

# Chương 1: Đại cương về kỹ thuật chiết xuất

TS. Hoàng Lê Sơn

## Table of contents

|  |    |
|--|----|
| 0.1 1.1 Ảnh hưởng của thực vật tới loài người .....                          | 1  |
| 0.1.a 1.1.1 Cấu tạo của con người thích nghi với sử dụng thực vật .....      | 1  |
| 0.1.b 1.1.2 Thuần hóa thực vật với các khu định cư và vấn đề dịch bệnh ..... | 2  |
| 0.1.c 1.1.3 Hợp chất có hoạt tính sinh học .....                             | 3  |
| 0.2 1.2 Phân loại các hợp chất từ tự nhiên .....                             | 5  |
| 0.2.a 1.2.1 Nhóm Terpenes .....  | 5  |
| 0.2.b 1.2.2 Nhóm Alkaloids .....   | 6  |
| 0.2.c 1.2.3 Polyphenols .....  | 7  |
| 0.2.d 1.2.4 Nhóm chất khác .....   | 8  |
| 0.3 1.3 Tầm quan trọng của quá trình chiết xuất .....                        | 8  |
| 0.4 1.4 Một số dung môi phổ biến dùng trong chiết xuất .....                 | 9  |
| 0.5 1.5 Phân đoạn bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng .....                     | 9  |
| 0.6 1.6 Ứng dụng cao chiết trong ngành dược .....                            | 11 |
| 0.6.a 1.6.1 Cao chiết từ lá .....  | 11 |
| 0.6.b 1.6.2 Cao chiết từ hoa và quả .....                                    | 11 |
| 0.6.c 1.6.3 Cao chiết từ vỏ thân .....                                       | 12 |
| 0.6.d 1.6.4 Cao chiết từ rễ và thân rễ .....                                 | 12 |
| 0.6.e 1.6.5 Cao chiết từ các bộ phận khác .....                              | 13 |
| Bibliography .....   | 13 |
| Bibliography .....   | 13 |

## Tóm tắt

Hoạt chất có hoạt tính sinh học có thể tìm thấy rộng rãi trong thực vật, động vật, nấm nhưng thường hay được hiểu liên quan tới nguồn gốc từ thực vật. Với thực vật, các hoạt chất này có thể xếp vào nhóm các hợp chất chuyển hóa bậc hai do được sinh tổng hợp từ các chất đảm nhiệm vai trò dinh dưỡng như đường, acid amin, các loại muối vô cơ và nước. Dựa trên cấu trúc hóa học, các hoạt chất này có thể phân chia vào một số nhóm phổ biến như flavonoide, tan-nin, terpene, ligand, alkaloid, polysaccarid, và peptide. Các hợp chất này từ lâu đã đóng vai trò ngày quan trọng trong công nghiệp dược do tiềm năng tác dụng sinh học như khả năng chống oxy hóa, kháng viêm để áp dụng trong các liệu pháp điều trị như ngăn ngừa các rối loạn tim mạch hoặc ức chế phát triển tế bào ung thư. Các kỹ thuật sắc ký để phân lập hoạt chất kết hợp với phân tích các loại phổ như IR, UV, MS, 1D-NMR, 2D-NMR để xác định cấu trúc có thể đóng vai trò đáng kể trong phát hiện các hợp chất này nhưng một dự án phát triển sản phẩm từ tự nhiên thành công phần lớn phụ thuộc vào phương

pháp chiết xuất để thu được cao chiết. Sản phẩm của quá trình chiết xuất có thể tiếp tục làm giàu hoạt chất đích hoặc phân lập các hợp chất đích nhưng cũng có thể đã đảm bảo chất lượng để chuyển sang giai đoạn bào chế. Để biết chi tiết hơn về các nội dung vừa đề cập các bạn có thể nghiên cứu chương này. Sau khi nghiên cứu xong, các bạn cần định hình được các khái niệm liên quan tới chiết xuất vừa đề cập cũng như phân tích được vai trò của các hoạt chất có hoạt tính sinh học trong lĩnh vực Dược - Mỹ phẩm.

### 0.1 1.1 Ảnh hưởng của thực vật tới loài người

#### 0.1.a 1.1.1 Cấu tạo của con người thích nghi với sử dụng thực vật

Lịch sử sử dụng thực vật trong cuộc sống loài người có lẽ khởi nguồn ngay từ bình minh của nhân loại. Dựa trên bằng chứng khảo cổ cho thấy các loài vượn người đã gắn chặt với việc sử dụng thực vật trong đời sống hàng ngày. *Australopithecus africanus*, một vượn nhân gần gũi với các loài vượn hơn loài người

hiện đại đã thích nghi với lối sống một phần hay hoàn toàn trên cây tại khu vực Nam Phi cách đây khoảng ba triệu năm có chế độ ăn khác biệt với hầu hết các loài linh trưởng khi biết khai thác các loài thực vật hoang dại như các loại hạt cứng và các rễ cứng. (Figure 1) Cả hai đều khó nhai và không dễ dàng tiêu hóa loại thực phẩm này. Hộp sọ của *Australopithecus* sở hữu một hàm rất lớn được bao phủ bởi lớp men dày và có gờ cao cho phép các cơ lớn gắn vào hàm. Hình thái của hộp sọ *Australopithecus* cho phép nhai thực vật cứng và cách cơ thể tiến hóa để phù hợp với loại thức ăn này. Ngoài ra, *Australopithecus* có một hệ thống tiêu hóa rất dài để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tiêu hóa thức ăn. Đến thời kỳ của *Homo erectus* sau đó khoảng 1.5 triệu năm gần với lịch sử loài người hiện đại hơn, lại cho thấy hộp sọ nhẹ hơn nhiều, với răng nhỏ hơn và men mỏng hơn *Australopithecus*. Những vườn nhai hình này cũng có hệ thống tiêu hóa ngắn hơn nhiều. *H. erectus* được cho là đã tìm kiếm thức ăn trên thảo nguyên để lấy cỏ và hạt cỏ. Đây là nguồn dinh dưỡng tốt hơn so với của *Australopithecus* cũng như dễ tiêu hóa hơn. *H. erectus* không cần thiết một hệ thống cơ hàm hoặc đường tiêu hóa giống như giống như *Australopithecus* để có thể tồn tại.

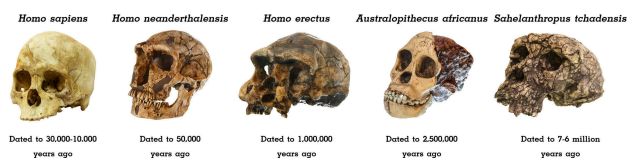


Figure 1: So sánh hộp sọ người trong ba triệu năm qua. *Australopithecus africanus* có răng lớn và răng hàm mài ở phía sau hàm, trong khi người hiện đại (*Homo sapiens*) có răng và hàm nhỏ hơn nhiều. Những hình dạng hộp sọ này là một hệ quả tiến hóa trực tiếp của chế độ ăn uống của những người này, đặc biệt là về thực vật mà chúng ăn. Hình ảnh lịch sử của *Puwadol Jaturawutthicha*.

Ngoài hình thái, phân tích về vai trò thực vật trong con đường hóa sinh cho thấy sự phụ thuộc của loài người vào dinh dưỡng từ thực vật. Loài người cần 22 acid amin thiết yếu để phát triển cơ thể và có 9 loại chỉ có thể tổng hợp từ thực vật bao gồm Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine + Cysteine, Phenylalanine + Tyrosine, Threonine, Tryptophan, Valine. Hàm lượng các acid amin này trong các loại thực vật cũng khác nhau dẫn tới sự đa dạng trong chế độ dinh dưỡng để có thể đảm bảo đủ dinh dưỡng, ví dụ, loài người dùng nhiều loại đậu từ các loài khác nhau. Ngoài ra, vitamin C con người cũng không thể tự tổng hợp được. Thiếu vitamin C có thể dẫn tới một

số bệnh lý trong cơ thể như thiếu máu, loãng xương, tim mạch hay bệnh scorbut. Nhiều nền văn minh dù cách xa về địa lý lại có điểm chung chọn lọc các loài thuộc chi citrus như cam, quýt để bổ sung vitamin C nhằm cải thiện sức đề kháng cũng như phòng chống bệnh tật. Dĩ nhiên, không chỉ dinh dưỡng hay phòng chống bệnh tật, thực vật từ lâu đã đóng vai trò quan trọng để chữa bệnh. Cần chú ý thêm một điều về mối liên hệ hóa sinh giữa con người và thực vật chính là chu trình acid shikimic. Trong thực vật, chu trình acid shikimic đóng góp tới 3 trong 9 acid amin thiết yếu cho con người nhưng đồng thời cũng là con đường để sinh tổng hợp ra nhiều hoạt chất có hoạt tính sinh học như nhóm flavonoids, các phenolic hay một số alkaloids. Con người cũng đã học tập để từ acid shikimic từ quả hồi quả hồi (*Illicium verum*) tổng hợp hóa được ra thuốc Tamiflu để điều trị các triệu chứng nghiêm trọng của cúm. Điều này cho thấy, các con đường sinh hóa của con người có sự tương thích nhất định với các hợp chất từ tự nhiên.

#### 0.1.b 1.1.2 Thuần hóa thực vật với các khu định cư và vấn đề dịch bệnh

Thực vật rất quan trọng với hoạt động hàng ngày của cá nhân con người và cũng định hình cộng đồng định cư. Sau khi kỷ băng hà kết thúc, những tảng băng lớn dần rút lui bộc lộ mặt đất dưới ánh mặt trời, loài người đã khởi đầu cho giống loài của mình với cuộc hành trình đầy kỳ vĩ như thế. Trong hàng ngàn năm trước đó, loài người đã theo đuổi cuộc sống tự do với các hành trình phụ thuộc vào sự di cư của các đàn thú hoang cũng như thực vật hoang dã trên đường đi để đa dạng chế độ dinh dưỡng của mình. Và khi những mảng băng tan ra, đất bắt đầu trồng trọt được và những loài thực vật bắt đầu được thuần hóa, thời điểm đó cách đây khoảng 11700 năm trước với nhiều địa điểm trên khắp thế giới, vào khoảng 24 địa điểm. Lý do thực sự quá trình này vẫn còn nhiều tranh cãi nhưng các nhà khoa học đều nhất trí rằng quá trình trồng trọt và thuần hóa thực vật đòi hỏi nhiều nhân công hơn đã thúc đẩy quá trình định cư của loài người, điều này giúp gia tăng dân số nhưng các căn bệnh mới cũng xuất hiện theo. Các di tích khảo cổ chỉ giúp chúng ta nhận ra về các vấn đề cơ bản như ước lượng nhân khẩu học, thiết chế xã hội hay một phần đời sống văn hóa. Tuy nhiên, một ngành mới là cổ sinh học dựa trên tiến bộ phân tích đã giúp khắc họa cách nhìn đầy mới mẻ về thời kỳ định cư đầu tiên với vai trò cốt lõi của thực vật trong đời sống và xuất hiện mầm mống đầu tiên của dịch bệnh truyền nhiễm.

Thực vật có một số cơ chế quang hợp giúp phân vào một số nhóm. Nhóm thực vật C3 phổ biến nhất chiếm 95% sử dụng chu trình Calvin để cố định  $CO_2$  tạo ra hợp chất có 3 nguyên tử car bon. Đây là nhóm có thể gặp nhiều môi trường hoang dã và có thể lưu giữ đồng vị trong xương người săn bắn hái lượm. Trong khi đó, nhóm thực vật C4 quang hợp tiên tiến hơn sử dụng chu trình Hatch-Slack, trong đó  $CO_2$  được cố định thành hợp chất có 4 nguyên tử carbon (oxaloacetate). Điều này giúp thực vật C4 giảm mất nước và tăng hiệu suất quang hợp phù hợp để làm cây lương thực như ngô, mía, cao lương, kê. Hệ quả phân tích xương người cổ đại định cư sẽ cho thấy tiêu thụ thực vật C4 ở mức độ ổn định. Điều này đã được J.C. Vogel và Nicholas van der Merwe đã nghiên cứu công bố những năm 1970 (Vogel & van der Merwe, 1977). Tuy nhiên, nhà cổ sinh học còn phát hiện nhiều hơn nữa về đời sống người cổ đại khi định cư đó là vấn đề cai sữa ở trẻ sơ sinh. (Tsutaya & Yoneda, 2015; Wright & Schwarcz, 1998) Nhưng năm đầu tiên, xương trẻ có dấu hiệu đồng vị ổn định tương tự ở mẹ cho thấy trong năm đầu tiên chủ yếu trẻ lấy dinh dưỡng protein từ sữa mẹ. Sau khi cai sữa, sự tương đồng giảm dần giúp bộc lộ thời gian cai sữa. Thời gian trẻ bắt đầu bổ sung thực phẩm sau 6 tháng và cai sữa hoàn toàn sau 3 năm phụ thuộc vào yếu tố văn hóa, xã hội hay sức khỏe trẻ em. Cai sữa sớm làm tăng nguy cơ suy dinh dưỡng và bệnh tật (Sandberg, Sponheimer, Lee-Thorp, & Van Gerven, 2014; Temple, 2016) nhưng khi mẹ mang thai với gánh nặng dinh dưỡng đây là điều bắt buộc. Việc rút ngắn thời gian cai sữa phản ánh sự gia tăng dân số. Và dĩ nhiên, thực vật nhóm C4 đóng vai trò quan trọng cung cấp dinh dưỡng cho cả mẹ và con trong giai đoạn này. (Katzenberg, Herring, & Saunders, 1996; Buikstra et al., 1986).

Quá trình dùng nguồn dinh dưỡng từ ngô hoặc giàu carbohydrate, sống trong các cộng đồng ít vận động, đông đúc tạo điều kiện cho quá trình gia tăng tỷ lệ mắc các bệnh truyền nhiễm. Bằng chứng về DNA của *M. tuberculosis* đã được phát hiện trên xác ướp ở Peru khi phân tích dựa trên kỹ thuật gene vào năm 1990 cũng như sau đó ở châu Mỹ và châu Âu giúp định hình lại cách về bệnh truyền nhiễm xuất hiện. (Arriaza, Salo, Aufderheide, & Holcomb, 1995; Salo, Aufderheide, Buikstra, & Holcomb, 1994, Klaus et al., 2010, Mays, Taylor, Legge, Young, & Turner-Walker, 2001). Câu hỏi về vi khuẩn gây bệnh đã tiến hóa và truyền sang người ở đâu, khi nào và như thế nào. Hoặc, mầm bệnh lần đầu tiên tiến hóa ở

người và sau đó chuyển sang động vật. Kinh nghiệm nghiên cứu về một loạt các bệnh truyền nhiễm ngày nay chỉ ra động vật là nguồn gốc của vi khuẩn gây bệnh. Đối với bệnh lao, từ lâu người ta đã biết rằng *M. bovis* là mycobacterium gây bệnh gây bệnh ở gia súc. Con người rất nhạy cảm với mầm bệnh, liên quan đến sự lây lan từ gia súc sang người qua không khí hoặc tiêu thụ thịt và các sản phẩm từ sữa. Do đó, có vẻ như trong thời kỳ đồ đá mới, dư thừa sản lượng từ thực vật đã giúp con người thuần hóa động vật tạo điều kiện quá trình chuyển đổi tiến hóa từ *M. bovis* sang *M. tuberculosis*. Tuy nhiên, bằng chứng về phân tích cây phát sinh loài dựa trên bộ gen của trực khuẩn đại diện cho một loạt các chủng loài mycobacteria cho thấy *M. tuberculosis* rõ ràng không tiến hóa từ *M. bovis*. Hơn nữa, mầm bệnh *M. tuberculosis* liên quan đến con người có khả năng có thời gian cổ xưa đáng kể, trước khi con người đến Tây bán cầu (Bos et al., 2014). Cụ thể đối với châu Mỹ, Bos và các cộng sự (2014) đã xác định thành công bộ gen *M. tuberculosis* tại hệ thống thoát nước sông Osmore ở Peru (khoảng 750–1350 sau Công nguyên). Trong khi hồ sơ bệnh học chứng minh rằng về sự hiện diện của bệnh lao với thời gian lưu hành tại châu Âu trước khi thuộc địa hóa. Một điều quan trọng không thể bỏ qua đó là chúng thấy quần thể con người thời xưa giống với chủng ghi nhận ở hải đảo và sự tử biến hơn là chủng quần thể người. Điều đó tạo ra bức tranh khác về phát sinh loài cho thấy *M. tuberculosis* có nguồn gốc từ động vật có vú biển và sau đó được truyền sang người. Điều này cần nhiều bằng chứng hơn để khẳng định do sự không chắc chắn của cây phát sinh loài. Tuy nhiên việc hình thành xã hội loài người sống trong không gian hẹp tại các khu định cư tạo điều kiện lây truyền dịch bệnh trong cộng đồng là điều được cộng đồng các nhà khoa học thừa nhận.

### 0.1.c 1.1.3 Hợp chất có hoạt tính sinh học

Thực vật đóng vai trò quan trọng trong chăm sóc sức khỏe cộng đồng từ thời xưa và ngay cả bây giờ. Các ghi dấu đầu tiên của loài người được khẳng định là các bản giấy cói của người Ai Cập cổ đại đã chứa thông tin ghi hướng dẫn sử dụng rau mùi và dầu thầu dầu để làm dược phẩm, mỹ phẩm và chất bảo quản. [1] Trong thời kỳ Hy Lạp và La Mã, Hippocrates, Theophrastus, Celsus, Dioscorides và nhiều người khác đã tập hợp hàng ngàn công dụng chữa bệnh của thảo mộc trong các bản thảo quan trọng nhất của loài người. [2] Tại Việt Nam, Tuệ Tĩnh Thiền Sư thời nhà Trần đã biết trồng cây dược liệu và tập hợp các kinh nghiệm dân gian thành Hồng Nghĩa

giác tử y thư tập hợp được 500 vị thuốc Nam với châm ngôn Nam dược trị Nam nhân. Đến thời Trình-Nguyễn phân tranh, Hải Thượng Lãn Ông (tên tự Lê Hữu Trác, 1720-1791) đã tiếp tục phát huy và tập hợp thành cuốn Hải Thượng y tông tâm lĩnh. Tuy nhiên mãi tới thế kỷ 18, chuyên ngành dược liệu với thuật ngữ pharmacology mới được định hình. Vào khoảng giữa 1803-1805, nhà dược học người Đức Friedrich Serturmer (Figure 3) đã phân lập được hợp chất morphine - một alkaloid có tác dụng giảm đau từ nhựa quả của cây thuốc phiện (*Papaver somniferum*). Từ đó, nhân loại chuyển sang thời kỳ sử dụng các hợp chất có hoạt tính sinh học từ thực vật trong phòng và chữa bệnh. Trong giai đoạn này, Heinrich Emanuel Merck (1794-1855) người khai sinh ra hãng dược phẩm Merck cũng như tạo nền tảng cho công nghiệp dược đã thương mại hóa hợp chất này vào năm 1827. Từ giai đoạn này, loài người đã xuất hiện khái niệm về các hợp chất có hoạt tính sinh học từ thực vật. Khái niệm này mở rộng thêm các hợp chất tự nhiên có tác dụng sinh học khi vào năm 1928 Alexander Fleming (1881-1955) đã khám phá ra kháng sinh penicillin từ nấm. Trong tài liệu này, các hợp chất tự nhiên được đề cập chỉ giới hạn trong thực vật mặc dù các kỹ thuật có thể áp dụng trên các chuyên ngành khác.

```
from rdkit import Chem
from rdkit.Chem import Draw

# Tên SMILES của morphin
smiles = "CN1CCC[C@H]2[C@@H]3CC=C4C(=O)CC[C@]5(C)[C@H](O)CC[C@]12C3=C[C@H]45"

# Tạo đối tượng Mol từ tên SMILES
mol = Chem.MolFromSmiles(smiles)

# Vẽ cấu trúc hóa học và lưu thành tệp ảnh
img = Draw.MolToImage(mol)
img.save("../graphics/morphine_structure.png")
```

Figure 2



Figure 3: Năm 1804, dược sĩ người Đức Friedrich Serturmer đã phân lập được morphine từ nhựa cây thuốc phiện (*Papaver somniferum*). Đây được coi là hợp chất đầu tiên phân lập từ thực vật và hãng dược phẩm Merck đã bắt đầu thương mại hóa hợp chất này từ năm 1827. Tên của hoạt chất này theo tiếng Latin là *morphium* biến thể từ tên của một vị thần giấc mơ trong tiếng Hy Lạp *Morpheus*.

Các hợp chất có hoạt tính sinh học từ thực vật là nhóm các chất chuyển hóa bậc hai và có tác dụng dược lý cũng như có thể gây độc trên động vật và con người. Quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa bậc hai trong thực vật diễn ra như là kết quả của quá trình trao đổi chất với nguyên liệu đầu vào gồm các hợp chất bậc một liên quan đến sự tăng trưởng và phát triển của thực vật. Do đó, các hoạt chất có hoạt tính sinh học thường được coi là sản phẩm phụ của quá trình chuyển hóa tế bào thực vật. [3] Mặc dù không đảm nhận vai trò dinh dưỡng nhưng các hợp chất này cũng có thể đóng vai trò quan trọng đảm bảo sự phát triển của thực vật, ví dụ. [4]

- Quá trình quang hợp, các flavonoid đóng vai trò như các hợp chất chặn gốc tự do;
- Terpenoid tạo ra mùi hương cho hoa để thu hút các loài đến thụ phấn hoặc hương vị cho quả để phát tán hạt;
- Các alkaloid thường tạo ra độc tính để xua đuổi hoặc ngăn chặn côn trùng và các động vật ăn cỏ.

Cây lương thực và thực phẩm đều tạo ra các hợp chất có hoạt tính sinh học nhưng nồng độ thấp hơn so với cây thuốc hoặc cây có độc. [5], [6] Các nghiên cứu đều xác nhận rằng các hợp chất chuyển hóa bậc hai này có tác dụng bảo vệ sức khỏe con người và là yếu tố chính của một chế độ ăn uống lành mạnh. Chúng cũng có tác dụng hữu ích trong ngăn ngừa các bệnh tim mạch, viêm nhiễm, rối loạn lipid và béo phì. [7] Ví dụ nổi bật nhất chính là vai trò của hợp chất tự nhiên trong giải thích bí ẩn về sức khỏe của người Pháp. (French Paradox) Hiện tượng này được các nhà dịch tễ người Pháp phát hiện ra vào thập niên 1980 khi tỷ lệ tử vong do bệnh tim mạch và vành tại Pháp thấp mặc dù chế độ ăn giàu chất béo bão hòa và cholesterol. Qua nhiều nghiên cứu,

giả thuyết được nhiều nhà khoa học đồng tình là do thói quen sử dụng rượu vang. Trong rượu vang có nhiều flavonoids, đây là nhóm hợp chất tự nhiên có vai trò ức chế quá trình oxy hóa các lipoprotein khối lượng phân tử bé (Low density lipoprotein), ngăn ngừa quá trình lipid bị oxy hóa và giảm thiểu hình thành xơ vữa mạch. Ngoài ra, rượu vang đỏ cũng chứa nhiều polyphenol từ vỏ quả nho cũng có tác dụng chống oxy hóa mạnh. Tuy nhiên, điều này là chưa đủ bằng chứng để giải thích. Các nhà khoa học cũng đồng thuận rằng sự kết hợp giữa uống rượu vang và chế độ ăn Địa Trung Hải mới tạo ra được hiệu quả thực sự. Nồng độ Catechin trong huyết tương- một flavonoid có tác dụng chống oxy hóa mạnh- của chế độ ăn có trái cây, rau không rượu cao gấp ba lần khi so với chế độ ăn không trái cây, rau hay rượu và cao gấp bốn lần chế độ ăn có rượu vang đỏ nhưng không có rau và trái cây. [8], [9] Từ đó cho thấy hợp chất tự nhiên là một thành phần quan trọng trong chế độ ăn uống của con người và quá trình chiết xuất các hợp chất này cần được quan tâm.

## 0.2 1.2 Phân loại các hợp chất từ tự nhiên

Cách phân loại các hoạt chất có hoạt tính sinh học từ thực vật có thể dựa trên các tiêu chí như lâm sàng, độc tính, dược lý hoặc thực vật học. Nhìn chung, mối liên hệ giữa cấu trúc và tác dụng sinh học nhiều khi không rõ ràng, thậm chí, các loài mặc dù có mối liên hệ di truyền nhưng tạo ra các phân tử có hoạt tính sinh học không giống nhau, dẫn tới cách phân loại trên không đạt hiệu quả như mong đợi. [3] Cách phân loại dựa trên cấu trúc hóa học và con đường sinh hóa sẽ tốt hơn. Theo Croteau *et al.* [10] và Taiz *et al.*, [11], các hợp chất có hoạt tính sinh học từ các nguồn thực vật có thể phân loại thành:

- Terpen và terpenoid (khoảng 25.000 hợp chất) được tạo ra bởi con đường acid mevalonic và non-mevalonate (MEP);
- Alkaloid (khoảng 12.000 hợp chất) được sản xuất thông qua con đường acid shikimic và;
- Hợp chất phenolic (khoảng 8000 hợp chất) được sản xuất bởi con đường acid malonic và acid shikimic.

### 0.2.a 1.2.1 Nhóm Terpenes

Trong số các hợp chất tự nhiên, terpenoid chiếm nhóm lớn nhất với cấu trúc hóa học được cấu thành từ các isoprene. Khoảng 25.000 hợp chất được xác định thuộc nhóm này có vai trò chính bảo vệ thực

vật khỏi các tác nhân gây hại đồng thời cũng có nhiệm vụ thu hút côn trùng tới thụ phấn. [12] Với y học và công nghệ sinh học, các terpenoid có tác dụng dược lý rộng từ chống viêm, kháng khuẩn tới ức chế tế bào ung thư hay kích thích trao đổi chất. Có hai con đường chính để sinh tổng hợp ra terpen trong thực vật gồm con đường acid mevalonic và con đường không acid mevalonic thông qua deoxyxylulose phosphate. Con đường acid mevalonic được tiến hành trong tế bào chất và ty thể của tế bào thực vật, ở đó, các hợp chất khác nhau được tổng hợp cụ thể gồm sterol, sesquiterpenes và ubiquinones. [13] Trong khi con đường không acid mevalonic thông qua deoxyxylulose phosphate được diễn ra tại plas-tid của tế bào thực vật và điều chế các hợp chất như hemi-, mono-, sesqui- và diterpenes, ngoài ra carotenoid và nhóm phytol của chất diệp lục. [14]

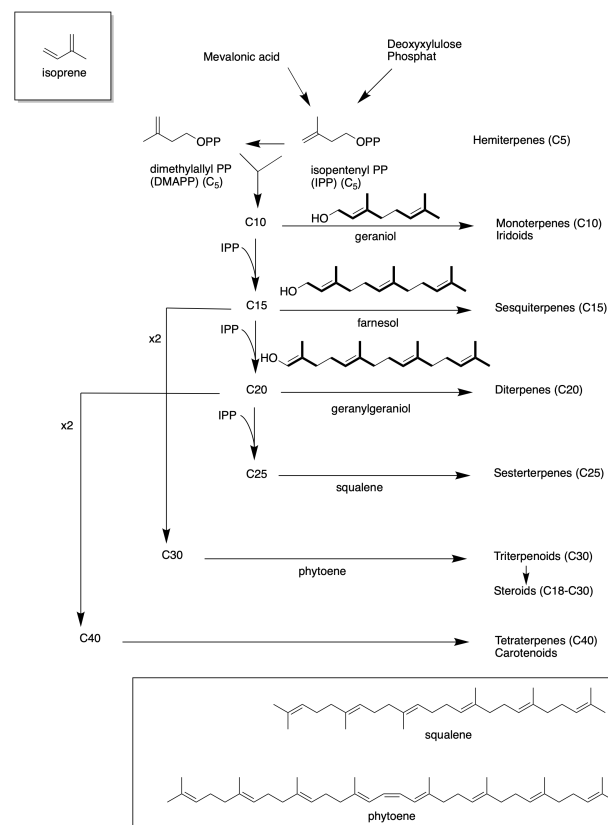


Figure 4: Cấu trúc hóa học của isoprene và con đường sinh tổng hợp thành các nhóm của terpenoid.

Nếu dựa trên số đơn vị isoprene, terpen có thể chia thành các nhóm nhỏ hơn gồm các hemi-, mono-, sesqui-, di-, sester-, triterpen. Nhóm monoterpene là thành phần chính trong các tinh dầu với đặc trưng là nhóm mạch hở geraniol, linalool và myrcene hoặc mạch vòng camphor, menthol, limonene và pinene. Với nhiệt độ sôi cao hơn, nhóm diterpen mặc dầu có thể thu được bằng phương pháp cất kéo hơi nước giống monoterpene nhưng không bay hơi ở nhiệt độ

phòng và coi là thành phần của nhựa thực vật. Nhóm sesquiterpene với ba đơn vị isoprene thường là ở dạng hai hoặc ba vòng. Farnesol là một sesquiterpene mạch hở quan trọng của quá trình tổng hợp terpen. Arteether là sesquiterpene lactone có nguồn gốc từ *Artemisia annua* (Thanh hao hoa vàng) có tác dụng điều trị sốt rét. Triterpenes với số Carbon chủ yếu bằng 30 tạo thành từ sáu đơn vị isoprene thông qua quá trình đóng vòng squalene. Những hợp chất như vậy có điểm nóng chảy cao hơn, không màu, ở dạng rắn và chủ yếu được tìm thấy trong nhựa thực vật, lớp bần, và cu-tin. Các Steroid, saponin và glycoside tìm thuộc nhóm này thường có hoạt tính sinh học mạnh. Từ hạt của *Azadirachta indica* (cây Nem, sầu đầu) chiết được nimbolide có khả năng diệt tế bào ung thư vú mạnh thông phân giải protein. Cucurbitacin được phân lập từ họ Cucurbitaceae năm 1954 tạo ra vị đắng, có tác dụng diệt côn trùng và ức chế tế bào ung thư. Các steroid thực vật là dạng chuyển đổi của triterpene có chứa hệ thống vòng bốn của lanosterol nhưng thiếu ba nhóm methyl tại vị trí C4 và C14. Diosgenin là nguồn nguyên liệu quan trọng của công nghiệp hóa dược, ước tính 60% thuốc nhóm steroid như thuốc chống viêm cortison, progesterone, hydrocortison hay progesteron, testosterone được bán tổng hợp từ hoạt chất này. Diosgenin có thể chiết từ các loài thuộc chi Dioscorea (Họ Dioscoreaceae). [15] Khi gắn thêm mạch đường vào triterpen sẽ tạo thành nhóm phổ biến khác trong thực vật là triterpen saponin. Một số tác dụng của dược liệu đã được chứng minh là do nhóm triterpen saponin tạo ra như *Glycyrrhiza glabra* (cam thảo), *Panax ginseng* (nhân sâm), *Hedera helix* (thường xuân). Glycyrrhizins là dạng muối của amoni và canxi của acid glycyrrhizic, và trên thang đo độ ngọt, chúng ngọt hơn 50-100 lần so với đường. [16]

### 0.2.b 1.2.2 Nhóm Alkaloids

Các alkaloids là những hợp chất dị vòng có chứa nitơ thường có hoạt tính sinh học mạnh và vị đắng (có một số ngoại lệ như capsaicin từ ớt có vị cay). Hiện tại, 12.000 alkaloid được phân lập và xác định cấu trúc hóa học từ khoảng 150 họ. Các họ thực vật bậc cao quan trọng với ngành dược gồm Papaveraceae, Apocynaceae, Ranunculaceae, Fabaceae, Rubiaceae, Solanaceae, và Rutaceae trong khi thực vật bậc thấp và nấm ít phổ biến hơn (alkaloid nấm cựa gà). [17] Về cấu trúc hóa học, các alkaloid trong tự nhiên tạo dạng muối với một số acid hữu cơ như acid malic, oxalic, lactic, citric, tannic, tartaric. Với một

số alkaloid dạng base yếu như nicotin sẽ ở dạng tự do. Một số alkaloid ở dạng glycoside khi gắn với một số mạch đường tạo thành từ các đường đơn như galactose, glucose và rhamnose như solanine. Chúng cũng ở dạng amid (piperine) hay dạng ester với acid hữu cơ (cocaine và atropine). [18] Nhiều bộ phận khác nhau của thực vật chứa alkaloid chẳng hạn trong hạt cây *Strychnos nuxvomia* (mã tiền) chứa nhiều strychnine, brucine, trong rễ cây *Coptis chinensis* (hoàng liên bắc) chứa berberin, trong vỏ thân cây *Holarrhena pubescens* (mộc hoa trắng, mộc hoa trắng) có chứa conessin. Alkaloid xuất hiện trong cây hai lá mầm so với cây một lá mầm. Thực vật chứa alkaloid thường được quan tâm do tác dụng dược lý mạnh và bản thân các alkaloid cũng có tác dụng sinh học. Ví dụ phổ biến nhất là vinblastine chiết từ *Catharanthus roseus* (cây dừa cạn) được sử dụng làm thuốc điều trị ung thư như ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư não, u ác tính hay ung thư tinh hoàn. Thuốc giảm đau morphine và codeine phân lập từ nhựa cây *Papaver somniferum* (thuốc phiện, anh túc). Thuốc giãn cơ tubocurarine sử dụng trong phẫu thuật được phân lập từ vỏ cây *Chondrodendron tomentosum*. Caffeine từ quả cà phê, trà cùng với nicotin từ thuốc lá có ảnh hưởng đến thần kinh trung ương được sử dụng trong chế phẩm nhai, hút. [19] Mối liên hệ giữa cấu trúc hóa học, sinh tổng hợp trong họ thực vật và tác dụng sinh học của các alkaloid cũng tương đối là rõ ràng. Ví dụ nhóm alkaloid tropane được tìm thấy nhiều trong họ Solanaceae ở *Atropa belladonna*, *Datura spp.*, và *Hyoscyamus niger* đều thể hiện tác dụng kháng cholinergic, làm giảm co thắt cơ trơn, giảm đau và tăng tiết. Bên cạnh tác dụng điều trị, alkaloid cũng gây ra độc tính và thường xuất hiện trong thực phẩm và thực phẩm bổ sung. Nổi bật là các alkaloid nhóm pyrrolizidine xuất hiện trong ba họ thực vật Asteraceae (họ cúc), Boraginaceae và Leguminosae (Fabaceae) có thể gây độc trên phổi và gan. Năm 1997, FDA Hoa Kỳ đã công bố quy định hướng dẫn về thực hành sản xuất tốt (GMP) theo đó các nhà sản xuất cần phải cải thiện sản phẩm để giảm thiểu sự xuất hiện của nhóm pyrrolizidine.



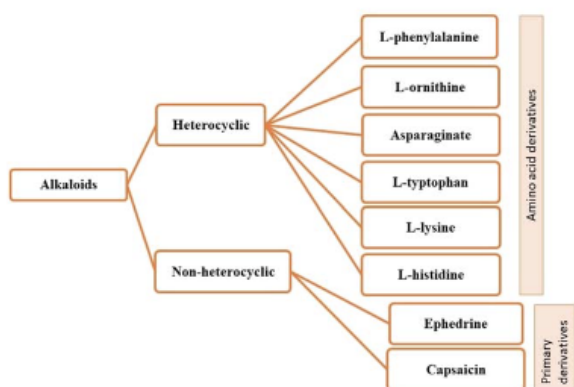


Figure 5: Phân loại alkaloid từ thực vật.

### 0.2.c 1.2.3 Polyphenols

Polyphenol là các chất chuyển hóa bậc hai trong thực vật. Với gần 8000 hoạt chất đã được phân lập và xác định cấu trúc. Chúng có thể phân thành các nhóm nhỏ hơn dựa trên số vòng phenol và các nhóm thế. Các nhóm nhỏ hơn bao gồm các acid phenolic phenolic (acid hydroxycinnamic và acid hydroxybenzoic), flavonoid (flavonol, flavanol, flavanone, flavon, proanthocyanidin và isoflavone), tanin, stilben và lignan. [4], [20] Đơn vị cấu tạo của polyphenol từ một vòng thơm gắn với một nhóm OH hoặc nhóm carbonyl. [21] Hầu hết, các hợp chất polyphenolic được sinh tổng hợp thông qua con đường shikimate như flavonoid, stilben, xanthon, nhưng đôi khi thông qua con đường polyketide ví dụ orcinol và quinon. [22] Các polyphenol có thể tập trung tìm thấy trong các bộ phận của thực vật như lá, vỏ cây, hoa, và quả. [23] Với thực vật, các polyphenol có vai trò tạo màu sắc, mùi vị và tạo nguồn dinh dưỡng tại quả. [24]

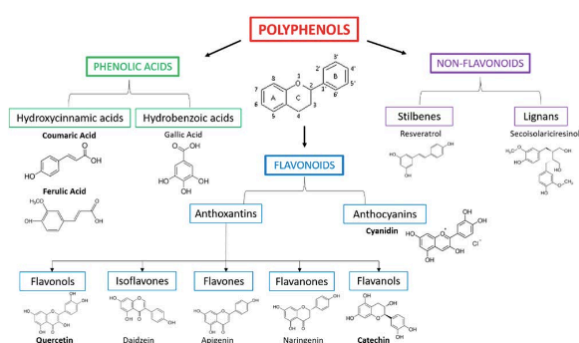


Figure 6: Phân loại polyphenol từ thực vật.

Nhóm polyphenol quan trọng đầu tiên cần đề cập tới là các flavonoid. Đây là nhóm hợp chất được tạo bởi hai vòng pheonlic nối với nhau thông qua một cầu 3 carbon và thường ở dạng glycoside. Bất cứ hợp chất flavonoid nào đều có hoạt tính chống oxy hóa. Ngoài ra khả năng chống viêm và ức chế tế bào ung

thư cũng là tính chất đặc trưng của nhóm này. Các khung isoflavone hay còn gọi là phytoestrogen (thực vật nữ sắc tố) có thêm tác dụng giống như hormon nội sinh estrogene và sử dụng những thực vật chứa nhóm này sẽ có lợi trong quá rối loạn quanh và hậu mãn kinh. Nguồn cung cấp isoflavone thường đến từ họ Fabaceae (họ Đậu) như đậu tương, đỗ xanh, đỗ đen. Một số hoạt chất đại diện cho nhóm này như genistein và daidzein được các nhà khoa học quan tâm để phân lập, làm giàu hay làm chất chuẩn để giám sát chất lượng sản phẩm. [25]

Tanin là hợp chất cao phân tử có cấu trúc hóa học phức tạp thuộc nhóm polyphenol. Dựa trên cấu trúc hóa học, tanin chia thành hai nhóm gồm ngưng tụ và nhóm thủy phân. Nhóm ngưng tụ là một cao phân tử chứa các đơn vị flavonoid trong cấu trúc của chúng trong khi nhóm thủy phân được cấu tạo từ trung tâm là một đường đơn (thường là glucose) tạo liên kết của các nhóm OH với dẫn xuất của catechin hoặc acid pheonlic. Độ tan của tanin phụ thuộc vào kích thước phân tử. Tanin thường sẽ cản trở quá trình hấp thu dinh dưỡng do khả năng tạo liên kết với protein và khoáng chất trong khi tanin có khối lượng phân tử lớn hơn sẽ có khả năng làm săn se ứng dụng trong điều trị một số bệnh như tiêu chảy, tăng tiết dịch hoặc chảy máu. Tanin xuất hiện trong hầu hết thực vật nhưng họ thực vật được quan tâm trong dược liệu gồm Fagaceae (họ Sồi) và Polygonaceae (Họ rau răm). [26]

Phân nhóm có hoạt tính sinh học mạnh thuộc phenol cuối cùng đề cập là các lignan. Đây là nhóm với cấu trúc hóa học tạo thành từ các Lignans chứa các nhóm chức năng khác nhau và bao gồm hai đơn vị phenylpropanoid ghép nhau và thường có 18 carbon. Các hợp chất này xuất hiện trong màng tế bào và thường tan trong dung môi hữu cơ không phân cực. Lignans giống như isoflavone xếp vào nhóm các hợp chất phytoestrogen. Chúng xuất hiện nhiều trong thực phẩm hàng ngày như lúa mạch, lúa mì, hạt vừng. Các hoạt chất thường hay gặp trong chế ăn hàng ngày của con người là secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, pinoresinol và syringaresinol. Khi ăn vào, secoisolariciresinol và matairesinol được chuyển đổi thành enterodiol và enterolactone (hai lignan do động vật có vú sinh tổng hợp ra) nhờ các enzym của vi sinh vật trong ruột kết. Enterodiol và enterolactone giúp cơ thể bảo vệ chống lại các bệnh tim mạch, ung thư vú và ung thư tiền liệt tuyến thể liên quan tới hormon. Chế độ ăn giàu lignan cũng giúp tỷ lệ ung thư thấp, điều này

đã được công bố trong nghiên cứu tại Đan mạch trên 875 phụ nữ mãn kinh. Các phụ nữ ăn nhiều ngũ cốc nguyên hạt sẽ có nồng độ enterolactone trong máu cao hơn đáng kể. Trong khi đó, nồng độ enterolactone cao sẽ tỷ lệ nghịch với bệnh tim mạch. [27]

#### 0.2.d 1.2.4 Nhóm chất khác

Protein thực hiện một vai trò cực kỳ quan trọng đối với cuộc sống. Khi protein hấp thụ vào cơ thể từ mô ruột sẽ cung cấp các khối cơ bản để xây dựng cấu trúc cơ thể. Nhưng cũng có những protein đóng vai trò như một hoạt chất cao phân tử có hoạt tính sinh học. [28] Các protein này khi hấp thu qua đường tiêu hóa sẽ không bị thủy phân mà hấp thu vào máu và duy trì chức năng đặc biệt trong cơ thể. Ví dụ, ricin chiết xuất từ hạt cây *Ricinus communis* (đậu thầu dầu) thuộc họ Euphorbiaceae (Họ Thầu dầu) gây độc tính cấp trên cơ thể với triệu chứng ói ra máu, hoại tử, suy thận và trụy tim mạch. [29] Glycoside là một nhóm lớn gồm aglycone liên kết với phần đường trong đó aglycone là nhiều loại chất chuyển hóa thứ cấp khác nhau. Glycoside Cyanogen, glycoside tim, glycoside anthraquinone, saponin và glucosinolate là một số nhóm glycoside chính. Flavonoid cũng được tìm thấy dưới dạng glycoside. Sử dụng theo đường tiêu hóa, các glycoside bị thủy phân ở phần ruột kết và các glycoside kỵ nước hơn (aglycone) có thể được hấp thụ. [30] Các hợp chất có tác dụng sinh học mạnh thuộc nhóm này cần đề cập đầu tiên là các glycoside tim với phần aglycones có cấu trúc là steroid. Các hoạt chất nhóm này có thể ức chế các bơm  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase hoạt động trên màng tế bào cơ tim. Digoxin chiết xuất từ cây *Digitalis spp.* (mao địa hoàng) hoặc Neriolin từ lá cây *Nerium Oleander* (lá trúc đào) có tác dụng trên tim điều trị một số bệnh như chậm nhịp tim. Nhóm tiếp theo là các glycoside cyanogen có gốc aglycone là các acid amin. [31]

Suy giáp có thể xuất hiện nếu sử dụng cao chiết có nhóm hoạt chất này do có thể cản trở việc hấp thu Iod. Nếu các acid amin trong phần alycone có chứa lưu huỳnh thì các hoạt chất này thường sẽ có mùi hăng. Tại cấp độ tế bào, chúng giúp giảm độc tính của các chất gây ung thư tại gan thông qua một quá trình phức tạp ảnh hưởng đến các cytochrom P450. Nhóm cuối cùng là các saponin với aglycone thuộc nhóm triterpen. Các saponin có đặc tính nhũ hóa liên quan đến phần đường có khối lượng phân tử lớn thân nước và phần aglycone kỵ nước.

### 0.3 1.3 Tầm quan trọng của quá trình chiết xuất

Quá trình chiết xuất là giai đoạn quan trọng trong nghiên cứu và phát triển sản phẩm từ dược liệu khi tác động đáng kể đến kết quả cuối cùng. Sản phẩm quá trình chiết xuất là hỗn hợp các hoạt chất với cấu trúc hóa học đa dạng với tiềm năng tác dụng sinh học khác nhau. Nồng độ từng hoạt chất trong hỗn hợp chiết được là khác nhau. Trong trường hợp nồng độ hoạt chất quan tâm có nồng độ thấp trong dược liệu có thể cần thêm quá trình xử lý để làm giàu hàm lượng. Khi đó, công nghệ sản xuất phức tạp và thường dẫn tới chi phí tăng cao hơn ban đầu. [32] Mặc dù các kỹ thuật sắc ký và phương pháp quang phổ cũng đóng góp vai trò lớn trong phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hoạt chất nhưng quá trình chiết xuất đòi hỏi tới hai phần ba về thời gian, nguồn nhân lực và chi phí của một dự án phát triển sản phẩm từ dược liệu thành công. [33] Nhưng khó khăn về đa dạng thành phần trong dược liệu cộng thêm lựa chọn được hợp chất có tác dụng sinh học đích đã thúc đẩy các công nghệ chiết xuất mới để tối ưu hóa quy trình nghiên cứu và sản xuất. Hiện nay, nhiều nhà nghiên cứu đang phát triển các phương pháp khác nhau để sàng lọc các cao chiết có hoạt tính sinh học từ các nguồn tự nhiên ứng dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh khác nhau của con người. Hiệu quả của các hỗn hợp này khi tương tác với các đích phân tử sinh học bao gồm enzyme và protein sẽ cung cấp các bằng chứng cho phép sử dụng cao chiết từ thực vật trong các liệu pháp điều trị. [34] Do đó, với mục đích này, chiết xuất các phân tử có hoạt tính sinh học từ các nguồn thực vật cùng xây dựng tiêu chuẩn kiểm nghiệm bao gồm định tính và định lượng là rất quan trọng để phát triển thuốc mới từ dược liệu. [35] Theo UNESCO, 80% dân số chủ yếu đang sinh sống tại các nước đang phát triển phụ thuộc vào sử dụng các sản phẩm từ dược liệu để chăm sóc sức khỏe. [36] Với hàng nghìn các hợp chất hóa học có thể hiện diện trong dược liệu, phổ tác dụng của sản phẩm từ dược liệu rất đa dạng từ điều trị các bệnh truyền nhiễm cho tới hoạt tính sinh học có lợi như chống oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn, chống ung thư, giảm đau. [37]

Từ cao chiết từ thực vật, ngành công nghiệp thực phẩm đang tập trung sản xuất và phát triển các sản phẩm bảo vệ sức khỏe với sự quan tâm ngày càng tăng của người tiêu dùng. Nhìn chung, các sản phẩm này bao gồm nhiều loại với tỷ lệ các hợp chất có hoạt tính sinh học khác nhau. [38] Chúng có thể được gắn



nhân mác khác nhau trên thị trường như sản phẩm bảo vệ sức khỏe, thực phẩm chức năng, thực phẩm bổ sung. Tuy nhiên, các sản phẩm này có thể hiểu là một sản phẩm mới trong đó thành phần được cấu tạo từ các hợp chất có hoạt tính sinh học, tác dụng từng hợp chất riêng lẻ có thể giống nhau hoặc khác nhau. [39] Plaza *et al.* [40] đã đề cập tới ba yếu tố chính cần phải có trong sản phẩm bảo vệ sức khỏe từ thực vật. Trước hết, tác dụng của chúng phải khác so với chế độ ăn thông thường. Thứ hai, chúng phải có dữ liệu tin cậy về việc không có bất kỳ tác dụng có hại nào. Và cuối cùng, chúng sẽ có lợi trong việc giảm nguy cơ tiến triển của bệnh lý và cũng sẽ giúp cải thiện chức năng sinh lý. Do đó, các hoạt chất có hoạt tính sinh học như kháng vi-rút, chống oxy hóa, hạ huyết áp, chống tiểu đường, *ldots* phải được chiết xuất từ nguồn thực vật sau đó sử dụng trong việc xây dựng công thức bào chế các sản phẩm bảo vệ sức khỏe khác nhau vì thực tế không có một hoạt chất toàn năng. Điều cần lưu tâm trong phát triển các sản phẩm dạng này cần phân biệt giữa tác dụng và chỉ định. Các sản phẩm bảo vệ sức khỏe có thể được chỉ định dựa trên tác dụng ví dụ giúp giảm cholesterol máu, chống ung thư, giảm tình trạng không dung nạp đường sữa, hoặc giảm tiêu chảy nhanh hơn. [41]–[43] Trên thị trường, chúng có thể bán dưới dạng sản phẩm thông thường như bánh, đồ uống hay gói ngũ cốc hoặc áp dụng bào chế của thuốc để chuyển dạng. Trong đó, dạng đồ uống thường tiện lợi hơn do dễ xử lý, chế biến và pha chế so với các loại khác.

#### 0.4 1.4 Một số dung môi phổ biến dùng trong chiết xuất

Các kỹ thuật thông thường để chiết xuất được liệu bao gồm chiết xuất lỏng-lỏng hoặc rắn-lỏng, chiết xuất Soxhlet, ngâm và cắt kéo hơi nước. Trong đó phương pháp chiết sử dụng Soxhlet được coi là truyền thống và lâu đời nhất. Điểm chung các phương pháp này đều phụ thuộc phần lớn lựa chọn đúng dung môi chiết xuất với mục tiêu thu được hợp chất mong muốn và cải thiện hiệu suất dựa trên tác động vật lý như nhiệt và/hoặc trộn. Tại thời điểm hiện tại, lý thuyết lựa chọn dung môi trong chiết xuất được liệu chỉ mang tính tương đối. Bảng dựa trên kinh nghiệm thể hiện nhóm hoạt chất kỳ vọng thu được từ dung môi chiết xuất. Các dung môi này phổ biến trong nghiên cứu và thường được áp dụng triển khai trong công nghiệp. Dung môi nước thường được ưu tiên sử dụng hơn nhưng sẽ hao tổn về năng lượng trong quá trình chiết xuất. Khi sử dụng

các dung môi, yêu cầu bắt buộc người lao động phải có kỹ năng cao vận hành thiết bị, xử lý sự cố cũng như giảm thiểu rủi ro trong quá trình sản xuất. Thêm nữa, áp dụng nội dung trong bảng cũng khá phức tạp nguyên nhân trong được liệu có thể chứa hàng trăm, hàng ngàn hoạt chất. Đặc biệt nhóm cao phân tử như tinh bột, polysacharride, protein có thể tạo lớp màng gây cản trở quá trình chiết xuất.

Gần đây một số thiết bị mới ra đời áp dụng tiến bộ về công nghệ để chiết xuất, có thể kể ra như chiết xuất siêu tới hạn, chiết lỏng có áp suất, siêu âm và vi sóng. Ngoài ra, quá trình chiết xuất có thêm sự hỗ trợ bởi xung điện trường và chiết xuất ohmic. Các phương pháp chiết xuất mới về cơ bản được sử dụng để tăng cường giải phóng các hợp chất từ tế bào thực vật. Hơn nữa, việc giảm sử dụng dung môi hữu cơ trong các phương pháp này làm cho chúng còn được gọi là phương pháp chiết xuất xanh. Một đặc trưng nữa của các phương pháp này làm giảm thời gian chiết xuất dẫn đến năng suất tốt hơn và chất lượng sản phẩm cuối cao hơn. Và dự đoán trong vài năm tới, những công nghệ này có thể phổ biến hơn do cách tiếp cận thân thiện với môi trường thúc đẩy ngành công nghiệp chế tạo dụng cụ để tăng năng suất và giảm chi phí.

#### 0.5 1.5 Phân đoạn bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng

Để thu được sản phẩm có chất lượng hơn, mẫu sau khi chiết xong có thể xử lý trước bằng phương pháp phân đoạn lỏng-lỏng. Đây là kỹ thuật tiền xử lý được sử dụng phổ biến nhất trong giai đoạn hiện tại. Quá trình phân đoạn có thể tách một nhóm chất ra khỏi mẫu ban đầu dựa trên độ phân cực của dung môi không đồng tan. (Figure 7) Nguyên lý phương pháp dựa trên một hoạt chất có xu hướng phân bố nhiều vào lớp dung môi có độ phân cực gần với hoạt chất hơn. Hệ quả là, hoạt chất có thể tách khỏi mẫu nền. Danh mục các dung môi không đồng tan với nhau được biểu diễn trong Figure 8. Hiệu quả của quá trình chiết phân đoạn lỏng lỏng ngoài lựa chọn hai dung môi không đồng tan, còn ảnh bởi pH, tỷ lệ giữa hai pha, số lần phân đoạn.

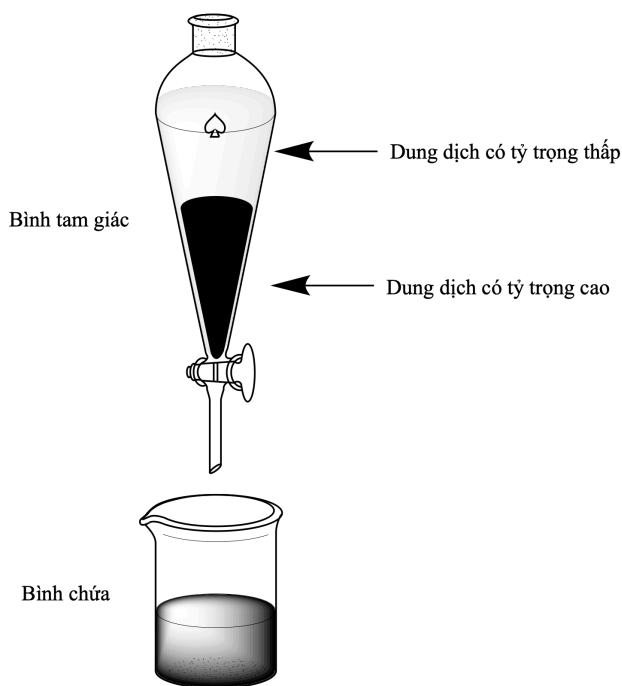


Figure 7: Chiết lỏng-lỏng.

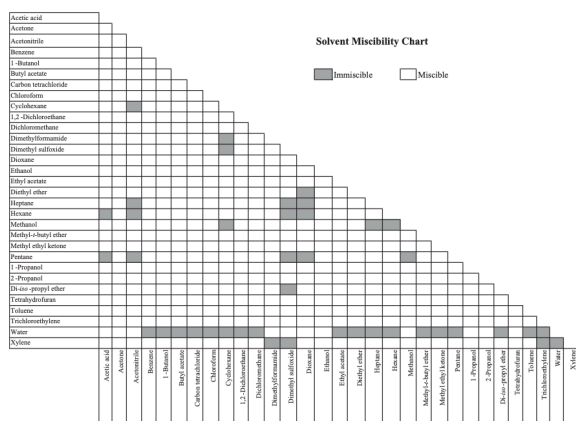


Figure 3.2. Solvent miscibility chart (modified from Phenomenex<sup>13</sup>).

Figure 8: Danh mục các dung môi không đồng tan với nhau.

Trong nghiên cứu các hợp chất tự nhiên để tạo cao chiết từ tác dụng sinh học để định hướng nhóm tác dụng trong thực vật, từ đó, phân lập và xác định cấu trúc hóa học của hoạt chất có tác dụng sinh học, quy trình mô tả dưới đây thường được áp dụng. Cao chiết từ thực vật sẽ được cô đặc để loại bỏ dung môi chiết. Cao này sẽ được tái phân tán vào trong nước với tỷ lệ thích hợp. Sau đó lắc phân đoạn lần lượt với các dung môi hữu cơ có độ phân cực tăng dần gồm *n*-hexan, Chloroform (khuyến cáo thay thế bằng Dichloromethanol), Ethyl acetat và *n*-butanol. Do các dung môi này không đồng tan với nước dẫn đến để một thời gian sau sẽ phân lớp. Các lớp dung môi giống nhau sẽ được gộp lại, loại bỏ dung môi để thu được cao chiết. Kết quả là nhóm chất không phân cực như chất béo, tinh dầu có xu hướng vào lớp dung

môi *n*-hexane, terpenoid và alkaloid dạng base xu xuống vào lớp Chloroform (Dichloromethanol), flavonoid xu hướng vào lớp Ethyl acetat trong khi saponin phân tốt trong *n*-butanol. Tuy nhiên, hợp chất tự nhiên đa dạng và trong hỗn hợp có xu hướng tương tác với nhau dẫn tới quy trình này chỉ định hướng chứ không đúng một cách tuyệt đối.

### Giới hạn của phương pháp

Kỹ thuật này cũng có một số nhược điểm ví dụ như quá trình vận hành thủ công, tốn công sức và thời gian do cần thời gian để phân lớp giữa lớp dung môi hữu cơ và lớp nước. Thêm nữa, các dung môi trên có thể gây vấn đề về sức khỏe với người vận hành, tốn kém và gây ô nhiễm môi trường. Để khắc phục một số kỹ thuật đã được đề xuất như tối ưu hóa quy trình để giảm mức sử dụng dung môi, giảm tiếp xúc với người lao động. [44], [45]

### Thiết bị cải tiến chiết lỏng-lỏng hồi lưu liên tục (Continuous liquid-liquid extraction)

Thiết bị cải tiến chiết lỏng-lỏng hồi lưu liên tục là sự kết hợp giữa quá trình chiết và bay hơi. Thiết bị đã thành công trong quá trình phân tích thực phẩm, dược phẩm và các mẫu lâm sàng nhưng giảm thiểu ô nhiễm. [45] Mẫu được phân tán vào trong nước đặt tại bộ phận chiết trong khi pha dung môi hữu cơ được nạp vào bộ phận có gia nhiệt. Tùy thuộc vào tỷ trọng giữa pha phân tán và pha dung môi hữu cơ mà chọn thiết bị như Figure 9. Pha dung môi hữu cơ hay pha chiết được gia nhiệt, dung môi sẽ bay hơi từ bộ phận gia nhiệt bốc hơi và ngưng tụ tại pha chiết theo từng giọt. Xuất hiện sự trao đổi hoạt chất giữa pha nước và pha hữu cơ xảy ra mà không cần khuấy trộn hay lắc để tăng sự tiếp xúc giữa hai pha dung môi không đồng tan. Pha hữu cơ sẽ phân lớp và sẽ hồi lưu lại bộ phận có gia nhiệt. Quá trình lặp đi lặp lại cho đến khi chiết phân đoạn kết thúc, nhóm chất cần phân tích sẽ tách ra khỏi mẫu nền và thu lại tại bình gia nhiệt. Thiết bị này cũng có khả năng giám sát chất lượng mẫu theo thời gian thực khi bắt cặp với hệ thống MS, theo thiết kế của Hui-Hsien Yang và cộng sự. [46]

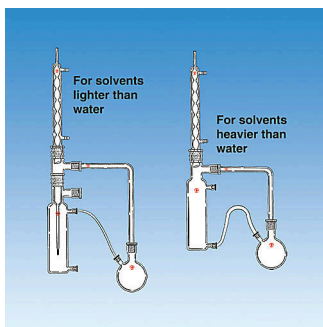


Figure 9: Thiết bị chiết lỏng lỏng dành cho dung môi nặng hơn nước và dung môi nhẹ hơn nước của hãng Thomas Scientific.

## 0.6 1.6 Ứng dụng cao chiết trong ngành dược

### 0.6.a 1.6.1 Cao chiết từ lá

Cao chiết từ lá đã được sử dụng để phòng và điều trị bệnh từ lâu. Ví dụ, cao chiết từ lá của loài *Olea europaea* (cây ô liu) để điều trị cảm lạnh và cúm đã được sử dụng trong y học phương Tây. Ngày nay, oleuropein, một seco-iridoid có khả năng kháng khuẩn, kháng viêm và chống oxy hóa đã tìm thấy trong cao chiết từ lá ô liu. Bảng dưới liệt kê một số trường hợp tác dụng sinh học của một số hoạt chất nằm trong cao chiết từ lá một số dược liệu cũng như cách chiết xuất. Cao chiết từ *Olea europaea* (cây ô liu) cũng chứa một số hoạt chất khác có tác dụng ức chế phát triển của virus và vi khuẩn. Chúng cũng xuất hiện trong lá. Viêm họng sử dụng cao chiết từ lá để súc miệng có thể giảm triệu chứng. Sử dụng cao chiết từ lá ô liu trong thời gian ngắn thường được cho là an toàn nhưng thời gian dài chưa được chứng minh đầy đủ. Bệnh nhân giai đoạn sớm của viêm khớp dạng thấp chiết xuất từ lá khô của ô liu cùng methotrexate trong 6 tuần thấy giảm tổn thương tế bào, khôi phục cân bằng chất chống oxy hóa, cải thiện khả năng ức chế IL-6. Tuy nhiên với bệnh nhân mắc viêm khớp lâu năm thấy không có tác dụng. [47] Cao chiết bằng dung môi Ethanol của lá ô liu xuất hiện một số nhóm nhất như phenolic, pentacyclic và alditols triterpenes, tất cả đều có hoạt tính sinh học. Triterpene chính được tìm thấy trong lá ô liu là acid oleanolic (3,0% - 3,5% DW), tiếp theo là acid maslinic và một lượng nhỏ erythrodil, acid ursolic và uvaol. [48] Trong những thập niên gần đây, các polyphenol trong lá của loài *Camellia sinensis* (trà xanh) thu hút được quan tâm của nhiều nhà nghiên cứu. Cao chiết trà xanh có hàm lượng cao của polyphenol, flavonoid, caffein, acid amin, acid phenolic (đặc biệt là acid hydroxybenzoic), carbohydrate, lipid và các

hóa chất dễ bay hơi. Nhóm Catechin, chẳng hạn như (-)-catechin (C), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-gallocatechin gallate (GCG), và (-)-gallocatechin (GC), là những thành phần polyphenol quan trọng nhất. [49] Dựa trên quá trình chế biến, ngoài trà xanh còn có trà đen và trà ô long. Trà đen thu được từ quá trình lên men của lá trà xanh và các catechin được chuyển đổi tạo ra màu sắc đen hơn cho sản phẩm. Quá trình này làm giảm đáng kể nồng độ catechin trong trà đen. Catechin, chẳng hạn như epigallocatechin và epigallocatechin gallate, có nhiều trong trà xanh. [50] Thành phần hóa học và tác dụng sinh học của nhụy, vòi hoa, đài hoa, áo hoa và lá của cây *Crocus sativus* (Cây nghệ tây) đã được xác định bởi Lahmass *et al.* Các đặc điểm sinh học của nhụy (gia vị nghệ tây) có liên quan đến hàm lượng cao của crocins. Mặc dù, tổng hàm lượng phenolic và flavonoid cao hơn nhưng hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết từ nhụy nghệ tây thấp hơn so với cao chiết từ lá và hoa. Hiện tại có ba cách giải thích cho những phát hiện này. Thứ nhất, lá có hàm lượng luteolin và dẫn xuất glycosyl cao bất thường. Thứ hai, lá có chứa kaempferol và dẫn xuất glycosyl. Và thứ ba, lá có hàm lượng cao các dẫn xuất glycosyl của spaths có chứa crocin và các dẫn xuất malvidin. [51] Lá cây *Beta vulgaris L.* (củ cải đường) thường bị bỏ đi tuy nhiên cao chiết từ lá chứa nồng độ cao phenolics, betacyanin và betaxanthin được chứng minh bởi Bengardino *et al.* [52] Betacyanins và betaxanthins (betalins) chứa nhóm nitơ và tan tốt trong nước có hoạt tính sinh học. Tương tự như vậy, lá *Curcuma longa L.* (cây nghệ) cũng bị loại bỏ nhưng các nghiên cứu thấy cao chiết từ lá nghệ an toàn dù chứa ít nitrat nhưng không chứa cyanua. Nếu sấy khô bằng vi sóng làm khô lá nghệ giúp tăng cường khả năng chống oxy hóa. Còn nhiều bằng chứng nữa tác dụng của cao chiết từ lá dược liệu có tiềm năng ngăn ngừa và điều trị bệnh. [53], [54]

### 0.6.b 1.6.2 Cao chiết từ hoa và quả

Dầu thu được từ hạt thực vật có nhiều ứng dụng trong đời sống hàng ngày cũng như trong dược phẩm. Đây có thể là sản phẩm phụ khi sử dụng trái cây hoặc thu được trực tiếp. Hạt chứa hàm lượng cao các hoạt chất có hoạt tính sinh học nếu so với các bộ phận khác từ quả và thường bị bỏ đi trong nông nghiệp. Nếu sử dụng hạt để chiết xuất sẽ giảm thiểu đáng kể các vấn đề rác thải nông nghiệp. [55] Bước tiền xử lý hạt cũng khá quan trọng. Hạt thu

về phải được rửa sạch, loại bỏ vỏ hạt, nghiền và sấy. Lớp màng xơ của hạt cũng cần loại bỏ vì chúng sẽ hút ẩm, lên men làm hỏng hạt. Nghiền hạt đảm bảo phá vỡ và giải phóng dầu. Bên cạnh đó, diện tích bề mặt tăng lên giúp dung môi tiếp xúc nhiều hơn với tế bào và cho phép nâng cao hiệu suất chiết. Tiền xử lý bằng vi sóng đã được chứng minh giúp cải thiện hiệu suất chiết dầu, nâng cao hàm lượng tocopherols và phytosterols. Tuy nhiên, do quá trình phân hủy, tiền xử lý hạt bằng vi sóng có thể làm giảm nồng độ acid béo không bão hòa đa. [56] Các ví dụ khác nhau về việc phân lập các hoạt chất từ dịch chiết của hạt thực vật được liệt kê trong Bảng dưới đây. Dầu thực vật từ lâu được xem là nguồn cung cấp các vitamin tan trong dầu và các acid béo thiết yếu, cũng như các thành phần hoạt tính sinh học khác bao gồm cả các hợp chất dễ bay hơi. Cao chiết từ hạt thường có hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm, ứng chế tế bào ung thư, kháng virus và hạ đường huyết. Hạ đường huyết của cao chiết từ hạt giúp kiểm soát đường huyết bằng cách ức chế enzym chuyển hóa carbohydrate. Nồng độ glucose máu tăng sau bữa ăn do các enzyme thủy phân như amylase hay glucosidase. Các phân tử tinh bột với khối lượng phân tử lớn không thể vượt qua màng ruột sẽ được thủy phân thành phân tử có khối lượng nhỏ hơn dựa trên các enzyme trên. Lượng đường trong máu sẽ tăng lên phụ thuộc vào tốc độ chuyển hóa. Nếu lượng đường dư thừa sẽ được cơ thể chuyển hóa lưu trữ trong tế bào dưới dạng glycogen nhờ các insulin. Nhờ khả năng ức chế enzyme glucosidase (98,4%) của cao chiết từ hạt *Swietenia macrophylla* (nhạc ngựa hay dái ngựa lá to, dái ngựa lá lớn, dái ngựa Brasil, dái ngựa Honduras) có tác dụng như một thuốc điều trị đường huyết. Tuy nhiên, tác dụng ức chế vừa phải hoạt động của enzyme amylase (34,9%). Khả năng ức chế virus của thảo mộc đóng vai trò quan trọng trong điều trị virus. Để thay thế các thuốc hóa dược, một số công ty có xu hướng sản xuất thuốc ức chế virus từ thảo mộc. Hoạt chất limonoid thu được từ hạt cây *Swietenia macrophylla* có tác dụng ức chế virus gây sốt xuất huyết, lây truyền rộng rãi ở châu Á. Cao chiết từ hạt nho chứa nhiều nhiều proanthocyanin đã được chứng minh có khả năng chống lại virus viêm gan A và virus Tulane khi kết hợp với xử lý nhiệt. [57] Một hoạt tính cần quan tâm cao chiết từ hạt là khả năng ức chế tế bào ung thư. Theo nghiên cứu, khoảng 70% polyphenol được tìm thấy với hàm lượng cao trong hạt nho có đặc tính gây độc tế bào. Khả năng ức chế sự phát triển tế bào ung thư biểu mô theo nồng độ và thời gian của hạt nho hiệu quả

hơn cao chiết từ vỏ nho. [58] Cao chiết từ hạt bơ có khả năng ức chế tế bào ung thư thông qua chung trình chết tế bào đã được chứng minh khi gây rối loạn chức năng ty thể với biểu hiện giải phóng ra các phosphatidylserine. Cao chiết từ Vỏ hạt cây *Paeonia obovata* (thảo thuộc dược) có khả năng kháng khuẩn Gram dương bao gồm *Staphylococcus aureus*. [59] Thành phần có hoạt tính trong hoa cũng được phân lập và xác định cấu trúc hóa học giống như trong hạt. Trigonelline, acid galic, caffein, acid protocatechuic, cũng như melanoidin thuộc nhóm phenolic của hoa cà phê. Nguyên *et al* đã sử dụng kỹ thuật xanh để sản xuất cao có hoạt tính sinh học với hàm lượng phenolic cao, melanoidin từ hoa cà phê. [60] Acid caffeic là thành phần acid hydroxycinnamic dồi dào nhất trong cao chiết này tiếp theo là acid chlorogen, acid ferulic và p-coumaric.

#### 0.6.c 1.6.3 Cao chiết từ vỏ thân

Tương tự như lá cây, vỏ thân cây cũng chứa một số hoạt chất giống như vậy. Bảng mô tả các ví dụ về chiết xuất cao chiết có hoạt tính từ vỏ thân cây. Theo y học cổ truyền, vỏ thân của nhiều loài thực vật được sử dụng để phòng và chữa bệnh. Ví dụ, vỏ cây thuộc chi *Salix* (chi liễu) đã được sử dụng để điều trị sốt, khó chịu và viêm trong hàng ngàn năm. Salicin, một hoạt chất có cấu trúc hóa học gần tương tự aspirin giúp giảm đau và viêm được tìm thấy trong vỏ cây thuộc chi này. Vỏ cây thuộc loài *Rhamnus purshiana* (cây hắc mai, cây hắc mai California) được sử dụng để điều trị táo bón và bệnh trĩ và trong một số liệu pháp điều trị hậu phẫu trực tràng trong quá khứ. Trong vỏ cây xuất hiện một số dẫn xuất anthra-noid có tác dụng nhuận tràng có cấu trúc hóa học ở dạng anthraquinone tự do, dianthrone, anthrone và/hoặc O- và C-glycoside. [61] Trong những thập kỷ gần đây, nhiều nhà nghiên cứu đã tiến hành phân lập các hợp chất có hoạt tính sinh học từ thân cây. Ví dụ, scoparone, *beta*-sitosterol, fraxidin, fraxetin, acid 3-acetylaleuritolic và sitosterone từ vỏ thân cây *Jatropha podagrica* (Dầu lai có củ hay còn gọi đầu lai lá sen, sen lục bình). [62] Thengyai *et al.* đã xác định vỏ thân là bộ phận chứa hoạt tính sinh học cao nhất của *Vitex glabrata* (cây mã). [63] Tương tự, Minh *et al.* đã xác định và phân lập cấu trúc hóa học của acid galic, methyl gallat, fraxetin và tomentin từ *Jatropha podagrica*. [62]

#### 0.6.d 1.6.4 Cao chiết từ rễ và thân rễ

Cao chiết từ rễ và thân rễ được sử dụng rộng rãi trên thế giới để điều trị bệnh, phổ biến bao gồm gừng

(*Zingiber officinale*), maca (*Lepidium meyenii*), kava kava (*Piper methysticum*), nghệ (*Curcuma longa*), cây nữ lang (*Valeriana officinalis*), cúc đại (*Echinacea purpurea*), hải cầu vàng (*Hydrastis canadensis*), sâm Ashwagandha (*Withania somnifera*), và cam thảo bắc (*Glycyrrhiza glabra*). Gừng thường được sử dụng gia vị tuy nhiên cao chiết từ gừng có thể bào chế dưới dạng dung dịch đường uống, viên nang cứng hoặc bột khô. Gừng được sử dụng để điều trị và ngăn ngừa chứng buồn nôn do nhiều nguyên nhân bao gồm say tàu xe, ốm nghén và các bệnh khác. Cao chiết từ gừng được chứng minh có khả năng chống viêm và sử dụng trong điều trị các bệnh viêm khớp dạng thấp, viêm xương khớp, đau cơ xương khớp. Một số thành phần có tác dụng đã được phân lập và xác định cấu trúc với tác dụng tương tự như cao chiết gồm các hợp chất thuộc nhóm gingerol và shogaol. Cao chiết từ gừng được chứng minh có khả năng ức chế trực tiếp quá trình tổng hợp các chemokine từ hoạt dịch tế bào, tế bào sụn và bạch cầu, rất có thể là do giảm sản xuất TNF và PGE-2 thông qua ức chế sự kích hoạt NF $\kappa$ B và I $\kappa$ B $\alpha$ . [64] Trong của nghệ có chứa các hợp chất thuộc nhóm phenolic quan trọng là các curcuminoid (2% -9%) gồm curcumin (70%-75%), demethoxycurcumin (10%-25%) và bisdemethoxycurcumin (5% -10%). [65]

#### 0.6.e 1.6.5 Cao chiết từ các bộ phận khác

Lớp vỏ quả cà phê thường được bỏ đi cho thấy có tiềm năng sinh học khi thử nghiệm *in vitro* có khả năng chống oxy hóa và hàm lượng cao các phenolics. Khi phân lập và xác định cấu trúc cho thấy cao chiết chứa acid chlorogen (chủ yếu là acid 5-O-cafeoylquinic), acid caffeic và caffein. Các hoạt chất này đều có tác dụng sinh học. [66] Trong các mô hình oxy hóa *in vitro* và *in vivo* (*C. elegans* được xử lý bằng tia cực tím), Iriondo-DeHond *et al.* đã phát hiện thấy cao chiết từ vỏ hạt có khả năng bảo vệ làn da và giảm nguy cơ lão hóa trên da. [67] Có vài đề xuất về khả năng kháng viêm, các rối loạn mô mỡ nhờ vỏ quả cà phê. [68] Acid chlorogenic và kaempferol cũng tìm thấy trong cao chiết từ vỏ quả cà phê. Lớp vỏ mỏng của cà chua giàu lycopene có tác dụng tốt tới sức khỏe. Bã quả cà chua là hỗn hợp vỏ và hạt sau khi chế biến cà chua đóng hộp trong công nghiệp thực phẩm. Bã này chứa nhiều các carotenoid chủ yếu là lycopene, lutein và caroten. Bã này cũng bao gồm các dẫn xuất acid béo quan trọng mà cơ thể chúng ta cần. [69] Hành tây là cây gia vị phổ biến thứ hai trên thế giới và lớp vỏ cứng màu vàng bị loại bỏ đi nhiều nhất. Đây là kết quả của quá trình

sản xuất công nghiệp thực phẩm. Trong lớp vỏ khô bỏ đi, thành phần flavonoid đặc biệt giàu quercetin, các dẫn chất cũng như kaempferol và acid protocatechuic. Sử dụng chiết xuất carbon dioxide và nước dưới tới hạn sẽ thu được hiệu suất cao hơn hai lớp chất flavonoid và phenolic. [70], [71] Tương tự như vậy, actisô là nguồn cung cấp các hoạt chất như các phenolic, inulin, cyclitols và sesquiterpenes. Hơn nữa, có một lượng nhỏ hoạt chất có hoạt tính sinh học trong tất cả các loại trái cây và rau quả chúng ta tiêu thụ hàng ngày.

## Bibliography

## Bibliography

- [1] M. Vinatoru, "An Overview of the Ultrasonically Assisted Extraction of Bioactive Principles from Herbs," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 8, no. 3, pp. 303–313, Jul. 2001, doi: 10.1016/S1350-4177(01)00071-2.
- [2] M. Fitzgerald, M. Heinrich, and A. Booker, "Medicinal Plant Analysis: A Historical and Regional Discussion of Emergent Complex Techniques," *Front. Pharmacol.*, vol. 10, p. 1480–1481, Jan. 2020, doi: 10.3389/fphar.2019.01480.
- [3] H. A. Rasul Suleria and C. Barrow, *Bioactive Compounds from Plant Origins: Extraction, Applications, and Potential Health Benefits*. Milton: Apple Academic Press, Incorporated, 2019.
- [4] G. P. P. Lima, F. Vianello, C. R. Corrêa, R. A. d. S. Campos, and M. G. Borguini, "Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health," *FNS*, vol. 5, no. 11, pp. 1065–1082, 2014, doi: 10.4236/fns.2014.511117.
- [5] P. Kris-Etherton, M. Lefevre, G. Beecher, M. Gross, C. Keen, and T. Etherton, "Bioactive Compounds in Nutrition and Health-Research Methodologies for Establishing Biological Function: The Antioxidant and Anti Inflammatory Effects of Flavonoids on Atherosclerosis," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 24, no. 1, pp. 511–538, Jul. 2004, doi: 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073237.
- [6] S. B. Levy, G. B. Fitzgerald, and A. B. Maccone, "Changes in Intestinal Flora of Farm Personnel after Introduction of a Tetracycline-Sup-

- plemented Feed on a Farm,” *N Engl J Med*, vol. 295, no. 11, pp. 583–588, Sep. 1976, doi: 10.1056/NEJM197609092951103.
- [7] E. S. Ford and A. H. Mokdad, “Fruit and Vegetable Consumption and Diabetes Mellitus Incidence among U.S. Adults,” *Preventive Medicine*, vol. 32, no. 1, pp. 33–39, Jan. 2001, doi: 10.1006/pmed.2000.0772.
- [8] C. J., “A Commentary on Resveratrol,” *Med Aromat Plants*, vol. 4, no. 4, 2015, doi: 10.4172/2167-0412.1000206.
- [9] J. Ferrieres, “The French Paradox: Lessons for Other Countries,” *Heart*, vol. 90, no. 1, pp. 107–111, Jan. 2004, doi: 10.1136/heart.90.1.107.
- [10] R. Croteau, R. E. B. Ketchum, R. M. Long, R. Kaspera, and M. R. Wildung, “Taxol Biosynthesis and Molecular Genetics,” *Phytochem Rev*, vol. 5, no. 1, pp. 75–97, Feb. 2006, doi: 10.1007/s11101-005-3748-2.
- [11] L. Taiz, E. Zeiger, I. M. Møller, A. Murphy, and others, *Plant Physiology and Development*, no. Ed.6. Sinauer Associates Incorporated, 2015.
- [12] B. Singh and R. A. Sharma, “Plant Terpenes: Defense Responses, Phylogenetic Analysis, Regulation and Clinical Applications,” *3 Biotech*, vol. 5, no. 2, pp. 129–151, Apr. 2015, doi: 10.1007/s13205-014-0220-2.
- [13] B. M. Lange and A. Ahkami, “Metabolic Engineering of Plant Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes-Current Status and Future Opportunities,” *Plant Biotechnol J*, vol. 11, no. 2, pp. 169–196, Feb. 2013, doi: 10.1111/pbi.12022.
- [14] M. Callisto, J. F. Gonçalves Jr, and M. A. S. Graça, “Leaf Litter as a Possible Food Source for Chironomids (Diptera) in Brazilian and Portuguese Headwater Streams,” *Rev. Bras. Zool.*, vol. 24, no. 2, pp. 442–448, Jun. 2007, doi: 10.1590/S0101-81752007000200023.
- [15] M. Phạm Kim, *Báo cáo tổng kết nghiên cứu công nghệ chiết xuất Diosgenin làm nghiên cứu chế tạo các thuốc Steroit*. Hà nội: Viện Dược liệu, 1996.
- [16] E. Vranová, D. Coman, and W. Gruissem, “Structure and Dynamics of the Isoprenoid Pathway Network,” *Molecular Plant*, vol. 5, no. 2, pp. 318–333, Mar. 2012, doi: 10.1093/mp/sss015.
- [17] M. Heinrich, J. Mah, and V. Amirkia, “Alkaloids Used as Medicines: Structural Phytochemistry Meets Biodiversity—An Update and Forward Look,” *Molecules*, vol. 26, no. 7, p. 1836–1837, Mar. 2021, doi: 10.3390/molecules26071836.
- [18] M. Kolak *et al.*, “Effects of Chronic Rosiglitazone Therapy on Gene Expression in Human Adipose Tissue \emph{in Vivo} in Patients with Type 2 Diabetes,” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 92, no. 2, pp. 720–724, Feb. 2007, doi: 10.16092613233300554.
- [19] T. Aniszewski, *Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology, and Applications*. Elsevier Science, 2015. [Online]. Available: <https://books.google.com.vn/books?id=tQ6dBAAQBAJ>
- [20] G. Williamson and C. Manach, “Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans. II. Review of 93 Intervention Studies,” *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 81, no. 1, p. 243–244, Jan. 2005, doi: 10.1093/ajcn/81.1.243S.
- [21] V. Govindarajan and W. H. Stahl, “Turmeric — Chemistry, Technology, and Quality,” *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 12, no. 3, pp. 199–301, Jun. 1980, doi: 10.1080/10408398009527278.
- [22] H.-S. Lin, B.-D. Yue, and P. C. Ho, “Determination of Pterostilbene in Rat Plasma by a Simple HPLC-UV Method and Its Application in Pre-Clinical Pharmacokinetic Study,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 23, no. 12, pp. 1308–1315, Dec. 2009, doi: 10.1002/bmc.1254.
- [23] M. P. Kähkönen *et al.*, “Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, no. 10, pp. 3954–3962, Oct. 1999, doi: 10.1021/jf990146l.
- [24] V. Cheynier, “Polyphenols in Foods Are More Complex than Often Thought,” *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 81, no. 1, p. 223–224, Jan. 2005, doi: 10.1093/ajcn/81.1.223S.
- [25] K. D. Croft, “The Chemistry and Biological Effects of Flavonoids and Phenolic Acids,” *Annals NY Acad Sci*, vol. 854, no.



- 1, pp. 435–442, Nov. 1998, doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x.
- [26] B. Puri and A. Hall, *Phytochemical Dictionary*, 0th ed. CRC Press, 1998. doi: 10.4324/9780203483756.
- [27] A. Gani, W. Sm, M. Fa, and G. Hameed, “Whole-Grain Cereal Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review,” *Journal of Food Processing & Technology*, vol. 3, no. 3, pp. 1–10, 1AD, doi: 10.4172/2157-7110.1000146.
- [28] N. P. Möller, K. E. Scholz-Ahrens, N. Roos, and J. Schrezenmeir, “Bioactive Peptides and Proteins from Foods: Indication for Health Effects,” *Eur J Nutr*, vol. 47, no. 4, pp. 171–182, Jun. 2008, doi: 10.1007/s00394-008-0710-2.
- [29] D. Kitts and K. Weiler, “Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses Used in Isolation and Recovery,” *CPD*, vol. 9, no. 16, pp. 1309–1323, Jun. 2003, doi: 10.2174/1381612033454883.
- [30] J. Xiao, “Dietary Flavonoid Aglycones and Their Glycosides: Which Show Better Biological Significance?,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p. 0–1, Jul. 2015, doi: 10.1080/10408398.2015.1032400.
- [31] K. Ohtani, K. Mizutani, R. Kasai, and O. Tanaka, “Selective Cleavage of Ester Type Glycoside-Linkages and Its Application to Structure Determination of Natural Oligoglycosides,” *Tetrahedron Letters*, vol. 25, no. 40, pp. 4537–4540, Jan. 1984, doi: 10.1016/S0040-4039(01)81487-8.
- [32] G. Joana Gil-Chávez *et al.*, “Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to Be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview: Production of Nutraceutical Compounds: A Review,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 12, no. 1, pp. 5–23, Jan. 2013, doi: 10.1111/1541-4337.12005.
- [33] J. Azmir *et al.*, “Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review,” *Journal of Food Engineering*, vol. 117, no. 4, pp. 426–436, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- [34] P. K. Ajikumar, K. Tyo, S. Carlsen, O. Mucha, T. H. Phon, and G. Stephanopoulos, “Terpenoids: Opportunities for Biosynthesis of Natural Product Drugs Using Engineered Microorganisms,” *Mol. Pharmaceutics*, vol. 5, no. 2, pp. 167–190, Apr. 2008, doi: 10.1021/mp700151b.
- [35] R. Ingle, “Heterocyclic Chemistry of Benzimidazoles and Potential Activities of Derivatives,” 2011.
- [36] J. Delors, *Learning: The Treasure within; Report to UNESCO of the International Commission on Education for the Twenty-first Century (Highlights) - UNESCO Digital Library*. 1996. Accessed: Jan. 18, 2023. [Online]. Available: <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000109590>
- [37] F. Donsì, G. Ferrari, and G. Pataro, “Applications of Pulsed Electric Field Treatments for the Enhancement of Mass Transfer from Vegetable Tissue,” *Food Eng. Rev.*, vol. 2, no. 2, pp. 109–130, Jun. 2010, doi: 10.1007/s12393-010-9015-3.
- [38] W. Bernal, G. Auzinger, A. Dhawan, and J. Wendon, “Acute Liver Failure,” *The Lancet*, vol. 376, no. 9736, pp. 190–201, Jul. 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60274-7.
- [39] L. Day, R. B. Seymour, K. F. Pitts, I. Konczak, and L. Lundin, “Incorporation of Functional Ingredients into Foods,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 20, no. 9, pp. 388–395, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.tifs.2008.05.002.
- [40] M. Plaza, A. Cifuentes, and E. Ibanez, “In the Search of New Functional Food Ingredients from Algae,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 19, no. 1, pp. 31–39, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.tifs.2007.07.012.
- [41] S. Marette, J. Roosen, S. Blanchemanche, and E. Feinblatt-Mélèze, “Functional Food, Uncertainty and Consumers’ Choices: A Lab Experiment with Enriched Yoghurts for Lowering Cholesterol,” *Food Policy*, vol. 35, no. 5, pp. 419–428, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.foodpol.2010.04.009.
- [42] S. Nobili *et al.*, “Natural Compounds for Cancer Treatment and Prevention,” *Pharmacological Research*, vol. 59, no. 6, pp. 365–378, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.phrs.2009.01.017.
- [43] S. Hekmat, H. Soltani, and G. Reid, “Growth and Survival of *Lactobacillus Reuteri* RC-14 and *Lactobacillus Rhamnosus* GR-1 in Yo-

- gurt for Use as a Functional Food,” *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 10, no. 2, pp. 293–296, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.ifset.2008.10.007.
- [44] M. Miró, S. K. Hartwell, J. Jakmunee, K. Grudpan, and E. H. Hansen, “Recent Developments in Automatic Solid-Phase Extraction with Renewable Surfaces Exploiting Flow-Based Approaches,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 27, no. 9, pp. 749–761, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.trac.2008.07.003.
- [45] T. M. Hii and H. K. Lee, “Liquid-Liquid Extraction in Environmental Analysis,” *Handbook of Sample Preparation*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 39–51, Mar. 16, 2011. doi: 10.1002/9780813823621.ch3.
- [46] H.-H. Yang, E. P. Dutkiewicz, and P. L. Urban, “Kinetic Study of Continuous Liquid-Liquid Extraction of Wine with Real-Time Detection,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 1034, pp. 85–91, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.aca.2018.06.072.
- [47] A. L. Oliveira, S. Gondim, R. Gómez-García, T. Ribeiro, and M. Pintado, “Olive Leaf Phenolic Extract from Two Portuguese Cultivars – Bioactivities for Potential Food and Cosmetic Application,” *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 9, no. 5, p. 106175–106176, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.jece.2021.106175.
- [48] A. Lama-Muñoz, M. d. M. Contreras, F. Espínola, M. Moya, I. Romero, and E. Castro, “Content of Phenolic Compounds and Mannitol in Olive Leaves Extracts from Six Spanish Cultivars: Extraction with the Soxhlet Method and Pressurized Liquids,” *Food Chemistry*, vol. 320, p. 126626–126627, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126626.
- [49] A. B. Hsouna *et al.*, “Characterization of Bioactive Compounds and Ameliorative Effects of Ceratonia Siliqua Leaf Extract against CCl<sub>4</sub> Induced Hepatic Oxidative Damage and Renal Failure in Rats,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 12, pp. 3183–3191, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.fct.2011.09.034.
- [50] A. F. Korystova, L. N. Kublik, T. V. Samokhvalova, V. V. Shaposhnikova, and Y. N. Korystov, “Black Tea Is More Effective than Green Tea in Prevention of Radiation-Induced Oxidative Stress in the Aorta of Rats,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 142, p. 112064–112065, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2021.112064.
- [51] M. C. Braga, E. C. S. Vieira, and T. F. de Oliveira, “Curcuma Longa L. Leaves: Characterization (Bioactive and Antinutritional Compounds) for Use in Human Food in Brazil,” *Food Chemistry*, vol. 265, pp. 308–315, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.05.096.
- [52] A. Čabarkapa *et al.*, “Dry Olive Leaf Extract in Combination with Methotrexate Reduces Cell Damage in Early Rheumatoid Arthritis Patients-A Pilot Study: Combined Treatment Reduces Cell Damage in Rheumatoid Arthritis,” *Phytother. Res.*, vol. 30, no. 10, pp. 1615–1623, Oct. 2016, doi: 10.1002/ptr.5662.
- [53] D. Haldar and M. K. Purkait, “A Review on the Environment-Friendly Emerging Techniques for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: Mechanistic Insight and Advancements,” *Chemosphere*, vol. 264, p. 128523–128524, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128523.
- [54] D. Haldar and M. K. Purkait, “Lignocellulosic Conversion into Value-Added Products: A Review,” *Process Biochemistry*, vol. 89, pp. 110–133, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.procbio.2019.10.001.
- [55] E. Gómez-Mejía *et al.*, “Valorisation of Black Mulberry and Grape Seeds: Chemical Characterization and Bioactive Potential,” *Food Chemistry*, vol. 337, p. 127998–127999, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127998.
- [56] B. Fathi-Achachlouei, S. Azadmard-Damirchi, Y. Zahedi, and R. Shaddel, “Microwave Pretreatment as a Promising Strategy for Increment of Nutraceutical Content and Extraction Yield of Oil from Milk Thistle Seed,” *Industrial Crops and Products*, vol. 128, pp. 527–533, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.11.034.
- [57] M. Patwardhan, M. T. Morgan, V. Dia, and D. H. D’Souza, “Heat Sensitization of Hepatitis A Virus and Tulane Virus Using Grape Seed Extract, Gingerol and Curcumin,” *Food Microbiology*, vol. 90, p. 103461–103462, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.fm.2020.103461.
- [58] F. Di Meo *et al.*, “Anti-Cancer Activity of Grape Seed Semi-Polar Extracts in Human Mesothelioma Cell Lines,” *Journal of Functional Foods*,

- vol. 61, p. 103515–103516, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.jff.2019.103515.
- [59] Z. Yan *et al.*, “Insights into the Phytochemical Composition and Bioactivities of Seeds from Wild Peony Species,” *Plants*, vol. 9, no. 6, p. 729–730, Jun. 2020, doi: 10.3390/plants9060729.
- [60] T. M. T. Nguyen, E. J. Cho, Y. Song, C. H. Oh, R. Funada, and H.-J. Bae, “Use of Coffee Flower as a Novel Resource for the Production of Bioactive Compounds, Melanoidins, and Bio-Sugars,” *Food Chemistry*, vol. 299, p. 125120–125121, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125120.
- [61] T. Minh *et al.*, “Isolation and Purification of Bioactive Compounds from the Stem Bark of *Jatropha Podagrica*,” *Molecules*, vol. 24, no. 5, p. 889–890, Mar. 2019, doi: 10.3390/molecules24050889.
- [62] N. Nurjanah, A. M. Jacob, T. Hidayat, and A. Shyline, “Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Lindur Stem Bark (*Bruguiera Gymnorhiza*),” vol. 1, no. 5, 2015.
- [63] S. Thengyai, P. Thiantongin, C. Sontimuang, C. Ovatlarnporn, and P. Puttarak, “ $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Activities of Medicinal Plants in Thai Antidiabetic Recipes and Bioactive Compounds from *Vitex Glabrata* R. Br. Stem Bark,” *Journal of Herbal Medicine*, vol. 19, p. 100302–100303, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.hermed.2019.100302.
- [64] J. G. de Oliveira Filho, M. J. de Almeida, T. L. Sousa, D. C. dos Santos, and M. B. Egea, “Bioactive Compounds of Turmeric (*Curcuma Longa* L.),” *Bioactive Compounds in Underutilized Vegetables and Legumes*. Springer International Publishing, Cham, pp. 297–318, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-57415-4\_37.
- [65] S. Latif and F. Anwar, “Physicochemical Studies of Hemp (*Cannabis Sativa*) Seed Oil Using Enzyme-assisted Cold-pressing,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 111, no. 10, pp. 1042–1048, Oct. 2009, doi: 10.1002/ejlt.200900008.
- [66] S. M. Bessada, R. C. Alves, A. S. Costa, M. A. Nunes, and M. B. P. Oliveira, “Coffee *Canephora* Silverskin from Different Geographical Origins: A Comparative Study,” *Science of The Total Environment*, vol. 645, pp. 1021–1028, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.201.
- [67] A. Iriondo-DeHond *et al.*, “Coffee Silverskin Extract Protects against Accelerated Aging Caused by Oxidative Agents,” *Molecules*, vol. 21, no. 6, p. 721–722, Jun. 2016, doi: 10.3390/molecules21060721.
- [68] M. Rebollo-Hernanz, Q. Zhang, Y. Aguilera, M. A. Martín-Cabrejas, and E. Gonzalez de Mejia, “Phenolic Compounds from Coffee By-Products Modulate Adipogenesis-Related Inflammation, Mitochondrial Dysfunction, and Insulin Resistance in Adipocytes, via Insulin/PI3K/AKT Signaling Pathways,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 132, p. 110672–110673, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.fct.2019.110672.
- [69] K. Szabo, F. V. Dulf, Z. Diaconeasa, and D. C. Vodnar, “Antimicrobial and Antioxidant Properties of Tomato Processing Byproducts and Their Correlation with the Biochemical Composition,” *LWT*, vol. 116, p. 108558–108559, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2019.108558.
- [70] M. Munir, H. Kheirkhah, S. Baroutian, S. Y. Quek, and B. R. Young, “Subcritical Water Extraction of Bioactive Compounds from Waste Onion Skin,” *Journal of Cleaner Production*, vol. 183, pp. 487–494, May 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.02.166.
- [71] L. Campone *et al.*, “Response Surface Methodology to Optimize Supercritical Carbon Dioxide/Co-Solvent Extraction of Brown Onion Skin by-Product as Source of Nutraceutical Compounds,” *Food Chemistry*, vol. 269, pp. 495–502, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.042.