

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÓA HỌC CÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

ĐỖ THANH HÀ

**NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ TÁCH CÁC CATECHIN
TỪ CHÈ XANH (*CAMELLIA SINENSIS* L.), CHUYỂN
HÓA TẠO DẪN XUẤT O-ACETYL CATECHIN VÀ
KHẢO SÁT HOẠT TÍNH DỌN GỐC TỰ DO
CỦA CHÚNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

HÀ NỘI – 2017

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÓA HỌC CÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

ĐỖ THANH HÀ

**NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ TÁCH CÁC CATECHIN
TỪ CHÈ XANH (*CAMELLIA SINENSIS* L.), CHUYỂN
HÓA TẠO DẪN XUẤT O-ACETYL CATECHIN VÀ
KHẢO SÁT HOẠT TÍNH DỌN GỐC TỰ DO
CỦA CHÚNG**

Chuyên ngành: hóa hữu cơ

Mã số: 62.44.01.14

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Hoàng Văn Hoan
2. PGS.TS Trần Thị Như Mai

HÀ NỘI – 2017

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án là công trình nghiên cứu của bản thân. Tất cả thông tin tham khảo dùng trong luận án này lấy từ các công trình nghiên cứu có liên quan đều được nêu rõ nguồn gốc trong danh mục tài liệu tham khảo. Các kết quả nghiên cứu đưa ra trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa được công bố trong bất kì công trình khoa học nào khác.

Ngày tháng năm 2017

TÁC GIẢ

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến tập thể hướng dẫn TS. Hoàng Văn Hoan – Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam và PGS.TS. Trần Thị Như Mai – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên đã hướng dẫn tôi trong mọi khía cạnh học thuật của luận án này.

Xin chân thành cảm ơn các cán bộ của Trung tâm Hóa dược, Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam đã luôn hỗ trợ, giúp đỡ tôi trong thời gian qua.

Xin chân thành cảm ơn Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam đã luôn tạo mọi điều kiện về cơ sở vật chất và thủ tục hành chính cho tôi thực hiện luận án.

Xin chân thành cảm ơn gia đình bạn bè, đồng nghiệp đã động viên giúp đỡ tôi hoàn thành luận án này.

Tác giả

Đỗ Thanh Hà

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC CÁC BẢNG

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

LỜI MỞ ĐẦU VÀ NHIỆM VỤ LUẬN ÁN	1
CHƯƠNG 1 : TỔNG QUAN.....	3
1.1. VÀI NÉT VỀ CHÈ XANH.....	3
1.1.1. Cây chè - <i>Camellia sinensis</i> (L.) O.Kuntze.....	3
1.1.2. Chè xanh trong thực phẩm và dược phẩm.....	4
1.2. THÀNH PHẦN HOẠT CHẤT CỦA CHÈ XANH	6
1.2.1. So sánh chất lượng nguyên liệu theo vùng trồng chè xanh ở Thái Nguyên, Phú Thọ, Mộc Châu.....	7
1.2.2. Các catechin chè xanh	8
1.2.3. Các thành phần khác [16]	12
1.3. HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA EGCG VÀ CÁC CATECHIN CHÈ XANH...14	
1.3.1. Cơ chế hoạt động	15
1.3.2. Hoạt tính chống oxy hóa.....	17
1.3.3. Hoạt tính diệt khuẩn, kháng viêm, kháng virus [45,46,48].....	17
1.3.4. Một số nghiên cứu ứng dụng các catechin phòng và trị ung thư [32,33]...18	
1.3.5. Bảo vệ tim mạch [34, 35]	21
1.3.6. Chống béo phì.....	22
1.3.7. Một số tác dụng khác của EGCG và catechin chè xanh.....	22
1.4. CÁC NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ HÓA HỌC CHIẾT, TÁCH VÀ ĐIỀU CHẾ CÁC CATECHIN VÀ DẪN XUẤT	25
1.4.1. Các kỹ thuật công nghệ chiết catechin từ chè xanh	25

1.4.2. Sắc ký lỏng hiệu năng cao trong phân tích và phân tách catechin	28
CHƯƠNG 2 : THỰC NGHIỆM	30
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	30
2.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	32
2.2.1. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị	32
2.2.2. Các phương pháp chiết chè xanh	33
2.2.2.1. Phương pháp chiết đun hồi lưu sử dụng cồn	33
2.2.2.2. Phương pháp chiết ngược dòng liên tục dùng nước làm dung môi	33
2.2.3. Các phương pháp phân tách catechin	34
2.2.4. Phương pháp acetyl hóa catechin	34
2.2.5. Các phương pháp phân tích sản phẩm	35
2.2.6. Thiết kế nghiên cứu của luận án	35
2.3. THỰC NGHIỆM	37
2.3.1. Nghiên cứu quy trình chiết suất các catechin tổng số từ chè xanh	37
2.3.1.1. Nghiên cứu quy trình chiết suất các catechin tổng số từ chè xanh bằng ethanol	37
2.3.1.2. Nghiên cứu quy trình chiết suất các catechin tổng số từ chè xanh bằng nước trên thiết bị chiết ngược dòng liên tục	39
2.3.2. Nghiên cứu tách và tinh chế các catechin và EGCG từ catechin tổng số của chè xanh	43
2.3.2.1. Nghiên cứu lựa chọn chất hấp phụ có thể tái sử dụng làm pha tĩnh tách sắc ký điều chế EGCG từ catechin tổng số của chè xanh	43
2.3.2.2. Nghiên cứu và thử nghiệm quy trình công nghệ tách EGCG lượng lớn trên hệ thống sắc ký lỏng MP/HPLC Pilot	47
2.3.2.3. Nghiên cứu phân tách các catechin bằng phương pháp HPLC trên cột sắc ký phối hợp Diaion HP20 và Sephadex LH20	49

2.3.3. Bán tổng hợp dẫn xuất O-acetyl của các catechin chè xanh và đánh giá mức độ suy giảm hoạt tính dạn gốc tự do	51
2.3.3.1. Bán tổng hợp các dẫn xuất acetyl của catechin để đánh giá mức độ suy giảm hoạt tính	51
2.3.3.2. Đánh giá mức độ suy giảm hoạt tính dạn gốc tự do DPPH của các dẫn xuất O-acetyl so với các catechin chè xanh.....	52
2.3.4. Nghiên cứu quy trình tách và tinh chế caffeine từ cao chiết chè xanh.....	53
CHƯƠNG 3 : KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	55
3.1. NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT CATECHIN TỔNG SỐ TỪ CHÈ XANH	55
3.1.1. Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ chung chiết catechin tổng số từ chè xanh.....	55
3.1.2. Nghiên cứu chiết catechin tổng số bằng ethanol theo phương pháp Soxhlet.....	56
3.1.3. Nghiên cứu chiết chè xanh bằng nước theo phương pháp ngược dòng liên tục.....	58
3.2. NGHIÊN CỨU TÁCH VÀ TINH CHẾ CÁC CATECHIN VÀ EGCG TỪ CATECHIN TỔNG SỐ CỦA CHÈ XANH.....	61
3.2.1. Nghiên cứu lựa chọn chất hấp phụ có thể tái sử dụng làm pha tĩnh tách sắc ký điều chế EGCG từ catechin tổng số của chè xanh.....	61
3.2.1.1. Đánh giá hiệu quả tách EGCG từ catechin tổng số trên cột silica gel biến tính bằng pha động sắc ký	61
3.2.1.2. Đánh giá hiệu quả tách EGCG từ catechin tổng số trên cột silica gel pha lưỡng tính RP/NP.....	62
3.2.1.3. Đánh giá hiệu quả tách EGCG từ tổng catechin trên cột Sephadex LH 20.....	62

3.2.1.4.	Đánh giá hiệu quả tách EGCG từ catechin tổng số trên vật liệu polyme xốp có lỗ trống mạng phân tử lớn.....	63
3.2.1.5.	So sánh hiệu quả tách của các phương pháp sắc ký điều chế tách EGCG.....	64
3.2.2.	Nghiên cứu và thử nghiệm quy trình công nghệ tách EGCG lượng lớn trên hệ thống sắc ký lỏng MP/HPLC Pilot	67
3.2.2.1.	Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ dòng pha động đến quá trình tách sắc ký sản xuất EGCG	68
3.2.2.2.	Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ khối lượng mẫu đầu vào đến quá trình tách sắc ký sản xuất EGCG.....	68
3.2.3.	Nghiên cứu phân tách các catechin bằng phương pháp HPLC trên cột sắc ký phối hợp Diaion HP20 và Sephadex LH20	69
3.2.3.1.	Đánh giá phân đoạn III.....	72
3.2.3.2.	Đánh giá phân đoạn V.....	75
3.2.3.3.	Đánh giá phân đoạn VI và VII.....	79
3.3.	BÁN TỔNG HỢP DẪN XUẤT O-ACETYL CỦA CÁC CATECHIN CHÈ XANH VÀ ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ SUY GIẢM HOẠT TÍNH DỌN GỐC TỰ DO	83
3.3.1.	Bán tổng hợp các dẫn xuất acetyl của catechin để đánh giá mức độ suy giảm hoạt tính	83
3.3.1.1.	Hợp chất epi-Catechin acetate (I)	85
3.3.1.2.	Hợp chất epi-Gallocatechin acetate (II)	88
3.3.1.3.	Hợp chất epi-Gallocatechin gallate, O-octaacetyl (III).....	91
3.3.2.	Đánh giá mức độ suy giảm hoạt tính dọn gốc tự do DPPH của các dẫn xuất O-acetyl so với các catechin chè xanh.....	94
3.4.	NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH THU NHẬN CAFFEINE TỪ CAO CHIẾT CHÈ XANH	96
3.4.1.	Quy trình tách và tinh chế Caffeine.....	96
3.4.2.	Xác định cấu trúc hóa học của caffeine bằng phương pháp phổ.....	97

KẾT LUẬN.....	101
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN.....	103
DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	105
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

C	Catechin
EC	Epicatechin
GC	Gallocatechin
EGC	Epigallocatechin
ECG	Epicatechin gallate
EGCG	Epigallocatechin gallate
CG	Catechin gallate
GCG	Gallo catechin gallate
ECDG	Epicatechin digallate
EGCDG	Epigallocatechin digallate
¹³ C-NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon
¹ H-NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hidro
DEPT	Phổ DEPT (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer)
2D-NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều (Two – dimensional NMR)
HSQC	Phổ HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
HMBC	Phổ HMBC (heteronuclear multiple bond connectivity)
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
m	Multipet
m/z	Tỷ lệ số khối/điện tích ion

s	Singlet
t	Triplet
EIS-MS	Phổ khối lượng phun mù điện tử (Electron Spray Ionization Mass Spectrometry)
HPLC-MS	Sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối khối phổ
MeOH	Metanol
SKLM	Sắc ký lớp mỏng
LDL	Lipoprotein tỉ trọng thấp
HDL	Lipoprotein tỉ trọng cao
IC ₅₀	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử
đvC	Đơn vị cacbon
v	Thể tích
ROS	Reactive oxygen species (gốc tự do oxi hóa)
HIV	Virus gây suy giảm miễn dịch ở người
NF-κB	Yếu tố Nhân kappa B
APP	Protein tiền chất của amyloid
PKC	Protein kinase C
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine
6-OHDA	6-hydroxydopamin
DPPH	2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl
DMSO	Dimethylsulfoxyd

DANH MỤC CÁC BẢNG

<i>Bảng 1. 1: Ứng dụng của chế phẩm polyphenol chè xanh trong chế biến thực phẩm</i>	<i>5</i>
<i>Bảng 1. 2 : Thành phần cơ học nguyên liệu 1 tôm 3 lá</i>	<i>7</i>
<i>Bảng 1. 3 : Thành phần polyphenol nguyên liệu chè theo vùng và vụ thu hái</i>	<i>7</i>
<i>Bảng 1. 4: Các catechin đã được phân lập trong chè xanh.....</i>	<i>9</i>
<i>Bảng 1. 5: Hàm lượng các catechin chủ yếu trong các loại chè khác nhau.....</i>	<i>10</i>
<i>Bảng 1. 6: Thành phần catechin trong các bộ phận chè xanh [16]</i>	<i>10</i>
<i>Bảng 1. 7: So sánh lượng catechin chiết từ chè xanh theo các kỹ thuật sử dụng viba, siêu âm và Soxhlet.</i>	<i>27</i>
<i>Bảng 3. 1: Hàm lượng một số catechin trong catechin tổng số.....</i>	<i>57</i>
<i>Bảng 3. 2: Thành phần catechin tổng số theo phương pháp ngược dòng liên tục.....</i>	<i>60</i>
<i>Bảng 3. 3: Đánh giá hiệu quả tách sắc ký EGCG.....</i>	<i>66</i>
<i>Bảng 3. 4: Độ chuyển dịch hóa học của epi-Catechin.....</i>	<i>73</i>
<i>Bảng 3. 5: Độ chuyển dịch hóa học của epi-Gallocatechin.....</i>	<i>77</i>
<i>Bảng 3. 6: Độ chuyển dịch hóa học của epi-Gallocatechin gallate.....</i>	<i>80</i>
<i>Bảng 3. 7: Độ chuyển dịch hóa học (δ) của epi-Catechin acetate.....</i>	<i>86</i>
<i>Bảng 3. 8: Độ chuyển dịch hóa học (δ) của epi-Gallocatechin acetate.....</i>	<i>89</i>
<i>Bảng 3. 9: Độ chuyển dịch hóa học của EGCG acetate.....</i>	<i>92</i>
<i>Bảng 3. 10: Kết quả khảo sát hoạt tính dọn gốc tự do DPPH của các Catechin và dẫn xuất O-acetyl.....</i>	<i>95</i>
<i>Bảng 3. 11: Độ dịch chuyển hóa học của Caffeine.....</i>	<i>100</i>

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

Hình 1. 1: Búp chè xanh.....	Error! Bookmark not defined.
Hình 1. 2: Công thức tổng quát của Catechin	8
Hình 1. 3: Một số cấu trúc Catechin chè xanh điển hình	9
Hình 1. 4: Quy trình tóm tắt công nghệ chiết Polyphenol chè xanh trên thế giới	25
Hình 2. 1: Chè nguyên liệu.....	30
Hình 2. 2: Hệ thống Pilot Prep. HPLC và cột tách Sephadex ID 100 x L 800 mm	34
Hình 2. 3: Thiết kế nội dung nghiên cứu	36
Hình 2. 4: Thiết bị chiết Soxhlet 20 lít.....	37
Hình 2. 5: Thiết bị cô quay chân không 20 lít Heidolph Laborota LR 20	38
Hình 2. 6: Chiết phân bố trên thiết bị chiết tuần hoàn 80 lít.....	38
Hình 2. 7: Lọc hút chân không thu catechin tổng số	39
Hình 2. 8: Hệ thống chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục.....	40
Hình 2. 9: Thiết kế máy chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục	40
Hình 2. 10: Sơ đồ quy trình thu nhận catechin tổng số từ dịch thủy phân	42
Hình 2. 11: Thiết bị tách sắc ký điều chế MPLC	43
Hình 2. 12: Hệ thống sắc ký lỏng cao áp điều chế bán công nghiệp	50
Hình 2. 13: Quy trình công nghệ tách và tinh chế Caffeine	53
Hình 3. 1: Quy trình chung chiết xuất catechin tổng số từ chè xanh.....	55
Hình 3. 2: Sản phẩm catechin tổng số.....	56
Hình 3. 3: Sắc ký đồ HPLC/MS phân tích catechin tổng số.....	57
Hình 3. 4: Sơ đồ nguyên lý chiết lỏng rắn ngược dòng liên tục	58
Hình 3. 5: Sắc ký đồ HPLC-MS catechin tổng số chè xanh chiết theo phương pháp ngược dòng liên tục	59
Hình 3. 6: TLC các phân đoạn sắc ký tách catechin tổng số	65

Hình 3. 7: Sắc ký đồ tách catechin trên cột Diaion HP20 SS/Sephadex LH20	70
Hình 3. 8: Sơ đồ phân tách catechin chè xanh: EC; EGC; EGCG.....	71
Hình 3. 9: Sắc ký lớp mỏng (TLC) các phân đoạn catechin	71
Hình 3. 10: Phổ ^1H -NMR của epi-Catechin.....	74
Hình 3. 11: Phổ ^{13}C -NMR của epi-Catechin.....	74
Hình 3. 12: Phổ DEPT của epi-Catechin	75
Hình 3. 13: Phổ ^1H -NMR của epi-Galloatechin	77
Hình 3. 14: Phổ ^{13}C -NMR của epi-Galloatechin	78
Hình 3. 15: Phổ DEPT của epi-Galloatechin	78
Hình 3. 16: Phổ ^1H -NMR của epi-Gallocatechin gallate	81
Hình 3. 17: Phổ ^{13}C -NMR của epi-Gallocatechin gallate	81
Hình 3. 18: Phổ DEPT của epi-Gallocatechin gallate.....	82
Hình 3. 19: Sơ đồ phản ứng acyl hóa các catechin	84
Hình 3. 20: Phổ ^1H -NMR của EC acetate	87
Hình 3. 21: Phổ ^{13}C -NMR của EC acetate	87
Hình 3. 22: Phổ DEPT của EC acetate.....	88
Hình 3. 23: Phổ ^1H -NMR của EGC acetate	90
Hình 3. 24: Phổ ^{13}C -NMR của EGC acetate	90
Hình 3. 25: Phổ DEPT của EGC acetate.....	91
Hình 3. 26: Phổ ^1H -NMR của EGCG acetate	93
Hình 3. 27: Phổ ^{13}C -NMR của EGCG acetate	93
Hình 3. 28: Phổ DEPT của EGCG acetate	94
Hình 3. 29: Hình ảnh kết tinh caffeine.....	97
Hình 3. 30: Phổ ^1H -NMR của Caffeine	98
Hình 3. 31: Phổ ^{13}C -NMR của Caffeine	99
Hình 3. 32: Phổ DEPT của Caffeine	99
Hình 3. 33: Cấu trúc hóa học của Caffeine	100

LỜI MỞ ĐẦU VÀ NHIỆM VỤ LUẬN ÁN

Chè được sử dụng như một loại đồ uống và phương thuốc trong y học phương đông từ hàng ngàn năm trước Công nguyên. Tuy nhiên, việc đẩy mạnh các nghiên cứu cơ chế và tìm cách ứng dụng các hoạt chất phenolic trong chè xanh vào y học hiện đại mới chỉ bắt đầu từ nửa sau thế kỷ 20. Cho đến nay, với hoạt tính chống ôxy hóa mạnh, các hợp chất catechin trong chè xanh (chiếm tới 30 % hàm lượng khô) đã được sử dụng trong mỹ phẩm và thực phẩm chức năng. Trong Y học, các catechin đã được áp dụng trong điều trị nhiều loại bệnh tim mạch, viêm và ung thư. Các hoạt chất này đặc biệt hiệu quả khi sử dụng phối hợp với các biện pháp xử lý các bệnh viêm, dị ứng, tim mạch như alzheimer, béo phì, tiểu đường không phụ thuộc Insulin, parkinson, HIV-1, ung thư da và một số loại ung thư khác.

Năm 2006, Cục Quản lý Dược và Thực phẩm Hoa Kỳ đã công nhận cao chiết chè xanh, polyphenol chè xanh và các catechin là các loại Dược phẩm và thực phẩm chức năng được phép sử dụng tại Mỹ [1]. Trong lá chè xanh, thành phần catechin chủ yếu Epigallocatechin gallat (EGCG, có hàm lượng > 50 % trong tổng catechin) cũng là chất có hoạt tính mạnh nhất. Hiện nay các công ty Dược phẩm trên thế giới đã tách riêng EGCG, đăng ký và thương mại hóa thành một dược chất có tác dụng như tác nhân đơn. Tại thị trường Việt Nam, cũng đã xuất hiện nhiều sản phẩm mỹ phẩm, thực phẩm chức năng và dược phẩm chứa polyphenol chè xanh và EGCG nguồn gốc nhập khẩu từ Trung Quốc (Nguồn: Cục Quản lý Dược - Bộ Y tế 2008).

Từ những năm 2000, các cơ sở nghiên cứu trong nước cũng bắt đầu tổ chức triển khai nghiên cứu công nghệ chiết xuất polyphenol tổng số từ chè xanh và bắt đầu nghiên cứu phân lập các catechin chè xanh cũng như các hợp chất phenolic từ nguồn khác hướng tới mục tiêu ứng dụng trong dược phẩm và hóa mỹ phẩm. Điển hình có thể kể đến Học viện Quân y, Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, TRAPHACO, Mediplantex, Đại học Dược Hà Nội, Đại học Y Dược Thành phố

Hồ Chí Minh. Năm 2002 - 2005 thực hiện đề tài nghiên cứu cấp cơ sở, Học viện Quân y đã phối hợp với Viện Hóa học nghiên cứu công nghệ chiết xuất polyphenol tổng số từ chè xanh, phân lập một số catechin và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các sản phẩm này [2, 3]. Các nghiên cứu này đã thu được những thành công bước đầu về mặt nghiên cứu cơ bản hóa học và hoạt tính sinh học của các catechin chè xanh, là tiền đề để phát triển nghiên cứu và triển khai công nghệ trong tương lai.

Xuất phát từ cách tiếp cận nêu trên, nhằm đáp ứng nhu cầu cấp thiết cho ngành công nghiệp dược phẩm là tìm ra những hoạt chất tinh khiết có hoạt tính sinh học để bào chế ra các loại dược phẩm, chúng tôi đã tiến hành đề tài ***“Nghiên cứu công nghệ tách các catechin từ chè xanh (Camellia sinensis L.), chuyển hóa tạo dẫn xuất O-acetyl catechin và khảo sát hoạt tính dọn gốc tự do của chúng”***; đây là hướng nghiên cứu mới ở Việt Nam, rất có triển vọng ứng dụng trong ngành công nghiệp dược phẩm.

Nhiệm vụ nghiên cứu đề ra trong luận án:

- Từ Chè xanh (*Camellia sinensis L.*), điều chế (chiết tách và bán tổng hợp) được các hoạt chất đặc hữu bao gồm các catechin và các dẫn xuất axyl hóa;
- Phân tích đánh giá cấu trúc hóa học và hoạt tính chống oxy hóa của một số hoạt chất được chọn từ các chất nêu trên.

CHƯƠNG 1 :TỔNG QUAN

1.1. VÀI NÉT VỀ CHÈ XANH

1.1.1. Cây chè - *Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze.

Cây chè, *Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze. thuộc chi Chè - *Camellia*, họ Chè - *Theaceae*, thuộc ngành Hạt kín *Angiospermatophyta*, lớp Ngọc lan (hai lá mầm) *Magnoliopsida*, phân lớp Sô *Dilleniidae*, bộ Chè *Theales*. Năm 1753, Carl Von Linnaeus (Thụy Điển) xác định chè có hai giống: *Thea bokea* (chè đen) và *Thea viridis* (chè xanh) có nguồn gốc ở Vân Nam, Trung Quốc sau đó được phổ biến tại Việt Nam, Nhật Bản, Ấn Độ và nhiều nước Châu Á khác [4-6].



Hình 1.1: Búp chè xanh

Chè là loại cây xanh lưu niên mọc thành bụi hoặc các cây nhỏ, thông thường được xén tỉa để thấp hơn 2 mét khi được trồng để lấy lá. Lá của chè dài từ 4-15 cm và rộng khoảng 2-5 cm. Chè có rễ cái dài. Hoa chè màu trắng ánh vàng, đường kính từ 2,5-4 cm với 7 - 8 cánh hoa mọc ở kẽ lá, mùi thơm nhiều nhị. Quả là một nang, thường có 3 ngăn nhưng chỉ có một hạt do các hạt khác teo đi.

Hàng năm, sản lượng chè trên thế giới đạt 2,5 triệu tấn chè, trong đó 80 % có nguồn gốc từ Châu Á, đặc biệt là Trung Quốc, Ấn Độ và Srilanka.

Ở nước ta, chè được trồng ở 33 tỉnh (chủ yếu ở Phú Thọ, Tuyên Quang, Hà Giang, Thái Nguyên, Quảng Nam, Đà Nẵng, Lâm Đồng, Đắk Lắk). Đến năm 2013, tổng diện tích trồng chè cả nước khoảng 125.000 ha, sản lượng hơn 500.000 tấn, với rất nhiều loại chè thương phẩm, trong đó 70 % xuất khẩu là chè đen còn lại là chè xanh và các loại sản phẩm chè khác. Năm 2013, Việt Nam là nước xuất khẩu chè đứng thứ 5

thế giới, xuất khẩu sang 110 thị trường khác nhau, kim ngạch xuất khẩu chè đạt trên 200 triệu đô la Mỹ. Các thị trường lớn nhất của chè xanh Việt Nam là Pakistan, Đài Loan, Nga, Ba Lan, Trung Quốc, Hoa Kỳ [7-8].

1.1.2. Chè xanh trong thực phẩm và dược phẩm

Đồ uống trong văn hóa châu Á:

Chè là sản phẩm chế biến từ búp (tôm), cuộng và các lá non thu hái từ cây chè . Với những phương pháp chế biến khác nhau, người ta phân ra hai loại chè:

+ Chè xanh: Nước pha xanh vàng, vị đậm dịu, có hương thơm tự nhiên của chè . Chè xanh được chế biến bằng cách đem nguyên liệu chè diệt men (men có sẵn trong nguyên liệu chè) rồi vò, sau đó đem sấy.

+ Chè đen: Trong quá trình chế biến không diệt men ngay mà có thêm quá trình lên men để tạo ra những biến đổi sinh hóa cần thiết làm cho sản phẩm có màu sắc , hương vị đặc biệt. Màu nước pha chè đen có màu đỏ nâu sáng, vị dịu, hương thơm nhẹ.

Ngoài hai loại chè được tiêu thụ chủ yếu hiện nay ở trên , phụ thuộc vào công nghệ chế biến, còn có các loại chè khác như : chè đỏ và chè vàng .Ngoài ra, các loại chè nếu đem ướp hương thì người ta gọi là chè hương , hoặc nếu sản phẩm chè ở dạng cánh rời thì gọi là chè rời, dạng bánh gọi là chè bánh, dạng bột (nước pha chè đem cô đặc rồi sấy khô) gọi là chè bột hay chè hòa tan [9].

Ứng dụng trong dược - thực phẩm:

Các hiểu biết về cơ chế tác dụng sinh lý của chè mới được bắt đầu nghiên cứu mạnh mẽ trong thế kỷ 20. Trước đây các tác dụng của chè thường được quy cho thành phần caffeine và vitamin C, bắt đầu từ khoảng thập niên 1970, các nghiên cứu sâu về hóa sinh và hợp chất thiên nhiên đã chứng minh những tác dụng về mặt dược lý và sinh lý của nhóm các hợp chất catechin trong chè. Đã có nhiều công bố về tác dụng của các polyphenol chè xanh đối với các bệnh ung thư, tim mạch, tiết niệu, tiêu hóa,

Alzheimer, bệnh Parkinson, .v.v...; ngoài ra polyphenol chè xanh còn có tác dụng làm giảm sự nhiễm độc do kim loại, do phóng xạ...[1, 10, 11].

Theo nghiên cứu của các nhà khoa học ở trung tâm dinh dưỡng Unilever (Vlaerdingen, Hà Lan), một số bệnh viện đã đưa chè vào danh sách những thực phẩm có tính năng bảo vệ sức khỏe. Các nhà khoa học nhận thấy sau khi uống đều đặn mỗi ngày 3 chén nước chè, “khối lượng” và phạm vi hoạt động của gốc tự do oxy hóa trong huyết thanh của cơ thể đã giảm đi rõ rệt [12].

Chè xanh có tác dụng giải khát, tăng cường chất dinh dưỡng và ngăn ngừa bệnh nhờ vào các chất có hoạt tính sinh học cao có trong lá chè. Nó đã trở thành nguyên liệu quan trọng để chế biến nhiều loại thức ăn, đồ uống khác nhau như các loại bánh kem chè xanh, bánh gatô chè xanh, sandwich chè xanh,...được tiêu thụ mạnh ở Việt Nam, Nhật Bản, Hàn Quốc, Anh, Mỹ, Úc. Trong đó, Nhật Bản là nước có nhiều loại đồ uống và thức ăn được chế biến với chè xanh nhất [13, 14], một số ứng dụng trong thực phẩm của chế phẩm Thea-flan (chế phẩm giàu catechin từ chè xanh) và polyphenol chè xanh (bảng 1.1).

Bảng 1. 1: Ứng dụng của chế phẩm polyphenol chè xanh trong chế biến thực phẩm

Lĩnh vực sử dụng	Công dụng đối với các sản phẩm	Hàm lượng sử dụng	
		Thea-flan	Polyphenol
Chất bảo quản chống ôxi hóa	-Dầu ăn thông thường (dầu thực vật, dầu đậu tương, dầu cọ, mỡ lợn...); - Thực phẩm chứa dầu (snack food, thực phẩm rán, margarin...);	0,01-0,5%	0,002-0,2%
	- Dầu có chứa các axit béo bão hòa phân tử lượng lớn;	0,1 - 1,0 %	0,2 - 0,3 %
	- Kéo dài thời gian sử dụng của các thực phẩm chế biến từ hải sản;	0,01-0,5%	

	- Thực phẩm khô như bột cá;	0,01 - 0,1 %	
	-Chống nhạt màu của các chất màu tự nhiên.	0,01-0,5%	0,05-0,3%
Kiểm soát mầm bệnh	- Tất cả thực phẩm thông thường	0,1 - 0,5 %	0,05 - 0,3 %
Khử mùi	- Thực phẩm chống hôi miệng (bánh kẹo, kẹo cao su)	0,1 - 0,5 %	$\leq 0,2 \%$
Thực phẩm y tế	- Đồ uống cho sức khỏe		0,1 - 0,3 %
	- Chống sâu răng, viêm lợi (kẹo, bánh);		
	-Ức chế tăng cholesterol (sử dụng trong hamburger, thịt băm, xúc xích, thực phẩm rán... cho người ăn kiêng).		0,1 - 2 %

1.2. THÀNH PHẦN HOẠT CHẤT CỦA CHÈ XANH

Thành phần hóa học của nguyên liệu chè bao gồm tannin , caffeine, proteine, tinh dầu, men, sắc tố, pectin, vitamine, chất khoáng, axit hữu cơ... trong đó tannin, caffeine, sắc tố, dầu thơm, pectin là những thành phần quan trọng quyết định màu sắc , hương vị của sản phẩm [4]. Tannin là tên chung để chỉ hỗn hợp các chất polyphenol mà catechin là thành phần chủ yếu. Trong quá trình sản xuất chè xanh, men polyphenol oxidase có tác dụng oxy hóa các polyphenol đã bị bất hoạt bởi nhiệt độ nên toàn bộ hàm lượng polyphenol trong chè xanh không thay đổi so với hàm lượng polyphenol trong lá chè. Các hợp chất phenol từ lâu đã được xem như là một trong các thông số quan trọng đầu tiên hay còn được coi là các chất chỉ thị của chè [15-18]. Chất chỉ thị quan trọng nhất trong chè đen dùng để tiếp cận đánh giá giá trị thị trường, các giống chè khác nhau [19, 20] và sự khác biệt chất lượng chè theo mùa [21-23] là theaflavin. Trong chè xanh

catechin và các gallate của chúng, các hợp chất phenol tổng số được xem là các chỉ số đánh giá chất lượng [24, 25] và giá trị của chè [26, 27]. Vì vậy, phân tích các hợp chất phenol của chè rất quan trọng đối với việc xác định và mô tả tính chất của chè.

1.2.1. So sánh chất lượng nguyên liệu theo vùng trồng chè xanh ở Thái Nguyên, Phú Thọ, Mộc Châu [73]

Nghiên cứu đã tiến hành lựa chọn và lấy mẫu (đọt chè tươi 1 tôm 3 lá, hái vào buổi sáng sớm) vào vụ mùa trong năm 2010 tại các vùng trồng chè ở miền Bắc là Thái Nguyên (TN), Phú Thọ (PT), Mộc Châu (MC). Tiến hành phân tích thành phần cơ giới đọt chè 1 tôm 3 lá của chè xanh và hàm lượng polyphenol trong chè xanh được thu hái ở các vùng và các vụ khác nhau trong năm thu được kết quả thể hiện trong bảng 1.2 và bảng 1.3.

Bảng 1. 2 : Thành phần cơ học nguyên liệu 1 tôm 3 lá

Vùng chè	Tôm		Lá 1		Lá 2		Lá 3		Cuộng		Tổng (g)
	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	
TN	2,2	4,69	4,5	9,6	11,0	23,45	15,2	32,41	14,0	29,85	46,9
PT	2,3	4,85	4,5	9,55	11,4	24,07	15,0	31,6	14,2	29,9	47,5
MC	2,5	5,3	4,5	9,55	11,5	24,42	14,9	31,63	13,7	29,09	47,1

Bảng 1. 3 : Thành phần polyphenol nguyên liệu chè theo vùng và vụ thu hái

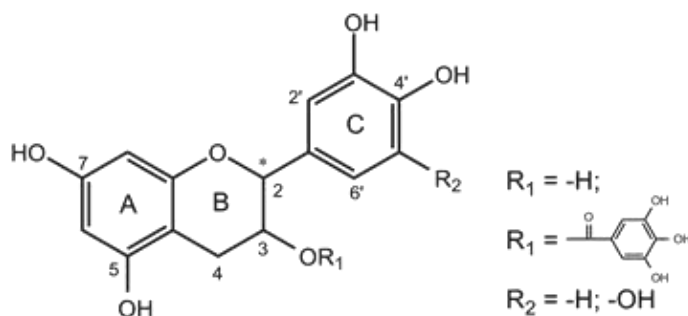
Chỉ tiêu Vụ	Polyphenol (%)		
	TN	PT	MC
Xuân	16,2	15,3	16,32
Hạ	19,12	15,65	19,54
Thu	20,45	16,78	20,18
Đông	18,1	15,2	17,85

Đơn vị: % tính theo hàm lượng khô

Từ kết quả phân tích ở bảng 1.2 và bảng 1.3 cho thấy, so sánh về trọng lượng, tỷ lệ các thành phần tương ứng của đợt chè gồm tôm, lá 1, lá 2, lá 3, cuộng và trọng lượng trung bình đợt chè của nguyên liệu hái từ vườn chè được chăm sóc, đồn hái theo quy trình an toàn giữa các mẫu và hàm lượng polyphenol theo chè thu thập ở Thái Nguyên, Phú Thọ và Mộc Châu và vụ mùa thu hái thấy rằng không có sự chênh lệch nhau đáng kể. Tuy nhiên, qua điều thấy rằng, chè Mộc Châu và Thái Nguyên có độ đồng đều về màu sắc, tỷ lệ già/bánh tẻ và hương vượt trội hơn so với chè Phú Thọ [73]. Vì vậy chè xanh Thái Nguyên đã được lựa chọn để làm đối tượng nghiên cứu cho luận án.

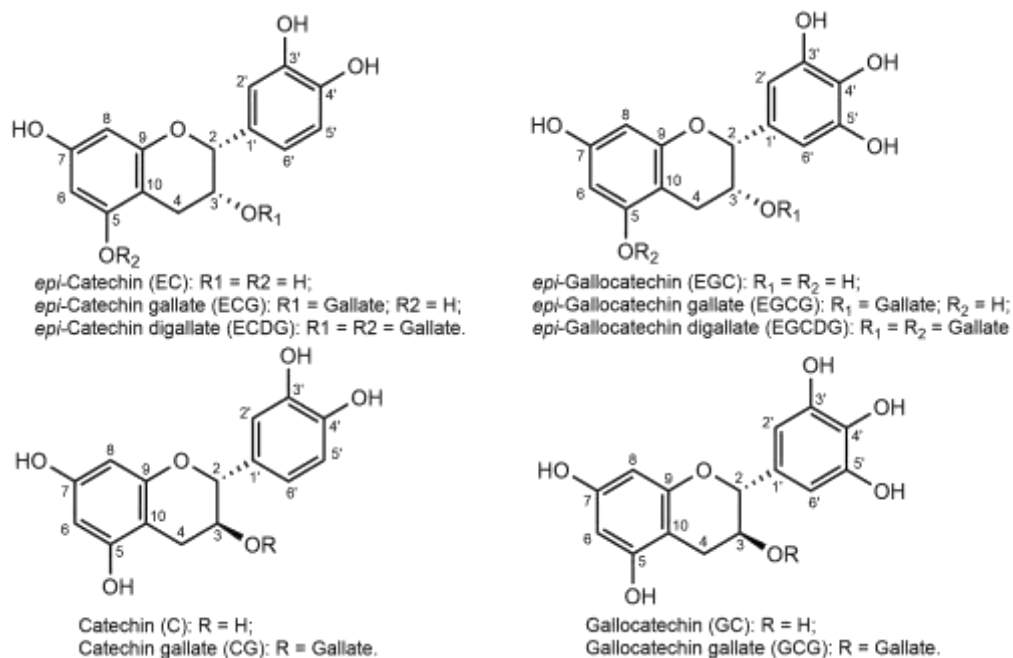
1.2.2. Các catechin chè xanh

Các catechin và các hợp chất gallate của chúng thường được gọi chung là các catechin chè xanh, chiếm khoảng 30 % trọng lượng khô [28, 29]. Các hợp chất này thuộc phân lớp flavan-3-ol hay còn gọi là flavanol trong lớp chất flavonoid. Các chất này có bộ khung C6-C3-C6 rất độc đáo (hình 1.2), được cấu thành từ 3 vòng phenol được kí hiệu là A, B và C, khác nhau về mức độ hydroxyl hóa [30]. Bộ khung này và sự định hướng tương đối của các thành phần của phân tử quyết định các hoạt tính sinh học của catechin và các chất chuyển hóa của chúng.



Hình 1. 1: Công thức tổng quát của Catechin

Trong cấu trúc các catechin, khi sắp xếp theo cấu hình tuyệt đối và các nhóm thế có thể xuất hiện tới 24 catechin, tuy nhiên đến nay mới có 12 catechin [16, 17] được phân lập và xác định cấu trúc từ chè xanh (hình 1.3).



Hình 1. 2: Một số cấu trúc catechin chè xanh điển hình

Các catechin đã được phân lập là EC, C, EGC, và GC; catechin gallat gồm có ECG, CG, GCG, EGCG; hai catechin digallat là epicatechin digallat ECDG và epigallocatechin digallat EGCDG cũng được gọi chung là catechin gallat. Gần đây (-)-epicatechin-3-(3-O-methylgallate) và (-)-epigallocatechin-3-(3-O-methylgallate) mới được tìm thấy trong thành phần tự nhiên của chè. Tỷ lệ % mol và hàm lượng các catechin này trong trong các loại chè khác nhau và trong các bộ phận khác của chè xanh được nêu trong bảng 1.4, bảng 1.5, bảng 1.6.

Bảng 1. 4: Các catechin đã được phân lập trong chè xanh

Stt	Tên	Viết tắt	Tỉ lệ (% mol)
1	Catechin	C	0,40
2	Epicatechin	EC	1,30
3	Gallocatechin	GC	2,00
4	Epigallocatechin	EGC	12,00
5	Epicatechin gallate	ECG	18,01
6	Epigallocatechin gallate	EGCG	58,10

7	Catechin gallate	CG	
8	Gallo catechin gallate	GCG	
9	Epicatechin digallate	ECDG	
10	Epigallocatechin digallate	EGCDG	

Bảng 1. 5: Hàm lượng các catechin chủ yếu trong các loại chè khác nhau

	Chè xanh	Chè đen	Chè OoLong
EGCG	7.33	2.79	1.18
EGC	3.21	0.39	0.73
ECG	1.04	1.15	0.31
EC	1.41	0.74	0.35
Gallic Acid	0.07	0.25	0.12
Caffeine	3.83	4.74	2.91

Đơn vị: % tính theo hàm lượng khô

Bảng 1. 6: Thành phần catechin trong các bộ phận chè xanh [16]

Catechin	Lá thứ 1	Lá thứ 2	Lá thứ 3	Lá già	Cuộng
EGC	122,10	152,27	206,27	232,36	222,08
GC	0	0	0	0	68,79
EC	45,53	47,84	45,16	45,16	65,65
EGCG	580,54	577,93	431,14	431,14	292,93
ECG	138,52	132,27	103,09	103,09	87,98
Tổng lượng catechin	886,69	910,31	786,11	701,82	737,40

Đơn vị: mg/g chế phẩm chiết bằng ethyl acetate

Từ kết quả phân tích ở bảng 1.5 và bảng 1.6 cho thấy hàm lượng catechin trong chè xanh lớn hơn chè đen, chè ôlong và Epigallocatechin gallat (EGCG) là thành phần polyphenol chính trong lá chè, chiếm hàm lượng cao nhất khoảng 10 - 50 % tổng lượng catechin. Trong các catechin chè xanh, EGCG là chất có khả năng chống ôxy hóa, chống ung thư và có tính đề kháng cao nhất. Hoạt tính chống ôxy hóa của EGCG cao gấp 100 lần so với vitamin C và cao hơn 25 lần so với vitamin E. EGCG hỗ trợ hiệu quả trong các thử nghiệm lâm sàng ức chế các tác nhân gây ung thư, điều trị các bệnh tim mạch, phòng ngừa bệnh xơ vữa động mạch do tác dụng làm giảm tích tụ gốc tự do - ngăn cản sự ôxy hóa của lipid trong máu, giảm LDL-cholesterol, tăng HDL-cholesterol. Do những lợi ích của EGCG nên người ta cho rằng chè xanh có thể giúp chống lão hóa mô, kéo dài tuổi thọ của con người [31, 32].

Tính chất hóa học chung của các catechin [32-36]:

Những nghiên cứu hóa học và cấu trúc cho biết rằng các catechin và các hợp chất gallate của chúng hấp phụ quang phổ tử ngoại trong vùng bước sóng từ 266 đến 280 nm. Trong dung môi ethanol, bước sóng hấp phụ cực đại của các catechin lần lượt như sau: EC 280 nm, GCG 275 nm và 279.5 nm, ECG 279 -280 nm, EGC 271 nm, EGCG 275 nm.

Catechin là chất không màu, khi kết tinh có dạng hình kim hoặc hình lăng trụ. Chúng có vị chát ở mức độ khác nhau, có hậu ngọt, riêng hai chất EGC và EGCG có vị chát hơi đắng khi ở dạng tự do và chuyển thành vị chát dịu khi ngưng thành các dicatechin.

Các catechin dễ tan trong nước nóng, ancol, acetone, ethyl acetate, không tan trong benzene và chloroform. Tính tan tốt trong nước và trong ethyl acetate đã được áp dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất các catechin từ hỗn hợp tannin chè xanh.

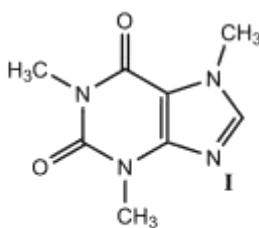
Các chất catechin tạo phản ứng màu với FeCl_3 và tùy thuộc vào các nhóm hydroxyl trong phân tử mà cho màu xanh lá cây hoặc màu xanh da trời.

Các chất catechin có tính khử mạnh nên dễ dàng bị oxy hóa bởi dung dịch KMnO_4 trong môi trường axit và bởi dung dịch I_2 trong môi trường kiềm, chúng có thể tự oxy hóa trong không khí ẩm.

Dưới tác dụng của các men peroxidase, hoặc ở nhiệt độ cao, các catechin bị oxy hóa và tiếp đến các sản phẩm oxy hóa thứ cấp lại gây ra hàng loạt các chuyển hóa hóa học của các hoạt chất có trong lá chè, góp phần tạo ra mùi thơm đặc trưng cho các loại chè. Cuối cùng, các sản phẩm oxy hóa bị ngưng tụ thành các hợp chất có màu vàng chuyển dần sang màu đỏ đặc trưng cho màu nước chè đen.

1.2.3. Các thành phần khác [14]

Caffeine: Đây có thể coi là một hoạt chất chính của chè xanh [10]. Caffeine có tác dụng tạo cảm giác hưng phấn, được sử dụng rộng rãi trong dược phẩm và nước giải khát có gas.. Caffeine tan trong nước chè nóng tạo nên hương thơm, giảm vị đắng do có khả năng tạo muối tannate với các thành phần tannin bị oxy hóa. Hàm lượng caffeine biến đổi theo mùa, cao nhất vào tháng 7 (4 % chè khô). Caffeine thăng hoa ở nhiệt độ 100°C , do đó khoảng 10 % caffeine sẽ bị hao hụt khi sao sấy, chế biến chè xanh.



Caffeine
1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione

Nước: Chiếm 75 - 80 % lá chè tươi, hàm lượng nước giảm dần từ lá đến thân. Ngoài ra, hàm lượng nước còn thay đổi theo thời điểm thu hoạch và thời tiết lúc thu hoạch. Khi chế biến, nước là môi trường và tham gia trực tiếp vào nhiều phản ứng thủy phân và oxy hóa khử xảy ra trong quá trình chế biến. Khi hàm lượng nước trong nguyên liệu chè < 10 % thì các loại men trong nguyên liệu chè bị ức chế hoạt động. Để

chuẩn hóa nguyên liệu cho quá trình chế biến từng loại thành phẩm chè, người ta thường cố gắng tránh làm mất nước và áp dụng rất nhiều biện pháp hạn chế sự mất nước trong quá trình thu hái, bảo quản và vận chuyển.

Các enzyme: Các enzyme trong chè xanh chủ yếu thuộc về hai nhóm: 1 - *Thủy phân*: Amilase, protease; và 2 - *Ôxy hóa*: peroxydase, polyphenol-oxydase.

Trong sản xuất chè đen, enzyme đóng một vai trò rất quan trọng cho những biến đổi sinh hóa trong các giai đoạn vò nát, làm héo, lên men từ đó tạo ra hương vị, màu sắc đặc biệt của chè đen. Các men này hoạt động mạnh ở 40°C, nhiệt độ cao hơn sẽ yếu dần và đến hơn 70°C thì mất hoạt tính. Trong quá trình lên men chế biến chè đen, các enzyme oxydase và peroxydase tham gia vào quá trình oxy hóa tannin tạo ra các sản phẩm có màu đỏ sẫm, màu sữa hoặc lốm đốm hồng.

Trong sản xuất chè xanh, cần thiết giữ hàm lượng tannin cao, tránh bị ôxy hóa. Vì thế, ngay từ giai đoạn đầu tiên của quá trình chế biến chè xanh, người ta dùng nhiệt độ cao để diệt men trong nguyên liệu chè.

Các sắc tố: Như phần lớn lá thực vật bậc cao, chè xanh rất giàu các sắc tố; ví dụ

- Chlorophyll: sắc tố chủ yếu quyết định màu nước pha chè xanh thành phẩm. Tuy nhiên lại làm giảm đi màu sắc đặc trưng của nước chè đen. Do đó, trong quá trình chế biến chè đen ở Trung Quốc, người ta tách triệt để chlorophyll khỏi nguyên liệu và tận thu làm nguyên liệu dược phẩm;

- Caroten và xantophyll: Các sắc tố màu vàng, không tan trong nước cho bã chè có màu vàng xỉn;

- Anthocyanidine khi bị ôxy hóa thì tan được trong nước và nó là sắc tố chủ yếu của màu sắc nước pha chè đen (màu đồng đỏ), hàm lượng anthocyanidin thường được điều chỉnh trong công nghệ lên men sản xuất chè đen. Tuy vậy, nồng độ cao sắc tố này làm chè có vị rất đắng và làm xấu màu nước pha chè xanh.

Các tinh dầu: Trong nguyên liệu chè có khoảng 0,03 % tinh dầu, thành phần chính là các aldehyd, có mùi chè hăng thơm ngọt. Nguyên liệu chè chứa nhiều dầu thơm có nhiệt độ sôi cao sẽ làm tăng chất lượng chè thành phẩm.

Pectin: Hàm lượng pectin trong nguyên liệu chè ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình chế biến và chất lượng chè thành phẩm. Với một lượng pectin thích hợp thì tạo điều kiện tốt cho lá chè dễ dàng xoắn chặt lại; tuy nhiên nếu chứa quá nhiều pectin sẽ làm cho khối nguyên liệu chè vón cục lại khi vò và sẽ gây khó khăn khi sấy chè; pectin có tính hút ẩm mạnh nên sẽ làm tăng độ ẩm trong quá trình bảo quản, làm giảm chất lượng chè. Mặc dầu vậy, để sản xuất chè bánh, pectin được thêm vào để tạo độ nhòn và kết dính định hình bánh chè dưới tác dụng nhiệt độ cao.

1.3. HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA EGCG VÀ CÁC CATECHIN CHÈ XANH

Chè xanh và các catechin chè xanh là có hoạt tính chống oxy hóa nên đã được thử nghiệm và đánh giá hiệu quả trong một số bệnh liên quan đến các loại oxygen phản ứng (ROS-reactive oxygen species), chẳng hạn như các bệnh ung thư, tim mạch và thoái hóa thần kinh. Một số nghiên cứu dịch tễ học cũng như nghiên cứu trên mô hình động vật đã chỉ ra rằng chè xanh đủ khả năng bảo vệ chống lại các bệnh ung thư khác nhau như ung thư vú, ung thư da, ung thư tuyến tiền liệt và ung thư phổi [32, 33]. Ngoài khả năng phòng và chống các bệnh ung thư, chè xanh và EGCG đã được chứng minh có hoạt tính chống sinh thành mạch (anti-angiogenic) (ngăn chặn sự tạo thành mạch của các mạch máu khối u) [34, 35] và chống gây đột biến (anti-mutagenic) [36-37]. Chè xanh có khả năng làm giảm cholesterol [38] và ngăn chặn sự phát triển của xơ vữa động mạch [39]. Trong số các bệnh lý liên quan đến tuổi và các bệnh thoái hóa thần kinh, chè xanh đã được chứng minh có đủ khả năng bảo vệ cơ thể chống lại bệnh Parkinson, Bệnh Alzheimer, và tai biến do thiếu máu cục bộ [40-41]. Chè xanh cũng cho thấy tác dụng chống bệnh tiểu đường trong các mô hình động vật kháng insulin [42, 43] và thúc đẩy tiêu hao năng lượng [44]. Ngoài ra chè xanh còn là chất kháng khuẩn [45], chống HIV [46], chống lão hóa [47] và chống viêm [48].

1.3.1. Cơ chế hoạt động [49]

Những lợi ích chè xanh có được chủ yếu do hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính tiêu diệt các gốc tự do của các catechin. Hoạt tính này được tính cho sự hiện diện của các nhóm phenolic hydroxy trên vòng B ở các catechin (EC và ECG) (hình 1.2) và trên các vòng B- và D- ở các gallocatechin (EGC và EGCG). Ba nhóm hydroxy trên vòng B đã được chứng minh là quan trọng trong việc các catechin thể hiện hoạt tính chống oxy hóa và tiêu diệt các gốc tự do. Khả năng bắt giữ các kim loại của các catechin có đóng góp quan trọng cho hoạt tính chống oxy hóa. Gần đây nghiên cứu của Mandel đã chỉ ra rằng sự rối loạn chuyển hóa sắt có thể là nguyên nhân bệnh học quan trọng nhất của bệnh Parkinson vì vậy mà hoạt tính bắt giữ kim loại của EGCG là rất quan trọng trong việc bảo vệ các tế bào thần kinh chống lại căn bệnh thoái hóa.

Ngoài tác dụng chống oxy hóa, chè xanh còn tác động đến các phân tử đích và tế bào đích tham gia vào con đường truyền tín hiệu liên quan đến các tế bào chết và tế bào được tồn tại hay còn gọi là hiệu ứng cảm ứng gây chết tế bào được lập trình (apoptosis). Những ảnh hưởng này đã được chứng minh trong cả hai loại tế bào thần kinh tế bào và tế bào biểu mô/nội mô khối u [41, 49]. Tuy nhiên, vẫn chưa rõ liệu những tác dụng này đến các điểm cuối (là các phân tử) của các con đường truyền tin là các hiệu ứng ngược dòng (downstream events) của sự cân bằng trong tế bào giữa các chất pro-oxidant/antioxidant hoặc do tác động trực tiếp của EGCG và các catechin lên các phân tử đích, độc lập với hoạt tính chống oxy hóa của các catechin. Hơn nữa, hầu hết các cơ chế phân tử giả định hiện nay đều dựa trên những nghiên cứu về nồng độ của EGCG *in vitro* - nồng độ nghiên cứu này vượt rất xa nồng độ *in vivo*.

Các catechin chè xanh biểu hiện hoạt tính kháng u nhờ khả năng kìm hãm sự tăng sinh của các tế bào khối u, ức chế các con đường ở cấp độ phân tử tham gia vào các chu kỳ tế bào, ngăn chặn quá trình tạo thành mạch, sự xâm lấn và sự tăng sinh do các hormon tăng trưởng điều khiển. Điều trị bằng EGCG cho thấy nhân tố tăng trưởng G1 bị kìm hãm, enzym kinase phụ thuộc cyclin bị bất hoạt, đồng thời cảm ứng tổng

hợp các chất ức chế của protein p21 và p27 ở các dòng tế bào ung thư vú và ung thư tiền liệt tuyến. EGCG cũng ức chế yếu tố phiên mã kích hoạt gen qua trung gian như NF- κ B và AP-1. Sự kìm hãm quá trình hoạt hóa gen trung gian qua NF- κ B và AP-1 là hiện tượng trung tâm giải thích cho hoạt tính chống oxy hóa của các catechin chè xanh và ảnh hưởng của chúng trên đến các phân tử đích. NF- κ B, trong đáp ứng với sự tiêu diệt các gốc tự do, kích hoạt phiên mã của nhiều gen pro-inflammatory và anti-apoptotic/survival. Hoạt tính tiêu diệt các gốc tự do của catechin chè xanh ức chế sự hoạt hóa NF- κ B, dẫn đến ức chế biểu hiện pro-inflammatory và các gen sống sót. Ngoài ra, EGCG trực tiếp ức chế hoạt tính proteasome, dẫn đến sự tích lũy các protein kìm hãm NF- κ B, I κ B, và các protein pro-apoptosis như Bax. Cơ chế kìm hãm sự hoạt hóa cá gen trung gian qua NF- κ B của EGCG cũng tương tự như ức chế sự cảm ứng nitric oxide syntase, là enzym trung gian các hoạt động chống viêm. Chè xanh cũng ức chế sự hình thành mạch và sự xâm lấn của các khối u nhờ khả năng bất hoạt các metalloproteinaza và sự biểu hiện các thụ thể của yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu và dẫn truyền tín hiệu ở các tế bào nội mô và các tế bào khối u.

Trong tế bào thần kinh, các catechin thể hiện khả năng bảo vệ các tế bào này ở nồng độ thấp hơn nhiều so với nồng độ thể hiện khả năng tiêu diệt các tế bào ung thư [41]. Nhiều người cho rằng khả năng bảo vệ tế bào thần kinh của các catechin là do hoạt tính chống oxy hóa và bắt giữ kim loại, đã có bằng chứng gợi ý rằng catechins cũng ảnh hưởng đến con đường truyền tín hiệu tế bào rời rạc của các tế bào thần kinh nhờ đó mà có khả năng bảo vệ tế bào thần kinh. EGCG ở nồng độ 1-10 μ M đã được chứng minh chống lại sự gây chết các tế bào thần kinh cảm ứng bởi β -amyloid và 6-hydroxydopamine nhờ hoạt hóa protein kinase C (PKC). PKC có vai trò quan trọng cho sự tồn tại của các tế bào thần kinh, PKC mất hoạt tính sẽ dẫn đến một loạt các hiệu ứng thần kinh như là sự tích lũy amyloid- β và các độc tố thần kinh khác. EGCG liều thấp làm giảm sự biểu hiện của các gen proapoptotic như BAX, BAD, caspaza, và p21 trong tế bào thần kinh nhờ đó mà biểu hiện hoạt tính bảo vệ hệ thần kinh ở cấp độ tế

bào. EGCG ảnh hưởng đến quá trình chế biến protein tiền chất của amyloid (APP) thông qua nhiều cơ chế. Đã có bằng chứng cho thấy rằng EGCG tăng cường thúc đẩy chế biến APP thông con đường α -secretase non-amyloidogenic và dường như là kìm hãm trực tiếp con đường β -secretase dẫn đến sự tổng hợp các sợi β -amyloid.

Rõ ràng là ảnh hưởng của EGCG và các catechin chè xanh lên cấp độ tế bào phụ thuộc vào liều lượng và loại tế bào và có vai trò nhiều hơn là chỉ biểu hiện hoạt tính chống oxy và tiêu diệt các gốc tự do. Bất cứ hiệu quả nào được khuếch đại in vivo đều phụ thuộc vào liều lượng và dược động học của chè xanh. Vì chè xanh được sử dụng rộng rãi để tăng cường sức khỏe tự nhiên, mối liên hệ giữa hoạt tính và liều lượng, loại tế bào khối u, tế bào thần kinh chịu tác động là hết sức cần thiết. Các nghiên cứu tìm hiểu mối quan hệ này vẫn được thực hiện. Tuy nhiên, thực tế là chè xanh đã được sử dụng trong nhiều thế kỷ ở châu Á mà không có độc tính, cùng với vô số các truyền thuyết về lợi ích của việc uống trà cho thấy rằng các catechin chè xanh, đặc biệt là EGCG có thể cơ sở cho sự khám phá ra là một lớp dược chất mới. Lý tưởng nhất, các hoạt chất như vậy cần bắt chước tác dụng bảo vệ của chè xanh mà để có lợi ích mong muốn không cần phải thay đổi lối sống (chẳng hạn phải uống nhiều tách một ngày).

1.3.2. Hoạt tính chống ôxy hóa[11, 49]

Như đã đề cập ở trên hoạt tính chống ôxy hóa được quy bởi các nhóm hydroxy phenyl trên vòng C - trong cấu trúc các catechin không galloyl (ví dụ EC và EGC) và trên các vòng C - và vòng D - trong các este galloyl catechin (ECG và EGCG). Yếu tố cấu trúc 3,4,5-trihydroxyphenyl trên vòng C - đóng vai trò quan trọng nhất trong hoạt tính chống ôxy hóa và dọn gốc tự do của các hợp chất này, có thể sắp xếp hoạt độ chống ôxy hóa của hợp chất này EGCG > ECG > EGC > EC. Rice-Evans đã chứng minh hoạt tính dọn gốc tự do của EGCG mạnh hơn hẳn các vitamin C và E [11, 49].

1.3.3. Hoạt tính diệt khuẩn, kháng viêm, kháng virus [45,46,48]

Tháng 8/1996 giáo sư T. Shimamura tại trường đại học y khoa Showa (Nhật

Bản) đã có công trình diễn thuyết "về tác động diệt khuẩn E-coli-157" tại hội thảo chuyên đề diệt khuẩn của chè xanh.

Catechin, các hợp chất tạo nên vị đắng của chè xanh có công dụng hữu hiệu trong việc tiêu diệt hầu hết những loại vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm và giải trừ luôn những độc tố do vi khuẩn tiết ra, cụ thể đây là độc tố veratoxin của Ecoli -157.

Nếu uống chè xanh trong và sau bữa ăn sẽ phát huy được cơ chế chất catechin tiêu diệt tế bào ngoài của vi khuẩn. Trong các thử nghiệm này chè xanh được ngâm trong nước muối để tạo ra hợp chất pha loãng nồng độ 2,5 % - 5 % so với trà bình thường. Còn khi ngâm với nước nóng các catechin được giải phóng nhiều hơn nên tác động diệt khuẩn cũng được cải thiện. Tuy nhiên các nhà nghiên cứu cũng khuyến cáo không nên uống chè xanh trước những bữa ăn, nhất là trà nóng. Điều này sẽ làm dịch vị tiết ra trong miệng, sẽ khiến ta không có cảm giác ngon miệng.

Chè xanh đã được biết đến để ngăn ngừa sâu răng cho nhiều thập kỷ. Tuy nhiên, gần đây, EGCG đã nhận được sự chú ý đáng kể bởi khả năng ức chế lây nhiễm HIV và sự nhiễm trùng kháng đa thuốc *Staphylococcus aureus* [48]. EGCG ức chế sự nhân bản của HIV-1 bằng cách ức chế enzyme sao chép ngược HIV reverse transcriptase và gây nhiễu quá trình bám của vỏ virus. Gần đây, Kawai cho thấy rằng EGCG ngăn chặn quá trình bám của các virion HIV-1, gp120 và phân tử CD4 lên bề mặt tế bào miễn dịch T-help, do đó ngăn ngừa bước khởi đầu tiên của sự lây nhiễm HIV-1. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Chang và các cộng sự đã chứng tỏ rằng các catechin epigallocatehin, epicatechin gallat và epigallocatechin gallat được chiết từ chè xanh - *Camellia sinensis* L. - có tác dụng ức chế, gây miễn nhiễm với vi rút HIV, IC_{50} của epigallocatechin là 7,8; của epicatechin gallat là 0,32 và của epigallocatechin gallat là 0,63 mmol [46].

1.3.4. Một số nghiên cứu ứng dụng các catechin phòng và trị ung thư [32,33]

Những chất polyphenol có trong chè xanh có vai trò quan trọng trong việc phòng

chống lại bệnh ung thư. Hoạt chất EGCG có tính chất chống oxy hóa mạnh, ngăn ngừa các peroxidase kích hoạt sự sao chép nhân bản ở tế bào ung thư.

Trong giai đoạn bắt đầu của tế bào ung thư, EGCG có khả năng ức chế AP-1, một chất dẫn truyền khơi mào cho sự phát triển của tế bào ung thư da; thể hiện khả năng ngăn chặn protein kinase, enzyme kích hoạt tế bào trong giai đoạn phát triển của tế bào ung thư da, thể hiện khả năng ngăn chặn protein kinase, enzyme kích hoạt trong giai đoạn phát triển của tế bào ung thư, ức chế hoạt động của telomerase, làm giảm thời gian sống của tế bào ung thư.

Khi quá trình ung thư diễn ra, EGCG có thể can thiệp, ức chế hoạt động của urokinase, enzyme đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển và biến đổi của tế bào ung thư, phá hủy các dạng biến đổi đặc thù của tế bào gây ra do adevirus hay ngăn chặn quá trình tổng hợp AND trong tế bào ung thư hepatoma, leukemia và ung thư phổi...

Từ năm 1997 - 2001, Viện nghiên cứu ung thư quốc gia Mỹ đã hoàn tất các nghiên cứu Phase I dược tính và dược lý của EGCG và hiện đã bước vào giai đoạn cuối thử nghiệm lâm sàng Phase II cho loại dược phẩm này trên các bệnh ung thư, đặc biệt đối với các thể khối u rắn. Kết quả thử nghiệm lâm sàng cho thấy để đạt được hiệu quả điều trị ngang với liều lượng 20 mg amilorid/ngày, người bệnh chỉ cần một tách nhỏ chè chứa 150 mg epigallocatechin gallat và uống thêm một vài loại chè mình yêu thích khoảng 10 tách/ngày.

Ung thư dạ dày: Một số nghiên cứu được tiến hành ở Nhật Bản và Trung Quốc đã cho thấy tác dụng của chè xanh kìm hãm sự phát triển của ung thư dạ dày [9], những người uống nhiều nhất cho kết quả tốt nhất. Inoue tiến hành nghiên cứu trên 22.834 người Nhật Bản thấy rằng uống bảy ly chè xanh một ngày có liên quan với việc giảm 31 % nguy cơ ung thư dạ dày. Phù hợp với những dữ liệu trên, trong một nghiên cứu của Shibata cho thấy 636 người sống trong một ngôi làng uống hơn mười ly một ngày

giảm nguy cơ tiền ung thư mãn tính teo viêm dạ dày. Hamajima thấy rằng uống ít nhất 1 đến 2 tách chè xanh mỗi ngày giúp cải thiện hàm lượng pepsinogen huyết thanh cấp là một yếu tố gây ung thư dạ dày.

Ung thư đại trực tràng: Một số nghiên cứu thực nghiệm ở Nhật Bản và Trung Quốc cho thấy tiềm năng chống lại bệnh ung thư đường tiêu hóa của trà đặc biệt ung thư đại trực tràng. Thật thú vị, polyphenol trong chè xanh làm giảm 50 % lượng prostaglandin E2 được tổng hợp trong niêm mạc trực tràng bốn giờ sau khi uống.

Ung thư bàng quang và thận: Nghiên cứu của Ohno và các cộng sự được tiến hành trên nhóm 882 người Nhật Bản cho thấy tác dụng bảo vệ của chè xanh đối với ung thư bàng quang, đặc biệt là ở phụ nữ. Trong một nghiên cứu tiếp theo của nhóm này, Wakai và các cộng sự thấy rằng những bệnh nhân uống chè xanh có tuổi thọ dài hơn 5 năm so với những người không uống. Một nghiên cứu trên 4.000 người Mỹ cho thấy uống nhiều hơn 5 tách trà một ngày có liên quan với việc giảm 30 % nguy cơ ung thư bàng quang.

Ung thư tuyến tiền liệt: In vitro, các catechin chè xanh ức chế 5- α -Reductase là enzyme xúc tác cho quá trình chuyển hóa testosterone thành 5-dihydrotestosterone cho thấy tiềm năng ứng dụng của chè xanh trong hỗ trợ điều trị ung thư tuyến tiền liệt. Jain và cộng sự với nghiên cứu trên 1254 người Canada gần đây cho thấy khi uống 500 ml nước trà/ngày giúp giảm 30 % nguy cơ ung thư tuyến tiền liệt. Dù rằng kết quả trên được ghi nhận với trà đen nhưng Paschka đã chứng minh rằng EGCG catechin chè xanh cảm ứng apoptosis các tế bào ung thư tuyến tiền liệt.

Ung thư da: Những nghiên cứu trên cả mô hình động vật và trên người cho thấy polyphenol có tác dụng bảo vệ da chống lại những tác hại của tia cực tím và các hóa chất gây ung thư da. Katiyar tìm thấy EGCG ức chế các tế bào bạch cầu xâm nhập và quá trình sinh ra các gốc oxy và nitơ tự do trong da của con người do UVB cảm ứng. Elmets tìm thấy catechin trà mà EGCG và ECG là các tác nhân mạnh nhất ức chế phản

ứng ban đỏ và phá hủy DNA do UVB gây ra. Uống chè đen trước hoặc sau khi chiếu xạ UVB cũng hiệu quả trong việc làm giảm cảm ứng phototoxicity và viêm trong da của con người.

Ung thư vú: Trong nhiều thí nghiệm khác nhau ở những con chuột bị khối u ở vú được cho uống chè xanh, so sánh với những con chuột tương tự cho uống nước lã. Kết quả cho thấy những con chuột cho uống chè xanh giảm kích thước khối u, còn những khối u mới chậm phát triển hơn. Các nhà khoa học Nhật bản ở Viện nghiên cứu ung thư Saitama khám phá ra rằng những phụ nữ có thói quen uống hơn 5 tách chè xanh mỗi ngày thường ít có nguy cơ mắc bệnh hoặc tái phát bệnh ung thư vú và bệnh không di căn nhanh chóng như những đối tượng bình thường khác. Để đạt được những lợi ích sức khỏe bạn chỉ cần uống 3-4 tách mỗi ngày và tốt hơn nữa là không nên pha thêm đường hay sữa.

1.3.5. Bảo vệ tim mạch [34, 35]

Các bệnh nhân tim mạch nếu uống chè xanh thường xuyên sẽ giảm được mức độ tử vong rất cao, theo nghiên cứu của Hiệp hội tim mạch tại Mỹ cho biết. Những nhà nghiên cứu đã phát hiện ra rằng sau khi phát cơn đau tim, những bệnh nhân nghiện chè xanh cỡ nặng có tỉ lệ tử vong ít hơn 44 % so với bệnh nhân không uống trà, còn những bệnh nhân uống chè xanh ở mức độ vừa phải có tỉ lệ tử vong ít hơn 22 % so với những người không uống trà.

Các catechin được xem là chìa khóa cho tính năng bảo vệ sức khỏe của chè xanh. Hiệu quả bảo vệ tim mạch của catechin bắt nguồn từ hoạt tính chống oxy hóa của các hợp chất này. Nhờ hoạt tính chống oxy hóa mà chè xanh có khả năng ngăn ngừa cholesterol xấu LDL không bị oxy hoá, chống tụ máu, chống xơ cứng động mạch. EGCG ở nồng độ 10 mg/kg ức chế sự phát triển các mảng xơ vữa trên mô hình chuột thiếu hụt Apo E. Những nghiên cứu đã cho thấy lợi ích của chè xanh bảo vệ hệ tim mạch tuy nhiên tương tác giữa chè xanh với các thuốc điều trị tim mạch có thể xảy ra.

Vì vậy cần tiếp tục nghiên cứu và cân nhắc những lợi ích thu được khi uống chè xanh khi sử dụng ở các nước phương Tây, nơi mà các thuốc điều trị tim mạch được sử dụng rất phổ biến. Với những bệnh nhân tim mạch, tốt nhất là sử dụng các chế phẩm chè xanh đã loại bỏ các hợp chất cafein, theophyllin, theobromin là những chất kích thích không có lợi cho tim mạch. Quá lạm dụng chè xanh ở các bệnh nhân tim mạch sẽ dẫn đến tình trạng mất ngủ thường xuyên, cơ thể mỏi mệt, biếng ăn. Những người có tiền chứng bệnh về tim mạch có thể uống chè xanh đều đặn hằng ngày sau những bữa ăn, lưu ý không nên pha trà quá đậm.

1.3.6. Chống béo phì [44]

Chè xanh có thể có tính chất sinh nhiệt không do hàm lượng caffeine của nó. Trong một thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên kiểm soát cho việc sử dụng caffeine, Dulloo thấy rằng mười người đàn ông trẻ tuổi khỏe mạnh 24 giờ sau khi uống một chế phẩm chè xanh có 90 mg EGCG có chi phí năng lượng ($p < 0,01$) tăng lên và thương số hô hấp giảm đi ($p < 0,001$), nitơ tiết niệu không bị ảnh hưởng, nhưng norepinephrine tiết niệu bài tiết trong 24 giờ tăng 40 % ($p < 0,05$) trong quá trình điều trị. Nghiên cứu này cho thấy vai trò tiềm năng của chè xanh trong kiểm soát trọng lượng cơ thể.

Một số nghiên cứu của Kao và cộng sự cho thấy uống chè có thể bảo vệ chống lại các rối loạn liên quan đến béo phì như arteriosclerosis, tiểu đường và cao huyết áp. Thử nghiệm cho thấy EGCG tinh khiết (50-100 mg/kg) làm giảm đáng kể hoặc ngăn ngừa sự gia tăng trọng lượng cơ thể ở chuột Zucker nạc và béo phì. Với sự tác động vivo tinh khiết EGCG trên các thông số khác có liên quan, như ức chế quá trình oxy hóa lipid và điều chế lượng đường, EGCG có thể là một ứng cử viên hữu ích cho việc điều trị bệnh béo phì. Những tiềm năng sử dụng của EGCG vẫn còn được khám phá.

1.3.7. Một số tác dụng khác của EGCG và catechin chè xanh

Chè xanh và bệnh tiểu đường [42,43]

Kháng insulin và không dung nạp glucose, các tính năng của bệnh tiểu đường

typ 2 cũng được coi là yếu tố nguy cơ tim mạch bệnh và hội chứng chuyển hóa X (loại rối loạn ở các xã hội phương Tây). Trong một nghiên cứu nhỏ ở người tình nguyện, Tsuneki phát hiện ra rằng uống chè xanh làm tăng đáng kể sự dung nạp glucose đường uống mà không ảnh hưởng đến đường huyết cơ bản. Cho những con chuột bình thường uống chè xanh lâu dài làm tăng độ nhạy cảm insulin. Khi cho chuột ăn đường fructose, chiết xuất chè xanh có khả năng ngăn chặn sự phát triển kháng insulin, tăng đường huyết và khuyết tật trao đổi chất. Nó đã được chứng minh *in vitro* rằng những tác động do tăng nhạy cảm với insulin và sự hấp thu glucose của tế bào mỡ và EGCG là catechin quan trọng nhất biểu hiện những hoạt tính này.

Chè xanh phòng chống bệnh viêm khớp

Theo một thử nghiệm tại Mỹ trên chuột cho thấy những con chuột uống chè xanh ít bị viêm khớp hơn so với con chuột uống nước. Tuy nhiên, khi gây nhiễm viêm khớp cho cả hai lô thí nghiệm thì con chuột uống chè xanh chỉ mắc bệnh sơ sài vào một thời gian khá lâu sau đó. Có một nhận xét thú vị cho rằng ở các quốc gia như Ấn Độ, Trung Quốc, Nhật Bản những nơi xem trà là thức uống sức khỏe hàng ngày, thì bệnh viêm khớp giảm hẳn so với nơi khác trên thế giới [48, 39].

Chống sâu răng

Các chế phẩm chè xanh ức chế các vi khuẩn trong miệng như *Escherichia coli*, *Streptococcus salivarius* và *Streptococcus mutans*. Polyphenol trà làm giảm khả năng tiết axit của các vi khuẩn sâu răng *S. mutans* nhờ đó mà giảm lượng các mảng bám do vi khuẩn sâu răng tạo ra. Polyphenol trà cũng ức chế hoạt động amylase trong nước bọt làm giảm 70 % lượng maltose được sinh ra nhờ đó lượng mảng bám do các thực phẩm tinh bột có khả năng tạo mảng bám trên răng giảm đi [45].

Chức năng, nhận thức [40-41]

Hindmarch đã báo cáo rằng tiêu thụ trà dài ngày được cải thiện nhận thức và tâm lý hiệu suất của người lớn khỏe mạnh trong một cách tương tự như cà phê, nhưng trà

(có chứa ít caffeine) ít có khả năng hơn so với cà phê để phá vỡ chất lượng giấc ngủ vào ban đêm. Sở hữu hoạt tính chống oxy hóa và bắt giữ sắt và kim loại chuyển tiếp, EGCG và các catechin chè xanh hiện đang là các đích tiềm năng trong quá trình tìm kiếm các loại thuốc điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh thoái hóa tế bào thần kinh.

Bệnh Parkinson: Stress oxy hóa là nguyên nhân chính gây ra bệnh Parkinson. Những nghiên cứu gần đây cho biết sự rối loạn trao đổi sắt ở não tạo ra các thể Lewy bệnh lý bởi sự ngưng tụ α -synuclein do sắt cảm ứng. Trên những mô hình động vật Parkinson, các neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine (MPTP) và 6-hydroxydopamin (6-OHDA) cảm ứng gây chết tế bào dopamin và tích lũy thể Lewy được trung gian qua nhiều cơ chế trong đó có stress oxy hóa. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng EGCG ngăn ngừa rất hiệu quả những triệu chứng bệnh lý đó trên những mô hình động vật. Được sử dụng ở liều 25 mg/kg, EGCG bảo vệ các neuron dopamin ở các substantia nigra và bảo toàn nồng độ dopamin của các tế bào striatal. EGCG ngăn chặn sự tích lũy sắt và α -synuclein ở chuột được xử lý MPTP. Khả năng bảo vệ các tế bào thần kinh của EGCG được quy cho hoạt tính bắt giữ sắt và các kim loại chuyển tiếp của catechin này.

Bệnh Alzheimer: Mặc dù chưa có những chứng cứ rõ ràng chứng minh chè xanh có khả năng làm chậm quá trình tiến triển của bệnh Alzheimer, nhưng một số nghiên cứu trên các mô hình động vật và các dòng tế bào nuôi cấy đã gợi ý rằng EGCG cũng có ảnh hưởng đến nhiều đích tiềm năng có liên quan đến sự tiến triển của căn bệnh này. Choi et al đã chỉ ra rằng nhờ hoạt tính chống oxy hóa mà EGCG đã bảo vệ dòng tế bào thần kinh cá ngựa được nuôi cấy chống lại hoạt tính gây độc thần kinh do α -amyloid cảm ứng. Levites cũng nhận thấy EGCG đã điều khiển quá trình chế biến APP thành sAPP (APP hòa tan non-amyloid) bằng cách hoạt hóa PKC vì vậy mà ngăn ngừa sự tổng hợp các α -amyloid có hoạt tính gây độc thần kinh. EGCG và các catechin chè xanh khác ức chế enzyme secretase BACE1 là enzyme xúc tác cho quá trình chế biến sAPP thành α -amyloid nên cũng được coi là các chất ức chế hiệp đồng tiềm năng quá

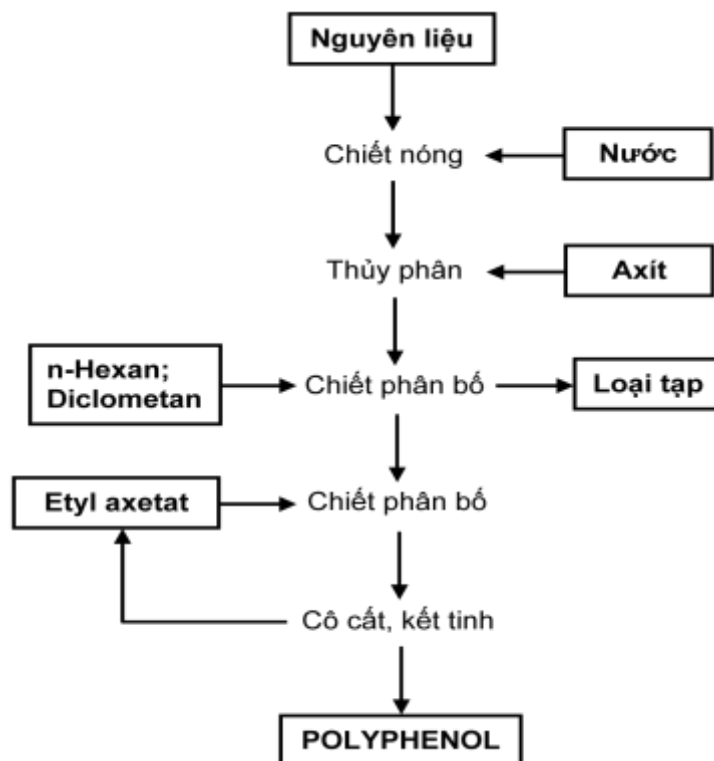
trình sinh tổng hợp α -amyloid. EGCG thể hiện hoạt tính nêu trên với liều uống 2mg/kg/ngày, thời gian uống từ 7-14 ngày *in vivo*.

Trong khi các kết quả nghiên cứu còn chưa thống nhất, tăng cường kiến thức về hoạt tính sinh học của các hợp chất polyphenol trong trà sẽ khuyến khích những điều tra lâm sàng để khám phá những lợi ích của trà trong việc thúc đẩy sức khỏe và phòng chống các bệnh mãn tính, hỗ trợ điều trị các bệnh nhiễm khuẩn và ung thư [49].

1.4. CÁC NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ HÓA HỌC CHIẾT, TÁCH VÀ ĐIỀU CHẾ CÁC CATECHIN VÀ DẪN XUẤT

1.4.1. Các kỹ thuật công nghệ chiết catechin từ chè xanh

Hiện nay các phương pháp chiết xuất các hợp chất catechin từ chè xanh - hay còn gọi là polyphenol chè xanh được áp dụng rộng rãi ở Trung Quốc và trên thế giới [9, 50 - 59]. Phương pháp chiết có thể mô tả theo sơ đồ chung dưới đây (hình 1.4):



Hình 1. 3: Quy trình tóm tắt công nghệ chiết Polyphenol chè xanh trên thế giới

Dựa trên tính chất hóa học đặc trưng của catechin là các hợp chất phân cực, hay gặp trong chè xanh dưới dạng các glycosid dễ tan trong nước nóng và các dung môi hữu cơ có độ phân cực cao như ethanol, methanol, hoặc hỗn hợp của chúng với nước nên người ta thường chọn các dung môi này để chiết các catechin ở giai đoạn đầu tiên. Kết quả sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa của các dịch chiết cũng cho thấy khi chiết chè xanh bằng các dung môi phân cực cho các sản phẩm có hoạt tính mạnh hơn so với khi chiết bằng các dung môi có độ phân cực yếu như n-hexane, ete dầu hỏa, ether ethylic, hay hỗn hợp của ether ethylic với chloroform, aceton, ethyl acetate [59-61]. Mặc dầu vậy, trong dịch chiết tồn tại một lượng lớn các hợp chất không mong muốn bị chiết cùng với catechin, thêm vào đó các glycosid cũng bị thủy phân khi sử dụng dung môi chiết là dung dịch nước axít.

Các dung môi phân cực yếu, lại có đặc tính ưu việt hơn khi tiến hành tinh chế các dịch chiết của dung môi phân cực. Phần lớn các catechin có phân tử lượng thấp và các aglycon đều bị hòa tan trong các dung môi này và hầu hết các hợp chất này đều có tính chống oxy hóa cao. Có thể tham khảo một số ví dụ về các phương pháp chiết catechin từ chè xanh bằng dung môi hữu cơ dưới đây [56-59]:

Phương pháp ngâm chiết của Delaunay J.C. và các cộng sự [59]: 100 g lá chè được ngâm chiết ở nhiệt độ phòng bằng 1 lít Nước/Acetone (3 : 2, v/v) trong 12 giờ. Dịch chiết được cô kiệt trong chân không ở 40°C. Chiết bằng n-hexane để loại tạp chất, cuối cùng catechin được chiết bằng ethyl acetate, chế phẩm được làm đông khô thành bột mịn. Sản phẩm được phân tích xác định các catechin và cafein bằng các phương pháp sắc ký như sắc ký lỏng cao áp kết nối khối phổ hoặc sắc ký điện di.

Các tác giả Xuejun Pan, Guoguang Niu [56-59] đã so sánh các phương pháp chiết catechin bằng Soxhlet với các kỹ thuật chiết kết hợp viba và kết hợp siêu âm (bảng 1.7).

Bảng 1. 7: So sánh lượng catechin chiết từ chè xanh theo các kỹ thuật sử dụng viba, siêu âm và Soxhlet [56].

Kỹ thuật	A	B	C	D
MAE	30	4	77	10
UE	28	3,6	75	10
Soxhlet	28	3,6	72	9

Trong đó:

A - % Catechin so với nguyên liệu ban đầu;

B - % caffeine so với nguyên liệu ban đầu;

C - Hàm lượng % Catechin trong dịch chiết;

D - Hàm lượng % caffeine trong dịch chiết.

MAE: Phương pháp chiết có hỗ trợ viba. Dung môi Ethanol/nước (1:1, v/v), tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 20/1. Thời gian tác dụng của viba trong 4 phút và ngâm tĩnh 90 phút ở 20°C.

UE: Phương pháp chiết có hỗ trợ siêu âm. Dung môi Ethanol/nước (1:1, v/v) tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 20/1. Thời gian chiết 90 phút, nhiệt độ chiết 20 - 40°C.

Soxhlet: Chiết hồi lưu trên phễu Soxhlet trong 45 phút, nhiệt độ chiết 85°C.

Nhìn chung, các phương pháp nêu trên đều có ưu điểm cho hiệu suất thu nhận catechin cao, phù hợp với các nước phát triển có trình độ kỹ thuật và công nghệ cao, tự chủ được các dung môi và hóa chất cơ bản. Đây cũng là các yếu tố kỹ thuật quan trọng để có giá thành sản phẩm thấp, đặc biệt có ý nghĩa đối với các quốc gia và vùng lãnh thổ không có nguyên liệu chè phế loại.

1.4.2. Sắc ký lỏng hiệu năng cao trong phân tích và phân tách catechin

Năm 1976, lần đầu tiên Hoefler và Coggon [65] đã sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) phân tích thành phần trong của chè xanh và chè đen. Hệ thiết bị của Hoefler và Coggon sử dụng một cột sắc ký pha đảo Bondapak[®] C18 (10 μ m) với hệ dung môi rửa giải isocratic. Sau đó vào năm 1983 Robertson và Bendall [66] đã cải tiến hệ thiết bị này bằng cột sắc ký Hypersil ODS 5 μ m. Việc thay thế pha tĩnh từ kích thước hạt lớn (10 μ m) sang loại pha tĩnh có kích thước hạt nhỏ hơn (5 μ m) sẽ làm tăng diện tích bề mặt tiếp xúc nhờ đó mà lượng mẫu hấp phụ lên pha tĩnh tăng lên, hiệu quả tách cũng đạt tối đa. Nhóm nghiên cứu này cũng sử dụng hệ dung môi rửa giải isocratic. Mặc dù hệ thống này cho hiệu quả tách tốt nhưng khả năng tái sinh định lượng rất thấp.

Cuối thập kỷ 80, hệ thống HPLC đã trở thành một công cụ phân tích tuyệt vời để nghiên cứu các thành phần hóa học của chè với việc bổ sung đầu dò photodiode array (PDA). Kể từ đó, HPLC đã được sử dụng để phân tích các sản phẩm trong các hệ thống lên men in vitro được sử dụng để nghiên cứu hóa học của thearubigin. Tiếp đó, Bailey và cộng sự [67] đã rất thành công trong việc ứng dụng hệ HPLC để phân tích hóa học các polyphenol chè xanh bị oxy hóa được thiết lập trong một mô hình lên men hóa học, bao gồm cả các sản phẩm oxy hóa bởi enzym của dịch chè đen. Cả hai mô hình trên đều sử dụng hệ HPLC với đầu dò PDA và hệ dung môi rửa giải theo cách gradient. Dần dần, hệ HPLC được cải tiến và trở thành một công cụ phân tích hữu hiệu, ứng dụng cho rất nhiều loại mẫu khác nhau. Kết quả là, hệ thống HPLC dần dần được cải thiện và ứng dụng trong phân tích nhiều hơn sản xuất, đa dạng và tương thích. Do đó, sự phân lập các chất được rửa giải gần nhau và phân tách thearubigins đã bị polyme hoá đã trở thành hiện thực trong tiến trình nghiên cứu hóa học thearubigin.

Nhờ một hệ thiết bị phân tích HPLC được cải tiến đã có sẵn mà một loạt các sắc tố mới hình thành từ việc oxy hóa ECG đã được phân lập và xác định. Theaflavate A là một dẫn xuất benzotropolone được tạo thành từ sự bắt cặp của một nhóm este allyl

của phân tử ECG với vòng B của một phân tử khác đã được phân lập từ chè đen. Phân lập Theaflavate A thành công đã cho thấy tính phức tạp của các hợp chất kiểu theaflavin trong chè đen đồng thời chỉ ra một con đường phản ứng bổ sung cho quá trình hình thành thearubigin. Ngoài ra, hệ thống phân tích HPLC này đã được sử dụng để điều khiển sự oxy hóa hóa học polyphenol chè xanh là EGCG và ECG [68] thông qua xác định các polyphenol và các hợp chất oxy hóa tương ứng [67] rất thành công. Những nghiên cứu này cho thấy rằng hệ thống HPLC là một công cụ hữu ích cho việc phân tích các chất flavonoid và polyphenol chè.

CHƯƠNG 2 : THỰC NGHIỆM

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

a/ Chè xanh

Lá chè xanh - *Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze được thu mua từ các hộ sản xuất kinh doanh chè tại huyện Đại Từ, Thái Nguyên, chè được thái nhỏ đem sấy ở nhiệt độ 110°C trong 15 phút để diệt men, sau đó sấy lại đồng nhất hóa đến độ ẩm trung bình 5 - 10 % sau đó xay mịn đến kích thước dưới rây 1,5 mm rồi đóng vào túi HDPE kín, hút chân không, bảo quản trong tối ở nhiệt độ < 25°C.



Hình 2. 1: Chè nguyên liệu

b/ Catechin tổng số từ chè xanh:

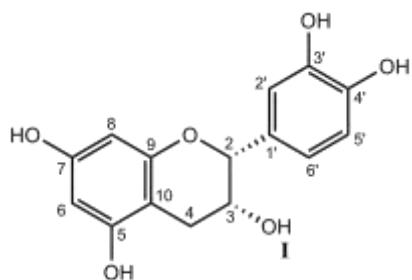
Catechin tổng số được chiết tách từ chè xanh trong quá trình thực hiện luận án, có màu vàng nhạt, hàm lượng tổng các hợp chất phenolic đạt > 90 % theo HPLC, được bảo quản trong lọ thủy tinh kín màu nâu, tránh ánh sáng, nhiệt độ bảo quản < 25°C. Hàm lượng EGCG trong catechin tổng số đạt ít nhất 50 %.

c/ Các catechin chè xanh:

Các catechin chè xanh được phân lập từ catechin tổng số trong quá trình thực hiện luận án, bao gồm:

(-)-epicatechin:

Tên viết tắt EC; CAS: (2R, 3R)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-3,5,7-triol;



epi-Catechin
(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)chroman-3,5,7-triol

CTPT: C₁₅H₁₄O₆

Phân tử lượng: 290;

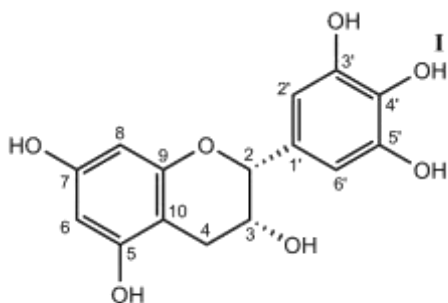
Dạng tinh thể hình kim màu vàng sáng;

Điểm nóng chảy: 173 - 177°C;

Tan tốt trong nước nóng, ethanol, methanol.

(-)-epigallocatechin:

Tên viết tắt EGC; tên CAS: (2R,3R)-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol



epi-Gallocatechin
(2R,3R)-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3,5,7-triol

CTPT: C₁₅H₁₄O₇

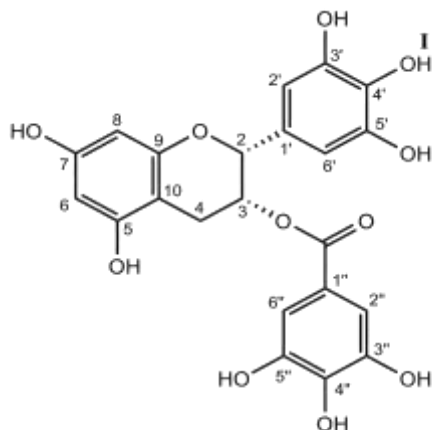
Phân tử lượng: 306;

Dạng bột vô định hình màu trắng hồng;

Tan tốt trong nước nóng, ethanol, methanol.

(-)-epigallocatechin-3-O-gallate:

Tên viết tắt EGCG; CAS: 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid, (2R,3R)-3,4-dihydro-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-2H-1-benzopyran-3-yl ester;



CTPT: $C_{22}H_{18}O_{11}$

Phân tử lượng: 458;

Dạng bột tinh thể màu trắng;

Điểm nóng chảy: 214 - 218°C;

Tan tốt trong nước nóng, ethanol, methanol.

epi-Gallocatechin gallate
(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3-yl
3,4,5-trihydroxybenzoate

2.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị

Methanol, ethanol, ethyl acetate, n-hexane, sodium sunfate khan, sunfuric acid đặc, pyridine, silica gel Merck 60 (15 - 40 μ m), Sephadex LH 20, Diaion HP 20, .v.v... Hóa chất được dùng trong quá trình thực nghiệm là những hóa chất tinh khiết pA của các hãng Merck, Sigma Aldrich, và hóa chất kỹ thuật của Việt Nam, Trung Quốc và Singapor.

Dụng cụ thủy tinh: Thiết bị cô quay chân không Buechi R 210; Cột sắc ký, hệ chưng cất phân đoạn thu hồi và tinh chế dung môi, cốc thủy tinh, phễu lọc hút Buechner, pipet, ống đong, ống nghiệm, bình cầu, bình tam giác...

Các thiết bị thử nghiệm lượng lớn: Hệ thống chiết Soxhlet Pilot 20 lít; Thiết bị cô quay chân không Pilot 20 lít Heidolph Laborota LR 20; Hệ thống sắc ký lỏng cao áp Pilot Labomatic HD 3000; Hệ thống chiết phân bố hồi lưu lỏng/lỏng 80 lít; Hệ thống chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục 100 kg nguyên liệu/giờ.

2.2.2. Các phương pháp chiết chè xanh

2.2.2.1. Phương pháp chiết đun hồi lưu sử dụng cồn

Đây là phương pháp chiết phân tích polyphenol chè xanh chung được áp dụng ở Trung Quốc và trên thế giới, phương pháp này được tóm tắt như sau:

Chè vụn được nghiền nhỏ và chiết đun hồi lưu trên hệ thống chiết Soxhlet 20 lít với ethanol trong thời gian thích hợp. Dịch chiết được làm nguội, lọc sạch và cô kiệt loại ethanol ở áp suất thấp thu cao chè.

Tiếp đó, cao chè được chiết phân bố loại tạp ít phân cực (defat) bằng n-hexane. Phần dịch nước được chiết phân bố với ethyl acetate để thu nhận các Catechin.

Caffeine được tách loại khỏi Polyphenol tổng số bằng cách đun hồi lưu với chloroform trong thời gian thích hợp. Bột cao chiết sau khi loại hết caffeine còn lại được gọi là Catechin tổng số.

2.2.2.2. Phương pháp chiết ngược dòng liên tục dùng nước làm dung môi

Trong hệ thống chiết ngược dòng liên tục, nguyên liệu bột chè ướt qua bánh răng nghiền của thiết bị được nghiền mịn tạo thành bùn nhão mịn. Sau đó nguyên liệu và dung môi chiết được đưa vào hai đầu ngược nhau của thiết bị chiết. Trong quá trình này nguyên liệu chiết (thông thường dưới trạng thái bùn mịn) được chuyển động hướng lên trên dọc theo thiết bị chiết dạng ống, ở đây nguyên liệu sẽ tiếp xúc triệt để với dung môi chiết chuyển động ngược chiều. Chất tan trong nguyên liệu luôn được tiếp xúc với dịch chiết có nồng độ chất tan thấp hơn, độ chênh nồng độ của hai pha rắn lỏng thúc đẩy quá trình khuếch tán từ rắn sang lỏng luôn xảy ra. Nguyên liệu đầu dịch chuyển càng xa thì nồng độ chất chiết trong dịch chiết càng tăng. Sau khi nồng độ nguyên liệu trong dịch và tốc độ dịch đạt được mức tối ưu, quá trình chiết có thể kết thúc, dịch chiết đậm đặc sẽ chảy ra một đầu của bình chiết trong khi bã (gần như không còn dung môi) được tháo ra ở một đầu bên kia.

2.2.3. Các phương pháp phân tách catechin

Các catechin và EGCG được nghiên cứu phân tách trên hệ thống sắc ký lỏng cao áp điều chế bán công nghiệp với hệ thống cột tách gồm cột Diaion HP 20 kết nối trực tuyến với cột Sephadex LH 20 của Trung tâm Hóa Dược, Viện Hóa học công nghiệp Việt Nam (hình 2.2).



Hình 2. 2: Hệ thống Pilot Prep. HPLC và cột tách Sephadex ID 100 x L 800 mm

2.2.4. Phương pháp acetyl hóa catechin

Phản ứng acyl hóa là quá trình thay thế nguyên tử H ở nhóm chức $-OH$, $-NH_2$... bằng nhóm $R-CO-$. Trong đó không những cần amine có tính bazơ đủ mạnh mà còn đòi hỏi chất phản ứng phải có proton.

Phản ứng acyl hóa bằng anhydrit acetic được thực hiện theo cơ chế :

Anhydrit acetic có bản chất là một acid và mạnh hơn acid carboxylic, nên phản ứng acyl hóa mạnh hơn carboxylic và phản ứng 1 chiều không tái tạo lại phenol

2.2.5. Các phương pháp phân tích sản phẩm

Sắc ký lớp mỏng (SKLM)

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên lớp mỏng Silica gel với các hệ dung môi Chloroform/Methanol/Axit citric 0,5 % - 3:2:0,2 (v/v); Chỉ thị bằng UV/Vis 360 nm; Thuốc hiện: Von's (Ce/NH₄/MoO₄).

Sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối phổ khối lượng

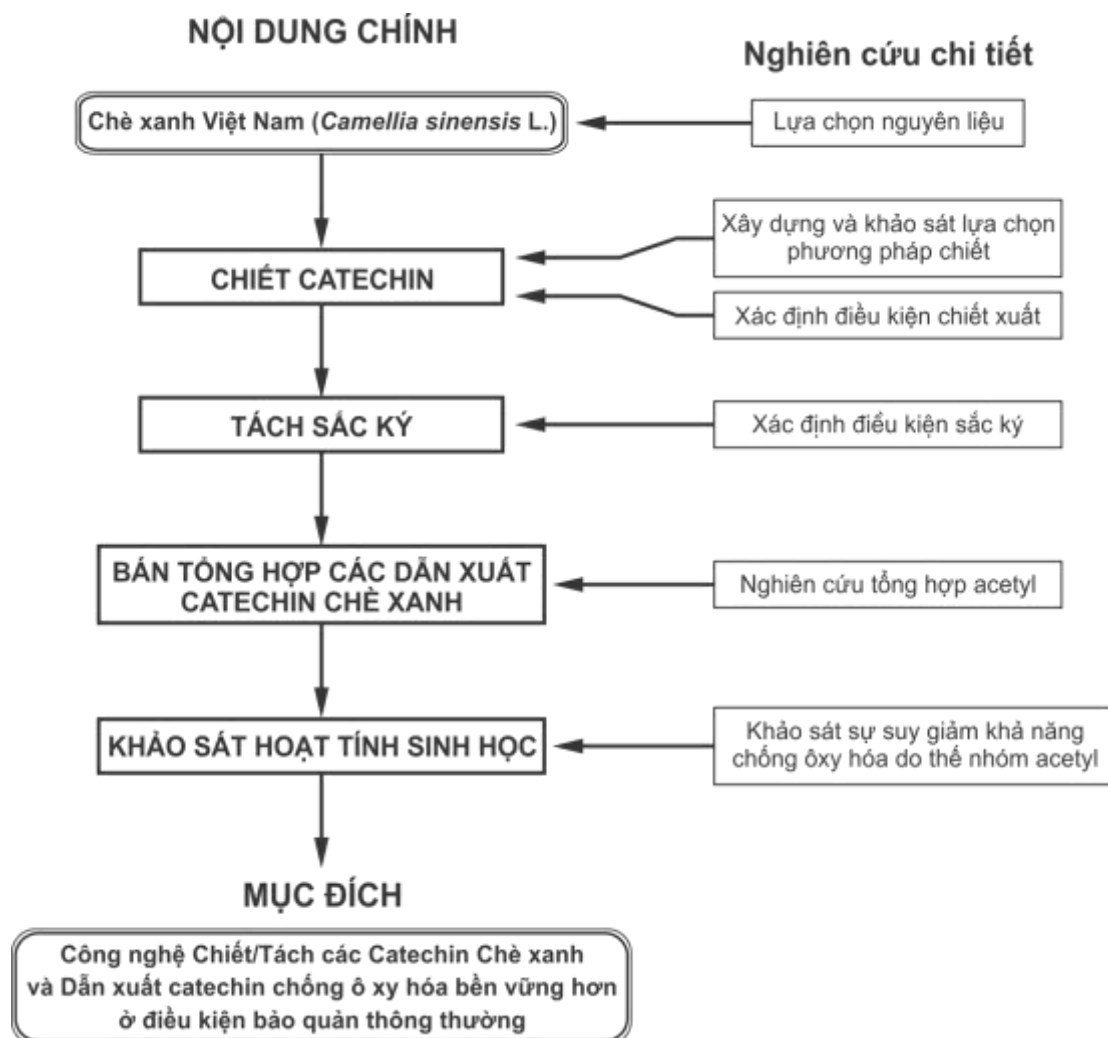
Các sản phẩm catechin phân lập từ chè xanh Việt Nam được phân tích định tính và định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối phổ khối (HPLC-MS) trên hệ thiết bị LC/MSD-Trip-SL Agilent 1100, Viện Hóa học, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân

EGCG và các sản phẩm khác từ chè xanh là EC, EGC, Caffeine và các dẫn xuất được khẳng định cấu trúc bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H và ¹³C NMR trên máy NMR Bruker AVAN 500 MHz của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.6. Thiết kế nghiên cứu của luận án

Thực hiện mục tiêu của luận án là nghiên cứu công nghệ tách các catechin từ chè xanh Việt Nam (*Camellia sinensis* L.), chuyển hóa tạo dẫn xuất và bước đầu khảo sát một số hoạt tính sinh học của một số sản phẩm thu được; Chúng tôi đã xây dựng thiết kế nghiên cứu của luận án và tiến hành các bước nghiên cứu thực nghiệm và lý thuyết (hình 2.3).



Hình 2. 3: Thiết kế nội dung nghiên cứu

Cụ thể các bước nghiên cứu thực nghiệm và lý thuyết được thực hiện:

- Kết hợp các phương pháp chiết sử dụng nước và dung môi (ethanol, methanol, chloroform, ...) như chiết Soxhlet, chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục và chiết phân bố nhằm trích ly phân đoạn phenol (chứa các catechin);
- Sử dụng các phương pháp sắc ký (sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký lỏng trung áp, sắc ký lớp mỏng, sắc ký cột) để phân tách và tinh chế các catechin thu được;
- Sử dụng phương pháp phân tích cấu trúc bằng các loại phổ (phổ hồng ngoại, phổ tử ngoại, phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ khối) để xác định cấu trúc hóa học của các catechin tinh khiết thu được;

- Nghiên cứu bán tổng hợp các dẫn xuất acetyl của các catechin nhằm tìm kiếm các dẫn xuất bền vững hơn ở điều kiện bảo quản thông thường làm chất bảo quản chống ôxy hóa;

- Tiến hành các nghiên cứu *in vitro* thử và đánh giá hoạt tính chống ôxy hóa của các catechin và dẫn xuất thu được.

2.3. THỰC NGHIỆM

2.3.1. Nghiên cứu quy trình chiết suất các catechin tổng số từ chè xanh

2.3.1.1. Nghiên cứu quy trình chiết suất các catechin tổng số từ chè xanh bằng ethanol

Tiến hành lấy 5 kg chè vụn được nghiền nhỏ trên máy nghiền ly tâm 3000 vòng/phút sàng 1,5 mm; sau đó nạp vào túi chiết đặt trong bầu chiết Soxhlet thể tích 20 lít (hình 2.4). Đun chiết với ethanol trong 16 giờ ở nhiệt độ hồi lưu của ethanol (75°C). Tốc độ hồi lưu được điều chỉnh sao cho dịch trong bầu chiết rút xuống bình đun khoảng 10 - 15 phút/lượt.



Hình 2. 4: Thiết bị chiết Soxhlet 20 lít

Sau 16 giờ hồi lưu ở nhiệt độ trên, dịch chiết được để nguội xuống nhiệt độ phòng, lọc sạch và cô kiệt loại ethanol trên thiết bị cô quay chân không Pilot 20 lít Heidolph LR 20 (hình 2.5) ở nhiệt độ 60°C, áp suất 200 mbar thu được cao chè.



Hình 2. 5: Thiết bị cô quay chân không 20 lít Heidolph Laborota LR 20

Tiếp đó, đưa cao chè lên thiết bị chiết phân bố tuần hoàn 80 lít (hình 2.6) và tiến hành chiết phân bố bằng hỗn hợp dung môi n-hexane/nước (1 : 1; v/v), tách thu riêng phần dịch chiết nước và phần dịch chiết n-hexane. Phần dịch nước được chiết phân bố với ethyl acetate 3 lần, gộp dịch ethyl acetate và cô kiệt loại dung môi ở áp suất giảm thu được Catechin tổng số thô.



Hình 2. 6: Chiết phân bố trên thiết bị chiết tuần hoàn 80 lít

Đun hồi lưu Catechin tổng số thô với chloroform theo tỷ lệ 1: 10 - w/v trong 4 giờ ở nhiệt độ hồi lưu của chloroform (61°C); lọc hút chân không thu riêng phần dịch chloroform (hình 2.7). Phần bột cao chè còn lại trên phễu lọc được đem sấy khô và nghiền mịn thu được Catechin tổng số.



Hình 2. 7: Lọc hút chân không thu catechin tổng số

Thành phần và hàm lượng tương đối của các Catechin được phân tích bằng phương pháp HPLC-MS với điều kiện phân tích:

- + Cột Sắc ký Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6 x 150 mm);
- + Detector DAD 254,4 nm;
- + Detector ESI-MS: quét từ 100 - 600 m/z cả hai chế độ Ion dương (Positive mode) và âm (negative mode);
- + Tốc độ dòng 0,4 ml/phút;
- + Pha động Methanol/H₂O+0.5% formic acid rửa giải theo cách gradient.

2.3.1.2. Nghiên cứu quy trình chiết suất các catechin tổng số từ chè xanh bằng nước trên thiết bị chiết ngược dòng liên tục

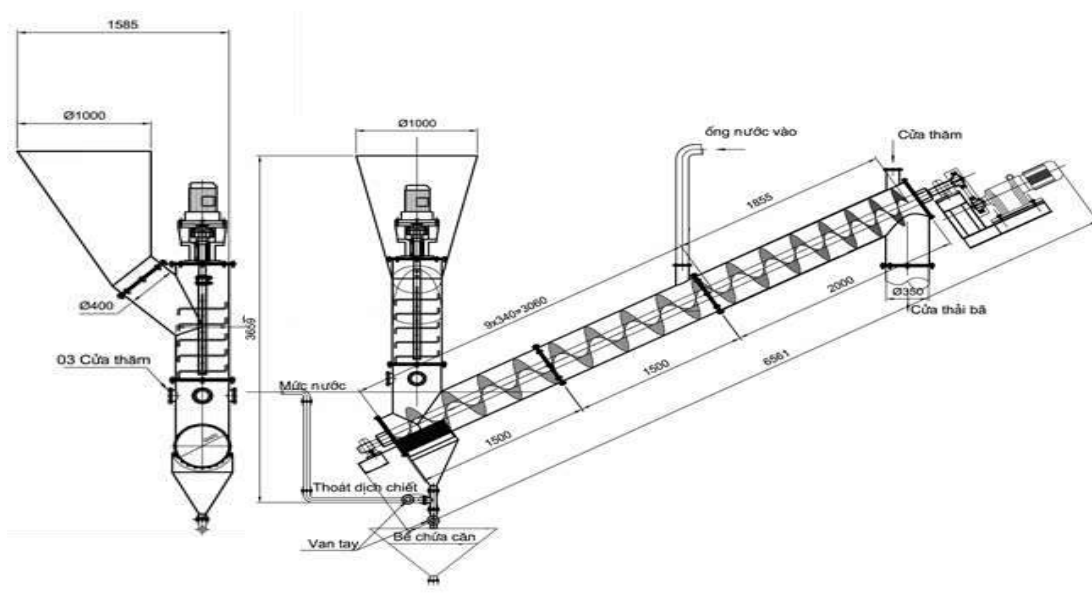
Hệ thống chiết ngược dòng liên tục rắn/lỏng (hình 2.8); chiều dài thân ống chiết 3000 mm; chiều dài thân ống ép 1500 mm; nạp liệu bằng vít tải. Hệ thống nhận nguyên liệu từ vít tải; kính theo dõi; cửa thải bã; đường nạp dung môi; đường tháo dịch chiết.



Hình 2. 8: Hệ thống chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục

Mô tả hệ thống thiết bị(hình 2.9):

Máy chiết ngược dòng liên tục chế tạo bằng thép SSU 304 dạng ống ID. 400 × L. 5500 mm; Vít tải và ép kéo dài suốt dọc trục ống chiết, Vít tải gồm 2 đoạn với bước xoắn biến đổi: Đoạn chiết dài 3 m bước xoắn vít tải có độ dài P không đổi 340 mm; Đoạn vít nén ép dài 2 m bước xoắn có độ dài biến đổi $\frac{1}{2}$ bước giảm đều (P-10) mm;



Hình 2. 9: Thiết kế máy chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục

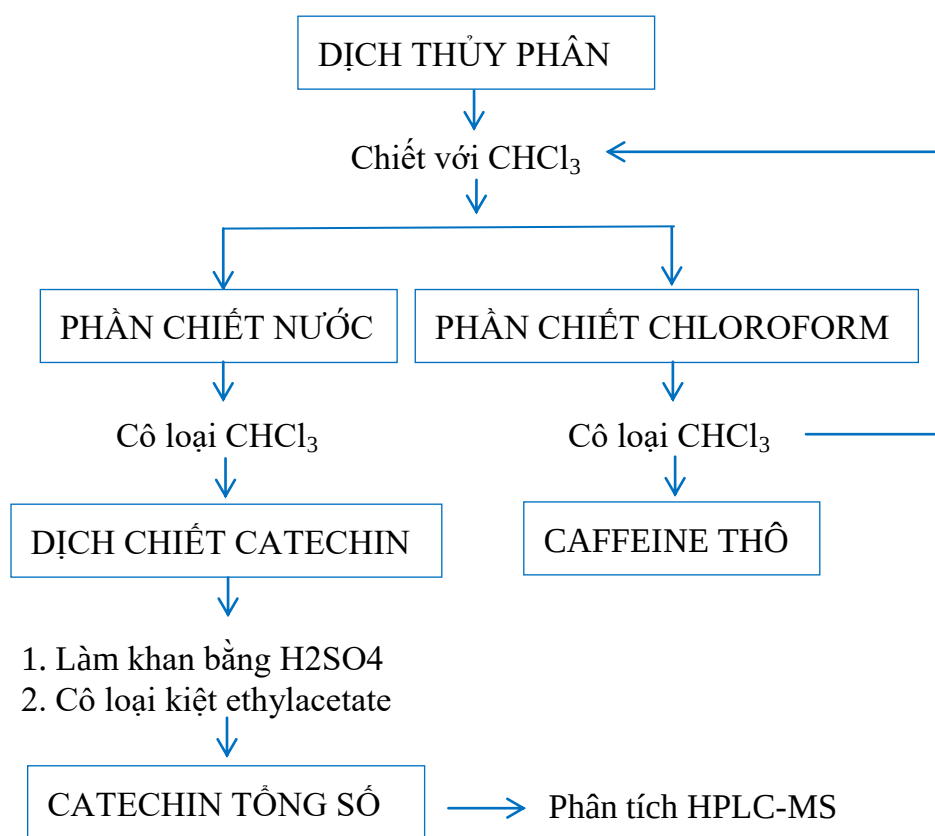
- + Năng lực sản xuất: 200 ~ 300 lít/giờ tương đương với 0,3 ~ 0,5 tấn/giờ;
- + Nhiệt độ chiết nguyên liệu 25°C - 30°C;
- + Thời gian nguyên liệu dừng trong máy (thời gian chiết): 95 ~ 120 phút;
- + Tốc độ quay của trục chính 0.3 ~ 1 vòng/phút;
- + Điều kiện hoạt động chịu ăn mòn và mài mòn: hoạt động ở điều kiện mang tính axit hoặc dung môi hữu cơ;
- + Mật độ được liệu trong máy ~1,2 tấn/m³;
- + Hàm lượng nước trong bã 40 % - 50 %.

Tiến hành lấy 100kg chè vụn được nghiền nhỏ đến dưới rây 1,5 mm sau đó nạp vào thiết bị trộn, khuấy trộn với 500 lít nước có pha 50 gam citric acid thành khối nguyên liệu nhão. Nguyên liệu này được nạp vào phễu nạp của máy chiết và tiến hành chiết với tốc độ nạp liệu ~ 125 kg/giờ. Dung môi chiết (dung dịch citric acid 0.05) được bơm bằng bơm định lượng vào đường nạp dung môi của máy chiết với tốc độ ~ 150 lít/giờ theo đường cấp dịch ngược chiều dịch chuyển nguyên liệu. Tổng cộng sau 5 h hoàn thành việc chiết 600 kg bột chè nhão. Bã chiết (độ ẩm từ 40 - 50 %) được vắt khô kiệt bằng máy vắt ly tâm 1400 vòng/phút rồi đem ép trên máy ép thủy lực với áp suất 75 kg/cm² thành bánh có độ ẩm cuối cùng còn < 10 %.

Các dịch chiết, dịch lọc vắt và dịch ép được gộp lại tổng cộng ~ 1000 lít rồi bơm vào thiết bị phản ứng hồi lưu có khuấy và gia nhiệt. Bổ sung chlohydric acid 1N đến pH ~ 2 - 3; gia nhiệt đến 85°C và khuấy liên tục trong 4 giờ ở nhiệt độ này. Sau khi phản ứng kết thúc, dịch chiết được làm nguội xuống nhiệt độ phòng, toàn bộ phần dịch chè và bã được lọc sạch bằng máy lọc ép thu lại dịch thủy phân.

Dịch thủy phân được đưa vào hệ thống chiết phân bố tuần hoàn cùng với chloroform theo tỷ lệ 2 : 1 về thể tích (dịch chiết/chloroform) và tiến hành chiết - bơm khuấy trộn bằng bơm ly tâm cao tốc (200 lít/phút) - trong 15 phút, để phân lớp tách thu

riêng phần dịch nước và phần dịch chloroform. Sau cùng, dịch nước được chiết lại 3 lần với ethyl acetate trên hệ thống chiết phân bố tuần hoàn. Dịch chiết ethyl acetate được gộp lại, làm khan bằng Na_2SO_4 khan rồi cô cất chân không để thu nhận “Catechin tổng số” và thu hồi ethyl acetate. Phần dịch chloroform được cô kiệt ở 50°C , 350 mbar thu nhận cao diệp lục màu xanh đen tối chứa chủ yếu caffeine và chlorophyll. Đây là nguyên liệu thô để tách tinh chế caffeine và chlorophyll (sản phẩm phụ cho nghiên cứu tiếp theo). Quá trình thu nhận catechin tổng số từ dịch thủy phân được thể hiện như trên hình 2.10.



Hình 2. 10: Sơ đồ quy trình thu nhận catechin tổng số từ dịch thủy phân

Thành phần và hàm lượng tương đối của các Catechin được phân tích bằng phương pháp HPLC-MS với điều kiện phân tích:

- + Cột Sắc ký Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6 x 150 mm);
- + Detector ESI-MS: quét từ 100 - 600 m/z cả hai chế độ Ion dương (Positive

mode) và âm (negative mode);

+ Nhiệt độ cột 35°C;

+ Tốc độ dòng 0,4 ml/phút;

+ Pha động Acetonitrin/H₂O+1% formic acid rửa giải theo cách gradient.

2.3.2. Nghiên cứu tách và tinh chế các catechin và EGCG từ catechin tổng số của chè xanh

2.3.2.1. Nghiên cứu lựa chọn chất hấp phụ có thể tái sử dụng làm pha tĩnh tách sắc ký điều chế EGCG từ catechin tổng số của chè xanh

Catechin tổng số giàu thành phần được nghiên cứu lựa chọn các điều kiện tách sắc ký như pha tĩnh và dung môi (pha động) trên thiết bị sắc ký trung áp điều chế MPLC của Trung tâm Hóa Dược, Viện Hóa học công nghiệp Việt Nam (hình 2.11).



Hình 2. 11: Thiết bị tách sắc ký điều chế MPLC

Điều kiện thiết bị tách sắc ký điều chế MPLC:

Bơm sắc ký: MPLC Pump MD 80/100 Labomatic AG;

Tốc độ dòng 0 - ~30 ml/phút;

Áp lực nén trung bình: 0,5 - 20 bar.

Hệ thống cột sắc ký:

Sắc ký pha đảo: ID 50 x L 350 mm; Sephadex LH20

Sắc ký pha thường: ID 50 x L 450 mm; Silica gel 60 (Merck);

Sắc ký pha lưỡng tính: ID 35 x L 230 mm; Silica gel CN (Merck);

Sắc ký trao đổi ion: ID 30 x L 400 mm; Diaion HP20SS;

Sắc ký hấp phụ: ID 10 x L 50 mm; pha tĩnh AP 6.

Kết quả khảo sát sẽ được áp dụng vào hệ thống sắc ký lỏng cao áp điều chế Pilot để phân lập các catechin chè xanh với lượng lớn đủ làm nguyên liệu bán tổng hợp và khảo sát cấu trúc, hoạt tính chống ôxy hóa.

Hiệu suất tách EGCG từ catechin tổng số của chè xanh được xác định bằng công thức:

$$H\% = \frac{m * 100}{\% EGCG * M}$$

Trong đó: m là khối lượng (g) EGCG tách được từ catechin tổng số

M là khối lượng mẫu catechin tổng số

% EGCG là phần trăm của EGCG trong catechin tổng số được chiết bằng phương pháp chiết ngược dòng liên tục và bằng 50,62%

a/ Khảo sát và đánh giá hiệu quả tách EGCG từ catechin tổng số trên cột silica gel biến tính bằng pha động sắc ký

Nghiên cứu xây dựng điều kiện tách sắc ký điều chế MPLC:

+ Cột tách: ID 50 × L 450 mm; pha tĩnh Silica gel 60 (Merck) cỡ hạt 15 - 40 μm ;

- + Mẫu khảo sát: 5 g Catechin/10 ml methanol;
- + Tốc độ dòng pha động: 10 ml/phút;
- + Pha động chạy sắc ký: Chloroform/Methanol/Axit citric 0,5 % rửa giải theo cách gradient từ 10 % - 100 % thể tích methanol.
- + Phát hiện mẫu: Sắc ký lớp mỏng silica gel;

Dung môi Chloroform/Methanol/Axit citric 0,5 % - 3:2:0,2 (v/v);

Thuốc hiện: Von's (Ce/NH₄/MoO₄).

b/ Khảo sát và đánh giá hiệu quả tách EGCG từ catechin tổng số trên cột silica gel pha lưỡng tính RP/NP

Nghiên cứu xây dựng điều kiện tách sắc ký điều chế pha thường MPLC trên pha tĩnh cyanosilica gel như sau:

- + Cột tách: ID 35 x L 230 mm; pha tĩnh LichroPrep[®] CN Merck (40 - 63 µm);
- + Mẫu khảo sát: 2 g Catechin/2 ml methanol;
- + Tốc độ dòng pha động: 10 ml/phút;
- + Pha động chạy sắc ký: Chloroform/Methanol rửa giải theo cách gradient từ 10 % - 100 % thể tích methanol.
- + Phát hiện mẫu: Sắc ký lớp mỏng silica gel;

Dung môi Chloroform/Methanol/Axit citric 0,5 % - 3:2:0,2 (v/v);

Thuốc hiện: Von's (Ce/NH₄/MoO₄).

c/ Khảo sát và đánh giá hiệu quả tách EGCG từ catechin tổng số trên cột Sephadex LH 20

Khảo sát tách sắc ký điều chế EGCG trên cột sắc ký nạp Sephadex LH 20 theo các điều kiện sau đây:

- + Cột tách: ID 50 x L 350 mm;
- + Pha tĩnh: Sephadex LH 20 (40 - 63 μ m);
- + Mẫu khảo sát: 2 g Catechin/1 ml Ethanol;
- + Tốc độ dòng dung môi: 10 ml/phút;
- + Dung môi chạy sắc ký: Ethanol/Nước - 95 : 5 (v/v)
- + Phát hiện mẫu: Sắc ký lớp mỏng silica gel;

Dung môi: Chloroform/Methanol/Axit citric 0,5 % - 3:2:0,2 (v/v);

Thuốc hiện: Von's (Ce/NH₄/MoO₄).

d/ Khảo sát và đánh giá hiệu quả tách EGCG từ catechin tổng số trên vật liệu polyme xốp có lỗ trống mạng phân tử lớn

i/ Khảo sát hiệu quả tách EGCG trên cột sắc ký Diaion HP20 SS

Khảo sát tách sắc ký điều chế EGCG trên cột sắc ký Diaion HP20 SS theo các điều kiện sau đây:

- + Cột tách: ID 30 x L 400 mm;
- + Pha tĩnh: Mitsubishi Diaion HP20 SS (200 - 600 μ m);
- + Mẫu khảo sát: 0,5 g Polyphenol/1 ml metanol;
- + Tốc độ dòng pha động: 5 ml/phút;
- + Dung môi chạy sắc ký: Metanol (A)/Nước (B); trong đó:
 - A: Gradient từ 10 % - 100 % thể tích;
 - B: Gradient từ 90 % - 0 % thể tích.
- + Phát hiện mẫu: Sắc ký lớp mỏng silica gel;

Dung môi Chloroform/Metanol/Axit citric 0,5 % - 3:2:0,2 (v/v);

Thuốc hiện: Von's (Ce/NH₄/MoO₄).

ii/ Khảo sát hiệu quả tách EGCG trên cột sắc ký nạp Polymeric AP 6

Khảo sát sơ bộ khả năng sử dụng polymer AP để tách hoặc tinh chế EGCG trên cartridge AP 6 theo các điều kiện sau đây:

- + Cột tách: Cartridge AP 6 ID 10 x L 50 mm;
- + Pha tĩnh: Polymeric GmBH AP 6 (45 - 100 µm);
- + Mẫu khảo sát: 0,1 g Polyphenol/0,5 ml metanol;
- + Tốc độ dòng pha động: 1,5 ml/phút;
- + Dung môi chạy sắc ký: Metanol (A)/Nước (B); trong đó:
 - A: Gradient từ 10 % - 100 % thể tích;
 - B: Gradient từ 90 % - 0 % thể tích.
- + Phát hiện mẫu: Sắc ký lớp mỏng silica gel;

Dung môi: Chloroform/Metanol/Axit citric 0,5 % - 3:2:0,2 (v/v);

Thuốc hiện: Von's (Ce/NH₄/MoO₄).

2.3.2.2. Nghiên cứu và thử nghiệm quy trình công nghệ tách EGCG lượng lớn trên hệ thống sắc ký lỏng MP/HPLC Pilot

a/ Khảo sát và thử nghiệm xác định ảnh hưởng của tốc độ dòng pha động đến quá trình tách sắc ký sản xuất EGCG

Trong sắc ký điều chế, tốc độ dòng pha động là một trong các thông số quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả tách và tính kinh tế của quá trình tách sắc ký. Vì vậy khảo sát thông số tốc độ dòng tối ưu cho pha động sắc ký Chloroform/Metanol/Axit citric 0,5 % trên cột tách silica gel. Cụ thể:

- + Cột tách: ID100 × L520 mm; pha tĩnh Silica gel 60 (Merck) cỡ hạt 15-40 µm;

+ Mẫu khảo sát: 25 g Polyphenol/25 ml metanol;

+ Phát hiện chất: Detector UV-Vis 290 nm;

+ Kiểm tra sản phẩm: Sắc ký lớp mỏng silica gel;

Dung môi Chloroform/Metanol/Axit citric 0,5 % - 3:2:0,2 (v/v);

Thuốc hiện: Von's (Ce/NH₄/MoO₄).

+ Pha động chạy sắc ký: Chloroform/Metanol/Axit citric 0,5 % rửa giải theo cách gradient từ 10 % - 100 % thể tích metanol;

+ Các tốc độ dòng pha động đã được thử nghiệm: 15 ml/phút; 25 ml/phút; 45 ml/phút và 60 ml/phút.

b/ Khảo sát và thử nghiệm xác định ảnh hưởng của tỷ lệ khối lượng mẫu đầu vào/tiết diện cột sắc ký đến quá trình tách sắc ký sản xuất EGCG

Trong kỹ thuật tách sắc ký, cũng giống như kỹ thuật chưng cất phân đoạn, số đĩa lý thuyết quan hệ rất chặt chẽ với lượng mẫu nạp vào cột và ảnh hưởng lớn đến hiệu quả tách. Với lượng mẫu lớn đòi hỏi chiều dài cột tách cũng phải tăng theo, tuy nhiên nếu tăng chiều dài cột tách lên quá cao, hiệu quả tách cũng sẽ không tăng do thời gian lưu của các phân đoạn sẽ bị kéo dài. Thêm vào đó, nếu chiều cao lớp mẫu đưa vào cột tách quá lớn, sẽ làm giảm số đĩa lý thuyết và gây ra hiện tượng chồng chập pic sắc ký.

Do đó, khi cố định chiều dài cột tách, lượng mẫu đưa vào trên mặt cột tách không thể quá lớn và sẽ tỷ lệ thuận với tiết diện cột tách. Chúng tôi đã tiến hành khảo sát đánh giá ảnh hưởng của khối lượng mẫu đầu vào đến quá trình tách sắc ký sản xuất EGCG để xác định thông số tối ưu S/ID - tỷ lệ Lượng “*Catechin tổng số*”/Đường kính cột tách. Điều kiện khảo sát cụ thể như sau:

+ Cột tách: ID 100 × L 520 mm; pha tĩnh Silica gel 60 (Merck) cỡ hạt 15 - 40 µm;

+ Pha động chạy sắc ký: Chloroform/Metanol/Axit citric 0,5 % rửa giải theo cách gradient từ 10 % - 100 % thể tích metanol;

- + Tốc độ dòng pha động: 45 ml/phút;
- + Phát hiện chất: Detector UV-Vis 290 nm;
- + Kiểm tra sản phẩm: Sắc ký lớp mỏng silica gel;

Dung môi Chloroform/Metanol/Axit citric 0,5 % - 3:2:0,2 (v/v);

Thuốc hiện: Von's (Ce/NH₄/MoO₄).

- + Lượng mẫu đưa lên cột tách để khảo sát ứng với từng thử nghiệm lần lượt là: 15 g Catechin tổng số/15 ml Metanol; 20 g/20 ml; 25 g/25 ml; 30 g/30 ml; 40 g/40 ml và 50 g/50 ml.

2.3.2.3. Nghiên cứu phân tách các catechin bằng phương pháp HPLC trên cột sắc ký phối hợp Diaion HP20 và Sephadex LH20

Các catechin chè xanh được phân tách từ catechin tổng số trên hệ thống sắc ký lỏng cao áp điều chế:

Thiết bị: Pilot Prep-HPLC HD-3000 Labomatic AG;

Detector: PDA 190 - 700 nm;

Tốc độ dòng: 1,5 - 550 ml/phút;

Áp lực tối đa: 600 bar.

Hệ thống cột sắc ký: Sephadex LH 20 ID 100 x L 800 mm

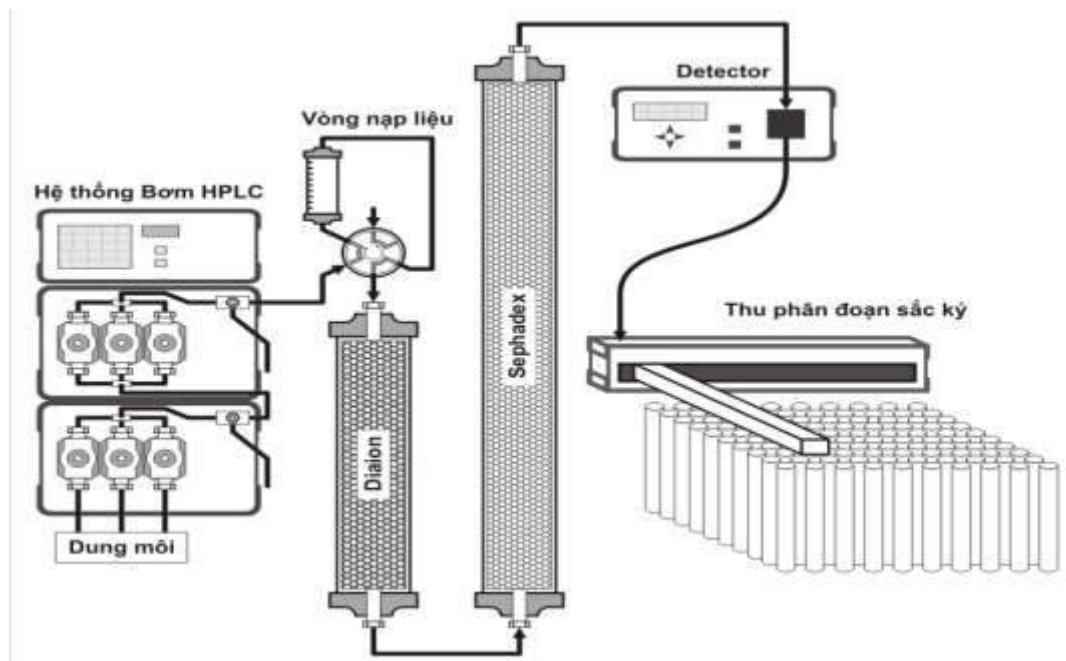
Diaion HP20 SS ID 100 x L 500 mm

Dung môi rửa giải ancol/nước được bơm từ hệ thống bơm sắc ký lỏng cao áp (Prep. HPLC) qua vòng nạp liệu vào hệ thống cột tách Diaion HP 20 và Sephadex LH 20; 50 ml dung dịch chứa 25 g catechin tổng số trong ethanol được bơm vào hệ thống bơm mẫu và tiến hành phân tách.

Điều kiện tách: UV 310 nm;

Pha động - Ethanol/Nước - 95 : 5 (v/v);

Tốc độ dòng: 60 ml/phút.



Hình 2. 12: Hệ thống sắc ký lỏng cao áp điều chế bán công nghiệp và hệ thống cột Diaion HP20 SS kết nối trực tuyến với cột Sephadex LH20

Từ detector UV/Vis, tùy từng thời điểm triển khai:

- + Thời điểm phát hiện có chất hấp thụ tử ngoại ở 310 nm: dung dịch sắc ký được dẫn vào hệ thống thu phân đoạn sắc ký tự động để chia cắt phân đoạn theo thể tích và thời gian lưu thích hợp, cụ thể thể tích mỗi phân đoạn sắc ký 220 ml;

- + Thời điểm dung dịch sắc ký không có tín hiệu UV 310 nm: dung dịch sắc ký được dẫn vào bình chứa của hệ thống thu hồi dung môi.

Các phân đoạn chứa catechin đều được kiểm tra lại so sánh với chất chuẩn bằng sắc ký lớp mỏng:

- + Hệ dung môi triển khai Chloroform/Methanol/Citric acid 0,5 % tỷ lệ 3:2:0,2

- + Thuốc hiện: Von's ($\text{Ce}/\text{NH}_4/\text{MoO}_4$).

2.3.3. Bán tổng hợp dẫn xuất O-acetyl của các catechin chè xanh và đánh giá mức độ suy giảm hoạt tính dạn gốc tự do

2.3.3.1. Bán tổng hợp các dẫn xuất acetyl của catechin để đánh giá mức độ suy giảm hoạt tính

Các catechin chè xanh EC; EGC và EGCG được acyl hóa bằng tác nhân anhydrite acetic trong acetic acid băng và pyridine.

Đưa 20 mMol (5,8g EC hoặc 6,12g EGC hoặc 9,16g EGCG) vào bình phản ứng có khuấy từ, làm lạnh ở nhiệt độ -4°C . Nhỏ giọt từ từ 25 ml axit axetic băng vào bình phản ứng và khuấy cho đến khi hỗn hợp trở nên quánh và sệt, tiếp tục nhỏ giọt từ từ 20ml hoặc 25ml hoặc 40 ml anhydrite acetic lần lượt vào hỗn hợp phản ứng chứa EC hoặc EGC hoặc EGCG, thêm vào 1 - 2 giọt pyridine; tiếp tục khuấy trong nửa giờ. Đậy kín bình và để tĩnh 24 giờ trong tủ lạnh ở nhiệt độ -4°C . Sau khoảng 8 giờ bắt đầu lấy mẫu kiểm tra tiến trình phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi triển khai $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$ (9:1; v:v).

Hỗn hợp sản phẩm phản ứng được thêm nước vào đến 4 lần thể tích, sử dụng NaHCO_3 trung hòa hỗn hợp phản ứng về trung tính. Chiết lấy sản phẩm acetyl hóa bằng chloroform 3 lần, mỗi lần 25 ml. Các dịch chiết được gộp lại, Chiết rửa dịch chloroform bằng nước cất cho đến khi trung tính. Dịch chiết được làm khan bằng Na_2SO_4 khan, cô loại kiệt dung môi ở áp suất 350 mbar, nhiệt độ 50°C .

Sản phẩm phản ứng được tách tinh chế bằng sắc ký cột nhanh trên cột silica gel Merck 60 (cỡ hạt 15 - 40 μm); ID. 10 x L. 200 mm, sử dụng khí nén với áp lực từ 0,2 đến 0,3 bar để đẩy dung môi chạy qua cột sắc ký. Pha động sắc ký là $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$, gradient từ 0 % đến 10 % methanol theo thể tích với tốc độ rửa giải từ 1 - 1,5 ml/phút.

Các phân đoạn chứa chất catechin acetyl tiếp tục được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh với hệ dung môi EtOAc/n-hecxa 20% đến 50% EtOAc theo thể tích. Sau đó các phân đoạn chứa chất tinh khiết được cô loại dung môi ở nhiệt độ 55°C , áp suất 80

mbar và được kết tinh lại trong etyl acetat.

Cấu trúc của các dẫn xuất acetyl đã được khẳng định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1D và 2D NMR trên máy Bruker AVANCE 500MHz tại Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Độ chuyển dịch hóa học (δ ppm) được xác định theo nội chuẩn Tetrametylsilan và tín hiệu dung môi đo phổ.

2.3.3.2. Đánh giá mức độ suy giảm hoạt tính gốc tự do DPPH của các dẫn xuất O-acetyl so với các catechin chè xanh

Các dẫn xuất của catechin được đánh giá hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp đánh giá khả năng quét gốc tự do DPPH tại Phòng thử các chất có hoạt tính sinh học, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra các gốc tự do bền trong dung dịch MeOH. Các chất có khả năng làm trung hòa hoặc bao vây các gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp thụ ánh sáng của các gốc tự do DPPH. Hoạt tính chống oxy hóa được đánh giá thông qua giá trị hấp thụ ánh sáng của mẫu thí nghiệm so với mẫu đối chứng khi đo ở bước sóng 517 nm [8].

Theo đó, 10 μ l mẫu pha trong DMSO được cho vào các giếng của phiên 96 giếng chứa 190 μ l dung dịch 150 μ M DPPH/Methanol. Sau 30 phút ủ trong tối ở nhiệt độ phòng, độ hấp thụ của các dung dịch phản ứng được đo trên máy ELISA ở bước sóng 517 nm. Resveratrol được sử dụng làm đối chứng dương.

Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo công thức sau:

$$\text{DPPH (\%)} = 100 \times (\text{ACT} - \text{ASP}) / \text{ACT}$$

Trong đó: ACT: Mật độ quang của mẫu trắng không chứa chất;

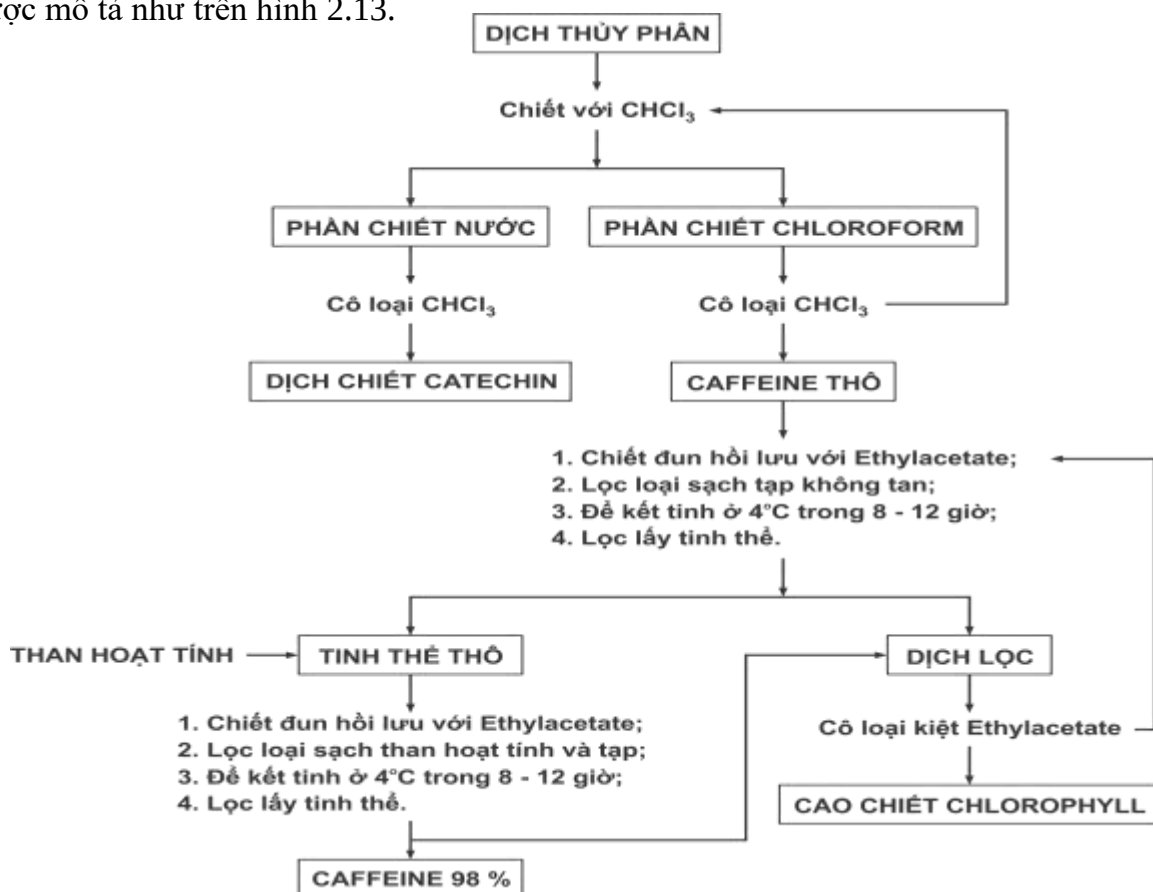
ASP: Mật độ quang của mẫu có chứa dịch chiết.

Giá trị IC_{50} là nồng độ của dịch chiết khử được 50% gốc tự do DPPH ở điều kiện xác định. Giá trị IC_{50} càng thấp thì hoạt tính khử gốc tự do DPPH càng cao.

2.3.4. Nghiên cứu quy trình tách và tinh chế caffeine từ cao chiết chè xanh

Sau khi chiết chè xanh theo phương pháp “Chiết ngược dòng liên tục”, diệp lục và caffeine đã được tách triệt để sang phần dịch chiết chloroform. Do vậy, sẽ được tiếp tục nghiên cứu về công nghệ tách, tinh chế caffeine dựa trên các phần chiết thu nhận được khi khảo sát phương pháp “Chiết ngược dòng liên tục”.

Caffeine được tinh chế bằng phương pháp sử dụng dung môi hữu cơ để kết tinh lại nhiều lần và kết hợp tẩy màu bằng than hoạt tính. Quy trình tách và tinh chế Caffeine từ dịch chiết chè xanh sau khi thủy phân với chlohydric acid (dịch thủy phân) được mô tả như trên hình 2.13.



Hình 2. 13: Quy trình công nghệ tách và tinh chế Caffeine

Dịch thủy phân được chiết với chloroform, phần chiết này sau khi loại kiệt dung môi chứa chủ yếu caffeine và một lượng nhỏ chlorophyll, tạm được gọi là caffeine thô.

Caffeine tan tốt trong nước, ethanol và các dung môi hữu cơ như chloroform, dichloromethane. Trong phần chiết chứa caffeine còn có một số các chất màu, chất sáp, và các diệp lục, do đó nếu dùng các dung môi gốc clo hòa tan tốt sẽ dẫn đến việc kết tinh ở ạt trong dung dịch quá bão hòa, tinh thể thu được sẽ không sạch. Các khảo sát sơ bộ của chúng tôi đã cho thấy ethylacetate là một lựa chọn tốt để kết tinh chậm caffeine.

Caffeine thô được hòa tan tối đa trong ethylacetate ở nhiệt độ sôi hồi lưu, lọc nóng loại sạch tạp không tan rồi để kết tinh ở 4°C trong 8 - 12 giờ. Lọc thu lại tinh thể thô, bổ sung than hoạt tính và đun hồi lưu trong ethylacetate trong 30 phút. Lọc nóng nhanh thu lại dịch lọc, làm lạnh từ từ xuống đến 4°C rồi để tĩnh cho kết tinh trong 12 giờ rồi lọc thu tinh thể.

CHƯƠNG 3 : KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

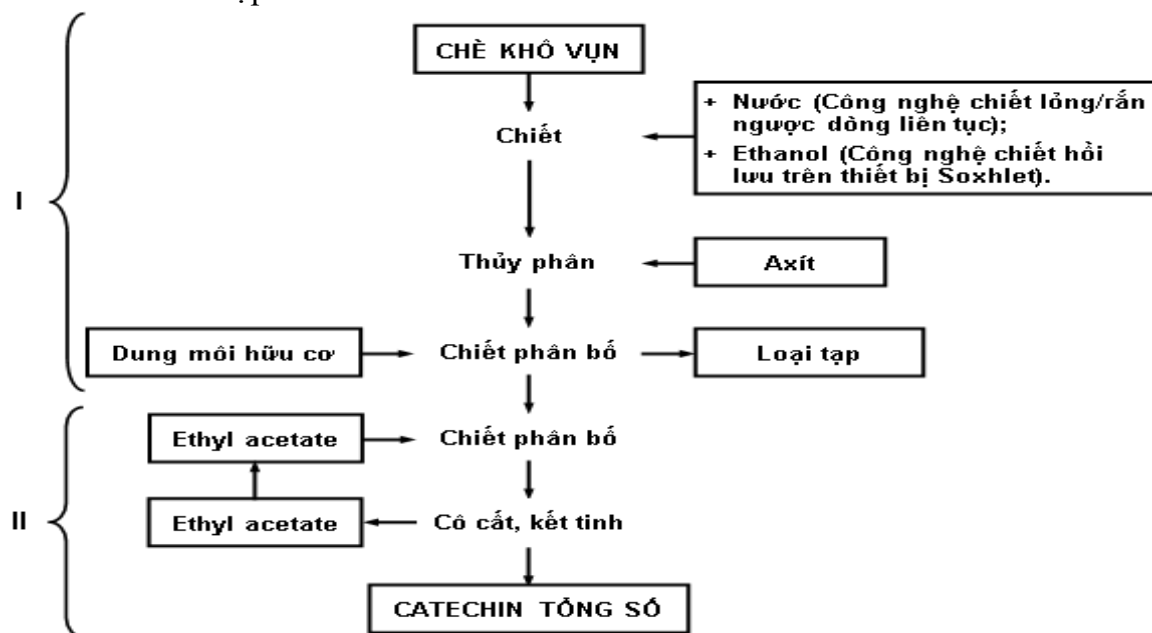
3.1. NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT CATECHIN TỔNG SỐ TỪ CHÈ XANH

3.1.1. Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ chung chiết catechin tổng số từ chè xanh

Xây dựng phương án công nghệ chiết Catechin chè xanh theo quy trình chiết chè xanh chung đã được áp dụng trên thế giới (hình 3.1), các catechin là các hợp chất phân cực yếu, dễ tan trong nước và dung môi hữu cơ phân cực như ethanol, methanol:

+ Trong phương án chiết bằng ethanol: Nguyên liệu được chiết hồi lưu bằng ethanol trên hệ thống chiết Soxhlet, sau đó dịch chiết được cô loại kiệt dung môi ở áp suất thấp để thu lại *cao chiết cồn*.

+ Trong phương án chiết bằng nước: Nguyên liệu được đưa lên hệ thống chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục để chiết với dung dịch citric acid (lượng axit sử dụng ~ 0,05 % so với nguyên liệu) với tốc độ chảy ngược dòng dung môi/nguyên liệu được điều chỉnh thích hợp.



Hình 3. 1: Quy trình chung chiết xuất catechin tổng số từ chè xanh

Cao chiết còn hoặc dịch chiết nước sau đó sẽ được thủy phân các polyphenol bằng HCl 1 % rồi tách catechin từ lá chè theo phương pháp chiết phân bố tuần hoàn lần lượt với các dung môi hữu cơ thích hợp như n-hexane, chloroform và ethyl acetate để loại chlorophyll và caffeine trước, sau đó chiết xuất lấy catechin.

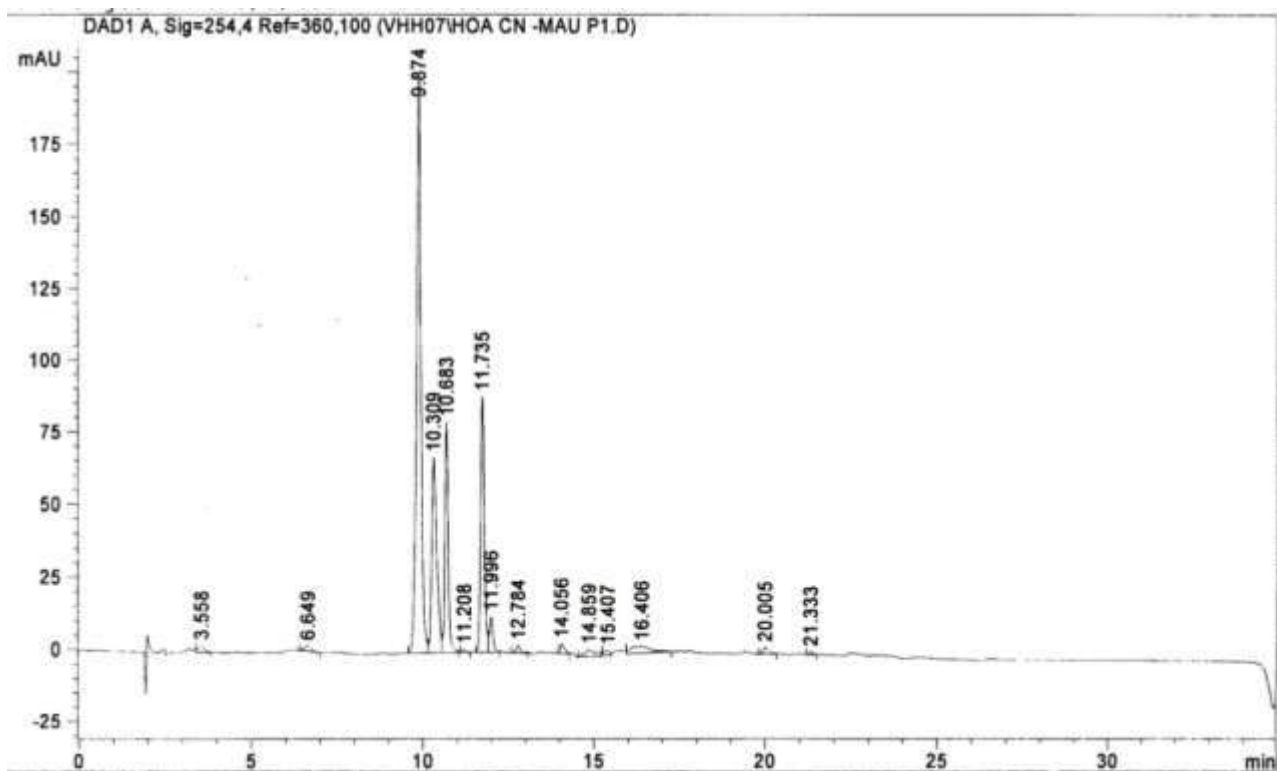
3.1.2. Nghiên cứu chiết catechin tổng số bằng ethanol theo phương pháp Soxhlet

Chiết chè xanh bằng ethanol theo phương pháp Soxhlet thu được catechin tổng số sạch có màu vàng nhạt (hình 3.2), tổng cộng từ 5 kg chè nguyên liệu thu được 470 g catechin tổng số, đạt hiệu suất 9,4 % đây là tỷ lệ chấp nhận được đối với phương pháp chiết đun hồi lưu, tương đương với các kết quả nghiên cứu trước đây trên thế giới [56, 59].



Hình 3. 2: Sản phẩm catechin tổng số

Thành phần và hàm lượng tương đối của các catechin đã được phân tích bằng phương pháp HPLC-MS được mô tả trên sắc ký đồ hình 3.3.



Hình 3. 3: Sắc ký đồ HPLC/MS phân tích catechin tổng số

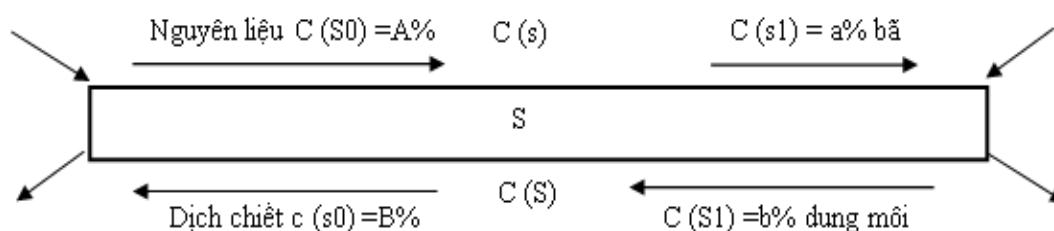
Từ sắc ký đồ hình 3.3 thấy rằng Catechin tổng số gồm 4 hợp chất có hàm lượng cao (EGCG, EC, EGC, ECG) và lẫn một số hợp chất có hàm lượng rất nhỏ, từ đó có hàm lượng tổng các hợp chất catechin đạt >90% theo HPLC trong đó EGCG > 50% , được bảo quản trong lọ thủy tinh kín màu nâu, tránh ánh sáng, nhiệt độ bảo quản nhỏ hơn 25°C. Hàm lượng một số catechin tổng số được mô tả như trong bảng 3.1.

Bảng 3. 1: Hàm lượng một số catechin trong catechin tổng số

Stt	Thời gian lưu (phút)	MS	Hàm lượng (%)	Hợp chất
1	9,874	458	53,67	EGCG
2	10,309	290	16,86	EC
3	10,683	306	13,12	EGC
4	11,735	442	16,24	ECG

3.1.3. Nghiên cứu chiết chè xanh bằng nước theo phương pháp ngược dòng liên tục

Trong ứng dụng công nghệ chiết ngược dòng liên tục, để thúc đẩy hiệu quả chiết, tăng độ chênh lệch nồng độ, nguyên liệu và dịch chiết trong thiết bị chiết chuyển động ngược chiều, liên tục. Quá trình khuếch tán của ngược dòng liên tục và quá trình cân bằng luôn đảm bảo giới hạn cân bằng là lớn nhất. Do đó hiệu suất thu được tương đối cao và nồng độ chiết tương đối đặc, đồng thời hiệu suất tổng tương đương với 3 ~ 5 khuếch tán đơn, giai đoạn cân bằng và phân ly, năng suất chiết các thành phần tan có thể đạt đến 90 %, nguyên lý (hình 3.4).



Hình 3. 4: Sơ đồ nguyên lý chiết lỏng rắn ngược dòng liên tục

Chiết ngược dòng liên tục là một dạng công nghệ kết hợp chiết trạng thái động (chiết liên tục), chiết ngược dòng và ngâm chiết. Trên cơ sở giữ lại những ưu điểm của các phương pháp truyền thống, phương pháp này cùng lúc có thể đạt được các ưu điểm mà các phương pháp truyền thống không thể đạt được như: tốc độ chiết nhanh; thành phần tan được chiết một cách kiệt nhất; hiệu suất chiết cao, trên một khối lượng đơn vị nguyên liệu lượng dung môi dùng để chiết tiêu hao ít, nồng độ dịch chiết thu được cao, giảm bớt khâu cất giảm áp sau khi chiết; chiết trong trạng thái động và có thể tiến hành ở nhiệt độ thường nên thời gian ngâm chiết ngắn, các thành phần ít bị phân huỷ nên tập trung dịch chiết tương đối ít.

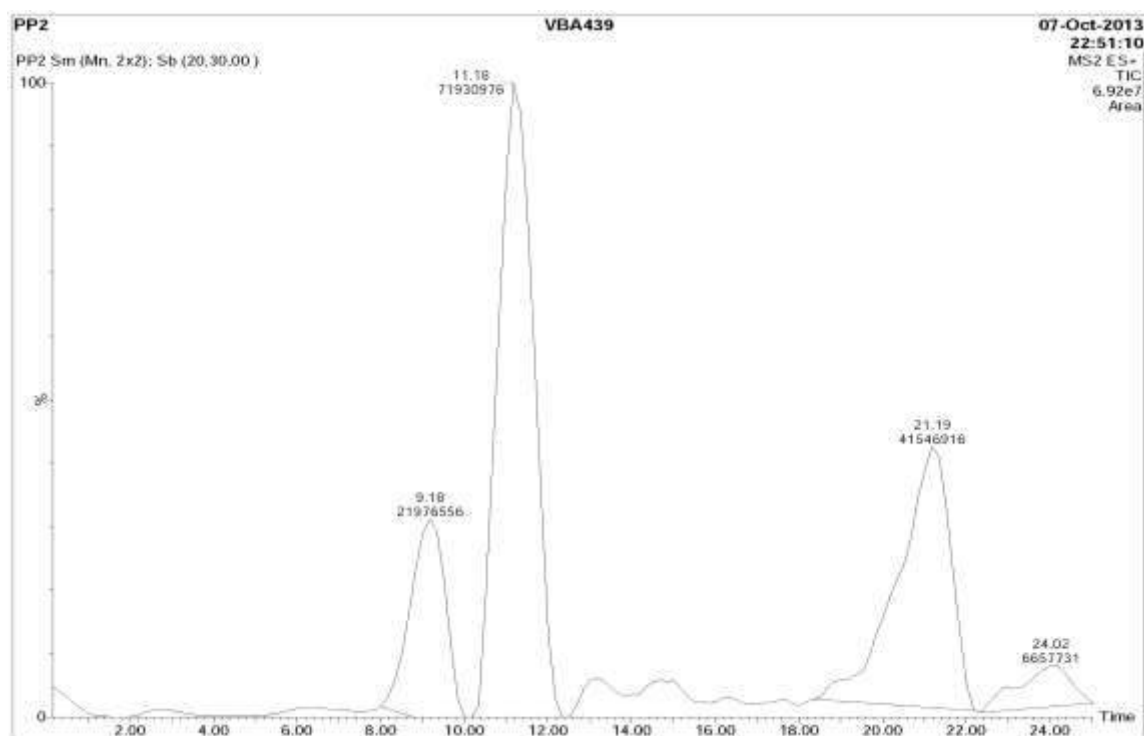
Kết quả và nhận xét quá trình chiết chè xanh bằng nước theo phương pháp ngược dòng liên tục:

Khảo sát và xây dựng quy trình chiết chè bằng nước trên hệ thống chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục đã giảm được thời gian chiết xuống 4 giờ cho mỗi 100 kg nguyên

liệu chè khô, giảm chi phí sử dụng n-hexane và ethanol.

Tổng cộng từ 100 kg chè khô nguyên liệu thu được 12,5 kg catechin tổng số, đạt hiệu suất chiết xấp xỉ 12,5 % Catechin tổng số có màu vàng nhạt.

Kết quả phân tích HPLC-MS thành phần catechin chè xanh chiết theo phương pháp ngược dòng liên tục được mô tả trên hình 3.5.



Hình 3. 5: Sắc ký đồ HPLC-MS catechin tổng số chè xanh chiết theo phương pháp ngược dòng liên tục

Từ sắc ký đồ hình 3.5 thấy rằng Catechin tổng số bao gồm 4 hợp chất có hàm lượng cao (EGCG, EGC, EC, ECG) và lẫn một số hợp chất có hàm lượng rất nhỏ, từ đó có hàm lượng tổng các hợp chất catechin đạt >90% theo HPLC trong đó EGCG > 50% , caffeine <0,5%, bảo quản trong lọ thủy tinh kín màu nâu tránh ánh sáng, nhiệt độ bảo quản nhỏ hơn 25°C. Hàm lượng một số catechin tổng số được mô tả như trong bảng 3.2.

Bảng 3. 2: Thành phần catechin tổng số theo phương pháp ngược dòng liên tục

Stt	Thời gian lưu (phút)	MS	Hàm lượng (%)	Hợp chất
1	9.18	290	15.46	EC
2	11.8	458	50.62	EGCG
3	21.19	306	29.24	EGC
4	24.02	442	2.62	ECG

Từ kết quả chiết xuất catechin từ chè xanh theo hai phương pháp chiết 1 - *Chiết đun hồi lưu với ethanol* và 2 - *Chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục với nước*; thấy rằng hàm lượng % của EGC chiết theo hai phương pháp chiết khác nhau nhiều, chiết bằng ethanol theo phương pháp Soxhlet đạt 13,12% trong khi đó phương pháp chiết ngược dòng liên tục đạt rất cao 29,24% . Vì chiết bằng ethanol theo phương pháp Soxhlet thực hiện ở nhiệt độ cao 78°C, ở điều kiện này có khả năng EGC bị phân hủy, ngoài ra chiết bằng ethanol các tạp chất chứa chất béo và dầu cũng bị kéo theo, mặt khác trong quá trình tinh chế có bước chiết rửa bằng n-hexan cũng có thể EGC mất mát 1 phần.

Hàm lượng EGCG trong catechin tổng số chiết bằng nước đạt 50,62 % thấp hơn chiết bằng ethanol đạt 53,67 % không đáng kể, nhưng hiệu suất chiết bằng nước đạt 12,5 % cao hơn hẳn so với phương án chiết bằng ethanol chỉ đạt 9,4 %, thêm vào đó, trong quá trình tinh chế có sự hỗ trợ thủy phân của axit citric ở nhiệt độ thường, loại bỏ được bước chiết rửa bằng n-hexane, giảm tổn hao ethanol và chi phí chưng cất ethanol do sử dụng nước làm dung môi chiết. Do vậy, xét về mặt triển khai công nghệ, phương án chiết ngược dòng bằng nước có ưu thế hơn hẳn về quy mô, thời gian và chi phí dung môi, ngoài ra, việc thu hồi phụ phẩm caffeine và chlorophyll cũng dễ dàng hơn do phần chiết này không có mặt các tạp chất béo và dầu như khi chiết bằng cồn.

Lần đầu tiên ở Việt Nam tổ chức nghiên cứu áp dụng kỹ thuật chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục trong công nghiệp để triển khai sản xuất catechin từ chè xanh.

3.2. NGHIÊN CỨU TÁCH VÀ TINH CHẾ CÁC CATECHIN VÀ EGCG TỪ CATECHIN TỔNG SỐ CỦA CHÈ XANH

3.2.1. Nghiên cứu lựa chọn chất hấp phụ có thể tái sử dụng làm pha tĩnh tách sắc ký điều chế EGCG từ catechin tổng số của chè xanh

Kết quả phân tích LC-MS cho thấy catechin tổng số của chè xanh được chiết bằng phương pháp ngược dòng liên tục có hàm lượng catechin đạt tới hơn 97,94%, trong đó hàm lượng của EGCG đạt 50,62 %. Do đó, đã lựa chọn EGCG làm đối tượng chính để nghiên cứu hiệu quả tách sắc ký trên các loại pha tĩnh sắc ký khác nhau với các điều kiện triển khai sắc ký khác nhau. Những cột có đường kính nhỏ và làm với lượng nhỏ chỉ mang tính khảo sát so sánh quy mô phòng thí nghiệm còn những cột đường kính lớn được thực hiện với lượng phân tách lớn để triển khai với quy mô pilot. Qua đó xây dựng phương pháp công nghệ sắc ký sản xuất các catechin từ chè xanh với hiệu quả cao.

3.2.1.1. Đánh giá hiệu quả tách EGCG từ catechin tổng số trên cột silica gel biến tính bằng pha động sắc ký

Phân tử lượng của các hợp chất phenol thường khá nhỏ 300 - 1000 Dalton, thêm vào đó ái lực của chúng đối với silica gel trên cột tách sắc ký rất mạnh. Do vậy, khi nghiên cứu phân tách sắc ký các phenolic trên chất hấp phụ silica gel, người ta thường tìm cách biến tính silica gel để giảm hoạt tính của pha tĩnh, từ đó giảm được thời gian phân tách và tiết kiệm dung môi làm pha động. Trong đó một phương pháp đơn giản nhất là biến tính trực tiếp pha tĩnh ngay trong quá trình chạy sắc ký bằng chính dung môi sắc ký có pha thêm một số axit cacboxylic. Đối với các catechin, thông thường người ta hay pha axit formic hoặc axit citric; trong trường hợp tách EGCG, axit citric sẽ là lựa chọn tối ưu do chất này là thực phẩm và còn được sử dụng làm chất ổn định cho chính các sản phẩm từ chè xanh [22].

Kết quả từ 5 g catechin tổng số, đã phân lập được 1,5 g chất EGCG thô.

Từ 1,5 g EGCG thô này được kết tinh lại trong 0,5 ml dung dịch axit citric 0,5 %, thu được 1,28 g EGCG 98 %.

$$\text{Hiệu suất tách đạt: } H\% = \frac{m * 100}{\% EGCG * M} = \frac{1,28 * 100}{50,62\% * 5,00} = 50,6 \%$$

3.2.1.2. Đánh giá hiệu quả tách EGCG từ catechin tổng số trên cột silica gel pha lưỡng tính RP/NP

Ngoài phương pháp biến tính silica gel bằng axit cacboxylic trong pha động sắc ký, trong phòng thí nghiệm hoặc ở quy mô triển khai Pilot cỡ nhỏ (Kilogram-LAB), có thể sử dụng các loại silica gel đã biến tính sẵn bằng các nhóm thế gây trung tính - ví dụ cyanoisopropyl làm pha tĩnh (cyanosilica gel - silica gel trung tính) để tách các catechin. Loại pha tĩnh này có thể áp dụng chạy sắc ký theo cả hai loại hình rửa giải pha thường (NP) hoặc pha đảo (RP).

Kết quả từ 2 g catechin tổng số, chúng tôi đã phân lập được 0,7 g EGCG thô; kết tinh lại thu được 0,6 g EGCG 98 %.

$$\text{Hiệu suất tách đạt: } H\% = \frac{m * 100}{\% EGCG * M} = \frac{0,6 * 100}{50,62\% * 2,00} = 59,3 \%$$

Tuy nhiên, phương pháp này khi áp dụng để tách Catechin chè xanh thường gặp phải một hạn chế: Các catechin có kích thước phân tử nhỏ, thêm vào đó, một bộ phận các chất màu caroten và anthocyanin dư trong Catechin tổng số chè xanh bị hấp phụ mạnh trong cyanoisopropyl silica gel. Do vậy, lượng dung môi rửa giải để hoàn nguyên cột tách phải sử dụng tương đối lớn so với cột tách silica gel thông thường.

3.2.1.3. Đánh giá hiệu quả tách EGCG từ tổng catechin trên cột Sephadex LH 20

Do tính chất tan tốt trong nước và các ancol của các catechin, phương pháp sắc ký phân bố đảo pha cũng được áp dụng để tách điều chế EGCG, trong đó các chất mang pha tĩnh được sử dụng là dextran gel methyrate (Sephadex LH20). Khi sử dụng chất mang sephadex được hình thành theo cả hai cơ chế phân bố lỏng/lỏng và hấp phụ/giải hấp rây phân tử molecular sieves.

Kết quả: Từ 0,5 g catechin tổng số đã phân lập được 0,23 g EGCG > 90 %, sản phẩm sau khi cô loại dung môi và kết tinh lại thu được 0,21 g EGCG 98 %.

$$\text{Hiệu suất tách đạt: } H\% = \frac{m \cdot 100}{\% EGCG \cdot M} = \frac{0,21 \cdot 100}{50,62\% \cdot 0,50} = 83,0 \%$$

3.2.1.4. Đánh giá hiệu quả tách EGCG từ catechin tổng số trên vật liệu polyme xốp có lỗ trống mạng phân tử lớn

Xuất phát từ các kết quả nghiên cứu tách catechin trên cột sắc ký rây phân tử sephadex, đã được bắt đầu từ những năm 1980, và chính thức công bố đăng ký bản quyền sáng chế năm 2009 [31], hiện nay các công ty sản xuất hóa dược đã bắt đầu áp dụng các loại vật liệu polyme hoạt động phân cực có lỗ trống lớn trên mạng phân tử (macroporous polar resin - vốn là các chất mang trong sắc ký trao đổi ion) làm vật liệu tách sắc ký sản xuất catechin, ví dụ: Amberlite® XAD-7; Diaion HP20 SS; .v.v...

Các vật liệu resin trong sắc ký trao đổi ion chủ yếu là các polystyren biến tính, có lỗ trống trong mạng lưới phân tử đủ lớn thích hợp với kích thước phân tử các hoạt chất trong dược phẩm, thêm vào đó, các resin này có khả năng hoạt động tĩnh điện và tạo liên kết ion (sắc ký trao đổi ion), có thể mở rộng được khả năng tách các hoạt chất trong dược phẩm, vốn là các chất khó tinh chế, thường phải tách và làm sạch theo nhiều bước bằng nhiều phương pháp khác nhau.

Luận án đã tiến hành nghiên cứu khả năng tách EGCG từ hỗn hợp Catechin tổng số chè xanh trên hai loại vật liệu: 1 - Nhựa trao đổi ion lưỡng tính Diaion HP 20 SS và 2 - Vật liệu polyme hấp phụ Polymeric AP 6.

a/ Đánh giá hiệu quả tách EGCG trên cột sắc ký Diaion HP20 SS

Diaion HP20 SS là nhựa polystyren biến tính, có khả năng trao đổi, bắt giữ ion với cả anion và cation (nhựa trao đổi ion lưỡng tính), do đó được áp dụng rộng rãi trong dược phẩm và công nghệ sinh học làm sắc ký điều chế tách loại các muối và ion vô cơ (desalting) khỏi hỗn hợp sản phẩm thô sau khi tổng hợp. Vật liệu này cũng được

sử dụng làm pha tĩnh chạy sắc ký tinh chế các glycosid và kháng sinh từ rong biển.

Kết quả: từ 0,5 g catechin tổng số đã phân lập được 0,15 g EGCG > 90 %, sản phẩm sau khi cô loại dung môi và kết tinh lại thu được 0,12 g EGCG 98 %.

$$\text{Hiệu suất tách đạt: } H\% = \frac{m \cdot 100}{\% EGCG \cdot M} = \frac{0,12 \cdot 100}{50,62\% \cdot 0,50} = 47,4\%$$

b/ Đánh giá hiệu quả tách EGCG trên cột sắc ký nập Polymeric AP 6

Từ những năm 1990, công ty Polymerics đã phát triển loại nhựa co-polymer trên nền polystyren và polydivinylbenzen với những tính chất tương tự một số loại resin hiện có trên thị trường, tuy nhiên vật liệu này có đặc tính hấp phụ các hợp chất hữu cơ mạnh hơn. Loại vật liệu mới này đã tìm được ứng dụng trong y tế làm cột lọc máu hỗ trợ cho thiết bị chạy thận nhân tạo với tên thương mại Polymerics GmbH AP (Adsorben Polymer). co-Polymer AP có tính chất nghiêng nhiều sang hướng hấp phụ/giải hấp, tính trao đổi ion không cao, tuy nhiên có thể tăng cường khả năng trao đổi ion khi biến tính với một số nhóm thế khác như acrylat hoặc meta-acrylat.

Trong quá trình nghiên cứu phát triển ứng dụng của co-Polymer AP, công ty Polymerics GmbH cũng đã khảo sát tách catechin chè xanh trên vật liệu AP 6 và đã thu được một số kết quả nhất định.

Nhằm mục đích thu thập thêm thông số kỹ thuật cho việc lựa chọn một loại hình sắc ký điều chế với vật liệu pha tĩnh có thể thu hồi và tái sử dụng để triển khai sản xuất EGCG, cùng với sự gợi ý từ công ty Polymerics, đã khảo sát để đánh giá lại hiệu quả tách EGCG từ polyphenol chè xanh trên cartridge AP 6.

Kết quả: EGCG được rửa giải ra ở đoạn dung môi A 20 %; từ 0,1 g Catechin tổng số đã phân lập được 0,03 g EGCG > 90 %.

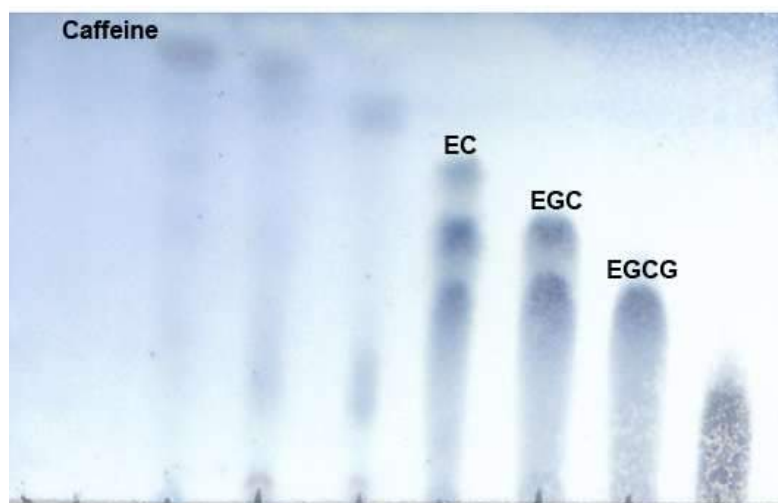
$$\text{Hiệu suất tách đạt: } H\% = \frac{m \cdot 100}{\% EGCG \cdot M} = \frac{0,03 \cdot 100}{50,62\% \cdot 0,10} = 59,3 \%$$

3.2.1.5. So sánh hiệu quả tách của các phương pháp sắc ký điều chế tách EGCG

Áp dụng các phương pháp tách sắc ký khác xa nhau về bản chất cơ chế hình

thành sắc đồ để nghiên cứu tách EGCG từ hỗn hợp catechin chè xanh, nhưng các sắc ký đồ cho kết quả gần tương tự nhau.

EGCG sẽ là cấu tử cuối cùng được rửa giải ra khỏi cột tách trong số 3 catechin chủ yếu của chè xanh (EC; EGC và EGCG), sắc đồ sắc ký lớp mỏng (TLC) đặc trưng nhất cho các kết quả khảo sát tách sắc ký EGCG (hình 3.6).



Hình 3. 6: TLC các phân đoạn sắc ký tách catechin tổng số

Hiện tượng các catechin được rửa giải ra khỏi cột sắc ký theo một thứ tự giống nhau trên các pha tĩnh sắc ký khác nhau được giải thích do đặc tính bị hấp phụ mạnh của các catechin trên bề mặt pha tĩnh. Theo đó, các catechin sẽ được rửa giải theo thứ tự độ phân cực của từng chất trong hỗn hợp dung môi. Pha động sắc ký được biến đổi tăng dần nồng độ metanol (gradient), các catechin kém tan hơn trong metanol sẽ được giải hấp ra trước; Đến các đoạn dung môi có nồng độ metanol cao hơn, các catechin tan tốt hơn trong metanol sẽ được đẩy ra sau. Riêng đối với sắc ký pha đảo, không có ảnh hưởng bởi hiệu ứng hấp phụ/giải hấp, thứ tự rửa giải của các catechin vẫn không thay đổi - giống như sắc ký trao đổi ion và sắc ký hấp phụ - Hiện tượng này có thể giải thích được do sự có mặt của axit cacboxylic trong pha tĩnh (Nước) và pha động sắc ký (Metanol/nước), các catechin có tính axit thấp hơn sẽ được rửa giải ra trước.

Đánh giá hiệu quả tách EGCG của các loại hình sắc ký:

Kết quả thống kê, tính toán và đánh giá hiệu quả tách EGCG của các loại pha tĩnh sắc ký được nêu tóm tắt lại trong bảng 3.3 dưới đây:

Bảng 3. 3: Đánh giá hiệu quả tách sắc ký EGCG

Loại pha tĩnh sắc ký	Tỷ lệ S/ID	Hiệu suất tách	Hiệu quả tuyệt đối	Dung môi
1. Pha thường:				
Silica gel 60 Merck (15-40 μm)	5 g/50 mm	50,6 %	5,840	10ml MeOH
LichroPrep [®] CN (25-40 μm)	2 g/35 mm	59,3 %	3,926	2ml MeOH
2. Pha đảo:				
Sephadex LH 20 (40-63 μm)	0,5 g/50 mm	83,0 %	0,830	1ml EtOH
3. Hấp phụ/giải hấp:				
Diaion HP20 SS (200 - 600 μm)	0,5 g/30 mm	47,4 %	0,915	1ml MeOH
Polymeric GmBH AP 6 (45 - 100 μm)	0,1 g/10 mm	59,3 %	0,687	0,5ml MeOH

S/ID: Tỷ lệ lượng mẫu (g)/Đường kính cột tách (mm)

Hiệu quả tuyệt đối = Tỷ lệ S/ID x Hiệu suất tách

Hiệu quả tách của vật liệu mới Polymeric GmBH AP 6 đạt tương đương với Diaion HP20 SS và Amberlite[®] XAD-7 [34]. Tuy nhiên vật liệu này vẫn đang trong quá trình thử nghiệm và phát triển thị trường, giá thành vẫn còn cao ~ 10 lần so với XAD-7 và ~ 5 lần so với Diaion HP20 SS.

Silica gel pha lưỡng tính Si-gel CN có hiệu quả tách rất tốt, nhưng giá quá cao (2.400 USD/kg), bằng ~ 20 lần so với silica gel thông thường và ~ 5 lần so với silica gel RP-C18, do đó loại vật liệu này không phải lựa chọn tối ưu để triển khai tách sản xuất nguyên liệu hóa dược có giá trị không lớn như EGCG (200 - 300 USD/kg 98 %).

Trong công nghiệp hóa dược ở các nước tiên tiến, trong khung cảnh đã đầu tư sẵn sàng các hệ thống liên hoàn, hoàn thiện và hiện đại để: 1 - Chung cất, cô và tinh

chế sản phẩm; 2 - Xử lý, thu hồi và tinh chế dung môi để sử dụng lại; Lựa chọn tối ưu lại là các phương pháp sử dụng Diaion HP20 SS hoặc Amberlite® XAD-7. Các vật liệu nhựa trao đổi ion này mặc dù có hiệu quả tách tuyệt đối thấp, tuy vậy có giá thấp (200 - 300 USD/kg), rất lâu phải thay thế cột tách để tái sinh (sau khoảng 200 - 500 lượt tách). Dung môi sử dụng là isopropanol, metanol đều dễ dàng tinh chế một bước bằng chưng cất. Sản phẩm sắc ký mặc dù khó cô cất (nhiều nước) trong Pilot, nhưng trong công nghiệp vấn đề này lại giải quyết được rất dễ dàng trên các hệ thống chưng cất chân không hoặc sấy chân không quy mô lớn.

Kết quả tính toán kê trong bảng 3.3 cho thấy Silica gel 60 Merck (15 - 40 μm) là lựa chọn tốt nhất để tách điều chế EGCG trên quy mô triển khai Pilot cỡ nhỏ và vừa (< 100 Kilogram/năm). Tuy nhiên, dù có giá rất rẻ (150 USD/kg) nhưng silica gel thông thường có hạn chế là nhanh phải tháo dỡ cột sắc ký để tái sinh lại (sau khoảng 20 - 50 lượt tách), sẽ hao hụt một phần nhỏ, điều này về lâu dài ảnh hưởng đến giá thành sản phẩm. Xét trong điều kiện triển khai tách sắc ký công nghiệp ở Việt Nam, thì đây chính là một cải tiến mới có ý nghĩa ứng dụng thực tế, giá thành hạ. Lần đầu tiên quy trình tách tinh chế EGCG bằng phương pháp sắc ký cột trên silica gel pha thường được nghiên cứu và từ đó triển khai công nghệ pilot đạt 100 lượt tách mà chưa mất hiệu lực.

Từ bảng 3.3 cho thấy dựa vào giá trị *hiệu quả tuyệt đối* thì lựa chọn tối ưu là sử dụng Diaion HP20 SS kết hợp với Sephadex LH 20. Luận án cùng thành công trong công nghệ tách tinh chế các catechin từ catechin tổng số áp dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC sử dụng hệ cột tách liên hợp Diaion HP20 SS và Sephadex LH 20 đạt hiệu quả cao.

3.2.2. Nghiên cứu và thử nghiệm quy trình công nghệ tách EGCG lượng lớn trên hệ thống sắc ký lỏng MP/HPLC Pilot

Silica gel 60 Merck (15 - 40 μm) biến tính bằng pha động sắc ký là lựa chọn tốt nhất cho tách sắc ký để thu nhận EGCG ở quy mô Pilot cỡ vừa và nhỏ (< 100 kg/năm),

do đó chúng tôi đã nghiên cứu khảo sát xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách Catechin tổng số chè xanh trên cột sắc ký MP/HPLC Silica gel 60 để xây dựng quy trình công nghệ sản xuất EGCG.

3.2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ dòng pha động đến quá trình tách sắc ký sản xuất EGCG

Kết quả sắc ký thử nghiệm cho thấy:

Tốc độ dòng lớn từ 60 ml/phút trở lên thì thời gian tiến hành sắc ký cho mỗi lượt tách được rút gọn xuống dưới 4 giờ/ca, tuy nhiên lượng dung môi tiêu tốn lớn và các pic sắc ký bị kéo dẫn rộng, có hiện tượng chồng chập giữa các đoạn chứa EGCG với các thành phần khác; Tốc độ dòng thấp < 45 ml/phút hiệu quả tách cao hơn, pic sắc ký sắc nét hơn, lượng dung môi tiêu tốn ít hơn, nhưng thời gian thực hiện một lượt tách lại quá dài, hơn 7 giờ/ca.

Ở tốc độ dòng 45 ml/phút, hiệu quả tách đạt tương đương như các trường hợp tốc độ thấp, thời gian một lượt tách sắc ký 5 giờ/ca. Như vậy, tốc độ dòng pha động 45 ml/phút là phù hợp nhất để tiến hành tách hiệu quả EGCG trên cột sắc ký Silica gel 60 ID 100 x L 520 mm.

3.2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ khối lượng mẫu đầu vào đến quá trình tách sắc ký sản xuất EGCG

Đã tiến hành nghiên cứu với các lượng mẫu 15 g, 30 g, 40 g, 50 g Catechin tổng số, cột tách có hiện tượng bị quá tải ở 40g và 50g, lượng EGCG tách ra bị lẫn nhiều EC và EGC trên cột sắc ký Silica gel 60 Merck kích thước 100 x 520 mm.

Các lượt tách sắc ký với các lượng mẫu từ 15 - 30 g Catechin tổng số; hiệu quả tách đạt rất tốt, tương đương với kết quả tách sắc ký khảo sát lựa chọn loại hình sắc ký và kết quả khảo sát lựa chọn tốc độ dòng pha động. Tuy nhiên, với lượng mẫu quá thấp, vẫn phải tiêu tốn một lượng dung môi lớn, thêm vào đó, thời gian tách giảm được cũng không đáng kể.

Như vậy, 30 g Catechin tổng số là lượng mẫu tối ưu để tách sắc ký điều chế EGCG trên cột sắc ký Silica gel 60 Merck kích thước 100 x 520 mm; tương ứng với tỷ lệ S/ID tối ưu là 30 g/100 mm.

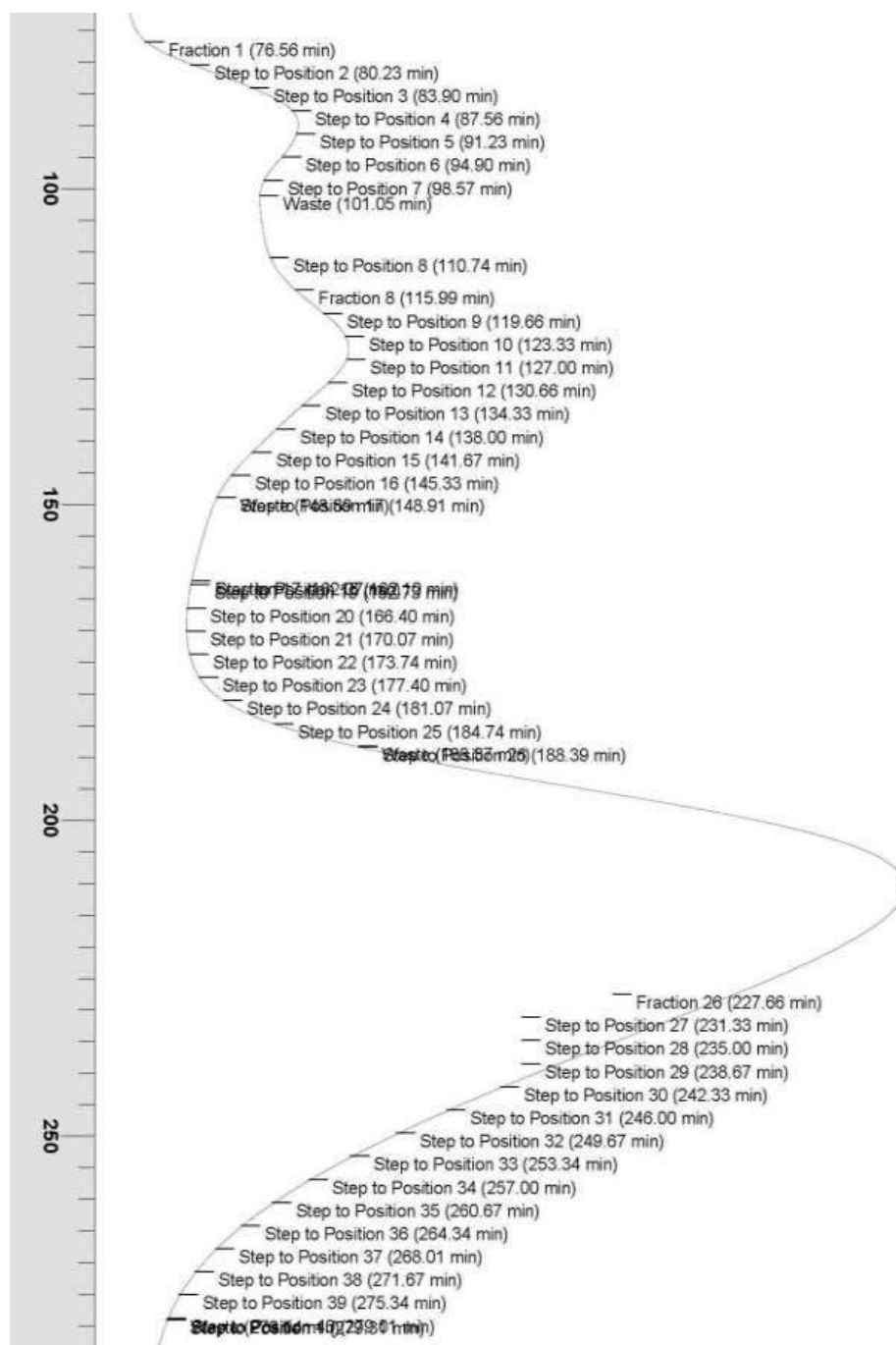
3.2.3. Nghiên cứu phân tách các catechin bằng phương pháp HPLC trên cột sắc ký phối hợp Diaion HP20 và Sephadex LH20

Từ kết quả nghiên cứu hiệu quả tách sắc ký EGCG trên các loại pha tĩnh khác nhau, kết hợp với tham khảo và cải tiến các phương pháp sắc ký tách catechin trên thế giới; đã xây dựng phương pháp công nghệ *“Phân lập các catechin từ chè xanh bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng cột sắc ký phối hợp Diaion HP20 SS và Sephadex LH20 với pha động là hệ dung môi ancol/nước”*.

Diaion HP20 SS là loại resin được sử dụng làm chất mang chế tạo vật liệu trao đổi ion cationic hoặc anionic; bản thân resin này có khả năng trao đổi anion và cation. Khi rửa giải hỗn hợp catechin trong alcol/nước qua cột sắc ký nạp chất mang này, sẽ gây ra sự khác biệt về ái lực bị hấp phụ/giải hấp phụ của catechin theo thứ tự khả năng phân ly axit các catechin trong dung môi [23, 24]. Từ đó hiệu quả phân tách các catechin được nâng cao khi hỗn hợp được rửa giải qua cột tách lọc gel Sephadex LH20.

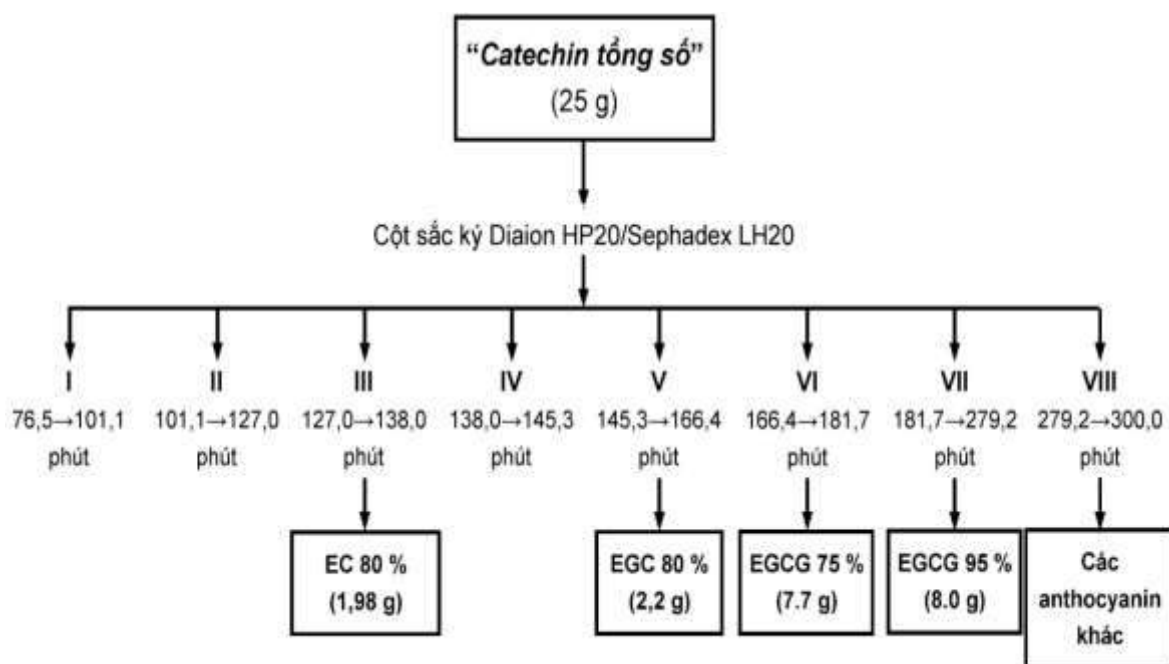
Kết quả nghiên cứu phân tách các catechin bằng phương pháp HPLC trên cột sắc ký phối hợp Diaion HP20 và Sephadex LH20

Các phân đoạn sắc ký phân tách từ catechin tổng số qua hệ thống cột sắc ký Diaion HP20 SS/Sephadex LH20 đã được kiểm tra lại bằng sắc ký lớp mỏng silica gel, được gộp lại và đánh số thứ tự theo thành phần chính. Sắc ký đồ HPLC-UV của quá trình tách các catechin trên hệ thống cột tách liên hợp Diaion HP20 SS/Sephadex LH20 (hình 3.7).

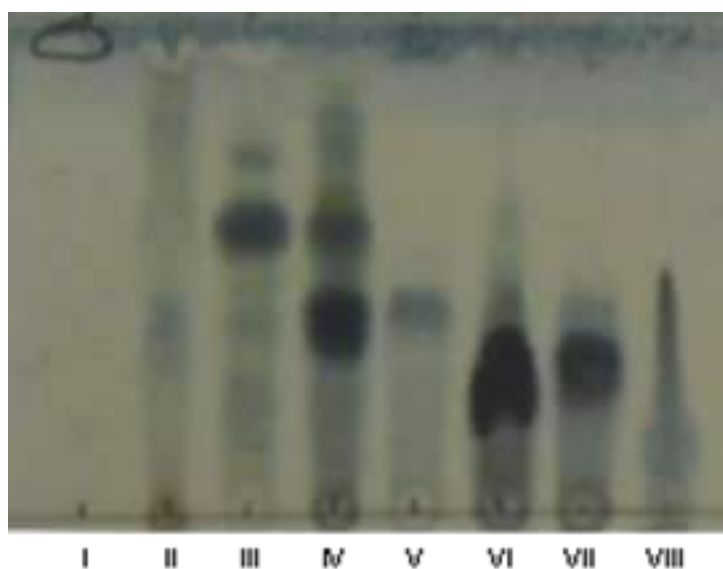


Hình 3. 7: Sắc ký đồ tách catechin trên cột Diaion HP20 SS/Sephadex LH20

Từ sắc ký đồ hình 3.7 thu được 8 phân đoạn được mô tả như sơ đồ hình 3.8. tiếp tục khảo sát 8 phân đoạn trên sắc ký bản mỏng được sắc ký bản mỏng hình 3.9.



Hình 3. 8: Sơ đồ phân tách catechin chè xanh: EC; EGC; EGCG



Hình 3. 9: Sắc ký lớp mỏng (TLC) các phân đoạn catechin

Kết quả từ 25g Catechin tổng số đã thu được 8 phân đoạn trong đó các phân đoạn III, V, VI và VII chứa các catechin chủ yếu của chè xanh. Các phân đoạn chứa EC, EGC và EGCG được loại kiệt dung môi ở nhiệt độ 55°C, áp suất 80 mbar; các chất này đã được tinh chế bằng cách kết tinh lại trong dung môi thích hợp.

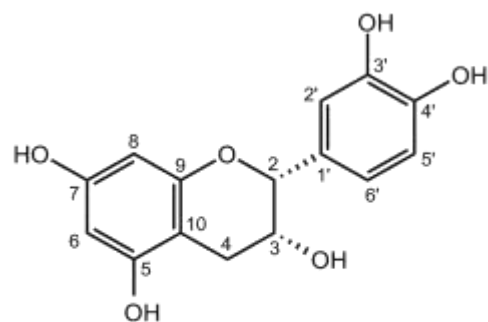
3.2.3.1. Đánh giá phân đoạn III

Phân đoạn III bao gồm các phân đoạn từ 127→138 phút, chứa thành phần chính epi-catechin (**EC**; $R_f \sim 0,56$) với hàm lượng đạt $> 80 \%$ (LC/MS); kết tinh lại trong ethanol thu được 1,98 g epi-catechin tinh thể hình kim, màu trắng; Phổ ESI-MS $m/z = 290,5$ (M^+) tương ứng với khối lượng phân tử $M=290$ đvC; CTPT là $C_{15}H_{14}O_6$; điểm nóng chảy $t_{nc} = 242^\circ C$.

Phổ 1H -NMR (hình 3.10) xuất hiện các tín hiệu proton của 1 vòng thơm độc lập dạng ABX tại 6,89 ppm (1H, d, 1 Hz, H-2'); 6,66 (1H, mbr, H-5') và 6,65 (1H, t, 3 Hz, H-6'). Ngoài ra, phổ 1H -NMR còn chỉ ra 2 proton methine vòng thơm tại 5,89 ppm (1H, d, 2,5 Hz, H-6) và 5,72 (1H, d, 2,5 Hz, H-8). Tín hiệu của 2 proton methine mang oxygen cũng xuất hiện ở 4,74 ppm (1H, brs, H-2) và 4,01 ppm (1H, mbr, H-3), đây là các tín hiệu đặc trưng cho proton tồn tại ở dạng cis. Do tương tác với proton H-3, 2 tín hiệu proton methylene tại vị trí H-4 bị tách thành duplet kép ở 2,49 ppm (H-4a) và 2,68 ppm (H-4b).

Phổ ^{13}C -NMR (hình 3.11) và DEPT (hình 3.12) xuất hiện 15 tín hiệu carbon, trong đó có 1 carbon methylene (28,2 ppm, C-4), 7 carbon methine và 7 carbon thơm bậc 4. Trong số 7 tín hiệu methine carbon, 5 tín hiệu trong khoảng 94-117 ppm thuộc về 5 carbon methine thơm và 2 tín hiệu (δ_C 78,07 ppm và 64,95 ppm) thuộc về 2 carbon mang oxygen. Trong 7 tín hiệu carbon thơm bậc 4, có 5 tín hiệu ở trường thấp trong khoảng 144-157 ppm, chứng tỏ các tín hiệu này phải thuộc về carbon mang oxygen.

Từ các kết quả phân tích dữ liệu phổ (bảng 3.4), kết hợp với phân tích phổ HSQC và HMBC, ta có thể dự đoán hợp chất trong phân đoạn III thuộc về nhóm chất flavan. Kết hợp với so sánh các tài liệu tham khảo, có thể khẳng định, hợp chất này có cấu trúc hoàn toàn phù hợp với cấu trúc (2*R*,3*R*)-2-(3,4-dihydroxy-phenyl)chroman-3,5,7-triol (**EC**).

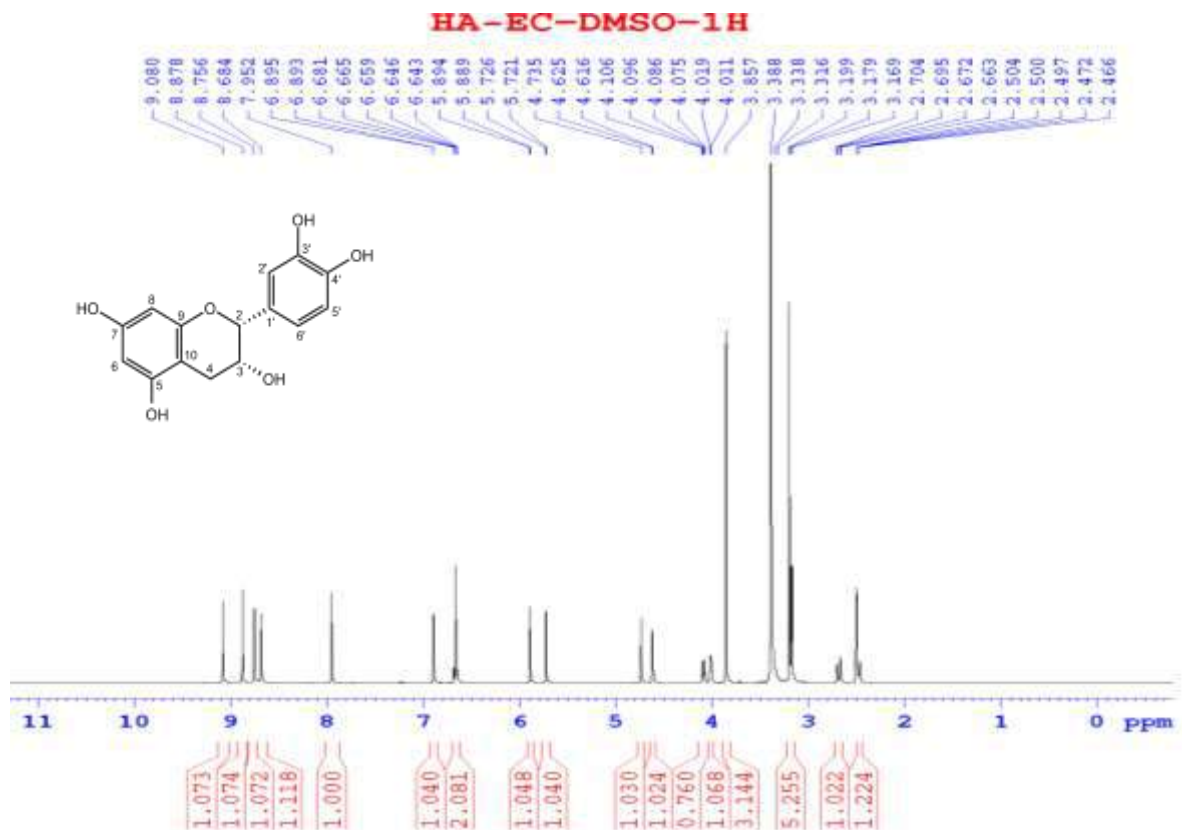


epi-Catechin
(2*R*,3*R*)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)chroman-3,5,7-triol

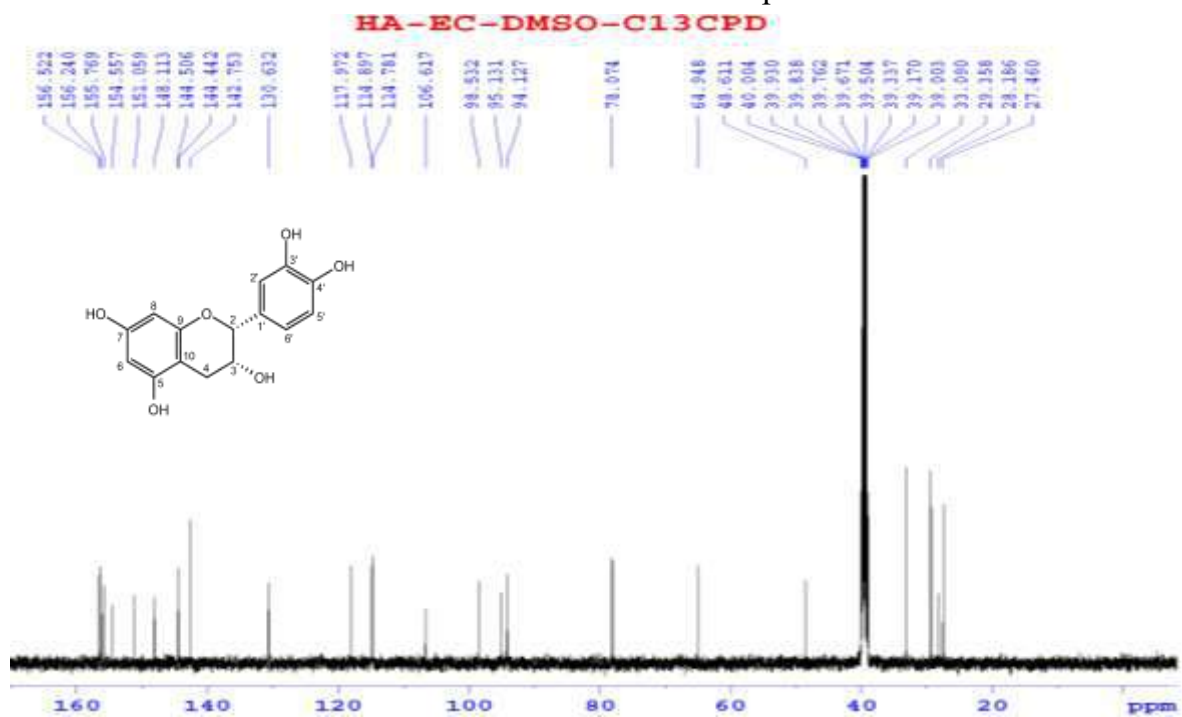
Bảng 3. 4: Độ chuyển dịch hóa học của epi-Catechin

Stt	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	4,74 brs	78,07 d
3	4,01 mbr	64,95 d
4	Ha: 2,49 m (overlap DMSO- d_6) Hb: 2,68 dd J = 4,5 Hz; 16 Hz	28,19 t
5	- - -	156,52 s
6	5,89 d J = 2,5 Hz	95,13 d
7	- - -	156, 24 s
8	5,72 d J = 2,5 Hz	94,13 d
9	- - -	155,77 s
10	- - -	98,53 s
1'	- - -	130,63 s
2'	6,89 d J = 1 Hz	114,90 d
3'	- - -	144,44 s
4'	- - -	144.51 s
5'	6,66 mbr	114,78 d
6'	6,65 t J = 3 Hz	117,97 d

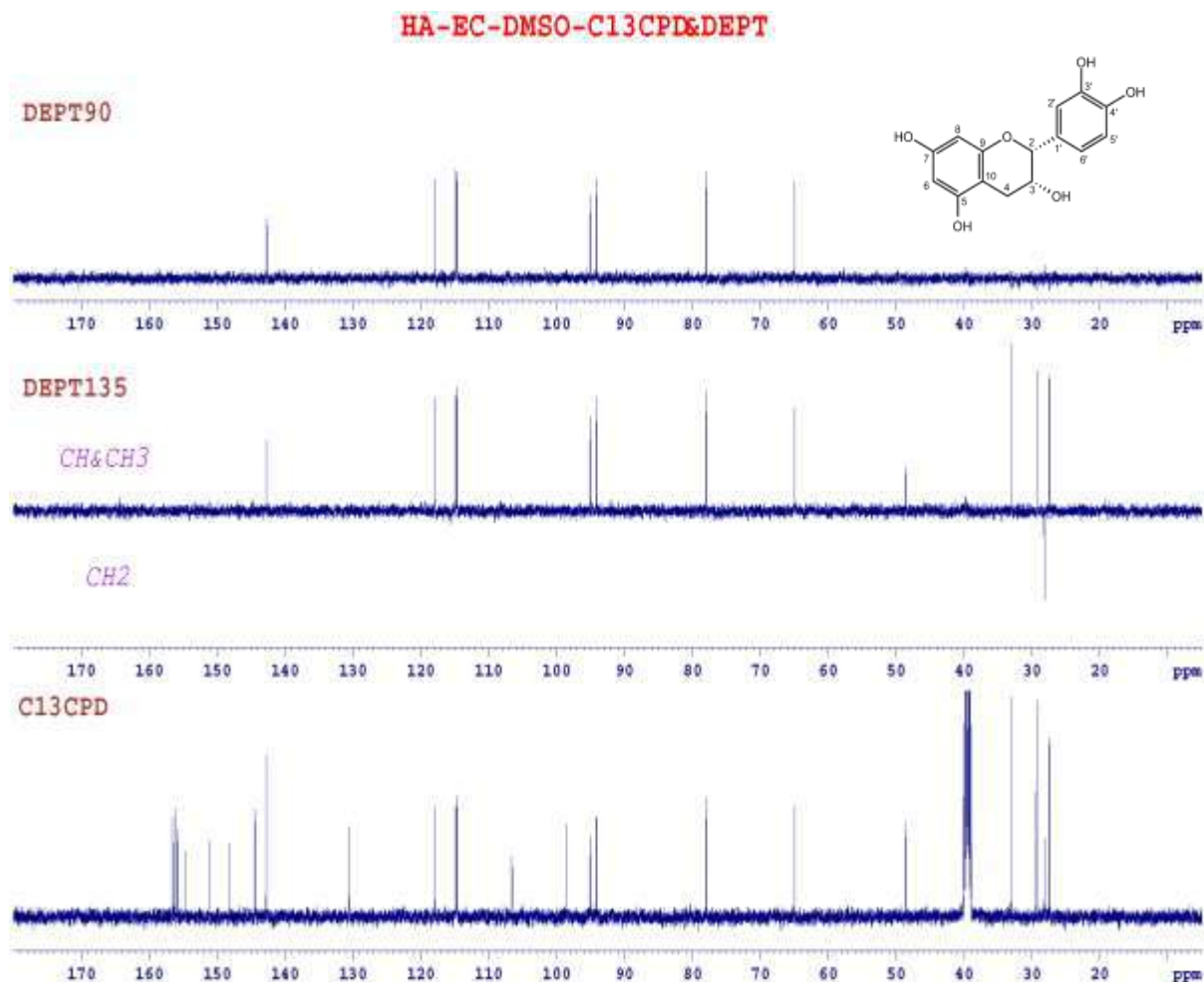
Dung môi DMSO- d_6 ; Nội chuẩn tetramethyl silan



Hình 3. 10: Phổ ^1H -NMR của epi-Catechin



Hình 3. 11: Phổ ^{13}C -NMR của epi-Catechin



Hình 3. 12: Phổ DEPT của epi-Catechin

3.2.3.2. Đánh giá phân đoạn V

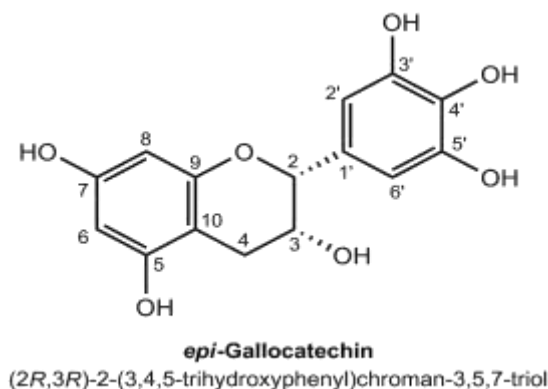
Phân đoạn V bao gồm các phân đoạn từ 145,3→166,4 phút, thành phần chính là epi-gallocatechin (EGC; $R_f \sim 0,4$), hàm lượng đạt 75 %; hợp chất này khó kết tinh trong ancol và nước; đã tinh chế lại trên cột sắc ký nhanh silica gel (FC) thu được 2,2 g EGC sạch-tinh thể hình kim màu trắng ngà; Phổ ESI-MS $m/z = 306,7(M^+)$ tương ứng với khối lượng phân tử $M=306$ đvC; CTPT $C_{15}H_{14}O_7$; điểm nóng chảy $t_{nc}=276^\circ C$.

Phổ 1H -NMR (hình 3.13) cho thấy hai tín hiệu proton của 1 vòng thơm độc lập tại 6,38 ppm (2H, brs, H-2', 6'). Ở trường rất thấp, tại 8,69 ppm (brs, ArOH-3', 5') và 7,92 ppm (ArOH-4') là các tín hiệu của nhóm hydroxyl gắn với vòng thơm. Ngoài ra,

phổ ^1H -NMR cũng chỉ ra 2 proton methine vòng thơm tại 5,88 ppm (1H, d, 2 Hz, H-6) và 5,72 (1H, d, 2 Hz, H-8); 2 proton methine mang oxygen ở 4,66 ppm (1H, brs, H-2) và 3,99 ppm (1H, d, 2 Hz, H-3) và 2 tín hiệu proton methylene ở 2,49 ppm (H-4a) và 2,68 ppm (H-4b).

Phổ ^{13}C -NMR (hình 3.14) và DEPT (hình 3.15) cũng cho thấy 15 tín hiệu carbon, trong đó có 1 carbon methylene (28,0 ppm, C-4), 6 carbon methine và 8 carbon thơm bậc 4. Trong số 6 tín hiệu methine carbon, 4 tín hiệu trong khoảng 94-106 ppm thuộc về 4 carbon methine thơm và 2 tín hiệu (δ_{C} 78,4 ppm và 65,3 ppm) thuộc về 2 carbon mang oxygen. Trong 8 tín hiệu carbon thơm bậc 4, có 6 tín hiệu ở trường thấp trong khoảng 132-157 ppm, chứng tỏ các tín hiệu này phải thuộc về carbon mang oxygen.

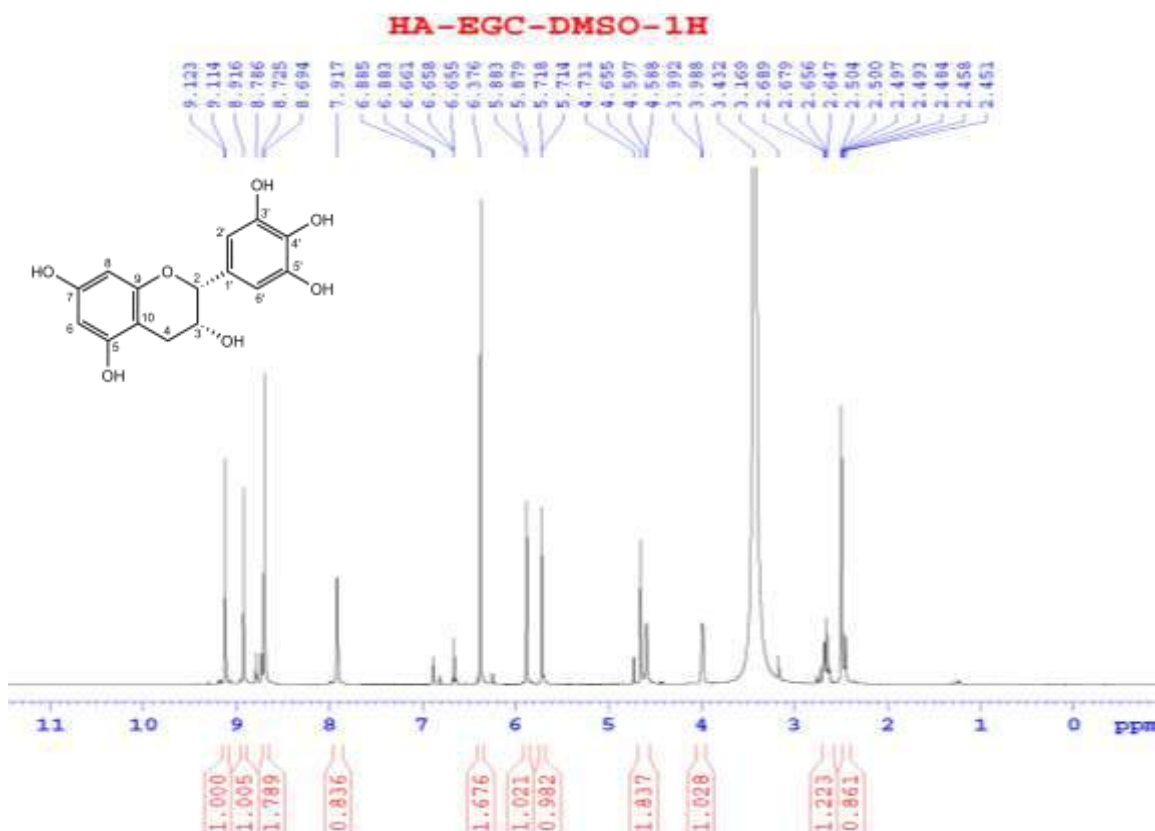
Từ độ chuyển dịch hóa học của epi-Gallocatechin (bảng 3.5) so sánh các dữ liệu phổ trên với hợp chất EC cho thấy có sự tương đồng, vì vậy có thể dự đoán hợp chất trong phân đoạn V cũng thuộc nhóm flavan. Kết hợp với tư liệu phổ tham khảo, có thể khẳng định, hợp chất này có cấu trúc hoàn toàn phù hợp với cấu trúc (2R,3R)-2-(3,4-trihydroxy-phenyl)chroman-3,5,7-triol (EGC). Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1D và 2D NMR cho thấy cấu trúc phù hợp với (2R,3R)-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3,5,7-triol (EGC).



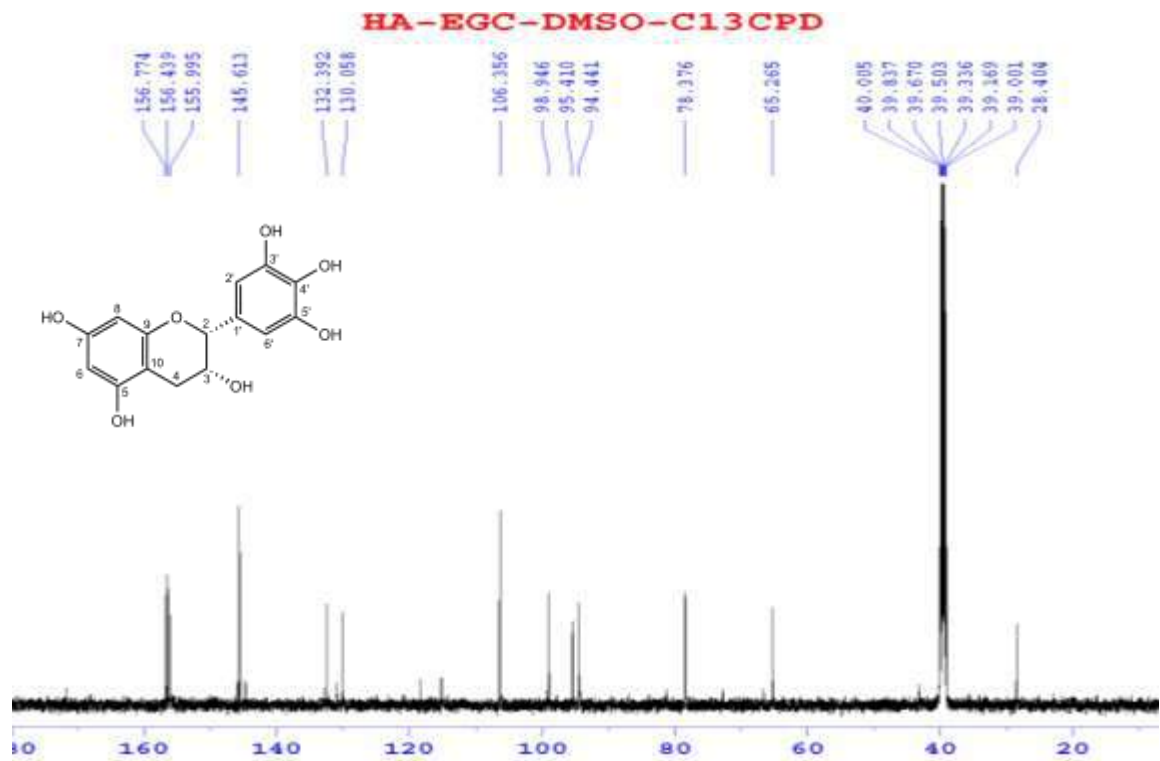
Bảng 3. 5: Độ chuyển dịch hóa học của epi-Gallocatechin

Stt	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	4,66 brs	78,38 d
3	3,99 d J = 2 Hz	65,27 d
4	2,47 dd J = 7 Hz, 16,5 Hz 2,67 dd J = 5 Hz, 16,5 Hz	28,04 t
5	9,11 brs (Ar-OH, C5)	156,44 s
6	5,88 d J = 2 Hz	95,41 d
7	8,92 brs (Ar-OH, C5)	156,77 d
8	5,72 d J = 2 Hz	94,44 d
9	- - -	155,99 s
10	- - -	98,95 s
1'	- - -	130,06 s
2' & 6'	6,38 brs (2 H)	106,36 d (2 C)
3' & 5'	8,69 brs (2 Ar-OH, C3' & C5')	145,61 s (2 C)
4'	7,92 brs (Ar-OH, C4')	132,39 s

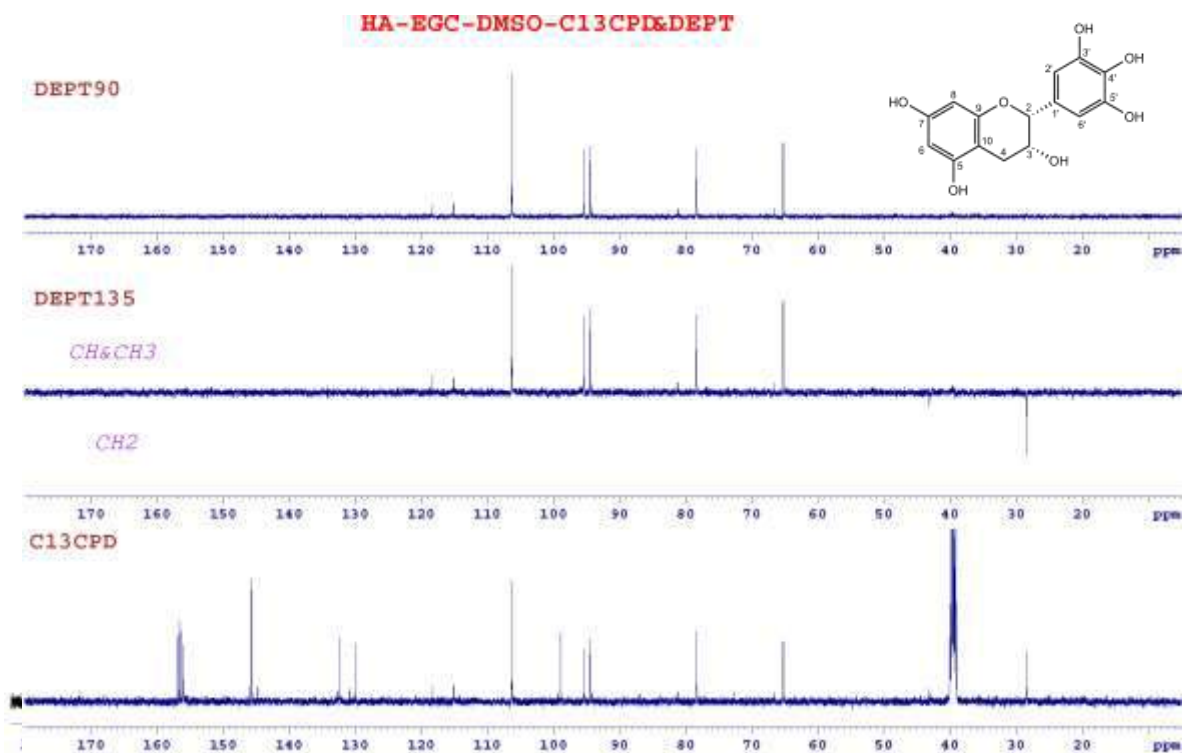
Dung môi DMSO- d_6 ; Nội chuẩn tetramethyl silan



Hình 3. 13: Phổ 1H -NMR của epi-Galloatechin



Hình 3. 14: Phổ ^{13}C -NMR của epi-Galloatechin



Hình 3. 15: Phổ DEPT của epi-Galloatechin

3.2.3.3. Đánh giá phân đoạn VI và VII

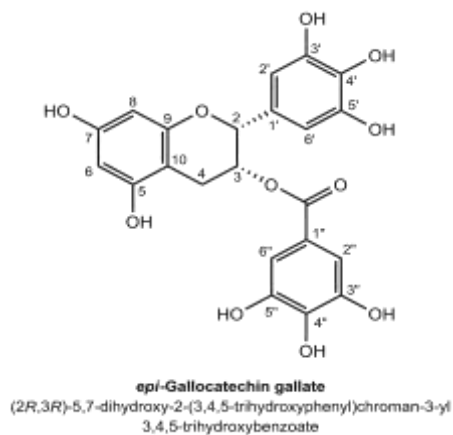
Phân đoạn VI và VII gồm các phân đoạn có thời gian lưu lần lượt là 166,4→181,1 phút và 181,1→279,1 phút có thành phần chủ yếu epi-gallocatechin gallate (EGCG) với hàm lượng 75 - 95 %; từ các phân đoạn này đã tinh chế EGCG bằng cách kết tinh lại trong dung dịch axit citric 0,05 % sau đó làm đông khô tạo sản phẩm. Kết quả đã thu được 13,7 g EGCG: tinh thể hình kim màu trắng hồng; Phổ ESI-MS $m/z = 458,7$ (M^+) tương ứng với khối lượng phân tử $M=458$ đvC; CTPT là $C_{22}H_{18}O_{11}$; điểm nóng chảy $t_{nc}=216^{\circ}C$.

Từ các dữ liệu phổ 1H -NMR (hình 3.16), ^{13}C -NMR (hình 3.17) và DEPT (hình 3.18), ta có thể dự đoán hợp chất chính trong phân đoạn VI và VII cũng có bộ khung flavan.

Phổ 1H -NMR(hình 3.16) cho thấy tín hiệu của 2 proton thơm *meta* thuộc vòng A tại 5,93 (1H, *d*, 2 Hz, H-6) và 5,83 ppm (1H, *d*, 2 Hz, H-8). Các tín hiệu proton thơm còn lại tại 6,41 ppm (2H, *brs*, H-2', 6') và 6,81 ppm (2H, *brs*, H-2'', 6'') thuộc về các proton thơm vòng B và gốc galloy. Các tín hiệu proton của nhóm hydroxyl cũng xuất hiện tại trường rất thấp từ 8,6-9,3 ppm. Hai tín hiệu proton methine đỉnh tù tại 4,95 và 5,37 ppm và 2 tín hiệu proton methylene tại 2,66 và 2,93 ppm (H-4a và H-4b) đặc trưng cho các proton thuộc vòng C.

Phổ ^{13}C -NMR (hình 3.17) và DEPT (hình 3.18) cho thấy 22 tín hiệu carbon, trong đó có 1 carbon methylene, 8 carbon methine và 13 carbon bậc 4. Ở trường rất thấp có 1 tín hiệu carbon tại 165,3 ppm, đây là tín hiệu đặc trưng của nhóm carbonyl không gắn với vòng thơm. Ngoài ra, các tín hiệu carbon cũng cho thấy sự hiện diện của gốc galloy, vòng thơm A, B và vòng C của khung flavan.

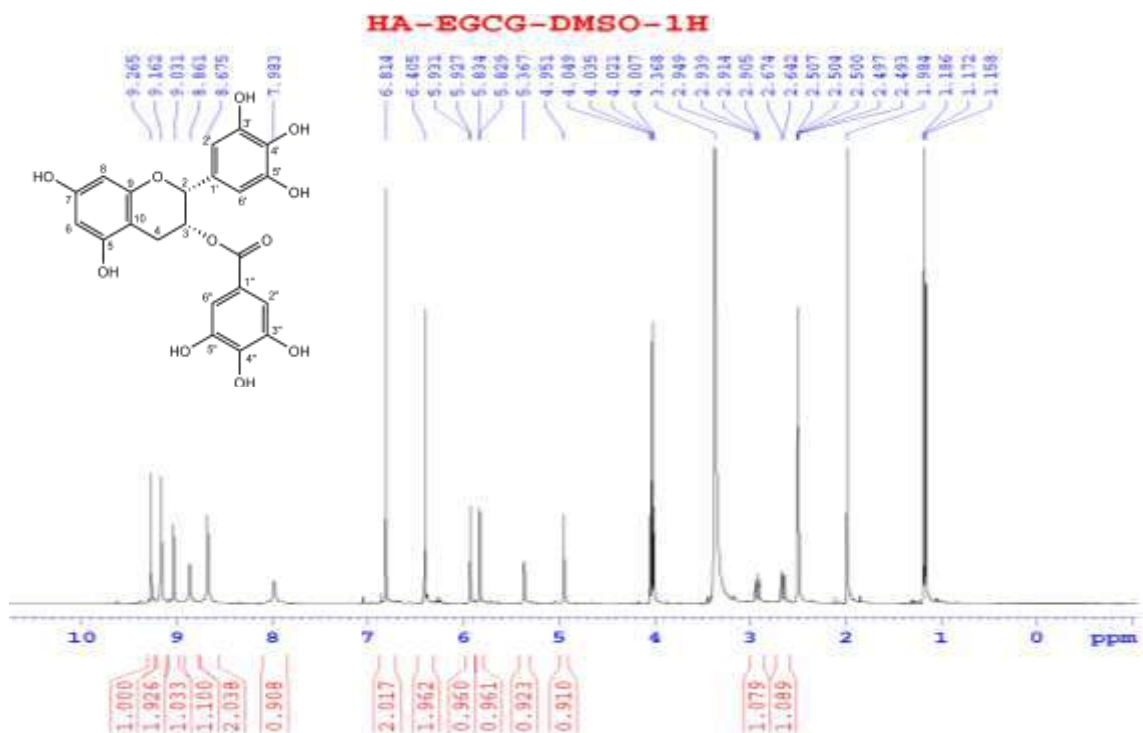
Từ phân tích dữ liệu phổ (bảng 3.6) cũng như so sánh với các phổ của hợp chất III, V và tư liệu tham khảo, có thể khẳng định hợp chất trên có cấu trúc phù hợp với (2*R*,3*R*)-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3,5,7-triol (EGCG).



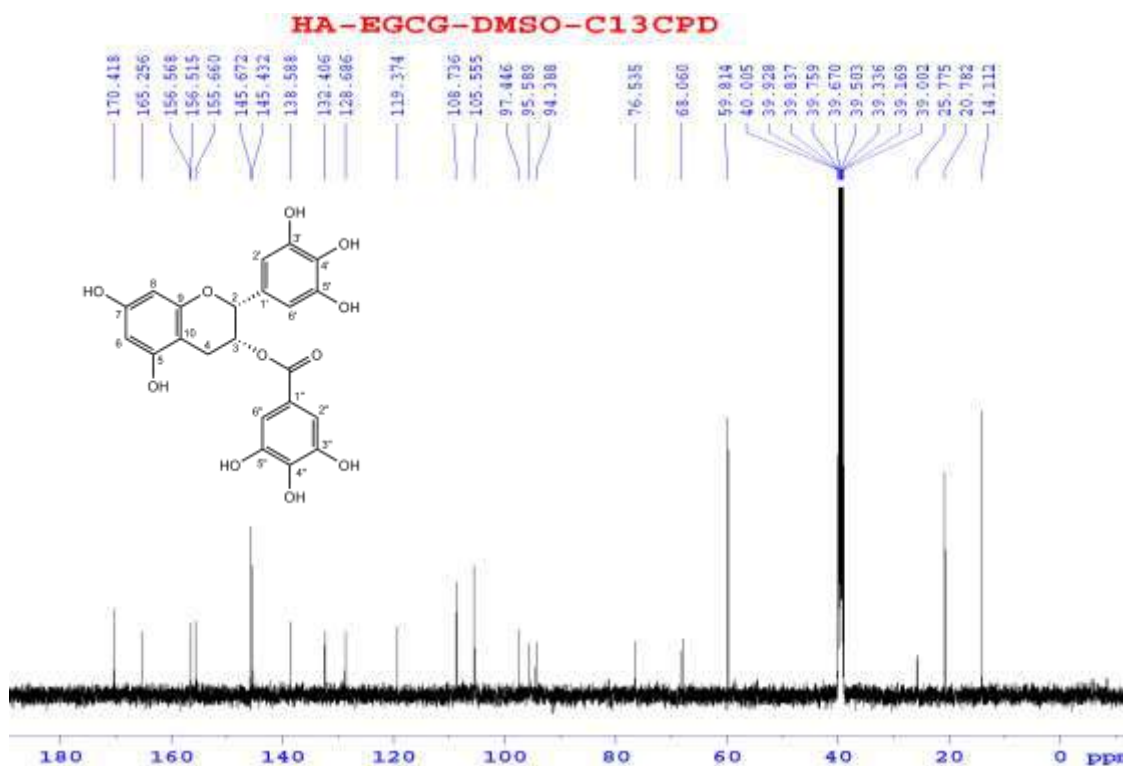
Bảng 3. 6: Độ chuyển dịch hóa học của *epi-Gallocatechin gallate*

Stt	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	4,95 <i>brs</i>	76,54 <i>d</i>
3	5,37 <i>brs</i>	68,06 <i>d</i>
4	Ha: 2,66 <i>d</i> $J = 17,5$ Hz Hb: 2,93 <i>dd</i> $J = 5$ Hz; 17,5 Hz	25,78 <i>t</i>
5	9,27 <i>brs</i> (Ar-OH, C5)	156,52 <i>s</i>
6	5,93 <i>d</i> $J = 2$ Hz	95,59 <i>d</i>
7	9,03 <i>brs</i> (Ar-OH, C7)	156,57 <i>s</i>
8	5,83 <i>d</i> $J = 2,5$ Hz	94,39 <i>d</i>
9	- - -	155,66 <i>s</i>
10	- - -	97,45 <i>s</i>
1'	- - -	128,69 <i>s</i>
2' & 6'	6,41 <i>brs</i> (2 H)	105,56 <i>d</i> (2 C)
3' & 5'	8,68 <i>brs</i> (2 Ar-OH, C3' & C5')	145,67 <i>s</i> (2 C)
4'	7,98 <i>brs</i> (Ar-OH, C4')	132,41 <i>s</i>
-COO-	- - -	165,26 <i>s</i>
1''	- - -	119,37 <i>s</i>
2'' & 6''	6,81 <i>brs</i> (2 H)	108,74 <i>d</i> (2 C)
3'' & 5''	9,16 <i>brs</i> (2 Ar-OH, C3'' & C5'')	145,43 <i>s</i> (2 C)
4''	8,86 <i>brs</i> (Ar-OH, C4'')	138,59 <i>s</i>

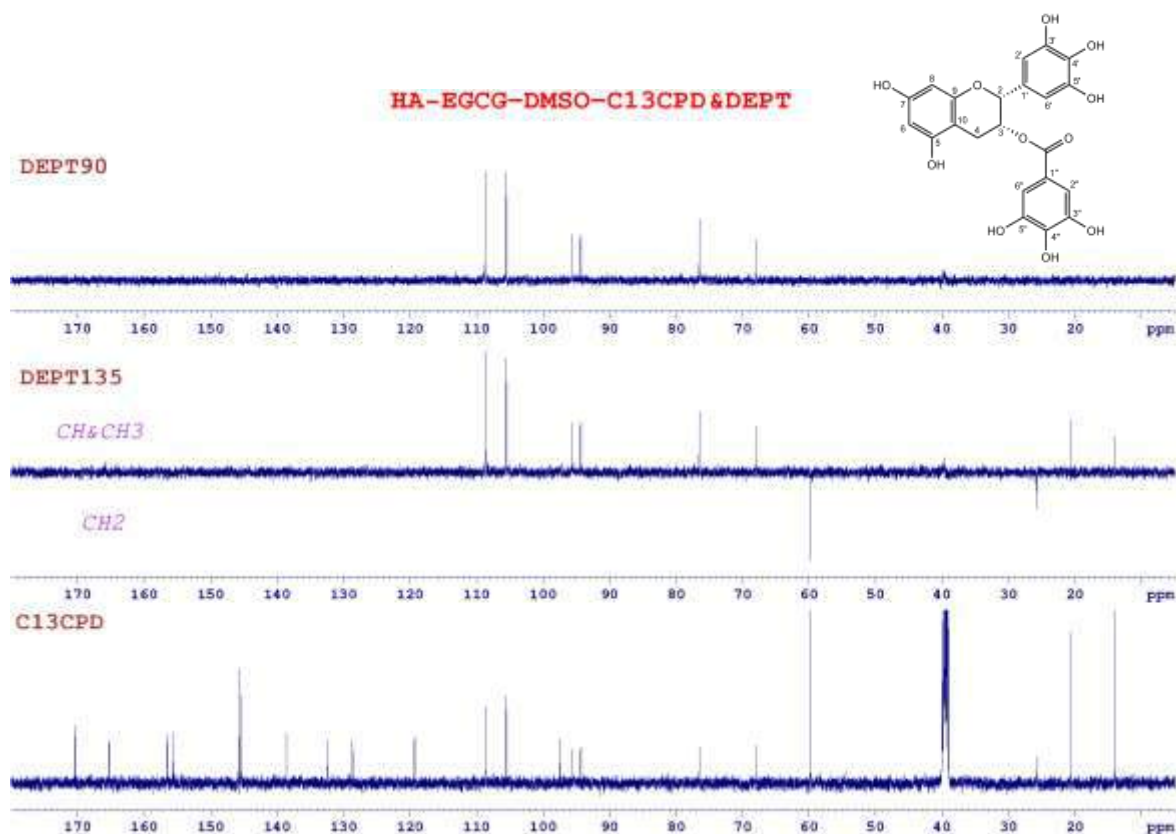
Dung môi DMSO-*d*₆; Nội chuẩn tetramethyl silan



Hình 3. 16: Phổ ¹H-NMR của epi-Gallocatechin gallate



Hình 3. 17: Phổ ¹³C-NMR của epi-Gallocatechin gallate



Hình 3. 18: Phổ DEPT của epi-Gallocatechin gallate

Đây là lần đầu tiên, kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp sử dụng hệ thống cột tách sắc ký Diaion HP20 kết nối trực tuyến với cột sắc ký lọc gel Sephadex LH20 được áp dụng và triển khai vào thử nghiệm sản xuất công nghiệp ở Việt Nam. Công nghệ mới đã chứng tỏ hiệu quả phân tách tốt EGCG và các catechin chè xanh với sản phẩm thu được có độ sạch cao > 95%. Phương pháp có ưu điểm thời gian phân tách sắc ký ngắn với hiệu suất tách cao, tiết kiệm được thời gian, dung môi và đặc biệt sử dụng được hệ dung môi ethanol/nước là dung môi thông dụng, không độc hại trong công nghiệp thực phẩm, hoàn toàn phù hợp để áp dụng vào sản xuất trong công nghiệp [4].

Mặc dù các catechin có hàm lượng rất cao trong chè xanh, nhưng việc phân lập riêng biệt và ứng dụng các hoạt chất này gặp rất nhiều khó khăn do chúng có các cấu trúc gần giống nhau và quá dễ bị oxy hóa. Theo KM.Dzemukaze và cộng sự để định lượng, phân lập và triển khai áp dụng rộng rãi được catechin chè xanh, quan trọng nhất là làm giảm khả năng bị oxy hóa của các catechin do enzym, và tác nhân môi trường như ánh sáng, hàm lượng oxy...[4], [10], [103].

3.3. BÁN TỔNG HỢP DẪN XUẤT O-ACETYL CỦA CÁC CATECHIN CHÈ XANH VÀ ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ SUY GIẢM HOẠT TÍNH DỌN GỐC TỰ DO

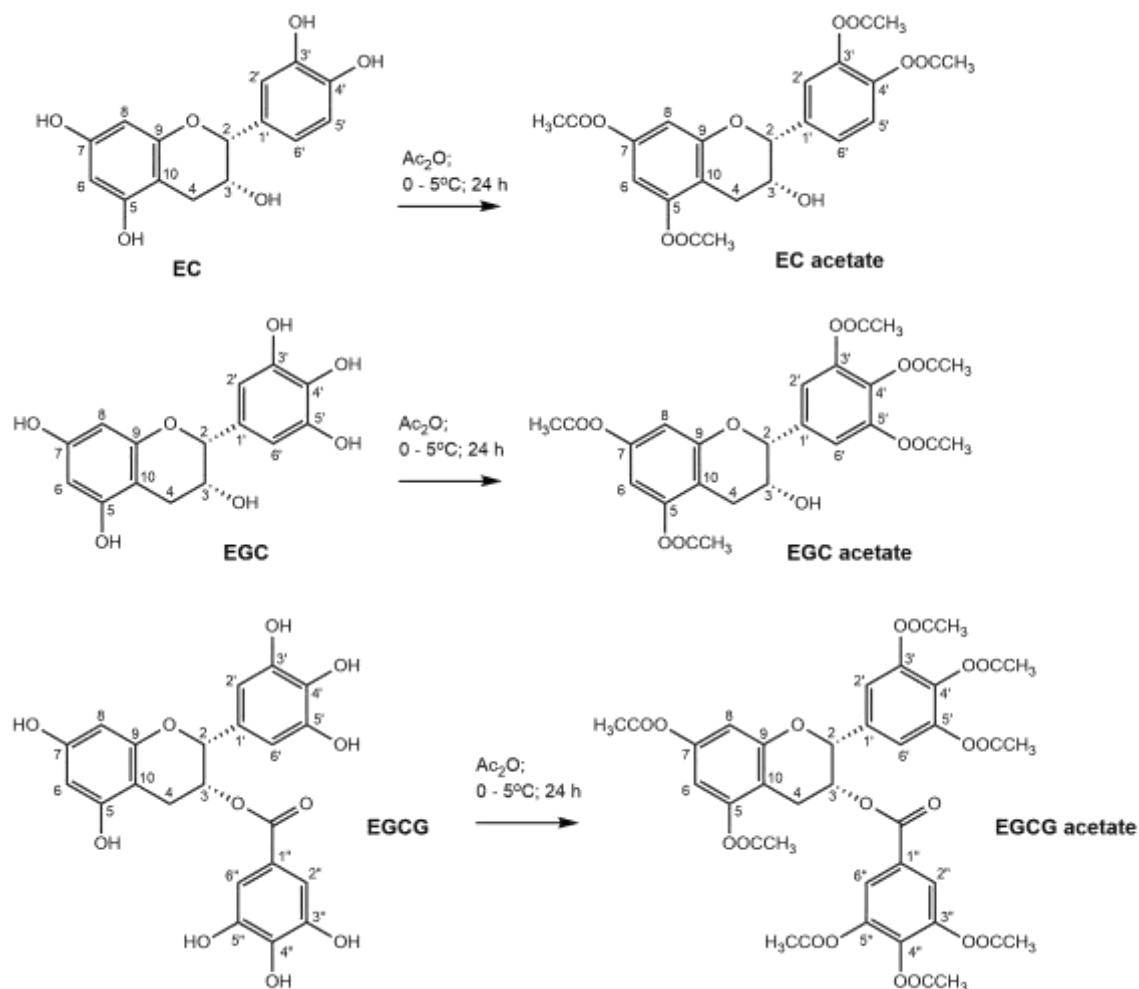
3.3.1. Bán tổng hợp các dẫn xuất acetyl của catechin để đánh giá mức độ suy giảm hoạt tính

Hoạt tính dọn các gốc tự do của các catechin chè xanh cao hơn hẳn các chất chống ôxy hóa vitamin C, vitamin E, resveratrol... [49]. Tuy nhiên các catechin này rất dễ bị phân hủy bởi nhiệt độ và ánh sáng, làm cho khả năng ứng dụng của chúng bị giới hạn rất nhiều.

Những nghiên cứu gần đây cho thấy rằng các dẫn xuất của các catechin có khả năng ứng dụng rộng rãi hơn bởi tính bền cao hơn. Thậm chí một số dẫn xuất của các catechin chè xanh xuất hiện hoạt tính mới mạnh hơn EGCG, chẳng hạn như dẫn xuất methyl của catechin có hoạt tính chống dị ứng cao hơn [71], dẫn xuất acetyl của catechin có hoạt tính ức chế protein mạnh hơn [69, 70], dẫn xuất glycosyl của catechin khó bị ôxy hóa chuyển màu hơn (anti-browning) [72]. Do đó, ngày càng nhiều nghiên cứu tập trung vào cải biến các catechin nhằm tăng độ bền và khả năng ứng dụng của chúng. Trong luận án thực hiện acyl hóa các chất EC, EGC và EGCG nhằm tạo ra các dẫn xuất acetyl của catechin, khảo sát đánh giá mức độ suy giảm khả năng bị ôxy hóa của các dẫn xuất này.

Phản ứng bán tổng hợp được thực hiện với những điều kiện phản ứng đơn giản, dễ thực hiện. Hóa chất sử dụng an toàn, dễ kiểm. Không sử dụng những hóa chất độc hại như pyridin [9], N,N- dimethyl amino pyridin [10]. Đây là ưu điểm lớn của phản ứng này. Từ đó khảo sát đánh giá mức độ suy giảm khả năng bị ôxy hóa của các dẫn xuất này.

Phản ứng acyl hóa các catechin đi từ nguyên liệu đầu là EC, EGC và EGCG (sản phẩm được tách, tinh chế trên cột sắc ký) được acyl hóa bằng anhydrit acetic ở nhiệt độ 0-5°C trong 24h. Theo sơ đồ phản ứng sau:



Hình 3. 19: Sơ đồ phản ứng acyl hóa các catechin

Các sản phẩm của phản ứng được tách và tinh chế trên sắc ký cột nhanh:

+ Phân đoạn chứa chất EC acetate được rửa giải ra với pha động sắc ký là $CH_3OH/CHCl_3$ gradient từ 0% đến 5% metanol theo thể tích. Sau đó phân đoạn chất này được tinh chế lại với hệ pha động n-hecxa/EtOAc - 2 : 1 (v/v). Phân đoạn chứa EC acetate tinh khiết được cô loại dung môi ở nhiệt độ $55^\circ C$, áp suất 80 mbar và kết tinh lại trong dung môi EtOAc. Tinh thể EC acetate thu được hình kim, màu trắng.

+ Làm tương tự như quá trình tinh chế phân đoạn chứa chất acyl EC với phân đoạn chứa chất acyl EGC thu được tinh thể acyl EGC hình kim, màu trắng.

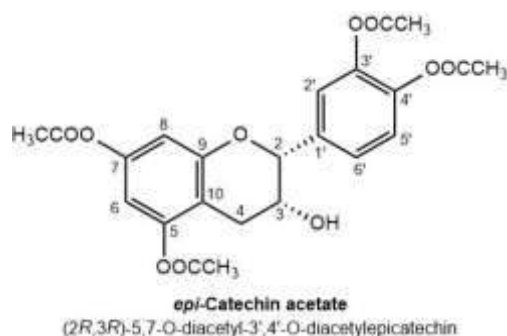
+ Phân đoạn chứa chất EGCG acetate thu được tinh thể EGCG acetate hình kim, màu hồng nhạt.

Cấu trúc của các dẫn xuất acetyl đã được khẳng định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1D và 2D NMR trên máy Bruker AVANCE 500MHz tại Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Độ chuyển dịch hóa học (δ ppm) được xác định theo nội chuẩn Tetrametylsilan và tín hiệu dung môi đo phổ.

So sánh dữ liệu phổ *epi*-catechin/*epi*-gallocatechin/*epi*-gallocatechin gallate với dữ liệu phổ *epi*-gallocatechin acetate/*epi*-gallocatechin gallate, O-octaacetyl, ta thấy có sự tương đồng, ngoại trừ sự biến mất của các tín hiệu proton của nhóm hydroxyl và thay vào đó là sự xuất hiện của các proton methyl không gắn vòng thơm (tín hiệu đặc trưng δ_H 2,3 ppm và δ_C 21 ppm) cùng tín hiệu của nhóm carbonyl không gắn trực tiếp với vòng thơm (tín hiệu đặc trưng δ_C 166-170 ppm). Với sự thay đổi tín hiệu như trên có thể dự đoán việc bán tổng hợp dẫn xuất acetyl của các catechin chè xanh *epi*-catechin, *epi*-gallocatechin và *epi*-gallocatechin gallate đã thành công.

3.3.1.1. Hợp chất *epi*-Catechin acetate (I)

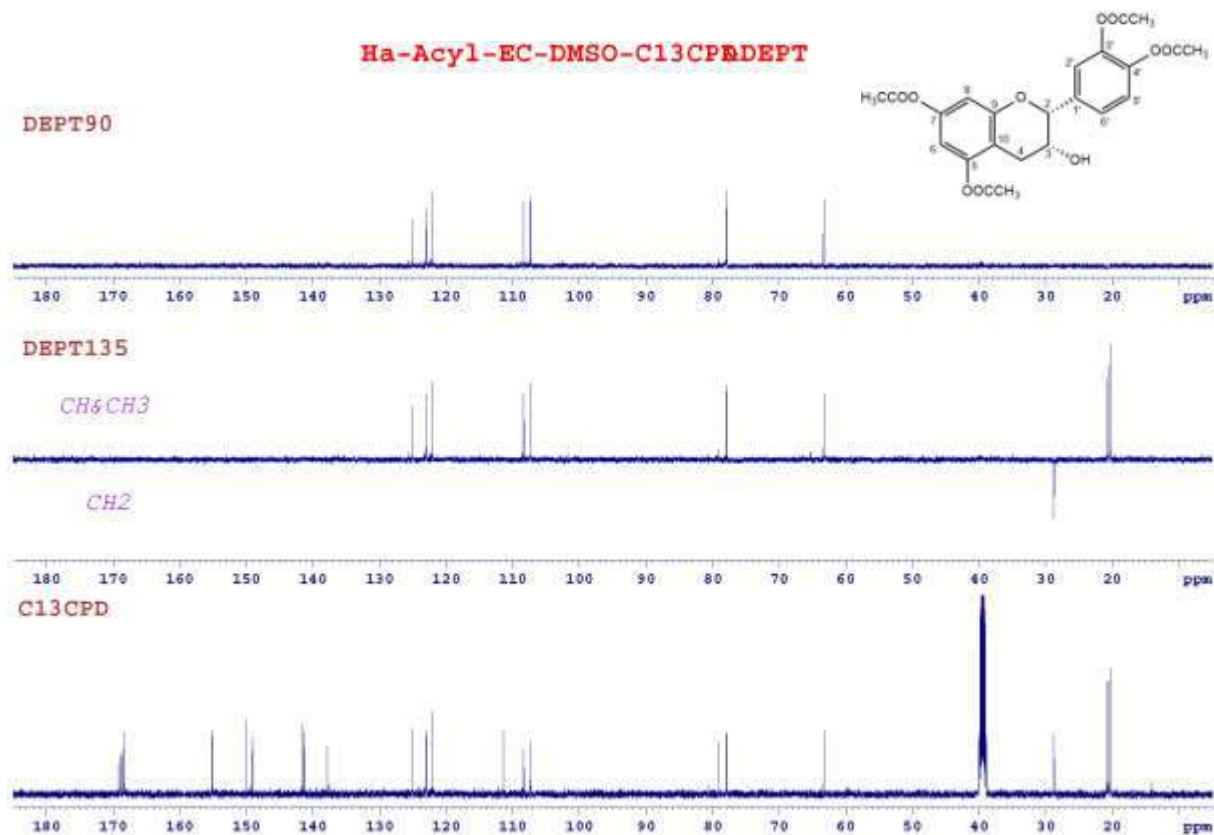
Hợp chất I kết tinh lại trong ethyl acetate, tinh thể hình kim màu trắng, điểm nóng chảy 142 - 144°C, phổ ESI-MS $m/z = 458,5$ (M^+) tương ứng với khối lượng phân tử $M=458$ đvC; CTPT là $C_{23}H_{22}O_{10}$. Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1D NMR (hình 3.20, hình 3.21, hình 3.22, bảng 3.7) và 2D NMR cho thấy cấu trúc hoàn toàn phù hợp với (2*R*,3*R*)-5,7-O-diacetyl-3',4'-O-diacetylepicatechin (EC acetate).



Bảng 3. 7: Độ chuyển dịch hóa học (δ) của *epi-Catechin acetate*

Stt	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	5,17 <i>d J</i> = 5 Hz	77,93 <i>d</i>
3	4,19 <i>m</i>	63,35 <i>d</i>
4	Ha: 2,6 <i>m</i> Hb: 2.8 <i>m</i>	28,81 <i>t</i>
5	- - -	149,98 <i>s</i>
6	6,62 <i>d J</i> = 2,5 Hz	107,43 <i>d</i>
7	- - -	149,07 <i>s</i>
8	6,57 <i>d J</i> = 2,5 Hz	108,43 <i>d</i>
9	- - -	111,46 <i>s</i>
10	- - -	79,19 <i>s</i>
1'	- - -	137,91 <i>s</i>
2'	7,41 <i>d J</i> = 2 Hz	122,16 <i>d</i>
3'	- - -	141,59 <i>s</i>
4'	- - -	141,36 <i>s</i>
5'	7,28 <i>m</i>	123,05 <i>d</i>
6'	7,37 <i>d J</i> = 2 Hz	125,16 <i>d</i>
C=O (C5)	- - -	155,24 <i>s</i>
C=O (C7)	- - -	168,36 <i>s</i>
C=O (C3')	- - -	168,54 <i>s</i>
C=O (C4')	- - -	169,05 <i>s</i>
CH ₃ (COO-C5)	2,24 <i>br</i> (3H)	20,34 <i>q</i>
CH ₃ (COO-C7)	2,28 <i>br</i> (3H)	20,38 <i>q</i>
CH ₃ (COO-C3')	2,29 <i>br</i> (3H)	20,49 <i>q</i>
CH ₃ (COO-C4')	2,30 <i>br</i> (3H)	20,49 <i>q</i>

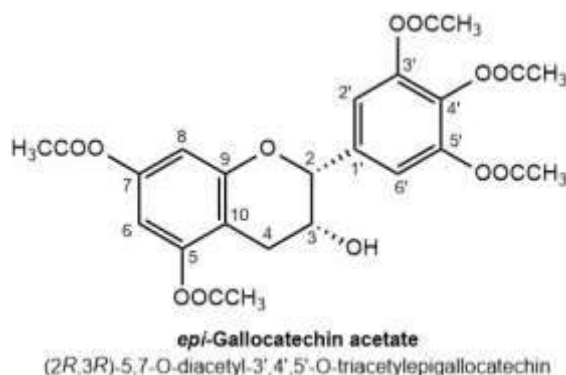
Dung môi CDCl₃; Nội chuẩn Tetramethylsilan



Hình 3. 22: Phổ DEPT của EC acetate

3.3.1.2. Hợp chất epi-Gallocatechin acetate (II)

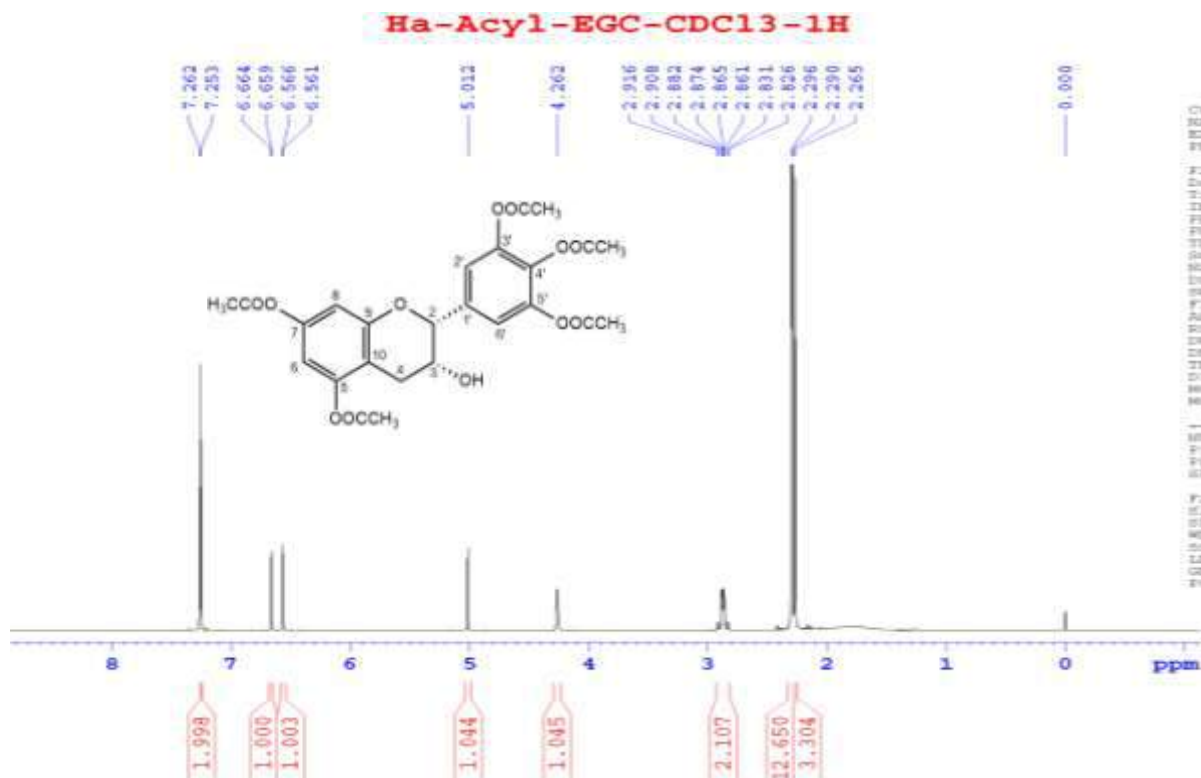
Hợp chất II kết tinh lại trong ethyl acetate, tinh thể hình kim màu trắng, điểm nóng chảy 114 - 115°C, Phổ ESI-MS $m/z = 516,1$ (M^+) tương ứng với khối lượng phân tử $M=516$ đvC; CTPT là $C_{25}H_{24}O_{12}$. Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1D NMR (hình 3.23, hình 3.24, hình 3.25, bảng 3.8) và 2D NMR cho thấy cấu trúc hoàn toàn phù hợp với (2*R*,3*R*)-5,7-*O*-diacetyl-3',4',5'-*O*-triacetylepigallocatechin (EGC acetate).



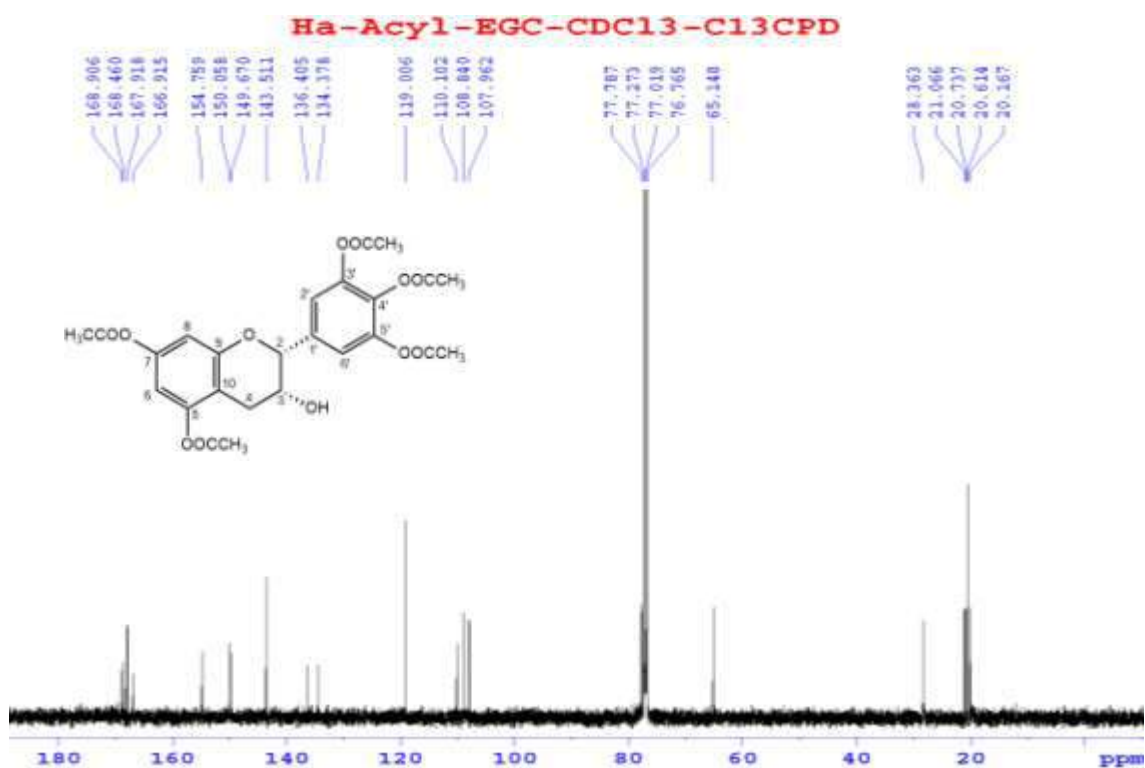
Bảng 3. 8: Độ chuyển dịch hóa học (δ) của *epi*-Galocatechin acetate

Stt	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	5.01s	77,79 <i>d</i>
3	4,26 <i>m</i>	65,15 <i>d</i>
4	2,83 <i>m</i> 2,90 <i>m</i>	28,36 <i>t</i>
5	- - -	154,76 <i>s</i>
6	6,66 <i>d</i> <i>J</i> = 2,5 Hz	107,96 <i>d</i>
7	- - -	150,06 <i>d</i>
8	6,56 <i>d</i> <i>J</i> = 2,5 Hz	108,84 <i>d</i>
9	- - -	149,67 <i>s</i>
10	- - -	110,10 <i>s</i>
1'	- - -	134,38 <i>s</i>
2' & 6'	7,25 <i>br</i> (2 H)	119,01 <i>d</i> (2 C)
3' & 5'	- - -	136,41 <i>s</i> (2 C)
4'	- - -	143,51 <i>s</i>
C=O (C5)	- - -	166,92 <i>s</i>
C=O (C7)	- - -	168,46 <i>s</i>
C=O (C3' & C5')	- - -	167,92 <i>s</i> (2C)
C=O (C4')	- - -	168,91 <i>s</i>
CH ₃ (COO-C5)	2,27 <i>s</i> (3H)	20,16 <i>q</i>
CH ₃ (COO-C7)	2,29 <i>br</i> (3H)	20,61 <i>q</i>
CH ₃ (COO-C3' & C5')	2,29 <i>br</i> (6H)	20,74 <i>q</i> (2C)
CH ₃ (COO-C4')	2,296 <i>br</i> (3H)	21,07 <i>q</i>

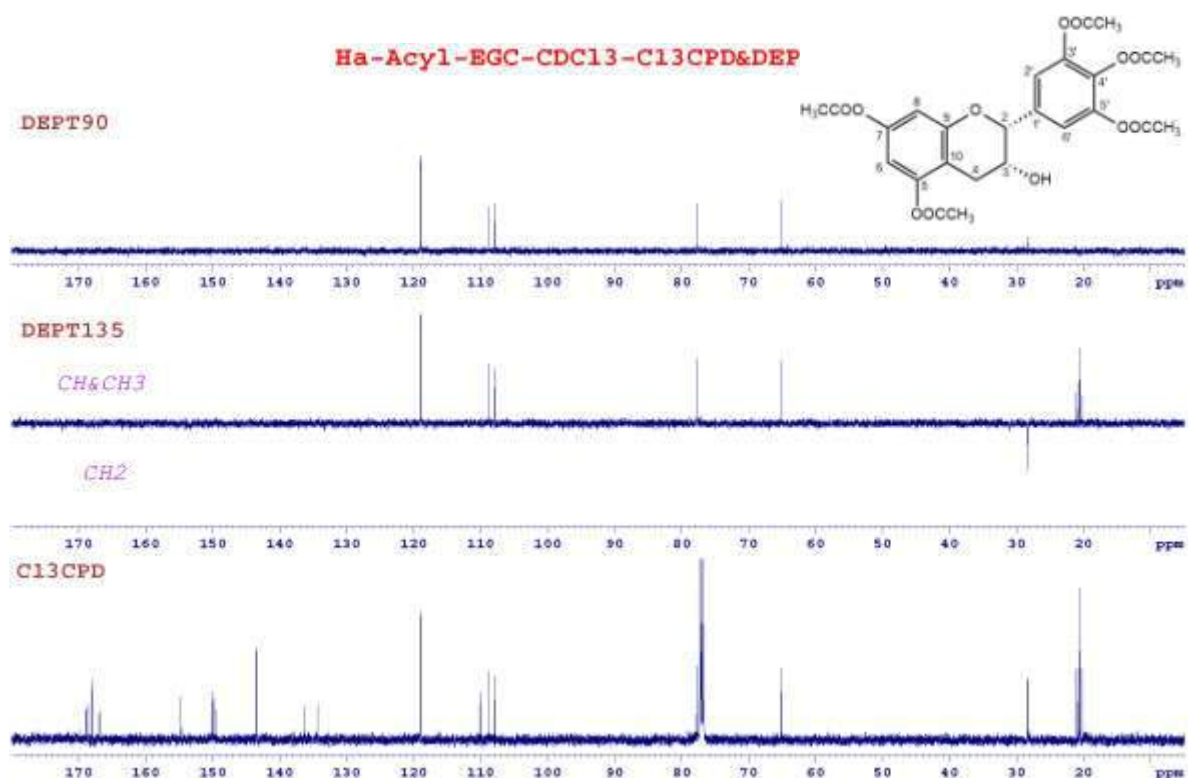
Dung môi CDCl₃; Nội chuẩn tetramethyl silan



Hình 3. 23: Phổ ^1H -NMR của EGC acetate



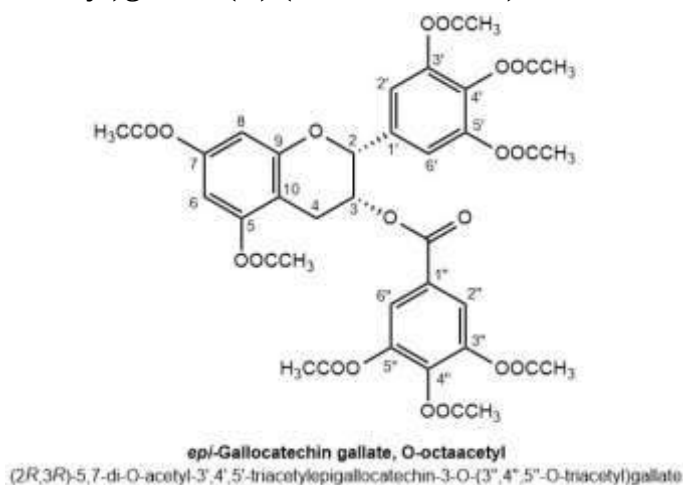
Hình 3. 24: Phổ ^{13}C -NMR của EGC acetate



Hình 3. 25: Phổ DEPT của EGC acetate

3.3.1.3. Hợp chất epi-Gallocatechin gallate, O-octaacetyl (III)

Hợp chất III kết tinh lại trong ethanol, tinh thể hình kim màu trắng ngà, điểm nóng chảy 102 - 105°C, phổ ESI-MS $m/z = 795 [M+H]^+$ tương ứng với khối lượng phân tử $M=794$ đvC; CTPT là $C_{38}H_{34}O_{19}$. Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1D NMR (hình 3.26, hình 3.27, hình 3.28, bảng 3.9) và 2D NMR cho thấy cấu trúc hoàn toàn phù hợp với (2*R*,3*R*)-5,7-di-O-acetyl-3',4',5'-triacetyl-epigallocatechin-3-O-(3'',4'',5''-O-triacetyl)gallate (C) (**EGCG acetate**)

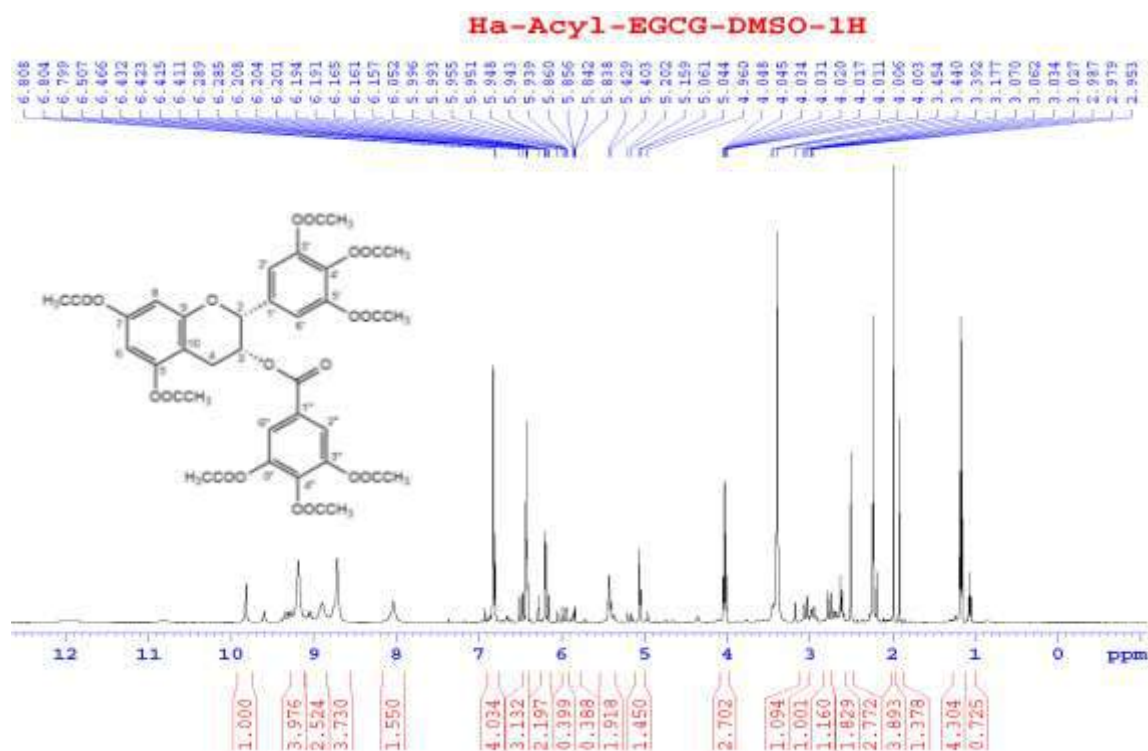


Bảng 3. 9: Độ chuyển dịch hóa học của EGCG acetate

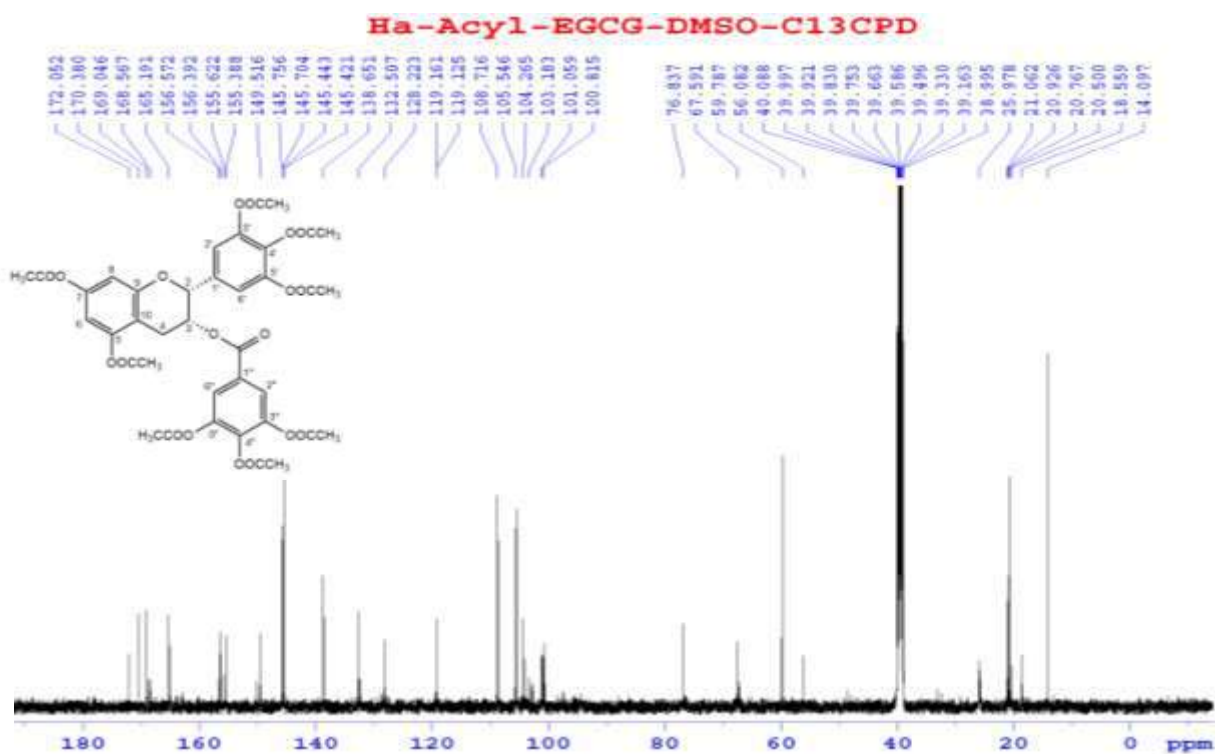
Stt	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	5,06br	76,84d
3	5.43br	67,59 d
4	Ha: 2,76 d $J = 17,5$ Hz Hb: 3,00 dd $J = 3,5$ Hz; 23,5	25,99 t
5	---	156,39 s
6	6,20 m	100,82 d
7	---	155,39 s
8	6,20 m	101,06 d
9	---	149,52 s
10	---	104,27 s
1'	---	128,22 s
2' & 6'	6,42 m (2 H)	105,55 d (2 C)
3' & 5'	---	145,44 s (2 C)
4'	---	132,51 s
-COO-	---	165,19 s
1''	---	119,16 s
2'' & 6''	6,83 m (2 H)	108,72 d (2 C)
3'' & 5''	---	145,43 s (2 C)
4''	---	138,65 s
C=O (C5)	---	168,57 s
C=O (C7)	---	169,05 s
C=O (C3' & C5')	---	169,05 s (2 C)
C=O (C4')	---	172,05 s
C=O (C3'' & C5'')	---	165,19 s (2 C)
C=O (C4'')	---	172,05 s
<u>CH₃</u> COO (C4' & C4'')	1,91 br *	20,7 q *
<u>CH₃</u> COO (Ar)	2,23 - 2,27 m *	20,5 q *

Dung môi DMSO-d₆; Nội chuẩn Tetramethylsilan

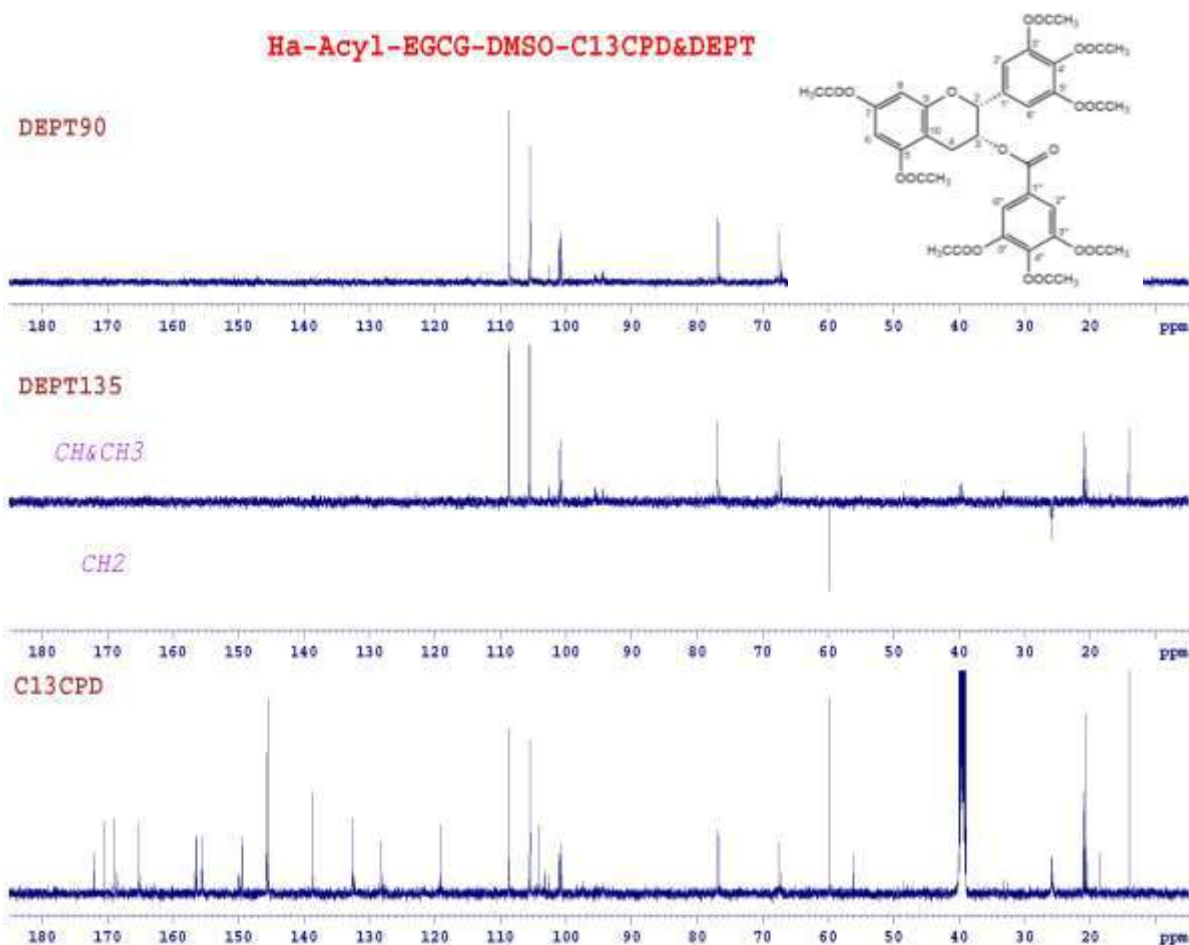
* Tín hiệu chồng chập



Hình 3. 26: Phổ ¹H-NMR của EGCG acetate



Hình 3. 27: Phổ ¹³C-NMR của EGCG acetate



Hình 3. 28: Phổ DEPT của EGCG acetate

3.3.2. Đánh giá mức độ suy giảm hoạt tính dọn gốc tự do DPPH của các dẫn xuất O-acetyl so với các catechin chè xanh

Các catechin chè xanh và dẫn xuất acyl được đánh giá hoạt tính chống oxi hóa bằng phương pháp đánh giá khả năng quét gốc tự do DPPH tại Phòng Hóa sinh ứng dụng, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Kết quả thử hoạt tính dọn gốc tự do DPPH của các catechin và dẫn xuất O-acetyl thu được như trên bảng 3.10.

Bảng 3. 10: Kết quả khảo sát hoạt tính dọn gốc tự do DPPH của các Catechin và dẫn xuất O-acetyl

STT	Mẫu gốc	EC ₅₀ của các Catechin gốc	EC ₅₀ của các Catechin acetate
1	epi-Catechin	7,08 µg/ml	45,64 µg/ml
2	epi-Gallocatechin	4,60 µg/ml	52,99 µg/ml
3	epi-Gallocatechin gallate	5,00 µg/ml	34,58 µg/ml
4	Đôi chứng dương Resveratrol	8,23 µg/ml	8,23 µg/ml

EC₅₀: Nồng độ (µg/ml) chất thử trung hòa được 50 % gốc tự do DPPH

Kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa cho thấy epi-catechin acetate có hoạt tính giảm 7,5 lần so với chất gốc EC, epi-gallocatechin acetate có hoạt tính giảm 10 lần so với chất gốc EGC; dẫn xuất EGCG acetate suy giảm hoạt tính ít nhất, bằng ~ 7 lần so với EGCG nhưng lại có hoạt tính mạnh nhất. Hoạt tính chống oxy hóa của các dẫn xuất này tuy giảm nhưng vẫn khá cao với giá trị EC₅₀ từ 34,58 - 52,99 µg/ml. Tính tan trong nước của các dẫn xuất này gần như không thay đổi: epi-Catechin acetate vẫn là chất khó tan trong nước như EC, dẫn xuất EGC acetate và EGCG acetate đều tan tốt trong nước. Hoạt tính chống oxy hóa của các dẫn xuất này giảm nhưng lại làm tăng độ bền của dẫn xuất ở điều kiện thường, nhờ đó mà khả năng ứng dụng của các dẫn xuất này tăng lên.

Đây là những kết quả rất đáng chú ý:

+ Việc các catechin suy giảm hoạt tính dọn gốc tự do sau khi các nhóm hydroxy bị thay thế bởi O-acetyl đã nêu ra gợi ý về vai trò quan trọng của các nhóm hydroxy trong mối liên quan giữa cấu trúc của các catechin với hoạt tính chống ôxy hóa;

+ Các dẫn xuất acetyl không thay đổi nhiều về tính chất vật lý, hoạt tính dọn gốc tự do suy giảm phần nào nhưng vẫn duy trì ở mức cao do vậy mà sẽ mở ra được khả năng ứng dụng rộng rãi hơn do có tính bền cao hơn. Việc nghiên cứu sâu hơn về ứng dụng hoạt tính của các catechin chè xanh và các dẫn xuất trong dược phẩm và thực phẩm đã và đang được chúng tôi tiếp tục ở một công trình khác.

Đây là lần đầu tiên ở Việt Nam bán tổng hợp và công bố dữ liệu phổ NMR các dẫn xuất O-acetyl của EC, EGC và EGCG. Đây cũng là lần đầu tiên ở Việt Nam thực hiện các khảo sát đối chiếu hoạt tính dọn gốc tự do của các catechin chè xanh EC, EGC và EGCG cùng với các dẫn xuất acetate.

3.4. NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH THU NHẬN CAFFEINE TỪ CAO CHIẾT CHÈ XANH

Kết quả phân tích Catechin tổng số thu nhận bằng phương pháp chiết Soxhlet cho thấy sự có mặt của ít nhất 12 hợp chất có thời gian lưu khác nhau, nhưng vẫn xuất hiện một lượng nhỏ caffeine (R_t - thời gian lưu khoảng 12 phút; sắc đồ hình 3.3). Trong khi đó, khi chiết chè xanh theo phương pháp chiết ngược dòng liên tục, diệp lục và caffeine đã được tách triệt để sang phần dịch chiết chloroform. Do vậy đã lựa chọn triển khai các nghiên cứu tiếp theo về công nghệ tách, tinh chế caffeine và catechin dựa trên các phân chiết nhận được khi khảo sát phương pháp *Chiết ngược dòng liên tục*.

3.4.1. Quy trình tách và tinh chế Caffeine

Caffeine từ dịch chiết chè xanh sau khi thủy phân với chlohydric acid (dịch thủy phân) được tinh chế bằng phương pháp sử dụng dung môi hữu cơ để kết tinh lại nhiều lần và kết hợp tẩy màu bằng than hoạt tính.

Kết quả nhận được các dịch lọc ethyl acetate được gộp lại, cô loại kiệt dung môi thu nhận cao chiết màu xanh lục đậm, phần chiết này chứa các chlorophyll và carotene. Từ phần tinh thể thô thu được Caffeine kết tinh hình kim, màu trắng có hàm lượng 98% (hình 3.29).



Hình 3. 29: Hình ảnh kết tinh caffeine

3.4.2. Xác định cấu trúc hóa học của caffeine bằng phương pháp phổ

Caffeine nhận được có dạng kết tinh hình kim, màu trắng.

Phổ ESI-MS xuất hiện pic tại $m/z = 195 [M+H]^+$ tương ứng với khối lượng phân tử là $M=194$ đvC; CTPT là $C_8H_{10}N_4O_2$; điểm nóng chảy $t_{nc}=238^\circ C$.

Phân tích bằng sắc ký lớp mỏng, caffeine cho vết chất có $R_f \sim 0,9$ phát quang màu hồng dưới ánh sáng tử ngoại 360 nm (TLC với hệ dung môi triển khai Chloroform/Methanol/Citric acid 0,5 % theo tỷ lệ thể tích 3:2:0,2).

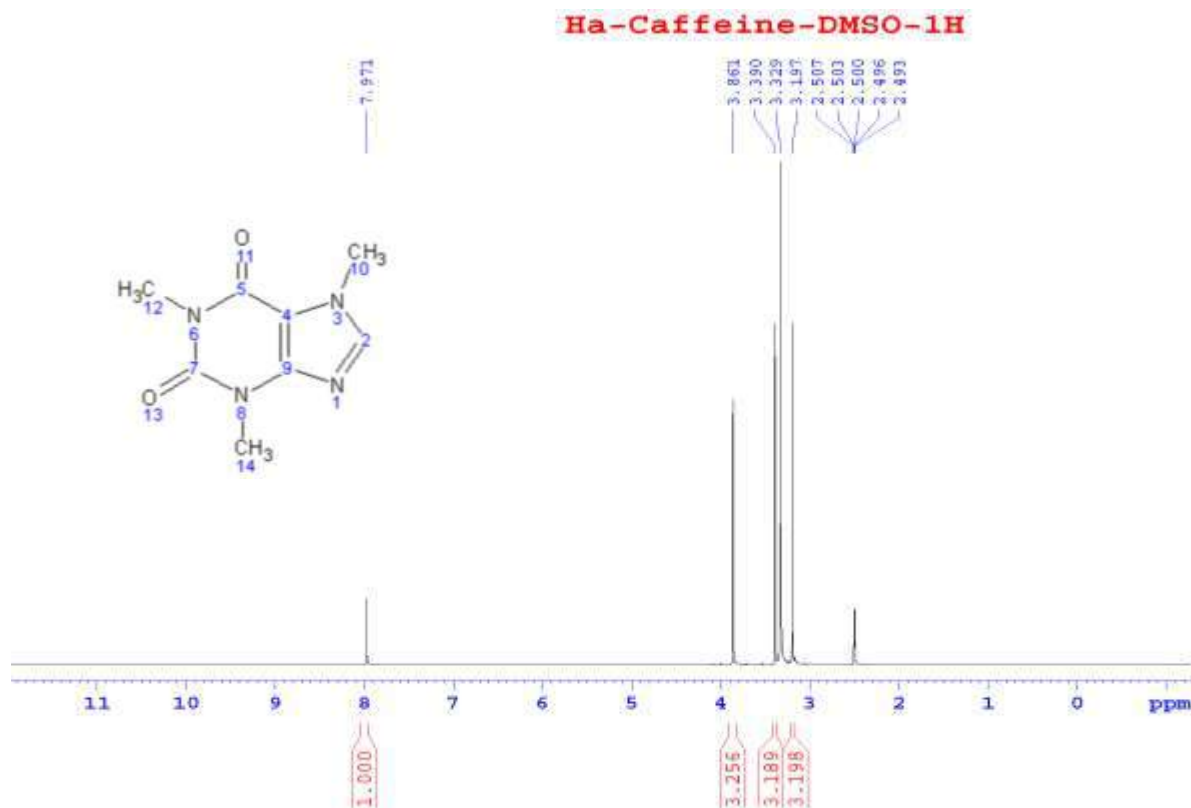
Phổ 1H -NMR (hình 3.30) của hợp chất caffeine thể hiện 3 tín hiệu singlet H-10 ở 3,88 ppm; H-12 ở 3,19 ppm và H-14 ở 3,39 ppm, kết hợp với HSQC cho thấy 3 tương tác gần giữa C-10 (33,05 ppm) với H-10 (3,88 ppm); của C-12 (27,40 ppm) với H-12 (3,19 ppm) và C-14 (29,30 ppm) với H-14 (3,39 ppm). Kết hợp dữ kiện phổ DEPT 135 tại các độ dịch chuyển C-10; C-12; C-14 khẳng định 3 tín hiệu singlet trên phù hợp với 3 nhóm CH_3 .

Trên phổ 1H -NMR tín hiệu của proton H-2 tại 7,97 ppm, kết hợp với HSQC ta thấy có sự tương tác gần giữa C-2 (142,73 ppm) với H-2 (7,97 ppm). Dựa vào phổ

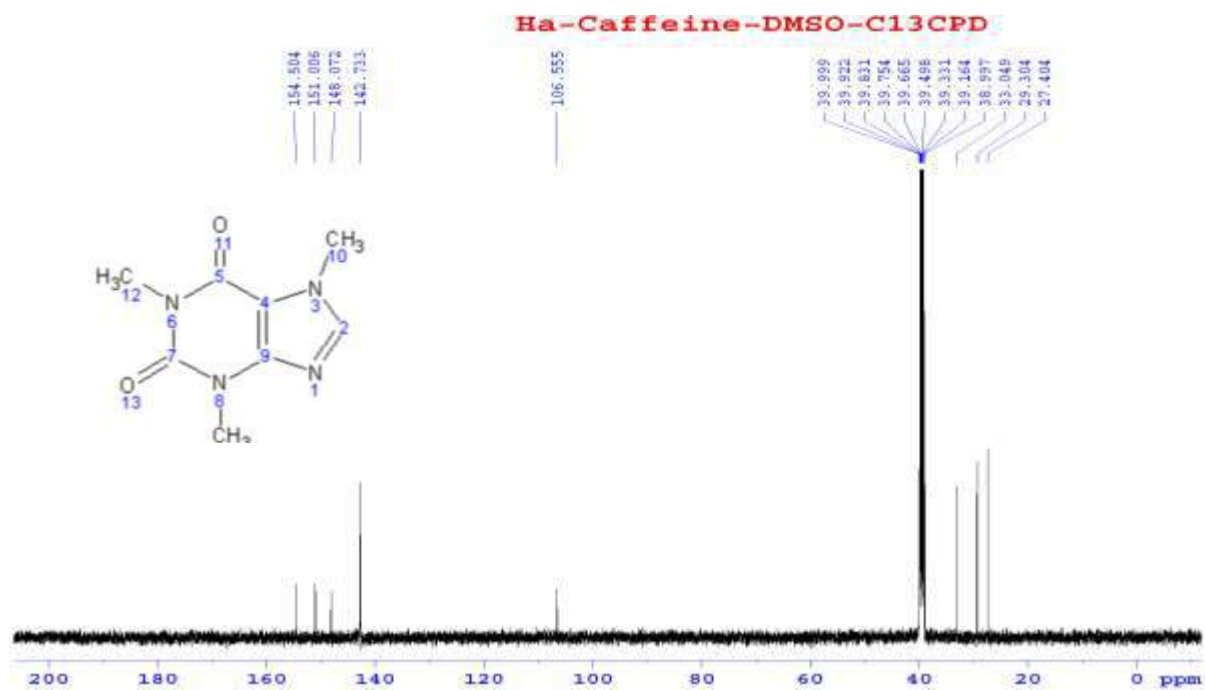
DEPT 90 ta thấy có tín hiệu CH tại độ chuyển dịch C-2 (142,73 ppm). Do vậy tín hiệu H-2 trên phổ ^1H cho ta 1 proton của carbon olefinic.

Phổ ^{13}C -NMR (hình 3.31) và phổ DEPT 135 & 90 (hình 3.32) của caffeine cho tín hiệu của 3 nhóm CH_3 tại C-10 (33,05 ppm); C-12 (27,40 ppm); C-14 (29,30 ppm) và 3 carbon sp^2 C-2 (142,73 ppm); C-4 (106,56 ppm) và C-9 (148,07 ppm). Trên phổ ^{13}C -NMR ta còn thấy tín hiệu của C-5 tại (154,50 ppm) và của C-7 tại (151,01 ppm). Hơn nữa với phổ DEPT 135 và DEPT 90 không thấy xuất hiện tín hiệu dịch chuyển nào của CH_3 , CH_2 và CH tại 154,50 ppm và 151,01 ppm, hơn nữa độ chuyển dịch của các carbon này nằm trong khoảng từ 150 - 185 ppm nên có thể quy kết đây là 2 carbon của nhóm amid ($\text{NC}=\text{O}$).

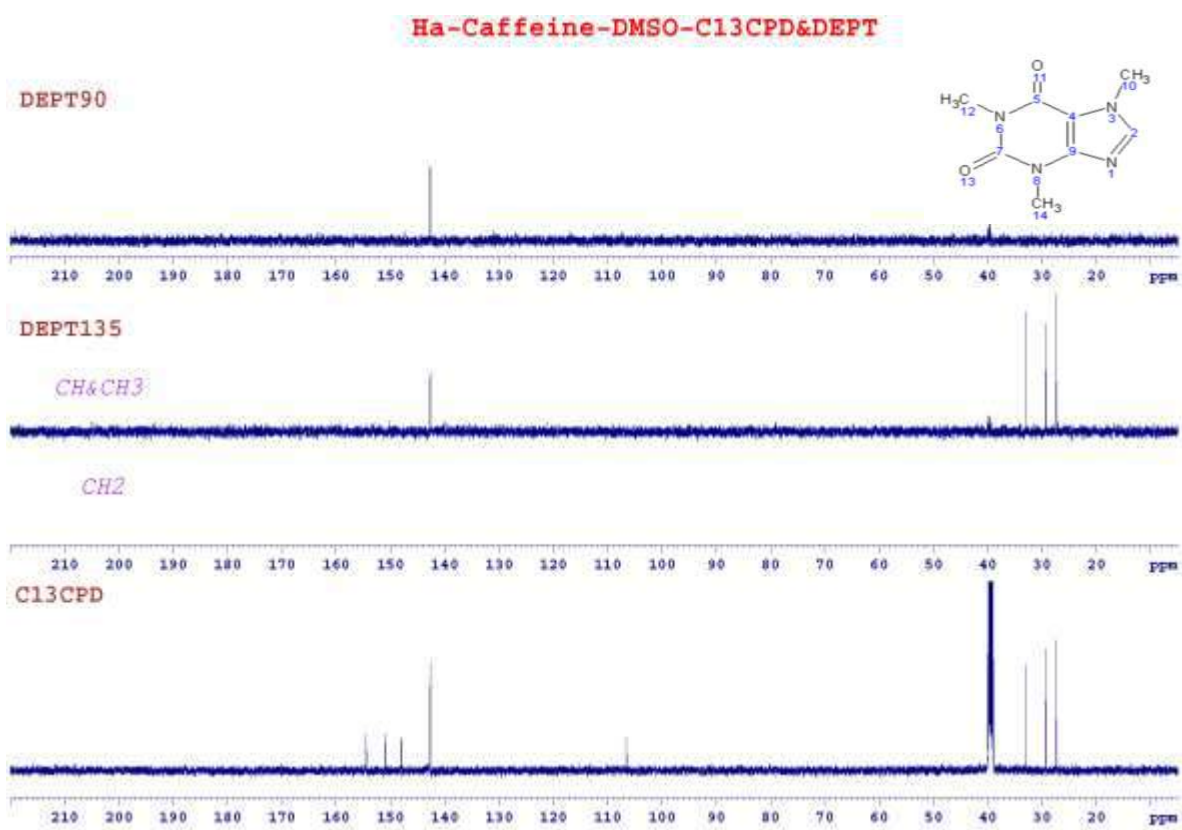
Phổ ^1H -NMR, ^{13}C -NMR và DEPT của caffeine đã phân lập được (hình 3.30, hình 3.31, hình 3.32), phổ 1D và 2D NMR (phụ lục).



Hình 3. 30: Phổ ^1H -NMR của Caffeine



Hình 3. 31: Phổ ^{13}C -NMR của Caffeine



Hình 3. 32: Phổ DEPT của Caffeine

Bảng 3. 11: Độ dịch chuyển hóa học của Caffeine

Stt	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	7,97 s (1H)	142,73 d
4	---	106,56 s
5	---	154,50 s
7	---	151,01 s
9	---	148,07 s
10	3,86 brs (3H)	33,05 q
12	3,19 brs (3H)	27,40 q
14	3,39 brs (3H)	29,30 q

Như vậy từ các dữ kiện MS, 1D NMR (bảng 3.11) và 2D NMR và các tính chất vật lý hoàn toàn phù hợp với cấu trúc hợp chất 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione (caffeine) (hình 3.33).



Hình 3. 33: Cấu trúc hóa học của Caffeine

KẾT LUẬN

L luận án đã nghiên cứu công nghệ chiết/tách các catechin chủ yếu của chè xanh Việt Nam (*Camellia sinensis*) nhằm phục vụ cho công nghiệp dược phẩm và thực phẩm và đã thu được những kết quả sau:

1. Đã xây dựng được quy trình công nghệ quy mô pilot chiết tách catechin chè xanh bằng dung môi nước theo kỹ thuật chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục và so sánh với quy trình chiết ethanol theo phương pháp Soxhlet, kết quả cho thấy: Hàm lượng EGCG trong catechin tổng số chiết bằng nước đạt 50,62 %, chiết bằng ethanol đạt 53,67 %; Nhưng hiệu suất chiết bằng nước catechin tổng số đạt 12,5 % so với nguyên liệu chè cao hơn hẳn so với phương án chiết bằng ethanol chỉ đạt 9,4 %. Phương án chiết ngược dòng liên tục bằng nước còn thể hiện ưu thế hơn hẳn về quy mô, thời gian, chi phí dung môi và tính an toàn sinh học.

Đây là lần đầu tiên ở Việt Nam đã tổ chức đã xây dựng được quy trình với quy mô pilot áp dụng kỹ thuật chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục để phân lập catechin từ chè xanh.

2. Đã nghiên cứu hoàn thiện công nghệ phân lập và tinh chế caffeine với năng suất đạt ~ 1 % so với nguyên liệu chè xanh. Caffeine thu được đạt tiêu chuẩn được dùng USP 35 của Dược điển Mỹ.

3. Đã nghiên cứu so sánh hiệu quả tách của các phương pháp sắc ký điều chế tách EGCG với các loại pha tĩnh sắc ký khác nhau như pha thường, pha đảo, hấp phụ/giải hấp. Từ đó sử dụng giá trị *hiệu quả tuyệt đối* dựa trên các yếu tố về *tỷ lệ giữa lượng catechin tổng số/đường kính cột tách nhân với hiệu suất tách* để lựa chọn hệ cột tách riêng rẽ các catechin EC, EGC, ECG, EGCG từ catechin tổng số. Đã xây dựng được quy trình tách tinh chế các catechin từ catechin tổng số của chè xanh áp dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC sử dụng hệ cột tách liên hợp Diaion HP20 SS và Sephadex LH 20 với hiệu suất tách đạt trên 90 %, các catechin có độ sạch $\geq 95\%$ đáp

ứng chất lượng trong dược phẩm.

Đây là lần đầu tiên, kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp sử dụng hệ thống liên hợp cột tách sắc ký Diaion HP20 và cột sắc ký lọc gel Sephadex LH20 được áp dụng và triển khai vào thử nghiệm sản xuất bán công nghiệp ở Việt Nam.

4. Đã đánh giá khả năng dọn gốc tự do EC_{50} của các catechin chè xanh EC, EGC, EGCG tương ứng là 7,08; 4,60; 5,00 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả cho thấy, các nhóm hydroxy-aren trong cấu trúc catechin có vai trò quan trọng trong hoạt tính chống oxy hóa của các chất này.

5. Đã nghiên cứu bán tổng hợp được các dẫn xuất O-acetyl của các catechin EC, EGC và EGCG không sử dụng dung môi pyridin. Đã đánh giá khả năng dọn gốc tự do của các dẫn xuất acetate và so sánh với catechin gốc, resveratrol. Các dẫn xuất acetyl có hoạt tính dọn gốc tự do suy giảm so với catechin gốc nhưng vẫn duy trì ở mức cao: EC O-acetyl; EGC O-acetyl và EGCG O-acetyl có giá trị EC_{50} tương ứng là 45,64 $\mu\text{g/ml}$; 52,99 $\mu\text{g/ml}$ và 34,58 $\mu\text{g/ml}$. Sự suy giảm hoạt tính dọn gốc tự do của các dẫn xuất catechin O-acetyl lại làm tăng tính bền và ổn định của các chất này.

6. Đã áp dụng các phương pháp vật lý hiện đại HPLC/MS; 1D và 2D NMR để phân tích, xác định cấu trúc và độ tinh khiết của các catechin và dẫn xuất O-acetyl của EC, EGC và EGCG. Các hợp chất này đã được khẳng định cấu trúc phù hợp, đạt độ tinh khiết $\geq 95\%$.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Về mặt nghiên cứu cơ bản, các kết quả nghiên cứu của luận án sẽ góp phần thêm vào những hiểu biết và kiến thức về mặt hóa học của các catechin từ chè xanh, tổng hợp các dẫn xuất, đánh giá hoạt tính sinh học nhằm đáp ứng nhu cầu cấp thiết là tìm ra nhiều loại thuốc mới với những hoạt tính quý báu để chữa các bệnh thông thường cũng như các bệnh hiểm nghèo. Kết quả của luận án cũng nhằm tìm ra và áp dụng các kỹ thuật, công nghệ mới tiến tiến phân lập, tách tinh chế và chuyển hóa các catechin từ chè đạt độ tinh khiết cao để phát triển các sản phẩm hóa dược.

Về mặt thực tiễn, kết quả nghiên cứu của luận án là cơ sở khoa học để xây dựng các quy trình phân lập, tách tinh chế catechin đặc biệt là EGCG ở quy mô bán công nghiệp tạo ra nguồn nguyên liệu để tiến hành tổng hợp hoặc bán tổng hợp ra các hoạt chất hữu cơ thiên nhiên làm dược phẩm, đóng góp vào việc phát triển chung của ngành công nghiệp hóa dược Việt Nam.

1. Luận án đã thành công trong việc áp dụng công nghệ tiên tiến chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục sử dụng dung môi là nước với sự hỗ trợ của axit citric để phân lập catechin từ chè xanh (*Camellia sinensis* L.) ở quy mô pilot 100kg chè xanh / mẻ. Công nghệ chiết cho hiệu quả cao, hiệu suất chiết đạt 12,5 %. Catechin tổng số chứa chủ yếu EC, EGCG, EGC, ECG đạt hàm lượng > 90 %, trong đó EGCG > 50 %. Kỹ thuật này hoàn toàn phù hợp để áp dụng vào sản xuất các hợp chất hữu cơ hóa dược và thực phẩm chức năng. Đây là lần đầu tiên ở Việt Nam kỹ thuật chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục phân lập catechin từ chè xanh được thực hiện ở quy mô bán công nghiệp.

2. Đã xây dựng được công nghệ tách tinh chế các catechin từ catechin tổng số áp dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC sử dụng hệ cột tách liên hợp Diaion HP20 SS kết nối trực tuyến với cột sắc ký lọc gel Sephadex LH20 đạt hiệu quả cao với thời gian phân tách sắc ký ngắn, hiệu suất tách đạt ~ 80 %, các catechin chủ yếu EC, EGC và EGCG có độ sạch $\geq 95\%$ đạt để ứng dụng trong dược phẩm. Lần đầu tiên ở Việt Nam kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng hệ thống cột tách liên hợp được áp dụng

và triển khai bán công nghiệp tách catechin.

3. Đã xây dựng được quy trình tách tinh chế EGCG bằng phương pháp sắc ký cột trên silica gel pha thường bằng cách biến tính trực tiếp pha tĩnh này ngay trong quá trình chạy sắc ký bằng chính dung môi sắc ký có pha thêm axit citric, đây là một cải tiến có đóng góp mới về mặt công nghệ có ý nghĩa ứng dụng thực tế triển khai tách sắc ký các catechin quy mô bán công nghiệp ở Việt Nam nhằm hạ giá thành. Lần đầu tiên quy trình tách tinh chế EGCG bằng phương pháp sắc ký cột trên silica gel pha thường được nghiên cứu và từ đó triển khai công nghệ pilot đạt 100 lượt tách mà chưa mất hiệu lực.

4. Đã bán tổng hợp được các dẫn xuất *O*-acetyl của các catechin EC, EGC và EGCG. Đã đánh giá khả năng dọn gốc tự do của các catechin chè xanh và các dẫn xuất acetate đối chiếu với Resveratrol. Các dẫn xuất acetyl có hoạt tính dọn gốc tự do suy giảm so với catechin gốc nhưng vẫn duy trì ở mức cao: EC *O*-acetyl; ECG *O*-acetyl và EGCG *O*-acetyl có giá trị EC_{50} tương ứng là 45,64 $\mu\text{g/ml}$; 52,99 $\mu\text{g/ml}$ và 34,58 $\mu\text{g/ml}$. Sự suy giảm hoạt tính dọn gốc tự do của các dẫn xuất catechin *O*-acetyl lại làm tăng tính bền và ổn định của các chất này.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Đỗ Thanh Hà, Mai Thanh Nga, Hoàng Văn Hoan, Nguyễn Quốc Đạt, Ngô Thị Hải Yến, Phạm Thị Thanh Hiếu (2012), “*Nghiên cứu công nghệ sản xuất epigallocatechin gallat (EGCG) 95%*”, Tạp chí Hóa học, T. 50 (6), tr 727-731;
2. Đoàn Thị Vân, Byxteeva U.M, Bataeva D.C., Đỗ Thanh Hà (2012), “*Tính kháng khuẩn của chất chiết tách chè xanh Việt Nam lên mẫu vi sinh vật Yersinia enterocolitica*”, Tạp chí Các vấn đề của sinh học hiện đại, Matxcova, T. 3, tr. 82-84;
3. Đỗ Thanh Hà, Phạm Thị Thanh Hiếu, Hoàng Văn Hoan, Trần Thị Như Mai, Giang Thị Phương Ly (2017), “*Nghiên cứu bán tổng hợp và đánh giá mức độ suy giảm hoạt tính dọn gốc tự do của một số dẫn xuất acyl catechin chè xanh*”, Tạp chí Hóa học, T. 55(5E34), tr 395-399.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zaveri Nurulain T. (2006), “*Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications*”, Life Sciences, 78, 2006, pp. 2073-2080;
2. Sung T.V., Thuy T.T., Nhung L.T., Quang N.V., Ha N.T., Huong B.T.T. (2007), “*Separation, purification and structure determination of (-)-epigallocatechin-3-gallat from the leaves of Camilla sinesis*”, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 45 (1B), 2007, pp. 450-455;
3. Dung Đ.N., Ngọc P.T. (2002), “*Chiết xuất và đánh giá sơ bộ thành phần polyphenol lá chè xanh Việt Nam*”, Tạp chí nghiên cứu Y học, 2 (18), 2002, pp. 35-39;
4. Lợi Đ.T. (2006), “*Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*”, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 2006;
5. Quý Đ.N. (1997), “*Cây chè Việt Nam*”, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội,
6. Sản H.T. (2003), “*Phân loại thực vật học*”, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội, 2003;
7. Số liệu thống kê của Tổng cục Hải quan năm 2015, Trang thông tin điện tử, Sở Công thương Thành phố Hồ Chí Minh (2016), “*Thị trường xuất khẩu chè năm 2015*”, 01-2016;
8. Hiệp hội Chè Việt Nam (2015), “*Hội thảo đánh giá sản xuất, chế biến, tiêu thụ chè 2010 - 2015 và đề xuất phân vùng nguyên liệu 2016 - 2020*”, Hiệp hội Chè Việt Nam, Hà Giang, 2015;
9. Hợp N.H. (1972), “*Hóa học và Hóa sinh chế biến lá chè*”, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, 1972;
10. Chang C.J., Chiu K.L., Chen Y.L. and Chang C.Y. (2000), “*Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction*”, Food Chem., 68 (1), 2000, pp.109-113;

11. Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P., Rice-Evans C. (1995), "*Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants*", Arch.Biochem.Biophys., 322(2),1995, pp.339-46;
12. Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y. (1996), "*Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical*", Free Radical Biology and Medicine, 21 (6), 1996, pp. 895-902;
13. Lee M.J., Maliakal P., Chen L., Meng X., Bondoc F.Y., Prabhu S., Lambert G., Mohr S., Yang C.S. (2002), "*Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability*", Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 11 (10/1), 2002, pp. 1025-1032;
14. Santos-Buelga C., Williamson G. (2003), "*Method in Polyphenol Analysis*", The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2003;
15. Prous S.R. (2009), "*Process for the production of Botanical extracts*", US Patent 2009/0042975;
16. Chang.C.J, Chiu.K.L et.al. (2000), Food chemistry. 2000, 68, p. 109;
17. Harbowy M.E. and Balentine D.A. (1997), "*Tea chemistry*", Crit. Rev. Plant Sci., 16 (5), 1997, pp. 415-480;
18. Saijo R. (1982), "*Isolation and chemical structures of two new catechins from fresh tea leaf*", A.gric .Biol .Chem., 46, 1982, pp. 1969-1970;
19. Forrest G.I., Bendall D.S. (1969), "*The distribution of polyphenols in the tea plant (Camellia Sinensis L)*", Biochem. J., 113, pp. 741-755;
20. Hara Y., Luo S.J., Wickremasinghe R.L., Yamanishi T. (1995), "*Special issue on tea*", Food Rev. Int., 11 (3), 1995, pp. 371-545;
21. Hilton P.J., Palmer-Jones R. (1973), "*Relationship between the flavanol composition of fresh tea shoots and the theaflavin content of manufactured tea*", J. Sci. Food Agric., 24 (7), 1973, pp. 813-818;

22. Coxon D.T., Holme, A., Ollis W.D., Vora V.C., Grant M.S., Tee J.L. (1972), "*Flavanol digallates in green tea leaf*", Tetrahedron, 28, 1972, pp. 2819-2826;
23. Nonaka G.I., Kawahara O., Nishioka I. (1983), "*Tannins and related compounds. XV. A new class of dimeric flavan-3-ol gallates, theasinensins A and B, and proanthocyanidin gallates from green tea leaf*", Chem. Pharm. Bull., 31 (11), pp. 3906-3914;
24. Hashimoto F., Nonaka G.I., Nishioka I. (1987), "*Tannins and related compounds. LVI. Isolation of four new acylated flavan-3-ols from olong tea*", Chem. Pharm. Bull., 35 (2), 1987, pp. 611-616;
25. Roberts E.A.H. (1962), "*Economic importance of flavonoid substances: tea fermentation*", In: Geissman T.A. (Ed) : "*The Chemistry of Flavonoid Compounds*", Pergamon Press, Oxford, 1962, pp. 409-512;
26. Zeeb D.J., Nelson B.C., Albert K., Dalluge J.J. (2000), "*Separation and identification of twelve catechins in tea using Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry*", Anal. Chem., 72 (20), 2000, pp. 5020-5026;
27. Chu D.C., Juneja L.R. (1997), "*General chemical composition of green tea and its infusion*", In: Yamamoto T., Juneja L.R., Chu D.C. & Kim M. (Ed), "*Chemistry and Applications of Green Tea*", New York, CRC Press, 1997, pp. 13-22;
28. Phương N.T.M., Dao N.T.N. (2003), "*Ảnh hưởng của polyphenol lá chè xanh (Camellia sinensis L.) lên vi khuẩn sâu răng Streptococcus mutans trên mảng bám răng*", Tạp chí Dược liệu, 4, pp. 110-114;
29. Diane L. McKay, Jeffrey B. (2002), "*The Role of Tea in Human Health: An Update*", Journal of the American College of Nutrition, 21 (1), 2002, pp. 1-13;
30. Bradfield A.E., Penny M., Wright W.B. (1947), "*The catechins of green tea, Part I.*", J. Chem. Soc., 1947, pp. 32-36;
31. Coxon D.T., Holmes, A., Ollis W.D., Vora V.C., Grant M.S. and Tee J.L. 1972.

Flavanol digallates in green tea leaf. *Tetrah.*, 28, 2819-2826 (32 De tai);

32. Mukhtar H., Ahmad N. (2000), "*Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health*", *American Journal of Clinical Nutrition*, 71 (6), 2000, pp. 1694-1703;
33. Yang C.S., Maliakal P., Meng X. (2002), "*Inhibition of carcinogenesis by tea*", *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*, 42, 2002, pp. 25-54;
34. Cao Y., Cao R. (1999), "*Angiogenesis inhibited by drinking tea*", *Nature* 398 (6726), 1999, pp. 381;
35. Pfeffer U., Ferrari N., Morini M., Benelli R., Noonan D.M., Albini A. (2003), "*Antiangiogenic activity of chemopreventive drugs*", *International Journal of Biological Markers*, 18 (1), 2003, pp. 70-74;
36. Wang Z.Y., Cheng S.J., Zhou Z.C., Athar M., Khan W.A., Bickers D.R., Mukhtar H. (1989), "*Antimutagenic activity of green tea polyphenols*", *Mutation Research*, 223 (3), 1989, pp. 273-285;
37. Han C. (1997), "", *Cancer Letters*, 114 (1-2), 1997, pp. 153-158;
38. Yang T.T., Koo M.W. (2000), "*Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion*", *Life Sciences*, 66 (5), 2000, pp. 411-423;
39. Chyu K.Y., Babbidge S.M., Zhao X., Dandillaya R., Rietveld A.G., Yano J., Dimayuga P., Cercek B., Shah P.K. (2004), "*Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice*", *Circulation*, 109 (20), 2004, pp. 2448-2453;
40. Mandel S., Maor G., Youdim M.B. (2004), "*Iron and alpha-synuclein in the substantia nigra of MPTP-treated mice: effect of neuroprotective drugs Rapomorphine and green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate*", *Journal of Molecular Neuroscience*, 24 (3), 2004, pp. 401-416;
41. Mandel S., Weinreb O., Amit T., Youdim M.B. (2004), "*Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-*

- epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases*", Journal of Neurochemistry, 88 (6), pp. 1555-1569;
42. Wu L.Y., Juan C.C., Ho L.T., Hsu Y.P., Hwang L.S. (2004), "*Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague–Dawley rats*", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (3), 2004, pp. 643-648;
 43. Wu L.Y., Juan C.C., Hwang L.S., Hsu Y.P., Ho P.H., Ho L.T. (2004), "*Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model*", European Journal of Nutrition, 43 (2), pp. 116-124;
 44. Dulloo A.G., Duret C., Rohrer D., Girardier L., Mensi N., Fathi M., Chantre P., (1999), "*Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans*", American Journal of Clinical Nutrition, 70 (6), pp. 1040-1045;
 45. Stapleton P.D., Shah S., Anderson J.C., Hara Y., Hamilton-Miller J.M., Taylor P.W. (2004), "*Modulation of beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus by catechins and gallates*", International Journal of Antimicrobial Agents, 23 (5), 2004, pp. 462-467;
 46. Nance C.L., Shearer W.T. (2003), "*Is green tea good for HIV-1 infection?*", Journal of Allergy and Clinical Immunology, 112 (5), 2003, pp. 851-853;
 47. Esposito E., Rotilio D., Di Matteo V., Di Giulio C., Cacchio M., Algeri S. (2002), "*A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes*", Neurobiology of Aging, 23 (5), 2002, pp. 719-735;
 48. Dona M., Dell'Aica I., Calabrese F., Benelli R., Morini M., Albini A., Garbisa S. (2003), "*Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis*", Journal of Immunology, 170 (8), pp. 4335-4341;
 49. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B.

- (1995), "*The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids*", Free Radical Research, 22 (4), 1995, pp. 375-383;
50. Gilmour I.A. (1997), "*Process for extraction of proanthocyanidins from Botanical material*", WO Patent 97/44407, 1997;
51. Dewdney P.A., Meara M.L. (1977), "*Natural fat-soluble antioxidants*", Scientific and Technical Surveys, No. 96. The British Food Manufacturing Industries Research Association 1977;
52. Duve K.J., White J.P. (1991), "*Extraction and identification of antioxidants in oats*", J. Am. Oil Chem. Soc., 68, 1991, pp. 365-370;
53. Watanabe M., Ohshita Y., Tsushida T. (1997), "*Antioxidant Compounds from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) Hulls*", J. Agric. Food Chem., 45 (4), 1997, pp. 1039-1044;
54. Tzia C., Tasios L., Spiliotaki T., Chranioti C., Giannou V. (2003), "*Extraction Optimization in food Engineering*", Chapter 16. *Edible Coatings and Films to Preserve Quality of Fresh Fruits and Vegetables*, New York - Basel, 2003;
55. Sims M. (1990), "*Decaffeinating with carbon dioxide*", Tea and Coffee Trade Journal, 1990 (9th), pp. 8-10;
56. Pan X., Niu G., Liu H. (2003), "*Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves*", Chemical Engineering and Processing, 42, 2003, pp. 129-133;
57. Djarmati Z., Jankov R.M., Schwirtlich E., Djulinac B., Djordjevic A. (1991), "*High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO₂ extraction*", J. Am. Oil Chem. Soc., 68, 1991, pp. 731-734;
58. Nonaka G. (1989), "*Isolation and structure elucidation of tannins*", Pure and Applied Chemistry, 61, 1989, pp. 357-360;
59. Delaunay Jean-Claude, Castagnino C., Cheze C., Vercauteren J. (2002), "*Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography*", Journal of Chromatography A, 964 (1-

- 2), 2002, pp. 123-128;
60. Robichaud J.L., Noble A.C. (1990), "*Astringency and bitterness of selected phenolics in wine*", J. Sci. Food Agric., 53, 1990, pp. 343-353;
61. Bailey D.T. (2001), "*Method for the isolation of caffeine-free catechin from green tea*", WO patent 01/5686, 2001;
62. Burdick D.C. (2001), "*Procedure for the production of epigallocatechin gallate*", EP patent 1077211, 2001;
63. Ibern-Gómez M., Andrés-Lacueva C., Lamuela-Raventós R.M., Waterhouse A.L. (2002), "*Rapid HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Red Wines*", American Society for Enology and Viticulture, 53 (3), 2002, pp. 218-221;
64. Suárez B., Palacios N., Fraga N., Rodríguez R. (2005), "*Liquid chromatographic method for quantifying polyphenols in ciders by direct injection*", J. of Chrom. A, 1066 (1-2), 2005, pp. 105-110;
65. Hoefler A.C., Coggon P. (1976), "*Reversed-phase high-performance liquid chromatography of tea constituents*", J. Chromatogr., 129, 1976, pp. 460-463;
66. Robertson A., Bendall D.S. (1983), "*Production and HPLC analysis of black tea theaflavins and thearubigins during in vitro oxidation*", Phytochem., 22 (4), 1983, pp. 883-887;
67. a/ Bailey R.G., Nursten H.E., McDowell I. (1990), "*Use of an HPLC photodiode-array detector in a study of the nature of a black tea liquor*", J. Sci. Food Agric., 52, 1990, pp. 509-525;
- b/ Bailey R.G., Nursten H.E., McDowell I. (1991), "*Comparative study of the reversed-phase highperformance liquid chromatography of black tea liquors with special reference to the thearubigins*", J. Chromat., 542, 1991, pp.115-128;
- c/ Bailey R.G., Nursten H.E., McDowell I. (1994), "*A comparison of the HPLC, mass spectra, and acid degradation of theaflavins from black tea and proanthocyanidin polymers from wine and cider*", J. Sci. Food Agric., 64, pp. 231-238;

68. Santos-Buelga C. (2003), “*Methods in Polyphenol Analysis*”, Ed. by C. Santos-Buelga and G. Williamson, Pub. by Hadcorver, England, 2003;
69. Lanis-Piwowar K.R., Huo C., Chen D. (2007), “*A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate as a potential anticancer agent*”, *Cancer Research*, 67 (9), 2007, pp. 4303-4310;
70. Vyas S., Shama M., Sharma P.D., Singh T.V. (2007), “*Design, semisynthesis, evaluation O-acyl EGCG as antitumor agents*”, *J. Agric. Food Chem.*, 55 (15), 2007, pp. 6319-6324;
71. Sano M., Suzuki M., Miyase T. (1999), “*Novel anti-allergic catechin derivatives isolated from oolong tea*”, *J. Agric. Food Chem.*, 47 (5), 1999, pp. 1906-1910;
72. Moon Y.H., Lee J.H., Ahn J.S. (2006), “*Synthesis, structure analyses, and characterization of novel epigallocatechin gallate (EGCG) glycosides using the glucanase from Leuconostoc mesenteroides B-1299CB*”, *J. Agric. Food Chem.*, 54 (4), 2006, pp. 1230-1237.
73. Mai N.T.T., Trâm T.B., Chiên T.T., Vinh Đ.T. (2011), “*Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn chè nguyên liệu trong chế biến bột chè xanh chất lượng cao*”, *Tạp chí sinh học*, 34(2): 224-227;

PHỤ LỤC

Các kết quả ghi phổ NMR của caffeine,
catechin và các dẫn xuất O-acetyl catechin

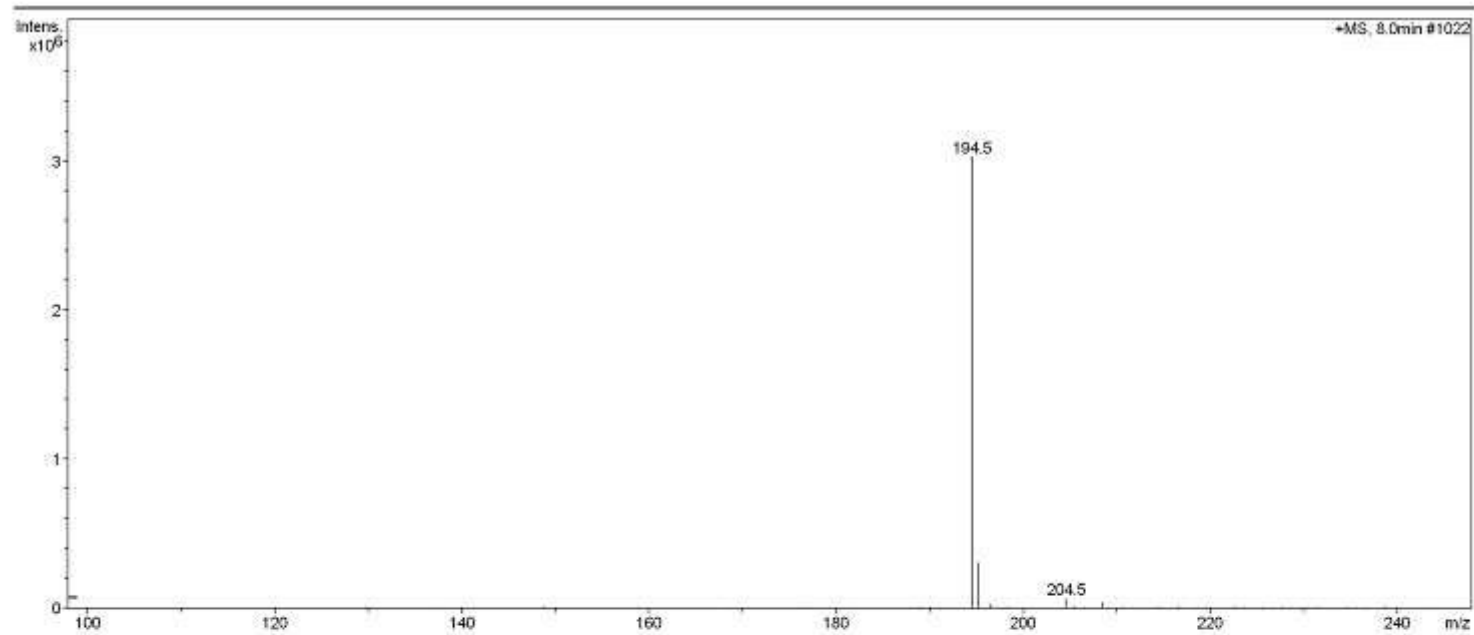
Phổ MS và NMR của Caffeine

Display Report - Selected Window Selected Analysis

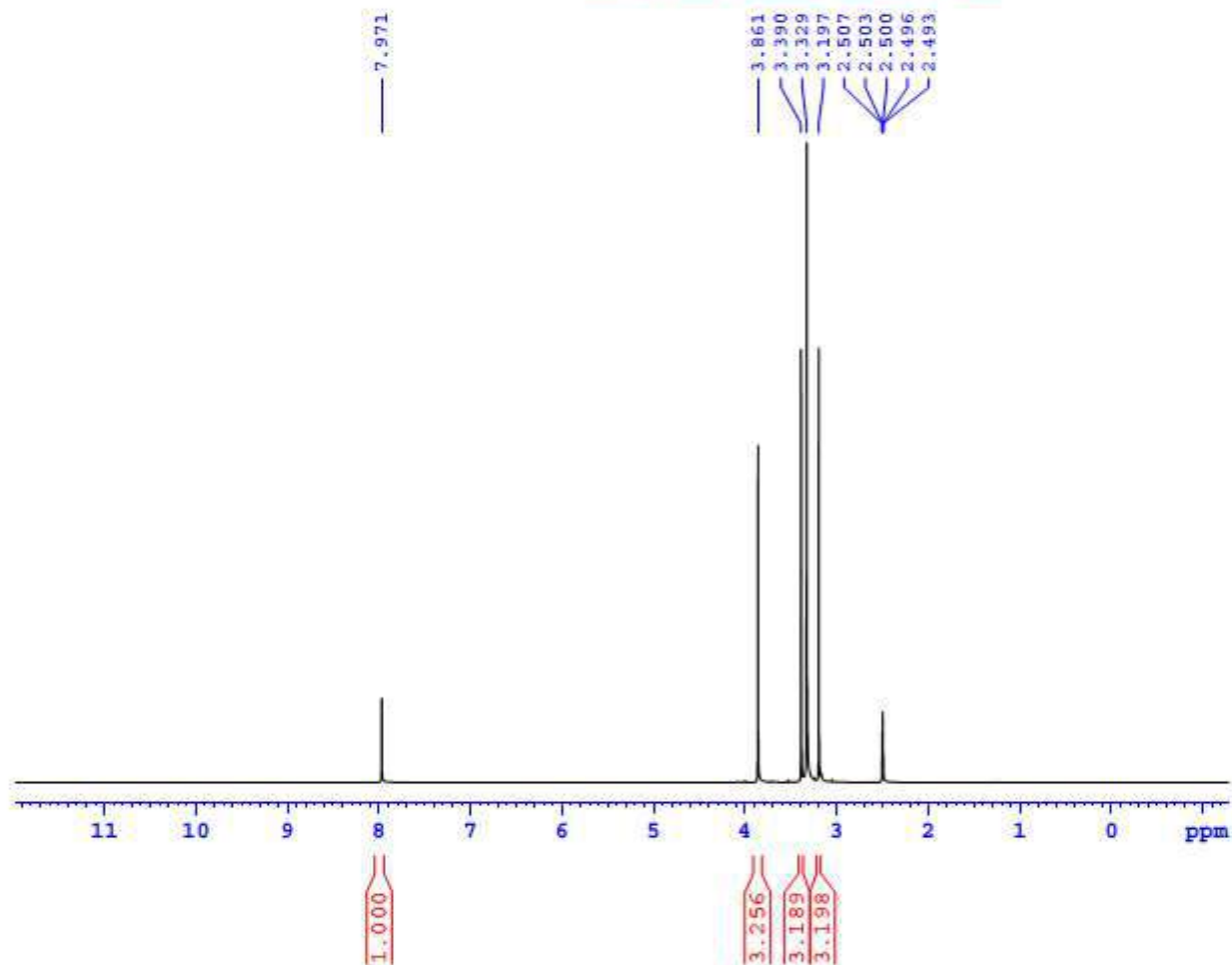
Analysis Name: T1.D
Method: TESTMAU_LC-MS.M
Sample Name: T1
Analysis Info:

Instrument: Agilent 6310 Ion Trap
Operator: NAM_DANG

Print Date: 7/17/2013 9:29:07 AM
Acq. Date: 7/14/2013 2:41:35 PM



Ha-Caffeine-DMSO-1H



Current Data Parameters

NAME	Ha-Caffeine
EXPNO	1
PROCNO	1

F2 - Acquisition Parameters

Date_	20121018
Time	11.21
INSTRUM	av500
PROBHD	5 mm Multinucl
PULPROG	zg30
TD	65536
SOLVENT	DMSO
NS	16
DS	0
SWH	10000.000 Hz
FIDRES	0.152588 Hz
AQ	3.2769001 sec
RG	114
DW	50.000 usec
DE	6.00 usec
TE	304.6 K
D1	1.00000000 sec
MCREST	0.00000000 sec
MCWRK	0.01500000 sec

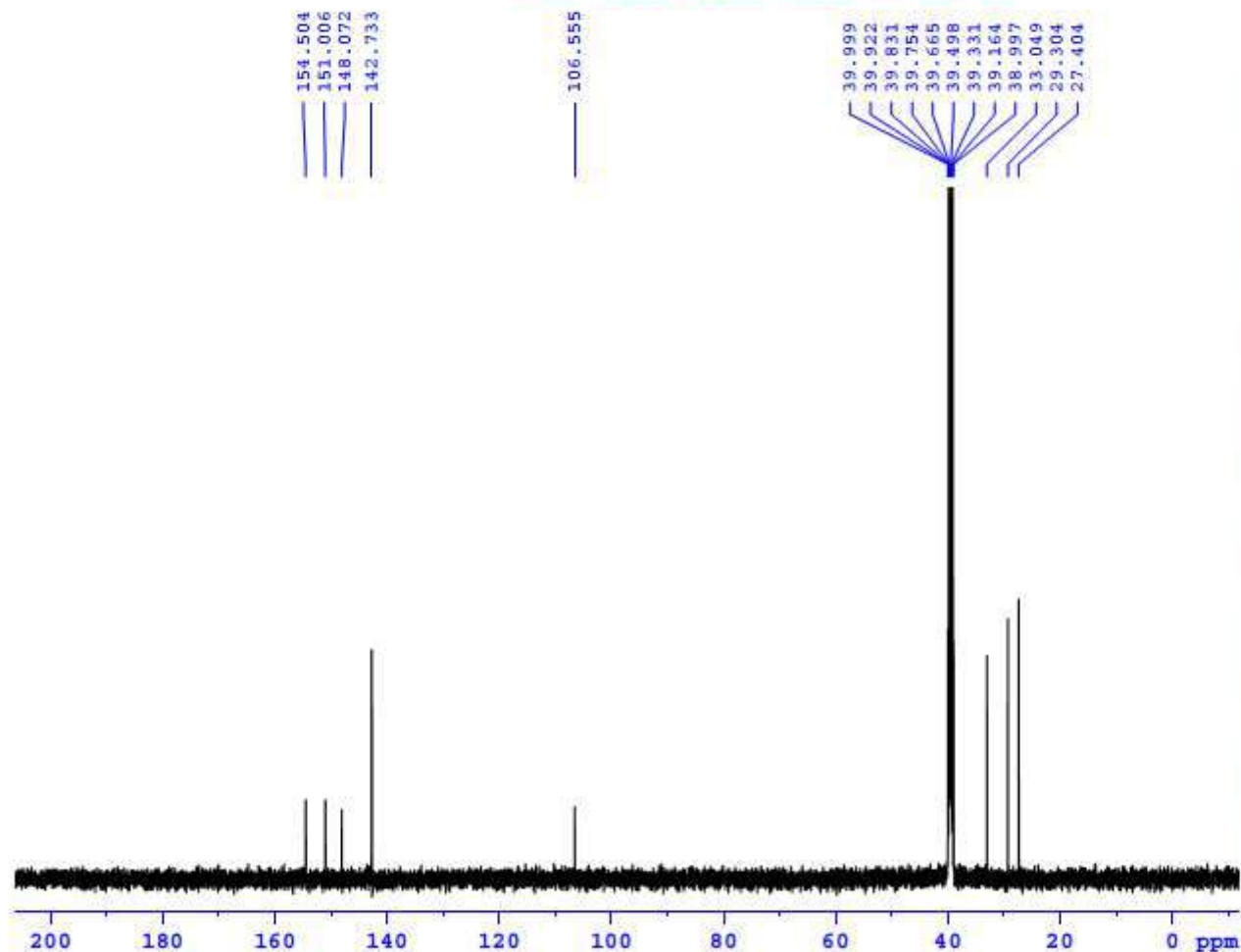
***** CHANNEL f1 *****

NUC1	1H
P1	10.50 usec
PL1	-3.00 dB
SFO1	500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters

SI	32768
SF	500.1300054 MHz
WDW	EM
SSB	0
LB	0.30 Hz
GB	0
PC	1.00

Ha-Caffeine-DMSO-C13CPD



Current Data Parameters
 NAME Ha-Caffeine
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date 20121018
 Time 11.23
 INSTRUM av500
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 128
 DS 2
 SWH 31446.541 Hz
 FIDRES 0.479836 Hz
 AQ 1.0420883 sec
 RG 8192
 DW 15.900 usec
 DE 6.00 usec
 TE 304.8 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999998 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRK 0.01500000 sec

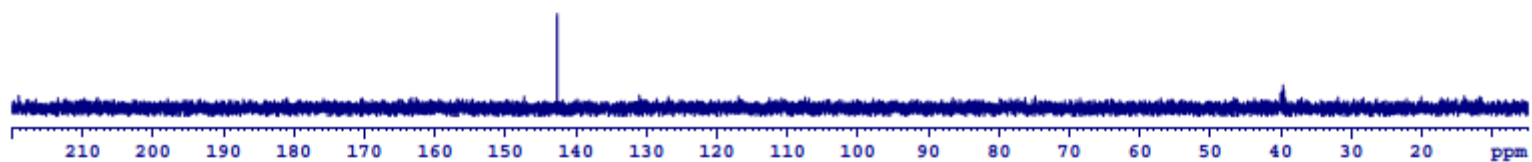
***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 13C
 P1 10.50 usec
 PL1 -1.00 dB
 SFO1 125.7716224 MHz

***** CHANNEL f2 *****
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 88.00 usec
 PL2 -3.00 dB
 PL12 14.68 dB
 PL13 22.00 dB
 SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.7578538 MHz
 NDM EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Ha-Caffeine-DMSO-C13CPD&DEPT

DEPT90

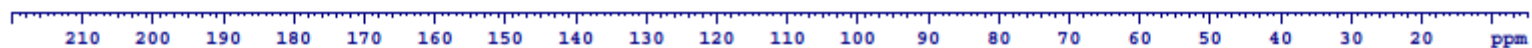


DEPT135

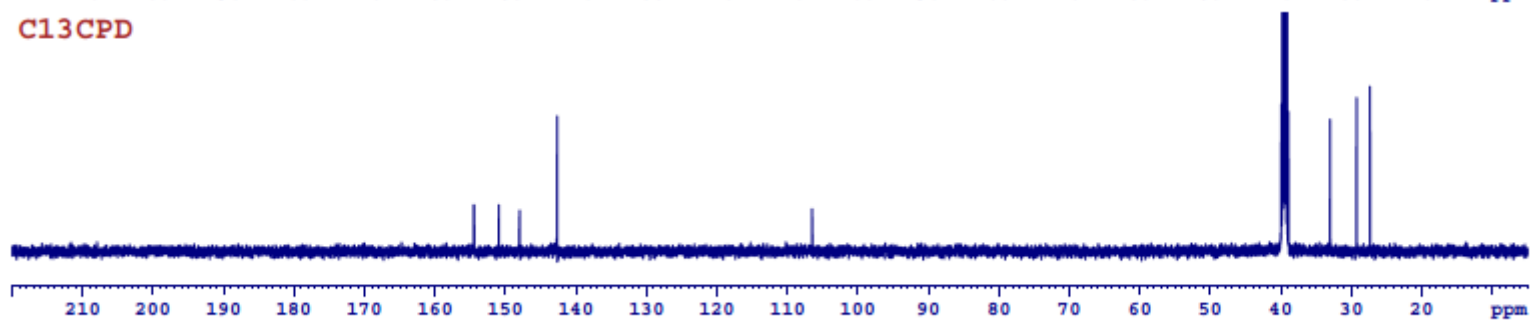


CH&CH3

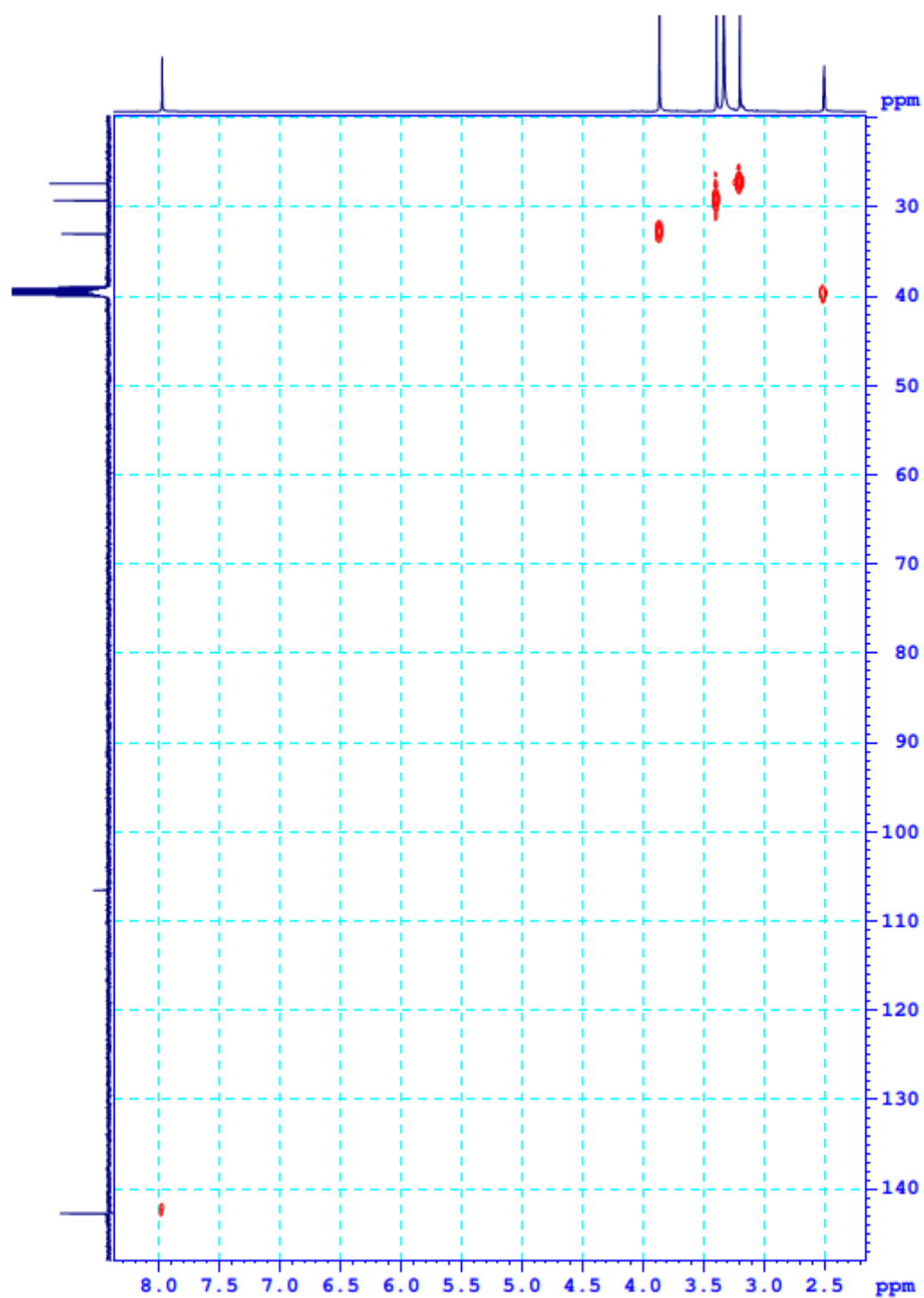
CH2



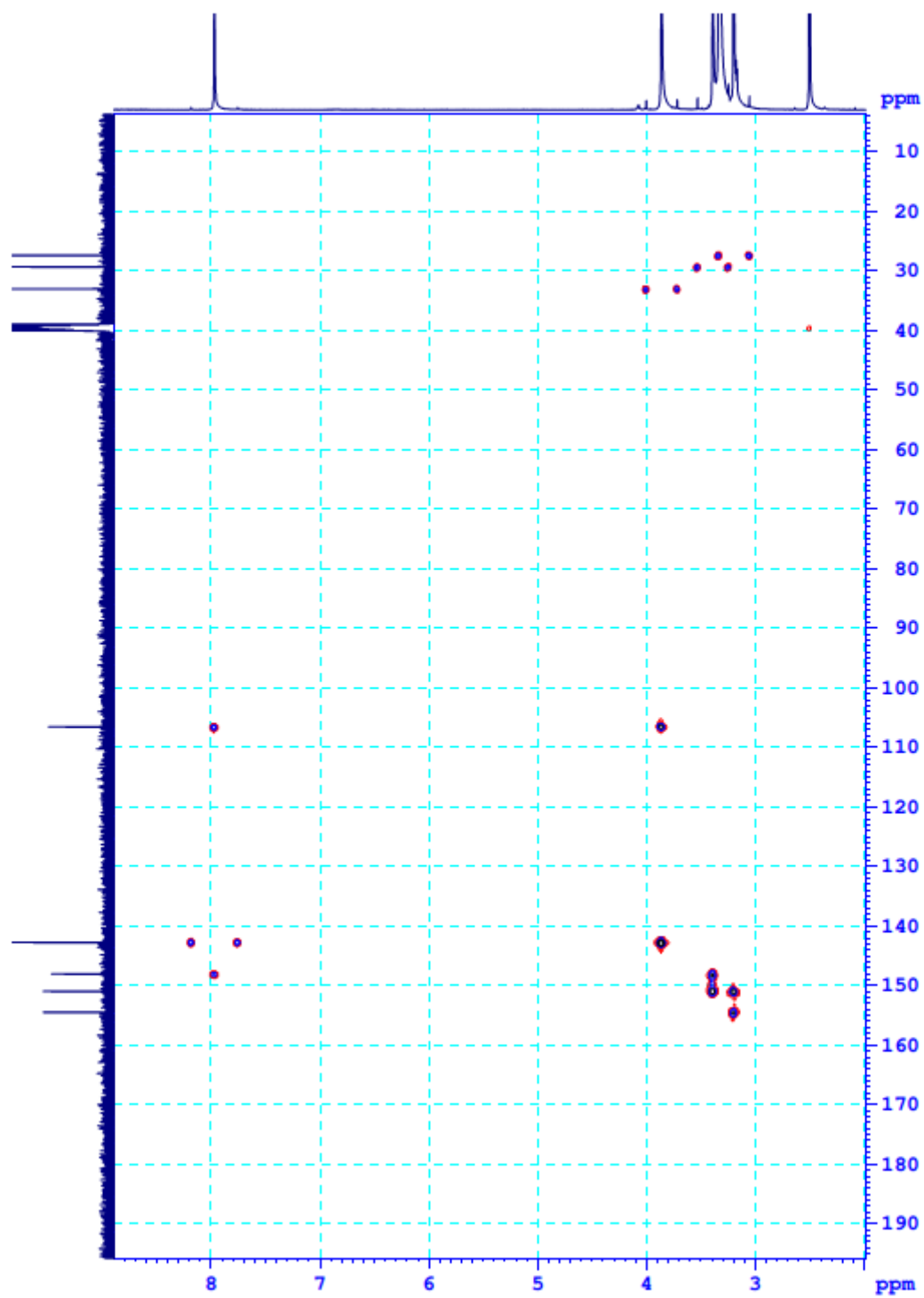
C13CPD



Ha-Caffeine-DMSO-HSQC



Ha-Caffeine-DMSO-HMBC



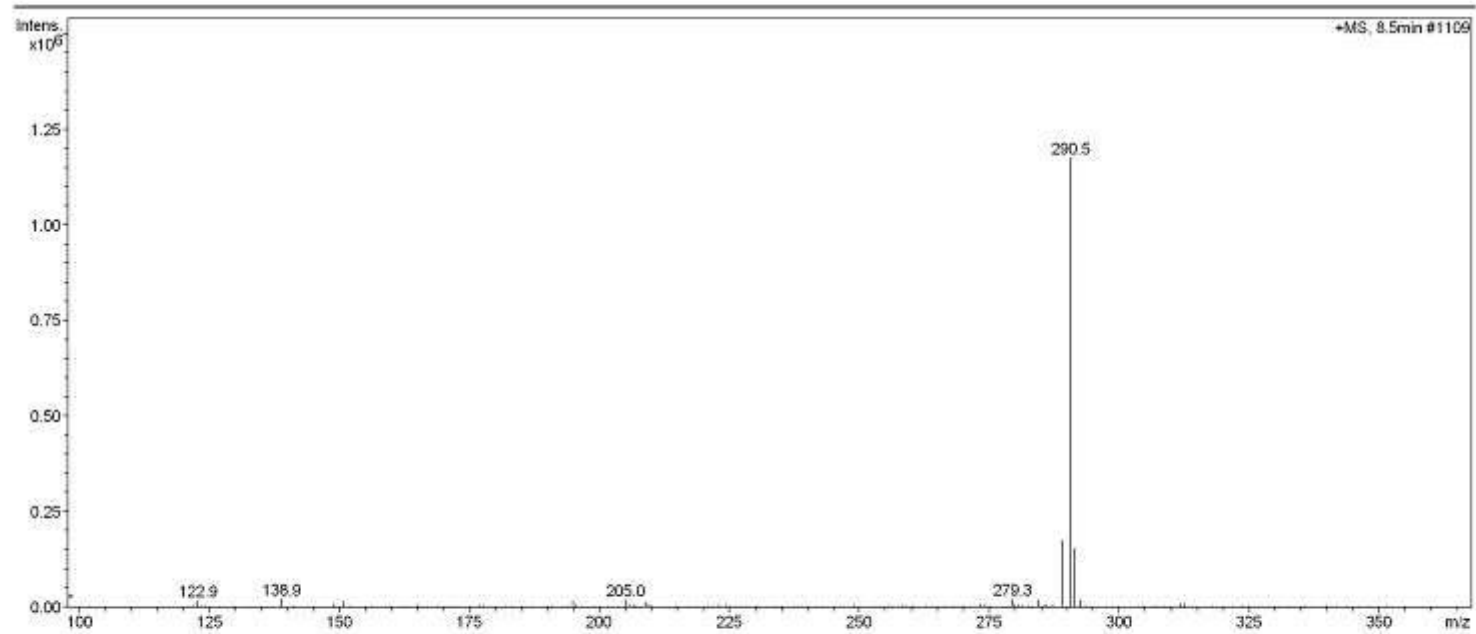
Phổ MS và NMR của epi-catechin (**EC**)

Display Report - Selected Window Selected Analysis

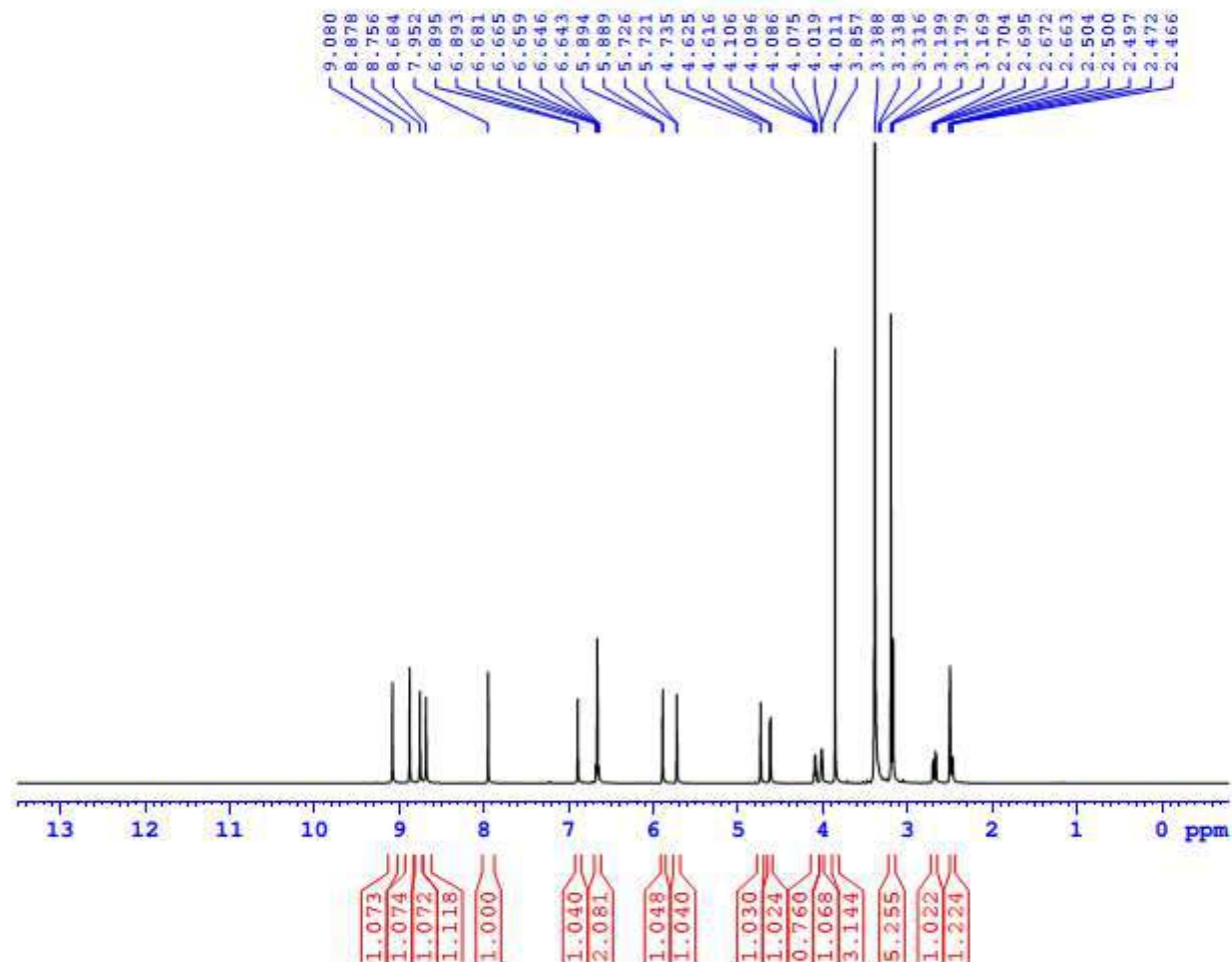
Analysis Name: T1.D
Method: TESTMAU_LC-MS.M
Sample Name: EC
Analysis Info:

Instrument: Agilent 6310 Ion Trap
Operator: NAM_DANG

Print Date: 7/27/2013 9:29:37 AM
Acq. Date: 7/14/2013 2:41:35 PM



HAEC-DMSO-1H



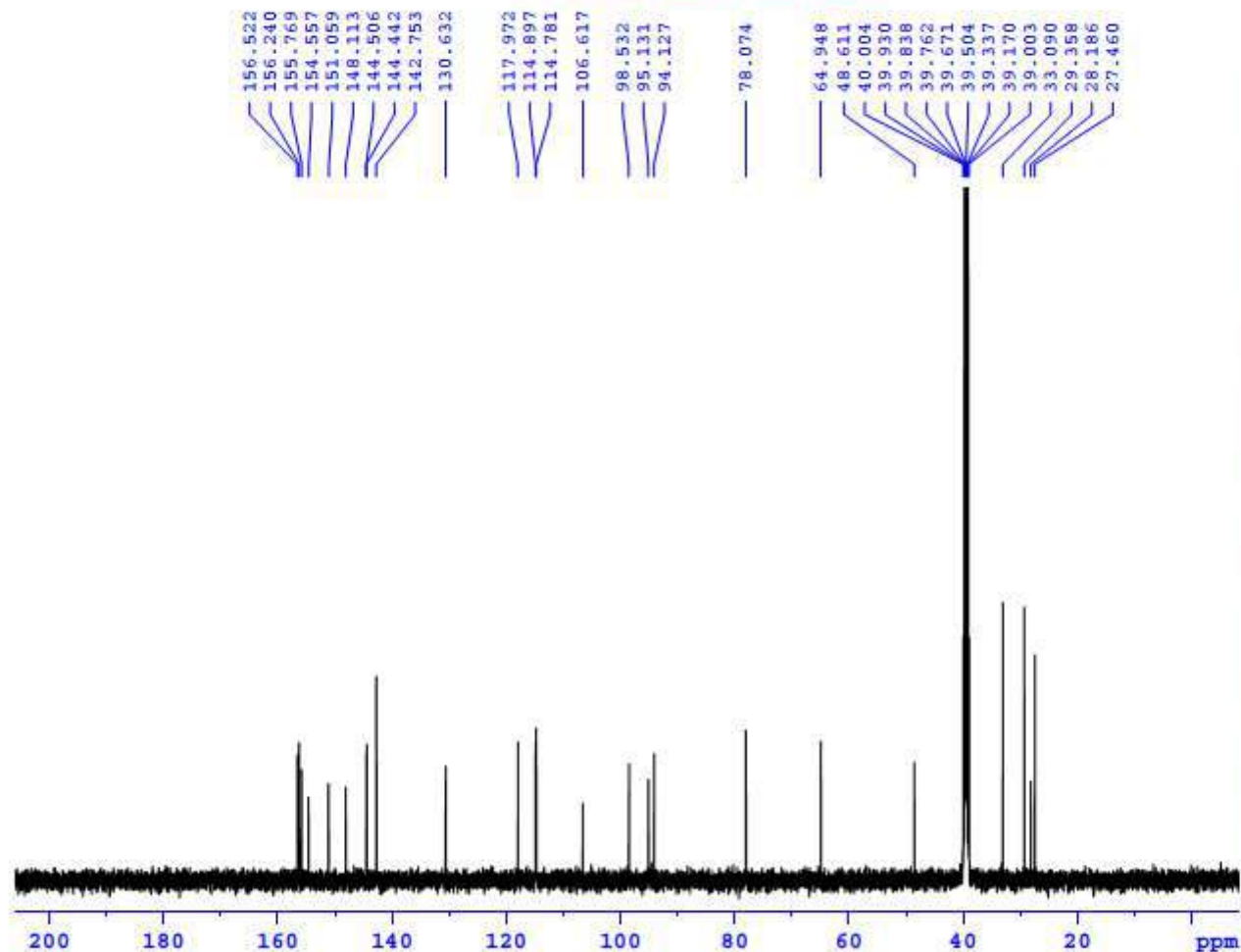
Current Data Parameters
NAME HA-EC
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date 20121017
Time 15.17
INSTRUM av500
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 0
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2769001 sec
RG 71.8
DW 50.000 usec
DE 6.00 usec
TE 305.2 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

***** CHANNEL f1 *****
NUC1 1H
P1 10.50 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300054 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

HA-EC-DMSO-C13CPD



Current Data Parameters
 NAME HA-EC
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date 20121017
 Time 15.28
 INSTRUM av500
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 128
 DS 2
 SWH 31446.541 Hz
 FIDRES 0.479836 Hz
 AQ 1.0420883 sec
 RG 8192
 DW 15.900 usec
 DE 6.00 usec
 TE 306.0 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999998 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRK 0.01500000 sec

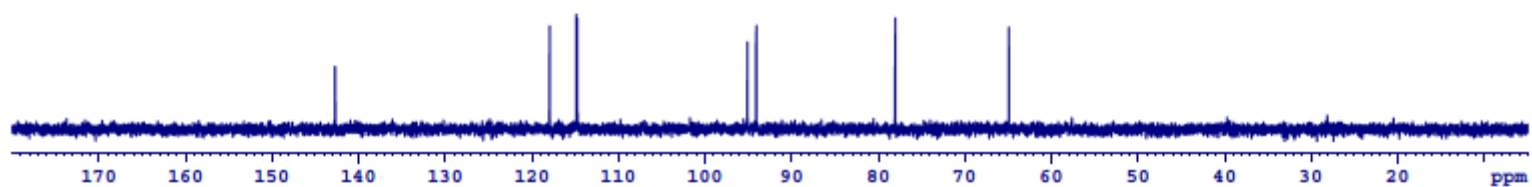
***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 13C
 P1 10.50 usec
 PL1 -1.00 dB
 SFO1 125.7716224 MHz

***** CHANNEL f2 *****
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 88.00 usec
 PL2 -3.00 dB
 PL12 14.68 dB
 PL13 22.00 dB
 SFO2 500.1320005 MHz

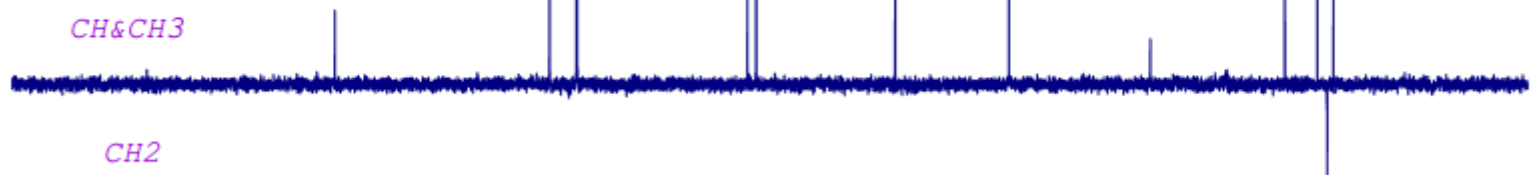
F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.7578471 MHz
 NDM 0
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

HA-EC-DMSO-C13CPD&DEPT

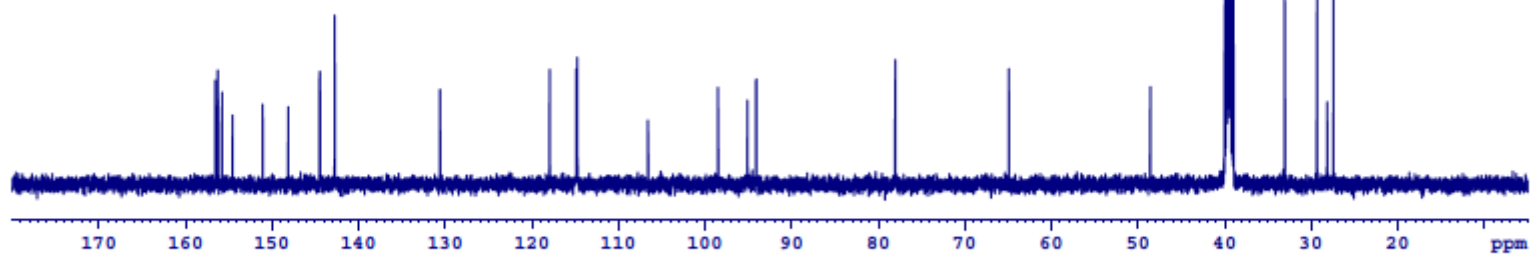
DEPT90



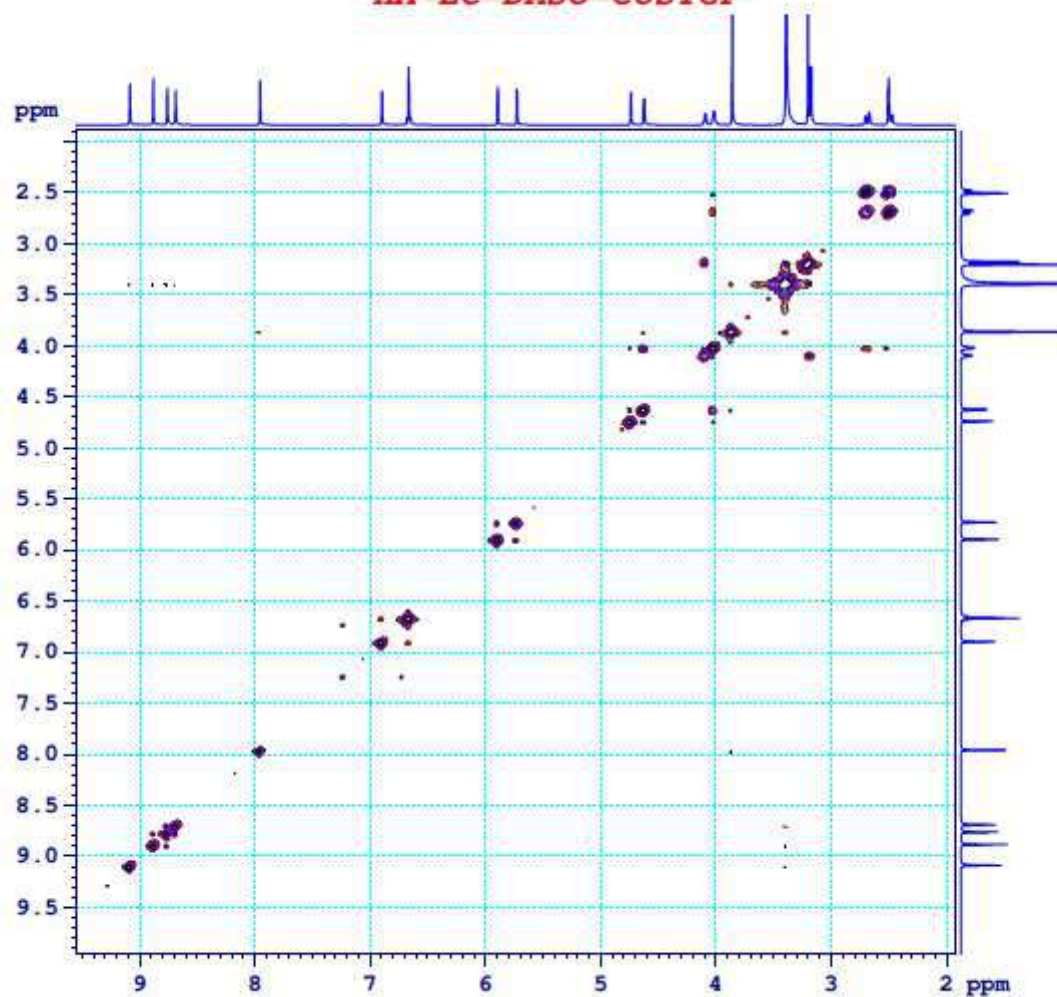
DEPT135



C13CPD



HA-EC-DMSO-COSYGP



```

Current Data Parameters
NAME          HA-EC
EXPNO         2
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20121017
Time          15.37
INSTRUM       sv500
PROBHD        5 mm Multinucl
PULPROG       cosygpuf
TD            32768
SOLVENT       DMSO
NS            2
DS            8
SWH           5482.456 Hz
FIDRES        2.676980 Hz
AQ            0.1869188 sec
RG            71.8
DM            91.200 usec
DE            6.00 usec
TE            305.6 K
d0            0.00000300 sec
D1            1.48689198 sec
d11           0.00000400 sec
D16           0.00015000 sec
TH0           0.00018178 sec
MCREST        0.00000000 sec
MCWREK        1.48689198 sec

***** CHANNEL f1 *****
NUC1          1H
PQ            10.50 usec
PL            10.50 usec
PL1           -3.00 dB
SFO1          500.1325006 MHz

***** GRADIENT CHANNEL *****
GPMUAM1       SINK.100
GPMUAM2       SINK.100
GPM1          0.00 %
GPM2          0.00 %
GPM3          0.00 %
GPM4          0.00 %
GPM5          10.00 %
GPM6          10.00 %
P16           1000.00 usec

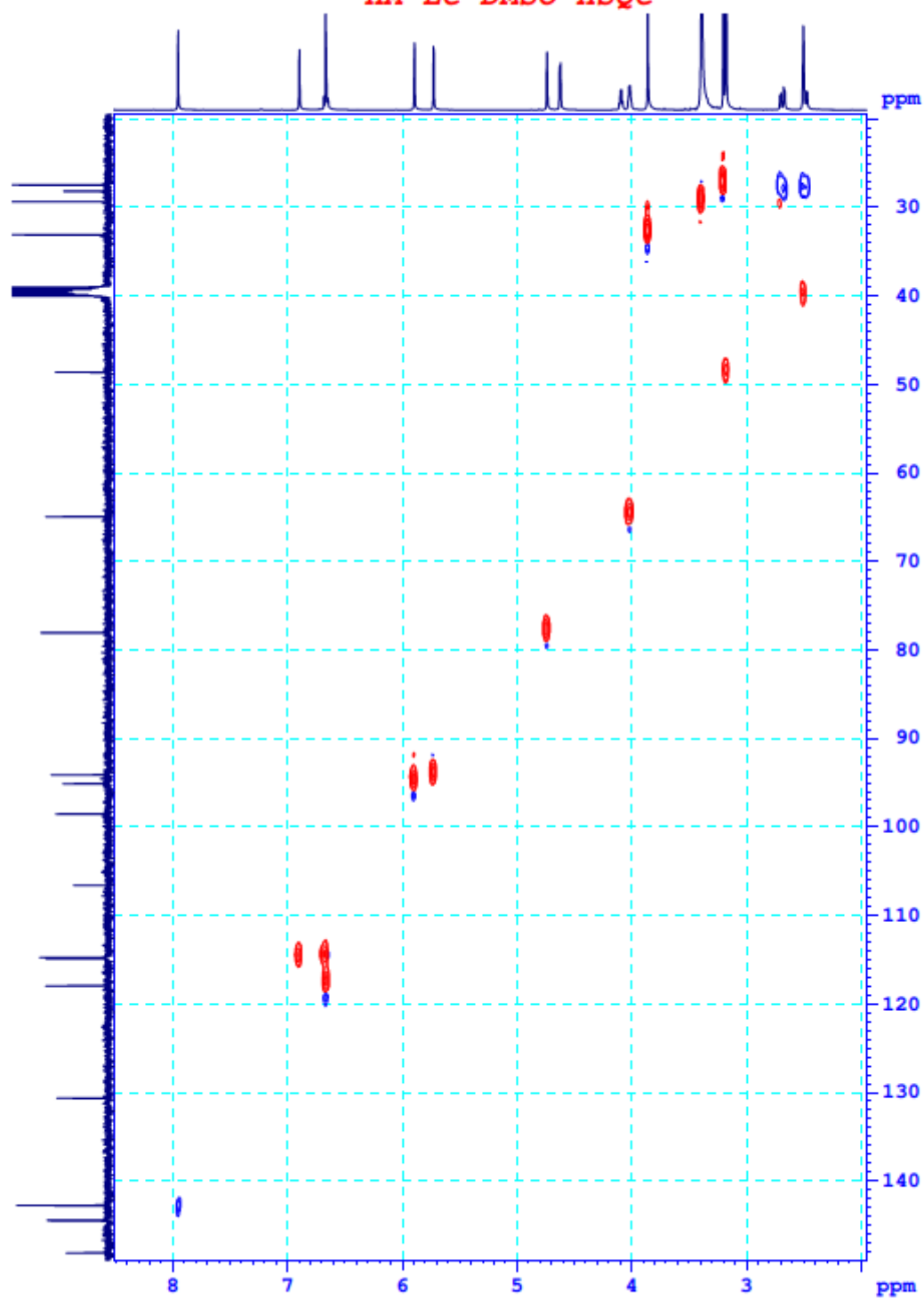
F1 - Acquisition parameters
HD0           1
TD            160
SFO1          500.1325 MHz
FIDRES        34.383167 Hz
SN            11.000 ppm
P1MODE        QF

F2 - Processing parameters
SI            1024
SF            500.1300000 MHz
WDW           SINK
SSB           0
LB            0.00 Hz
GB            0
PC            1.40

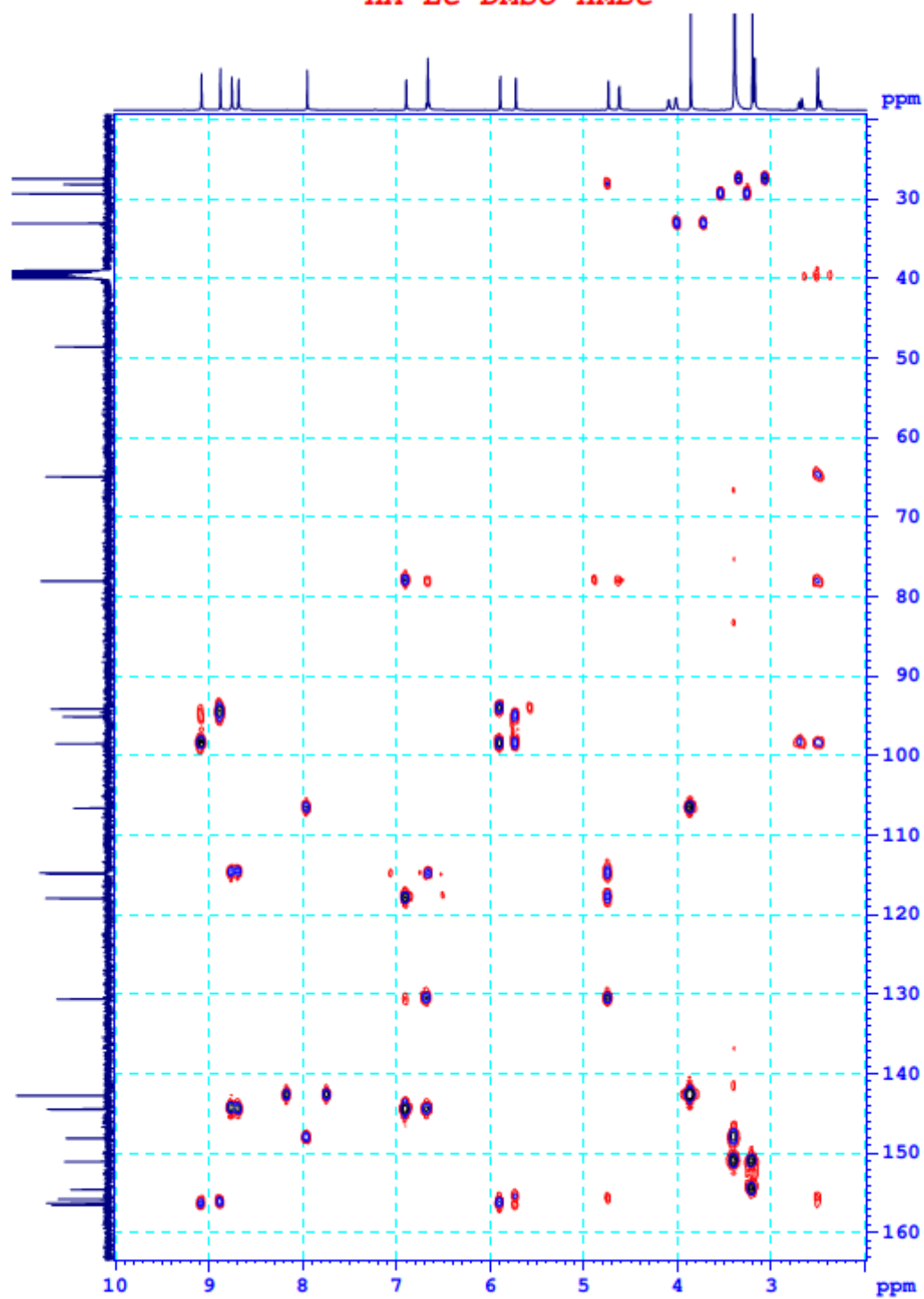
F1 - Processing parameters
SI            1024
MC2           QF
SF            500.1300000 MHz
WDW           SINK
SSB           0
LB            0.00 Hz
GB            0

```

HA-EC-DMSO-HSQC



HA-EC-DMSO-HMBC



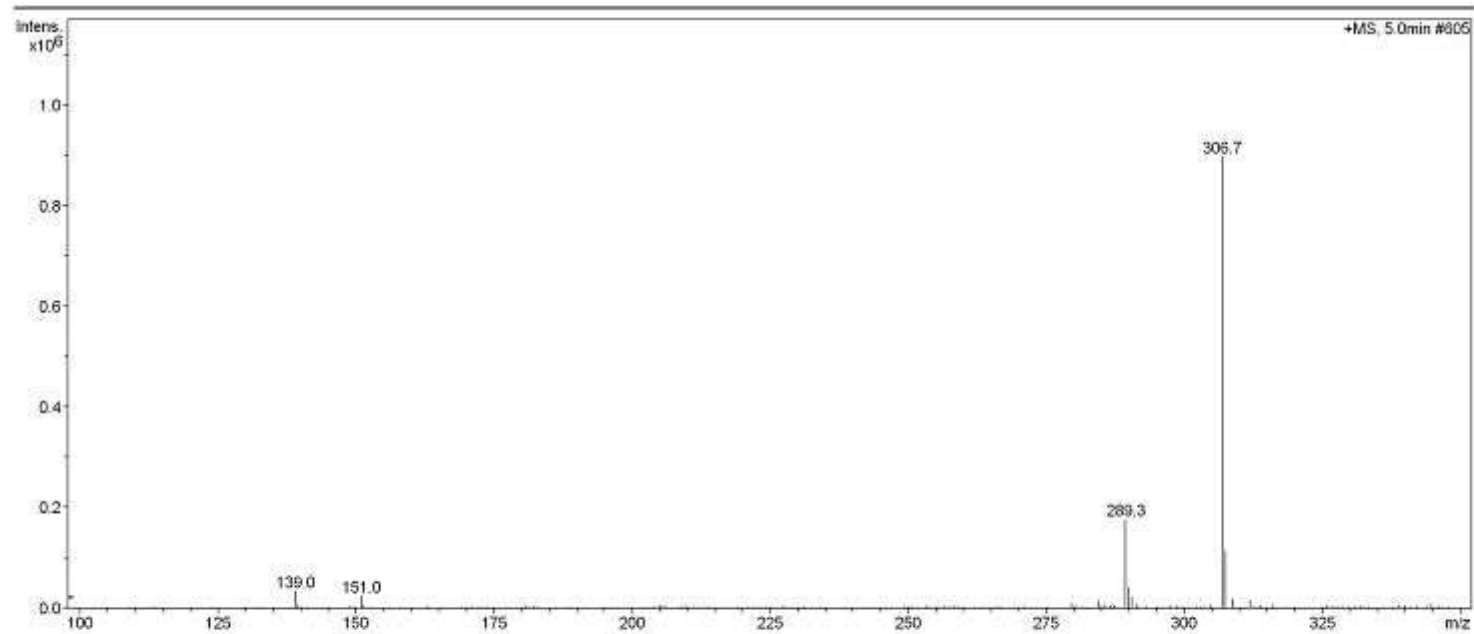
Phổ MS và NMR của epi-gallocatechin (**EGC**)

Display Report - Selected Window Selected Analysis

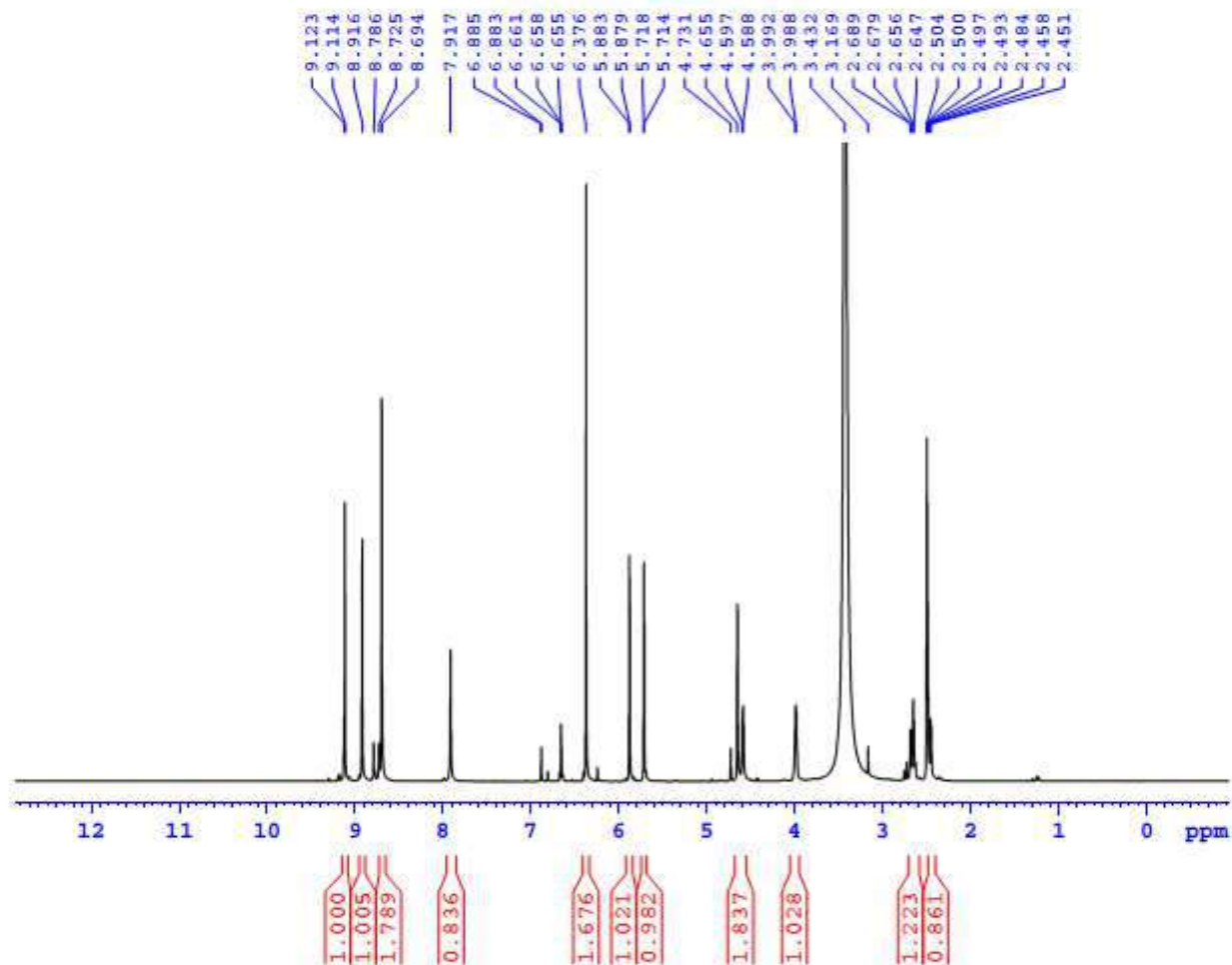
Analysis Name: EGC.D
Method: TESTMAU_LC-MS.M
Sample Name: EGC
Analysis Info:

Instrument: Agilent 6310 Ion Trap
Operator: NAM_DANG

Print Date: 8/15/2013 9:34:14 AM
Acq. Date: 8/12/2013 3:39:06 PM



HA-EGC-DMSO-1H



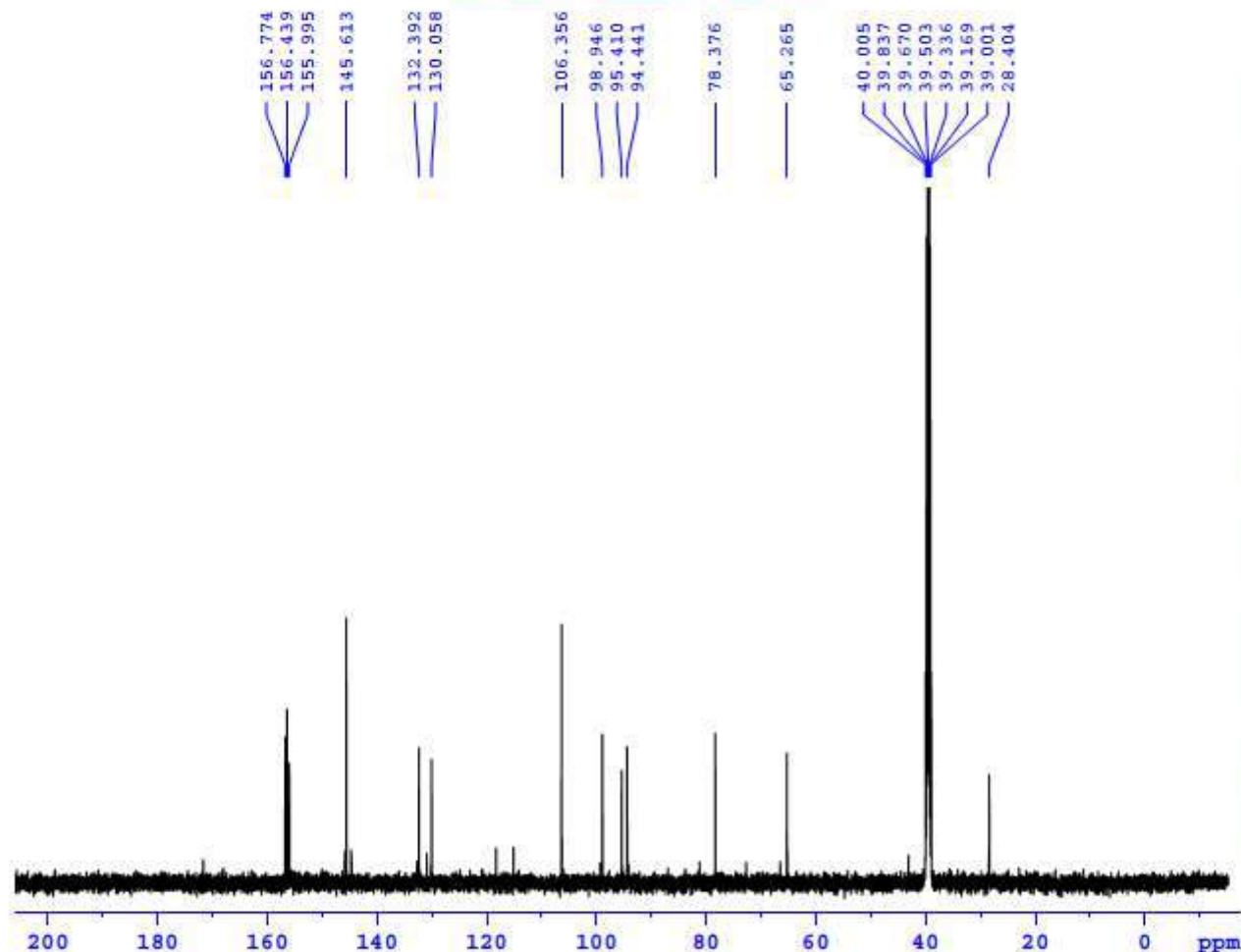
Current Data Parameters
 NAME HA-EGC
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date 20121125
 Time 15.27
 INSTRUM av500
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 16
 DS 0
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.152588 Hz
 AQ 3.2769001 sec
 RG 80.6
 DW 50.000 usec
 DE 6.00 usec
 TE 301.4 K
 D1 1.00000000 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRK 0.01500000 sec

***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 1H
 P1 10.50 usec
 PL1 -3.00 dB
 SFO1 500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 500.1300051 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

HA-EGC-DMSO-C13CPD



Current Data Parameters
NAME HA-EGC
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date 20121125
Time 15.39
INSTRUM av500
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 128
DS 2
SWH 31446.541 Hz
FIDRES 0.479836 Hz
AQ 1.0420883 sec
RG 8192
DW 15.900 usec
DE 6.00 usec
TE 301.6 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 1.89999998 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

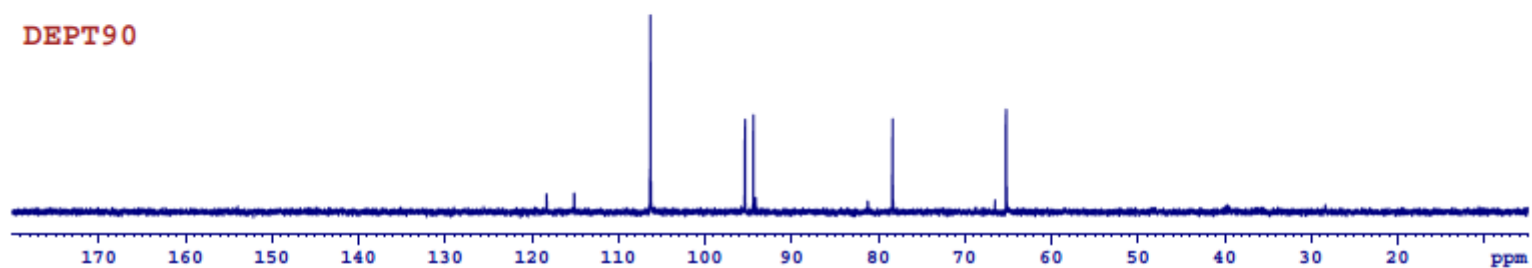
***** CHANNEL f1 *****
NUC1 13C
P1 10.50 usec
PL1 -1.00 dB
SFO1 125.7716224 MHz

***** CHANNEL f2 *****
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 88.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 14.68 dB
PL13 22.00 dB
SFO2 500.1320005 MHz

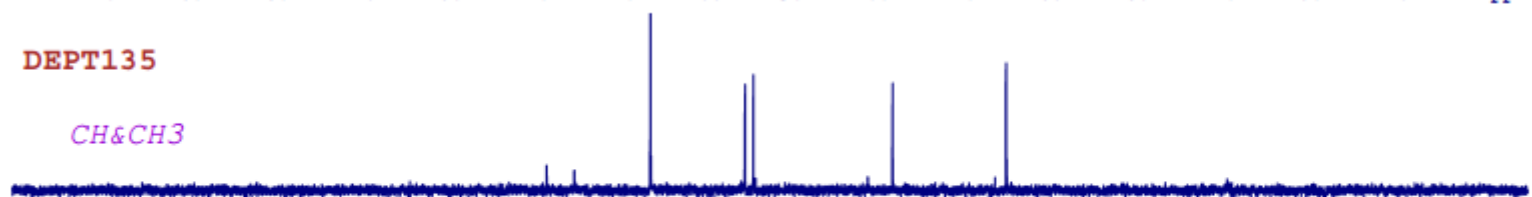
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7578106 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.00

HA-EGC-DMSO-C13CPD&DEPT

DEPT90



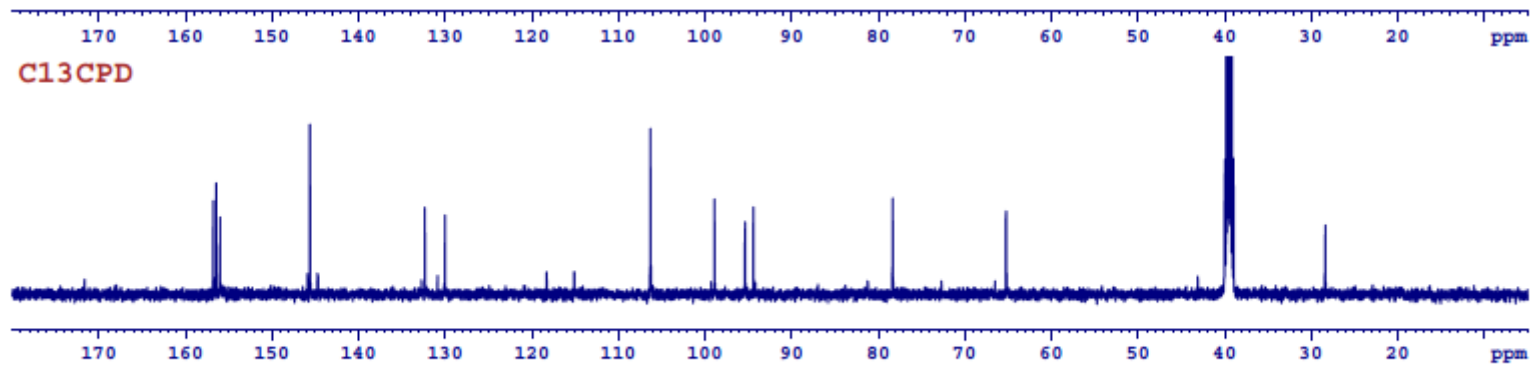
DEPT135



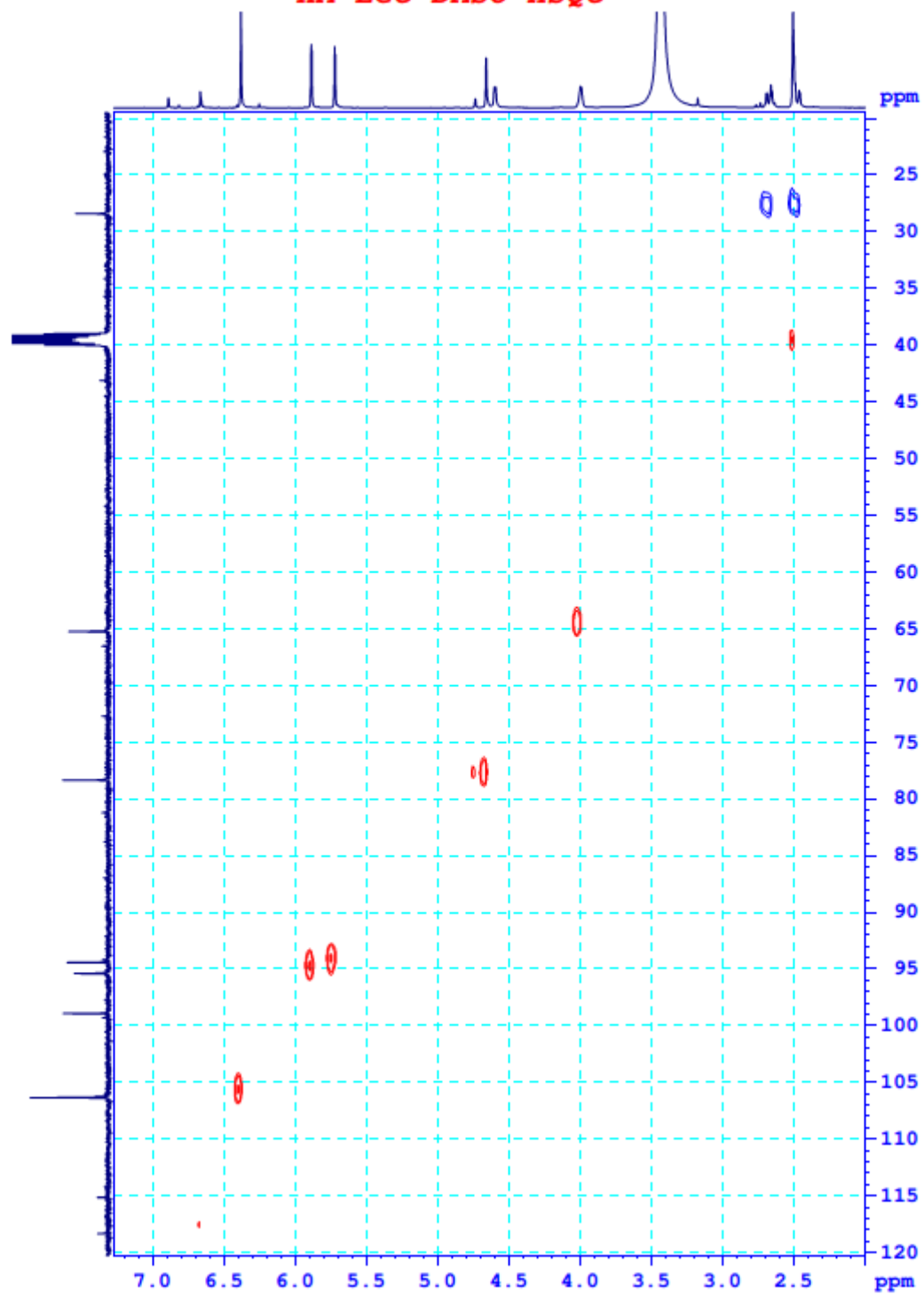
CH&CH3

CH2

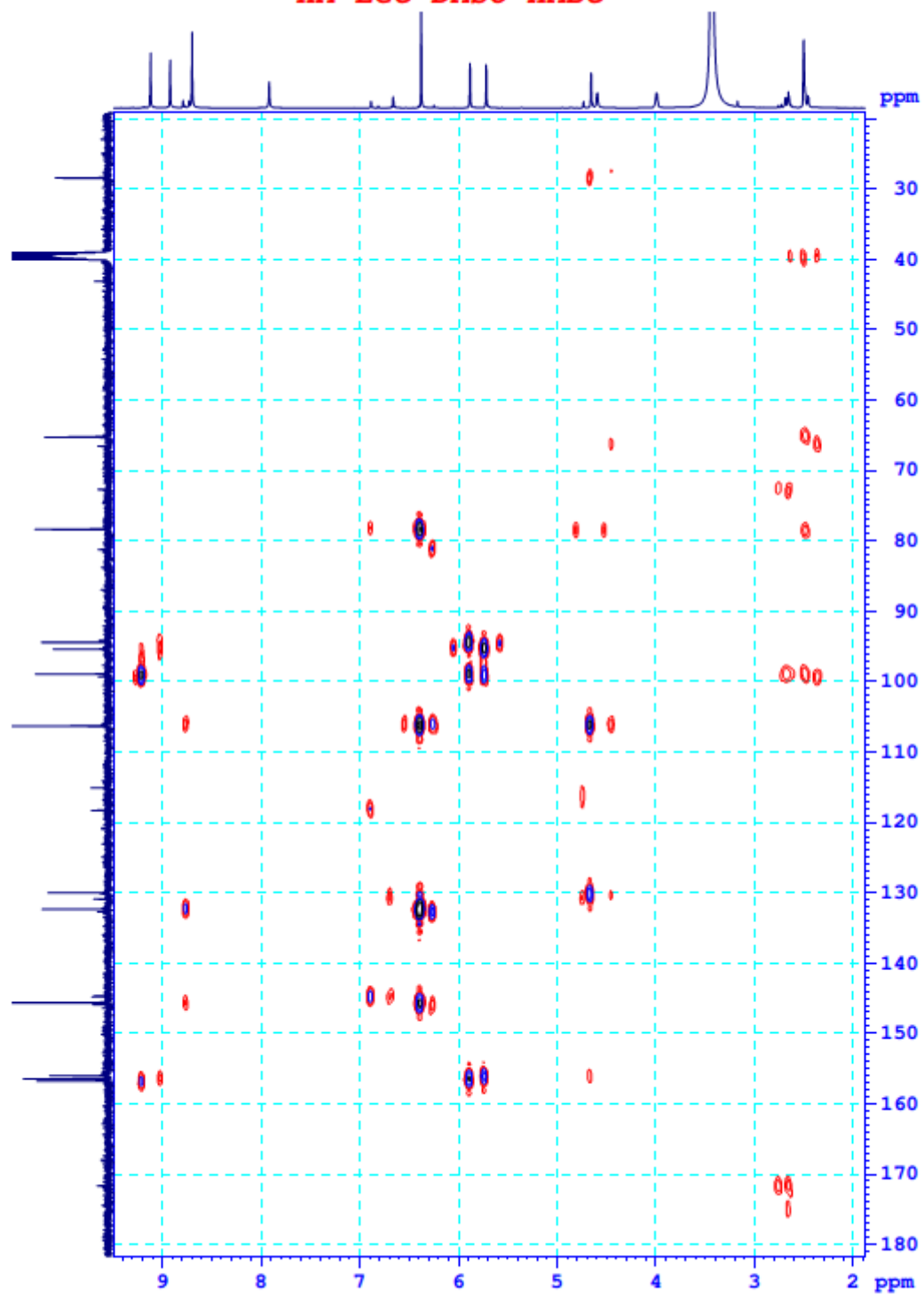
C13CPD



HA-EGC-DMSO-HSQC



HA-EGC-DMSO-HMBC



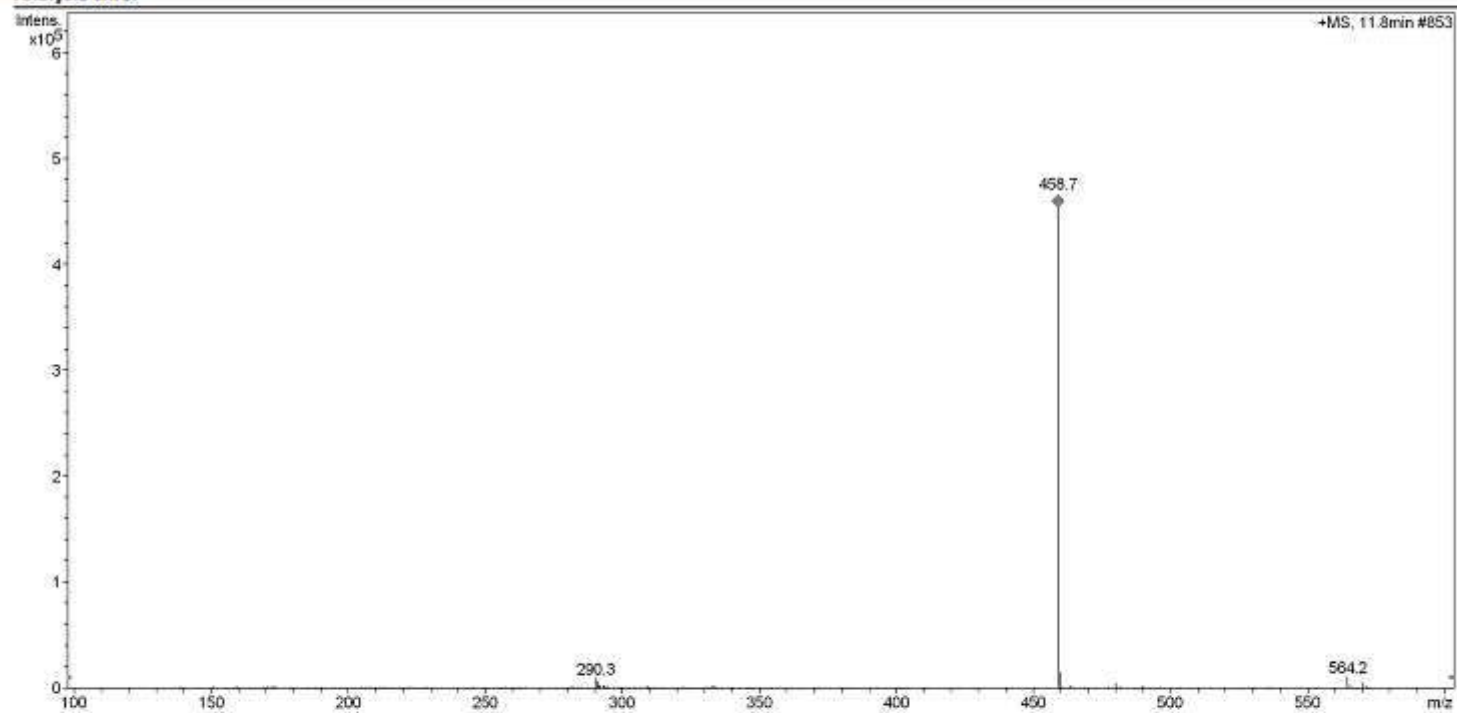
Phổ MS và NMR của epi-gallocatechin gallate (**EGCG**)

Display Report - Selected Window Selected Analysis

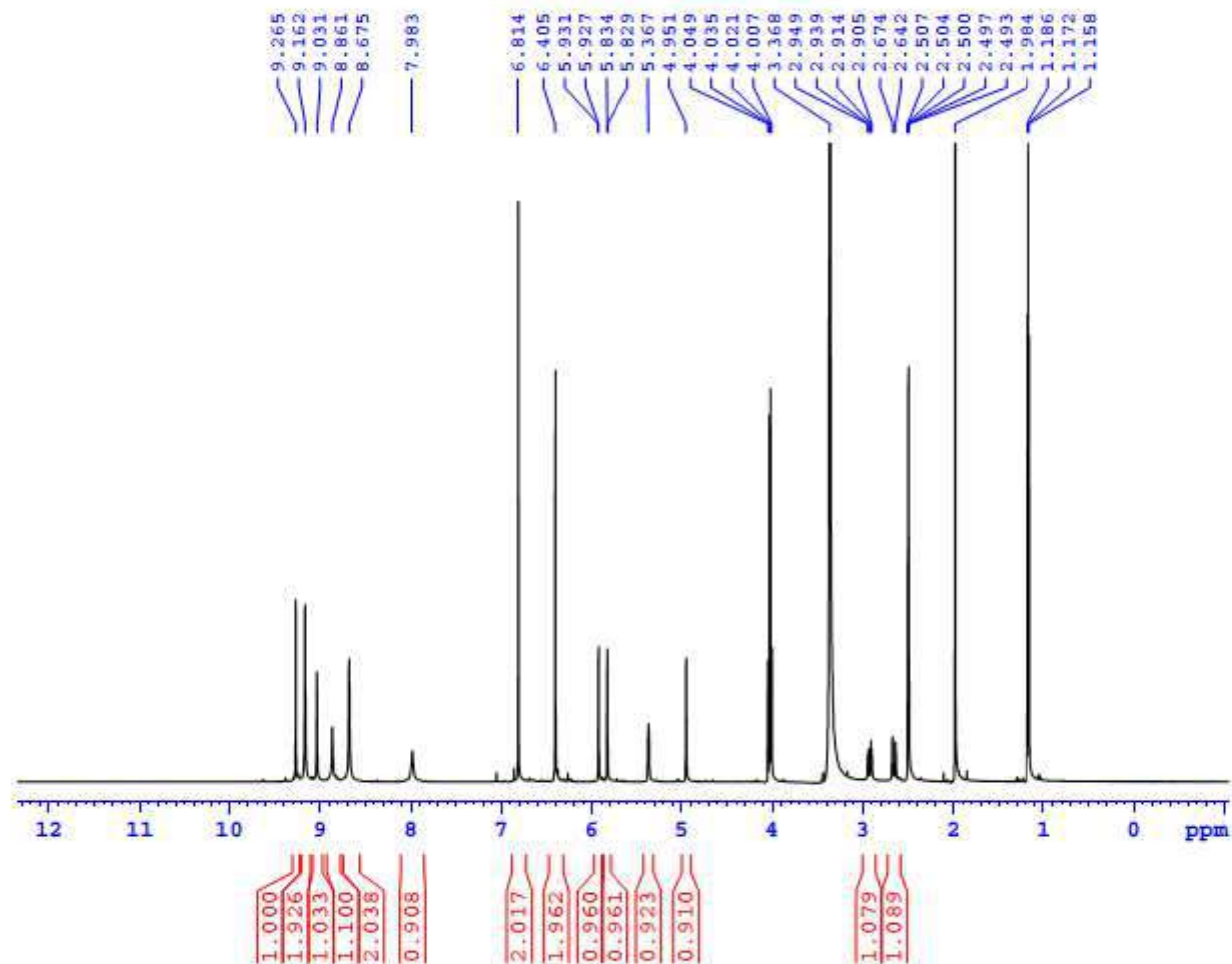
Analysis Name: EGCG.D
Method: TESTMAU_LC-MS.M
Sample Name: HA_EGCG
Analysis Info:

Instrument: Agilent 6310 Ion Trap
Operator: NAM_DANG

Print Date: 11/24/2012 4:08:47 PM
Acq. Date: 11/23/2012 4:12:20 PM



HA-EGCG-DMSO-1H



Current Data Parameters

NAME	HA-EGCG
EXPNO	1
PROCNO	1

F2 - Acquisition Parameters

Date_	20121128
Time	14.19
INSTRUM	av500
PROBHD	5 mm Multinucl
PULPROG	zg30
TD	65536
SOLVENT	DMSO
NS	16
DS	0
SWH	10000.000 Hz
FIDRES	0.152588 Hz
AQ	3.2769001 sec
RG	101.6
DW	50.000 usec
DE	6.00 usec
TE	303.2 K
D1	1.00000000 sec
MCREST	0.00000000 sec
MCWRK	0.01500000 sec

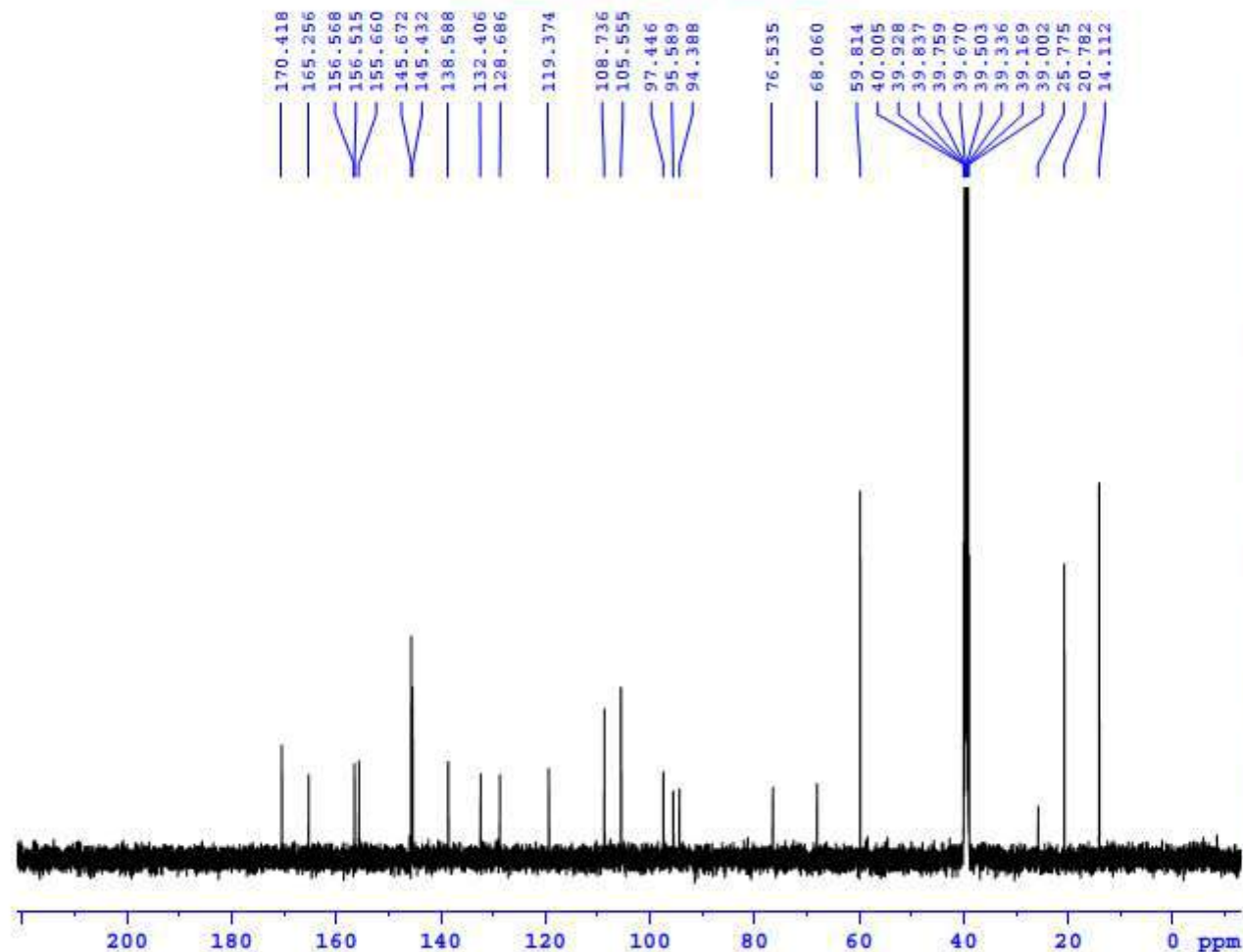
***** CHANNEL f1 *****

NUC1	1H
P1	10.50 usec
PL1	-3.00 dB
SFO1	500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters

SI	32768
SF	500.1300051 MHz
WDW	EM
SSB	0
LB	0.30 Hz
GB	0
PC	1.00

HA-EGCG-DMSO-C13CPD



Current Data Parameters
 NAME HA-EGCG
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date 20121128
 Time 14.28
 INSTRUM av500
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 128
 DS 2
 SWH 31446.541 Hz
 FIDRES 0.479836 Hz
 AQ 1.0420883 sec
 RG 8192
 DW 15.900 usec
 DE 6.00 usec
 TE 303.1 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999998 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRK 0.01500000 sec

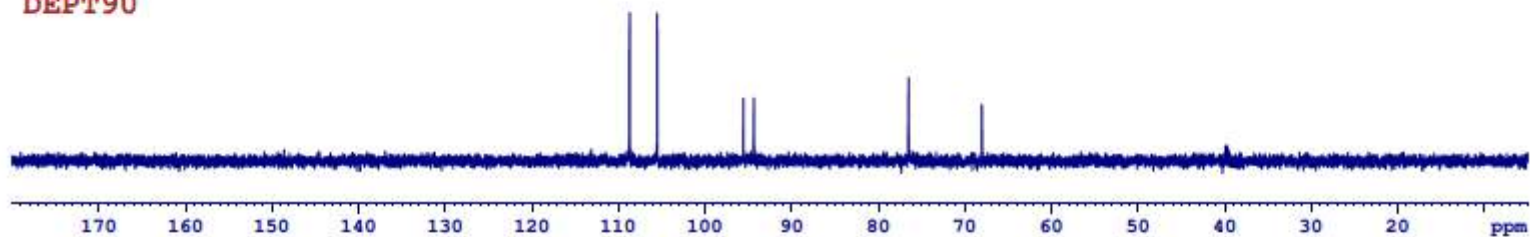
***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 13C
 P1 10.50 usec
 PL1 -1.00 dB
 SFO1 125.7716224 MHz

***** CHANNEL f2 *****
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 88.00 usec
 PL2 -3.00 dB
 PL12 14.68 dB
 PL13 22.00 dB
 SFO2 500.1320005 MHz

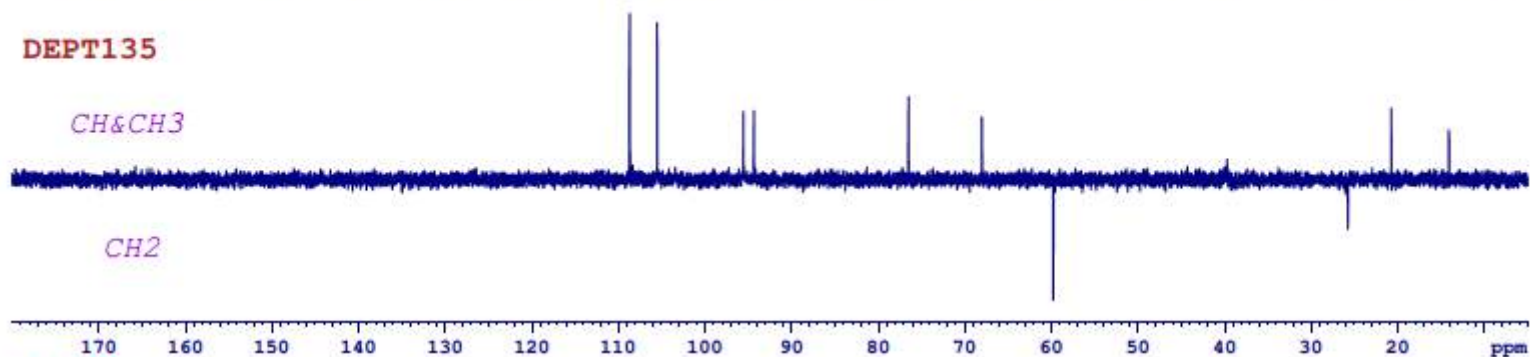
F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.7578423 MHz
 NDM EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

HAÆGCG-DMSO-C13CPD & DEPT

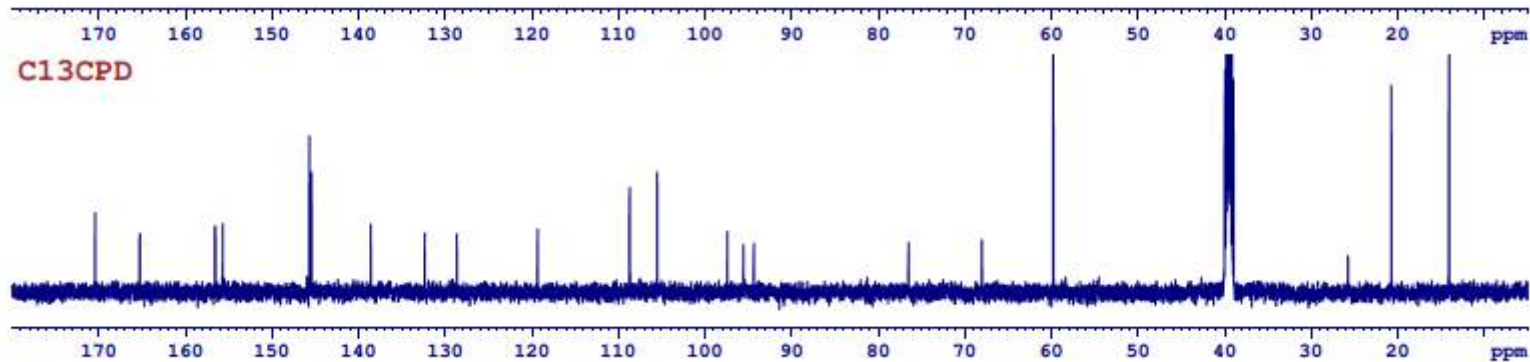
DEPT90



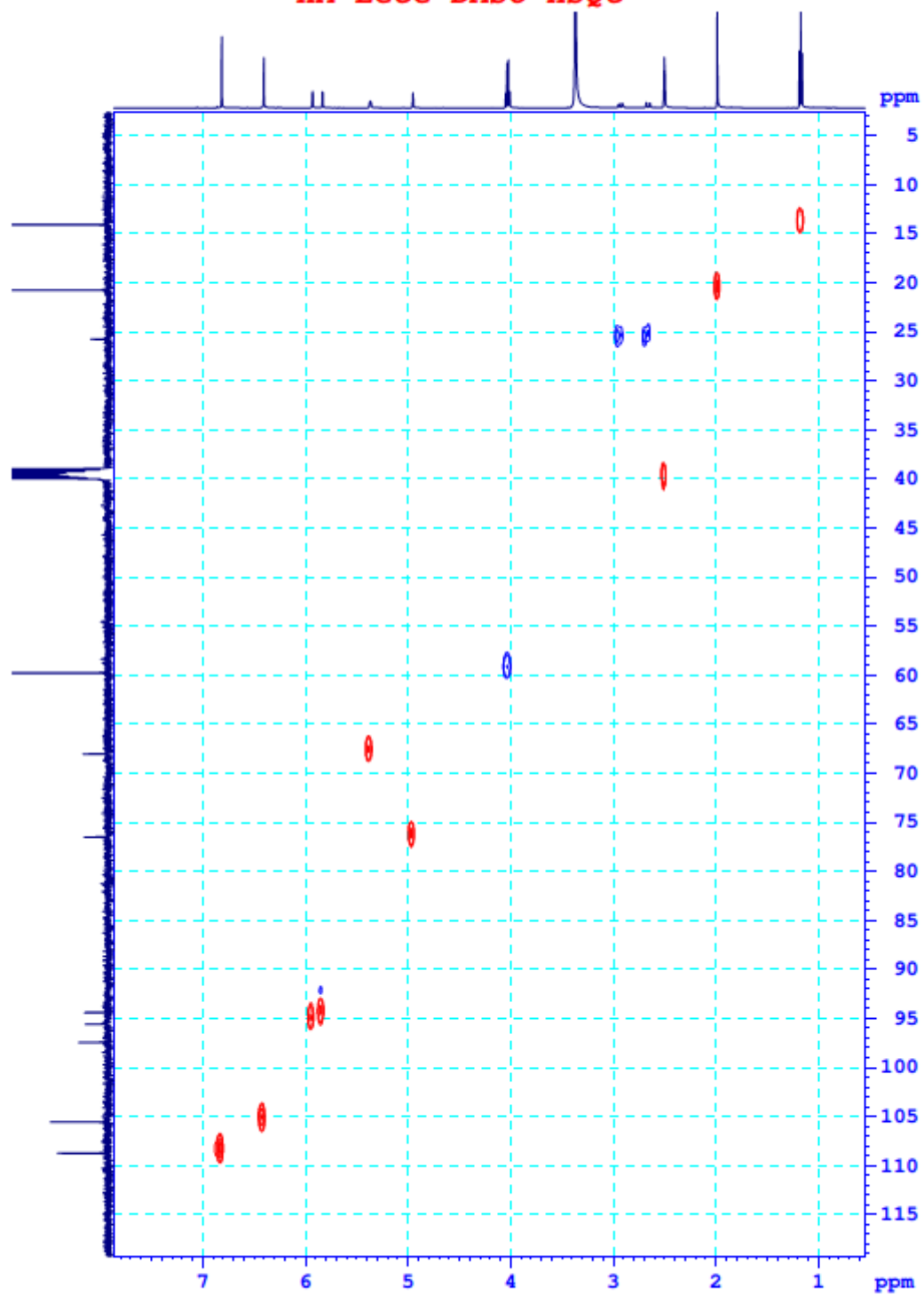
DEPT135



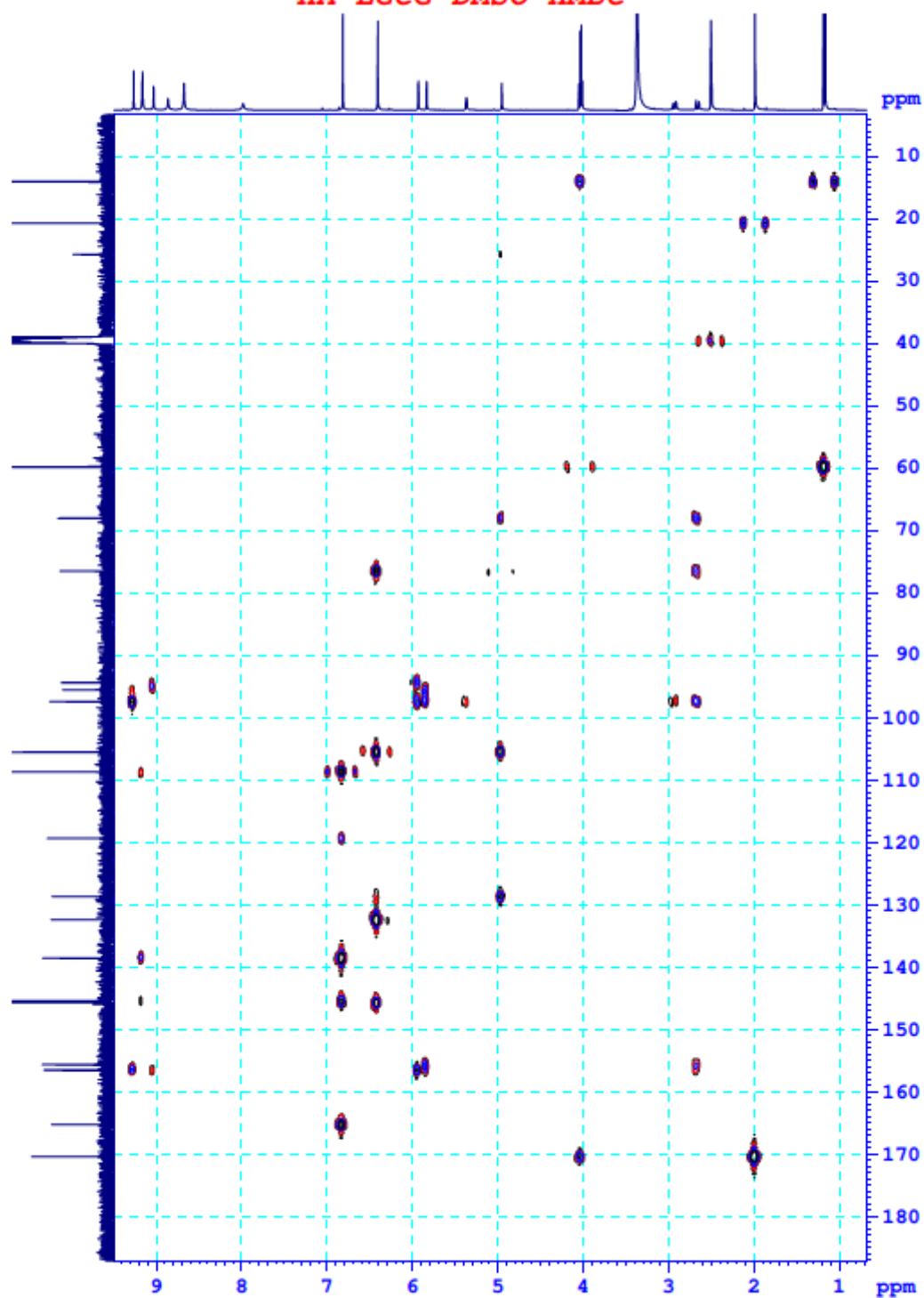
C13CPD



HA-EGCG-DMSO-HSQC

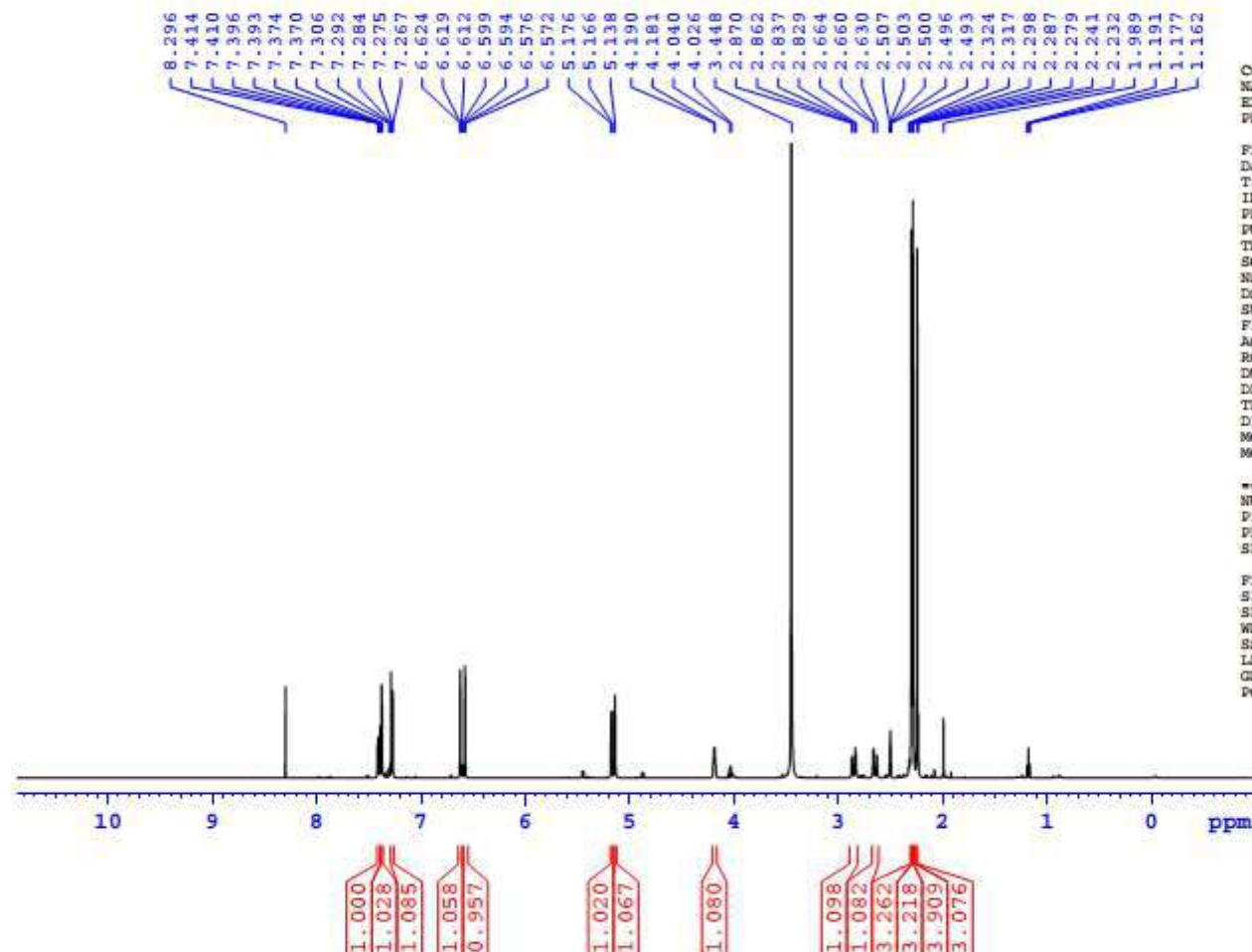


HA-EGCG-DMSO-HMBC



Phổ NMR của epi-Catechin acetate
(**EC acetate**)

Ha-Acyl-EC-DMSO-1H



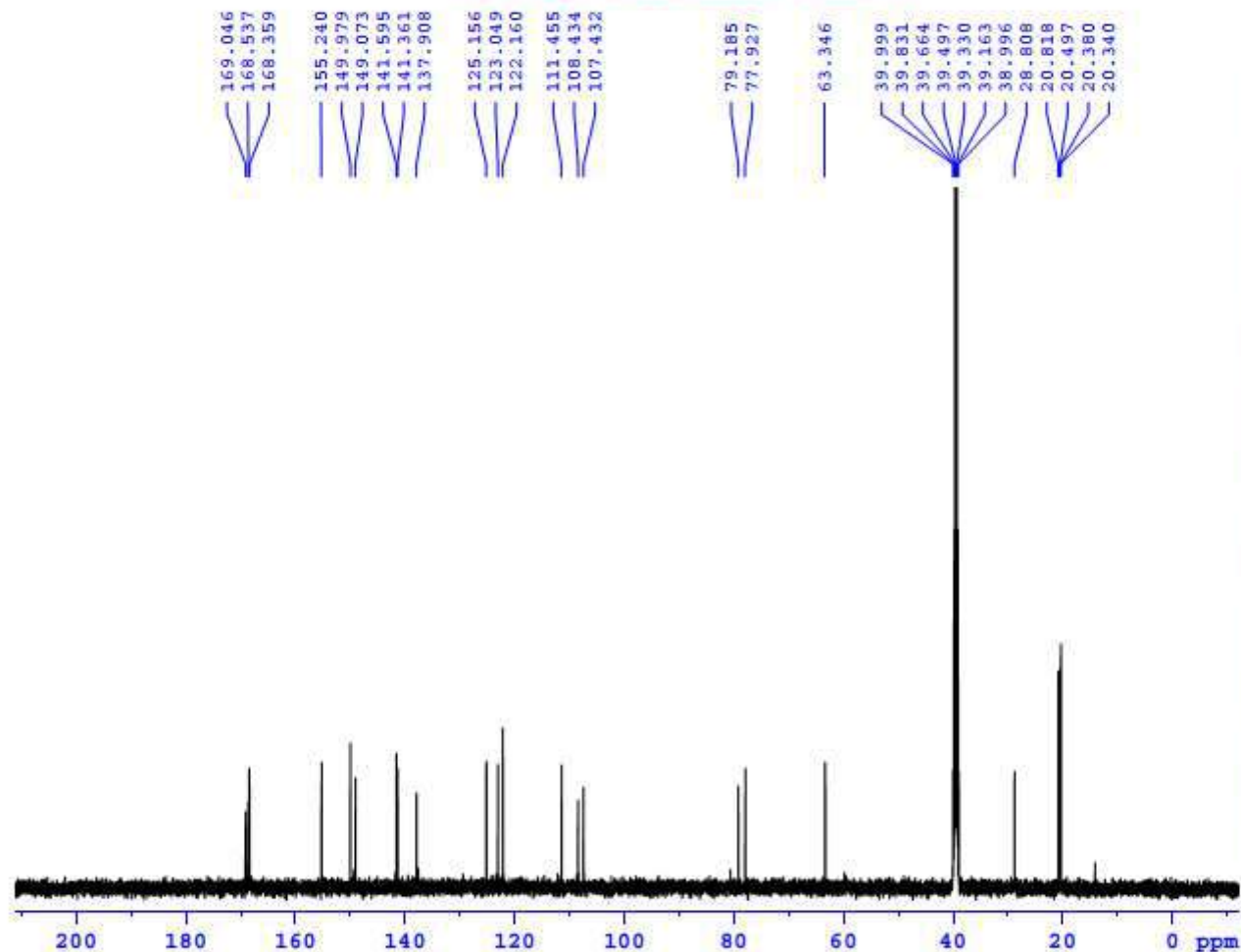
Current Data Parameters
 NAME Ha-Acyl-EC
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130729
 Time 10.58
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 16
 DS 0
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.152588 Hz
 AQ 3.2769001 sec
 RG 35.9
 DM 50.000 usec
 DE 6.00 usec
 TE 0.0 K
 D1 1.00000000 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRR 0.01500000 sec

***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 1H
 P1 10.40 usec
 PL1 0.00 dB
 SFO1 500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 500.1300057 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Ha-Acyl-EC-DMSO-C13CPD



Current Data Parameters
 NAME Ha-Acyl-EC
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date 20130729
 Time 11.05
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 128
 DS 2
 SWH 31446.541 Hz
 FIDRES 0.479836 Hz
 AQ 1.0420883 sec
 RG 32768
 DW 15.900 usec
 DE 6.00 usec
 TE 0.0 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999998 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRK 0.01500000 sec

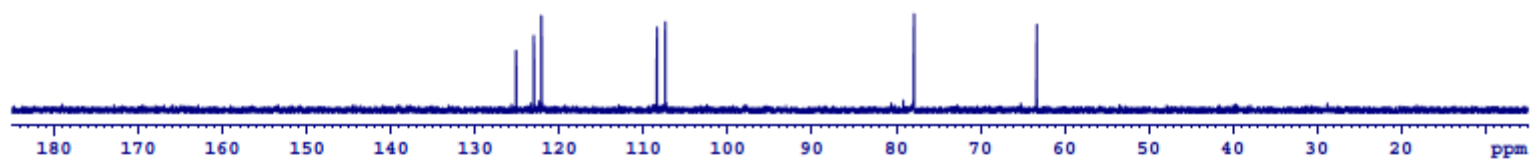
***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 13C
 P1 5.80 usec
 PL1 -1.00 dB
 SFO1 125.7716224 MHz

***** CHANNEL f2 *****
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 80.00 usec
 PL2 0.00 dB
 PL12 17.72 dB
 PL13 22.00 dB
 SFO2 500.1320005 MHz

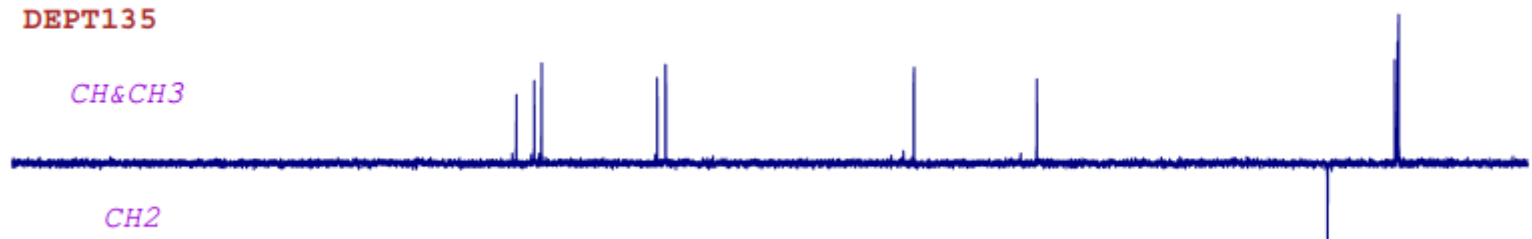
F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 125.7578403 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Ha-Acyl-EC-DMSO-C13CPDEPT

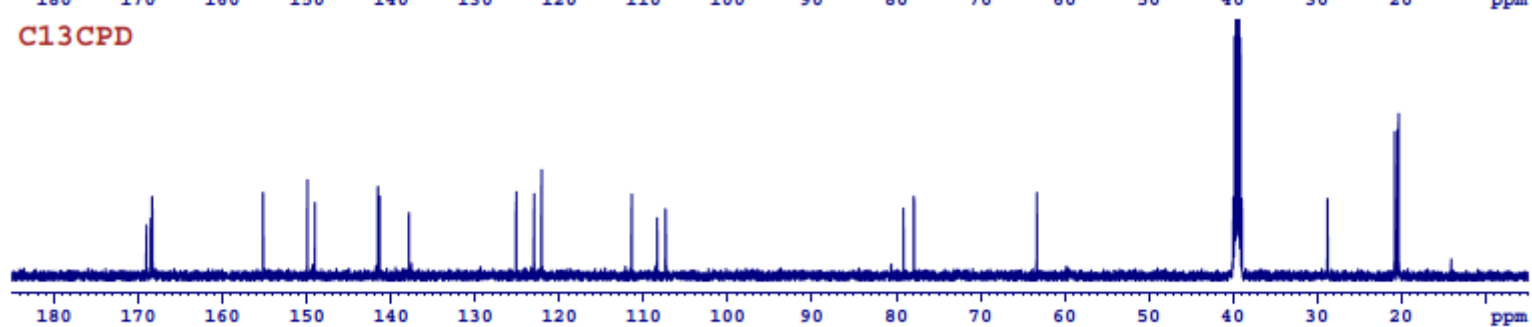
DEPT90



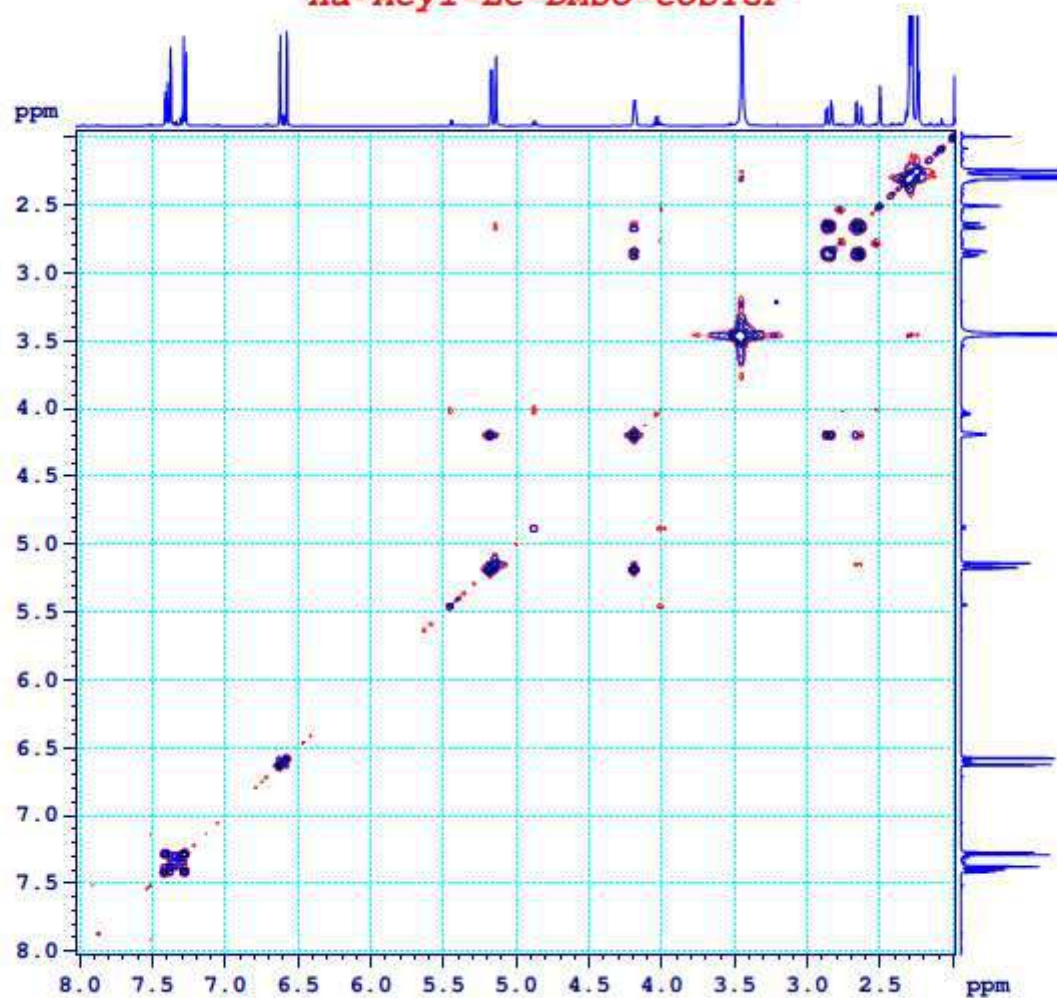
DEPT135



C13CPD



Ha-Acyl-EC-DMSO-COSYGP



Current Data Parameters

NAME	Ha-Acyl-EC
EXPNO	5
PROCNO	1

F2 - Acquisition Parameters

Date_	20130729
Time	11.10
INSTRUM	spect
PROBHD	5 mm Multinucl
PULPROG	cosygpuf
TD	32768
SOLVENT	DMSO
NS	2
DS	8
SWH	5000.000 Hz
FIDRES	2.441406 Hz
AQ	0.2049500 sec
RG	71.8
DM	100.000 usec
DE	6.00 usec
TE	300.2 K
DO	0.00000300 sec
D1	1.48689198 sec
d11	0.00000400 sec
D16	0.00000000 sec
TD0	0.00000000 sec
MCREST	0.00000000 sec
MCNEX	1.48689198 sec

***** CHANNEL f1 *****

NUC1	1H
PC	10.40 usec
PL	10.40 usec
PL1	0.00 dB
SP01	500.1322504 MHz

***** GRADIENT CHANNEL *****

GP0A01	SINK.100
GP0A02	SINK.100
GP01	0.00 %
GP02	0.00 %
GP03	0.00 %
GP04	0.00 %
GP05	10.00 %
GP06	10.00 %
PL6	1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters

HD0	1
TD	32768
SP01	500.1323 MHz
FIDRES	19.531250 Hz
SN	9.997 ppm
PhMODE	QF

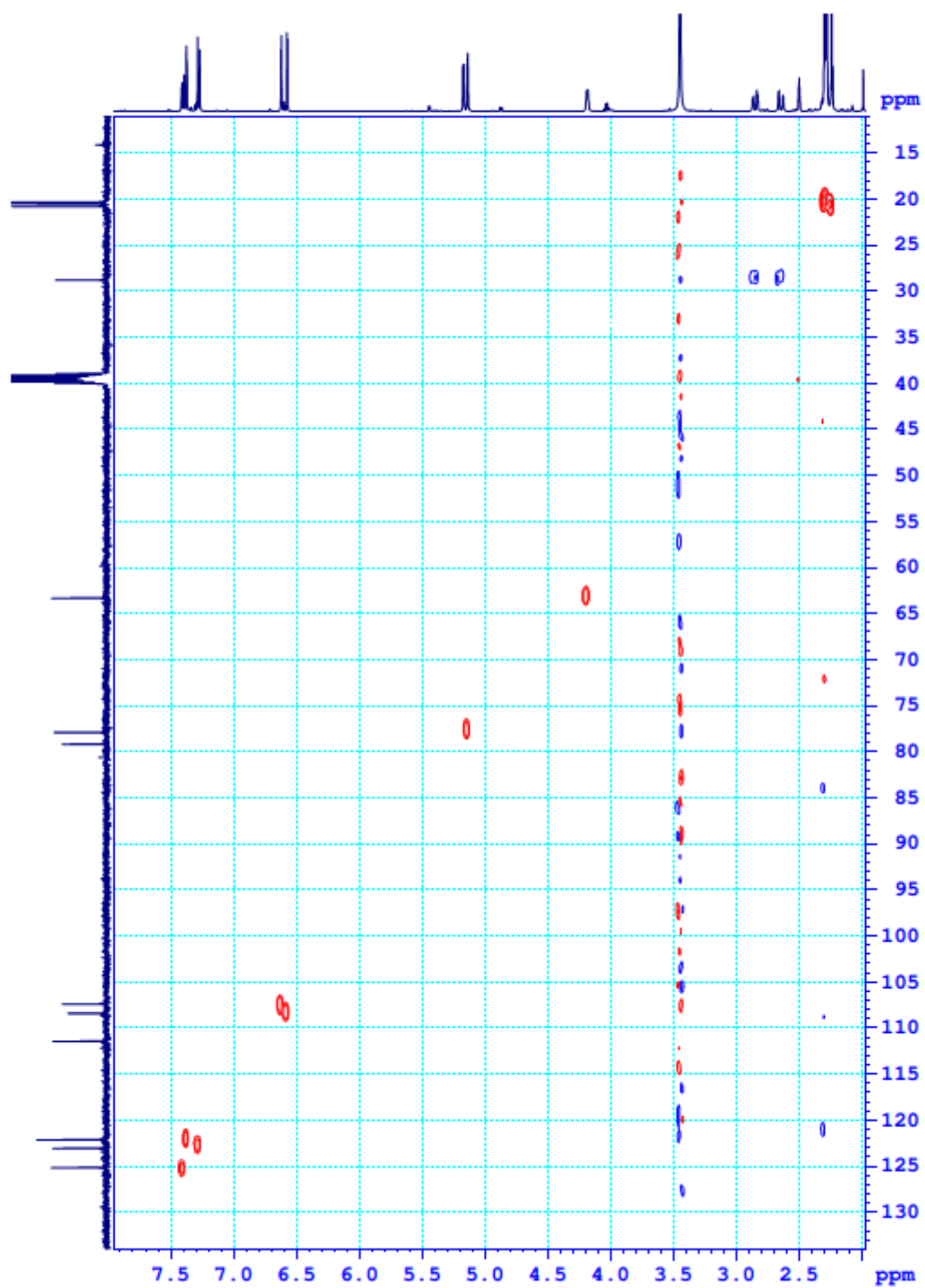
F2 - Processing parameters

SI	1024
SF	500.1300035 MHz
WDW	SINK
SSB	0
LB	0.00 Hz
GB	0
PC	1.40

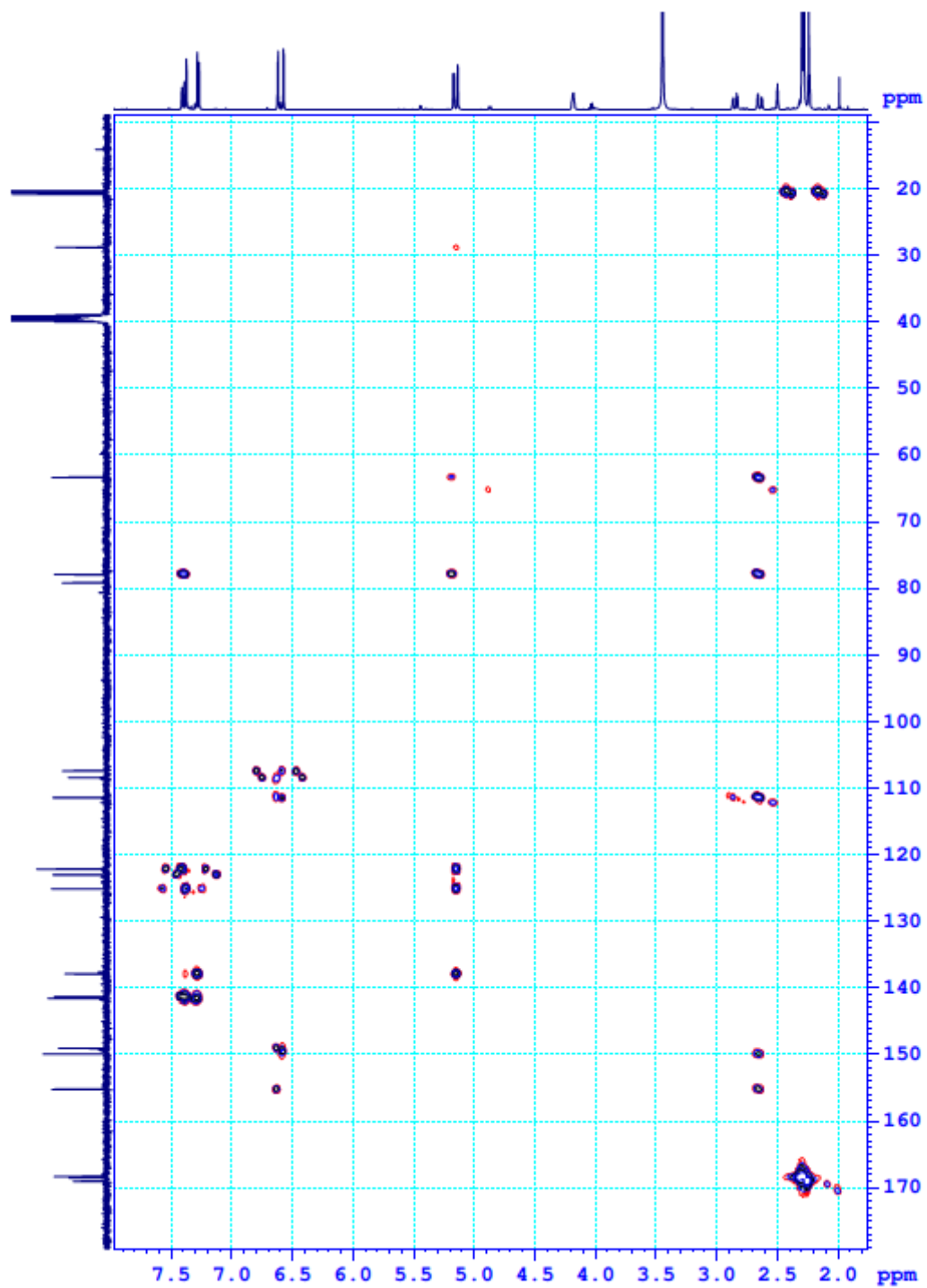
F1 - Processing parameters

SI	1024
MC2	QF
SF	500.1300027 MHz
WDW	SINK
SSB	0
LB	0.00 Hz
GB	0

Ha-Acyl-EC-DMSO-HSQC

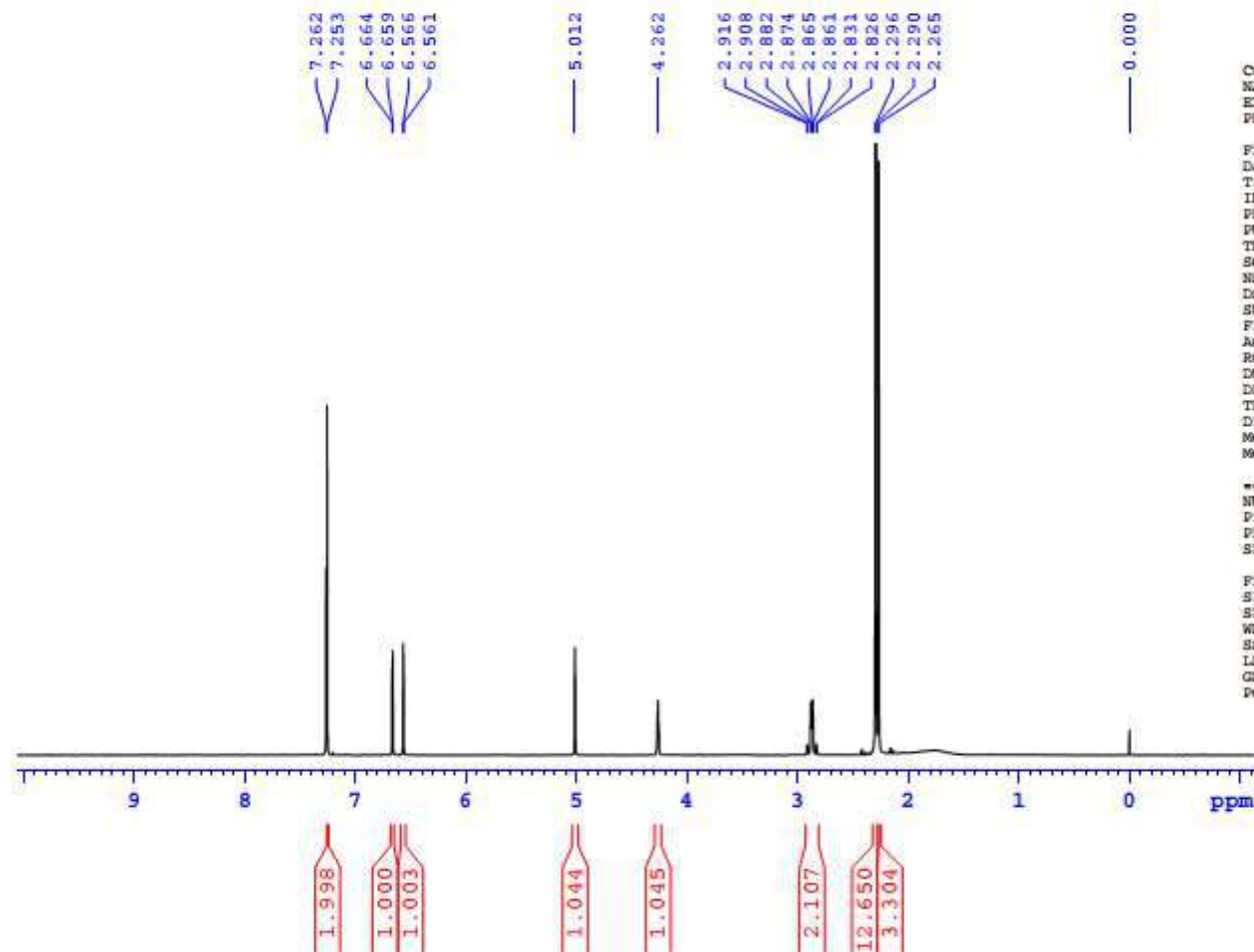


Ha-Acyl-EC-DMSO-HMBC



Phổ NMR của epi-Gallocatechin acetate
(**EGC acetate**)

Ha-Acyl-EGC-CDCl3-1H



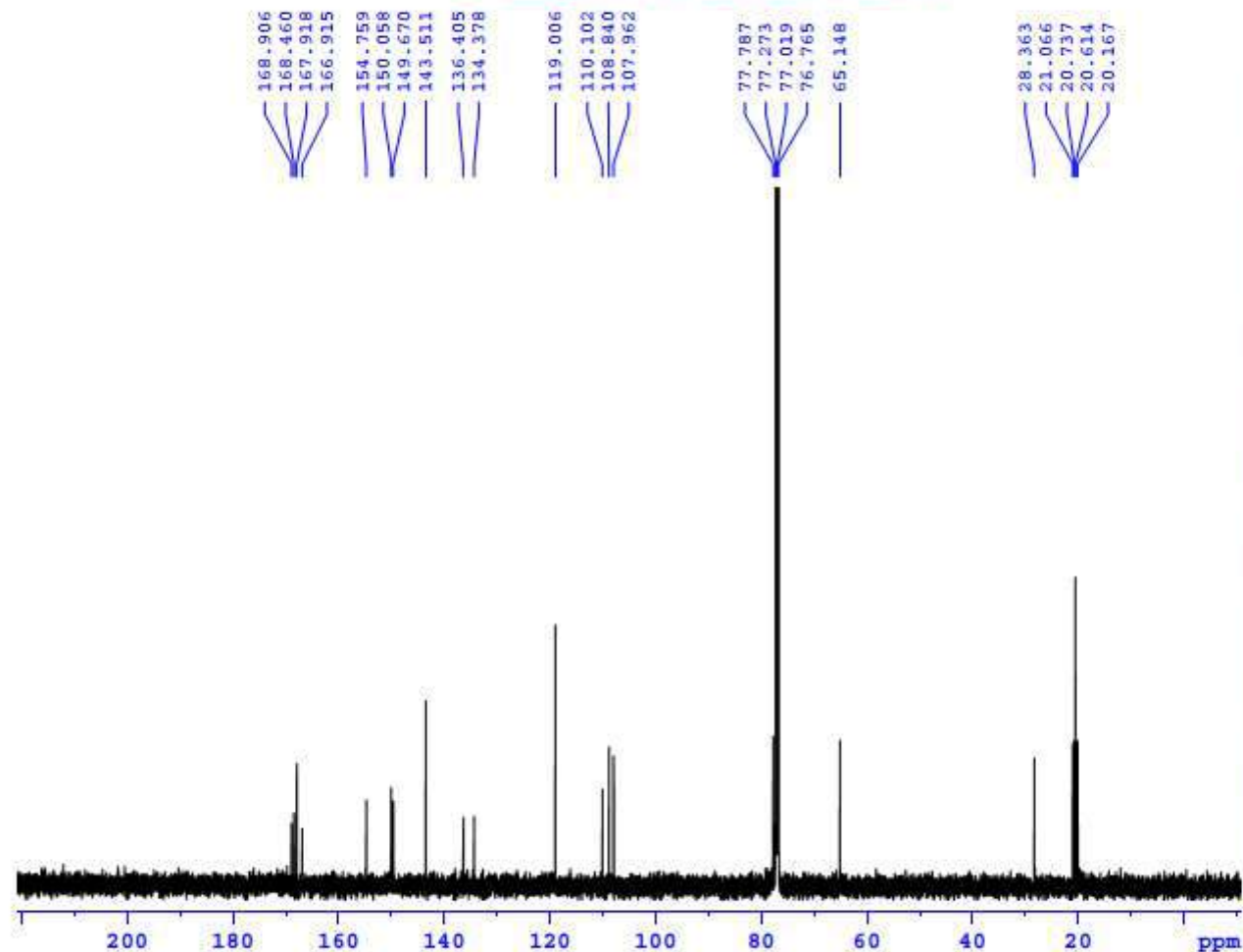
Current Data Parameters
 NAME Ha-Acyl-EGC
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130824
 Time 11.32
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 0
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.152588 Hz
 AQ 3.2769001 sec
 RG 228.1
 DM 50.000 usec
 DE 6.00 usec
 TE 0.0 K
 D1 1.00000000 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRR 0.01500000 sec

***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 1H
 P1 9.80 usec
 PL1 0.00 dB
 SFO1 500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 500.1300124 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Ha-Acyl-EGC-CDC13-C13CPD



Current Data Parameters
 NAME Ha-Acyl-EGC
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date 20130824
 Time 11.46
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDC13
 NS 512
 DS 2
 SWH 31446.541 Hz
 FIDRES 0.479836 Hz
 AQ 1.0420883 sec
 RG 32768
 DW 15.900 usec
 DE 6.00 usec
 TE 0.0 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999998 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRK 0.01500000 sec

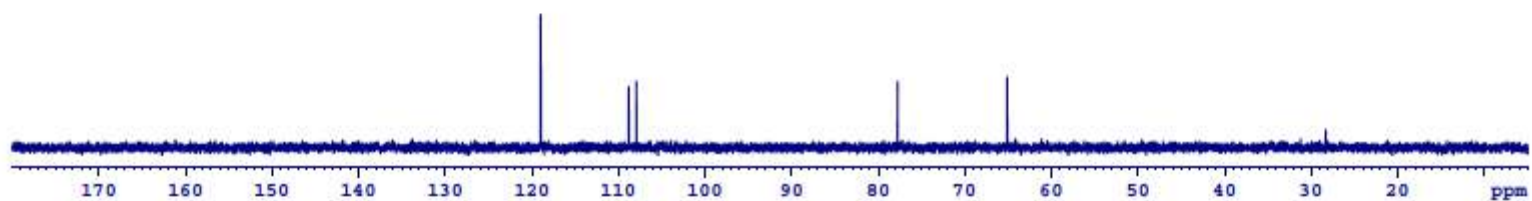
***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 13C
 P1 5.80 usec
 PL1 -1.00 dB
 SFO1 125.7716224 MHz

***** CHANNEL f2 *****
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 80.00 usec
 PL2 0.00 dB
 PL12 18.24 dB
 PL13 22.00 dB
 SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 125.7577897 MHz
 NDM 0
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Ha-Acyl-EGC-CDC13-C13CPD&DEPT

DEPT90



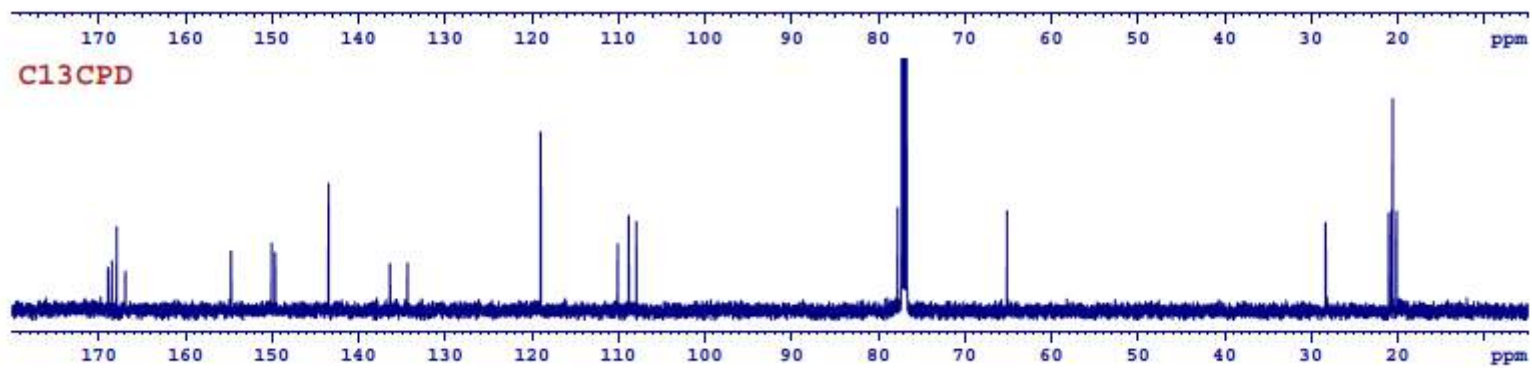
DEPT135



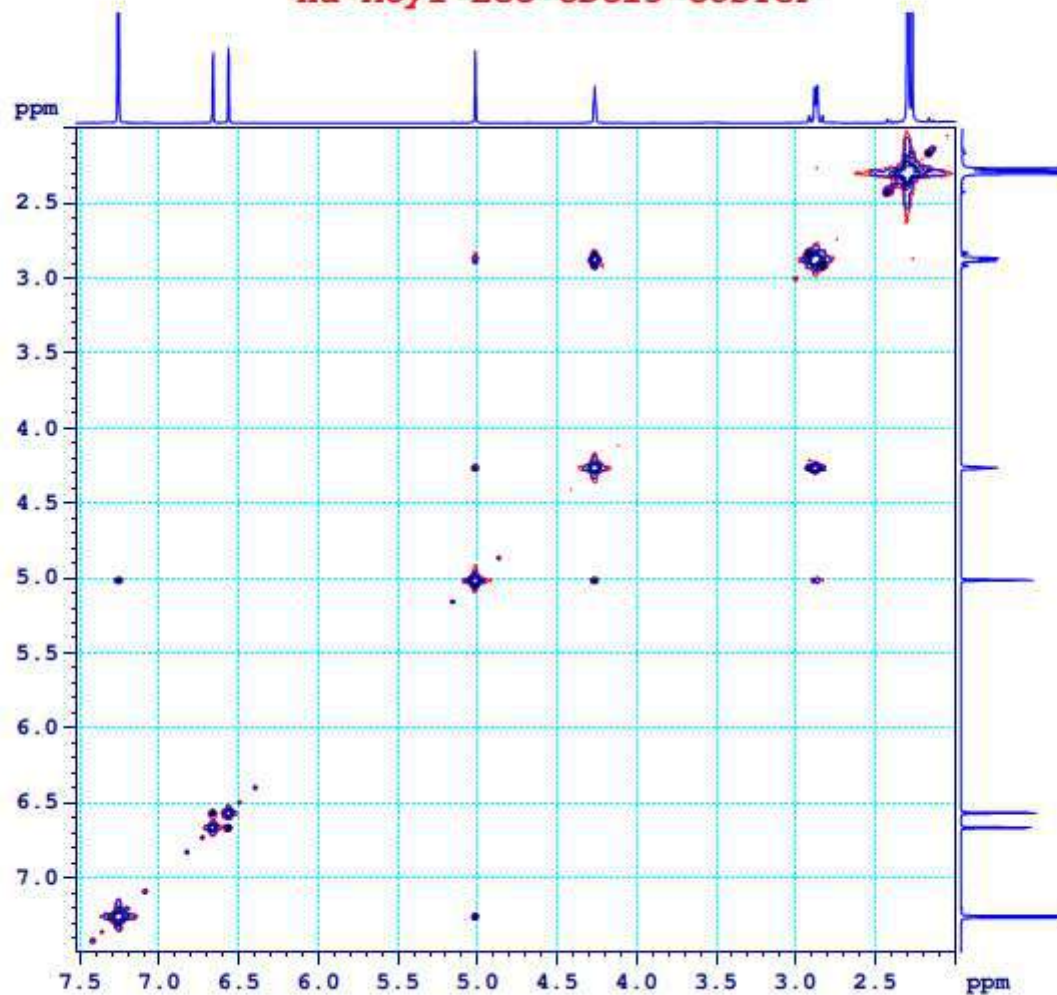
CH&CH3

CH2

C13CPD



Ha-Acyl-EGC-CDC13-COSYGP



```

Current Data Parameters
NAME      Ha-Acyl-EGC
EXPNO     5
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20130824
Time      12.10
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Multinucl
PULPROG   cosyppuf
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         2
DS         8
SWH        5000.000 Hz
FIDRES     2.441406 Hz
AQ         0.2049500 sec
RG         362
DM         100.000 usec
DE         6.00 usec
TE         300.2 K
d0         0.00000300 sec
D1         1.48689198 sec
d11        0.00000400 sec
D16        0.00000000 sec
TBD        0.00000000 sec
MCREST     0.00000000 sec
MCWREX     1.48689198 sec

***** CHANNEL f1 *****
NUC1       1H
PC         9.80 usec
PL         9.80 usec
PL1        0.00 dB
SFO1       500.1322504 MHz

***** GRADIENT CHANNEL *****
GPMU1      SINK.100
GPMU2      SINK.100
GPX1       0.00 %
GPX2       0.00 %
GPY1       0.00 %
GPY2       0.00 %
GPZ1       10.00 %
GPZ2       10.00 %
PL6        1000.00 usec

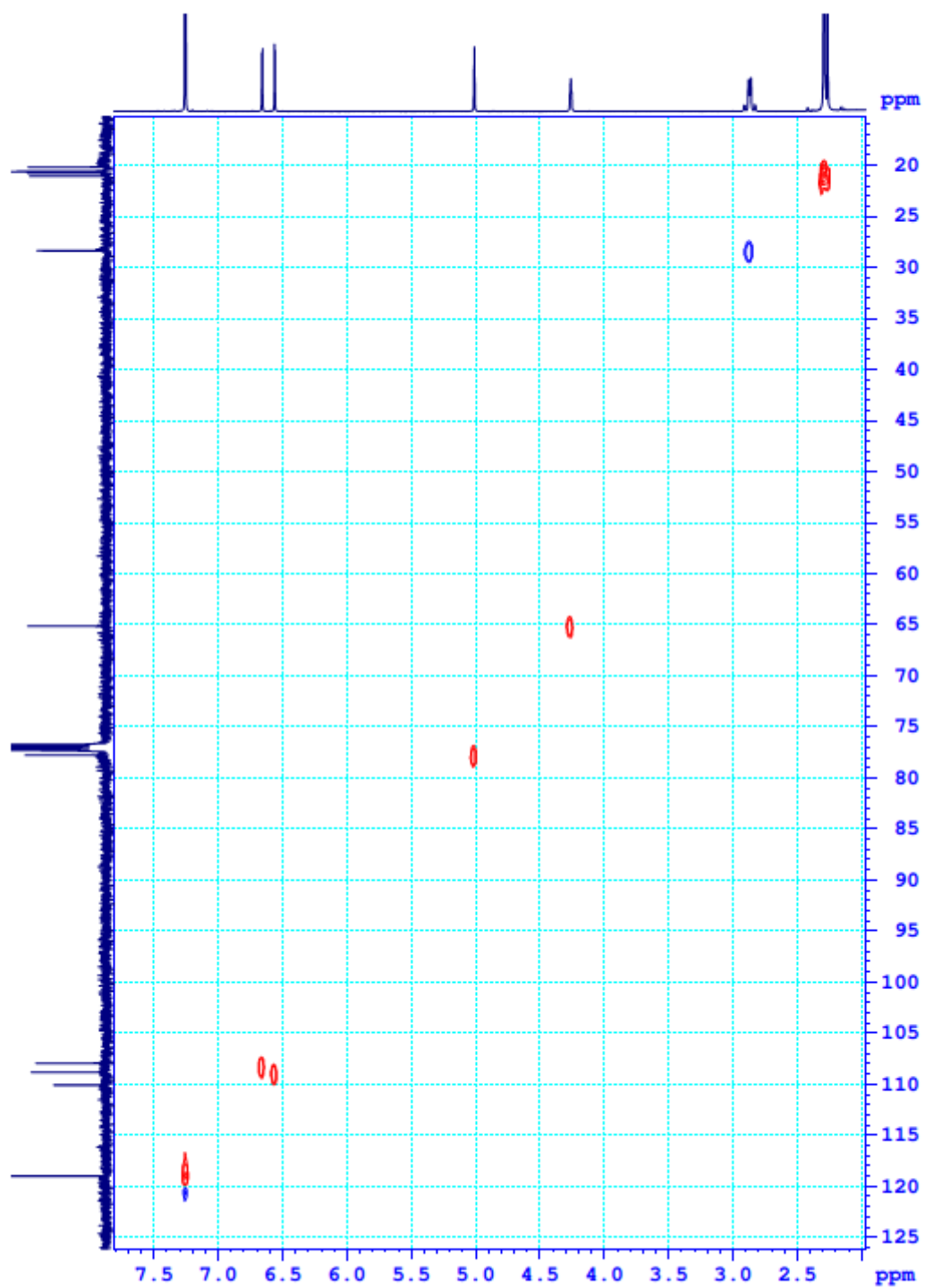
F1 - Acquisition parameters
RG      1
TD      32768
SFO1    500.13213 MHz
FIDRES   19.531250 Hz
SN       9.997 ppm
PhMODE   QF

F2 - Processing parameters
SI      1024
SF      500.1300128 MHz
WDW     SINK
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB        0
PC       1.40

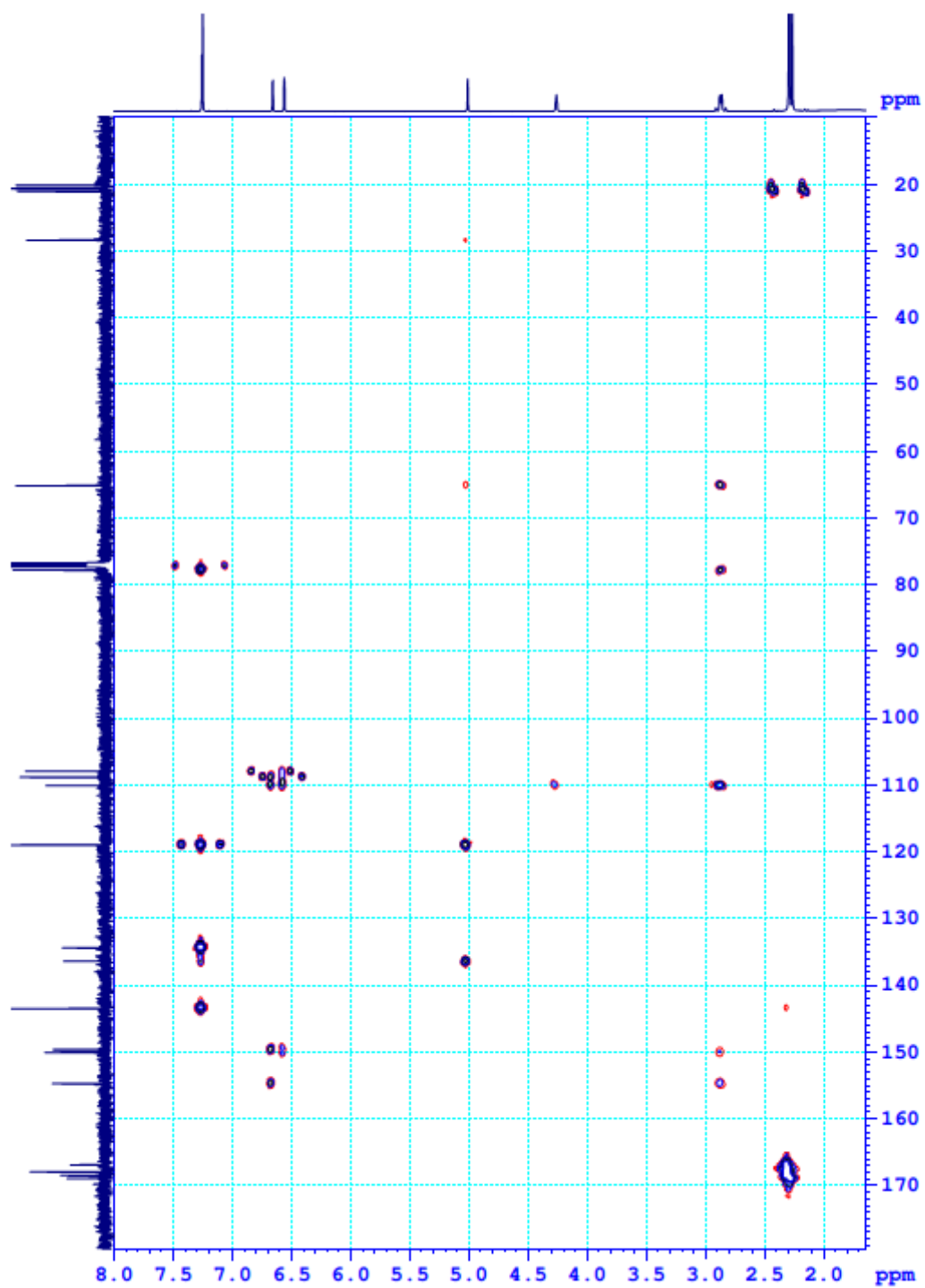
F1 - Processing parameters
SI      1024
RG      362
SF      500.1300122 MHz
WDW     SINK
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB        0

```

Ha-Acyl-EGC-CDCl3-HSQC

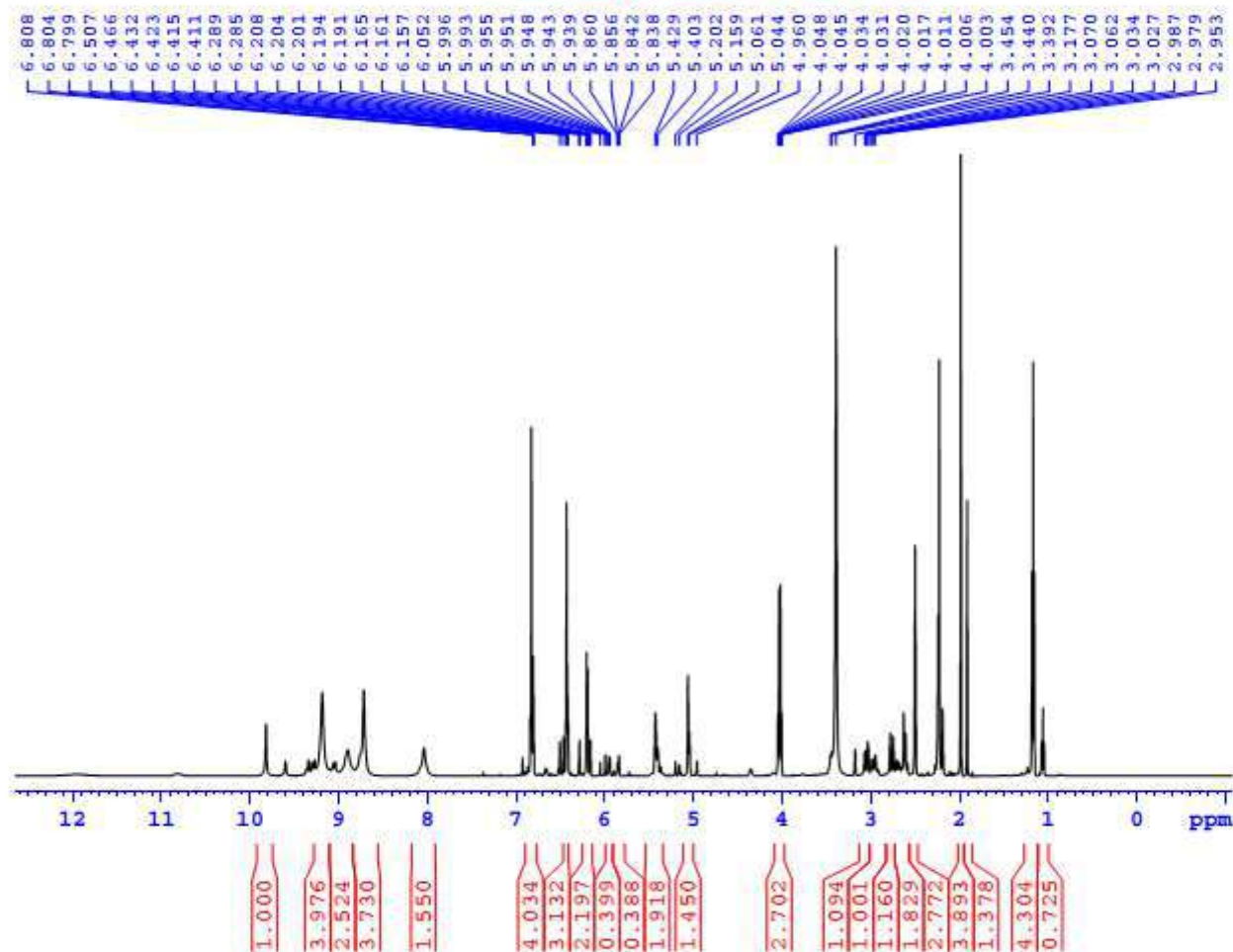


Ha-Acyl-EGC-CDCl3-HMBC



Phổ NMR của epi-Gallocatechin gallate,
O-octaacetyl (**EGCG acetate**)

Ha-Acyl-EGCG-DMSO-1H



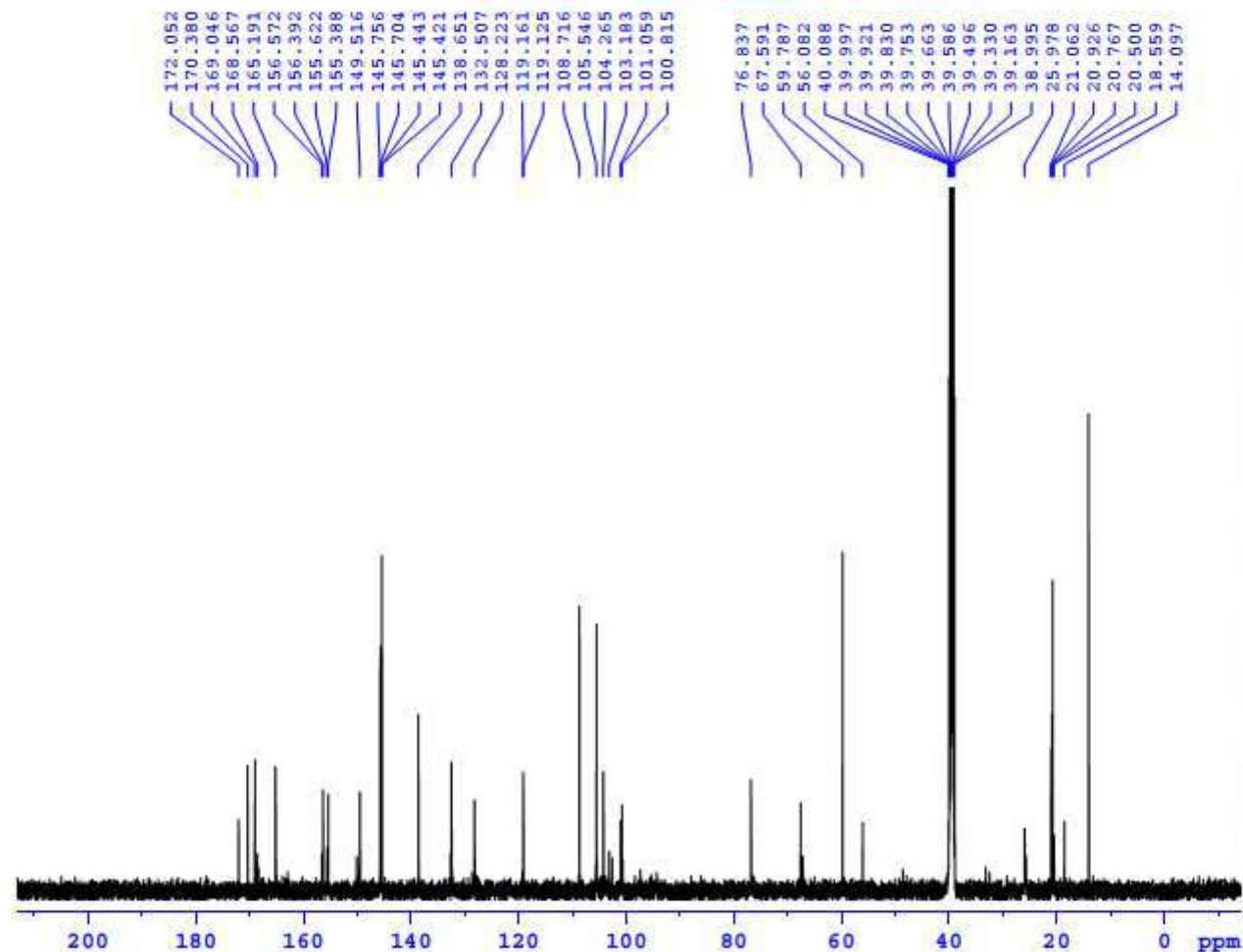
Current Data Parameters
NAME Ha-Acyl-EGCG
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20131116
Time 11.40
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 0
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2769001 sec
RG 80.6
DW 50.000 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
P1 10.30 usec
PL1 -1.00 dB
SFO1 500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300072 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Ha-Acyl-EGCG-DMSO-C13CPD



Current Data Parameters
NAME Ha-Acyl-EGCG
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20131116
Time 12.16
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 512
DS 2
SWH 31446.541 Hz
FIDRES 0.479836 Hz
AQ 1.0420883 sec
RG 32768
DW 15.900 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 1.89999998 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

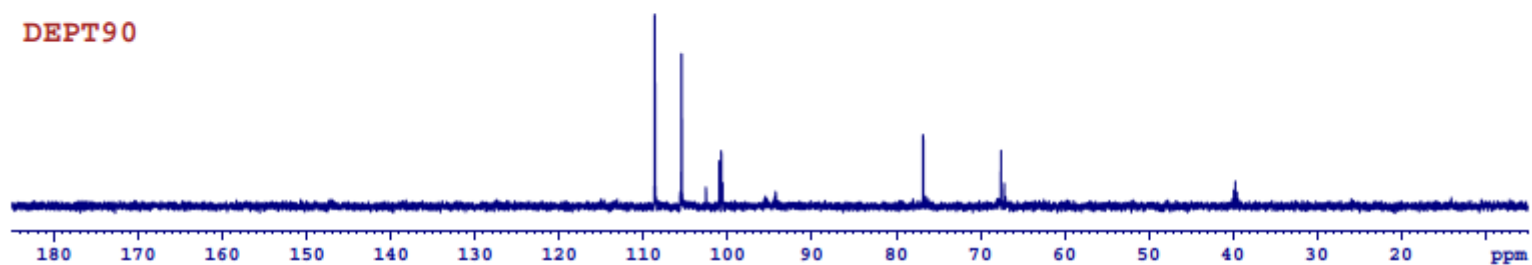
***** CHANNEL f1 *****
NUC1 13C
P1 5.20 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 125.7716224 MHz

***** CHANNEL f2 *****
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -1.00 dB
PL12 16.81 dB
PL13 22.00 dB
SFO2 500.1320005 MHz

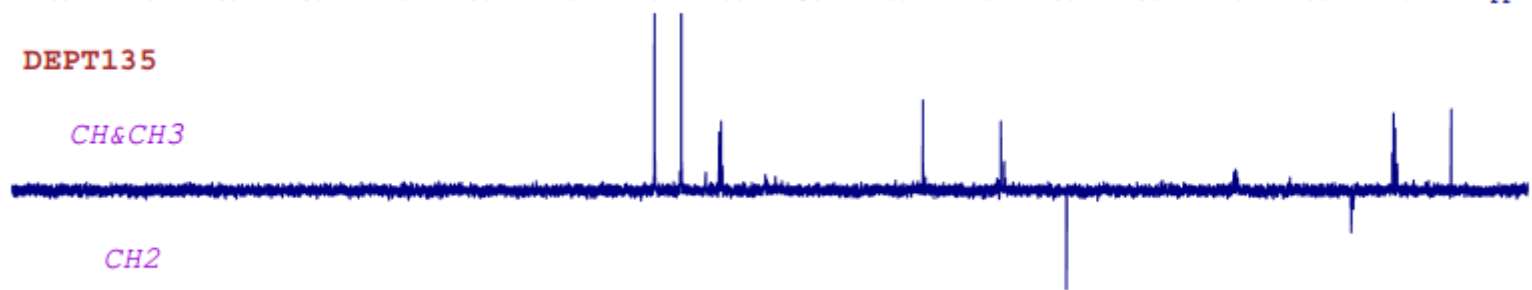
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7578451 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Ha-Acyl-EGCG-DMSO-C13CPD&DEPT

DEPT90



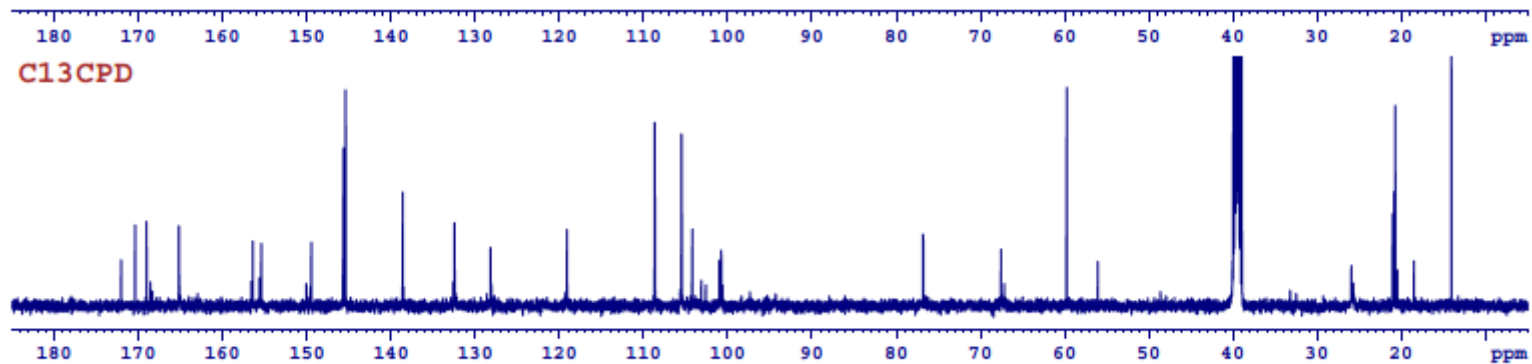
DEPT135



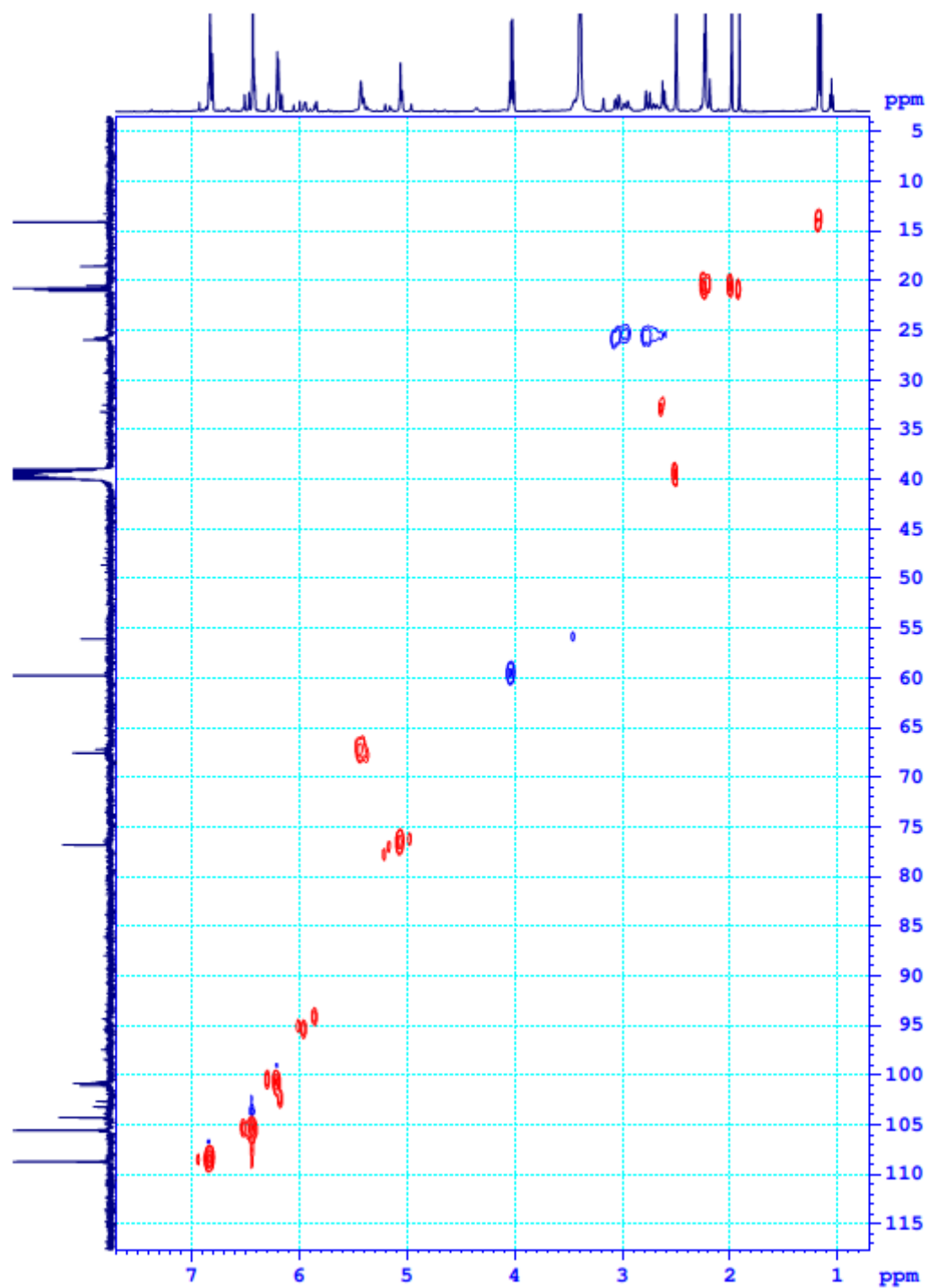
CH&CH3

CH2

C13CPD



Ha-Acyl-EGCG-DMSO-HSQC



Ha-Acyl-EGCG-DMSO-HMBC

