

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 học Hữu cơ

Mã số: 62.44.01.14

BẢN TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ HÓA HỌC

1. Ý nghĩa của 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 biệt dược 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. 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.

Từ những năm 2000, các cơ sở nghiên cứu trong nước như 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 cũng đã bắt đầu triển khai 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. 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.

Mục đích của luận án này là “*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.

2. Đối tượng và nhiệm vụ của luận án

Đối tượng nghiên cứu của luận án là Chè xanh (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze.), hệ thống công nghệ chiết xuất catechin chè xanh và các catechin được chiết xuất từ chè xanh.

Nhiệm vụ chính của 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 acyl hóa;
- Phân tích đánh giá cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của một số hoạt chất chọn lọc từ các chất nêu trên.

3. Những đóng góp mới của luận án

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; 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.

4. Bộ cục của luận án

Luận án gồm 163 trang với 18 bảng số liệu và 50 hình ảnh, sơ đồ. Kết cấu của luận án gồm: Mở đầu (2 trang); Tổng quan tài liệu (27 trang); Thực nghiệm (25 trang); Kết quả & Thảo luận (46 trang); Kết luận (2 trang); Đóng góp mới (2 trang); Tài liệu tham khảo (8 trang, dẫn 76 tài liệu); Danh mục các công trình đã công bố của tác giả. Ngoài ra còn có phần phụ lục nêu ảnh chi tiết phổ NMR của các hoạt chất đã được nghiên cứu trong luận án.

II. NỘI DUNG LUẬN ÁN

MỞ ĐẦU

Phần mở đầu đề cập đến ý nghĩa khoa học, tính thực tiễn, mục tiêu và nhiệm vụ nghiên cứu của luận án.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

Phần này tổng hợp các nghiên cứu trong nước và quốc tế về các vấn đề:

- + Tổng quan về Chè xanh, thành phần hóa học ứng dụng của các sản phẩm chè;
- + Thành phần Catechin, hoạt tính sinh học và các nghiên cứu ứng dụng trong mỹ phẩm, dược thực phẩm của EGCG và các ứng dụng trong mỹ phẩm, dược thực phẩm của EGCG và các catechin chè xanh;
- + Tổng quan về các nghiên cứu công nghệ chiết tách và điều chế các catechin và dẫn xuất.

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 %; xay mịn đến kích thước dưới rây 1,5 mm; đóng vào túi HDPE kín, hút chân không, bảo quản trong tối ở nhiệt độ < 25°C.

B/ Catechin tổng số từ chè xanh:

Catechin tổng số được chiết tách từ chè xanh trong quá trình thực hiện luận án, màu vàng nhạt, hàm lượng tổng phenolic đạt > 90 % theo HPLC. 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; (-)-epigallocatechin; (-)-epigallocatechin-3-O-gallate.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị

Mục này đã đề cập ở chương 2, phần 2.2.1 trang 32 của luận án. Nêu các hóa chất cơ bản và thiết bị thí nghiệm, triển khai đã sử dụng trong quá trình nghiên cứu.

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, tóm tắt như sau:

Bột Chè được 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 theo thời gian và tỷ lệ 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 ống chiết trong khi bã (gần như không còn dung môi) được tháo ra ở một đầu bên kia.

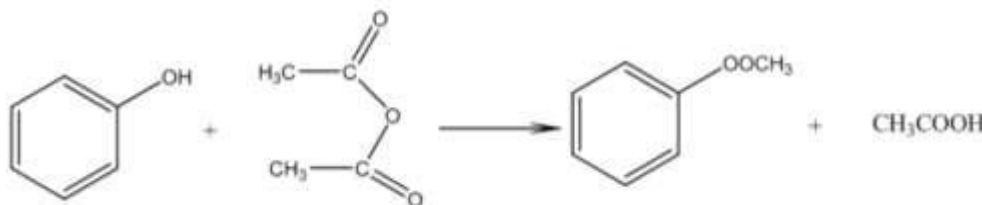
2.2.3. Các phương pháp phân tách catechin

Các catechin và EGCG được nghiên cứu và tối ưu hóa công nghệ 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.

2.2.4. Phương pháp acyl hóa catechin

Phản ứng acyl hóa là quá trình thay thế nguyên tử H ở nhóm chức -OH, -NH₂ ...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 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 một chiều không tái tạo lại phenol.

2.2.5. Các phương pháp phân tích sản phẩm

Sắc kí lớp mỏng (SKLM):

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên lớp mỏng Silica gen với các hệ dung môi thích hợp. Chỉ thị bằng UV/Vis 360 nm và thuốc hiện Von's.

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-Trap-SL Agilen 1100, Viện Hóa học, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân:

EGCG 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 ^{13}C 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 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. Đã xây dựng thiết kế nghiên cứu cụ thể là:

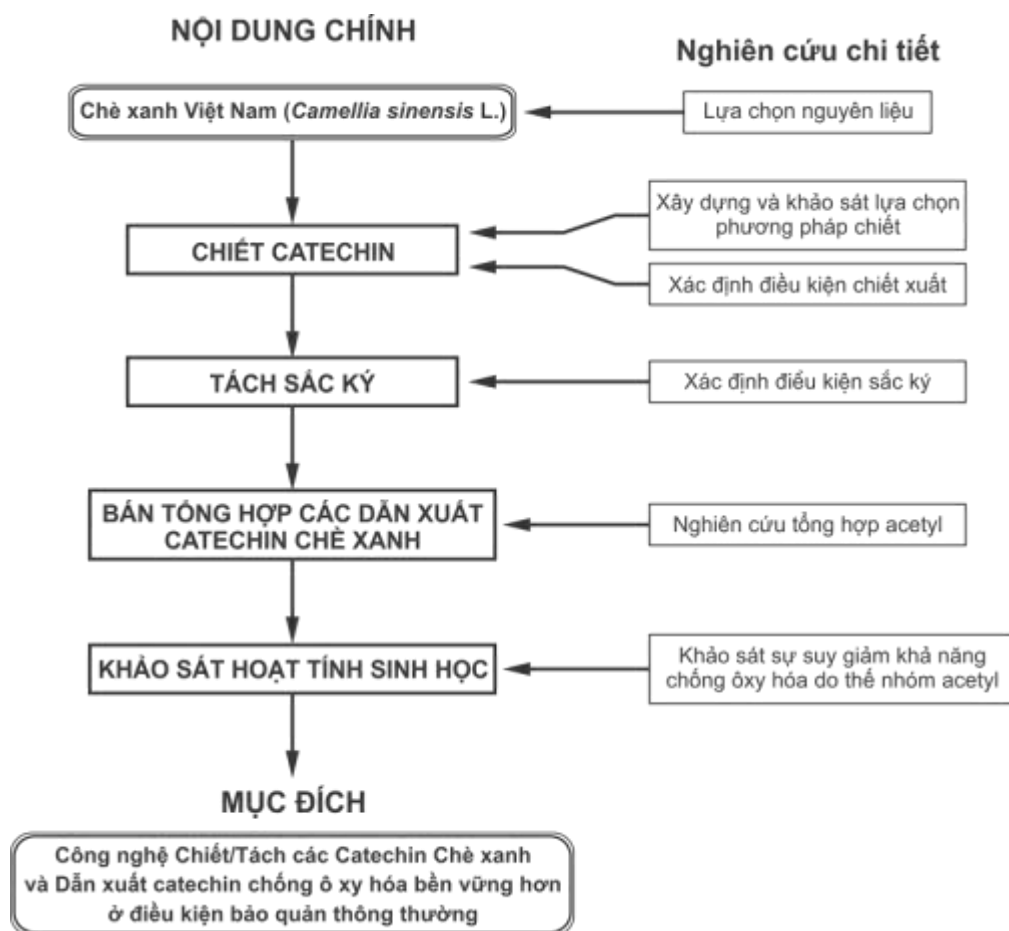
- Kết hợp các phương pháp chiết sử dụng nước và dung môi (ethanol, methanol, chloroform, ...) như chiết Soxhlet, chiết lỏng/rắn ngược dòng liên tục và chiết phân bố nhằm trích ly phân đoạn phenol (chứa các catechin);

- 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 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

Mục này đã đề cập ở Chương 2, từ trang 30 đến trang 54. Mô tả chi tiết các thực nghiệm trong quá trình thực hiện luận án nhằm khảo sát các điều kiện chiết xuất, phân tách catechin chè xanh, bán tổng hợp các catechin và khảo sát hoạt tính sinh học của các chúng.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu xây dựng quy trình chiết xuất catechin tổng số từ chè xanh

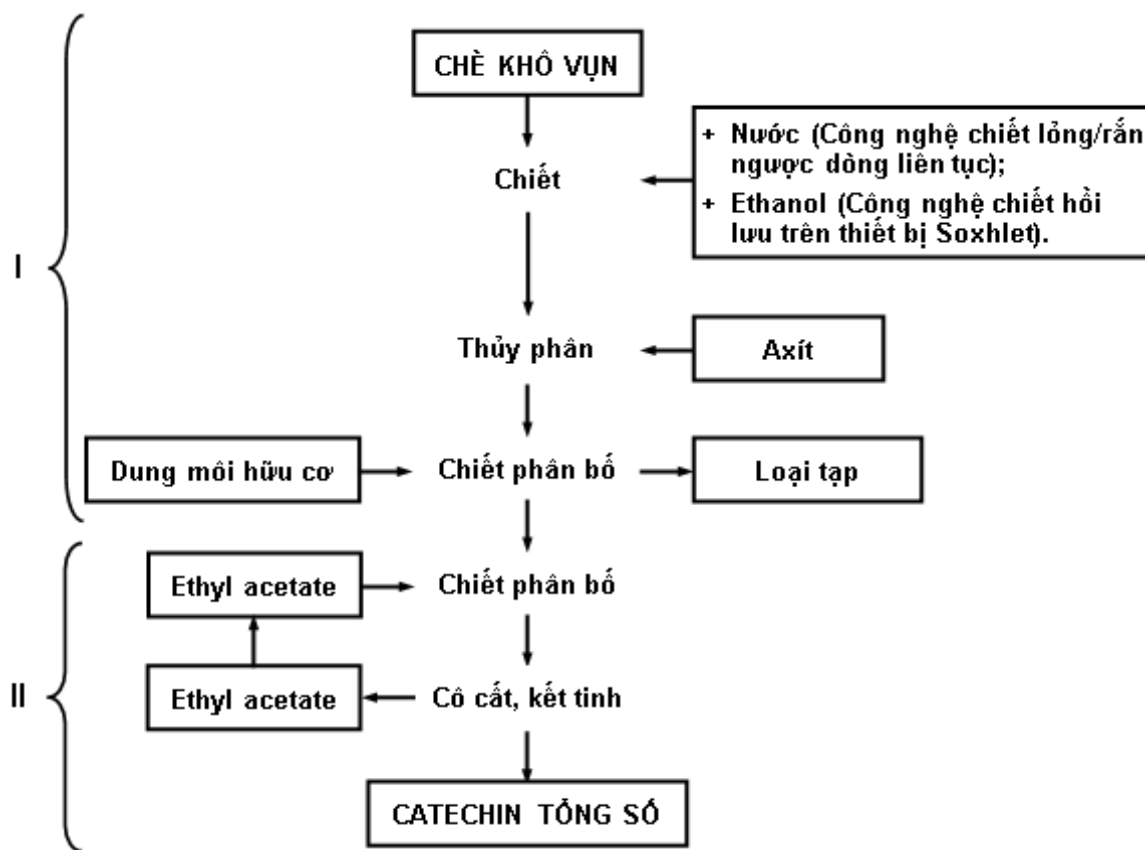
3.1.1. Nghiên cứu quy trình công nghệ chung chiết catechin tổng số từ chè xanh

Xây dựng và khảo sát các phương án công nghệ chiết Catechin chè xanh theo quy trình chiết chè xanh chung đã được áp dụng trên thế giới.

Theo quy trình này, các catechin là các hợp chất phân cực yếu, dễ tan trong nước và các 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 còn;

+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.



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, tổng cộng từ 5 kg chè nguyên liệu thu được 470 g catechin tổng số, 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.

Thành phần và hàm lượng tương đối của các Catechin đã được phân tích bằng phương pháp HPLC/MS.

Hàm lượng một số catechin trong catechin tổng số chiết bằng ethanol

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

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. Cụ thể:

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 %.

Thành phần và hàm lượng tương đối của các Catechin đã được phân tích bằng phương pháp HPLC/MS.

Thành phần catechin tổng số chiết 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

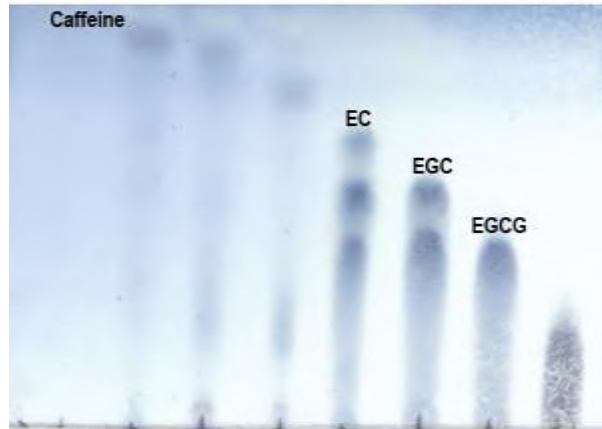
Như vậy, xét về mặt triển khai công nghệ, phương án chiết ngược dòng bằng nước có ưu thế hơn hẳn về thời gian và chi phí dung môi, và việc thu hồi phụ phẩm caffeine và chlorophyll cũng dễ dàng hơn do phần chiết này không có mặt các tạp chất béo và dầu như khi chiết bằng cồn.

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

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. Cụ thể: 1 - cột *Silica gel biến tính bằng pha động sắc ký*; 2 - *Silica gel pha lưỡng tính RP/NP*; 3 - *Sephadex LH 20*; 4 - *Vật liệu polyme xốp có lỗ trống mạng phân tử lớn Diaion HP 20 SS*.

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), Hình dưới đây nêu một sắc đồ sắc ký lớp mỏng (TLC) đặc trưng nhất cho các kết quả khảo sát tách sắc ký EGCG.



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 tan của từng chất trong hỗn hợp dung môi.

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; chúng tôi 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”.

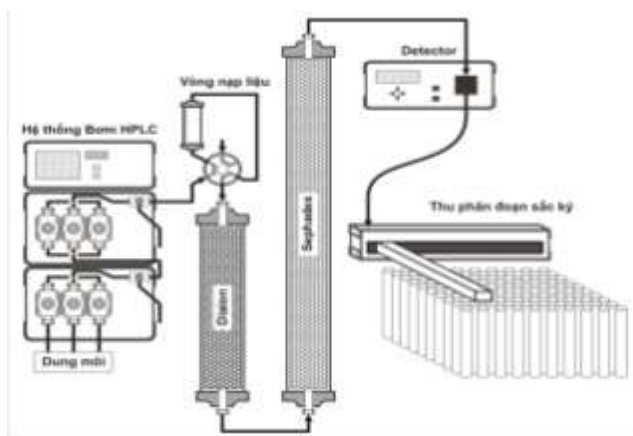
3.2.2. Nghiên cứu và thử nghiệm quy trình công nghệ tách EGCG lượng lớn trên hệ thống sắc ký lỏng MP/HPLC Pilot

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 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.

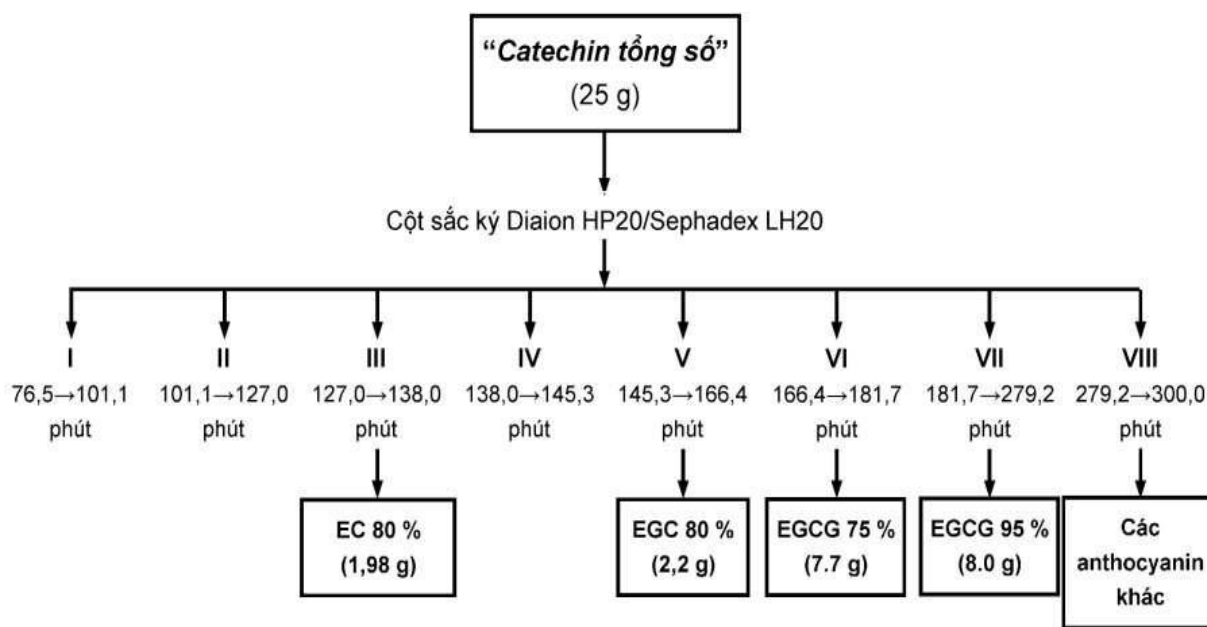
3.2.3. Nghiên cứu phân tách các catechin bằng phương pháp HPLC trên cột sắc ký phối hợp Diaion HP20 và Sephadex LH20

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 ancol/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 các catechin theo thứ tự khả năng phân ly axit của các catechin trong dung môi. Từ đó, hiệu quả phân tách các catechin sẽ được nâng cao khi hỗn hợp được tiếp tục rửa giải qua cột tách lọc gel Sephadex LH20.



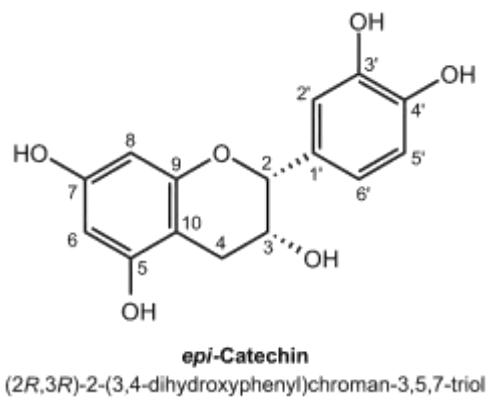
Kết quả từ 25g catechin tổng số đã thu được 8 phân đoạn trong đó phân đoạn III, V, VI và VII chứa các catechin chủ yếu của chè xanh. Các phân đoạn chứa EC, EGC và EGCG được loại kiệt dung môi ở nhiệt độ 55°C, áp suất 80 mbar; các chất này đã được tinh chế bằng cách kết tinh lại trong dung môi thích hợp.



Sơ đồ phân tách catechin chè xanh: EC; EGC; EGCG

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 ~ 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 tương ứng với KLPT M=290 đvC; CTPT C₁₅H₁₄O₆; điểm nóng chảy: 242°C.



Độ chuyển dịch hóa học của epi-Catechin

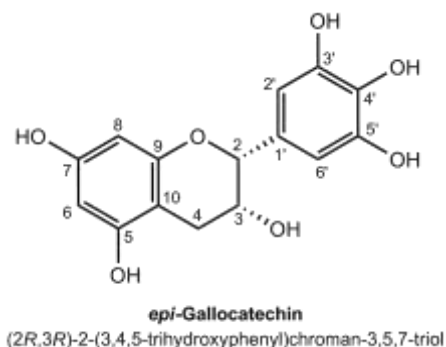
Stt	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	4,74 <i>brs</i>	78,07 <i>d</i>
3	4,01 <i>mbr</i>	64,95 <i>d</i>
4	Ha: 2,49 <i>m</i> (overlap DMSO- <i>d</i> ₆) Hb: 2,68 <i>dd</i> <i>J</i> = 4,5 Hz; 16 Hz	28,19 <i>t</i>
5	---	156,52 <i>s</i>
6	5,89 <i>d</i> <i>J</i> = 2,5 Hz	95,13 <i>d</i>
7	---	156,24 <i>s</i>
8	5,72 <i>d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

2'	6,89 <i>d J</i> = 1 Hz	114,90 <i>d</i>
3'	- - -	144,44 <i>s</i>
4'	- - -	144,51 <i>s</i>
5'	6,66 <i>mbr</i>	114,78 <i>d</i>
6'	6,65 <i>t J</i> = 3 Hz	117,97 <i>d</i>

Dung môi DMSO-d₆; Nội chuẩn tetramethyl silan

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 ~ 0,4), hàm lượng đạt 75 %; hợp chất này khó kết tinh trong ancol và nước; 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 tương ứng với KLPT M=306 đvC; C₁₅H₁₄O₇; điểm nóng chảy: 276°C.



Độ chuyển dịch hóa học của epi-Gallocatechin

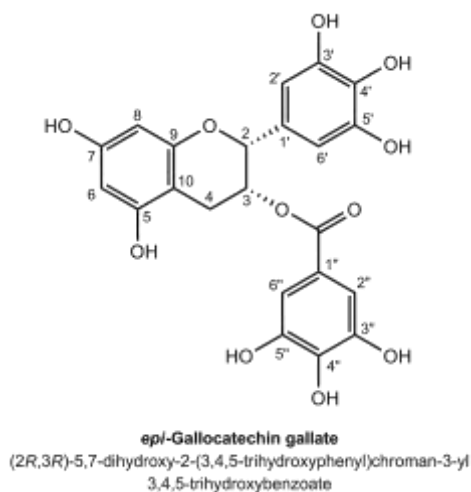
Stt	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	4,66 <i>brs</i>	78,38 <i>d</i>
3	3,99 <i>d J</i> = 2 Hz	65,27 <i>d</i>
4	2,47 <i>dd J</i> = 7 Hz, 16,5 Hz 2,67 <i>dd J</i> = 5 Hz, 16,5 Hz	28,04 <i>t</i>
5	9,11 <i>brs</i> (Ar-OH, C5)	156,44 <i>s</i>

6	5,88 <i>d J</i> = 2 Hz	95,41 <i>d</i>
7	8,92 <i>brs</i> (Ar-OH, C5)	156,77 <i>d</i>
8	5,72 <i>d J</i> = 2 Hz	94,44 <i>d</i>
9	- - -	155,99 <i>s</i>
10	- - -	98,95 <i>s</i>
1'	- - -	130,06 <i>s</i>
2' & 6'	6,38 <i>brs</i> (2 H)	106,36 <i>d</i> (2 C)
3' & 5'	8,69 <i>brs</i> (2 Ar-OH, C3' & C5')	145,61 <i>s</i> (2 C)
4'	7,92 <i>brs</i> (Ar-OH, C4')	132,39 <i>s</i>

Dung môi DMSO-d₆; Nội chuẩn tetramethyl silan

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 đó đã tinh chế EGCG đã thu được 13,7 g EGCG: tinh thể hình kim màu trắng hồng, Phổ ESI-MS $m/z = 458,7$ tương ứng với KLPT $M=458$ đvC; $C_{22}H_{18}O_{11}$; điểm nóng chảy: 216°C.



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 J</i> = 17,5 Hz Hb: 2,93 <i>dd J</i> = 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 J</i> = 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 J</i> = 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-d₆; Nội chuẩn tetramethyl silan

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.

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

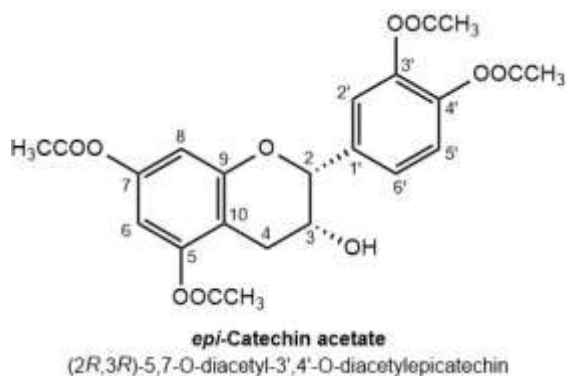
3.3.1. Bán tổng hợp các dẫn xuất acetyl của các catechin chè xanh để đánh giá mức độ suy giảm hoạt tính

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

Nghiên cứu bán tổng hợp các dẫn xuất O-acetyl của epi-catechin (EC), epi-gallocatechin (EGC) và epi-gallocatechin gallate (EGCG) sử dụng acetic anhydride với các điều kiện phản ứng đơn giản, dễ thực hiện. Từ đó khảo sát đánh giá mức độ suy giảm khả năng bị ôxy hóa của các dẫn xuất này.

3.3.1.1. Hợp chất epi-Catechin acetate (I)

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



Độ chuyển dịch hóa học (δ) của epi-Catechin acetate

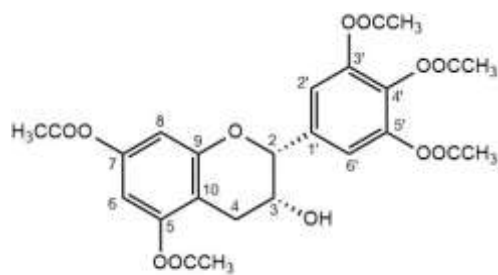
Stt	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	5,17 <i>d J</i> = 5 Hz	77,93 <i>d</i>
3	4,19 <i>m</i>	63,35 <i>d</i>
4	Ha: 2,6 <i>m</i> Hb: 2.8 <i>m</i>	28,81 <i>t</i>
5	---	149,98 <i>s</i>
6	6,62 <i>d J</i> = 2,5 Hz	107,43 <i>d</i>
7	---	149,07 <i>s</i>
8	6,57 <i>d J</i> = 2,5 Hz	108,43 <i>d</i>
9	---	111,46 <i>s</i>
10	---	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

3.3.1.2. Hợp chất epi-Gallocatechin acetate (II)

Hợp chất II kết tinh trong ethyl acetate, tinh thể hình kim màu trắng, t_{nc} 114 - 115°C; ESI-MS m/z = 516,1 tương ứng với KLPT $M=516$ đvC; $C_{25}H_{24}O_{12}$. Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân cho cấu trúc hoàn toàn phù hợp với (2R,3R)-5,7-O-diacetyl-

3',4',5'-O-triacetylepigallocatechin (**EGC acetate**).



epi-Gallocatechin acetate
(2*R*,3*R*)-5,7-O-diacetyl-3',4',5'-O-triacetylepigallocatechin

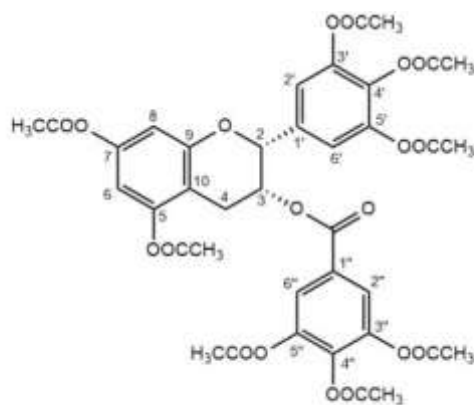
Độ chuyển dịch hóa học (δ) của epi-Gallocatechin acetate

Stt	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	5,01 <i>s</i>	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> $J = 2,5$ Hz	107,96 <i>d</i>
7	---	150,06 <i>d</i>
8	6,56 <i>d</i> $J = 2,5$ 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

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

Hợp chất III kết tinh trong ethanol, tinh thể hình kim màu trắng ngà, t_{nc} 102 - 105°C, ESI-MS $m/z = 795[M+H]^+$ ứng với $M=794$ đvC $C_{38}H_{34}O_{19}$. Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân cho cấu trúc hoàn toàn phù hợp với (2R,3R)-5,7-di-O-acetyl-3',4',5'-triacetyl-epigallocatechin-3-O-(3'',4'',5''-O-triacetyl)-gallate (**EGCG acetate**).



epi-Gallocatechin gallate, O-octaacetyl
(2R,3R)-5,7-di-O-acetyl-3',4',5'-triacetyl-epigallocatechin-3-O-(3'',4'',5''-O-triacetyl)gallate

Độ chuyển dịch hóa học của EGCG acetate

Stt	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	5,06 <i>br</i>	76,84 <i>d</i>
3	5.43 <i>br</i>	67,59 <i>d</i>
4	Ha: 2,76 <i>d</i> $J = 17,5$ Hz	25,99 <i>t</i>
	Hb: 3,00 <i>dd</i> $J = 3,5$ Hz; 23,5 Hz	
5	---	156,39 <i>s</i>
6	6,20 <i>m</i>	100,82 <i>d</i>
7	---	155,39 <i>s</i>
8	6,20 <i>m</i>	101,06 <i>d</i>
9	---	149,52 <i>s</i>
10	---	104,27 <i>s</i>
1'	---	128,22 <i>s</i>
2' & 6'	6,42 <i>m</i> (2 H)	105,55 <i>d</i> (2 C)
3' & 5'	---	145,44 <i>s</i> (2 C)
4'	---	132,51 <i>s</i>
-COO-	---	165,19 <i>s</i>
1''	---	119,16 <i>s</i>

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>CH</u> ₃ COO (C4' & C4'')	1,91 br *	20,7 q *
<u>CH</u> ₃ COO (Ar)	2,23 - 2,27 m *	20,5 q *

Dung môi DMSO-d₆; Nội chuẩn Tetramethylsilan

** Tín hiệu chồng chập*

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

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 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	Đối 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 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 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.

3.4. Nghiên cứu quy trình thu nhận caffeine từ chè xanh

Caffeine kết tinh hình kim, màu trắng; ESI-MS m/z = 195 [M+H]⁺ tương ứng M=194 đvC; CTPT C₈H₁₀N₄O₂; t_{nc}: 238°C. Phân tích bằng SKLM có R_f ~ 0,9 phát quang màu hồng dưới ánh sáng tử ngoại 360 nm (TLC - Hệ dung môi triển khai Chloroform/Methanol/Citric acid 0,5 % theo tỷ lệ thể tích 3:2:0,2).

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



Cấu trúc hóa học của caffeine

KẾT LUẬN

Luận án đã nghiên cứu công nghệ chiết/tách các catechin chủ yếu của chè xanh Việt Nam (*Camellia sinensis* L.) 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 dược dụng 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; 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.

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 $\geq 95\%$.

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.