



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027067

(51)<sup>7</sup> C12Q 1/68; A61K 36/47

(13) B

(21) 1-2018-05312

(22) 28/11/2018

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/04/2019 373A

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

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

(72) Nguyễn Mạnh Cường (VN); Trần Thu Hương (VN); Tô Đạo Cường (VN); Phạm Ngọc Khanh (VN); Đỗ Thị Thảo (VN).

(54) QUY TRÌNH CHIẾT HỖN HỢP POLYPHENOL CÓ TÁC DỤNG CHỐNG OXY HÓA VÀ BẢO VỆ GAN TỪ QUẢ ME RỪNG

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp polyphenol có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan từ quả Me rừng (*Phyllanthus emblica*). Bằng cách kết hợp hệ dung môi Tween 80 với nồng độ từ 5 đến 10% với kỹ thuật chiết siêu âm, quy trình theo sáng chế đã chiết được các hỗn hợp polyphenol có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan. Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp polyphenol có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan từ quả Me rừng. Quy trình theo sáng chế cho phép phát triển được dược phẩm và thực phẩm chức năng từ quả Me rừng.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ hóa sinh và các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp polyphenol từ quả Me rừng (*Phyllanthus emblica*) và hỗn hợp thu được từ quy trình này có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan để sản xuất sản phẩm chống oxy hóa và bảo vệ gan.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), trong số các 10 bệnh nguy hiểm nhất thì các bệnh về gan gây tỷ lệ tử vong cho con người chỉ đứng thứ 3 sau các bệnh về tim mạch và ung thư. Điều này rất nguy hiểm vì gan là một trong những cơ quan quan trọng nhất đóng vai trò sống còn trong cơ thể con người, là nơi dự trữ năng lượng, chuyển hóa các chất, tổng hợp protein, cô định các hormon, thuốc, các độc chất, vi khuẩn, v/v. Trong đó viêm gan là nguyên nhân hàng đầu gây xơ gan, ung thư gan. Nước ta hiện có khoảng 8 triệu người đang trong tình trạng viêm gan mãn tính, xơ gan và ung thư gan. Ngoài viêm gan thì có một căn bệnh cũng gây tổn thương gan, đó là gan nhiễm mỡ. Khi lượng mỡ thừa trong cơ thể tích tụ lại ở gan vượt quá giới hạn bình thường, đến một ngưỡng nào đó sẽ phát triển thành viêm gan, xơ gan, ung thư gan nếu không được ngăn chặn kịp thời.

Việc tìm kiếm các nguồn dược liệu thay thế từ nguồn thảo dược đã được quan tâm nghiên cứu. Đối với quả Me rừng (*Phyllanthus emblica* L. hoặc *Emblica officinalis*) đã có công bố (Hiroyuki, K., Kenji, M., Yutaka, A., Taiji, O. Lipid peroxidation inhibitor comprising one or more plant extract of *Emblica officinalis* (*Phyllanthus emblica*), *Terminalia chebula* and *Terminalia belerica* (*Terminalia bellirica*), JP 04069343 A). Trong tài liệu này, các tác giả đã phát hiện ra khả năng chống oxy hóa của thành phần dịch chiết từ quả Me rừng, tuy nhiên, khả năng chống oxy hóa thấp.

Quả Me rừng được cho là có các tác dụng thúc đẩy cơ thể hấp thụ canxi, ngăn chuột rút trong kỳ kinh nguyệt, chữa tiểu đường, tăng cường tiêu hóa và điều trị bệnh cao huyết áp (Gaire, B. P., Subedi, L. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Phyllanthus emblica* Linn. *Chin J Integr Med*, 2014). Trong y học dân tộc, quả Me rừng còn được sử dụng như một phương thuốc để hạ sốt, hỗ trợ điều trị rối

loạn gan, khó tiêu, thiếu máu, các vấn đề tiết niệu, hô hấp khó khăn, lợi tiểu, chống nhiễm trùng, tăng cường hệ miễn dịch, chống lão hóa da, cải thiện sự thèm ăn đồng thời giúp tăng cân lành mạnh.

Trong các công bố đã biết, phương pháp chiết chủ yếu sử dụng các hệ dung môi hexan, cloroform, etyl axetat, axeton, metanol, etanol bằng cách ngâm, chiết hồi lưu, chiết soxhlet hoặc chiết siêu tới hạn. Tuy nhiên, các phương pháp chiết này có nhược điểm là tốn năng lượng, thời gian chiết kéo dài và sử dụng dung môi độc hại để chiết. Hệ số thu hồi các hoạt chất không cao, các phương pháp chiết này thường chiết và sử dụng từng hoạt chất riêng rẽ với hệ số chiết thấp, khó áp dụng để phát triển thành nguồn dược liệu.

Các tác giả đã nghiên cứu và nhận thấy rằng, trong số khoảng 70 hợp chất, các hoạt chất của cây Me rừng tập trung chủ yếu ở các thành phần polyphenol, các thành phần này khi chiết bằng các dung môi, ví dụ etyl axetat, axeton, metanol, etanol trong thời gian dài sẽ bị biến đổi tạo nên các hợp chất chuyển hóa khác, điều này không những ảnh hưởng đến hiệu suất chiết mà còn tác động lớn đến tác dụng sinh học của hỗn hợp thu được. Ngoài ra, trong các nghiên cứu trên cho thấy, trong thử nghiệm các hoạt chất tinh khiết, tác dụng chống oxy hóa không cao.

Trong những năm gần đây, có một số công bố liên quan đến tác dụng của các chất hoạt động bề mặt, cụ thể là ảnh hưởng của sức căng bề mặt của các dung môi chiết ảnh hưởng lớn đến tác dụng sinh học của các hợp chất polyphenol từ dược liệu. Ví dụ, trong quá trình nghiên cứu chiết xuất tổng polyphenol từ loài táo ở Iran, chất hoạt động bề mặt Brij35 được chứng minh có hiệu suất chiết và hàm lượng tổng polyphenol cao có khả năng chống oxy hóa tốt hơn phương pháp chiết bằng dung môi metanol thông thường (Reza Hosseinzadeh, *Plos one*, 2013, 8, 1–7). Trong một số công bố cho thấy ảnh hưởng của dung môi đối với hoạt tính sinh học của polyphenol từ táo đỏ, chanh, xoài. Kết quả cho thấy chất hoạt động bề mặt Brij-58, Triton X-114 cho hiệu suất chiết cao hơn hẳn các dung môi thông thường, và đặc biệt không làm mất hoạt tính sinh học của hoạt chất được chiết. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu cải tiến hệ dung môi để chiết nhóm hợp chất polyphenol từ quả Me rừng.

Do đó, cần có phương pháp chiết với hệ dung môi cải tiến có khả năng chiết đặc hiệu các polyphenol của quả Me rừng có tác dụng sinh học là chống oxy hóa và bảo vệ gan để có thể phát triển thành nguồn nguyên liệu phục vụ phát triển thực phẩm chức năng hoặc dược phẩm.

### Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là sáng chế đề xuất quy trình chiết hỗn hợp polyphenol có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan từ quả Me rừng (*Phyllanthus emblica*) và hỗn hợp polyphenol có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp polyphenol có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan từ quả Me rừng, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hái quả Me rừng (*Phyllanthus emblica*), sau khi rửa sạch bằng nước cất, loại bỏ tạp chất, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C và nghiền quả thành bột;

b) chiết bột quả Me rừng bằng cách bổ sung bột thu được ở bước a) vào dung môi Tween 80 nồng độ từ 5 đến 10% theo tỷ lệ 1/30 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 20 đến 40 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C;

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

d) thu hỗn hợp polyphenol bằng cách loại bỏ dung môi trên thiết bị ly tâm cất quay đến khối lượng không đổi thu được hỗn hợp polyphenol chứa bảy hoạt chất bao gồm axit mucic gallat, axit mucic lactone gallat, galloylglucoza, axit gallic, axit mucic dimetyl este gallat, axit mucic lacton etyl este gallat và quercetin có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan ở dạng bột màu nâu.

Theo một phương án ưu tiên của quy trình theo sáng chế, trong đó nhiệt độ chiết được thực hiện ở 50°C với dung môi chiết là Tween 80 nồng độ 10% trong điều kiện siêu âm.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hỗn hợp polyphenol có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan thu được từ quy trình theo sáng chế, trong đó hỗn hợp này chứa bảy hoạt chất bao gồm: axit mucic gallat, axit mucic lactone gallat, galloylglucoza, axit gallic, axit mucic dimetyl este gallat, axit mucic lacton etyl este gallat và quercetin.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hàm lượng polyphenol là 321,60 mg/g hỗn hợp khô.

Hỗn hợp polyphenol thu được từ quy trình theo sáng chế thích hợp sử dụng để sản xuất được phẩm hoặc thực phẩm chức năng để chống oxy hóa và bảo vệ gan.

### Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Sắc ký đồ hỗn hợp polyphenol thu được sau khi phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối khối phổ/khối phổ (HPLC/MS/MS) tại bước sóng  $\lambda = 254$  nm.

### Mô tả chi tiết sáng chế

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

Cây Me rừng có tên khoa học là *Phyllanthus emblica* L. thuộc họ thầu dầu Euphorbiaceae., cây Me rừng còn có tên gọi là Mắc Kham, Chùm ruột núi, Mận rừng, Dur cam tử, Điều cam, Xi la liên. Cây Me rừng mọc nhiều ở vùng nhiệt đới (Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Y học, 2004, 695- 696). Quả Me rừng được sử dụng làm nguyên liệu theo sáng chế là quả tươi, được thu hái khi quả chín.

Sáng chế đề xuất quy trình chiết hỗn hợp polyphenol có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan từ quả Me rừng (*Phyllanthus emblica* L.) và hỗn hợp polyphenol có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp polyphenol có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan từ quả Me rừng (*Phyllanthus emblica* L.), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết bột quả Me rừng; c) thu dịch chiết; và d) thu hỗn hợp polyphenol.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, quả Me rừng (*Phyllanthus emblica* L.), được thu hái, sau khi rửa sạch bằng nước cất, loại bỏ tạp chất, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C và nghiền quả thành bột. Bột quả có màu vàng, mùi thơm, vị chua. Nhiệt độ sấy quả Me rừng không được vượt quá 60°C vì nếu nhiệt độ quá cao, các hợp chất polyphenol có trong quả sẽ bị phân hủy.

Trong bước chiết bột quả Me rừng, quá trình chiết này được thực hiện với hệ dung môi Tween 80. Theo sáng chế, bằng cách sử dụng hệ dung môi Tween 80 với

nồng độ tối ưu, các thành phần polyphenol thu được có hoạt tính sinh học. Mặc dù việc chiết này có thể sử dụng các hệ dung môi như etyl axetat, etanol, metanol để chiết, tuy nhiên, bất ngờ là với hệ dung môi, ví dụ etanol, mặc dù tỷ lệ chiết các hợp chất polyphenol tổng số cao, nhưng hoạt tính sinh học lại thấp. Ngược lại, với hệ dung môi etyl axetat, hiệu suất chiết các hợp chất polyphenol lại rất thấp, chỉ đạt 2,2%.

Theo đó, các tác giả đã nghiên cứu vào phát hiện ra rằng, một số hợp chất polyphenol sẽ bị biến tính nhanh nếu quá trình ngâm chiết kéo dài hoặc sử dụng các dung môi có hệ số phân cực khác biệt. Khi đó lượng polyphenol thu được sẽ giảm và tăng lượng các hợp chất không mong muốn khác. Hay nói cách khác, ví dụ, với dung môi etanol 90°, lượng polyphenol thu được có thể lớn, nhưng các thành phần có hoạt tính lại giảm. Hay nói cách khác, khi đó quá trình chiết là không đặc hiệu.

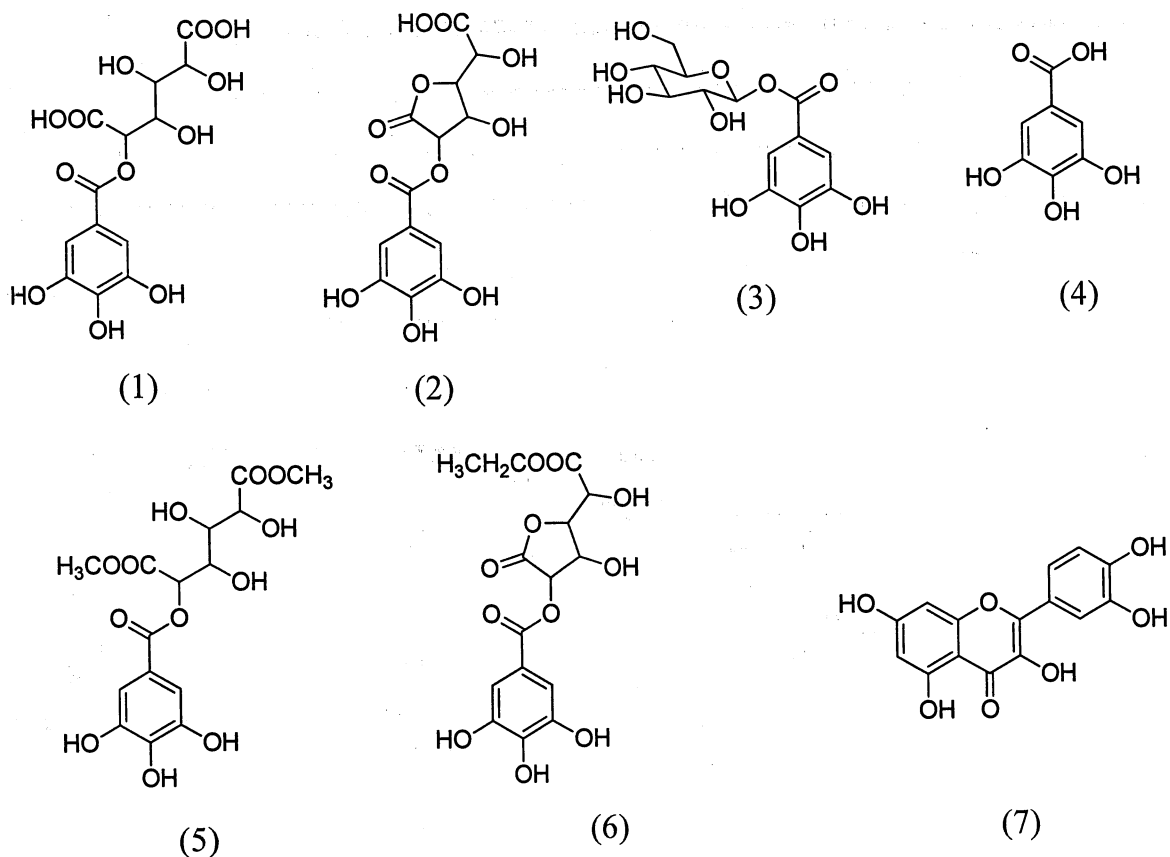
Các tác giả bất ngờ phát hiện ra rằng, bằng cách cải tiến hệ dung môi chiết đối với bột quả Me rừng, các tác giả đã thu được hỗn hợp polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ gan. Theo đó, các tác giả thấy rằng, dung môi tối ưu để chiết các hợp chất polyphenol có trong quả Me rừng là dung môi Tween 80 nồng độ từ 5 đến 10%. Tốt hơn là dung môi Tween 80 có nồng độ, 6, 7, 8 hoặc 9%.

Tween 80 còn gọi là Poly Sorbat 80 có tên danh pháp IUPAC là polyoxyetylen (20) monoleat sorbitan. Tween 80 là một dung dịch tổng hợp tan tốt trong nước và các dung môi hữu cơ, được sử dụng như một phụ gia giúp ổn định trạng thái kem, sữa, tạo nên một lớp liên kết, pha phân tán giúp ổn định, củng cố trạng thái của sản phẩm, giảm thiểu độ tan chảy. Theo sáng chế, Tween 80 được pha với nước cất tạo dung dịch có nồng độ từ 5 đến 10% làm dung môi chiết.

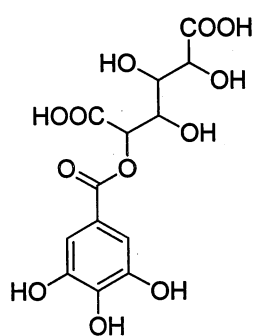
Theo đó, bột quả Me rừng được bổ sung vào hệ dung môi Tween có nồng độ từ 5 đến 10% theo tỷ lệ 1/30 (khối lượng/thể tích). Điều kiện chiết được thực hiện trong điều kiện chiết siêu âm để rút ngắn quá trình chiết và bảo vệ được các thành phần hoạt tính trong hỗn hợp chiết. Thời gian chiết siêu âm từ 20 đến 40 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C. Nhiệt độ chiết không được vượt quá 60°C vì nếu vượt quá nhiệt độ này, một số hoạt chất sẽ bị phân hủy. Tốt hơn là nhiệt độ chiết là 50°C trong điều kiện chiết với dung môi chiết là Tween 80 nồng độ 10% trong điều kiện chiết siêu âm. Điều kiện chiết siêu âm được thực hiện trong thiết bị siêu âm có công suất 180-220 W, tần số 40-60 kHz.

Trong bước thu dịch chiết, hỗn hợp chiết được ly tâm với tốc độ nằm trong khoảng từ 10.000-15.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ hoàn toàn phần cặn thu dịch chiết. Quá trình này nhằm tách phần bã và thu phần dịch chiết.

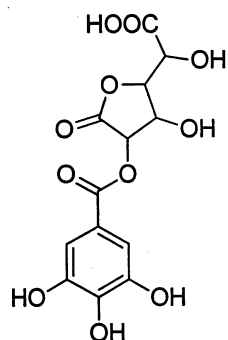
Trong bước thu hỗn hợp polyphenol, tiến hành loại bỏ dung môi chiết trên thiết bị ly tâm cất quay. Quá trình này nhằm loại bỏ dung môi, nhưng không làm biến tính thành phần hoạt chất thu được. Quá trình cô này được thực hiện đến khối lượng không đổi thu được hỗn hợp polyphenol. Hỗn hợp polyphenol này ở dạng bột màu nâu chứa bảy hoạt chất bao gồm axit mucic gallat có công thức (1), axit mucic lactone gallat có công thức (2), galloylglucoza có công thức (3), axit gallic có công thức (4), axit mucic dimetyl este gallat có công thức (5), axit mucic lacton etyl este gallat có công thức (6) và quercetin có công thức (7).



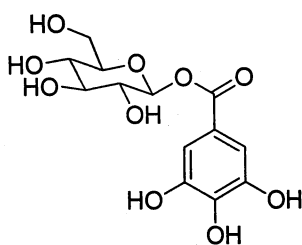
Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hỗn hợp polyphenol có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan thu được từ quy trình theo sáng chế, trong đó hỗn hợp này chứa bảy hoạt chất bao gồm: axit mucic gallat có công thức (1), axit mucic lactone gallat có công thức (2), galloylglucoza có công thức (3), axit gallic có công thức (4), axit mucic dimetyl este gallat có công thức (5), axit mucic lacton etyl este gallat có công thức (6) và quercetin có công thức (7) sau:



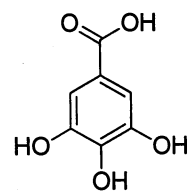
(1)



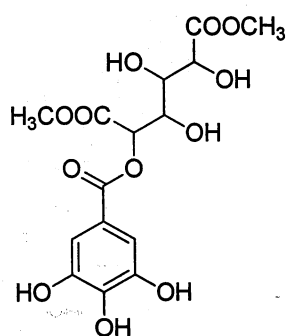
(2)



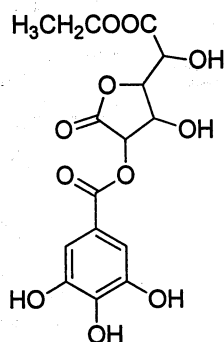
(3)



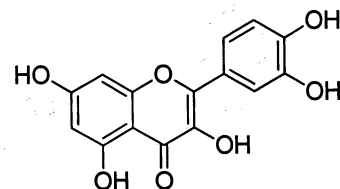
(4)



(5)



(6)



(7)

Theo một phương án ưu tiên, trong đó hàm lượng polyphenol là 321,60 mg/g hỗn hợp khô.

Hỗn hợp polyphenol thu được từ quy trình theo sáng chế thích hợp sử dụng để sản xuất dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng để chống oxy hóa và bảo vệ gan. Các thử nghiệm cho thấy hỗn hợp theo sáng chế có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan do CCl<sub>4</sub> gây ra. Các thử nghiệm cũng đã chứng tỏ hỗn hợp theo sáng chế có khả năng chống lại sự ức chế tăng trưởng tế bào HepG2 do CCl<sub>4</sub> gây ra

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

### Ví dụ thực hiện sáng chế

*Ví dụ 1: Sản xuất hỗn hợp polyphenol từ quả Me rừng (Phyllanthus emblica L.).*

Quả Me rừng (*Phyllanthus emblica* L.) được thu hái, loại bỏ tạp chất và rửa sạch bằng nước cất, sấy khô ở nhiệt độ 50°C, sau đó quả được nghiền thành bột kích thước 1-2 mm.

Phân bột quả được chuyển vào thiết bị chiết siêu âm (công suất 180-220 W và tần số 40-60 kHz), dung môi Tween 80 nồng độ 10% được bổ sung theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/30 (khối lượng/thể tích). Thời gian siêu âm 30 phút, nhiệt độ chiết 50°C. Sau khi chiết siêu âm, hỗn hợp được đem ly tâm ở tốc độ 12,000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ hoàn toàn phần cặn. Quá trình chiết siêu âm được thực hiện 3 lần.

Tiếp đó đưa dịch chiết thu được sau khi ly tâm vào thiết bị cất quay đến khi khối lượng không đổi thu hỗn hợp polyphenol (HCTN-121).

Sản phẩm được thử hoạt tính và xác định thành phần. Kết quả sắc ký đồ sau khi phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao tại bước sóng  $\lambda = 254$  nm được thể hiện trên Hình 1. Thành phần được xác định với hàm lượng polyphenol tổng là 321,60 mg/g hỗn hợp khô và chứa hai hợp chất chính có tên là axit gallic và quercetin. Kết quả thành phần hỗn hợp polyphenol được thể hiện trong bảng 1.

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

| Pic    | Thời gian lưu (phút) | Hợp chất xác định                  | Công thức phân tử (Khối lượng phân tử, MW) | Phổ khối (ESI) $[M-H]^-$ |
|--------|----------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------|
| 1<br>2 | 5,357<br>5,800       | Axit mucic gallat                  | $C_{13}H_{14}O_{12}$<br>(MW = 362)         | $[M-H]^- = 361,2$        |
| 3<br>5 | 7,503<br>9,620       | Axit mucic lactone gallat          | $C_{13}H_{12}O_{11}$<br>(MW = 344)         | $[M-H]^- = 343,2$        |
| 4      | 8,132                | Galloylglucoza                     | $C_{13}H_{16}O_{10}$<br>(MW = 332)         | $[M-H]^- = 331,2$        |
| 6      | 10,110               | Axit gallic                        | $C_7H_6O_5$<br>(MW = 170)                  | $[M-H]^- = 169,2$        |
| 7      | 10,736               | Axit mucic dimetyl este gallat     | $C_{15}H_{18}O_{12}$<br>(MW = 390)         | $[M-H]^- = 389,2$        |
| 8      | 14,470               | Axit mucic lacton etyl este gallat | $C_{15}H_{16}O_{11}$<br>(MW = 372)         | $[M-H]^- = 371,2$        |
| 11     | 20,222               | Quercetin                          | $C_{15}H_{10}O_7$<br>(MW = 302)            | $[M-H]^- = 301,2$        |

Ví dụ 2: Thử nghiệm sản xuất hỗn hợp polyphenol khác từ quả Me rừng (*Phyllanthus emblica* L.).

Để thử nghiệm hiệu suất chiết và hàm lượng hỗn hợp polyphenol thu được từ các phương pháp chiết khác nhau. Tiến hành chiết với các hệ dung môi khác nhau. Phương pháp chiết như trong Ví dụ 1. Các hệ dung môi thử nghiệm bao gồm: Tween 80, nước, etyl axetat, etanol 50°, etanol 70° và etanol 96°.

Kết quả thu được các hỗn hợp polyphenol tương ứng bao gồm hỗn hợp chiết bằng Tween 80 (HCTN-121), hỗn hợp chiết bằng etyl axetat (HCTN-122), hỗn hợp chiết bằng nước (HCTN-123) hỗn hợp chiết bằng etanol 50° (HCTN-124), hỗn hợp chiết bằng etanol 70° (HCTN-125) và hỗn hợp chiết bằng etanol 96° (HCTN-126). Kết quả về hiệu suất chiết được thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 2. Hiệu suất chiết polyphenol từ quả Me rừng bằng các hệ dung môi thử nghiệm

| Hỗn hợp chiết | Ký hiệu  | Hiệu suất chiết (%) |
|---------------|----------|---------------------|
| Tween 80      | HCTN-121 | 31,2                |
| Etyl axetat   | HCTN-122 | 2,2                 |
| Nước          | HCTN-123 | 23,4                |
| Etanol 50°    | HCTN-124 | 14,1                |
| Etanol 70°    | HCTN-125 | 29,1                |
| Etanol 96°    | HCTN-126 | 25,6                |

Kết quả Bảng 2 cho thấy 02 mẫu nghiên cứu HCTN-125 và HCTN-126 cho hiệu suất chiết khá cao (29,1 và 25,6%). Mẫu HCTN-121 khi sử dụng Tween 80 kết hợp với siêu âm cho hiệu suất chiết cao nhất, lên tới 31,2%. Mẫu HCTN-122 (chiết bằng dung môi etyl axetat) cho hiệu suất chiết thấp nhất (2,2%).

Mặc dù hai mẫu HCTN-125 và HCTN-126 cho hiệu suất chiết gần bằng HCTN-121, nhưng kiểm tra sắc ký đồ sau khi phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao tại bước sóng  $\lambda = 254$  nm cho thấy thành phần của các hỗn hợp chiết này khác nhau, cụ thể thành phần axit gallic và quercetin thấp hơn và xuất hiện các pic khác. Do đó, cần hiểu rằng, quá trình chiết bằng etanol không những hiệu suất không bằng Tween 80 mà còn đưa vào một lượng các thành phần không có tác dụng sinh học do etanol là một dung môi mạnh.

Kết quả xác định hàm lượng polyphenol tổng bằng phương pháp Folin-Ciocalteu được thể hiện trên Bảng 3. Cụ thể các bước tiến hành như sau: lấy 0,5 mL dịch chiết hoặc dung dịch axit gallic chuẩn (có nồng độ từ 0,05÷3,0 mg/mL) thêm vào 2,5 mL Folin – Ciocalteu (10%, thể tích/thể tích), lắc đều. Sau 4 phút, thêm vào 2mL dung dịch  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bão hoà, lắc đều, ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng được đo ở bước sóng 760 nm. Axit gallic được sử dụng như là chất chuẩn tham khảo và kết quả được quy tương đương theo số milligram axit gallic/1 gam hỗn hợp chiết khô.

Bảng 3. Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) của các hỗn hợp chiết từ quả Me rừng

| Hỗn hợp chiết | Ký hiệu  | TPC<br>(mg GAE/g hỗn hợp chiết) |
|---------------|----------|---------------------------------|
| Tween 80      | HCTN-121 | 321,60                          |
| Etyl axetat   | HCTN-122 | 252,21                          |
| Nước          | HCTN-123 | 204,51                          |
| Etanol 50°    | HCTN-124 | 240,83                          |
| Etanol 70°    | HCTN-125 | 279,31                          |
| Etanol 96°    | HCTN-126 | 282,87                          |

Trong các hỗn hợp thử nghiệm, HCTN-126 có hàm lượng polyphenol tổng khá cao (282,87 mg GAE/g hỗn hợp chiết), HCTN-121 (Tween 80) có hàm lượng polyphenol tổng cao nhất lên tới 321,60 mg GAE/g hỗn hợp chiết và HCTN-123 có hàm lượng polyphenol tổng thấp nhất (204,51 mg GAE/g hỗn hợp chiết). Như vậy, sử dụng Tween 80 để chiết cho phép thu được hỗn hợp polyphenol không những có hiệu suất chiết cao mà còn có hàm lượng polyphenol tổng cao vượt trội so với các dung môi chiết thông thường. Điều này cho thấy hiệu quả vượt trội của hỗn hợp thu được khi chiết bằng Tween 80 so với các dung môi thông dụng khác.

*Ví dụ 3: Xác định hoạt tính chống oxy hóa của hỗn hợp chiết từ quả Me rừng (Phyllanthus emblica L.)*

Để xác định hoạt tính chống oxy hóa của các hỗn hợp chiết từ quả Me rừng thu được từ Ví dụ 2. Tiến hành thử nghiệm theo phương pháp của P. Yuvaraj và cộng sự (Yuvaraj P, Subramoniam A, Louis T, Madhavachandran V, Narasu ML. Attenuation of expression of cytokines, oxidative stress and inflammation by hepatoprotective

phenolic acids from *Thespesia populnea* Soland ex Correa stem bark. *Annals of Phytomedicine*, 2013, 2, 47-56) có một số điều chỉnh cho phù hợp.

+ Mẫu thử được pha thành dung dịch mẹ trong DMSO, sau đó được pha loãng với nước cất khử ion thành các dải nồng độ: 100; 50; 25; 12,5 và 6,25  $\mu\text{M}$ ;

+ Axit ascorbic (đối chứng) được pha loãng với nước cất khử ion thành các dải nồng độ: 100, 50, 25; 12,5; 6,25 và 3,125  $\mu\text{M}$ ;

+ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) pha với metanol nồng độ 0,25  $\mu\text{M}$ ;

Hút mẫu nghiên cứu đã pha ở các nồng độ vào ống thủy tinh. Bổ sung dung dịch DPPH đã chuẩn bị ở trên vào các ống đã có sẵn mẫu nghiên cứu (tỉ lệ 1:1). Ống không có mẫu thử chỉ có 1mL nước và 1 mL DPPH. Tiến hành ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút rồi xác định độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng tại bước sóng 517 nm.

Vì mẫu nghiên cứu và dung dịch DPPH được đưa vào ống theo tỷ lệ 1:1, nên nồng độ mẫu nghiên cứu trong ống có DPPH sẽ giảm đi một nửa còn 50; 25; 12,5 và 6,25  $\mu\text{M}$ . Nồng độ axit ascorbic (VitC) trong ống có DPPH sẽ giảm đi một nửa còn 50, 25; 12,5; 6,25 và 3,125  $\mu\text{M}$ .

Ống có dung môi hòa mẫu nghiên cứu và dung dịch DPPH được xem là đối chứng. Ống có sử dụng axit ascorbic là chất đối chứng tham khảo.

Khả năng trung hòa gốc oxy hóa tự do (Scavenging Activities - SA) sinh ra từ DPPH của mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ SA} = (\text{OD}_{\text{đối chứng}} - \text{OD}_{\text{mẫu thử}}) * 100 / \text{OD}_{\text{đối chứng}} (\%)$$

$\text{OD}_{\text{đối chứng}}$  : Độ hấp thụ tại giếng không chứa chất thử;

$\text{OD}_{\text{mẫu thử}}$  : Độ hấp thụ tại giếng chứa chất thử.

Giá trị  $\text{SC}_{50}$  (Scavenging Concentration at 50% - nồng độ trung hòa được 50% gốc tự do của DPPH) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve2Dv4.

Bảng 4. Hoạt tính chống oxy hóa thông qua trung hòa gốc tự do bằng DPPH của các hỗn hợp chiết từ quả Me rừng

| Hỗn hợp chiết | Ký hiệu  | $\text{SC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---------------|----------|---------------------------------------|
| Tween 80      | HCTN-121 | $4,05 \pm 0,22$                       |
| Etyl axetat   | HCTN-122 | $4,45 \pm 0,45$                       |

|               |          |                 |
|---------------|----------|-----------------|
| Nước          | HCTN-123 | $6,01 \pm 0,70$ |
| Etanol 50°    | HCTN-124 | $5,16 \pm 0,51$ |
| Etanol 70°    | HCTN-125 | $4,62 \pm 0,29$ |
| Etanol 96°    | HCTN-126 | $4,17 \pm 0,46$ |
| Axit ascorbic | ĐC       | $9,34 \pm 0,72$ |

Kết quả thể hiện trên Bảng 4 cho thấy 06 mẫu nghiên cứu (HCTN-121, HCTN-122, HCTN-123, HCTN-124, HCTN-125 HCTN-126) đều thể hiện khả năng trung hòa gốc tự do bằng DPPH rất tốt với giá trị  $SC_{50}$  trong khoảng 4,05 - 6,01  $\mu\text{g/mL}$ . Cả 6 mẫu nghiên cứu đều có tác dụng chống oxy hóa mạnh hơn so với chất đối chứng tham khảo (ĐC), axit ascorbic (9,34  $\mu\text{g/mL}$ ). Trong đó, HCTN-121 có tác dụng chống oxy hóa mạnh nhất với  $SC_{50} = 4,05 \mu\text{g/mL}$ . HCTN-123 với hàm lượng polyphenol tổng thấp nhất (204,51 mg GAE/g hỗn hợp chiết) có tác dụng chống oxy hóa yếu nhất trong các mẫu thử nghiệm ( $SC_{50} = 6,01 \mu\text{g/mL}$ ). Mặc dù HCTN-126 với hàm lượng polyphenol tổng cao nhất (321,60 mg GAE/g hỗn hợp chiết), nhưng tác dụng chống oxy hóa ( $SC_{50} = 4,14 \mu\text{g/mL}$ ) kém hơn HCTN-121. Điều này cho thấy rằng, mặc dù hiệu suất chiết cao, nhưng hiệu quả tác dụng sinh học lại giảm, điều này minh chứng cho thấy tác dụng chiết đặc hiệu các hoạt chất có đặc tính chống oxy hóa của dung môi Tween 80 được sử dụng theo sáng chế.

*Ví dụ 4: Xác định khả năng ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào (thử nghiệm MDA).*

Để xác định khả năng ức chế peroxy hóa lipid, tiến hành theo theo phương pháp của Jelili A Badmus và cộng sự (Jelili A Badmus, Temitope O. Adedosu, John O. Fatoki, Victor A Adegbite, Oluwatosin A. Adarmoye and Oyeronke A Odunola. Lipid peroxidation inhibition and antiradical activities of some leaf fractions of *Mangifera indica*. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 2011, 68, 23-29) có điều chỉnh phù hợp với với điều kiện của phòng thí nghiệm. Xác định khả năng ức chế peroxy hoá lipid của mẫu nghiên cứu qua việc xác định hàm lượng malonyl dialdehyd (MDA), là sản phẩm của quá trình peroxy hoá lipid màng tế bào. MDA có khả năng phản ứng với axit thiobarbituric để tạo thành phức hợp trimethin (có màu hồng) có đỉnh hấp thụ cực đại ở  $\lambda = 532 \text{ nm}$ .

Tiến hành tách não chuột và nghiền đồng thể trong dung dịch đệm phosphat (pH = 7,4) theo tỉ lệ 1:10 ở nhiệt độ 0-4 °C. Sau đó, lấy 1mL dịch đồng thể và bổ sung 0,1

mL mẫu thử ở các nồng độ và 0,8 mL đệm phosphat bổ sung 0,1mL hệ Penton ( $\text{FeSO}_4$  0,1 mM :  $\text{H}_2\text{O}_2$  15 mM theo tỉ lệ 1:1). Sau đó, hỗn hợp được ủ ở 37 °C trong 15 phút.

Sau khi ủ, dùng phản ứng bằng 1 mL axit tricloacetic 10% và ly tâm ở 12000 vòng trong 5 phút. Thu phần dịch trong và cho phản ứng với 1 mL axit thiobarbituric 0,8 % (theo tỉ lệ 2:1). Hỗn hợp tiếp tục được ủ ở nhiệt độ 100 °C 15 phút.

Sau khi làm lạnh, tiến hành đo ở bước sóng  $\lambda = 532$  nm, sử dụng trolox làm chất đối chiếu tham khảo.

Kết quả được tính theo công thức phần trăm chống oxy hoá (HTCO) sau:

$$\text{HTCO (\%)} = [(\text{OD}_C - \text{OD}_T)/\text{OD}_C] \times 100$$

$\text{OD}_C$  : Mật độ quang học của giếng chứng không có mẫu thử;

$\text{OD}_T$  : Mật độ quang học của mẫu thử;

Giá trị  $\text{IC}_{50}$  sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve. Kết quả được thể hiện trên Bảng 5.

Bảng 5. Khả năng ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào (thử nghiệm MDA) của các cao chiết từ quả Me rừng.

| Cao chiết   | Ký hiệu  | $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-------------|----------|---------------------------------------|
| Tween 80    | HCTN-121 | $2,21 \pm 0,34$                       |
| Etyl axetat | HCTN-122 | $9,58 \pm 1,45$                       |
| Nước        | HCTN-123 | $16,11 \pm 1,19$                      |
| Etanol 50°  | HCTN-124 | $9,20 \pm 0,83$                       |
| Etanol 70°  | HCTN-125 | $2,74 \pm 0,43$                       |
| Etanol 96°  | HCTN-126 | $3,54 \pm 0,66$                       |
| Trolox      | ĐC       | $7,82 \pm 0,98$                       |

Kết quả bảng 5 cho thấy 06 mẫu nghiên cứu (HCTN-121, HCTN-122, HCTN-123, HCTN-124, HCTN-125 HCTN-126) đều có tác dụng chống oxy hóa tốt thông qua ức chế peroxy hoá lipid màng tế bào với giá trị  $\text{IC}_{50}$  trong khoảng 2,21 – 16,11  $\mu\text{g/mL}$ . Trong đó HCTN-121, HCTN-125 và HCTN-126 có tác dụng chống oxy hóa mạnh với giá trị  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là 2,21; 2,74 và 3,54  $\mu\text{g/mL}$ . Cả 3 mẫu này (HCTN-121, HCTN-122 và HCTN-126) đều có tác dụng chống oxy hóa mạnh hơn so với ĐC

(Trolox, 7,82 µg/mL). HCTN-123 với hàm lượng polyphenol tổng thấp nhất (204,51 mg GAE/g cao chiết) có tác dụng chống oxy hóa yếu nhất thông qua ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào ( $IC_{50} = 16,11 \mu\text{g/mL}$ ). HCTN-121 có tác dụng chống oxy hóa mạnh nhất thông qua ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào ( $IC_{50} = 2,21 \mu\text{g/mL}$ ) với hàm lượng polyphenol tổng cao nhất (321,60 mg GAE/g hỗn hợp chiết). Điều này cho thấy tác dụng sinh học vượt trội của hỗn hợp khi chiết bằng Tween 80 theo sáng chế so với các hỗn hợp được chiết bằng các hệ dung môi khác.

*Ví dụ 5: Xác định khả năng bảo vệ gan của các hỗn hợp polyphenol chiết từ quả Me rừng.*

Để thử nghiệm khả năng bảo vệ gan thử nghiệm được tiến hành trên dòng tế bào HepG2. Dòng tế bào này được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy DMEM với thành phần bổ sung bao gồm 2 mM L-glutamin, 10 mM HEPES, và 1,0 mM natri pyruvat và 10% huyết thanh thai bò – FBS (GIBCO) và nuôi trong tủ ẩm  $CO_2$  ở điều kiện  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $CO_2$ .

Tế bào HepG2 được nuôi trong đĩa 96 giếng với nồng độ tế bào  $3 \times 10^4$  tế bào/giếng và ủ 24 giờ ở tủ ẩm  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $CO_2$ .

Mẫu thử nghiệm được sử dụng là các mẫu hỗn hợp chiết thu được từ Ví dụ 2 được đưa vào các giếng nuôi cấy ở các nồng độ khác nhau với sự có mặt của  $CCl_4$  40 mM. Sau đó ủ đĩa thêm 2 giờ.

Xác định khả năng sinh sống của tế bào dưới tác động của  $CCl_4$  theo thử nghiệm MTT. Sau khi loại bỏ môi trường nuôi cấy, thêm 50 µL MTT (1mg/mL) vào mỗi giếng. Ủ đĩa ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$  trong 4 giờ. Màu formazal hình thành được hòa tan bằng DMSO. Đo giá trị OD ở bước sóng 540 nm.

Hiệu quả bảo vệ tế bào gan được xác định thông qua % phòng ngừa sự ức chế tăng trưởng do  $CCl_4$  gây ra theo công thức:

$$\% \text{ HQ bảo vệ} = (\text{OD}_{\text{mẫu thử} + \text{CCl}_4} - \text{OD}_{\text{CCl}_4}) / (\text{OD}_{\text{mẫu chứng}} - \text{OD}_{\text{CCl}_4}) \times 100$$

$OD_{\text{mẫu chứng}}$  là OD của giếng tế bào chỉ chứa dung môi pha mẫu;

$OD_{\text{mẫu thử} + \text{CCl}_4}$  là OD của giếng tế bào chỉ chứa hỗn hợp mẫu thử và  $CCl_4$ ;

$OD_{\text{CCl}_4}$  là OD của giếng tế bào chỉ chứa  $CCl_4$ .

Mỗi thử nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được thể hiện trên Bảng 6.

Bảng 6. Hiệu quả bảo vệ tế bào HepG2 bởi các mẫu thử nghiệm

| Nồng độ<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | % tế bào sống |          |          |          |          |          |
|---------------------------------|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                                 | HCTN-121      | HCTN-122 | HCTN-123 | HCTN-124 | HCTN-125 | HCTN-126 |
| 100                             | 96,05         | 89,67    | 110,64   | 91,49    | 99,09    | 107,60   |
| 20                              | 120,67        | 115,20   | 108,81   | 100,91   | 105,17   | 114,89   |
| 4                               | 121,58        | 116,11   | 109,73   | 99,09    | 100,91   | 108,21   |
| 0,8                             | 128,88        | 124,01   | 121,28   | 94,83    | 131,61   | 107,90   |

Qua bảng 6 chúng tôi nhận thấy ở các nồng độ nghiên cứu khác nhau, các mẫu thử nghiệm đều không thể hiện khả năng gây độc tế bào HepG2. Vì vậy, các nồng độ này được chúng tôi sử dụng để xác định khả năng bảo vệ tế bào gan dưới tác động của  $\text{CCl}_4$ . Nồng độ bảo vệ tế bào sống được thể hiện bằng giá trị  $\text{PC}_{50}$  (PC-Protective concentration at 50%) và kết quả thể hiện qua bảng 7.

Bảng 7. Tác dụng bảo vệ tế bào gan của các mẫu thử nghiệm khi có mặt  $\text{CCl}_4$ .

| Nồng độ<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | % tế bào sống  |                  |          |          |          |                  |                  |           |
|---------------------------------|----------------|------------------|----------|----------|----------|------------------|------------------|-----------|
|                                 | $\text{CCl}_4$ | HCTN-121         | HCTN-122 | HCTN-123 | HCTN-124 | HCTN-125         | HCTN-126         | Silymarin |
| 100                             |                | 61,55            | 45,14    | 47,11    | 46,66    | 54,26            | 56,99            | 36,32     |
| 20                              |                | 42,71            | 39,82    | 35,41    | 37,99    | 43,16            | 41,79            | 31,76     |
| 4                               |                | 35,56            | 36,78    | 33,13    | 31,00    | 32,52            | 33,28            | 28,27     |
| 0,8                             |                | 34,95            | 35,56    | 30,70    | 30,55    | 29,33            | 31,46            | 27,36     |
| 0                               | 27,89          |                  |          |          |          |                  |                  |           |
| $\text{PC}_{50}$                |                | $47,68 \pm 2,24$ | >100     | >100     | >100     | $60,14 \pm 4,09$ | $56,56 \pm 5,01$ | >100      |

Qua bảng 7 chúng tôi nhận thấy dưới tác động của  $\text{CCl}_4$ , chỉ có 27,89% tế bào HepG2 sống sót. Tuy nhiên khi có mặt của các mẫu thử, tỉ lệ tế bào HepG2 sống tăng cao ở nồng độ 100 ( $\mu\text{g/mL}$ ). Ba mẫu thử nghiệm HCTN-121, HCTN-125 và HCTN-126 có tác dụng bảo vệ gan khi có mặt  $\text{CCl}_4$  với giá trị  $\text{PC}_{50}$  lần lượt là 47,68; 60,14 và 56,56  $\mu\text{g/mL}$ . Trong đó, mẫu HTNC-121 có tác dụng bảo vệ tế bào gan mạnh nhất ( $\text{PC}_{50} = 47,68 \mu\text{g/mL}$ ) khi có mặt  $\text{CCl}_4$ . Silymarin, chất đối chứng tham khảo hầu như không có tác dụng bảo vệ gan khi có mặt  $\text{CCl}_4$  ( $\text{PC}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ). Như vậy, kết quả

từ bảng trên cho thấy ba mẫu thử nghiệm HCTN-121, HCTN-125 và HCTN-126 đều thể hiện khả năng chống lại sự ức chế tăng trưởng tế bào do  $\text{CCl}_4$  gây ra. Mặt khác, các mẫu từ HCTN-122 đến HCTN-126 có hàm lượng polyphenol tổng tương đối thấp ( $\text{TPC} = 204,51 - 282,78 \text{ mg GAE/g}$  hỗn hợp chiết) và chiết bằng các dung môi độc hại như etyl axetat và etanol nên làm giảm khả năng chống lại sự ức chế tăng trưởng tế bào do  $\text{CCl}_4$  gây ra.

Như vậy, từ những kết quả trên cho thấy Tween-80 (một chất hoạt động bề mặt được sử dụng trong thực phẩm và dược phẩm) kết hợp với siêu âm cho phép chiết được hỗn hợp polyphenol có hiệu suất cao, có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan vượt trội từ quả Me rừng.

### **Hiệu quả đạt được của sáng chế**

Quy trình chiết của sáng chế cho phép sản xuất hỗn hợp polyphenol có hoạt tính sinh học, cụ thể là có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan từ quả Me rừng (*Phyllanthus emblica*) với hiệu quả chiết cao và tác dụng sinh học vượt trội. Điều này cho phép sử dụng hỗn hợp polyphenol làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất sản phẩm có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan.

Hỗn hợp polyphenol thu được từ quy trình theo sáng chế đã được chứng minh có hoạt tính chống oxy hóa mạnh và bảo vệ gan tốt. Bằng cách sử dụng dung môi chiết Tween 80 kết hợp với siêu âm trong điều kiện chiết tối ưu, quy trình theo sáng chế cho phép thu được hỗn hợp polyphenol bao gồm 7 hoạt chất chính. Quy trình theo sáng chế mở ra khả năng thu được hỗn hợp có khả năng phối hợp với các thảo dược để sản xuất dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

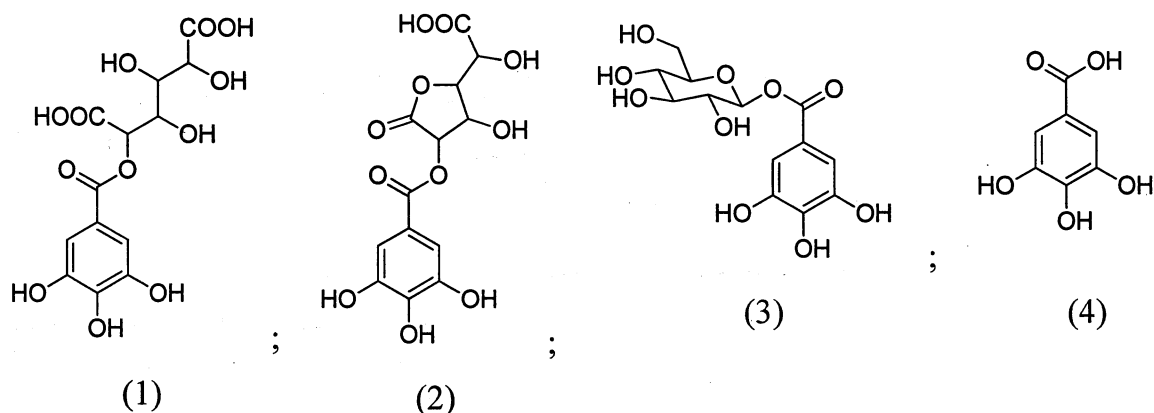
1. Quy trình chiết hỗn hợp polyphenol có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan từ quả Me rừng, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

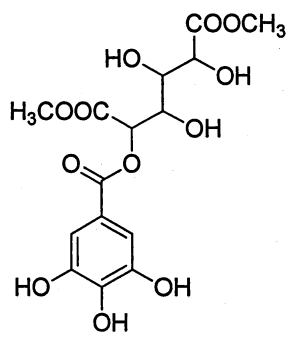
a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hái quả Me rừng (*Phyllanthus emblica* L.), sau khi rửa sạch bằng nước cất, loại bỏ tạp chất, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C và nghiền quả thành bột;

b) chiết bột quả Me rừng bằng cách bổ sung phần bột thu được ở bước a) vào dung môi Tween 80 nồng độ từ 5 đến 10% theo tỷ lệ 1/30 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết trong điều kiện siêu âm với thời gian siêu âm từ 20 đến 40 phút với nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C;

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

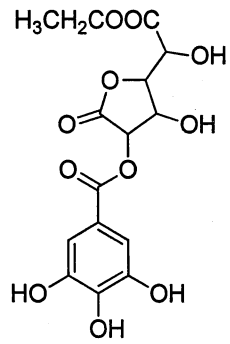
d) thu hỗn hợp polyphenol bằng cách loại bỏ dung môi trên thiết bị ly tâm cất quay đến khối lượng không đổi thu được hỗn hợp polyphenol chứa bảy hoạt chất bao gồm: axit mucic gallat có công thức (1), axit mucic lactone gallat có công thức (2), galloylglucoza có công thức (3), axit gallic có công thức (4), axit mucic dimetyl este gallat có công thức (5), axit mucic lacton etyl este gallat có công thức (6) và quercetin có công thức (7) sau:





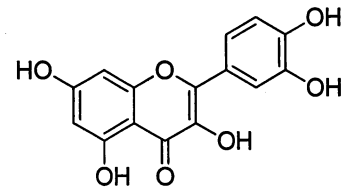
(5)

;



(6)

; và



(7)

có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan ở dạng bột màu nâu.

## HÌNH 1

