

Nghiên cứu bán tổng hợp α -glucosyl hesperidin từ hesperidin

Phạm Hải Long¹, Trần Thị Tuyết², Hoàng Thị Ngọc Anh²,

Lê Thị Phương¹, Ngô Thị Hồng Vân³, Nguyễn Thị Hà¹

¹Viện Dược Liệu, 3B Quang Trung, phường Tràng Tiền, Hà Nội, Việt Nam

²Đại học Đại Nam, 1 Phố Xóm, phường Phú Lương, Hà Nội, Việt Nam

³Đại học Công Nghệ Đông Á, Làng Đại học, Võ Cường, Bắc Ninh, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/6/2026; ngày chuyển phản biện 24/6/2026;

ngày nhận phản biện 17/8/2026; ngày chấp nhận đăng 28/9/2026

Tóm tắt:

Alpha glucosyl hesperidin (AGH) được cấu tạo từ glucose và hesperidin, là một loại bioflavonoid có trong vỏ của các loại trái cây họ cam chanh (thu được từ các nguồn nguyên liệu tái chế), α -glucosyl hesperidin có độ tan trong nước và hoạt tính sinh học vượt trội so với hesperidin, cải thiện khả năng hấp thụ và độ ổn định. Hơn thế nữa, α -glucosyl hesperidin còn có tác dụng làm sáng da và cải thiện tình trạng quầng thâm dưới mắt. Thông qua phản ứng chuyển nhóm glucosyl (transglucosylation) sử dụng enzym cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase), hiệu suất chuyển hóa hesperidin thành α -glucosyl hesperidin cao nhất đạt 65,3% khi sử dụng CGTase ở nồng độ 22,5 IU/ml và tinh bột 5% (w/v), trong điều kiện nhiệt độ 55-60°C và thời gian phản ứng 8 giờ. Sản phẩm của phản ứng chuyển nhóm glucosyl đã được tinh sạch và xác định cấu trúc hóa học là glucosyl- α -(1 $\rightarrow$ 4)-hesperidin. Cấu trúc của các hợp chất được xác định thông qua phổ NMR và LC-ESI MS

Từ khoá: chuyển nhóm glucosyl, enzym CGTase, hesperidin, α -glucosyl hesperidin.

Chỉ số phân loại: 2.4, 3.2

The synthesis of α -glucosyl hesperidin from hesperidin
Pham Hai Long¹, Tran Thi Tuyet², Hoang Thi Ngoc Anh²,
Le Thi Phuong¹, Ngo Thi Hong Van³, Nguyen Thi Ha^{1*}

¹*National Institute of Medicine Material, 3B Quang Trung Street, Trang Tien Ward,
Hanoi, Vietnam*

²*Dai Nam University, 1 Xom Street, Phu Luong Ward, Hanoi, Vietnam*

³*Dong A University, University Village, Vo Cuong, Bac Ninh, Vietnam*

Received 22 June 2026; revised 17 August 2026; accepted 28 September 2026

Abstract:

Alpha glucosyl hesperidin (AGH) is composed of glucose and hesperidin, a bioflavonoid found in various citrus fruits peels from upcycling resources, has better water solubility and bioactivity than hesperidin to improve absorption and stability. Moreover, α -glucosyl hesperidin has the effect of warming, brightening and improving dark circles under the eyes. The via transglucosylation using cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase), the highest hesperidin to α -glucosyl hesperidin conversion yield achieved was 65,3% using 22,5 mU/ml CGTase, and 5% starch (w/v), at 55-60°C for 8 h. The product of transglucosylation was purified and its chemical structure was determined to be glucosyl- α -(1 $\rightarrow$ 4)-hesperidin using. The structures of the compound were determined by NMR and LC-ESI MS spectra.

Keywords: enzyme CGTase, hesperidin, transglucosylation, α -glucosyl hesperidin.

Classification numbers: 2.4, 3.2

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, các thuốc có cấu trúc mới ngày càng được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và điều chế nhằm tạo ra các hợp chất mới dựa trên cấu trúc các chất có sẵn, có hoạt tính sinh học cao vượt trội hơn so với các chất ban đầu. Hesperidin là một loại flavonoids, được tìm thấy nhiều trong phần vỏ và màng trắng bám ngoài múi của trái cây thuộc chi cam chanh, có tác dụng chống kết dính tiểu cầu, tăng tính thấm, bền thành mạch, các rối loạn xơ vữa động mạch, nhồi máu cơ tim, suy tĩnh mạch gây tê đau tay chân và trĩ [1]. Tuy nhiên, hesperidin có độ hoà tan trong nước kém, dẫn

đến sinh khả dụng theo đường uống thấp. Trong khi đó α -glucosyl hesperidin có độ hòa tan gấp 300 lần so với hesperidin, do đó có thể cải thiện được sinh khả dụng so với hesperidin [2]. Do đó ngoài tác dụng dược lý tương tự hesperidin, α -glucosyl hesperidin còn có một số tác dụng dược lý như hạ lipid máu, hạ axit uric máu, là một chất bổ sung hoặc thuốc hữu ích cho người đang bị bệnh béo phì [3]. Vì thế đã có rất nhiều nghiên cứu trên thế giới về tổng hợp hoạt chất này. Hầu hết các nghiên cứu đều được thực hiện ở quy mô nhỏ [4-7]. Theo T. Kometani và cs (1995) [4] đã sử dụng tinh bột 5% so với phản ứng như là chất cho glucose và 2 U/ml CGTase làm xúc tác, ở 40°C với pH 10 trong thời gian 16 h, cuối cùng là sử dụng sephadex LH-20 để tinh chế sản phẩm, thu được hỗn hợp hesperidin glucosid, hiệu suất 50%. Hơn nữa, theo Titaporn và cộng sự đã sử dụng nồng độ CGTase 200 IU/ml với dung môi DMSO 80% để hoà tan hesperidin (2% trong hỗn hợp phản ứng), sử dụng β -cyclodextrin là chất cho glucose (khoảng 1,5% theo thể tích phản ứng), điều kiện pH 5 trong thời gian 6 h ở nhiệt độ 60°C, thu được hỗn hợp hesperidin glycosid trong đó α -glucosyl hesperidin, hiệu suất 10% trên HPLC [5].

Trong khi đó, hiện nay trong nước chưa có một nghiên cứu về tổng hợp hoạt chất này cũng như hỗn hợp hesperidin glycosid. Bên cạnh đó, hàng năm có khoảng 500.000 tấn/năm rác thải từ nguồn nguyên liệu từ vỏ cam quýt chanh, chứa hàm lượng flavonoid khoảng 1,28% trong vỏ, hàm lượng hesperidin chiếm khoảng 32-50% về khối lượng [8]. Vì thế để tận dụng được nguồn nguyên liệu hesperidin trong nước, bước đầu chúng tôi đã nghiên cứu quy trình lên men hesperidin thành α -glucosyl hesperidin ở quy mô phòng thí nghiệm, tiến tới có thể thực hiện ở quy mô lớn hơn, nhằm tận dụng được nguồn nguyên liệu hesperidin trong nước, chủ động được nguồn nguyên liệu hoá dược trong tương lai.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Các hóa chất dùng cho phản ứng hesperidin có độ tinh khiết 95%, enzym CGTase 90 IU/ml của Trung Quốc sử dụng mà không cần tinh chế. Các hoá chất DMSO, CH₃CN, MeOH dùng cho phản ứng của Merck, β -cyclodextrin, tinh bột của Trung Quốc. Các dung môi được sử dụng cho triển khai sắc kí lớp mỏng (TLC), sắc

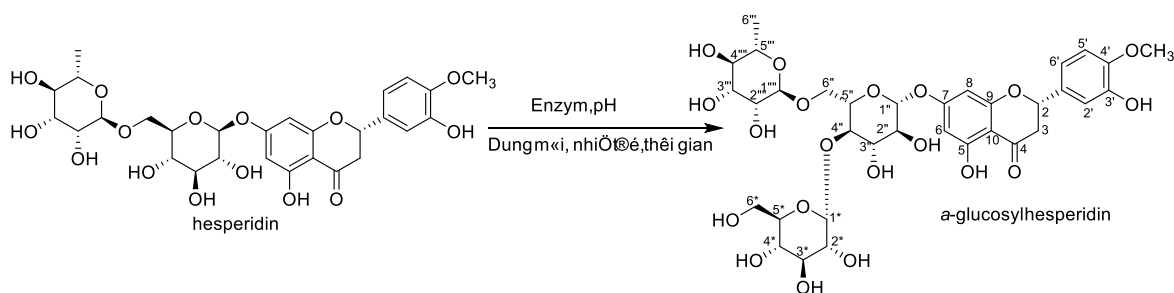
kí cột là các dung môi của Trung Quốc, được sử dụng mà không cần tinh chế. Dung môi sử dụng cho phân tích HPLC là các dung môi của Merck hoặc Fisher.

Sắc kí lớp mỏng (SKLM) thực hiện trên bản mỏng pha thuận tráng sẵn silica gel 60F₂₅₄ (Merck) hoặc sử dụng bản mỏng pha đảo RP-18 F₂₅₄ (Merck), được quan sát dưới bước sóng UV₂₅₄ và UV₃₆₀ nm. Điểm nóng chảy được đo trên máy Buchi M360 của Thụy Sĩ. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được ghi trên máy Bruker AM 600 FT-NMR trong dung môi DMSO-*d*₆ sử dụng TMS làm chất nội chuẩn. Sắc kí lỏng ghép nối khối phổ LC-ESI MS được ghi trên máy LC/MS-8045 Shimadzu, Nhật Bản. Hệ thống HPLC LC-20A (Shimadzu LC20, Nhật Bản), cột phân tích pha đảo Vertical C₁₈ (250 mm × 4,6 mm, 5 μm)

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Sau khi tham khảo các phương pháp tổng hợp trên thế giới [4, 5], chúng tôi đã tiến hành tổng hợp α -glucosyl hesperidin bằng việc sử dụng phản ứng tạo liên kết glycosid với xúc tác là enzym CGTase trong dung môi hữu cơ, ở môi trường pH 5-10, kiểm soát hiệu suất phản ứng ở từng thời điểm phản ứng bằng cách sử dụng TLC kết hợp HPLC để xác định độ chuyển hóa và độ tinh khiết. Sử dụng nguyên liệu đầu hesperidin và enzym CGTase phù hợp cho quá trình glycosid hoá là một yếu tố đặc biệt quan trọng của quy trình.

Tiếp theo tiến hành nghiên cứu khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng, sau khi tổng hợp thành công α -glucosyl hesperidin, để tiếp tục nâng cao được hiệu suất của phản ứng, tiến hành khảo sát các yếu tố phù hợp với điều kiện chuyển hoá hesperidin thành α -glucosyl hesperidin để tối ưu hoá quy trình, nâng cao được hiệu suất, giảm được chi phí cho sản xuất, đồng thời khắc phục được các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chuyển hoá. Sơ đồ và các yếu tố khảo sát được thực hiện như sau:



Hình 1. Sơ đồ tổng hợp α -glucosyl hesperidin từ hesperidin

3. Kết quả và bàn luận

Để thực hiện quy trình tổng hợp, chúng tôi sử dụng với lượng hesperidin (0,5 g; 0,8 mmol; 1 equiv.), được hoà tan trong 0,2 ml DMSO, quá trình phản ứng được sử dụng với tác nhân glucosyl hoá là hồ tinh bột 5% (0,5 g). Tiếp tục thêm vào đó enzym CGTase 11,2 IU (0,02 ml), phản ứng được gia nhiệt đến 45-50°C, quá trình phản ứng được kiểm soát bằng TLC với hệ dung môi EtOAc:CH₃COOH:H₂O (3:1:1, v/v/v) ở UV₂₅₄ nm và đốt nóng với thuốc thử H₂SO₄ 10% trong nước. Thêm vào đó, để kiểm soát được độ chuyển hoá sử dụng HPLC theo dõi được tiến trình của phản ứng trong thời gian 8 h. Kết thúc phản ứng loại bỏ phần cặn trong hỗn hợp, phần dịch thu được được cô cạn dung môi dưới áp suất giảm (ở áp suất 10-20 mbar, nhiệt độ 50°C) thu được sản phẩm thô. Tiến hành tinh chế sản phẩm thô bằng sắc kí cột nhựa D101 (kích thước hạt 0,315-1,25 mm), với hệ dung môi gradient H₂O:EtOH từ 0% EtOH, 10% EtOH, 20% EtOH, 30% EtOH, 50% EtOH thu được các phân đoạn khác nhau, trong đó phân đoạn 20% EtOH và 30% EtOH chứa sản phẩm α -glucosyl hesperidin. Tiếp tục thu hồi dung môi dưới áp suất giảm (ở áp suất 10-20 mbar ở nhiệt độ 50°C) thu được sản phẩm α -glucosyl hesperidin.

Cấu trúc của sản phẩm sau khi tinh chế được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ ¹H và ¹³C-NMR kết hợp với phổ hai chiều HSQC, HMBC, COSY và MS. Trên phổ ¹H-NMR ta thấy xuất hiện hai nhóm tín hiệu proton đặc trưng cho khung hesperidin và các proton thuộc vòng đường. Cụ thể hai tín hiệu proton đặc trưng cho vòng A ở δ_H 6,15 (1H, dd, $J = 4,5; 2,0$ Hz, H-6) và δ_H 6,14 (1H, t, $J = 2,0$ Hz, H-8). Thêm vào đó các tín hiệu proton ở δ_H 6,94 (2H, m, H-2', 5'), δ_H 6,94 (1H, m, H-6') đặc trưng cho các tín hiệu proton thuộc vòng B. Sự xuất hiện của proton methoxy ở δ_H 3,77 (3H, s). Ngoài ra một tín hiệu proton chuyển về trường thấp ở vị trí δ_H 5,49 (1 H, m) thuộc về proton H-2, một tín hiệu khác thuộc về proton H-3 đặc trưng cho khung hesperidin ở δ_H 2,77 (1H, ddd, $J = 17,0; 7,5; 3,20$ Hz), δ_H 3,25 (1H, m) thuộc về proton H-3. Thêm vào đó sự xuất hiện của các tín hiệu ở δ_H 5,05 (1H, t, $J = 7,7$ Hz, H-1''), δ_H 4,58 (1H, s, H-1''') đặc trưng cho hai proton anomeric của vòng đường của hesperidin, sự xuất hiện của tín hiệu δ_H 1,065 (3H, q, $J = 6,2; 3,6$ Hz, H-6''') chỉ ra sự xuất hiện của đường rhamnose của hesperidin. Thêm vào đó một tín hiệu proton anomeric ở δ_H 5,00 (1H, d, $J = 3,8$ Hz) chỉ ra sự xuất hiện của một vòng đường

α trong cấu trúc. Trên phổ ^{13}C NMR của hợp chất chỉ ra sự xuất hiện của 15 tín hiệu carbon thuộc khung hesperidin và 18 tín hiệu carbon thuộc vòng đường pyranose. Cụ thể, sự xuất hiện của một tín hiệu carbon ở δ_{C} 197,05 ppm chỉ ra sự xuất hiện của vị trí C-3. Các tín hiệu khác còn lại thuộc về carbon của vòng B, A và C của khung hesperidin.

Kết hợp phổ HMBC, HSQC và COSY xác định chính xác vị trí liên kết của các vòng đường với aglycon và các liên kết glycosid trong cấu trúc. Trên phổ HMBC chỉ ra tương tác giữa proton H-1* (δ_{H} 5,00) với C-4'' (δ_{C} 79,7) điều này chỉ ra được đường α -glucose gắn với đường của hesperidin thông qua carbon C-4'' α -glucose-(1 $\rightarrow$ 4)- β -glucose. Tương tác giữa H-1''' (δ_{H} 4,58) với C-6'' (δ_{C} 65,7) chỉ ra được vị trí liên kết giữa hai đường trong hesperidin ở vị trí β -glucose-(1 $\rightarrow$ 6)- β -rhamnose. Thêm vào đó tương tác giữa H-1'' (δ_{H} 5,05) với C-7 (δ_{C} 165,1) chỉ ra vị trí liên kết của đường với aglycon tại vị trí C-7 của khung hesperidin. Vị trí của nhóm OCH_3 được xác định thông qua tương tác giữa proton trong nhóm $-\text{OCH}_3$ (δ_{H} 3,77) tương tác với C-4' (δ_{C} 148,01). Phổ ESI-MS của hợp chất chỉ ra được pic ion giả phân tử $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 773,15. Từ các dữ liệu trên cho thấy hợp chất thu được là α -glucosyl hesperidin. R_f: 0,4 (EtOAc:CH₃COOH:H₂O (3:1:1, v/v/v), T_{nc}: 170-180°C; LC-ESI-MS: $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 773,15 ($[\text{M} + \text{H}]^+$ lý thuyết 773,25); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): 12,01 (1H, brs, 5-OH); 9,10 (1H, brs, 3'-OH); 6,94 (1H, m, H-2'); 6,94 (1H, m, H-5); 6,90 (1H, m, H-6'); 5,49 (1H, m, H-2); 6,15 (1H, dd, $J = 4,5; 2,0$ Hz, H-6); 6,14 (1H, t, $J = 2,0$ Hz, H-8); 5,05 (1H, t, $J = 7,7$ Hz, H-1''); 5,00 (1H, d, $J = 3,8$ Hz, H-1*); 4,58 (1H, s, H-1'''); 3,82 (1H, d, $J = 10,2$ Hz, H-6''a); 3,77 (3H, s, OCH_3); 3,74 (1H, m, H-3*); 3,63 (1H, m, H-3'''); 3,60 (1H, m, H-6a*); 3,52 (1H, m, H-6*b); 3,58 (1H, m, H-6''b); 3,56 (1H, m, H-3''); 3,52 (1H, m, H-6*a); 3,42 (1H, m, H-4''); 3,43 (1H, m, H-2''); 3,40 (1H, m, H-5''); 3,38 (1H, m, H-5'''); 3,29 (1H, m, H-2''); 3,27 (1H, m, H-2*); 3,25 (1H, m, H-3a); 3,25 (1H, m, H-5*); 3,15 (1H, m, H-4'''); 3,15 (1H, m, H-4*); 2,77 (1H, ddd, $J = 17,0; 7,5; 3,20$ Hz, H-3b); 1,065 (3H, q, $J = 6,2; 3,6$ Hz, H-6'''). ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): 78,9 (C-2); 42,1 (C-3); 197,1 (C-4); 163,0 (C-5); 96,4 (C-6); 165,1 (C-7); 95,6 (C-8); 162,6 (C-9); 103,4 (C-10); 131,0 (C-1'); 114,1 (C-2'); 146,5 (C-3'); 148,0 (C-4'); 112,1 (C-5'); 117,9 (C-6'); 55,7 (OCH_3); 99,2 (C-1''); 73,5 (C-2''); 75,9 (C-3''); 79,7 (C-4''); 73,3 (C-5''); 65,7 (C-6''); 100,8 (C-1'''); 72,7 (C-2'''); 70,4 (C-3''');

70,7 (C-4^{'''}); 68,4 (C-5^{'''}); 17,8 (C-6^{'''}); 101,3 (C-1^{*}); 72,5 (C-2^{*}); 73,7 (C-3^{*}); 69,6 (C-4^{*}); 72,5 (C-5^{*}); 60,6 (C-6^{*}).

Bảng 1. Dữ liệu phổ của α -glucosyl hesperidin.

STT	¹³ C-NMR ^a	TLTK ^c [5]	¹ H-NMR ^b
2	78,5	78,5	5,49 (1 H, m)
3	42,1	42,4	2,77 (1H, ddd, $J = 17,0; 7,5; 3,20$ Hz), 3,25 (1H, m)
4	197,1	197,1	
5	163,0	163,0	
6	96,4	96,5	6,15 (1H, dd, $J = 4,5; 2,0$ Hz)
7	165,1	165,0	
8	95,6	95,5	6,14 (1H, t, $J = 2,0$ Hz)
9	162,6	162,6	
10	103,4	103,4	
1'	131,0	130,9	
2'	114,1	114,2	6,94 (1H, m)
3'	146,5	146,5	
4'	148,0	148,0	
5'	112,1	112,1	6,94 (1H, m)
6'	117,9	117,9	6,90 (1H, m)
OCH ₃	55,7	55,7	3,77 (3H, s)
1''	99,2	99,1	5,05 (1H, t, $J = 7,7$ Hz)
2''	73,5	73,6	3,29 (1H, m)
3''	75,9	75,8	3,56 (1H, m)
4''	79,7	79,7	3,42 (1H, m)
5''	73,3	73,5	3,40 (1H, m)
6''	65,7	65,9	3,82 (1H, d, $J = 10,2$ Hz); 3,58 (1H, m)
1'''	100,5	100,4	4,58 (1H, s)
2'''	72,7	72,1	3,43 (1H, m)

3'''	70,4	70,7	3,63 (1H, m)
4'''	70,7	69,5	3,15 (1H, m)
5'''	68,4	68,3	3,38 (1H, m)
6'''	17,8	17,8	1,065 (3H, q, $J = 6,2; 3,6$ Hz)
1*	101,3	101,3	5,00 (1H, d, $J = 3,8$ Hz)
2*	72,5	73,2	3,27 (1H, m)
3*	73,7	75,8	3,74 (1H, m)
4*	69,6	70,3	3,15 (1H, m)
5*	72,5	72,4	3,25 (1H, m)
6*	60,6	60,5	3,60 (1H, m), 3,52 (1H, m)
5-OH			12,01 (1H, brs)
3'-OH			9,10 (1H, brs)

^a150 MHz, DMSO-*d*₆; ^b600 MHz, DMSO-*d*₆; ^c100 MHz, DMSO-*d*₆

Sau khi tổng hợp thành công α -glucosyl hesperidin chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu nâng quy mô phản ứng lên 1,0 g/mẻ, quá trình phản ứng được thực hiện thông qua khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến phản ứng, để đưa ra điều kiện tối ưu cho quy trình tổng hợp.

3.1. Quy trình chung cho các khảo sát

Để thực hiện quy trình khảo sát chúng tôi sử dụng với lượng hesperidin là 1 g, được hoà tan trong vừa đủ dung môi khảo sát, quá trình phản ứng được sử dụng với tác nhân cho glucose là hoá hồ tinh bột 5% hoặc β -cyclodextrin 0,5%. Tiếp tục thêm vào đó enzym CGTase 11,2 IU (0,04 ml), phản ứng được gia nhiệt lên đến trong khoảng nhiệt độ khảo sát, quá trình phản ứng được kiểm soát bằng TLC với hệ dung môi EtOAc:CH₃COOH:H₂O (3:1:1, v/v/v) ở UV₂₅₄ nm và đốt nóng với thuốc thử H₂SO₄ 10%. Ngoài ra để kiểm soát được độ chuyển hoá của phản ứng chính xác chúng tôi cũng kết hợp với phương pháp HPLC. Phản ứng được thực hiện ở 8 h. Kết thúc phản ứng lọc loại bỏ phần chất rắn không tan trong hỗn hợp. Phần dịch thu được được cô cạn dung môi dưới áp suất giảm (áp suất 10-20 mbar, nhiệt độ 50 °C) thu được sản phẩm thô. Tiếp tục được tinh chế bằng phương pháp sắc kí cột nhựa D101, với hệ dung môi gradient H₂O: EtOH từ 0% EtOH, 10% EtOH, 20% EtOH, 30% EtOH, 50% EtOH thu được các phân đoạn khác nhau, trong đó phân đoạn 20% EtOH

và 30% EtOH chứa α -glucosyl hesperidin. Tiếp tục thu hồi dung môi dưới áp suất giảm (áp suất 10-20 mbar, nhiệt độ 50°C) thu được sản phẩm α -glucosyl hesperidin.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất phản ứng

Do phản ứng sử dụng enzym làm xúc tác, vì thế dung môi phản ứng có vai trò rất quan trọng liên quan độ bền của enzym. Trong khi enzym bền vững trong môi trường pH 4,5-6 và kém bền ở nhiệt độ cao, thêm vào đó dung môi cũng là yếu tố quan trọng có thể phá vỡ cấu trúc của enzym làm giảm độ hoạt động chúng. Điều này để giải thích trong quá trình phản ứng hiệu suất sẽ giảm dần khi thực hiện phản ứng trong các dung môi hữu cơ như CH₃CN, MeOH và hiệu suất thu được cao nhất khi sử dụng với dung môi DMSO. Ở đây DMSO là dung môi hòa tan hesperidin hoàn toàn, đồng thời sự có mặt có của 5% tinh bột làm giảm nồng độ DMSO dẫn đến enzym hoạt động tốt hơn, dẫn đến tăng hiệu suất của phản ứng. Kết quả thu được như bảng 2 sau:

Bảng 2. Khảo sát ảnh hưởng của dung môi.

STT	Dung môi	Hiệu suất (%)
1	CH ₃ CN	10,5
2	H ₂ O	15,6
3	MeOH	20,3
4	DMSO	30,5

Theo bảng 2, hiệu suất của phản ứng với các dung môi tăng dần từ CH₃CN đến DMSO. Cụ thể là hiệu suất đạt thấp nhất khi sử dụng với dung môi là CH₃CN với hiệu suất 10,5%, và tăng lên một chút khi thay dung môi này bằng H₂O ở môi trường trung tính ổn định về độ bền của enzym, thì hiệu suất cải thiện nên đến 15,6%. Ở đây có thể do CH₃CN có khả năng hòa tan hesperidin kém, dẫn đến hiệu suất phản ứng giảm. Mặt khác khi sử dụng dung môi hữu cơ với một thời gian dài enzym rất khó có thể giữ nguyên được cấu trúc ban đầu, điều này sẽ làm giảm hoạt tính xúc tác, đồng thời giảm hiệu suất của phản ứng. Thêm vào đó, khi thay dung môi bằng MeOH thì độ tan của hesperidin có thể được cải thiện, tuy nhiên hiệu suất cũng chỉ đạt 20,3%. Theo đó việc sử dụng DMSO làm dung môi cho phản ứng có thể hòa tan được hoàn toàn hesperidin, tuy nhiên có thể làm giảm hoạt tính của enzym, do đó chúng tôi sử dụng DMSO vừa đủ để hòa tan hoàn toàn hesperidin, đồng thời làm môi trường cho

enzym có thể hoạt động tốt nhất. Kết quả thu được được thể hiện trong bảng. Ngoài việc sử dụng làm dung môi cho phản ứng đồng thời hỗn hợp dung môi có thể làm bền được enzym, cải thiện được độ tan để làm tăng hiệu suất. Do đó chúng tôi đã thăm dò ở nồng độ DMSO 30%. Thì hiệu suất phản ứng tăng lên đáng kể đạt 30,5%, cao hơn nhiều so với việc sử dụng các dung môi còn lại. Ở đây ngoài việc DMSO là dung môi hoà tan hesperidin, nó còn có tác dụng là môi trường sống của enzym xúc tác cho phản ứng glucosyl hoá. Vì thế chúng tôi đã tiến hành sử dụng DMSO cho phản ứng. Trong khi đó độ tan của hesperidin trong phản ứng sẽ ảnh hưởng đến hiệu suất của phản ứng. Do đó việc cải thiện độ tan của hesperidin là yếu tố tiên quyết để gia tăng được độ chuyển hóa cũng như làm tăng hiệu suất thu được sản phẩm. Trong nghiên cứu này, việc thay đổi nồng độ %DMSO (trong nước) cũng được triển khai để cải thiện độ tan của hesperidin, đồng thời đảm bảo với độ bền của enzym. Bằng việc thay đổi nồng độ % DMSO (trong nước), tối ưu hoá tỉ lệ dung môi cho phản ứng chúng tôi đã tiến hành khảo sát với các tỉ lệ là 10%, 20%, 40%, 60% và 80% DMSO (trong nước). Kết quả khảo sát được thể hiện theo bảng 3 sau:

Bảng 3. Khảo sát nồng độ dung môi DMSO.

STT	Nồng độ DMSO (%)	Hiệu suất (%)
2	10	30,4
3	20	40,6
4	30	30,5
5	40	20,8
6	60	10,3

Theo bảng trên khi khảo sát với nồng độ DMSO từ 30% xuống 10%. Nhìn vào bảng chúng ta thấy hiệu suất phản ứng tăng dần theo nồng độ từ 10-20% của DMSO, hiệu suất tăng dần từ 30,4% ở nồng độ 10% DMSO đến 40,6% ở nồng độ 20% và giảm dần xuống còn 30,5% khi dùng ở nồng độ 30% DMSO. Và tiếp tục giảm chỉ còn 20,8% khi tăng nồng độ DMSO lên đến 40%. Thêm vào đó, hiệu suất tiếp tục bị giảm xuống khá thấp chỉ còn 10,3% khi thời gian phản ứng ở 8 h với nồng độ DMSO 60%. Mặt khác trong các nghiên cứu về hoạt tính của enzym CGTase khi giảm nồng độ DMSO thì hiệu suất phản ứng tăng lên khá cao, điều này có thể liên quan đến sự phá hủy cấu trúc của enzym. Ở đây có thể thấy ở nồng độ DMSO 20% đã đạt được

sự cân bằng giữa độ bền của enzym, ở nồng độ này enzym bền hơn dẫn đến hoạt hoá phản ứng tốt hơn, có thể hoà tan được DMSO cũng có thể làm ổn định xúc tác làm tăng hiệu suất của phản ứng. Do đó dung môi DMSO 20% được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Trong khi đó hầu hết các nghiên cứu trên thế giới đều chỉ ra khoảng pH tối ưu cho enzym CGTase hoạt động, và có khả năng hoạt động ở pH khoảng 5,0 đến 8,0. Ví dụ, độ pH tối ưu cho CGTase có nguồn gốc từ *Bacillus macerans* là pH 5,220 [9], *Bacillus stearothermophilus* (pH 6,0) [10] và *Bacillus subtilis* (pH 8,0) [11]. Ngoài ra có rất ít tài liệu nói về việc sử dụng CGTase ở pH ở môi trường acid mạnh và kiềm mạnh, ngoại trừ một số enzym từ *Bacillus sp.* ATCC21783 (pH 4,0) và *Bacillus* ưa kiềm (pH 10) [12]. Do đó để tìm được điều kiện tối ưu cho phản ứng, chúng tôi đã khảo sát ở khoảng pH rộng, để làm tăng độ tan của hesperidin. Ngoài ra pH của phản ứng là một yếu tố lớn ảnh hưởng quan trọng đến hoạt động xúc tác của enzym. Do đó chúng tôi đã sử dụng pH từ 4 -10. Kết quả được thể hiện trong bảng sau:

Bảng 4. Khảo sát ảnh hưởng của pH đến hiệu suất .

STT	pH phản ứng	Hiệu suất (%)
1	5-6	25,3
2	6-7	30,6
3	7-8	40,6
4	8-9	30,2
5	9-10	30,1
6	>10	18,3

Nhìn vào bảng 4 trên ta thấy độ pH ảnh hưởng lớn đến hiệu suất của phản ứng, trong khi phản ứng sử dụng enzym làm xúc tác thì pH vừa đóng vai trò ảnh hưởng đến độ bền của enzym vừa có tác dụng đến việc hoà tan chất đầu hesperidin. Theo đó khi pH đạt từ 5-6 thì hiệu suất cũng chỉ đạt 25,3% thấp hơn nhiều so với việc sử dụng pH ở 6-7 là 30,6%. Ở đây có thể khi thực hiện ở pH thấp, khả năng tan của hesperidin kém hơn, điều này thể hiện rõ hơn khi tăng pH của phản ứng lên từ hai khoảng 6-7 đến 7-8 thì hiệu suất của phản ứng cũng tăng lên đáng kể từ 30,6% đến 40,6%, có thể ở điều kiện pH cao hesperidin được cải thiện độ tan, do đó đã làm tăng hiệu suất của

phản ứng. Vì thế tiếp tục nâng pH của phản ứng lên 8-9, thì hiệu suất phản ứng giảm xuống chỉ còn 30,2%, và tiếp tục giảm xuống khi pH >10 hiệu suất chỉ còn 18,3%. Như vậy độ pH của phản ứng phù hợp nhất là pH 7-8, các điều kiện khác như môi trường acid hoặc base có thể sẽ làm độ tan của hesperidin kém đi hoặc làm giảm độ bền của enzym ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng.

Bảng 5. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất phản ứng.

STT	Nhiệt độ phản ứng (°C)	Hiệu suất (%)
1	25-30	20,3
2	35-40	40,6
3	45-50	50,2
4	55-60	57,6
5	70-75	56,5

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến phản ứng, kết quả được thể hiện như bảng 5. Theo bảng trên thì nhiệt độ khảo sát của phản ứng được thực hiện trong khoảng 40-60°C, do nhiệt độ của phản ứng ảnh hưởng đến độ bền của xúc tác enzym, có thể dẫn đến enzym bị đứt gãy cấu trúc làm mất đi hoạt tính xúc tác. Do đó, phản ứng được khảo sát ở nhiệt độ tăng dần để đảm bảo độ bền của enzym. Theo đó hầu hết ở các nhiệt độ khảo sát hiệu suất đạt từ 20,3% đến 57,6%. Cụ thể khi tiến hành phản ứng ở nhiệt độ thường 25-30°C, thì hiệu suất chỉ đạt 20,3%, có thể do nhiệt độ thấp enzym hoạt động kém dẫn đến khả năng xúc tác cho phản ứng giảm. Do đó tiếp tục tăng nhiệt độ lên 35-40°C thì hiệu suất thu được tăng lên đáng kể đạt 40,6%. Và hiệu suất tiếp tục tăng lên 50,2% khi nhiệt độ của phản ứng trong khoảng 45-50°C và đạt cao nhất 57,6% khi phản ứng ở nhiệt độ 55-60°C. Tiếp tục tăng nhiệt độ của phản ứng lên 70-75°C thì hiệu suất thu được chỉ đạt 56,5%. Điều này có thể khi tăng nhiệt độ enzym mất khả năng hoạt hoá do cấu trúc bị đứt gãy, dẫn đến giảm khả năng xúc tác. Kết quả khảo sát cũng phù hợp với các báo cáo trước đó về nhiệt độ phản ứng tối ưu khi sử dụng enzym CGTase trong khoảng từ 40-60°C. Do đó chúng tôi lựa chọn nhiệt độ phản ứng ở 55-60°C cho những khảo sát tiếp theo.

Bảng 6. Ảnh hưởng của tác nhân glucosid đến hiệu suất phản ứng

STT	Tác nhân cho glucosid	Hiệu suất (%)
1	Tinh bột	60,7
2	β -cyclodextrin	57,6

Tác nhân glucosyl trong phản ứng là một yếu tố quan trọng trong phản ứng gắn glucose vào phân tử hesperidin. Trong đó enzym CGTase được sử dụng phổ biến cho phản ứng dẫn đến xảy ra rất nhiều quá trình tương tác giữa tác nhân glucosyl với hesperidin. Ở đây hai tác nhân phổ biến được sử dụng là tinh bột 5% và β -cyclodextrin 5%. Kết quả cho thấy đối với tinh bột 5%, thu được hiệu suất sản phẩm α -glucosyl hesperidin là 60,7%, cao hơn so với khi sử dụng β -cyclodextrin là 57,6%. Thêm vào đó khi sử dụng tác nhân β -cyclodextrin phản ứng sinh ra các tạp chất có thể là thể *di*, *tri-glucosyl* (điều này có thể quan sát trên TLC và HPLC) cao hơn so với sử dụng tinh bột 5%. Điều này có thể do β -cyclodextrin có độ bền cao, khó bị thủy phân hơn tinh bột ở điều kiện 20% DMSO (trong nước). Do đó với các khảo sát tiếp theo chúng tôi sử dụng tinh bột làm tác nhân glucosyl hoá.

Bảng 7. Ảnh hưởng của enzym đến hiệu suất phản ứng.

STT	Lượng enzym (IU/ml)	Hiệu suất (%)
1	90	65,7
2	45	65,3
3	22,5	64,3
4	11,2	40,2
5	5,3	20,7

Để khảo sát ảnh hưởng của enzym đến hiệu suất phản ứng chúng tôi khảo sát với nồng độ enzym giảm dần từ 90 IU/ml xuống 5,3 IU/ml, thể tích với mỗi nồng độ khảo sát là 0,02 ml. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của enzym đến hiệu suất của phản ứng được chỉ ra trong bảng 7, theo đó hoạt độ của enzym ảnh hưởng đến độ chuyển hoá của phản ứng, ở đây khi sử dụng với lượng enzym là 90 IU/ml thì hiệu suất của phản ứng thu được đạt cao nhất 65,7%. Mặt khác quá trình theo dõi phản ứng cho thấy, ngoài sản phẩm phản ứng là α -glucosyl-hesperidin thì còn có các chất phân cực khác được sinh ra có thể là *di*, *tri-glucosyl* vào các vị trí OH khác nhau của hesperidin, làm giảm độ tinh khiết của sản phẩm, mặc dù độ chuyển hoá của phản ứng khá cao.

Hơn nữa, hiệu suất thu được tương tự với việc khi giảm hoạt độ enzym xuống còn 45 IU/ml. Tiếp tục giảm hoạt độ của enzym xuống còn 22,5 IU/ml, thì hiệu suất phản ứng thu được cũng gần tương đương là 64,3%. Thêm vào đó, khi giảm hoạt độ của enzym xuống còn 11,2 IU/ml thì hiệu suất thu được chỉ đạt 40,2%, và kết quả thể hiện rõ ràng hơn khi tiếp tục giảm nồng độ xuống 5,3 IU/ml thì hiệu suất thu được chỉ còn 20,7%.

Như vậy khi sử dụng nồng độ enzym trong khoảng 22,5-90 IU/ml, thì hiệu suất phản ứng tăng mạnh, bên cạnh đó khả năng tạo thành các sản phẩm phụ như sản phẩm thể *di*, *tri*-glucosyl sẽ được tạo ra và ảnh hưởng đến hiệu suất của phản ứng. Trái lại, khi giảm nồng độ của enzym xuống từ 11,2 IU/ml và 5,3 IU/ml thì hiệu suất phản ứng giảm rõ rệt, ở đây có thể nồng độ enzym quá thấp khó có thể chuyển hoá sang glucosyl hesperidin cùng với α -glucosyl hesperidin. Do đó chúng tôi sử dụng lượng enzym là 22,5 IU/ml cho các khảo sát tiếp theo.

Bảng 8. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất phản ứng.

STT	Thời gian phản ứng (h)	Hiệu suất (%)
1	3	25,5
2	6	40,8
3	8	65,3
4	10	55,3
5	24	20,5

Dựa vào số liệu bảng 8 thì thời gian phản ứng ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng, theo đó khi khảo sát với thời gian là 3 h, ở nhiệt độ 55-60°C, thì hiệu suất phản ứng chỉ đạt 25,5%. Tiếp tục tăng thời gian phản ứng lên 6 h thì hiệu suất thu được tăng lên gấp đôi đạt 40,8 %. Ngoài ra sự khác biệt về thời gian còn thể hiện rõ hơn khi tăng thời gian lên 8 h, thì hiệu suất đạt khá cao 65,3%. Bên cạnh đó, khi tăng thời gian lên 10 h thì hiệu suất của phản ứng giảm đáng kể chỉ còn 55,3%, điều này có thể do khi tăng thời gian thì enzym có thể sẽ hoạt hoá tiếp tục sản phẩm α -glucosyl hesperidin thành thể *di*, *tri*-glucosyl (theo dõi phản ứng bằng TLC và HPLC), dẫn đến giảm hiệu suất của phản ứng. Để làm rõ điều này chúng tôi tiếp tục tăng thời gian phản ứng lên 24 h thì hiệu suất phản ứng lúc này chỉ còn 20,5%, có thể do kéo dài thời gian phản ứng lượng enzym có thể tiếp tục xúc tác cho quá trình chuyển hoá gần

đường tiếp theo vào sản phẩm tạo thành thể *di*, *tri*-glucosyl hoặc thể các đường vào các vị trí nhóm OH còn lại của hesperidin hoặc α -glucosyl hesperidin. Do đó, từ các điều kiện khảo sát trên chúng tôi đã lựa chọn thời gian cho phản ứng là 8 h, và tiến hành thực hiện phản ứng ở quy mô 1 g/mẻ.

3.3. Quy trình tổng hợp α -glucosyl hesperidin ở quy mô 1 g/mẻ phản ứng

Hesperidin (1 g), được hoà tan vừa đủ 0,3 ml DMSO, sử dụng với tác nhân glucosyl hoá là hồ tinh bột 5% (1 g). Tiếp tục thêm vào đó enzym CGTase 22,5 IU (0,04 ml), phản ứng được gia nhiệt lên đến trong khoảng 55-60°C, trong thời gian 8 h. Quá trình phản ứng được kiểm soát bằng TLC với hệ dung môi EtOAc:CH₃COOH:H₂O (3:1:1, v/v/v) ở UV₂₅₄ nm và đốt nóng với thuốc thử H₂SO₄ 10%. Kết thúc phản ứng lọc loại bỏ phần chất rắn không tan trong hỗn hợp. Phần dịch thu được được cô cạn dung môi dưới áp suất giảm (áp suất 10-20 mbar, nhiệt độ 50 °C), thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp sắc kí cột D101, với hệ dung môi gradient H₂O:EtOH từ 0% EtOH, 10% EtOH, 20% EtOH, 30% EtOH, 50% EtOH thu được các phân đoạn khác nhau, trong đó phân đoạn 20% EtOH và 30% EtOH chứa α -glucosyl hesperidin, cô cạn dung môi dưới áp suất giảm (áp suất 10-20 mbar, nhiệt độ 50°C), thu được 0,82 g sản phẩm. Hiệu suất phản ứng 65,3%. Độ tinh khiết 83,4% diện tích pic trên HPLC.

Như vậy, đề tài đã nghiên cứu được quy trình tổng hợp α -glucosyl hesperidin với độ tinh khiết cao và hiệu suất khá. Trong khi hầu hết các quy trình trên thế giới đều nghiên cứu tổng hợp hỗn hợp hesperidin glucosyl mà chưa đưa ra được quy trình điều chế α -glucosyl hesperidin tinh khiết. Thêm vào đó, việc lựa chọn nồng độ DMSO 20% là yếu tố phù hợp nhất cho phản ứng tạo liên kết glucosid. Ngoài ra quá trình tinh chế đã sử dụng nhựa D101, hệ dung môi rửa giải EtOH:H₂O để thay thế cho việc sử dụng các phương pháp tinh chế khác như sephadex LH-20, Amberlit XAD-16 [4] trong các nghiên cứu trước đây cũng là một phương pháp tinh chế hiệu quả kinh tế phù hợp với đối tượng α -glucosyl hesperidin. Vì thế đây là những kết quả khả quan của đề tài có thể được áp dụng ở quy mô lớn hơn.

4. Kết luận

Từ nguyên liệu đầu là hesperidin chúng tôi đã tổng hợp thành công α -glucosyl hesperidin bằng cách sử dụng enzym CGTase ở nồng độ 22,5 IU/ml và tinh bột 5%

(w/v), trong điều kiện nhiệt độ 55-60°C và thời gian phản ứng 8 h thu được hiệu suất 65,3%. Quy trình cho độ ổn định và hiệu suất khá, có thể nâng quy mô phản ứng lớn hơn. Vì thế, với những kết quả nghiên cứu của đề tài, cần tiếp tục nghiên cứu tối ưu hóa quy trình để nâng cao được hiệu suất và độ tinh khiết của sản phẩm, để có thể áp dụng sản xuất ở quy mô lớn tận dụng được nguồn nguyên liệu hesperidin trong nước, đồng thời đáp ứng được nguồn nguyên liệu hóa dược trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ đề tài khoa học công nghệ cấp Viện Dược liệu (NIMM), Mã số đề tài 01/2025/HĐ-NV-CNCX. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. M.K. Samota, M. Kaur, M. Sharma, et al. (2023), Hesperidin from citrus peel waste: extraction and its health implications, *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 15(2), pp. 71-99. DOI: 10.15586/qas.v15i2.1256.
- [2]. K. Pyrzynska, 2022, Hesperidin: a review on extraction methods, stability and biological activities. *Nutrients*, 14 (12), 2387. DOI: 10.3390/nu14122387.
- [3]. D. Trivedi, R.J. Roja, E. Künnemann, 2024, The advantages of the alpha-glycosylated form of hesperidin, increased bioavailability and beneficial effects for human health, *International Journal of Biomed Research*, 3(3), DOI:10.31579/2834-5029/043.
- [4]. T. Kometani, Y. Terada, T. Nisimuda, H. Takii, S. Okada, 1995, Synthesis of hesperidin glycosides by cyclodextrin glucanotransferase and stabilization of the natural Pigments. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 42(5): pp. 376-382.
- [5]. T. Chaisin, P. Rudeekulthamrong, J. Kaulpiboon, 2021, Enzymatic synthesis, structural analysis, and evaluation of antibacterial activity and α -glucosidase inhibition of hesperidin glycosides, *Journal of Catalysts*, 11(5): p. 532. DOI: 10.3390/catal11050532.
- [6]. H. Hijiya, T. Miyake, 1997, *α -glycosyl hesperidin and its uses*, US005627157A (in USA).

[7]. T. Miyake, T. Yumotoo, 1999, *Enzyme-treated hesperidin, process for producing the same and method of using enzyme-treated hesperidin*, US5885969A (in USA).

[8]. P.T. Hien, H.X. Thai, N.M. Thai, N.H. Binh, N.V. Giang, N.D. Huy, N. V. Hai, Đ.N.S. Huyen, 2025, Study on hesperidin extraction from orange peel by roducts, *Cantho Journal of Medicine and Pharmacy*, 86, pp 15-20, DOI: 10.58490/ctump.2025i86.3326.

[9]. E.B Tilden, C.S Hudson, 1942, Preparation and properties of the amylases produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa*, *Journal of Bacteriology*, 43(4), p 527-544, DOI: 10.1128/jb.43.4.527-544.1942.

[10]. S. Hashizume, T. Sekiguchi, Y. Nosoh, 1976, Effect of temperature on the viability of *Bacillus stearothermophilus*, *Journal of Archives of Microbiology*, 107(1), pp. 75-80. DOI: 10.1007/BF00427870.

[11]. J.C. Wilks, R.D. Kitko, S.H. Cleeton, G.E. Lee, C.S. Ugwu, B.D. Jones, S.S. BonDurant, J.L. Slonczewski, 2009, *Acid and base stress and transcriptomic responses in Bacillus subtilis*, 75(4), pp. 981-990, DOI: 10.1128/AEM.01652-08.

[12]. N.Jamil, R.C. Man S.M. Shaarani, S.Z. Sulaiman, S.K.A. Mudalip, Z.I.M. Arshad, 2017, Characterization of α -Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus licheniformis*, *Indian Journal of Science and Technology*, 10(7), pp. 1-5, DOI: 10.17485/ijst/2017/v10i7/111220.