



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002872

(51)⁷ **A61K 35/00**

(13) **Y**

(21) 2-2017-00317

(22) 16/10/2017

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/04/2019 373A

(73) Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam (VN)

Số 2 Phạm Ngũ Lão, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội

(72) Lê Đăng Quang (VN); Nguyễn Thị Duyên (VN); Vũ Đình Hoàng (VN); Vũ Dũng Lê (VN).

(54) QUY TRÌNH CHẾ TẠO CAO CHIẾT TỪ LÁ CÂY MUỒNG TRÂU *CASSIA ALATA* L.
CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM VÀ KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH HẠI CÂY
TRỒNG

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chế tạo cao chiết từ cây muồng trâu (*Cassia alata* L.) có hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn gây hại cây trồng bao gồm các bước:

(i) sơ chế nguyên liệu;

(ii) chiết hồi lưu nóng thu cao chiết thô; và

(iii) chiết phân bố làm giàu cao chiết.

Quy trình thu được cao chiết etyl axetat có hoạt tính kháng nấm *Magnaporthe grisea* gây bệnh đạo ôn, nấm *Puccinia recondita* gây rỉ sắt lúa mì và nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cây ớt và kháng vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* gây bệnh đốm lá trên dưa hấu. Quy trình này đơn giản, dễ thực hiện, sản phẩm có hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh cây trồng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập tới lĩnh vực chế tạo cao chiết có hoạt tính sinh học từ thảo mộc. Cụ thể là quy trình chế tạo cao chiết từ lá cây muồng trâu *Cassia alata* L. có hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh hại cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây muồng trâu (tên khoa học *Cassia alata* L.) thuộc phân họ Vang. Cây thân thảo, có thể cao đến 3m. Lá hình trứng tằm đầu, mọc đối, xếp lại vào ban đêm. Hoa của cây màu vàng nghệ. Tại các vùng nhiệt đới loài này có thể sinh trưởng ở độ cao 1.200 m. Ở Việt Nam, loài cây này phân bố từ Thanh Hóa đến Cà Mau, Phú Quốc, tập trung từ Kon Tum, Đắk Lắk, Khánh Hòa, Lâm Đồng, Ninh Thuận, Đồng Nai, Bình Phước và ở thành phố Hồ Chí Minh. Trong đông y, muồng trâu có tính mát, có thể dùng để nhuận tràng, giải nhiệt. Lá tươi vò nát trị các bệnh nấm ngoài da, bệnh Lác đồng tiền.

Trên thế giới có nhiều công trình nghiên cứu về thành phần, hoạt tính dược học của cây muồng trâu. Tuy nhiên chưa có công trình nào nghiên cứu sử dụng nguyên liệu lá cây muồng trâu làm thuốc bảo vệ thực vật. Mặt khác kết quả sàng lọc các thực vật có hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn gây hại cây trồng của chúng tôi từ năm 2007 tới nay đã phát hiện và báo cáo nhiều đối tượng thực vật có hoạt tính phòng trừ và kháng bệnh do vi khuẩn, nấm hại cây trồng gây ra. Nhiều nghiên cứu về dịch chiết metanol của nguyên liệu hạt muồng ngủ (*Cassia tora*), muồng lá hẹp (*Cassia angustifolia*) nhận thấy có hoạt tính kháng vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* gây bệnh đốm lá, kháng nấm *Magnaporthe grisea* gây bệnh đạo ôn, *Puccinia recondita* gây rỉ sắt lá lúa mì và *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cây ớt.

Cây muồng trâu được trồng ở khu vực Bắc Giang, Lạng Sơn (Hữu Lũng) như các xã Yên Thịnh, Yên Vượng, Đồng Tân, Cai Kinh, Sơn Hà (20-30 ha) và Quang Thịnh với 4-10 hecta, canh tác ngắn ngày. Đây là vùng nguyên liệu tiềm năng để ứng dụng sản xuất trong công nghiệp.

Trên thế giới đã có một số sáng chế về các quy trình chế tạo cao chiết có tác dụng bảo vệ thực vật.

- US5662915A: Chiết từ cây *Tagetes minuta* bằng phương pháp ngâm cây vào nước trong một khoảng thời gian để tạo hỗn hợp lỏng. Hỗn hợp lỏng được hòa tan bởi các enzyme cellulolytic hoặc các sinh vật cellulolytic tạo ra hỗn hợp chiết.

- WO 2009023918A1: Sấy khô cây thanh hao hoa vàng *Artemisia annua*, sau đó ngâm nước/etanol với tỷ lệ 50:50. Tỷ lệ hỗn hợp nước/etanol : phần cây là 7:1. Ngâm và khuấy trong vòng 4-5 ngày. Dịch chiết nước/etanol được lọc qua màng và bỏ phần rắn. Dịch chiết nước/etanol được làm bay hơi dung môi để thu được cao chiết.

- US4146615A: Hoa của cây *Chrysanthellum procumbene* đã được nghiền nhỏ được chiết bằng metanol ở nhiệt độ sôi. Dịch chiết được bay hơi ở điều kiện chân không, 60°C xuống thể tích 1 lít. Sau đó thêm 1 lít nước và 1 lít trichloroethylene vào dung dịch đã cô đặc. Sau khi khuấy và chất, trichloroethylene được loại bỏ. Theo sau là ba bước loại bỏ dầu, mỗi bước sử dụng 1 lít trichloroethylene. Pha trichloroethylene được rửa bằng nước. Pha lỏng chứa metanol được cô đặc ở chân không, 60°C xuống thể tích 0,5 lít, sau đó để qua đêm. Kết tủa được lọc, hòa tan vào metanol và kết tủa bằng chloroform. Dịch chiết cuối cùng thu được dưới dạng bột có màu nâu vàng tan được trong nước với tỉ lệ khối lượng 0,2% và tan tốt trong cồn.

Bản chất của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích đề xuất quy trình chế tạo cao chiết từ lá cây muồng trâu *Cassia alata* L. có hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh hại cây trồng. Trong giải pháp này, các tác giả đề xuất quy trình chế tạo cao chiết từ lá cây muồng trâu *Cassia alata* L. có hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh hại cây trồng với quy trình đơn giản, dễ thực hiện, dung môi có thể thu hồi nên an toàn với môi trường.

Quy trình chế tạo cao chiết từ lá cây muồng trâu *Cassia alata* L. bằng quy trình ngâm chiết, làm giàu cao chiết bao gồm các bước sau:

- (i) sơ chế nguyên liệu;
- (ii) chiết hồi lưu nóng thu cao chiết thô; và
- (iii) chiết phân bố làm giàu cao chiết.

Mô tả chi tiết sáng chế

Nguyên liệu lá muồng trâu sau khi thu hái được sơ chế làm sạch. Sau đó tiến hành sấy khô ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C tới độ ẩm từ 8 đến 10%. Nghiền nhỏ nguyên liệu thành các mảnh có kích thước từ 5 đến 10mm.

Nguyên liệu lá Muồng trâu được chiết trong thiết bị chiết có lắp sinh hàn hồi lưu với dung môi metanol với tỉ lệ lá muồng trâu khô/dung môi metanol từ 1:4 đến 1:6 (khối lượng : thể tích) tại nhiệt độ từ 55 đến 65 °C trong vòng từ 5 đến 10 giờ. Sau đó, dịch chiết metanol được lọc, tách riêng khỏi phần bã. Bã chiết tiếp tục được chiết với metanol thêm 2 lần nữa. Dịch chiết metanol của 3 lần được gộp lại và cô quay hút chân không tại nhiệt độ 40 đến 50°C và áp suất trong khoảng từ 0,1 đến 0,5 atm (10,1 đến 50,5KPa), để tách loại dung môi và thu cao chiết metanol thô.

Phân tán hoàn toàn một lượng cao chiết metanol thô trong hỗn hợp nước/metanol (tỉ lệ nước/metanol là 1:4 (thể tích: thể tích) với tỉ lệ cao chiết metanol thô/ hỗn hợp nước/metanol là 1:5 đến 1:10 (khối lượng : thể tích). Sau đó, đổ hỗn hợp trên vào thiết bị chiết phân bố, cho thêm một lượng dung môi *n*-hexan bằng với thể tích hỗn hợp nước/metanol dùng để phân tán cao chiết thô, sau đó lắc hoặc khuấy đều trong thời gian từ 1 đến 2 giờ, nhiệt độ 20 đến 35 °C. Sau đó, để yên thiết bị chiết trong thời gian 1 đến 2 giờ, hỗn hợp trong thiết bị chiết sẽ phân tách thành 2 phân lớp khác nhau gồm phân lớp *n*-hexan và phân lớp metanol-nước. Phân lớp trên chứa hỗn hợp các chất kém phân cực, phân tán trong dung môi *n*-hexan, lớp dưới chứa hỗn hợp các hợp chất có độ phân cực trung bình và cao, phân tán trong metanol- nước. Tháo riêng phân lớp *n*-hexan. Phân lớp metanol-nước được chiết tương tự quy trình trên thêm 2 lần nữa với dung môi *n*-hexan. Gộp 3 lần phân lớp *n*-hexan lại, tiến hành cô quay tại nhiệt độ 50 đến 60°C và áp suất trong khoảng từ 0,1 đến 0,5 atm (10,1 đến 50,5KPa) loại hết dung môi để thu được cao chiết *n*-hexan.

Phân lớp metanol - nước được cô quay hút chân không tại nhiệt độ 50 đến 60°C và áp suất trong khoảng từ 0,1 đến 0,5 atm (10,1 đến 50,5KPa) loại hết dung môi metanol và bổ sung thêm một lượng nước bằng với thể tích metanol đã cô loại thu được phân lớp nước. Đổ phân lớp này và dung môi etyl axetat vào thiết bị chiết với tỉ lệ phân lớp nước : etyl axetat là 1:1 (thể tích : thể tích) và khuấy đều trong 1 đến 2 giờ, nhiệt độ 20 đến 35 °C. Sau một thời gian hỗn hợp phân thành 2 lớp, lớp phía trên là phân lớp etyl axetat, lớp phía dưới là phân lớp nước. Tách riêng 2 lớp được phân lớp etyl axetat và phân lớp nước. Phân lớp nước được chiết tương tự quy trình trên thêm 2 lần nữa với dung môi etyl axetat. Gộp 3 lần phân lớp etyl axetat lại và tiến hành cô quay phân lớp etyl axetat tại nhiệt độ 50 đến 60°C và áp suất trong khoảng từ 0,1 đến 0,5 atm (10,1 đến 50,5KPa) để thu hồi dung môi và thu cao chiết etyl axetat.

Ví dụ thực hiện sáng chế:

Sau đây là một số ví dụ minh họa quy trình chế tạo cao chiết từ lá cây muồng trâu có hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh hại cây trồng. Những ví dụ này chỉ có mục đích minh họa mà không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1:

Nguyên liệu lá muồng trâu sau khi thu hái được sơ chế làm sạch. Nguyên liệu lá muồng trâu được tiến hành sấy khô ở nhiệt độ 50 °C tới độ ẩm 10%. Nghiền nhỏ nguyên liệu lá muồng trâu khô thành các mảnh có kích thước từ 5 đến 10mm. Nguyên liệu lá muồng trâu khô (30 kg) được chiết trong thiết bị chiết có lắp sinh hàn hồi lưu chiết hồi lưu với 130 lít dung môi metanol ở nhiệt độ 64°C trong 8 giờ. Sau 8 giờ, dịch chiết metanol được lọc, tách riêng khỏi phần bã. Bã chiết tiếp tục được chiết với metanol thêm

2 lần nữa. Dịch chiết metanol của 3 lần được gộp lại, cô quay hút chân không tại nhiệt độ 50 °C và áp suất 0,2 atm (20,2 KPa) để loại hết dung môi metanol, thu được 7,1 kg cao chiết metanol thô.

Phân tán hoàn toàn 6 kg cao metanol thô chiết trong 12 lít nước và 48 lít metanol và đổ vào thiết bị chiết phân bố có thể tích 200 lít, sau đó, bổ sung thêm 60 lít dung môi *n*-hexan và khuấy đều trong 2 giờ tại nhiệt độ 35 °C. Sau đó, để yên thiết bị chiết trong thời gian 1 giờ, hỗn hợp trong thiết bị chiết sẽ phân tách thành 2 phân lớp khác nhau gồm phân lớp *n*-hexan và phân lớp metanol-nước. Phân lớp trên chứa hỗn hợp các chất kém phân cực, phân tán trong dung môi *n*-hexan, lớp dưới chứa hỗn hợp các hợp chất có độ phân cực trung bình và cao, phân tán trong metanol- nước. Tháo riêng phân lớp *n*-hexan. Phân lớp metanol-nước được chiết tương tự quy trình trên thêm 2 lần nữa với dung môi *n*-hexan. Gộp 3 lần phân lớp *n*-hexan lại, tiến hành cô quay tại nhiệt độ 60°C và áp suất trong khoảng từ 0,2 (20,2 KPa) loại hết dung môi để thu được cao chiết *n*-hexan. Khối lượng cao chiết *n*-hexan thu được 2,8 kg.

Phân lớp metanol - nước được cô quay hút chân không tại nhiệt độ 60°C và áp suất trong khoảng từ 0,1 đến 0,5 atm (10,1 đến 50,5KPa) loại hết dung môi metanol và bổ sung thêm một lượng nước bằng với thể tích metanol đã cô loại thu được phân lớp nước. Đổ phân lớp này và 60 lít dung môi etyl axetat vào thiết bị chiết và khuấy đều trong 2 giờ, tại nhiệt độ 35 °C. Sau một thời gian hỗn hợp phân thành 2 lớp, lớp phía trên là phân lớp etyl axetat, lớp phía dưới là phân lớp nước. Tách riêng 2 lớp được phân lớp etyl axetat và phân lớp nước. Phân lớp nước được chiết tương tự quy trình trên thêm 2 lần nữa với dung môi etyl axetat. Gộp 3 lần phân lớp etyl axetat lại và tiến hành cô quay phân lớp etyl axetat tại nhiệt độ 60°C và áp suất trong khoảng từ 0,2 atm (20,2 KPa) để thu hồi dung môi etyl axetat và thu được 1,07kg cao chiết etyl axetat.

Ví dụ 2:

Tiến hành thử hoạt tính kháng vi khuẩn đối với hai cao chiết gồm cao chiết *n*-hexan và cao chiết etyl axetat đã được chiết phân bố từ cao tổng metanol.

Các mẫu dịch chiết được kiểm tra hoạt tính kháng vi khuẩn đối với 10 loại vi khuẩn: *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia glumae*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*, *Pectobacterium chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Xanthomonas arboricola pruni*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* KW11, *Ralstonia solanacearum*. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Nồng độ ức chế tối thiểu (µg/mL) của cao dịch chiết và hợp chất kháng vi khuẩn

STT	Tên vi khuẩn	Cao <i>n</i> -hexan	Cao etyl axetat
-----	--------------	---------------------	-----------------

		($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
1	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattlyae</i>	-	125
2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	-
3	<i>Burkholderia glumae</i>	2000	500
4	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	500	500
5	<i>Pectobacterium carotovora</i> subsp. <i>carotorova</i>	-	-
6	<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	-	-
7	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	-	-
8	<i>Xanthomonas arboricola pruni</i>	-	250
9	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> KW11	-	500
10	<i>Ralstonia solanacearum</i>	-	500

Cao dịch chiết etyl axetat có hoạt tính mạnh đối với vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* gây bệnh cháy lá trên cây hoa Lan. Bên cạnh đó, cao etyl axetat còn thể hiện hoạt tính trung bình với vi khuẩn *Xanthomonas arboricola pruni* gây bệnh đốm trên lá đào (nồng độ ức chế tối thiểu là 250 $\mu\text{g/mL}$). Cao chiết *n*-hexan thể hiện hoạt tính trung bình với vi khuẩn *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* gây bệnh thối loét trái cà chua (nồng độ ức chế tối thiểu là 500 $\mu\text{g/mL}$) và hoạt tính yếu đối với vi khuẩn gây đen lép hạt lúa *Burkholderia glumae* tại (nồng độ ức chế tối thiểu là 2000 $\mu\text{g/mL}$). Cả hai cao chiết đều không thể hiện hoạt tính đối với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* gây bệnh u sùi thân, và các vi khuẩn *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotorova*, *Pectobacterium chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ở các nồng độ tối đa được thử.

Ví dụ 3:

Cao chiết etyl axetat đã được thử hoạt tính kháng vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* với các nồng độ khác nhau, kết quả được thể hiện trong gây bệnh đốm lá trên dưa hấu bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* gây bệnh đốm lá trên dưa hấu của cao chiết etyl axetat ở các nồng độ khác nhau

		Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)					
		15,63	31,25	62,5	125	250	500
Giá trị OD _{600nm}	0 h	0,058	0,066	0,105	0,142	0,238	0,419
		0,058	0,069	0,116	0,134	0,232	0,401
	24 h	0,442	0,375	0,274	0,194	0,23	0,412

		0,413	0,354	0,254	0,175	0,237	0,405
	Ức chế (%)	9,79	27,76	61,59	86,84	101,17	99,53
		16,60	32,69	66,29	91,31	99,53	101,17
Hiệu quả kháng vi khuẩn	Trung bình (%)	13,19	30,23	63,94	89,08	100,35	100,35
	SD	4,82	3,49	3,32	3,16	1,16	1,16

Từ bảng 2 nhận thấy cao chiết etyl axetat có hoạt tính kháng vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. tốt tại nồng độ >125 µg/mL. Tại nồng độ 250 µg/mL, hiệu quả kháng nấm đạt 100%.

Ví dụ 4:

Thử nghiệm hoạt tính *in vivo* kháng nấm của cao chiết *n*-hexan và cao etyl axetat tại Hàn Quốc đối với 7 loại nấm: nấm *Magnaporthe grisea* gây bệnh đạo ôn trên lúa; nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh bạc lá lúa; nấm *Botrytis cinerea* gây mốc xám; nấm *Phytophthora infestans* gây bệnh mốc sương ở cà chua; nấm *Puccinia recondita* gây rỉ sắt lúa mì; nấm *Erysiphe graminis* gây bệnh phấn trắng và *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cây ớt. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng nấm của cao chiết *n*-hexan và cao chiết etyl axetat đối với 7 loại nấm trên ở nồng độ 3000 µg/ml được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thử hoạt tính kháng nấm của cao chiết etyl axetat và cao *n*-hexan ở nồng độ 3000 µg/ml đối với 7 loại nấm

Mẫu thử	<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Puccinia recondita</i>	<i>Erysiphe graminis</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Cao chiết <i>n</i> -hexan	25	0	0	64,29	26,67	0	58,33
Cao chiết etyl axetat	93,75	0	28,57	95,71	90	0	93,33

Qua bảng 3, nhận thấy cao chiết etyl axetat thể hiện hiệu quả kháng nấm cao (hơn 90%) đối với bệnh đạo ôn do *Magnaporthe grisea*; mốc sương do nấm *Phytophthora infestans*; rỉ sắt lúa mì do *Puccinia recondita* và bệnh thán thư trên cây ớt do *Colletotrichum gloeosporioides*. Cao chiết etyl axetat thể hiện hoạt tính cao hơn so với cao chiết *n*-hexan đối với nấm *Magnaporthe grisea* gây bệnh đạo ôn; nấm *Botrytis*

cinerea gây bệnh mốc xám; nấm *Phytophthora infestans* gây cà chua mốc sương; nấm *Puccinia recondita* gây rỉ sắt lá lúa mì và nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên ớt. Cả hai cao chiết etyl axetat và *n*-hexan đều không thể hiện hoạt tính kháng nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh vỏ bạc lá lúa, *Erysiphe graminis* gây phấn trắng.

Từ các thí nghiệm trên cho thấy, cao chiết etyl axetat là cao chiết có hoạt tính mạnh, có tác dụng kháng một số nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh hại cây trồng.

Lợi ích đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình chế tạo cao chiết từ lá muồng trâu (*Cassia alata* L.) có hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh hại cây trồng cho phép sử dụng lá cây muồng làm nguyên liệu chế tạo cao chiết giàu hoạt tính, tạo tiền đề chế tạo một sản phẩm BVTV kháng nấm và kháng vi khuẩn hại cây trồng từ nguồn thảo mộc thân thiện với con người và môi trường.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chế tạo cao chiết từ lá muồng trâu *Cassia alata* L. có hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh hại cây trồng bao gồm các bước:
 - (i) Sơ chế nguyên liệu:
 - nguyên liệu lá muồng trâu khô sau khi thu hái được sơ chế làm sạch, sấy khô tại nhiệt độ 40 đến 50 °C, nghiền nhỏ lá cây muồng trâu đến kích thước 5 đến 10 mm, thu lá cây muồng trâu khô dạng mảnh nghiền nhỏ;
 - (ii) Chiết hồi lưu nóng thu cao chiết thô:
 - chiết hồi lưu nóng lá cây muồng trâu nghiền nhỏ bằng dung môi metanol với tỉ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:4-1:6 (khối lượng/thể tích), tại nhiệt độ chiết là 60 đến 64°C, thời gian chiết 6 đến 8 giờ, thu dịch chiết metanol;
 - cô quay chân không dịch chiết metanol lá cây muồng trâu ở nhiệt độ 50 đến 60°C, áp suất trong khoảng từ 0,1 đến 0,5 atm (10,1 đến 50,5KPa), thu cao chiết metanol thô; và
 - (iii) Chiết phân bố làm giàu cao chiết:
 - phân tán hoàn toàn cao chiết metanol thô trong hỗn hợp metanol: nước (tỉ lệ metanol/nước là 4:1 (thể tích: thể tích) với tỉ lệ cao chiết metanol thô/ hỗn hợp metanol/nước là 1:5 đến 1:10 (khối lượng : thể tích).
 - chiết phân bố hỗn hợp trên với dung môi *n*-hexan, với tỉ lệ dung môi *n*-hexan: hỗn hợp nước/metanol dùng để phân tán cao chiết thô là 1:1 (thể tích:thể tích)), nhiệt độ 25 đến 35 °C, thời gian 1 đến 2 giờ, loại bỏ dịch chiết *n*-hexan và thu phân lớp metanol:nước;
 - cô quay chân không phân lớp metanol:nước còn lại tại nhiệt độ 60 °C, áp suất trong khoảng từ 0,1 đến 0,5 atm (10,1 đến 50,5KPa), để loại hết dung môi metanol và bổ sung nước bằng với thể tích metanol cô loại;
 - chiết phân bố phân lớp nước này (phân lớp metanol-nước sau khi loại metanol và bổ sung nước) với etyl axetat với tỉ lệ phân lớp nước: dung môi etyl axetat là 1:1 (thể tích:thể tích), nhiệt độ 20 đến 35 °C, thời gian 1 đến 2 giờ, để yên từ 1 đến 2 giờ;
 - tháo riêng nhằm thu dịch chiết etyl axetat; cô quay chân không dịch chiết etyl axetat tại nhiệt độ từ 50 đến 60 °C, áp suất trong khoảng từ 0,1 đến 0,5 atm (10,1 đến 50,5KPa), thu cao chiết etyl axetat là cao chiết từ lá muồng trâu có hoạt tính kháng nấm và kháng vi khuẩn gây hại cây trồng.