



(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)



2-0003362

(51) **A61K 36/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00263

(22) 29/06/2021

(45) 25/10/2023 427

(43) 27/09/2021 402

(73) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)

334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Quang Huy (VN); Lê Huy Hoàng (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM QUERCETIN DẠNG BÁN TINH KHIẾT TỪ NỤ HOA HÒE (SOPHORA JAPONICA L.)

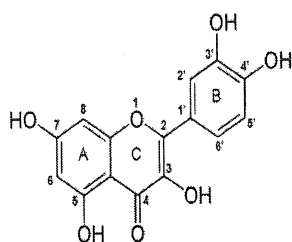
(57) Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm quercetin dạng bán tinh khiết từ nụ hoa hòe, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) thu dịch chiết toàn phần; b) thủy phân dịch chiết và thu nhận cao chiết sau thủy phân; và c) loại tạp và tinh chế tạo ra chế phẩm quercetin dạng bán tinh khiết.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa sinh học, cụ thể sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm quercetin dạng bán tinh khiết từ nụ hoa hòe để định hướng làm thành phần thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ cho cải thiện tình trạng stress oxy hóa liên quan đến tuổi, điều kiện sống, nghề nghiệp hoặc độc tính của thuốc trong điều trị.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Flavonoid là nhóm hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa mạnh, được thu nhận từ thực vật và ứng dụng trong y dược theo mức độ tinh khiết khác nhau. Trong các flavonoid từ rau quả phổ biến trong chế độ ăn, quercetin được chú trọng nghiên cứu hơn 10 năm trở lại đây để phát triển các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Quercetin (hay còn gọi là quercetin aglycon), là tên gọi thường dùng để mô tả dạng tự do, được tạo ra từ quercetin glycosid khi thủy phân bằng axit hoặc enzym trong đường tiêu hóa, để tách phân tử đường.



Cấu tạo quercetin

Hiện nay, quercetin và các hợp chất dẫn xuất quercetin (dạng kết hợp, quercetin glycosid) được ghi nhận có trong nhiều loài cây thuốc và rau quả, trong đó dạng kết hợp tồn tại với mức độ nhiều hơn dạng tự do. Quercetin có màu vàng, tinh thể hình kim và phân cực kém. Nghiên cứu trên *ex vivo* và *in vivo*, quercetin (ở dạng có mức độ tinh khiết cao, thu nhận từ rutin) được đánh giá là có hoạt tính sinh học đa dạng với nhiều đích tác dụng. Hoạt tính sinh học của quercetin đã được ghi nhận ở mức độ *in vitro* bao gồm chống oxy hóa, chống viêm, chống dị ứng, chống loét, kháng khuẩn, kháng vi rút, hỗ trợ tiêu hóa, bảo vệ dạ dày, bảo vệ hệ tim mạch và các hoạt động điều hòa miễn dịch

Cho đến nay, quercetin được ghi nhận có hoạt tính tăng sinh tính thích nghi (adaptogen) với hiệu quả cải thiện tốt tình trạng stress oxy hóa liên quan đến tuổi, điều kiện sống, nghề nghiệp hoặc độc tính của thuốc trong điều trị (thường gặp là paracetamol). Các nghiên cứu quá trình hấp thu, phân bố, chuyển hóa và thải trừ của quercetin trong cơ thể sinh vật cho thấy với đặc tính khử và không tan trong nước, sau khi quét gốc tự do quercetin trở thành tiền chất oxy hóa và được gan chuyển hóa để đào thải. Trên *in vivo*, hoạt tính sinh học của quercetin được hình thành dựa trên các tương tác đồng thời của dạng khử cũng như tiền chất oxy hóa lên cơ thể sinh vật. Khi đó, đồng thời với hiệu quả có được của quercetin nhờ cách thức sử dụng ở mức liều cao trong nhiều ngày thì cũng đã tạo ra thách thức lớn là nguy cơ dẫn đến độc tính và gây hại cho gan.

Ở trong nước cũng như trên thế giới, hiện nay đã có nhiều giải pháp để gia tăng sự phân tán trong dịch cơ thể sinh vật của các hoạt chất tự nhiên khó tan trong nước. Các giải pháp được phát triển từ rất sớm với cách tiếp cận tương tự như đã áp dụng đối với các thuốc hóa dược như tạo hạt nano, liposome, phytosome, v.v.. Gần đây, trên thế giới đã phát triển giải pháp chuyển hướng từ sử dụng hoạt chất tự nhiên ở dạng đơn chất có mức độ tinh khiết cao sang phát triển các chế phẩm gồm nhiều hoạt chất có mức độ tinh khiết thấp hơn. Theo đó, chế phẩm hỗn hợp hoạt chất chứa hợp chất đích được thu nhận từ cây thuốc cùng loài cũng như từ nhóm cây trong bài thuốc y học cổ truyền hoặc nhóm cây tương tự về hoạt tính sinh học. Quy trình thu nhận chế phẩm loại này được nghiên cứu thử nghiệm nhằm gia tăng hoạt tính sinh học có lợi trên lâm sàng của hợp chất đích. Qua đó, độc tính của đơn chất tinh khiết ít tan trong nước cũng được hạn chế. Hiện nay, đối với nhóm flavonoid, một số nghiên cứu đã cho thấy rằng chế phẩm chứa hợp chất đích ở mức độ tinh khiết thấp có hoạt tính chống oxy hóa và khả năng phân tán trong nước tốt hơn dạng đơn chất cùng loại có mức độ tinh khiết cao hơn. Tuy nhiên, các nghiên cứu thu nhận theo hướng này chưa được thực hiện trên hợp chất đích là quercetin.

Trong các nghiên cứu chiết xuất quercetin từ cây thuốc, hệ dung môi hữu cơ chứa axit được nhiều tác giả áp dụng. Theo các nghiên cứu này, chế phẩm chứa quercetin từ các cây thuốc khác loài được thu nhận cho nghiên cứu hàm lượng hoặc hoạt tính sinh học. Trong số đó, Gray và cộng sự đã sử dụng hệ dung môi ethanol chứa axit HCl để nghiên cứu tiêu chuẩn hóa điều kiện thu nhận chế phẩm flavonoid lá bạch quả, sau đó

được Watanabe và cộng sự áp dụng trên vỏ hành và gần đây được Nishimuro và cộng sự thực hiện trên một số loại rau, quả của Nhật Bản. Tuy nhiên, điều kiện chiết xuất theo các nghiên cứu này chủ yếu để nghiên cứu hàm lượng quercetin, chưa được phát triển để xây dựng quy trình thu nhận chế phẩm quercetin từ cùng loài cây thuốc cho nghiên cứu đồng thời về hàm lượng và hoạt tính sinh học.

Quercetin tinh khiết thủy phân từ rutin đã được nghiên cứu ứng dụng làm nguyên liệu sản xuất một số sản phẩm chăm sóc sức khỏe. Ở Việt Nam và một số nước châu Á, rutin được thu nhận chủ yếu từ nụ hoa của cây hòe. Tuy nhiên, cho đến nay ở Việt Nam chưa có tài liệu liên quan đến thu nhận chế phẩm chứa quercetin bán tinh khiết trực tiếp từ nụ hoa hòe để tạo nguyên liệu cho nghiên cứu so sánh với quercetin thủy phân từ rutin (được thu nhận từ nụ hoa hòe) cũng như so sánh với quercetin chuẩn (do Sigma cung cấp) về hoạt tính sinh học *in vitro*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tạo ra chế phẩm quercetin dạng bán tinh khiết từ nụ hoa hòe (*Sophora japonica* L.) để định hướng làm thành phần thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ cho cải thiện tình trạng stress oxy hóa liên quan đến tuổi, điều kiện sống, nghề nghiệp hoặc độc tính của thuốc trong điều trị. Để đạt được mục đích đó, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm quercetin dạng bán tinh khiết từ nụ hoa hòe, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- a) thu dịch chiết toàn phần;
- b) thủy phân dịch chiết và thu nhận cao chiết sau thủy phân; và
- c) loại tạp và tinh chế tạo ra chế phẩm quercetin dạng bán tinh khiết.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Sơ đồ quy trình tách chiết chế phẩm quercetin bán tinh khiết từ nụ hoa hòe

Hình 2: Sắc ký đồ HPLC của mẫu chứa quercetin từ nụ hoa hòe (H1) và quercetin chuẩn (QC và QUE)

Hình 3: Giá trị làm giảm 50% DPPH 100 μ M của mẫu QUE (quercetin chuẩn), mẫu H1 và vitamin C

Hình 4: Năng lực khử (độ hấp thụ quang bằng 1, Abs 1) của mẫu QUE (quercetin chuẩn), mẫu H1 và vitamin C

Hình 5: Tương quan giữa nồng độ mẫu quercetin (H1, QUE) và tỉ lệ tế bào HCT 116 còn sống

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm quercetin dạng bán tinh khiết từ nụ hoa hòe, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Thu dịch chiết toàn phần

Nụ hoa hòe (100g) đã loại tạp trong hexan và nghiền nhỏ, được bổ sung dung môi metanol 72 % với tỉ lệ bột nguyên liệu/dung môi là 1/5. Hỗn hợp nguyên liệu và dung môi được trộn đều trong bình thủy tinh dung tích 2 hoặc 5 lít có nắp đậy, đảm bảo nguyên liệu ngập trong dung môi. Sau đó, hỗn hợp đã trộn đều được siêu âm 30 phút trong bể siêu âm ở tần số 37Hz ở nhiệt độ 70°C để thu dịch chiết 1. Phần bã còn lại được cho vào bình ngấm kiệt thủy tinh dung tích 5 lít và bổ sung đủ dung môi, ổn định trong 1 giờ. Điều kiện ngấm kiệt được tiến hành ở nhiệt độ phòng, sử dụng dung môi metanol 72%, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5, tốc độ nhỏ giọt là 5 giọt/phút, thời gian ngấm kiệt cho 1 chu kỳ là 6 giờ. Sau 4 chu kỳ (khoảng 24 giờ), dịch chiết 2 được thu lại, gộp với dịch chiết 1, trộn đều tạo dịch chiết toàn phần.

b) Thủy phân dịch chiết và thu nhận cao chiết sau thủy phân

Dịch chiết toàn phần được thêm vào HCl 37% với tỷ lệ 1/10 (thể tích/thể tích) và siêu âm ở tần số 37Hz ở nhiệt độ 70°C để thủy phân dịch chiết trong 60 phút. Dịch sau thủy phân được lọc, ly tâm, bốc hơi dung môi, sấy áp lực giảm để thu nhận cao chiết sau thủy phân chứa quercetin.

c) Loại tạp và tinh chế tạo ra chế phẩm quercetin dạng bán tinh khiết

Các loại cao chiết đã sấy khô dưới áp lực giảm, được nghiền nhỏ. Bột cao được cân lấy khoảng 5-10 g cao. Bột sau cân được cho vào cốc thủy tinh và bổ sung 5-10 ml dung môi metanol 72% để hòa tan và lọc nóng. Dịch sau lọc được cho vào bình chiết loại 50-100ml, lắc đều. Tiếp theo, các dung môi theo thứ tự hexan; metanol; nước và etyaxetat được bổ sung, theo tỉ lệ tăng dần từ 1:1; 1:2 và 1:6 để loại tạp. Mẫu sau loại tạp được sấy khô trong tủ sấy chân không và tiếp tục quá trình loại tạp nhiều lần trong

etanol. Quá trình loại tạp nhiều lần trong etanol được thực hiện như sau: Cao quercetin thô được hòa tan trong etanol 70% và ủ ở nhiệt độ 75°C trong 30 phút. Phần không tan được loại bỏ bằng cách lọc và ly tâm 6500 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch được sấy khô bằng hút chân không thu quercetin. Quercetin tiếp tục được hòa tan trong etanol/H₂O (tỉ lệ 80:20 về thể tích), lọc và ly tâm thu dịch. Dịch sau ly tâm được phân tách theo phương pháp sắc ký cột chân không (dùng bơm hút chân không sau cột để tạo chênh lệch áp suất, cho dung môi đi qua cột nhồi silicagel nhanh hơn). Dịch sau sắc ký cột được thu lại, ly tâm và bốc hơi trong tủ sấy chân không, thu cao chứa quercetin. Cao chứa quercetin tiếp tục được hòa tan trong etanol 80% và làm lạnh. Sau đó, nước lạnh được thêm từ từ vào dung dịch etanol 80% lạnh có chứa quercetin, đến khi xuất hiện tủa không tan. Phần tủa không tan được thu lại bằng ly tâm hoặc lọc và sấy khô bằng tủ sấy áp lực giảm đến khối lượng không đổi thu chế phẩm quercetin bán tinh khiết từ nụ hoa hòe.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Quy trình sản xuất chế phẩm quercetin dạng bán tinh khiết từ nụ hoa hòe (*Sophora japonica* L.), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) thu dịch chiết toàn phần

bổ sung dung môi metanol 72 % vào nụ hoa hòe đã loại tạp trong hexan và nghiền nhỏ với tỉ lệ bột nguyên liệu/dung môi là 1/5; sau đó, trộn đều hỗn hợp thu được bằng cách siêu âm 30 phút trong bể siêu âm ở tần số 37Hz ở nhiệt độ 70°C để thu dịch chiết 1; bổ sung dung môi metanol 72% vào phần bã còn lại với tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5, tốc độ nhỏ giọt là 5 giọt/phút, thời gian cho 1 chu kỳ là 6 giờ, sau 4 chu kỳ (khoảng 24 giờ), dịch chiết 2 được thu lại, gộp với dịch chiết 1, trộn đều tạo dịch chiết toàn phần;

b) thủy phân dịch chiết và thu nhận cao chiết sau thủy phân

thêm HCl 37% vào dịch chiết toàn phần với tỷ lệ 1/10 (thể tích/thể tích) và siêu âm ở tần số 37Hz ở nhiệt độ 70°C để thủy phân dịch chiết trong 60 phút; sau đó lọc, ly tâm, bốc hơi dung môi, sấy áp lực giảm dịch sau thủy phân để thu nhận cao chiết sau thủy phân chứa quercetin;

c) loại tạp và tinh chế tạo ra chế phẩm quercetin dạng bán tinh khiết

nghiên nhỏ cao chiết thu được ở bước b), lấy khoảng 5-10 g bột cao cho vào cốc thủy tinh và bổ sung 5-10 ml dung môi metanol 72% để hòa tan và lọc nóng, cho dịch sau lọc vào bình chiết loại 50-100ml, lắc đều; tiếp theo, bổ sung các dung môi theo thứ tự hexan, metanol, nước, etyaxetat theo tỉ lệ tăng dần từ 1:1, 1:2 và 1:6 để loại tạp; sấy khô mẫu sau loại tạp trong tủ sấy chân không và tiếp tục quá trình loại tạp nhiều lần trong etanol; trong đó quá trình loại tạp nhiều lần trong etanol được thực hiện như sau: hòa tan cao quercetin thô trong etanol 70% và ủ ở nhiệt độ 75°C trong 30 phút; loại bỏ phần không tan bằng cách lọc và ly tâm 6500 vòng/phút trong 10 phút; sấy khô phần dịch bằng hút chân không thu quercetin; hòa tan quercetin trong etanol/H₂O (tỉ lệ 80:20 về thể tích), lọc và ly tâm thu dịch; phân tách dịch sau ly tâm theo phương pháp sắc ký cột chân không; thu lại dịch sau sắc ký cột, ly tâm và bốc hơi trong tủ sấy chân không, thu cao chứa quercetin; tiếp tục hòa tan cao chứa quercetin trong etanol 80% và làm lạnh; sau đó, thêm từ từ nước lạnh vào dung dịch etanol 80% lạnh có chứa quercetin, đến khi xuất hiện tủa không tan; ly tâm hoặc lọc và sấy khô phần tủa không tan bằng tủ sấy áp lực giảm đến khối lượng không đổi thu chế phẩm quercetin bán tinh khiết từ nụ hoa hòe.

Ví dụ 2: Đánh giá một số đặc điểm vật lý của chế phẩm thu được

Áp dụng quy trình, tiến hành thu nhận chế phẩm quercetin từ nụ hoa hòe (H1). Chế phẩm quercetin sau thu nhận được định tính và xác định hàm lượng quercetin, đánh giá so sánh với quercetin chuẩn (QC, QUE do Sigma cung cấp), kết quả thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Một số đặc điểm vật lý của các mẫu thu nhận được

Mẫu	Dung môi kết tinh	Dạng bề ngoài	Hiệu suất (%)	SKBM (R _f , cm)	Nhiệt độ nóng chảy của vết điều chế từ SKBM*	Phổ hấp thụ UV-vis
QC	Etanol 80%, lạnh	Bột kết tinh, màu vàng sáng, không mùi, vị đắng	-	1 vết, R _f là 0,27 ± 0,12	315 ± 2°C	Trong metanol có 2 hấp thụ cực đại tại bước sóng 258 ± 1 nm và 370 ± 1
QUE		Bột kết tinh, màu vàng sáng, không mùi, vị đắng	-	1 vết, R _f là 0,27 ± 0,14	315 ± 3°C	
H1		Bột kết tinh, màu	19,67	2 vết, trong	314 ± 2°C	

		vàng đậm, không mùi, vị đắng	$\pm$ 0,24	đó có 1 vết có R_f là $0,27 \pm 0,18$		nm
--	--	---------------------------------	---------------	---	--	----

Chú thích: * Sắc ký bản mỏng

Kết quả cho thấy mẫu H1 có màu cảm quan tương đương mẫu chuẩn (QC, QUE). Bên cạnh đó, mẫu có chứa chất có đặc điểm tương đương với hai mẫu quercetin chuẩn QC và QUE khi định tính bằng sắc ký bản mỏng, nhiệt độ nóng chảy và phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến (UV-Vis). Khi kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng, mẫu H1 phát hiện có 2 vết, trong đó có 1 vết có R_f tương đương quercetin chuẩn. Các vết (có R_f tương đương quercetin chuẩn) được tinh chế bằng sắc ký bản mỏng và cho thấy có nhiệt độ nóng chảy tương đương quercetin chuẩn.

Phổ IR của các vết điều chế được bằng sắc ký bản mỏng từ mẫu H1 có hình dạng tương đương với quercetin chuẩn (QUE, QC). Kết quả giải phổ theo các tần số đặc trưng cho cấu trúc của phân tử quercetin, so sánh giữa mẫu điều chế H1 so với hai mẫu chuẩn (QC và QUE) cho thấy các mẫu có phổ IR tương đương nhau và tương đương với quercetin chuẩn, chứng tỏ các vết điều chế đó là quercetin. Hàm lượng quercetin trong mẫu H1 tiếp tục được xác định bằng phương pháp HPLC theo các điều kiện phân tích đã chuẩn hóa. Kết quả phân tích HPLC của mẫu H1 cũng như quercetin chuẩn QC và QUE được thể hiện trên hình 2.

Kết quả phân tích HPLC cho thấy khi phân tách, nhận diện và xác định tại bước sóng $\lambda = 370$ nm mẫu H1 có 2 pic sắc ký. Trên sắc ký đồ, pic sắc ký thứ nhất của H1 có thời gian lưu t_r (phút) đều không khác biệt so với QUE và QC ($p > 0,05$), nghĩa là chế phẩm H1 có chứa quercetin với thời gian lưu trung bình khoảng 1,94 phút (hình 2). Pic thứ hai trong mẫu H1 được nhận diện cùng với quercetin trong cùng điều kiện, cho thấy hợp chất này có thể có đặc tính hóa học tương đồng với quercetin và thuộc phân nhóm flavonol. Về hàm lượng cho thấy, lượng quercetin ($\mu\text{g/ml}$) của mẫu H1 5,92 thấp hơn so với 2 chất chuẩn QUE (9,16) và QC (9,27). Hàm lượng của quercetin trong chất chuẩn, các mẫu QC, H1 và QUE được xác định tương ứng 92,72 %; 59,19 %; và 91,62%. Với các kết quả đánh giá như vậy cho thấy, quy trình thu nhận theo sáng chế đã tách được quercetin từ các nụ hoa hòe.

Ví dụ 3: Kết quả khảo sát hoạt tính *in vitro* của chế phẩm quercetin bán tinh khiết thu nhận từ nụ hoa hòe

Quercetin là flavonoid có nhiều trong rau quả, được sử dụng qua đường tiêu hóa. Vì vậy, trong nghiên cứu của chúng tôi các đích tác dụng về hoạt tính *in vitro* được lựa chọn, thuộc hệ thống đường tiêu hóa, nơi tiếp xúc trực tiếp với các hoạt chất có trong mẫu dùng theo đường uống ở trạng thái chưa bị chuyển hóa. Theo đó, chế phẩm quercetin từ nụ hoa hòe (H1) được đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, chống oxy hóa và kháng tế bào ung thư so sánh với quercetin chuẩn (QUE).

Kết quả đánh giá cho thấy, các mẫu đều có hoạt tính kháng khuẩn. Hoạt tính chống oxy hóa ở nồng độ ở IC₅₀ (µg/ml) của mẫu H1, QUE và vitamin C tương ứng 13,62, 14,35 và 15,30 và mẫu H1 có khả năng quét gốc tự do mạnh. Ở nồng độ 20 µg/ml, mẫu H1 và QUE thể hiện hoạt tính kháng tế bào ở mức thấp với tỷ lệ sống sót của tế bào bị giảm tương ứng là 60,76% và 48,12%. Trong nghiên cứu, mẫu H1 có hoạt tính cao hơn chất chuẩn QUE.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế được thực hiện nhằm thu nhận chế phẩm chứa quercetin ở mức độ bán tinh khiết từ nụ hoa hòe, để nghiên cứu cải thiện tình trạng stress oxy hóa. Sáng chế này góp phần định hướng phương pháp thu nhận quercetin từ nụ hoa hòe cho nghiên cứu hoạt tính sinh học, nhằm thúc đẩy ứng dụng của chế phẩm quercetin theo hướng dinh dưỡng trị liệu để cải thiện tình trạng stress oxy hóa liên quan đến tuổi, điều kiện sống, nghề nghiệp hoặc độc tính của thuốc trong điều trị.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm quercetin dạng bán tinh khiết từ nụ hoa hòe (*Sophora japonica* L.), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) thu dịch chiết toàn phần

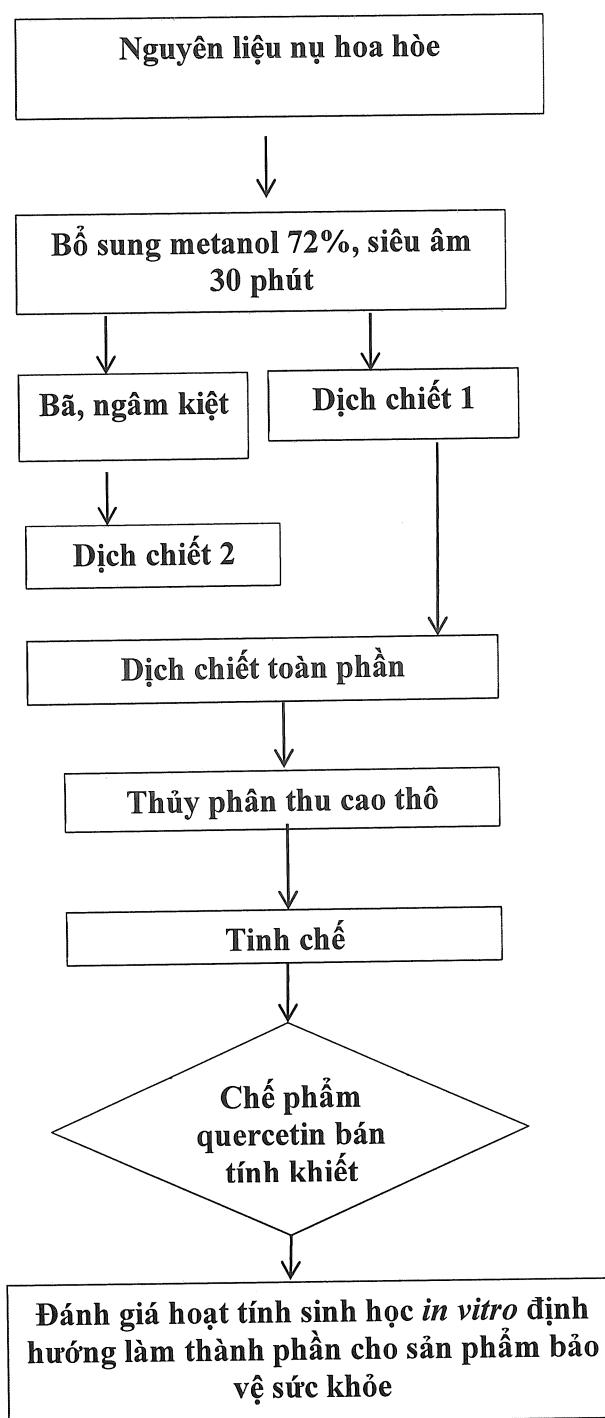
bổ sung dung môi metanol 72 % vào nụ hoa hòe đã loại tạp trong hexan và nghiền nhỏ với tỉ lệ bột nguyên liệu/dung môi là 1/5; sau đó, trộn đều hỗn hợp thu được bằng cách siêu âm 30 phút trong bể siêu âm ở tần số 37Hz ở nhiệt độ 70°C để thu dịch chiết 1; bổ sung dung môi metanol 72% vào phần bã còn lại với tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5, tốc độ nhỏ giọt là 5 giọt/phút, thời gian cho 1 chu kỳ là 6 giờ, sau 4 chu kỳ (khoảng 24 giờ), dịch chiết 2 được thu lại, gộp với dịch chiết 1, trộn đều tạo dịch chiết toàn phần;

b) thủy phân dịch chiết và thu nhận cao chiết sau thủy phân

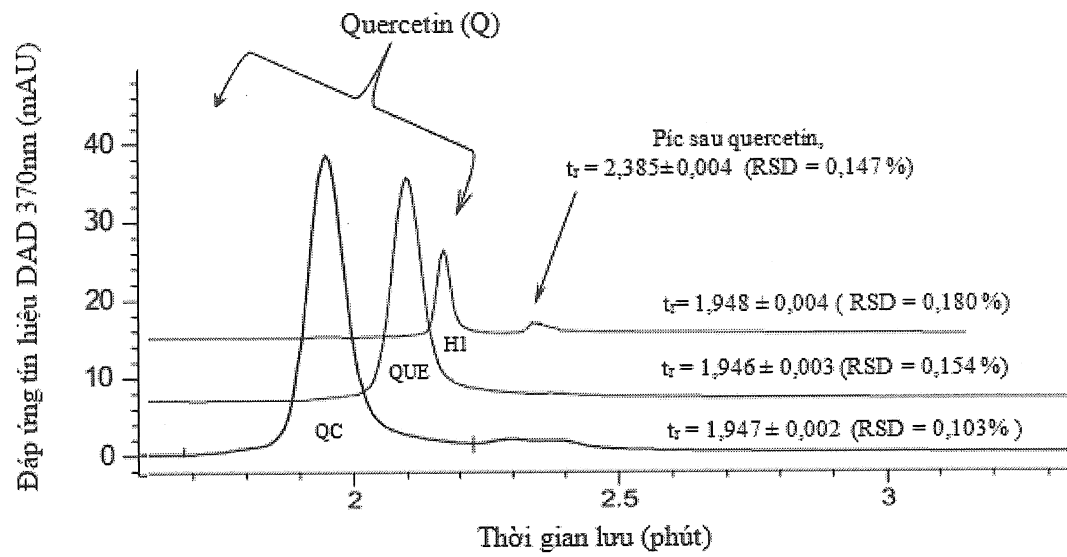
thêm HCl 37% vào dịch chiết toàn phần với tỷ lệ 1/10 (thể tích/thể tích) và siêu âm ở tần số 37Hz ở nhiệt độ 70°C để thủy phân dịch chiết trong 60 phút; sau đó lọc, ly tâm, bốc hơi dung môi, sấy áp lực giảm dịch sau thủy phân để thu nhận cao chiết sau thủy phân chứa quercetin;

c) loại tạp và tinh chế tạo ra chế phẩm quercetin dạng bán tinh khiết

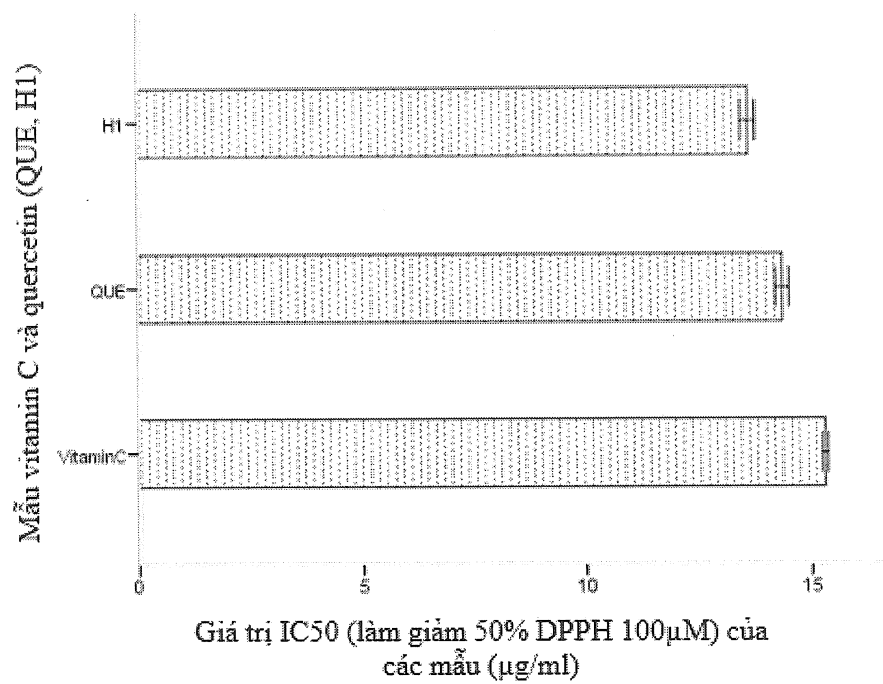
nghiền nhỏ cao chiết thu được ở bước b), lấy khoảng 5-10 g bột cao cho vào cốc thủy tinh và bổ sung 5-10 ml dung môi metanol 72% để hòa tan và lọc nóng, cho dịch sau lọc vào bình chiết loại 50-100ml, lắc đều; tiếp theo, bổ sung các dung môi theo thứ tự hexan, metanol, nước, etyaxetat theo tỉ lệ tăng dần từ 1:1, 1:2 và 1:6 để loại tạp; sấy khô mẫu sau loại tạp trong tủ sấy chân không và tiếp tục quá trình loại tạp nhiều lần trong etanol; trong đó quá trình loại tạp nhiều lần trong etanol được thực hiện như sau: hòa tan cao quercetin thô trong etanol 70% và ủ ở nhiệt độ 75°C trong 30 phút; loại bỏ phần không tan bằng cách lọc và ly tâm 6500 vòng/phút trong 10 phút; sấy khô phần dịch bằng hút chân không thu quercetin; hòa tan quercetin trong etanol/H₂O (tỉ lệ 80:20 về thể tích), lọc và ly tâm thu dịch; phân tách dịch sau ly tâm theo phương pháp sắc ký cột chân không; thu lại dịch sau sắc ký cột, ly tâm và bốc hơi trong tủ sấy chân không, thu cao chứa quercetin; tiếp tục hòa tan cao chứa quercetin trong etanol 80% và làm lạnh; sau đó, thêm từ từ nước lạnh vào dung dịch etanol 80% lạnh có chứa quercetin, đến khi xuất hiện tủa không tan; ly tâm hoặc lọc và sấy khô phần tủa không tan bằng tủ sấy áp lực giảm đến khối lượng không đổi thu chế phẩm quercetin bán tinh khiết từ nụ hoa hòe.



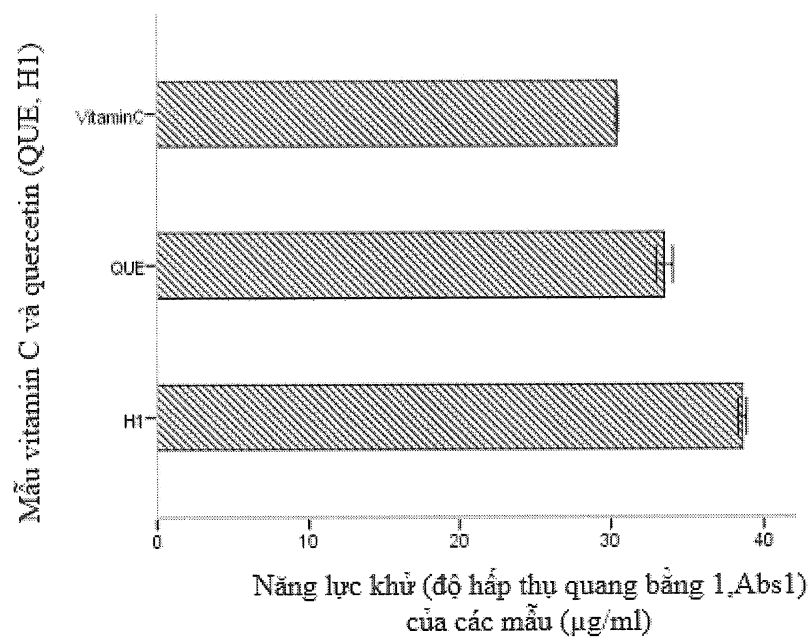
Hình 1



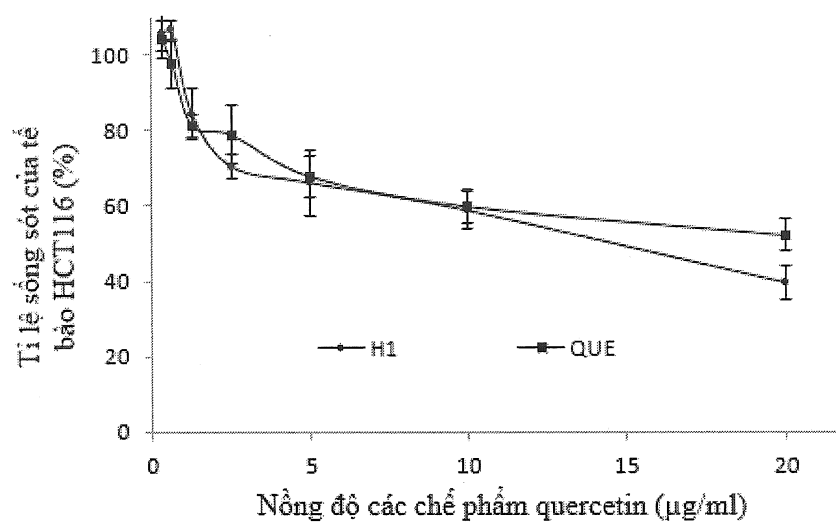
Hình 2



Hình 3



Hình 4



Hình 5