



(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)



1-0025697

(51)⁷ C07C 45/78

(13) B

(21) 1-2019-02170

(22) 26/04/2019

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/06/2019 375A

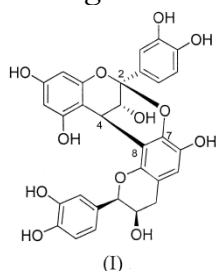
(73) Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội (VN)

Số 1 Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

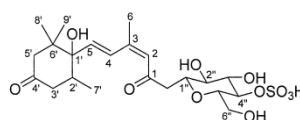
(72) Trần Thu Hương (VN); Lê Huyền Trâm (VN); Trần Thị Minh (VN); Nguyễn Văn Thông (VN); Nguyễn Tuấn Anh (VN); Nguyễn Hoàng Minh (VN); Trần Thượng Quảng (VN); Nguyễn Thị Minh Tú (VN); Nguyễn Tiên Đạt (VN); Trần Thu Hà (VN); Hà Mạnh Tuấn (VN); Nguyễn Thị Hiền (VN); Phạm Thị Hồng Phượng (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH CÁC HỢP CHẤT PROANTHOCYANIDIN A2 VÀ 4-O-SULFO-BETA-D-GLUCOPYRANOSYL ABSCIAT TỪ VỎ QUẢ MĂNG CỤT (*GARCINIA MANGOSTANA* L., CLUSIACEAE) BẰNG VIỆC SỬ DỤNG ENZYM

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách các hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) và 4-O-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae):



(I)



(II)

Phương pháp chiết tách theo sáng chế có sử dụng enzyme Pectinex Ultra SP-L được cung cấp bởi hãng Novozyme (Đan Mạch) ở giai đoạn đầu của quá trình chiết mẫu vỏ quả măng cụt nên hiệu quả phân tách cao, cho phép phân lập được hai hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) và 4-O-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) tinh khiết ra khỏi hỗn hợp gồm rất nhiều chất từ dịch chiết nước phân cực.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hoạt chất thiên nhiên có nguồn gốc từ thực vật có hoạt tính sinh học nhằm sử dụng trong việc hỗ trợ điều trị bệnh. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách hai hợp chất proanthocyanidin A2 và 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L.), họ Bứa (Clusiaceae). Hai hợp chất này được biết đến có một số hoạt tính sinh học đáng quý như chống oxi hóa, chống ung thư, kháng virus, hạ đường huyết...

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Măng cụt có tên khoa học là *Garcinia mangostana* L., là một loài thực vật thuộc họ Bứa (Clusiaceae). Măng cụt có nguồn gốc ở các nước Philipin, Malaysia, Indonesia, sau này được di thực vào miền Nam của Việt Nam và trồng rộng rãi ở các tỉnh Nam Bộ. Các bộ phận khác nhau của cây Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) như vỏ quả, vỏ cây và rễ đã được sử dụng hàng trăm năm trong y học cổ truyền của các nước Đông Nam Á như Indonesia, Malaysia, Philippin và Thái Lan. Do có tác dụng chống viêm tốt nên người dân các nước này dùng vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) để điều trị các vết thương bị nhiễm trùng, mưng mủ, chữa bệnh vàng da, dùng lá cây chữa bệnh eczema và một số bệnh ngoài da khác [Pedraza Chaverri J. *et al.*, *Food and Chem. Toxicol.*, 46, 3227-3239, 2008]. Tại Mỹ, Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) là loại trái cây phổ biến và rất được ưa chuộng. Nước ép từ áo hạt Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) trở thành một trong 3 mặt hàng bán chạy nhất trên thị trường Mỹ năm 2007 và trở thành loại đồ uống bổ sung dinh dưỡng từ thực vật thường xuyên trong chế độ ăn của người dân nơi đây bởi vì họ nhận thức được tác dụng của loại trái cây này trong việc cải thiện và nâng cao sức khỏe của họ [Young Won Chin *et al.*, *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 5, 355-364, 2008]. Garrity A. và cộng sự đã được cấp bằng sáng chế tại Mỹ và được lưu hành rộng rãi trên toàn thế giới cho các sản phẩm thực phẩm chức năng từ vỏ quả Măng cụt [Garrity A. *et al.*, *Nutraceutical mangosteen composition*, U.S. Patent 6, 730.333, 2004].

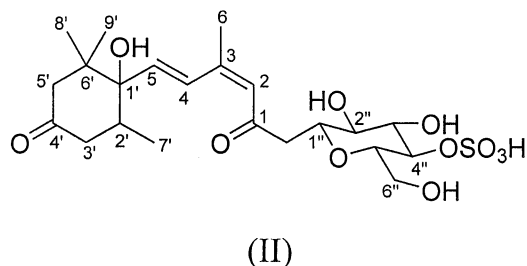
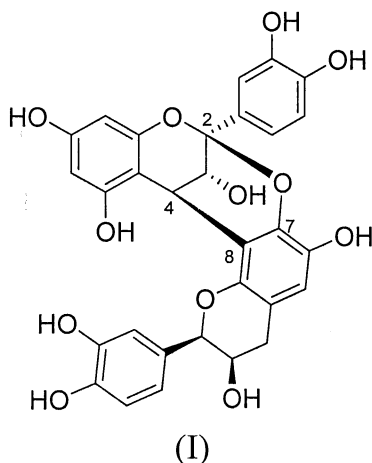
Ở Việt Nam, nước sắc của vỏ quả Măng cụt đã được sử dụng từ lâu trong y học cổ truyền nước ta để chữa bệnh kiết lỵ rất hiệu quả [Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, 428-429, 2006]. Tác dụng kháng khuẩn của vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) cũng tương đối phù hợp với các nghiên cứu của

Trương Văn Châu và cộng sự. Nhóm nghiên cứu phát hiện các hợp chất phenolic trong dịch chiết etanol và metanol của vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) có tác dụng ức chế mạnh sự phát triển của trực khuẩn mủ xanh *Staphylococcus aureus* và tụ cầu vàng *Pseudomonas aeruginosa* [Trương Văn Châu và cộng sự, *Tạp chí Sinh học*, 26(4), 59-62, 2004]. Sakagami và cộng sự cũng đã khẳng định hợp chất mangostin tách từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) có khả năng kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* [Sakagami Y. *et al*, *Phytomedicine*, 12, 203-208, 2005]. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Mai Phương và cộng sự cũng cho thấy dịch chiết etanol từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) có tác dụng làm ức chế sự hình thành biofilm và sinh axit gây sâu răng ở người của vi khuẩn *Streptococcus mutans* [Nguyễn Thị Mai Phương và cộng sự, *Tạp chí Dược học*, 44, 18-21, 2004]. Do vậy, từ nhiều năm nay, Bộ Y tế nước ta đã chính thức cho phép dùng vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) làm nguyên liệu để sản xuất thuốc điều trị các bệnh do nhiễm khuẩn đường ruột như lỵ, tiêu chảy, rối loạn tiêu hóa...

Các tác giả sáng chế đã tập trung nghiên cứu nhằm làm sáng tỏ thêm tác dụng chữa bệnh của cây Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae). Kết quả nghiên cứu đã đưa ra phương pháp chiết tách với việc sử dụng enzym (*enzym-assisted extraction*) để thu nhận hai hợp chất proanthocyanidin A2 và 4-O-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat. Đây là những hợp chất có tác dụng ức chế enzym α -glucosidase, α -amylase và chống oxi hóa từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp chiết tách với việc sử dụng enzym để thu nhận hai hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) và hợp chất 4-O-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae):



Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là hình vẽ minh họa sơ đồ chiết tách hai hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) và hợp chất 4-O-sulfo- β -D- glucopyranosyl absciat có công thức (II) từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học trong các loại thực vật bậc cao thường nằm trong hỗn hợp của nhiều chất. Do đó, để chiết tách chúng riêng biệt cần kết hợp sử dụng phương pháp chiết và các phân tích, phân tách sắc ký. Phương pháp chiết có ảnh hưởng quan trọng đến việc chiết xuất các hợp chất thuộc các lớp chất mong muốn ở trong mẫu thực vật. Phương pháp chiết xuất hóa học để chiết xuất hoạt tính sinh học được sử dụng rộng rãi vì chúng được thiết lập tốt và dễ thực hiện. Tuy nhiên, phương pháp này phần lớn phụ thuộc vào loại dung môi, năng lượng đầu vào và khuấy trộn để cải thiện khả năng hòa tan hóa học. Việc lựa chọn dung môi cho quá trình chiết xuất hóa học là hết sức quan trọng. Những dung môi như *n*-hexan, diclometan, cloroform, rượu metylic và rượu etylic thường được lựa chọn trong quá trình chiết sơ bộ một bộ phận của cây như lá, thân, rễ, hoa... Các dung môi thuộc nhóm rượu sẽ thẩm thấu tốt hơn lên màng tế bào nên quá trình chiết với các dung môi này sẽ thu được triệt để hơn các thành phần có trong tế bào. Ngược lại, khả năng phân cực của *n*-hexan, diclometan thấp hơn, có thể rửa được các chất nằm ngoài tế bào. Để chiết lấy toàn bộ thành phần của dược liệu thì dung môi thích hợp nhất là rượu etylic với nồng độ 60% - 96%. Rượu etylic được xem là một dung môi đa năng vì nó có khả năng hòa tan được các chất không phân cực, đồng thời dung môi này cũng có thể tạo liên kết hydro với các nhóm phân cực khác.

Hiện nay, chiết xuất sử dụng enzym để thu nhận các hợp chất hoạt tính sinh học từ thực vật là một phương pháp hiệu quả thay thế cho các phương pháp chiết bằng dung môi thông thường. Enzym là chất xúc tác lý tưởng để hỗ trợ quá trình chiết xuất, điều chế hoặc tổng hợp các hợp chất hoạt tính sinh học phức tạp có nguồn gốc tự nhiên. Chiết xuất sử dụng enzym dựa trên tính đặc hiệu của các enzym để xúc tác các phản ứng khác nhau. Bên cạnh đó, phương pháp chiết này đang được chú ý nhiều hơn do nhu cầu về công nghệ chiết xuất thân thiện với môi trường trong các mô hình hóa học xanh (*green chemistry*).

Enzym là các protein được sản xuất bởi tất cả các sinh vật sống. Chúng là những chất xúc tác sinh học có tính đặc hiệu cao cho nhiều phản ứng sinh hóa thiết yếu ở vi sinh vật, thực vật, động vật và con người. Các enzym khác nhau không những làm tăng tốc độ phản ứng của các quá trình sinh hóa mà còn có khả năng phân hủy sinh học. Trong quá trình chiết xuất các nguyên liệu thực vật, enzym có khả năng làm suy giảm hoặc phá vỡ thành tế bào, vì thế cho phép giải phóng tốt hơn và chiết xuất sinh học hiệu

quả hơn. Sự phá vỡ thành tế bào là bước chiết xuất quan trọng đối với nhiều hợp chất hoạt tính sinh học tồn tại bên trong thành tế bào nhằm chiết xuất và giải phóng hiệu quả các hợp chất hoạt tính sinh học [Lucia Gardossi *et al*, *Trends in biotechnology*, 28, 71-180, 2010]. Việc chiết xuất dựa trên khả năng thủy phân các hợp chất có mặt trong thành tế bào của các enzym, làm phá vỡ tính toàn vẹn cấu trúc của thành tế bào thực vật. Khi các enzym và cơ chất liên kết với nhau, hình dạng của phân tử enzym thay đổi thành một sự phù hợp tối ưu cho sự tương tác giữa enzym và cơ chất làm cho các liên kết bị phá vỡ trong phản ứng. Khi nồng độ cơ chất cao, việc bổ sung enzym có thể làm tăng tốc độ phản ứng cho đến khi nồng độ cơ chất trở nên hạn chế. Các nghiên cứu về chiết xuất có sự hỗ trợ của enzym cho thấy cần khảo sát những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình xúc tác bởi enzym như nhiệt độ phản ứng, thời gian chiết, pH của hệ, nồng độ enzym, kích thước hạt của chất cần chiết... Ưu điểm của phương pháp này là làm giảm thời gian chiết, tiết kiệm dung môi, đồng thời tăng hiệu suất và chất lượng sản phẩm [Sowbhagya H. B. *et al*, *Critical reviews in food science and nutrition*, 50, 146-161, 2010].

Để sử dụng enzym một cách hiệu quả trong quá trình chiết xuất, điều quan trọng là lựa chọn enzym nào phù hợp với nguyên liệu thực vật được chiết xuất, tính chất xúc tác và điều kiện hoạt động tối ưu của chúng. Nhiều công trình nghiên cứu đã cho thấy các hợp chất có hoạt tính sinh học từ thực vật đã được chiết xuất bằng phương pháp này như sử dụng enzym pectinex BE3-L chiết xuất anthocyanin từ vỏ quả nho [Munoz O. *et al.*, *Food Chem.*, 87, 487–490, 2004]; enzym cellulase, hemicellulase và pectinase chiết xuất capsaicin từ quả ớt [Sampathu S.R. *et al*, US Patent No. 7097867, 2006]; enzym cellulase chiết xuất oligosaccharit từ cám gạo [Patindol J. *et al*, *J. Food Sci.*, 72, C517–C521, 2007]; enzym cellulose và glycosidase chiết xuất lignan từ cây gai [Renouard, S. *et al.*, *Food Chem.*, 122, 679–687, 2010]; enzym pectinase và cellulase chiết xuất lycopene từ quả cà chua [Strati I.F. *et al*, *Food Bioprod. Process*, 94, 668–674, 2014)]; enzym pectinase và protease chiết xuất dầu từ hạt bí ngô [Jiao J. *et al.*, *Food Chem.*, 147, 17–24, 2014]; enzym cellulase chiết xuất polysaccharit từ tỏi [Pan S *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, 111, 606–609, 2014], v.v... Vì vậy, phương pháp chiết xuất với sự hỗ trợ của enzym đã được áp dụng để thu nhận nhiều nhóm hợp chất thiên nhiên ứng dụng trong các ngành thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm.

Nhằm tiết kiệm dung môi và rút ngắn thời gian chiết xuất, trong quá trình chiết mẫu vỏ quả Mãng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae), các tác giả sáng chế đã sử dụng enzym Pectinex Ultra SP-L được cung cấp bởi hãng Novozyme (Đan Mạch) với thành phần chính là polygalacturonase để thủy phân liên kết 1,4- α -D-galactosiduronic trong phân tử axit pectic và các galacturonan khác. Hoạt độ của enzym này là 3800 PGU/ml. Bên cạnh đó, tiến hành chiết chọn lọc với các dung môi khác nhau từ ít phân cực đến phân cực để thu được các phần chiết nghiên cứu. Ngoài ra, các phương pháp phân tích và phân

tách chất như sắc ký lớp mỏng (TLC) thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn của hãng Merck, sắc ký cột (CC) với các chất nhồi hấp phụ pha thường và pha đảo là Silica gel, Dianion, YMC RP-18 cũng đã được sử dụng. Các chất hấp phụ pha thường cho phép phân tách các phân chiết ít phân cực đến phân cực trung bình, trong khi đó các chất hấp phụ pha đảo cho phép phân tách các phân chiết có độ phân cực cao (ví dụ phân chiết nước). Ngoài ra, để thu được các hợp chất tinh khiết còn sử dụng các phương pháp kết tinh lại trong dung môi thích hợp.

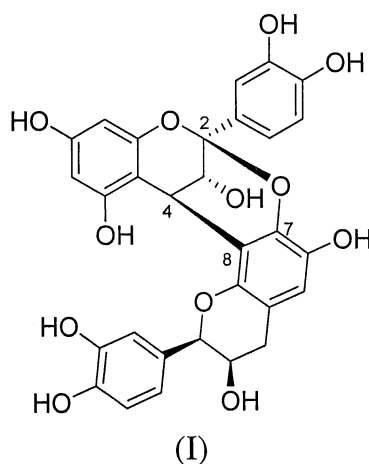
Phương pháp chiết tách hai hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) và 4-O-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) theo sáng chế bao gồm các bước sau:

- (i) thu gom vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae), thái lát mỏng từ 2 - 3mm, phơi khô rồi sấy ở nhiệt độ khoảng từ 40 đến 45°C, và nghiền bằng máy nghiền thu được bột với kích thước hạt nhỏ hơn 1mm;
- (ii) hòa tan một lượng enzym Pectinex Ultra SP-L (3800 PGNU/ml) vào nước cất đã được axit hóa bằng HCl với pH = 5 với nồng độ enzym là 0,5%; chuyển toàn bộ dịch nước chứa enzym vào bình chiết chứa bột vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) theo tỷ lệ dịch enzym/nguyên liệu là 3/1;
- (iii) khuấy đều hỗn hợp và ủ ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút để thực hiện quá trình thủy phân bột vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae);
- (iv) kết thúc quá trình ủ với enzym, bổ sung dung môi rượu etylic nồng độ 60% theo tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 20/1 để ngâm chiết bột vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 2 giờ;
- (v) lọc qua phễu lọc Buchner bỏ bã và thu dịch chiết sau khi thủy phân bằng enzym; cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 50°C để thu được dịch cô toàn phần trong rượu etylic, ký hiệu là dịch cô A;
- (vi) hòa tan dịch cô A với nước cất theo tỷ lệ dịch cô A/nước cất là 1/6;
- (vii) chiết dịch nước này ba lần bằng clorofom thu được dịch chiết clorofom, rồi cô kiệt dưới áp suất giảm ở 40°C thu được phần chiết cloroform, ký hiệu là phần chiết C; cất loại dung môi phần dịch nước sau khi chiết với clorofom thu được dưới áp suất giảm ở 70°C, thu được dịch cô trong nước, ký hiệu là dịch cô W;
- (viii) tiến hành chạy phân tách sắc ký dịch cô W trên cột thủy tinh có đường kính cột $\Phi = 50\text{mm}$, chiều dài cột $L = 250\text{mm}$, được nhồi Dianion; rửa giải bằng hệ dung môi MeOH/H₂O theo các tỷ lệ thể tích lần lượt là 20/80, 40/60, 80/20 (thể tích/thể tích), thu được các phân đoạn gộp theo thể tích của hệ dung môi rửa giải tương ứng; kiểm tra quá trình phân tách sắc ký cột bằng phân tích trên sắc ký lớp mỏng, cất loại dung môi thu được các phân đoạn dịch chiết tương ứng là W1, W2 và W3;

- (ix) tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn dịch chiết W1 trên cột thủy tinh có đường kính cột $\Phi = 30\text{mm}$, chiều dài cột $L = 500\text{ mm}$, được nhồi chất hấp phụ pha đảo là YMC RP-18, rửa giải bằng hỗn hợp dung môi rượu metylic/nước theo tỷ lệ thể tích 1:4 (thể tích/thể tích), sau đó thu gom các phân đoạn rửa giải giống nhau trên sắc ký lớp mỏng, cất loại dung môi, thu được 5 phân đoạn dịch chiết nhỏ ký hiệu lần lượt là W1.1, W1.2, W1.3, W1.4 và W1.5;
- (x) tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn dịch chiết W1.2 trên cột thủy tinh có đường kính cột $\Phi = 15\text{mm}$, chiều dài cột $L = 350\text{ mm}$, chất hấp phụ silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi cloroform/rượu metylic/nước theo tỷ lệ thể tích là 4,5:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích), thu được hợp chất proanthocyanidin A2 thô;
- (xi) tinh chế hợp chất proanthocyanidin A2 thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi cloroform/rượu metylic theo tỷ lệ thể tích là 1:1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) tinh khiết dưới dạng bột vô định hình màu vàng.
- (xii) tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn dịch chiết W1.5 trên cột thủy tinh có đường kính cột $\Phi = 15\text{mm}$, chiều dài cột $L = 350\text{ mm}$, chất hấp phụ silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi etyl axetat/rượu metylic/nước theo tỷ lệ thể tích là 6:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích), thu được hợp chất 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat thô;
- (xiii) tinh chế hợp chất 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat thô bằng cách kết tinh lại trong dung môi rượu metylic, thu được hợp chất 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) tinh khiết dưới dạng bột vô định hình không màu.

Phương pháp chiết tách với việc sử dụng enzyme Pectinex Ultra SP-L theo sáng chế này có hiệu quả phân tách cao, cho phép thủy phân liên kết (1,4)- α -D-galactosiduronic có trong phân tử axit pectic và các galacturonan khác để phá vỡ cấu trúc thành tế bào thực vật và làm cho các hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) và 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) tinh khiết được phân lập dễ dàng ra khỏi hỗn hợp chất bao gồm nhiều rất chất từ dịch chiết nước phân cực.

Hợp chất proanthocyanidin A2 theo sáng chế có công thức cấu tạo sau:



Tên khoa học theo IUPAC là: (2R,3R,8S,14R,15R)-2,8-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3,4,14-tetrahydro-8,14-methanobenzo[7,8][1,3]dioxocino[4,5-h]chromene-3,5,11,13,15-pentaol;

Tên gọi khác: Procyanidin A2; Procyanidol A2; Proanthocyanidin A-2; (+)-Proanthocyanidin A2; Epicatechin-(2 β →7, 4 β →8)-epicatechin.

Các thông số hoá lý của hợp chất này như sau:

Công thức phân tử: C₃₀H₂₄O₁₂;

Khối lượng phân tử: M = 576 g/mol;

Các thông số vật lý:

+ Chất rắn màu vàng, dạng bột vô định hình;

+ Độ quay cực: $[\alpha]_D^{25} = +40,5$ (c 0,5, MeOH);

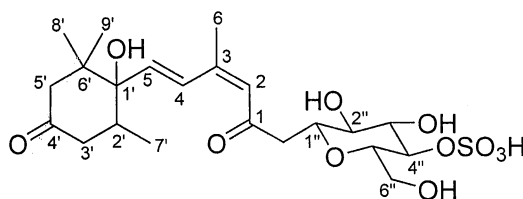
+ Phổ tử ngoại UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 207 (4,85), 224 (4,51) nm;

+ Phổ khối lượng ESI-MS (negative): m/z 575.0 [M – H][–].

Hoạt tính và tác dụng của hợp chất proanthocyanidin A2:

Proanthocyanidin A-2 là một hợp chất thuộc nhóm tannin ngưng tụ oligomeric proanthocyanidin. Hợp chất này được tìm thấy trong nhiều loài thực vật như quả bơ (*Persea americana*, Lauraceae) [Maria del R. Ramos-Jerz *et al*, *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2013, 2013: 391247], nước ép quả cranberry (*Vaccinium macrocarpon*, Ericaceae), lá, hoa, vỏ, hạt của quả vải (*Litchi chinensis*, Sapindaceae) [Manoj Kumar *et al*, *The Lychee Biotechnology*, Springer, 2017], vỏ lạc (*Arachis hypogaea*, Fabaceae) [Lou H. *et al*, *Phytochemistry*, 51 (2), 297–308, 1999; Tatiane L.C.O. *et al*, *Food Chem.*, 192, 306–312, 2016], v.v... Hợp chất proanthocyanidin A2 có nhiều hoạt tính sinh học đáng quý như kháng virus, chống oxi hóa, gây độc tế bào, chống ung thư... Các proanthocyanidin nói chung và hợp chất proanthocyanidin A-2 nói riêng có nhiều trong các loại thực phẩm (*foods*), thực phẩm bổ sung (*supplements*) và thực phẩm chức năng (*functional foods*) nguồn gốc từ thực vật.

Hợp chất 4-O-sulfo- β -D-glucopyranosyl absiciat theo sáng chế có công thức cấu tạo sau:



(II)

Tên khoa học theo IUPAC là: 4-O-sulfo- β -D-glucopyranosyl-[(2Z,4E)-5-(1'-hydroxy-2',6',6'-trimethyl-4'-oxocyclohex-2'-enyl)]-3-methylpenta-2,4-dienoate.

Các thông số hoá lý của hợp chất này như sau:

Công thức phân tử: $C_{21}H_{31}O_{12}S$;

Khối lượng phân tử: $M = 507 \text{ g/mol}$;

Các thông số vật lý:

+ Chất rắn không màu, dạng bột vô định hình;

+ Độ quay cực: $[\alpha]_D^{25} = +45,3$ (c 0,5, MeOH);

+ Phổ tử ngoại UV: $\lambda_{\max}^{MeOH}$ (log ϵ) 270 (3,75) nm;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS: m/z 507,1526 $[M + H]^+$ (tính toán 507,1526 cho công thức $C_{21}H_{31}O_{12}S$);

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phương pháp chiết tách hai hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) và hợp chất 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae):

Mẫu quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) tươi (35 kg) được thu hái tại Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam vào đúng mùa ra quả (tháng 6 dương lịch). Quả được rửa sạch, để ráo nước, rồi tách bỏ phần thịt quả bên trong, thu lấy vỏ quả. Vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) được thái lát mỏng từ 2 đến 3mm, phơi khô ở nơi thoáng mát, sấy trong tủ sấy ở 40-45°C đến khô giòn rồi xay thành bột có kích thước hạt nhỏ hơn 1mm, thu được 2,5 kg bột khô. Bột vỏ quả trước khi sử dụng được cho vào trong túi polyetylen kín và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Cân 2,0 kg bột nguyên liệu vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) cho vào bình chiết dung tích 20 lít. Hòa tan 10 ml chế phẩm enzym Pectinex Ultra SP-L có hoạt độ 3800 PGNU/ml được cung cấp bởi hãng Novozyme – Đan Mạch vào 6,0 lít nước cất đã được axit hóa bằng HCl (pH = 5), rồi chuyển dịch enzym vào bình chiết chứa bột vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae). Đặt bình chiết vào bể ổn nhiệt, tiến hành khuấy đều hỗn hợp ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 30 phút để thủy phân bột nguyên liệu bằng enzym. Sau đó, tiếp tục ngâm chiết bột vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) bằng cách bổ sung 14,0 lít dung môi rượu etylic 60% ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 2 giờ. Tiến hành lọc thu dịch chiết qua phễu lọc Buchner và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm ở 50°C để thu được dịch cô toàn phần trong rượu etylic, ký hiệu là dịch cô A (200g, hiệu suất 10% tính theo khối lượng nguyên liệu vỏ quả Măng cụt khô (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae)).

Hòa tan dịch cô A với 1 lít nước cất thu được dịch nước. Chiết dịch nước này ba lần với 1 lít cloroform. Gộp các dịch chiết trong cloroform lại với nhau, cất loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm ở 40°C để thu được phần chiết cloroform, ký hiệu là phần chiết C (75g, hiệu suất là 3,75% tính theo khối lượng nguyên liệu vỏ quả Măng cụt khô).

Phần dịch nước sau khi chiết với clorofom được cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 70°C thu được dịch cô trong nước, ký hiệu là W (120g, hiệu suất là 6,0% tính theo khối lượng nguyên liệu vỏ quả Măng cụt khô).

Phần dịch cô W được cho qua cột Dianion (đường kính cột $\Phi = 50\text{mm}$, chiều dài cột $L = 250\text{ mm}$) với hệ dung môi rửa giải là rượu metylic/nước có thay đổi tỷ lệ thể tích dung môi (20/80, 40/60, 80/20; thể tích/thể tích). Sau khi kiểm tra quá trình phân tách sắc ký cột bằng việc phân tích trên sắc ký lớp mỏng, gộp các phân đoạn theo thể tích của hệ dung môi rửa giải và cô quay loại bỏ loại dung môi thu được các phân đoạn dịch chiết tương ứng là W1 (46g, hiệu suất 2,3% tính theo khối lượng nguyên liệu vỏ quả Măng cụt khô), W2 (25g, hiệu suất 1,25% tính theo khối lượng nguyên liệu vỏ quả Măng cụt khô) và W3 (28g, hiệu suất 0,9% tính theo khối lượng nguyên liệu vỏ quả Măng cụt khô).

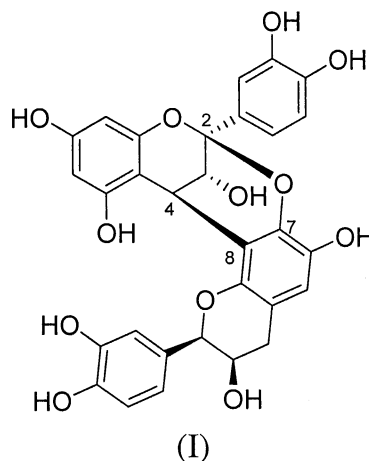
Phân đoạn dịch chiết W1 (46g) được tiến hành phân lập trên sắc ký cột (đường kính cột $\Phi = 30\text{mm}$, chiều dài cột $L = 500\text{ mm}$) với chất hấp phụ pha đảo là YMC RP-18 và sử dụng 4,0 lít hỗn hợp dung môi rửa giải là rượu metylic/nước theo tỷ lệ thể tích 1:4 (thể tích/thể tích). Kiểm tra các phân đoạn sau khi tách bằng sắc ký lớp mỏng, gom các phân đoạn có sắc ký đồ giống nhau, cất loại dung môi, thu được 5 phân đoạn nhỏ là W1.1 (4,5g, hiệu suất 0,225%), W1.2 (8,2g, hiệu suất 0,41%), W1.3 (7,1g, hiệu suất 0,355%), W1.4 (3,8g, hiệu suất 0,19%) và W1.5 (9,5g, hiệu suất 0,48%).

Phân đoạn nhỏ W1.2 (8,2g) được phân tách bằng cột silica gel (Merck, cỡ hạt 0,063-0,100 mm) với hệ dung môi rửa giải là cloroform/rượu metylic/nước theo tỷ lệ thể tích là 4,5:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích), thu được sản phẩm thô 1. Sau đó, tiến hành tinh chế sản phẩm thô 1 bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi cloroform/rượu metylic theo tỷ lệ thể tích là 1:1 (thể tích/thể tích), thu được 100 mg hợp chất tinh khiết dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Hợp chất này được đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H NMR và ^{13}C NMR cho kết quả như sau:

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 4,07 (1H, d, H-3), 4,42 (1H, d, H-4), 6,02 (1H, d, H-6), 6,08 (1H, d, H-8), 7,17 (1H, d, H-10), 6,82 (1H, d, H-13), 7,04 (1H, dd, H-14), 4,94 (1H, brs, H-2'), 4,25 (H, m, H-3'), 2,78 (1H, dd, 17,5, H_a -4'), 2,96 (1H, dd, H_b -4'), 6,11 (1H, s, H-6'), 7,15 (1H, d, H-10'), 6,83 (1H, d, H-13'), 7,00 (1H, dd, H-14').

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 100,2 (C-2), 68,0 (C-3), 29,2 (C-4), 104,3 (C-4a), 156,9 (C-5), 98,3 (C-6), 158,1 (C-7), 96,6 (C-8), 154,2 (C-8a), 132,4 (C-9), 115,7 (C-10), 146,3 (C-11), 145,6 (C-12), 116,0 (C-13), 120,4 (C-14), 81,7 (C-2'), 66,9 (C-3'), 29,8 (C-4'), 102,4 (C-4'a), 156,5 (C-5'), 96,5 (C-6'), 152,1 (C-7'), 107,2 (C-8'), 152,2 (C-8'a), 131,2 (C-9'), 115,7 (C-10'), 146,7 (C-11'), 145,9 (C-12'), 115,9 (C-13'), 119,8 (C-14').

Từ việc phân tích và so sánh các giá trị phổ NMR của hợp chất phân lập được với các giá trị phổ tương ứng của hợp chất proanthocyanidin A2 thu được từ vỏ hạt lạc [Lou H. *et al*, *Phytochemistry*, 51, 297-308, 1999] là hoàn toàn trùng khớp. Vì thế, đã xác định được hợp chất phân lập được là một dimeric proanthocyanidin với tên gọi là proanthocyanidin A2 có công thức cấu tạo sau:

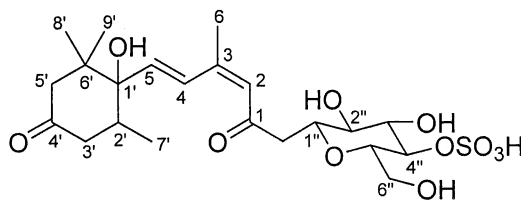


Tiếp tục tiến hành phân tách phân đoạn nhỏ W1.5 (9,5g) bằng qua cột sắc ký (đường kính cột $\Phi = 15\text{mm}$, chiều dài cột $L = 350\text{ mm}$) với chất hấp phụ silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi etyl axetat/rượu metylic/nước theo tỷ lệ thể tích là 6:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích), thu được sản phẩm thô 2. Tiến hành kết tinh lại sản phẩm thô 2 này trong dung môi rượu metylic, thu được 25mg hợp chất tinh khiết dưới dạng bột vô định hình. Kết quả đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H NMR và ^{13}C NMR của hợp chất như sau:

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 0,92 (3H, s, H-9'), 0,97 (3H, s, H-8'), 1,83 (3H, s, H-7'), 1,98 (3H, s, H-6), 2,10 (1H, d, $J = 17,0\text{ Hz}$, H-5'a), 2,44 (1H, d, $J = 17,0\text{ Hz}$, H-5'b), 3,64 (1H, t, $J = 9,0\text{ Hz}$, H-3''), 3,44 (1H, m, H-5''), 3,36 (1H, t, $J = 9,0\text{ Hz}$, H-2''), 3,77 (1H, dd, $J = 2,0, 12,0\text{ Hz}$, H-6''a), 3,67 (1H, m, H-6''b), 4,09 (1H, t, $J = 9,0\text{ Hz}$, H-4''), 5,43 (1H, d, $J = 8,5\text{ Hz}$, H-1''), 5,73 (1H, s, H-2), 5,84 (1H, s, H-3'), 6,23 (1H, d, $J = 16,0\text{ Hz}$, H-5), 7,70 (1H, d, $J = 16,0\text{ Hz}$, H-4).

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C NMR (125MHz, CD_3OD): δ 166,3 (C-1), 118,0 (C-2), 153,7 (C-3), 129,3 (C-4), 139,2 (C-5), 21,3 (C-6), 80,6 (C-1'), 165,7 (C-2'), 127,6 (C-3'), 200,9 (C-4'), 50,6 (C-5'), 42,8 (C-6'), 19,5 (C-7'), 23,5 (C-8'), 24,6 (C-9'), 95,0 (C-1''), 73,9 (C-2''), 76,7 (C-3''), 77,0 (C-4''), 77,1 (C-5''), 62,1 (C-6'').

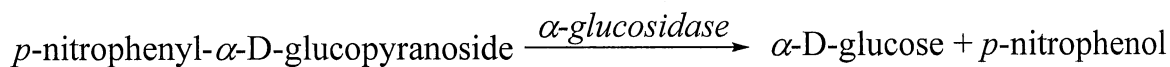
Phân tích và so sánh các giá trị phổ NMR đo được cho thấy đây chính là hợp chất 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat. Hợp chất này đã được nhóm tác giả sáng chế công bố vào năm 2016 [Trần Thu Hương *et al.*, *Natural Product Research*, 30(14), 1598–1604, 2016] có công thức cấu tạo sau:



(II)

Ví dụ 2: Thử nghiệm tác dụng ức chế các enzym α -glucosidase và α -amylase của hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) phân lập được từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae).

Tác dụng ức chế enzym α -glucosidase của hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) được thử nghiệm được thực hiện dựa vào phản ứng thủy phân *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside thành đường glucose và *p*-nitrophenol dưới xúc tác α -glucosidase trong sự có mặt/không có hoạt chất nghiên cứu [Ryu H.W. *et al*, *J. Agric. Food Chem.*, 58, 202-208, 2010].



Phép thử hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase được thực hiện như sau: Tra các mẫu nghiên cứu vào đĩa 96 giếng. Lấy 20 μ L mẫu tương ứng lần lượt ủ với *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (80 μ L) trong 3-5 phút. Sau đó, bổ sung enzym α -glucosidase (20 μ L), lắc đều rồi ủ trong 30 phút ở 37°C (hoặc nhiệt độ phòng). Hoạt động của enzym được định lượng bằng cách đo OD của sản phẩm *p*-nitrophenol ở bước sóng dài 405 nm trên máy đo Elisa. Tất cả các phản ứng enzym được thực hiện ở 37°C trong 30 phút, và lặp lại ba lần.

- Mẫu trắng: không có mẫu nghiên cứu và α -glucosidase (thay bằng đệm phosphate). Trường hợp này coi như giá trị ức chế 100%.

- Mẫu chuẩn dương: không có mẫu nghiên cứu (thay bằng đệm phosphate), có α -glucosidase. Trường hợp này coi như giá trị ức chế 0%.

- Đối chứng dương: acarbose.

Kết thử hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase được tính theo công thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100 - \frac{(C - B)}{(A - B)} \times 100$$

Trong đó: A: mật độ quang trung bình của mẫu chuẩn dương;

B: mật độ quang trung bình của mẫu trắng;

C: mật độ quang trung bình của mẫu thử hoạt tính.

Bên cạnh đó hoạt tính ức chế α -amylase của hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) được thực hiện dựa vào phản ứng khử tinh bột của enzym α -amylase trong sự có

mặt/không có hoạt chất nghiên cứu [Kusano R. *et al*, *J. Nat. Prod.*, 74, 119-128, 2011] được thực hiện như sau:

Chuẩn bị một dãy ống nghiệm 5 ml đánh số từ 1-10, mỗi ống chứa 0,2 ml dung dịch tinh bột 0,5 mM. Ống 1-2 không chứa tinh bột mà thay bằng 0,1 ml DMSO và 0,2 ml đệm phosphate được dùng làm mẫu trắng (0% ức chế), ống 3-4 thêm vào 0,1 ml DMSO được dùng làm mẫu dương (100% ức chế), ống 5-6 thêm 0,1 ml dung dịch acarbose làm đối chứng dương, ống 7-8 thêm 0,1 ml dung dịch mẫu đã pha ở các nồng độ khác nhau. Phản ứng thủy phân tinh bột được bắt đầu khi cho vào mỗi ống 0,2 ml dung dịch α -amylase. Lắc đều hỗn hợp rồi ủ trong bể ổn nhiệt ở 37°C trong 10 phút. Các ống dung dịch được đo độ hấp thụ UV tại bước sóng 490 nm. Tất cả các phản ứng enzym được thực hiện ở 37°C trong 30 phút, và lặp lại ba lần.

- Mẫu trắng: không có mẫu nghiên cứu và α -amylase (thay bằng đệm phosphate). Trường hợp này coi như giá trị ức chế 100%.

- Mẫu chuẩn dương: không có mẫu nghiên cứu (thay bằng đệm phosphate), có α -amylase. Trường hợp này coi như giá trị ức chế 0%.

- Đối chứng dương: acarbose.

Kết quả hoạt tính ức chế enzym α -amylase được tính theo công thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100 - \frac{(C - B)}{(A - B)} \times 100$$

Trong đó: A: mật độ quang trung bình của ống 1 và 2;

B: mật độ quang trung bình của ống 3 và 4;

C: mật độ quang trung bình của ống 5 và 6 hoặc 7 và 8.

Kết quả thử hoạt tính ức chế các enzym α -glucosidase và α -amylase của hợp chất có công thức (I) được chỉ ra ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính ức chế các enzym α -glucosidase và α -amylase của hợp chất có công thức (I)

Mẫu thử	ức chế enzym α -glucosidase IC ₅₀ (µg/ml)	ức chế enzym α -amylase IC ₅₀ (µg/ml)
Hợp chất có công thức (I)	3,46	0,25
Đối chứng dương (acarbose)	1910	0,25

Từ kết quả ở bảng 1 nhận thấy hợp chất proanthocyanidin A-2 có công thức (I) thể hiện hoạt tính ức chế mạnh các enzym α -glucosidase với giá trị IC₅₀ = 3,46 µg/ml và enzym α -amylase với giá trị IC₅₀ = 0,25 µg/ml. Sở dĩ như vậy là do cấu trúc của hợp chất này có chứa nhiều nhóm hydroxyl –OH nhất (9 nhóm) trên khung anthocyanidin. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu về hoạt tính này của vỏ quả Măng cụt

công bố vào các năm 2007 [Loo A. E. K. *et al*, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9805-9810, 2007] và năm 2011 [Ryu H. W. *et al*, *Phytochemistry*, 72(17), 2148-2154, 2011].

Enzym α -glucosidase tham gia vào quá trình sinh tổng hợp của các chuỗi oligosaccharide và cơ chế kiểm soát chất lượng trong lưới nội chất của glycoprotein N liên kết. Sự ức chế của các enzym glycosidase có thể có ảnh hưởng đến sự kiểm soát quá trình trao đổi chất và tiết ra glycoprotein. Nguyên tắc này là cơ sở cho việc sử dụng các chất ức chế enzym glycosidase để điều trị các chứng nhiễm trùng, ung thư, hạ đường huyết và các rối loạn di truyền do virus [Asano N., *Glycobiology*, 13 (10), 93-104, 2003]. Enzym α -amylase là một enzym thủy phân liên kết của các polysaccharide lớn như tinh bột và glycogen tạo ra glucose và maltose. Đây là dạng chủ yếu của amylase được tìm thấy ở người và động vật có vú, có mặt trong hạt có chứa tinh bột như là một thực phẩm dự trữ, và được tiết ra bởi nhiều loại nấm. Ở người, enzym amylase được tìm thấy trong nước bọt, có tác dụng phân giải tinh bột thành maltose và dextrin. Enzym α -amylase tuyến tụy có khả năng phân cắt ngẫu nhiên các liên kết α -(1,4)-glycosidic của amylose trong tinh bột tạo ra dextrin, maltose, hoặc maltotriose thông qua một cơ chế chuyển giữ cấu hình anomeric. Các thử nghiệm đối với amylase được thực hiện dễ dàng hơn đối với lipase, do đó, chủ yếu được sử dụng để phát hiện và theo dõi bệnh viêm tụy và bệnh đái tháo đường [Manaharan T. *et al*, *Molecules*, 17, 5915-5923, 2012]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc sử dụng các hợp chất thiên nhiên có tác dụng ức chế enzym α -glucosidase và α -amylase kết hợp với các thuốc khác trong điều trị tiểu đường sẽ làm tăng hiệu quả chữa trị đồng thời giảm đáng kể những tác dụng phụ không mong muốn [Bischoff H. *et al*, *Eur. J. Clin. Invest.*, 24(3), 3-10, 1994; Matthias F. *et al*, *Wien Med. Wochenschr.*, 157(13-14), 320-324, 2007].

Như vậy, hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) được đánh giá có tác dụng ức chế các enzym α -glucosidase và α -amylase. Kết quả này gợi ra rằng tác dụng hạ đường huyết của vỏ quả Mãng cụt có thể là nhờ vào khả năng ức chế các enzym α -glucosidase và α -amylase của thành phần proanthocyanidin nói chung, hợp chất proanthocyanidin A2 nói riêng thuộc nhóm tannin ngưng tụ có trong vỏ quả Mãng cụt. Đồng thời tác dụng ức chế các enzym α -glucosidase và α -amylase cũng giải thích được việc sử dụng vỏ quả Mãng cụt để trị bệnh tiểu đường typ 2 trong y học cổ truyền của Việt Nam và một số nước trên thế giới.

Ví dụ 3: Thử nghiệm tác dụng chống oxi hóa của hợp chất 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) phân lập được từ vỏ quả Mãng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae).

Tác dụng chống oxi hóa của hợp chất 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) được chứng minh thông qua phép thử hoạt tính chống oxi hóa dựa trên tác dụng dọn gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Phép thử này đã sử dụng

DPPH để tạo ra gốc oxi hóa tự do trong dung dịch phản ứng. Khả năng dọn gốc oxi hóa tự do của mẫu thử được đánh giá thông qua việc làm giảm mật độ quang của dung dịch sau phản ứng đo tại bước sóng $\lambda = 517$ nm so với mẫu đối chứng không chứa chất thử.

Mẫu chất thử ban đầu được pha loãng trong dung môi dimetyl sunfoxit (DMSO) thành một dãy 05 nồng độ thành các nồng độ 500, 200, 100, 30 và 10 μM . DPPH pha trong dung môi rượu metylic thành nồng độ 150 μM . Tiếp đó 10 μL dung dịch mẫu chất thử được trộn đều với 190 μL dung dịch DPPH trong các giếng của phiên 96 giếng, rồi ủ phiên trong tủ âm Sanyo (Nhật Bản) ở 37°C khoảng 30 phút. Sau đó, đo mật độ quang của dung dịch ở các giếng tại bước sóng 517nm trên máy đọc phiên vi lượng Molecular Device (Mỹ). Axit L-ascorbic (hay vitamin C) được sử dụng làm chất đối chứng dương trong phép thử.

Khả năng dọn gốc oxi hóa tự do sinh ra từ DPPH của mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$\text{SC}\% = \left[100 - \frac{(A_M - A_T)}{(A_o - A_T)} \right] \times 100 (\%)$$

trong đó:

A_M : Mật độ quang tại giếng chứa chất thử.

A_T : Mật độ quang tại giếng chứa mẫu trắng (dung môi rượu metylic không có DPPH).

A_o : Mật độ quang tại giếng chứa đối chứng âm (thay mẫu chất thử bằng dung môi dimetyl sunfoxit DMSO).

Giá trị nồng độ quét bán phần SC_{50} được tính theo các nồng độ khác nhau của chất thử. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác của dữ liệu. Kết quả thử hoạt tính chống oxi hóa của hợp chất có công thức (II) được chỉ ra ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thử hoạt tính chống oxi hóa dựa vào khả năng dọn gốc tự do DPPH của hợp chất có công thức (II)

Mẫu thử	Giá trị SC_{50} (μM)
Hợp chất có công thức (II)	247,8
Đối chứng dương (axit L-ascorbic)	210,5

Từ kết quả ở bảng 2 nhận thấy hợp chất 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) có tác dụng quét gốc tự do DPPH (với nồng độ quét bán phần $\text{SC}_{50} = 247,8$ μM) mạnh xấp xỉ đối chứng dương là axit ascorbic. Như vậy, hợp chất 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) có tác dụng chống oxi hóa.

Những lợi ích có thể đạt được

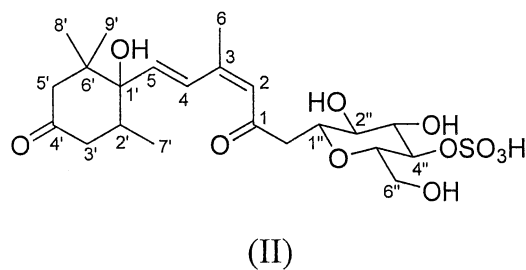
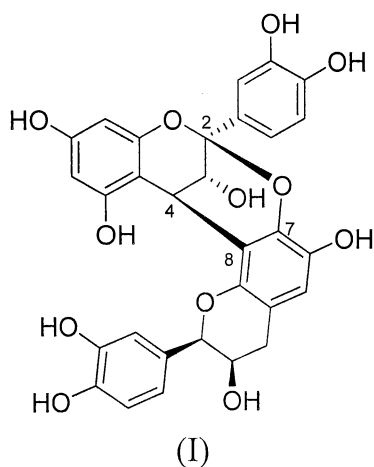
Phương pháp theo sáng chế là hữu ích trong việc phân lập các hợp chất phân cực có các hoạt tính ức chế các enzym α -glucosidase, α -amylase và chống oxi hóa từ vỏ quả Mãng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae), nguồn nguyên liệu phong phú, sẵn có ở Việt Nam. Đồng thời sáng chế cũng nhằm định hướng cho những nghiên cứu tiếp theo sâu hơn về cây Mãng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae), một cây thuốc quý cần được đầu tư nghiên cứu để trở thành nguồn nguyên liệu quan trọng trong bào chế các thuốc chữa bệnh có hiệu quả nhất.

YÊU CẦU BẢO HỘ

4. Phương pháp chiết tách các hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) và 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) từ vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) bao gồm các bước sau:

- (i) thu gom vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae), thái lát mỏng từ 2 - 3mm, phơi khô rồi sấy ở nhiệt độ khoảng từ 40 đến 45°C, và nghiền bằng máy nghiền thu được bột với kích thước hạt nhỏ hơn 1mm;
- (ii) hòa tan một lượng enzym Pectinex Ultra SP-L (3800 PGNU/ml) vào nước cất đã được axit hóa bằng HCl với pH = 5 với nồng độ enzym là 0,5%; chuyển toàn bộ dịch nước chứa enzym vào bình chiết chứa bột vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) theo tỷ lệ dịch enzym/nguyên liệu là 3/1;
- (iii) khuấy đều hỗn hợp và ủ ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút để thực hiện quá trình thủy phân bột vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae);
- (iv) kết thúc quá trình ủ với enzym, bổ sung dung môi rượu etylic nồng độ 60% theo tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 20/1 để ngâm chiết bột vỏ quả Măng cụt (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 2 giờ;
- (v) lọc qua phễu lọc Buchner bỏ bã và thu dịch chiết sau khi thủy phân bằng enzym; cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 50°C để thu được dịch cô toàn phần trong rượu etylic, ký hiệu là dịch cô A;
- (vi) hòa tan dịch cô A với nước cất theo tỷ lệ dịch cô A/nước cất là 1/6;
- (vii) chiết dịch nước này ba lần bằng clorofom thu được dịch chiết clorofom, rồi cô kiệt dưới áp suất giảm ở 40°C thu được phần chiết cloroform, ký hiệu là phần chiết C; cất loại dung môi phần dịch nước sau khi chiết với clorofom thu được dưới áp suất giảm ở 70°C, thu được dịch cô trong nước, ký hiệu là dịch cô W;
- (viii) tiến hành chạy phân tách sắc ký dịch cô W trên cột thủy tinh có đường kính cột Φ = 50mm, chiều dài cột L = 250mm, được nhồi Dianion; rửa giải bằng hệ dung môi MeOH/H₂O theo các tỷ lệ thể tích lần lượt là 20/80, 40/60, 80/20 (thể tích/thể tích), thu được các phân đoạn gộp theo thể tích của hệ dung môi rửa giải tương ứng; kiểm tra quá trình phân tách sắc ký cột bằng phân tích trên sắc ký lớp mỏng, cất loại dung môi thu được các phân đoạn dịch chiết tương ứng là W1, W2 và W3;
- (ix) tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn dịch chiết W1 trên cột thủy tinh có đường kính cột Φ = 30mm, chiều dài cột L = 500 mm, được nhồi chất hấp phụ pha đảo là YMC RP-18, rửa giải bằng hỗn hợp dung môi rượu metylic/nước theo tỷ lệ thể tích 1:4 (thể tích/thể tích), sau đó thu gom các phân đoạn rửa giải giống nhau trên sắc ký lớp mỏng, cất loại dung môi, thu được 5 phân đoạn dịch chiết nhỏ ký hiệu lần lượt là W1.1, W1.2, W1.3, W1.4 và W1.5;

- (x) tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn dịch chiết W1.2 trên cột thủy tinh có đường kính cột $\Phi = 15\text{mm}$, chiều dài cột $L = 350\text{ mm}$, chất hấp phụ silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi cloroform/rượu metylic/nước theo tỷ lệ thể tích là 4,5:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích), thu được hợp chất proanthocyanidin A2 thô;
- (xi) tinh chế hợp chất proanthocyanidin A2 thô bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi cloroform/rượu metylic theo tỷ lệ thể tích là 1:1 (thể tích/thể tích), thu được hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) tinh khiết dưới dạng bột vô định hình màu vàng;
- (xii) tiến hành chạy phân tách sắc ký phân đoạn dịch chiết W1.5 trên cột thủy tinh có đường kính cột $\Phi = 15\text{mm}$, chiều dài cột $L = 350\text{ mm}$, chất hấp phụ silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi etyl axetat/rượu metylic/nước theo tỷ lệ thể tích là 6:1:0,1 (thể tích/thể tích/thể tích), thu được hợp chất 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat thô;
- (xiii) tinh chế hợp chất 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat thô bằng cách kết tinh lại trong dung môi rượu metylic, thu được hợp chất 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) tinh khiết dưới dạng bột vô định hình không màu.



Hình 1. Sơ đồ chiết tách hai hợp chất proanthocyanidin A2 có công thức (I) và 4-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyl absciat có công thức (II) từ vỏ quả Măng cụt

