toàn dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết cồn; phần cặn này được phân bố lại trong hỗn hợp cồn nước, chiết với dung môi *n*-hexan hai lần, thu phần dịch *n*-hexan để cất loại dung môi thu được cặn *n*-hexan; tiếp theo, axit hóa phần cồn nước bằng axit HCl 1% và chiết với etylaxetat 4 lần, thu lấy phần dịch etylaxetat, cất loại dung môi thu được cặn etylaxetat;

ii) sắc ký cột silica gel cặn chiết etylaxetat thu được ở bước (i) với hệ dung môi EtOAc/MeOH theo tỷ lệ thể tích lần lượt là 100/0; 95/5; 90/10; 75/25; 50/50; 40/60; 20/80; 0/100 thu được 8 phân đoạn chính kí hiệu từ F1 đến F8;

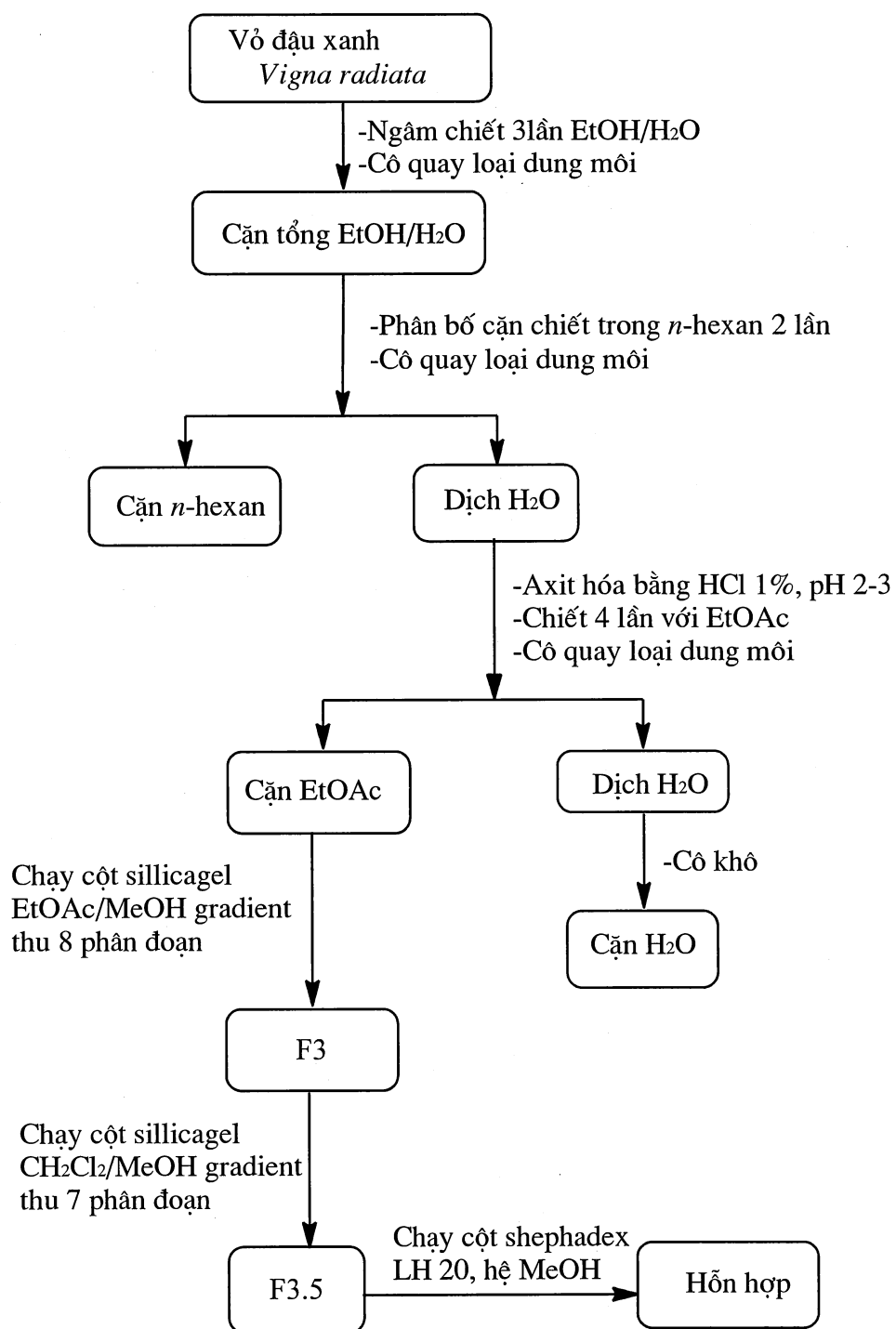
iii) phân lập phân đoạn F3 thu được ở bước (ii) trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH theo tỉ lệ thể tích 95/5; 90/10; 80/20; 70/30; 60/40; 50/50; 0/100, thu được 7 phân đoạn nhỏ ký hiệu lần lượt là F3.1 đến F3.7; và

iv) tinh chế phân đoạn F3.5 thu được ở bước iii) trên cột Sephadex LH-20 với dung môi metanol thu được hỗn hợp chứa hợp chất vitexin và isovitexin dưới dạng chất rắn màu vàng;

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó hỗn hợp thu được từ quy trình này chứa hợp chất vitexin và isovitexin với hàm lượng lớn hơn 80% tính theo tổng hàm lượng của hỗn hợp.

3. Quy trình theo điểm 2, trong đó hỗn hợp thu được có hoạt tính ức chế enzym HMGR.

Hình 1



Hình 2

Vitexin (1)			Isovitexin (2)		
C	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,d}$ (J, Hz)	C	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ (J, Hz)
Aglycone			Aglycone		
2	164,2	-	2	165,7	-
3	102,4	6,75 s	3	103,3	6,60 s
4	182,1	-	4	180,3	-
5	160,4	-	5	157,5	-
6	98,4	6,24 s	6	110,0	-
7	162,8	-	7	163,3	-
8	104,7	-	8	96,4	6,51 s
9	156,1	-	9	159,1	-
10	104,7	-	10	104,3	-
1'	121,1	-	1'	123,0	-
2'	129,7	8,01 d (8,0)	2'	129,3	7,85 d (8,5)
3'	115,9	6,89 d (8,0)	3'	117,2	6,94 d (8,5)
4'	161,1	-	4'	162,0	-
5'	115,9	6,89 d (8,0)	5'	117,2	6,94 d (8,5)
6'	129,7	8,01 d (8,0)	6'	129,3	7,85 d (8,5)
OH-5		13,15 s			
8-C-Glc			6-C-Glc		
1''	73,9	4,71 d (9,0)	1''	75,5	4,92 d (10,0)
2''	69,3	3,85 dd (8,0; 8,5)	2''	72,3	4,21 t (8,0)
3''	78,2	3,27-3,53 m	3''	80,4	3,42-3,54
4''	68,2		4''	71,6	
5''	80,5		5''	82,5	
6''	61,4	3,76 d (11,0) 3,53 m	6''	62,7	3,77 dd (5,0; 12,0) 4,89 dd (2,0; 12,0)

Hình 3

