

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DINH DƯỠNG QUỐC GIA

NGUYỄN MẠNH THẮNG

**NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ CAO TỪ CỎ SỮA
LÁ LỚN (*EUPHORBIA HIRTA* L.) VÀ ỨNG DỤNG
CHẾ BIẾN THỰC PHẨM DINH DƯỠNG
KIỂM SOÁT GLUCOSE MÁU**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DINH DƯỠNG

Hà Nội – 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DINH DƯỠNG QUỐC GIA

NGUYỄN MẠNH THẮNG

**NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ CAO TỪ CỎ SỮA
LÁ LỚN (*EUPHORBIA HIRTA* L.) VÀ ỨNG DỤNG
CHẾ BIẾN THỰC PHẨM DINH DƯỠNG
KIỂM SOÁT GLUCOSE MÁU**

Chuyên ngành: Dinh dưỡng

Mã số: 9720401

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DINH DƯỠNG

Hướng dẫn khoa học

- 1. GS.TS. Nguyễn Công Khẩn**
- 2. PGS.TS. Trương Tuyết Mai**

Hà Nội – 2020

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do chính tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS.TS Nguyễn Công Khẩn và PGS.TS Trương Tuyết Mai. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Hà Nội, ngày tháng năm 2020

Tác giả

Nguyễn Mạnh Thắng

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện luận án tại Viện Dinh dưỡng Quốc gia, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ quý báu của các thầy, cô, các nhà khoa học thuộc nhiều lĩnh vực cùng bạn bè, đồng nghiệp và gia đình.

Lời đầu tiên, tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc Viện Dinh Dưỡng Quốc gia, Trung tâm Đào tạo Dinh dưỡng và Thực phẩm và các khoa, phòng thuộc Viện Dinh dưỡng Quốc gia đã tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất giúp tôi hoàn thành công trình này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới GS.TS Nguyễn Công Khẩn và PGS.TS. Trương Tuyết Mai, những người thầy đã tận tình hướng dẫn, hết lòng giúp đỡ, tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu thực hiện luận án.

Xin trân trọng cảm ơn các đồng nghiệp, các kỹ thuật viên của Viện Dinh dưỡng Quốc gia; Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia; Trường Đại học Dược Hà Nội; Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương; Viện Dược liệu; Viện nghiên cứu Rau quả; Công ty TNHH Bia rượu nước giải khát AROMA đã nhiệt tình giúp đỡ và cộng tác để hoàn thành luận án.

Cuối cùng tôi muốn gửi lời cảm ơn chân thành tới các lãnh đạo và đồng nghiệp của tôi tại Bộ Công Thương, những người thân trong gia đình và bạn bè đã quan tâm, động viên, chia sẻ và luôn ủng hộ, giúp đỡ, tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng năm 2020

Tác giả

Nguyễn Mạnh Thắng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH	ix
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	5
1.1. Xu thế mô hình bệnh tật và thực trạng bệnh mạn tính không lây	5
1.1.1. Thực trạng về bệnh mạn tính không lây	5
1.1.2. Bệnh đái tháo đường.....	8
1.1.3. Dịch tễ học đái tháo đường.....	10
1.1.4. Các giải pháp can thiệp hỗ trợ phòng, điều trị đái tháo đường và rối loạn glucose máu	15
1.2. Polyphenol.....	19
1.2.1. Đặc điểm	19
1.2.2. Phân loại	19
1.2.3. Flavonoid	21
1.3. Cỏ sữa lá lớn	31
1.3.1. Đặc điểm thực vật và thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn	31
1.3.2. Các nghiên cứu đánh giá tính an toàn của cây cỏ sữa lá lớn	35
1.3.3. Hiệu quả kiểm soát glucose máu của cây cỏ sữa lá lớn.....	36
1.3.4. Một số chế phẩm từ cây cỏ sữa lá lớn ứng dụng trong kiểm soát glucose máu	39
1.4. Quá trình tách chiết và điều chế cao chiết xuất từ thực vật.....	41
1.4.1. Khái niệm cơ bản về quá trình chiết	41
1.4.2. Điều chế cao chiết xuất từ thực vật.....	46

1.5. Công nghệ sản xuất đồ uống từ thảo dược ứng dụng hỗ trợ phòng và kiểm soát glucose máu.....	48
1.5.1. Công nghệ sản xuất đồ uống pha chế	48
1.5.2. Một số sản phẩm đồ uống trong phòng và hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường	50
CHƯƠNG 2: NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	53
2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu	53
2.1.1. Nguyên liệu.....	53
2.1.2. Hóa chất, dụng cụ	54
2.1.3. Động vật thí nghiệm	55
2.1.4. Thiết bị.....	56
2.1.5. Địa điểm nghiên cứu.....	57
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	57
2.2.1. Khảo sát đặc điểm thực vật, thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn.....	57
2.2.2. Điều chế cao cỏ sữa lá lớn, đánh giá tính an toàn và hiệu quả của chế phẩm trong kiểm soát glucose máu	64
2.2.3. Ứng dụng cao cỏ sữa lá lớn thử nghiệm sản xuất đồ uống dinh dưỡng dùng trong kiểm soát glucose máu	73
2.3. Đạo đức nghiên cứu.....	78
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	79
3.1. Đặc điểm thực vật và thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn	79
3.1.1. Nghiên cứu đặc điểm thực vật	79
3.1.2. Xác định thành phần hóa học.....	87
3.2. Điều chế cao cỏ sữa lá lớn, đánh giá tính an toàn và hiệu quả của chế phẩm trong kiểm soát glucose máu	93
3.2.1. Điều chế cao cỏ sữa lá lớn	93
3.2.2. Đánh giá tính an toàn của cao cỏ sữa lá lớn	101
3.2.3. Đánh giá hiệu quả của cao cỏ sữa lá lớn trong kiểm soát glucose máu ...	106

3.3. Ứng dụng cao cỏ sữa lá lớn để thử nghiệm sản xuất đồ uống dinh dưỡng dùng trong kiểm soát glucose máu	110
3.3.1. Nghiên cứu lựa chọn công thức sản phẩm.....	111
3.3.2. Nghiên cứu bao bì sản phẩm và điều kiện thanh trùng sản phẩm	112
3.3.3. Xây dựng quy trình sản xuất đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa lá lớn.....	115
3.3.4. Đánh giá chất lượng, an toàn thực phẩm	116
3.3.5. Đánh giá khả năng chấp nhận tại cộng đồng	118
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	120
4.1. Đặc điểm thực vật và thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn	120
4.1.1. Đặc điểm thực vật	120
4.1.2. Thành phần hóa học	122
4.2. Điều chế cao cỏ sữa lá lớn, đánh giá tính an toàn và hiệu quả của chế phẩm trong kiểm soát glucose máu	125
4.2.1. Điều chế cao cỏ sữa lá lớn	125
4.2.2. Đánh giá tính an toàn của cao cỏ sữa lá lớn	131
4.2.3. Đánh giá tính hiệu quả của cao cỏ sữa lá lớn trong kiểm soát glucose máu.....	133
4.3. Ứng dụng cao cỏ sữa lá lớn để thử nghiệm sản xuất thực phẩm dinh dưỡng trong kiểm soát glucose máu	139
4.4. Những ưu điểm và tính mới của nghiên cứu	143
4.5. Những hạn chế của nghiên cứu.....	144
KẾT LUẬN	145
KHUYẾN NGHỊ.....	147
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	148
TÀI LIỆU THAM KHẢO	149
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

ACE	Association of Clinical Endocrinologist	Hiệp hội các nhà lâm sàng nội tiết
ADA:	American diabetes association	Hiệp hội đái tháo đường Hoa Kỳ
CDA	Canadian diabetes association	Hiệp hội đái tháo đường Canada
CSLL:	Cỏ sữa lá lớn	
DALY:	Disability adjusted life year	Số năm sống hiệu chỉnh theo mức độ tàn tật
ĐH	Đường huyết	
ĐTĐ:	Đái tháo đường	
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50%	Nồng độ ức chế 50%
IDF:	International Deabetes Federation	Liên đoàn Đái tháo đường Quốc tế
HbA1c:	Hemoglobin A1c	Hemoglobin dạng A1c
HDL-C:	High-density lipoprotein cholesterol	Cholesterol có đậm độ lipoprotein cao
OGTT:	Oral glucose tolerance testing	Nghiệm pháp dung nạp glucose qua đường uống
LDL-C:	Low-density lipoprotein cholesterol	Cholesterol có đậm độ lipoprotein thấp
LD ₅₀	Lethal Dose 50%	Liều lượng gây chết 50%
RLGM	Rối loại glucose máu	
SKLM:	Sắc ký lớp mỏng	
T2DM	Đái tháo đường type 2	
WHO:	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1.	Tiêu chuẩn chẩn đoán đái tháo đường và tiền đái tháo đường dựa vào glucose máu theo Hiệp hội đái tháo đường Hoa Kỳ năm 2019	9
Bảng 1.2.	Quốc gia có số người mắc bệnh đái tháo đường cao nhất năm 2017 và ước tính năm 2045.....	11
Bảng 1.3.	Một số thực vật giàu flavonoid	23
Bảng 1.4.	Thành phần hóa học của cỏ sữa lá lớn <i>Euphorbia hirta</i> L.	34
Bảng 2.1.	Sự phụ thuộc của độ hấp thụ vào nồng độ quercitrin chuẩn.....	62
Bảng 2.2.	Lựa chọn công thức phối trộn.....	74
Bảng 3.1.	Kết quả định tính các nhóm hợp chất trong phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn.....	88
Bảng 3.2.	Kết quả định tính phân đoạn dịch chiết n-hexan.....	89
Bảng 3.3.	Kết quả định tính phân đoạn dịch chiết chloroform	90
Bảng 3.4.	Kết quả định tính phân đoạn dịch chiết ethyl acetat	91
Bảng 3.5.	Kết quả định lượng flavonoid toàn phần trong cỏ sữa lá lớn.....	92
Bảng 3.6.	Kết quả điều chế cao cỏ sữa lá lớn ở quy mô 1 kg nguyên liệu/mẻ	99
Bảng 3.7.	Số liệu thử độc tính cấp của cao chiết nước cỏ sữa.....	102
Bảng 3.8.	Trọng lượng chuột thí nghiệm ở các thời điểm theo dõi.	102
Bảng 3.9.	Các chỉ số huyết học của các lô chuột thí nghiệm.....	103
Bảng 3.10.	Các chỉ số sinh hóa của các lô chuột thí nghiệm	104
Bảng 3.11.	Tỷ lệ khối lượng các cơ quan so với khối lượng cơ thể chuột thí nghiệm	105
Bảng 3.12.	Hoạt tính ức chế enzyme α -amylase của mẫu cao cỏ sữa lá lớn ở các độ pha loãng khác nhau	106
Bảng 3.13.	Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của mẫu cao cỏ sữa lá lớn ở các độ pha loãng khác nhau.....	108
Bảng 3.14.	Sự thay đổi nồng độ glucose máu và HbA1c sau 8 tuần điều trị cao chiết cỏ sữa lá lớn.....	110

Bảng 3.15. Một số chỉ tiêu hóa lý của các công thức phối chế đồ uống dinh dưỡng cao cô sữa lá lớn.....	111
Bảng 3.16. Kết quả đánh giá chất lượng cảm quan của các công thức phối chế đồ uống dinh dưỡng cô sữa lá lớn.....	112
Bảng 3.17. Chất lượng sản phẩm sau 6 tháng bảo quản với các bao bì khác nhau	113
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của điều kiện thanh trùng đến chất lượng đồ uống dinh dưỡng cô sữa lá lớn.....	114
Bảng 3.19. Chỉ tiêu hóa lý và an toàn thực phẩm của đồ uống dinh dưỡng cô sữa lá lớn.....	117
Bảng 3.20. Kết quả đánh giá chấp nhận tại cộng đồng của đồ uống dinh dưỡng cô sữa lá lớn.....	118

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1.	Biểu đồ xu hướng thay đổi cơ cấu gánh nặng bệnh tật tính theo DALY tại Việt Nam	6
Hình 1.2.	Biểu đồ so sánh số người mắc đái tháo đường, số ca tử vong và chi phí y tế dành cho đái tháo đường của các khu vực trên thế giới.....	10
Hình 1.3.	Một số thảo dược có tác dụng hạ glucose máu	18
Hình 1.4.	Sơ đồ phân loại các hợp chất phenol và polyphenol	20
Hình 1.5.	Khung sườn cơ bản của flavonoid	21
Hình 1.6.	Các phân nhóm chính của flavonoid	22
Hình 1.7.	Cây cỏ sữa lá lớn (<i>Euphorbia hirta</i> L.).....	33
Hình 1.8.	Công thức phân tử một số hoạt chất thuộc	35
Hình 1.9.	Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất đồ uống pha chế	48
Hình 2.1.	Ảnh chụp phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn khô	53
Hình 2.2.	Sơ đồ định tính các nhóm hợp chất trong dịch chiết cồn, dịch chiết nước và dịch chiết ether dầu hỏa phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn	58
Hình 2.3.	Sơ đồ định tính các nhóm hợp chất khác trong phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn	59
Hình 2.4.	Hình ảnh phổ quercitrin chuẩn tạo phức với nhôm clorid	61
Hình 2.5.	Đồ thị biểu diễn sự tương quan tuyến tính giữa độ hấp thụ và nồng độ quercitrin	62
Hình 3.1.	Ảnh chụp toàn cây cỏ sữa lá lớn	80
Hình 3.2.	Ảnh chụp các đặc điểm cây cỏ sữa lá lớn.....	81
Hình 3.3.	Ảnh chụp vi phẫu lá cỏ sữa lá lớn.....	82
Hình 3.4.	Ảnh chụp vi phẫu thân cỏ sữa lá lớn	83
Hình 3.5.	Ảnh chụp các đặc điểm bột lá cỏ sữa lá lớn dưới kính hiển vi	84
Hình 3.6.	Ảnh chụp các đặc điểm bột thân cỏ sữa lá lớn dưới kính hiển vi	85
Hình 3.7.	Ảnh chụp các đặc điểm bột hoa cỏ sữa lá lớn dưới kính hiển vi	86
Hình 3.8.	Ảnh chụp các đặc điểm bột quả cỏ sữa lá lớn dưới kính hiển vi	87

Hình 3.9. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hiệu suất điều chế và hàm lượng flavonoid trong cao chiết cỏ sữa lá lớn	94
Hình 3.10. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/dược liệu đến hiệu suất điều chế và hàm lượng flavonoid trong cao chiết cỏ sữa lá lớn	95
Hình 3.11. Ảnh hưởng của số lần chiết đến hiệu suất điều chế và hàm lượng flavonoid trong cao chiết cỏ sữa lá lớn	96
Hình 3.12. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hiệu suất điều chế và hàm lượng flavonoid trong cao chiết cỏ sữa lá lớn	97
Hình 3.13. Ảnh hưởng của kích thước dược liệu đến hiệu suất điều chế và hàm lượng flavonoid trong cao chiết cỏ sữa lá lớn	98
Hình 3.14. Quy trình điều chế cao cỏ sữa lá lớn quy mô 1kg/mẻ.....	100
Hình 3.15. Biểu đồ hoạt tính ức chế enzyme α -amylase của mẫu cao cỏ sữa lá lớn ở các độ pha loãng khác nhau	107
Hình 3.16. Biểu đồ hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của mẫu cao cỏ sữa lá lớn ở các độ pha loãng khác nhau	109
Hình 3.17. Ảnh hưởng của điều kiện thanh trùng đến màu sắc của sản phẩm.....	114
Hình 3.18. Quy trình sản xuất đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa lá lớn	115
Hình 3.19. Tỷ lệ chấp nhận sản phẩm đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa lá lớn tại cộng đồng	119

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đái tháo đường (ĐTĐ) là vấn đề sức khỏe cộng đồng của toàn cầu, bệnh gây nhiều biến chứng ở mắt, não, tim, thận, mạch máu, thần kinh. Trên Thế giới, ước tính trong năm 2015 có 5,0 triệu ca tử vong do đái tháo đường [156]. Năm 2017, có khoảng 425 triệu người bị bệnh đái tháo đường, tương đương cứ 11 người có 1 người bị ĐTĐ, đến năm 2045 dự đoán con số này sẽ là 629 triệu người [106]. Trong những năm gần đây, tỷ lệ ĐTĐ ở Việt Nam tăng nhanh. Năm 2017, Bộ Y tế thống kê Việt Nam có 3,5 triệu người trưởng thành mắc đái tháo đường, tương đương 6% dân số và dự kiến đến năm 2040 sẽ có 6,1 triệu người trưởng thành có thể mắc đái tháo đường [19].

Mục tiêu chính trong dự phòng và điều trị cho bệnh nhân đái tháo đường và tiền đái tháo đường là kiểm soát, duy trì nồng độ glucose máu ở mức bình thường, trong đó có việc hạn chế tăng glucose máu sau ăn và kiểm soát chỉ số glucose máu về lâu dài sẽ góp phần giảm các rối loạn chuyển hóa đường, chuyển hóa lipid máu, đồng thời giảm các biến chứng do tăng glucose máu gây ra.

Trong những thập kỷ gần đây, các nghiên cứu về cây cỏ thực vật có khả năng hỗ trợ trong phòng và điều trị bệnh đái tháo đường và biến chứng đái tháo đường đang ngày càng thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới. Đã có hơn 1.200 loại thực vật được xác định là có khả năng giảm glucose máu [104, 105, 150] và có một số dược liệu đã được nghiên cứu sản xuất thành các sản phẩm phòng ngừa và hỗ trợ bệnh đái tháo đường như dây thìa canh, mướp đắng. Các sản phẩm này thường được chế biến dưới dạng trà nhúng, trà hòa tan hoặc dạng viên nang, ít có sản phẩm chế biến dưới dạng đồ uống trong khi nhu cầu về đồ uống ở thị trường trong nước rất cao với mức tăng trưởng hàng năm khoảng 50%. Các dạng đồ uống từ thảo dược đã bắt đầu được các nhà nghiên cứu và sản xuất quan tâm nhiều và có tiềm năng trở thành một xu thế phát triển mạnh trong những năm tới, tương tự như ở Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc.

Cây cỏ sữa lá lớn có tên khoa học là *Euphorbia hirta* L., họ thầu dầu (*Euphorbiaceae*), một loại cây mọc hoang dại nơi vùng đất ẩm ở các nước nhiệt đới, trong đó có các tỉnh phía nam Việt Nam. Thực tế khảo sát cho thấy, Bình Dương là một tỉnh có điều kiện thời tiết, thổ nhưỡng rất phù hợp cho sự phát triển của các cây thuộc họ thầu dầu. Nhiều nghiên cứu trên Thế giới như Ấn Độ, Malaysia, Nhật Bản đã cho thấy tác dụng của cây cỏ sữa đối với bệnh đái tháo đường thông qua cơ chế kiểm soát glucose máu, ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase bởi hợp chất flavonoid có trong loài thảo dược này [106]. Ở nước ta, những nghiên cứu về cây cỏ sữa lá lớn còn chưa nhiều và chưa sâu, mới chỉ dừng lại ở xây dựng công thức chế biến trà cỏ sữa và cho đến nay, cỏ sữa lá lớn mới chỉ được sử dụng như một loại thuốc nam trong dân gian, khả năng và phạm vi ứng dụng còn rất hạn chế. Cho đến nay, còn thiếu những nghiên cứu một cách bài bản, có hệ thống về cây cỏ sữa lá lớn như mô tả đặc điểm thực vật, xác định thành phần các chất có hoạt tính, đánh giá tác dụng và tính an toàn, xây dựng quy trình công nghệ chế biến để đưa nguồn dược liệu này ứng dụng sản xuất thực phẩm giàu dinh dưỡng đáp ứng nhu cầu chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

Xuất phát từ thực tế trên, đề tài luận án “*Nghiên cứu điều chế cao từ cỏ sữa lá lớn (Euphorbia hirta L.) và ứng dụng chế biến thực phẩm dinh dưỡng kiểm soát glucose máu*” đã được thực hiện, nhằm đưa ra các bằng chứng khoa học cụ thể về đặc điểm thực vật, thành phần hóa học, tính an toàn và hiệu quả kiểm soát glucose máu của cỏ sữa lá lớn, mở ra tiềm năng khai thác nguồn nguyên liệu có giá trị để ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm nhằm cải thiện tình trạng dinh dưỡng, sẽ góp phần vào công cuộc phòng chống bệnh đái tháo đường của Bộ Y tế.

MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

1. Mô tả được đặc điểm thực vật và xác định một số thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn.
2. Điều chế và đánh giá được tính an toàn, hiệu quả của cao cỏ sữa lá lớn trong kiểm soát glucose máu.
3. Xây dựng được quy trình công nghệ sản xuất đồ uống dinh dưỡng từ cao cỏ sữa lá lớn dùng trong kiểm soát glucose máu.

NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

1. Nghiên cứu đặc điểm thực vật và phân tích một số thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn.
2. Nghiên cứu quy trình điều chế cao từ cỏ sữa lá lớn, đánh giá tính an toàn và hiệu quả của cao cỏ sữa lá lớn trong kiểm soát glucose máu.
3. Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ sản xuất đồ uống dinh dưỡng từ cao cỏ sữa lá lớn dùng trong kiểm soát glucose máu.

GIẢ THUYẾT NGHIÊN CỨU

1. Hiện nay các bằng chứng khoa học đầy đủ, có hệ thống về đặc điểm thực vật và thành phần hóa học của cỏ sữa lá lớn ở các vùng khác nhau của Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu đề cập đến. Việc nghiên cứu đặc điểm hình thái và thành phần hóa học cơ bản của cây này ở Bình Dương sẽ cung cấp các dữ liệu làm sáng tỏ hơn về các bằng chứng cập nhật đối với cây cỏ sữa phát triển tự nhiên ở Việt Nam.

2. Cao chiết từ cỏ sữa lá lớn được nghiên cứu trong điều kiện phù hợp đạt hàm lượng flavonoid trung bình là 20 mg/g cao khô sẽ có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase trên ống nghiệm, kiểm soát glucose máu trên chuột đái tháo đường, hỗ trợ dự phòng và điều trị đái tháo đường.

3. Sản phẩm cao chiết từ cỏ sữa lá lớn có thể làm nguyên liệu để tạo ra các sản phẩm khác nhau, trong đó có sản phẩm đồ uống dinh dưỡng đạt chất lượng (flavonoid trung bình 80 mg/100 ml) và đảm bảo an toàn thực phẩm, cảm quan tốt, giúp cộng đồng có thể tiếp cận, sử dụng dễ dàng và thuận tiện.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

1.1. Xu thế mô hình bệnh tật và thực trạng bệnh mạn tính không lây

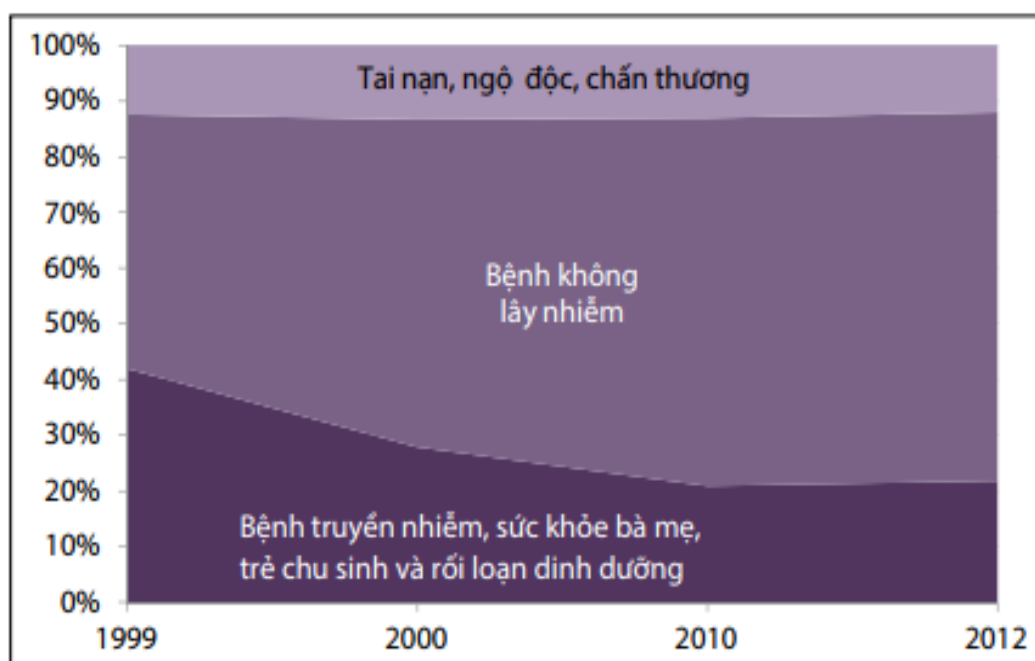
1.1.1. Thực trạng về bệnh mạn tính không lây

Hiện nay, mô hình bệnh tật ở Việt Nam đã có nhiều thay đổi so với một thập kỷ trước đây. Đó là sự gia tăng nhanh chóng của các bệnh mạn tính không lây về tỷ lệ mắc và tỷ lệ tử vong. Điều này là kết quả của sự chuyển dịch về mô hình dân số, với tỷ lệ người cao tuổi tiệm cận 11%, cơ cấu được cho là dân số già và do những thay đổi về kinh tế-xã hội, chế độ ăn và lối sống. Việt Nam đang đứng trước thách thức to lớn của gánh nặng kép về bệnh tật [47, 55, 79]. Một trong số những bệnh mạn tính không lây phổ biến là đái tháo đường (ĐTĐ).

Theo Tổ chức Y tế Thế giới, 78% ca tử vong là do các bệnh không lây nhiễm. Xét về các trường hợp tử vong do nguyên nhân, yếu tố nguy cơ chuyển hóa hàng đầu trên toàn cầu là huyết áp tăng (trong đó 19% tử vong toàn cầu), sau đó là thừa cân và béo phì và tăng đường huyết [89]. Ở nước ta, điều tra toàn quốc 2015 cho thấy tỷ lệ tăng huyết áp tăng từ 15,3% đến 25,3% ở người trưởng thành; tỷ lệ đái tháo đường 4,1% [16], Tỷ lệ mắc ung thư được ghi nhận tăng rõ rệt, đáng chú ý là số mới mắc hàng năm [16]. Nước ta cũng có tỷ lệ mắc bệnh phổi tắc nghẽn (COPD): 6,7% (Hong-Kong và Singapore có tỷ lệ 3,5%) [16]. Trong khi đó, tai nạn, thương tích, ngộ độc thực phẩm cũng là những vấn đề nhức nhối hiện nay và chưa có dấu hiệu giảm [165].

Hiện nay, tỷ lệ thừa cân, béo phì đang tăng nhanh ở lứa tuổi thiếu niên là yếu tố nguy cơ cao của bệnh ĐTĐ type 2. Bệnh xuất hiện ở lứa tuổi trẻ ngày càng nhiều. Nhìn chung các nghiên cứu cho thấy nhận thức chung của cộng đồng về bệnh ĐTĐ còn thấp, bệnh ĐTĐ đang tăng nhanh ở tất cả các khu vực, không chỉ ở các khu công nghiệp, thành phố mà còn tăng mạnh cả ở miền núi, trung du. Xu hướng gia tăng và dần chiếm ưu thế của các bệnh không truyền nhiễm trong cơ cấu gánh nặng bệnh tật và tử vong cũng được khẳng định trong các số liệu

đánh giá gánh nặng bệnh tật và tử vong. Hình 1.1 cho thấy từ năm 1999, vượt qua các bệnh truyền nhiễm, bệnh không truyền nhiễm đã chiếm tỷ trọng lớn nhất trong tổng gánh nặng bệnh tật tính theo số năm sống mất đi sau khi hiệu chỉnh theo mức độ tàn tật (DALY) tại Việt Nam. Gánh nặng do các bệnh không truyền nhiễm đã tăng từ 45,5% năm 1990 lên 58,7% vào năm 2000, năm 2010 lên thành 60,1% và con số này tăng lên là 66,2% vào năm 2012 [154].



Hình 1.1. Biểu đồ xu hướng thay đổi cơ cấu gánh nặng bệnh tật tính theo DALY tại Việt Nam

Gánh nặng của các bệnh không lây nhiễm gây ra bởi bốn nhóm bệnh chính là bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, ung thư, bệnh tim mạch và đái tháo đường. Bốn nhóm bệnh này chiếm 60,4% các trường hợp tử vong và 33% tổng gánh nặng bệnh tật tính theo DALY năm 2012 [14]. Ước tính nguy cơ tử vong do 4 nhóm bệnh này ở những người trong độ tuổi 30 – 70 là 17% [153].

Sự gia tăng của các bệnh không lây nhiễm, cụ thể là ĐTĐ không chỉ gây nên gánh nặng về bệnh tật và kinh tế cho cả bản thân bệnh nhân và gia đình mà còn tạo nên gánh nặng cho hệ thống y tế cũng như toàn xã hội. Không chỉ gia tăng ở các quần thể dân cư thành thị có điều kiện kinh tế phát triển mà ĐTĐ

còn tăng nhanh ở vùng nông thôn. Tỷ lệ bệnh nhân mắc ĐTD chưa được chẩn đoán và điều trị trong cộng đồng vẫn còn rất lớn. Tỷ lệ mắc ĐTD chưa được chẩn đoán ở độ tuổi 30 – 69 là 63,6% [3]. Kết quả điều tra của Dự án Phòng chống bệnh ĐTD giai đoạn 2012-2015 cũng cho thấy tỷ lệ tiền ĐTD và bệnh nhân ĐTD ngày càng gia tăng tại Việt Nam. Năm 2013, khám sàng lọc các đối tượng nguy cơ cao đã phát hiện 7,1% trường hợp tiền ĐTD và 17,3% bệnh nhân đái tháo đường [13]. Trong khi đó, công tác quản lý và phát hiện bệnh nhân mắc ĐTD đang còn nhiều khó khăn, thách thức. Theo kết quả điều tra quốc gia yếu tố nguy cơ bệnh không lây nhiễm năm 2015, chỉ có 31,1% số người tăng đường huyết từng được phát hiện bệnh và 28,9% số người tăng đường huyết được quản lý tại các cơ sở y tế [14].

Tuy nhiên, sự đầu tư cho công tác phòng chống bệnh ĐTD của Nhà nước chưa thực sự tương xứng với gánh nặng bệnh tật. Công tác kiểm soát các bệnh không lây nhiễm mới chỉ được đưa vào chương trình mục tiêu y tế quốc gia từ năm 2006 với bệnh ung thư và 2011 với các bệnh khác (tăng huyết áp, đái tháo đường, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính). Chiến lược phòng chống các bệnh không lây nhiễm mới chỉ được Thủ tướng Chính phủ phê duyệt từ tháng 3 năm 2015. Chiến lược chăm sóc sức khỏe nhân dân 2011 – 2020 và các mục tiêu của Kế hoạch 5 năm ngành y tế 2011 – 2015 chủ yếu tập trung nhiều cho các bệnh lây nhiễm [45]. Khả năng cung ứng các dịch vụ khám và điều trị ĐTD còn hạn chế, năng lực của hệ thống y tế, nhất là mạng lưới y tế cơ sở trong việc quản lý bệnh và các yếu tố nguy cơ ĐTD chưa đáp ứng được nhu cầu thực tế. Đây là một trong những yếu tố góp phần khiến bệnh ĐTD khó kiểm soát và xu thế ngày càng tăng trong thời gian tới.

Trong những năm gần đây, tỷ lệ ĐTD ở Việt Nam tăng nhanh, nghiên cứu của Tạ Văn Bình nghiên cứu thực trạng ĐTD tại khu vực thành thị của 4 thành phố lớn cho thấy tỷ lệ hiện mắc lên đến 4,0%. Tác giả cũng nhận định rằng tỷ lệ bệnh thực sự còn cao hơn so với nghiên cứu vì tuổi điều tra mới chỉ giới hạn đến 64 tuổi [43]. Đái tháo đường là vấn đề sức khỏe cộng đồng của toàn cầu, bệnh

gây nhiều biến chứng ở mắt, não, tim, thận, mạch máu, thần kinh. Đái tháo đường là nguyên nhân 12,5% mù lòa, 42% suy thận mạn giai đoạn cuối, 50% cắt cụt chi không do chấn thương, tăng 2,5 lần nguy cơ đột quỵ, tăng 2-4 lần nguy cơ tim mạch, hàng năm có khoảng 3,2 triệu người ĐTD trên thế giới tử vong. Không chỉ gây nên gánh nặng bệnh tật, tử vong sớm, ĐTD cũng làm chất lượng cuộc sống của người mắc bệnh giảm đi [154].

1.1.2. Bệnh đái tháo đường

1.1.2.1. Khái niệm

Đái tháo đường

Đái tháo đường là một tình trạng bệnh lý có biểu hiện bằng tăng glucose máu do hậu quả của việc thiếu hụt insulin, hoặc do liên quan đến sự suy yếu hoạt động của insulin [43, 48]. Tăng glucose mạn tính trong thời gian dài gây ra những rối loạn chuyển hóa carbohydrate, protein, lipid, tăng khả năng gây tổn thương ở nhiều cơ quan khác nhau, đặc biệt ở tim và mạch máu, thận, mắt, thần kinh [15].

Tiền đái tháo đường

Tiền đái tháo đường là tình trạng glucose máu cao hơn mức bình thường nhưng chưa đến mức chẩn đoán là bệnh ĐTD, bao gồm 2 tình trạng: Rối loạn glucose máu lúc đói (Impaired fasting glucose = IFG) và rối loạn dung nạp glucose (Impaired glucose tolerance = IGT), với cả 2 tình trạng này đều có tăng glucose máu, nhưng chưa đạt mức chẩn đoán ĐTD, tuy nhiên ở giai đoạn này đã xuất hiện tình trạng kháng insulin, là bước khởi đầu trong tiến trình xuất hiện ĐTD type 2. Rối loạn glucose máu lúc đói và rối loạn dung nạp glucose là giai đoạn ban đầu của sự RLG, trước khi tiến triển thành bệnh ĐTD type 2 thực sự. Hiện nay, tình trạng RLG được coi là tiền ĐTD [43].

1.1.2.2. Chẩn đoán đái tháo đường

Năm 2019, Hiệp hội ĐTD Hoa Kỳ đưa ra tiêu chuẩn chẩn đoán ĐTD dựa vào nồng độ glucose máu (mao mạch hoặc tĩnh mạch) và HbA1c. Tuy nhiên, glucose máu tĩnh mạch là chỉ số có giá trị nhất, thường được khuyến cáo sử

dụng. Các mẫu máu được lấy vào lúc đói (nhịn ăn ít nhất 8 giờ), lấy mẫu bất kỳ (không liên quan đến bữa ăn trước đó) và mẫu máu 2 giờ sau thực hiện nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống (OGTT).

Bảng 1.1. Tiêu chuẩn chẩn đoán đái tháo đường và tiền đái tháo đường dựa vào glucose máu theo Hiệp hội đái tháo đường Hoa Kỳ năm 2019 [63]

Chẩn đoán	Tiêu chuẩn chẩn đoán
Đái tháo đường	Nồng độ Glucose máu lúc đói (không ăn trước khi lấy máu ít nhất 8 giờ) $\geq 7,0$ (mmol/L).
	Hoặc nồng độ Glucose máu ở thời điểm sau hai giờ thực hiện thử nghiệm dung nạp glucose (uống 75g glucose hòa tan trong nước) $\geq 11,1$ (mmol/L).
	Hoặc HbA1c $\geq 6,5\%$
Tiền đái tháo đường	Nồng độ Glucose máu lúc đói (không ăn trước khi lấy máu ít nhất 8 giờ) từ 5,6 đến 6,9 (mmol/L).
	Hoặc nồng độ Glucose máu ở thời điểm sau hai giờ thực hiện thử nghiệm dung nạp glucose (uống 75g glucose hòa tan trong nước) từ 7,8 đến 11,0 (mmol/L).
	Hoặc HbA1c từ 5,7% đến 6,4%

1.1.2.3. Biến chứng của bệnh đái tháo đường

Các biến chứng cấp tính thường là hậu quả của chẩn đoán ĐTĐ muộn, điều trị không thích hợp hoặc nhiễm khuẩn cấp tính. Bệnh xảy ra ở người đã được chẩn đoán đái tháo đường hoặc chưa được chẩn đoán đái tháo đường trước đó (chiếm khoảng 50 %). Đây là biến chứng nặng, nếu không chẩn đoán sớm và điều trị tích cực, bệnh nhân có thể tử vong nhanh chóng [20].

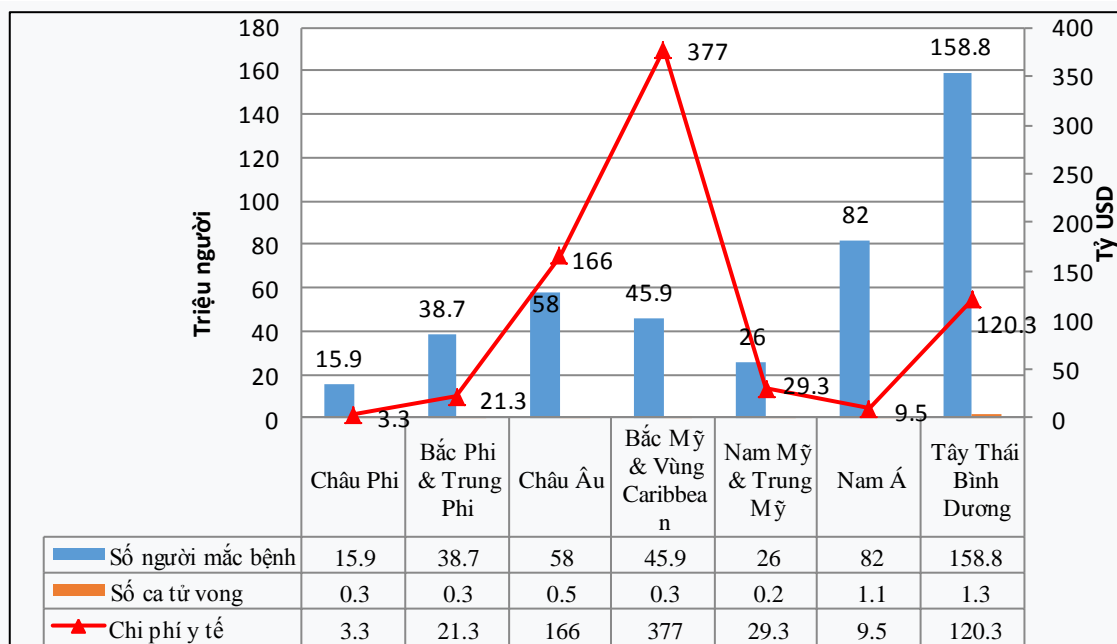
Biến chứng do ĐTĐ mạn tính cũng là nguyên nhân tăng chi phí gánh nặng bệnh tật và góp phần giảm chất lượng cuộc sống của bệnh nhân. Các biến chứng mạn tính phổ biến gồm: biến chứng mắt, biến chứng thận – tiết niệu [15], bệnh lý bàn chân do đái tháo đường, biến chứng hệ thần kinh, bệnh lý mạch máu do

đái tháo đường [19, 20]. Việc phòng ngừa các biến chứng mạn tính là một trong mục tiêu điều trị ĐTĐ

1.1.3. Dịch tễ học đái tháo đường

1.1.3.1. Tình hình bệnh đái tháo đường trên thế giới

Các nghiên cứu, điều tra về bệnh ĐTĐ được thực hiện trên phạm vi toàn cầu đều chỉ ra rằng: Đái tháo đường type 2 thực sự trở thành một cuộc khủng hoảng, đe dọa trực tiếp tới sức khỏe và chiến lược phát triển của các quốc gia. Nghiêm trọng hơn, bệnh không chỉ trở thành gánh nặng sức khỏe cho người dân mà còn là gánh nặng kinh tế tại các quốc gia đang phát triển. Có sự chênh lệch giữa tỷ lệ mắc ĐTĐ tại các khu vực khác nhau trên thế giới, theo cơ cấu dân số và mức thu nhập giữa các quốc gia, khu vực địa lý.



Hình 1.2. Biểu đồ so sánh số người mắc đái tháo đường, số ca tử vong và chi phí y tế dành cho đái tháo đường của các khu vực trên thế giới

Hình 1.2 cho thấy, khu vực Châu Á (Nam Á và Tây Thái Bình Dương) – nơi tập trung chủ yếu các quốc gia đang phát triển có số người mắc ĐTĐ cao nhất thế giới; tuy nhiên, tỷ lệ mắc ĐTĐ chuẩn hóa theo tuổi tại Bắc Mỹ và vùng Caribbean xếp thứ hạng cao nhất (tỷ lệ mắc 11%) [83].

Báo cáo mới nhất năm 2017 của IDF, khoảng 425 triệu người trong độ tuổi 20-79 mắc bệnh ĐTĐ, tương đương cứ 11 người có 1 người bị ĐTĐ, đến năm 2045 con số này sẽ là 629 triệu người (tăng 48%), tương đương cứ 10 người có 1 người bị ĐTĐ. Trong đó, độ tuổi từ 20-64 có 327 triệu người mắc (năm 2017), dự báo tăng lên tới 438 triệu người (năm 2045). Đô thị hóa toàn cầu vẫn là nguyên nhân chủ yếu gây nên sự chênh lệch số người mắc ĐTĐ tại thành thị (279,9 triệu người – năm 2017) so với nông thôn (145,7 triệu người – năm 2017) và số người mắc ĐTĐ tại thành thị sẽ còn tăng lên (khoảng 472,6 triệu người – năm 2045); tỷ lệ hiện mắc ĐTĐ năm 2017 của người dân sống tại thành thị (10,2%) cao hơn so với người dân tại nông thôn (6,9%) [106].

Bảng 1.2. Quốc gia có số người mắc bệnh đái tháo đường (độ tuổi 20-79) cao nhất năm 2017 và ước tính năm 2045

Đơn vị: triệu người

STT	Năm 2017		Năm 2045	
	Quốc gia	Số người mắc ĐTĐ	Quốc gia	Số người mắc ĐTĐ
1	Trung Quốc	114,4	Ấn Độ	134,3
2	Ấn Độ	72,9	Trung Quốc	119,8
3	Hoa Kỳ	30,2	Hoa Kỳ	35,6
4	Brazil	12,5	Mexico	21,8
5	Mexico	12,0	Brazil	20,3
6	Indonesia	10,3	Ai Cập	16,7
7	Liên Bang Nga	8,5	Indonesia	16,7
8	Ai Cập	8,2	Pakistan	16,1
9	Đức	7,5	Bangladesh	13,7
10	Pakistan	7,5	Thổ Nhĩ Kỳ	11,2

Trung Quốc, Ấn Độ và Hoa Kỳ là 3 nước có số người mắc ĐTĐ đứng đầu thế giới. Nhiều nghiên cứu đều cho thấy 2/3 số ca mắc ĐTĐ thuộc các quốc

gia thu nhập thấp – trung bình và số ca mắc ĐTĐ type 2 có xu thế gia tăng nhanh hơn so với các quốc gia thu nhập cao. Điều này có thể được giải thích là do sự đô thị hóa diễn ra nhanh chóng kéo theo sự thay đổi về nếp sống, sinh hoạt và ăn uống của người dân. Mất cân bằng trong việc nhận năng lượng và tiêu thụ năng lượng là yếu tố nguy cơ cho các bệnh thừa cân, béo phì, tăng huyết áp, tăng mỡ máu và bệnh đái tháo đường phát triển.

Bệnh đái tháo đường là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên thế giới, khoảng 2,2 triệu ca tử vong do tim mạch và bệnh khác có liên quan đến việc nồng độ glucose trong máu vượt mức cho phép, trong đó 43% số ca tử vong này ở độ tuổi dưới 70 tuổi. Nồng độ glucose trong máu cao là nguyên nhân gây tử vong của 7% nam giới trong độ tuổi 20-69, và 8% nữ giới trong độ tuổi 20-69 [155].

Không chỉ gây nên gánh nặng bệnh tật, tử vong sớm, chất lượng cuộc sống thấp, ĐTĐ còn gây ảnh hưởng không nhỏ tới kinh tế cho người bệnh, gia đình, rộng hơn là cả quốc gia. IDF đã ước tính chi phí chăm sóc y tế của người bệnh ĐTĐ trong 10 năm trên toàn cầu, từ 232 tỷ USD (năm 2007) lên 727 tỷ USD (năm 2017). Bắc Mỹ và vùng Caribbean đứng đầu danh sách chi tiêu y tế cho bệnh ĐTĐ trên đầu người, với 8.396 USD/ người/ năm; tiếp theo là Châu Âu (3.132 USD/ người/ năm), thấp nhất tại Châu Phi (444 USD/ người/ năm). Điều này là dễ hiểu do người dân quyết định chi trả chi phí y tế dựa vào thu nhập, cơ sở vật chất y tế, trang thiết bị y tế, giá thành khám chữa bệnh; các yếu tố này hoàn toàn có sự chênh lệch giữa các nền kinh tế khác nhau [106].

1.1.3.2. Tình hình mắc đái tháo đường ở Việt Nam

Việt Nam không nằm ngoài lệ trong bối cảnh ĐTĐ toàn cầu. Trong khoảng 2 thập niên vừa qua cũng có sự gia tăng nhanh chóng về tỷ lệ mắc bệnh ĐTĐ. Năm 2001, lần đầu tiên điều tra dịch tễ học bệnh ĐTĐ tại Việt Nam theo quy chuẩn quốc tế, Bệnh viện Nội tiết Trung ương đã tiến hành điều tra ĐTĐ tại 4 thành phố lớn: Hà Nội, Hải Phòng, Đà Nẵng và thành phố Hồ Chí Minh. Theo đó, tỷ lệ ĐTĐ là 4,0%; tỷ lệ rối loạn dung nạp glucose là 5,1%; trong đó 64,9% người mắc bệnh ĐTĐ không được chẩn đoán và hướng dẫn điều trị [42, 51].

Năm 2002, Bệnh viện Nội tiết Trung ương tiến hành nghiên cứu ở một số vùng sinh thái cho thấy, tỷ lệ ĐTĐ là 4,4% ở thành phố, 2,7% ở vùng đồng bằng, 2,2% ở vùng trung du-ven biển, và 2,1% ở vùng miền núi [43]. Điều tra quốc gia năm 2008 cho thấy tỷ lệ bệnh ĐTĐ type 2 trong lứa tuổi từ 30-69 khoảng 5,7% dân số, riêng ở khu vực thành phố và các khu công nghiệp tỷ lệ mắc bệnh chiếm khoảng từ 7,0% đến 10%. Tỷ lệ mắc ĐTĐ đã tăng gần gấp đôi năm 2002 (5,7% so với 2,7%) và tỷ lệ này tăng nhanh ở các thành phố lớn (4,0% năm 2000 so với 7,2% năm 2008) [43].

Năm 2013, trong kết quả công bố của “Dự án phòng chống ĐTĐ Quốc gia” do Bệnh viện Nội tiết Trung ương thực hiện năm 2012 trên 11.000 người tuổi 30-69 tại 6 vùng gồm: Miền núi phía Bắc, đồng bằng sông Hồng, duyên hải miền Trung, Tây Nguyên, Đông Nam Bộ và Tây Nam Bộ đã cho thấy tỷ lệ mắc bệnh ĐTĐ tăng gấp đôi so với năm 2002 (5,4 % so với 2,7%), tỷ lệ mắc cao nhất ở Tây Nam Bộ là 7,2%, thấp nhất là Tây Nguyên 3,8%. Tỷ lệ IGT cũng gia tăng mạnh mẽ từ 7,7% năm 2002 lên 13,7% năm 2012. Vùng Đông Nam Bộ có tỷ lệ mắc IGT cao nhất (17,5%), vùng có tỷ lệ thấp nhất là miền núi phía Bắc và Tây Nguyên (10,70%). Tỷ lệ người mắc ĐTĐ trong cộng đồng không được phát hiện chiếm 63,6% trong toàn quốc (đồng bằng sông Hồng: 57,3%, Tây nam Bộ: 72,1%). Cũng theo nghiên cứu này, những người trên 45 tuổi có nguy cơ mắc ĐTĐ type 2 cao gấp 4 lần những người dưới 45 tuổi, người huyết áp cao cũng có nguy cơ mắc bệnh cao hơn những người khác hơn 3 lần, người có vòng eo lớn nguy cơ mắc cao hơn 2,6 lần. Trong khi đó, 75,5% số người được hỏi đều có kiến thức rất thấp về ĐTĐ [2]. Như vậy, tỷ lệ mắc ĐTĐ ở Việt Nam 10 năm qua đã tăng gấp đôi. Đây là con số đáng báo động, vì trên thế giới, phải trải qua 15 năm tỷ lệ mắc ĐTĐ mới tăng gấp đôi [2, 41].

Năm 2017, Bộ Y tế thống kê Việt Nam có 3,5 triệu người trưởng thành mắc đái tháo đường, tương đương 6% dân số và dự kiến đến năm 2040 sẽ có 6,1 triệu người trưởng thành có thể mắc đái tháo đường. Tại Việt Nam, có 31,1% người đái tháo đường (nhóm 18 - 69 tuổi) được chẩn đoán, trong khi có tới 69,9% người đái

tháo đường chưa được chẩn đoán. Bên cạnh đó, đái tháo đường được quản lý tại cơ sở y tế mới chỉ 28,9% trong khi số chưa được quản lý theo số liệu thống kê mới nhất năm 2015 là 71,1%. Tức là 5/10 người mắc đái tháo đường không biết mình mắc bệnh (khoảng 1,8 triệu dân). Gánh nặng đái tháo đường tại Việt Nam sẽ tăng nhanh đến năm 2040; theo đó, 1 trong 7 người trưởng thành ở Việt Nam mắc tiền đái tháo đường hoặc đái tháo đường. Sẽ có khoảng trống lớn về sự chênh lệch giữa nhu cầu và cung cấp dịch vụ chăm sóc sức khỏe [19].

Trước thực trạng trên, Chính phủ Việt Nam đánh giá bệnh ĐTD đã ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe cộng đồng và sự phát triển kinh tế - xã hội của đất nước do số người mắc bệnh nhiều, bệnh gây tàn tật và tử vong cao. Phòng chống bệnh ĐTD hiệu quả sẽ hạn chế số người mắc bệnh này trong cộng đồng, sớm ngăn chặn tàn tật, tử vong và góp phần giảm quá tải tại các bệnh viện. Thủ tướng Chính phủ đã Phê duyệt Chiến lược quốc gia phòng, chống bệnh ung thư, tim mạch, đái tháo đường, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, hen phế quản và các bệnh không lây nhiễm khác giai đoạn 2015-2025 với mục tiêu hạn chế sự gia tăng của các bệnh không lây nhiễm nói chung và bệnh ĐTD nói riêng, cụ thể: Không chế tỉ lệ ĐTD dưới 8%, RLGGM dưới 16% ở người 30-69 tuổi; 50% số người bị bệnh ĐTD được phát hiện và 50% số người phát hiện bệnh được quản lý, điều trị theo hướng dẫn chuyên môn. Để đạt được mục tiêu trên, Chiến lược đã đưa ra nhiều giải pháp tổng thể, tích cực, lâu dài, trong đó có các giải pháp có hiệu quả trong phòng, chống các bệnh không lây nhiễm như kiểm soát các nguy cơ gây bệnh: dinh dưỡng không hợp lý, thực phẩm không an toàn, lạm dụng đồ uống có cồn, thiếu hoạt động thể lực [44].

Như vậy, việc tìm kiếm các giải pháp hỗ trợ phòng và điều trị bệnh ĐTD thông qua việc kiểm soát glucose máu ở cộng đồng là hết sức quan trọng bao gồm sự kết hợp của nhiều giải pháp, từ giải pháp dinh dưỡng, tăng cường hoạt động thể lực, chế độ ăn uống hợp lý, thay đổi lối sống tới việc sử dụng các sản phẩm hỗ trợ có nguồn gốc từ thực vật, đặc biệt là các sản phẩm thực vật giàu polyphenols đang là xu thế nghiên cứu và triển khai áp dụng hiện nay.

1.1.4. Các giải pháp can thiệp hỗ trợ phòng, điều trị đái tháo đường và rối loạn glucose máu

Các biện pháp chính trong phòng và điều trị ĐTD và RLGM là thay đổi lối sống, thực hiện chế độ ăn hợp lý và tăng cường vận động, bên cạnh đó là sử dụng các sản phẩm, thuốc có tác dụng kiểm soát glucose máu. Theo ADA, CDA, ACE và IDF, mục tiêu chính của mọi giải pháp là phải kiểm soát, duy trì nồng độ glucose máu ở mức bình thường, trong đó có việc hạn chế tăng glucose máu sau ăn và kiểm soát chỉ số glucose máu về lâu dài. Việc kiểm soát tốt glucose máu ở bệnh nhân ĐTD sẽ góp phần giảm các rối loạn chuyển hóa glucose, rối loạn chuyển hóa lipid máu, đồng thời giảm các biến chứng do tăng glucose máu gây ra [62, 82, 105].

1.1.4.1. Thay đổi lối sống, chế độ ăn và luyện tập

Các yếu tố nguy cơ của ĐTD và RLGM thường gặp là tuổi, giới, chủng tộc, gia đình, thừa cân béo phì, sinh con cân nặng trên 4 kg, ĐTD thai kỳ, tiền sử RLGM, kháng insulin, chế độ ăn, ít vận động, stress... Trong đó, các nhà khoa học cũng đã chỉ ra nguyên nhân hàng đầu là giảm hoạt động thể lực và chế độ ăn giàu năng lượng, ít chất xơ [104, 105]. Chính vì vậy, sự phối hợp hoạt động thể lực thường xuyên và điều chỉnh chế độ ăn có thể giúp giảm nguy cơ mắc ĐTD rất đáng kể [1].

Tăng cường luyện tập thể lực

Luyện tập phải phù hợp với lứa tuổi, tình trạng sức khỏe và sở thích cá nhân. Nên tập những môn rèn luyện sự dẻo dai bền bỉ hơn là những môn cần sử dụng nhiều thể lực. Theo các nghiên cứu trên thế giới, việc tập luyện thể lực thường xuyên có tác dụng làm giảm nồng độ glucose máu ở bệnh nhân ĐTD, đồng thời giúp duy trì sự bình ổn của lipid máu, huyết áp, cải thiện tình trạng kháng insulin và cải thiện tích cực về mặt tâm lý. Sự phối hợp hoạt động thể lực thường xuyên và điều chỉnh chế độ ăn có thể giúp giảm nguy cơ mắc ĐTD rất đáng kể [1]. Để đạt được mục đích này phải luyện tập khoảng 35-45 phút, mỗi tuần ít nhất 4-5 ngày [61].

Thực hiện chế độ ăn hợp lý

Thực phẩm ăn hàng ngày có tác động lớn đến lượng glucose trong máu. Thức ăn chứa carbohydrate sẽ làm tăng lượng glucose trong máu nên cần giảm ăn thực phẩm chứa nhiều carbohydrate như cơm, bánh mì, bánh kẹo. Thay vào đó, nên ăn nhiều rau xanh vì chứa nhiều khoáng chất, chất xơ và vitamin. Các loại rau họ cải là thực phẩm giàu chất xơ giúp ngừa ĐTĐ.

1.1.4.2. Sử dụng thuốc trong phòng và điều trị đái tháo đường

Cơ chế sinh lý bệnh chủ yếu của bệnh ĐTĐ là kháng insulin ở mô ngoại biên và giảm sản xuất insulin của tế bào beta ở tiểu đảo Langerhans của tuyến tụy nội tiết. Chính vì vậy, các nhóm thuốc chính điều trị bệnh ĐTĐ đều dựa trên những cơ chế bệnh sinh chính của bệnh là kích thích tụy tiết insulin, giảm kháng insulin (hay tăng nhạy cảm insulin), ức chế sự hấp thu glucose ở niêm mạc ruột. Các nghiên cứu sử dụng thuốc bao gồm các thuốc uống hạ glucose máu, các thuốc giảm cân và thuốc giảm huyết áp [105].

1.1.4.3. Sử dụng thực vật trong hỗ trợ phòng và điều trị đái tháo đường

Trong những thập kỷ gần đây, các nghiên cứu về các loài thực vật có khả năng hỗ trợ quản lý bệnh ĐTĐ và biến chứng ĐTĐ đang ngày càng thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới. Hiện nay, bên cạnh việc sử dụng các thuốc hóa dược trong điều trị ĐTĐ, nhiều loại thực vật đã được khuyến cáo sử dụng với mục đích hỗ trợ hoặc bổ sung thay thế thuốc điều trị cho bệnh nhân ĐTĐ. Trên thế giới có khoảng 1200 cây thực vật đã được ghi nhận có tác dụng trên bệnh nhân ĐTĐ. Thực vật là một lĩnh vực rộng, dễ tìm kiếm trong tự nhiên, thường có ít hoặc không có tác dụng phụ [22, 150]. Tương tự như nhóm thuốc ức chế α -glucosidase tổng hợp, nhiều dược liệu cũng có khả năng thủy phân glucid trong dịch tiêu hóa. Vì vậy việc sử dụng các cây thuốc với cơ chế này có thể giúp làm giảm hoặc chậm sự tăng glucose máu sau ăn trên bệnh nhân. Phát hiện ra chất ức chế α -glucosidase phù hợp ít tác dụng phụ là một thách thức trong việc tìm thuốc chữa bệnh hiệu quả. Trên cơ sở đó đã có nhiều nghiên cứu sàng lọc tác dụng ức chế enzyme α -glucosidase với nhiều dược liệu khác nhau [150, 154, 155].

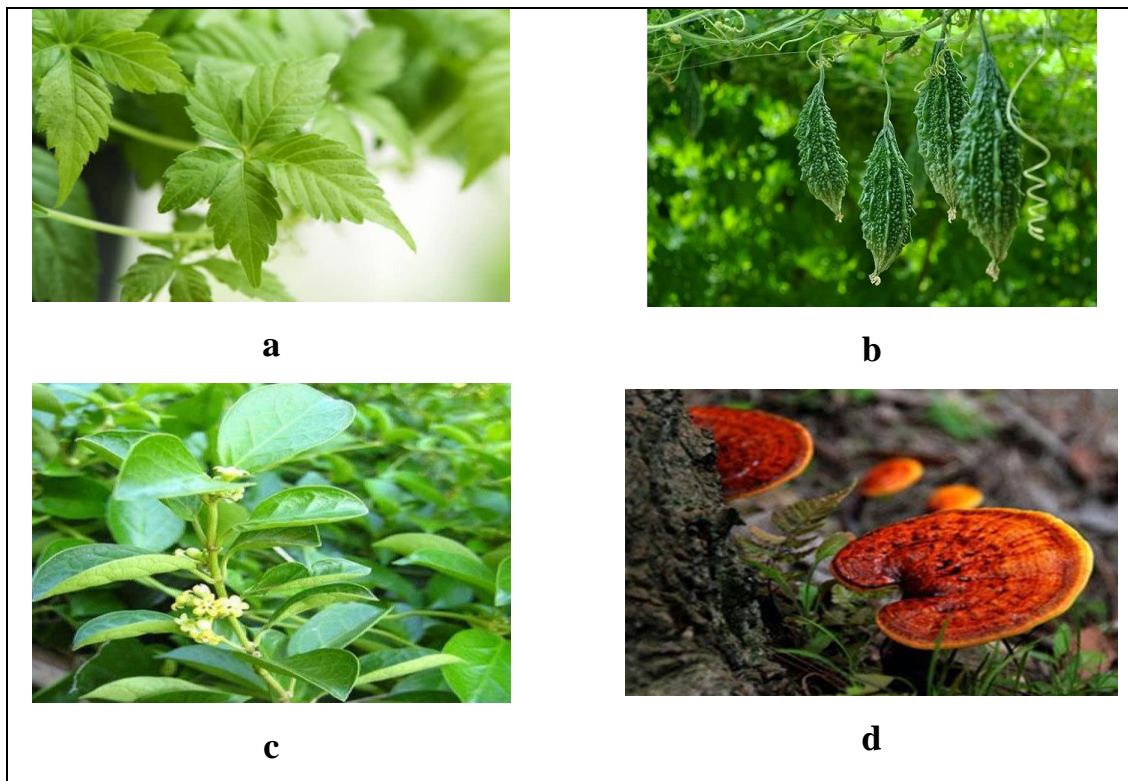
Ngoài các nghiên cứu chứng minh vai trò kiểm soát glucose máu của thảo dược đơn lẻ, còn có rất nhiều các nghiên cứu đặc biệt ở Trung Quốc, Ấn Độ đã nghiên cứu phối hợp nhiều thảo dược để tăng hiệu quả điều trị bệnh ĐTĐ type 2. Mỗi thực vật có thể chứa một hoặc nhiều hoạt chất khác nhau tác dụng hạn chế tăng glucose máu. Hoạt chất bao gồm polyphenol, flavonoid, alkaloids, terpenoid, anthocyanins và một số hoạt chất khác đã được phân lập từ thực vật [52, 95, 99, 101, 149]. Bên cạnh việc nghiên cứu chiết tách các thành phần hoạt tính đơn lẻ từ nguyên liệu thực vật nhằm tạo ra các dược phẩm, các nhà khoa học hiện nay chú trọng tới các thực vật có chứa nhiều hoạt tính, các hoạt tính có thể tương hỗ nhau, có nhiều tác dụng cùng lúc. Một nguyên liệu thực vật lý tưởng cho việc phòng trị bệnh ĐTĐ là nguyên liệu đó chứa nhiều hoạt tính có lợi, bao gồm khả năng kiểm soát glucose máu, cải thiện tình trạng hoạt động/bài tiết của insulin, giảm tình trạng stress cũng như việc cải thiện sự rối loạn các chuyển hóa lipid, đồng thời nguyên liệu đó phải đảm bảo an toàn.

Theo danh sách số liệu của WHO có khoảng 1200 loài thực vật với 183 họ có hoạt tính chống ĐTĐ [150]. Trong đó một nửa trong số đó được sử dụng theo đông y để phòng chống ĐTĐ, tuy nhiên chỉ có một nửa số cây thảo dược này được nghiên cứu thực nghiệm. Các phương pháp thử nghiệm được sàng lọc các nguyên liệu thiên nhiên có hoạt tính chống ĐTĐ thì rất đa dạng và không thể so sánh trực tiếp. Các kỹ thuật trên động vật với hình thức sử dụng động vật khỏe mạnh và động vật bị mắc ĐTĐ (tạo ra động vật bị mắc ĐTĐ bằng thuốc) giống như tình trạng ĐTĐ trên người. Các nhà khoa học trên thế giới đã xác định một số thành phần trong nguyên liệu thiên nhiên được chiết xuất có hoạt tính chống ĐTĐ như: polyphenol, flavonoid, alkaloids, terpenoid, anthocyanins và một số hợp chất khác [150, 154].

Các cơ chế chống ĐTĐ liên quan đến khả năng giảm glucose máu của các nguyên liệu tự nhiên bao gồm cơ chế cạnh tranh trực tiếp với insulin, kích thích bài tiết insulin, kích thích tăng tổng hợp glycogen, cơ chế chẹn vận chuyển Kali

trong tế bào beta của tụy, kích thích AMP vòng điều khiển sự hấp thụ glucose từ ruột non và một số cơ chế khác, ví dụ: quả mướp đắng (kích thích tuyến tụy bài tiết insulin, giảm glucose máu) lá chè xanh (chậm hấp thụ glucose từ ruột, kích thích hoạt động của insulin), lá ổi (chậm hấp thụ glucose từ ruột, cây quế giảm glucose máu, giảm sự kháng insulin), khoai lang trắng (giảm sự kháng insulin) [56, 92, 109, 111, 121, 147].

Hiện nay các nhà khoa học trên thế giới đã áp dụng các khoa học kỹ thuật hiện đại để chiết tách, chiết xuất các thành phần có hoạt tính sinh học từ các nguyên liệu thực vật, đưa các thành phần hoạt tính vào sử dụng thành các dược phẩm và đang được sử dụng rộng rãi trên thế giới. Bên cạnh đó các nhà khoa học về thực phẩm cũng đã và đang sử dụng chính các nguyên liệu tự nhiên có hoạt tính chống ĐTĐ vào trong thực phẩm hoặc đồ uống, ăn nhằm hỗ trợ cho người bệnh và người có nguy cơ mắc bệnh ĐTĐ có thể tiếp cận một cách thuận tiện [52, 109, 121]. Một số loại thảo dược hay gặp được chỉ ra ở hình 1.3.



Hình 1.3. Một số thảo dược có tác dụng hạ glucose máu

(a). Giảo cổ lam; (b). Mướp đắng; (c). Dây thìa canh; (d). Nấm linh chi

Theo WHO, một sản phẩm được coi là thảo dược khi thành phần chính gồm một bộ phận của thảo mộc nằm trên không hay dưới đất, trong hình dạng nguyên thủy hay sau khi được chế biến. Khi có pha lẫn hóa hay khoáng chất thì sản phẩm đó không còn là thảo dược nữa. WHO nhận định, hiện nay có tới 80% dân số trên thế giới dùng thảo dược. Khoảng 50 năm qua, con người hầu như hoàn toàn dựa vào cây cỏ để chữa tất cả các loại bệnh mà chủ yếu dựa vào các hợp chất polyphenol và flavonoid có sẵn trong thực vật. Thảo dược thường được dùng để bổ sung cho các loại thuốc chính quy, tạo ra những loại thuốc an toàn, có khả năng thích ứng tốt với những căn bệnh mãn tính [106, 150, 153].

1.2. Polyphenol

1.2.1. Đặc điểm

Hợp chất phenol là nhóm các chất khác nhau rất phổ biến trong thế giới thực vật, chúng thường tồn tại dưới dạng glycozit dễ tan trong nước và thường tập trung ở không bào của các tế bào thực vật. Đặc điểm chung của chúng là trong phân tử có vòng thơm (vòng benzen) mang một hoặc nhiều nhóm hydroxyl (OH) gắn trực tiếp vào vòng benzen. Tùy thuộc vào số lượng và vị trí tương hỗ của các nhóm này, mà các tính chất lý hóa học hoặc các hoạt tính sinh học thay đổi [127].

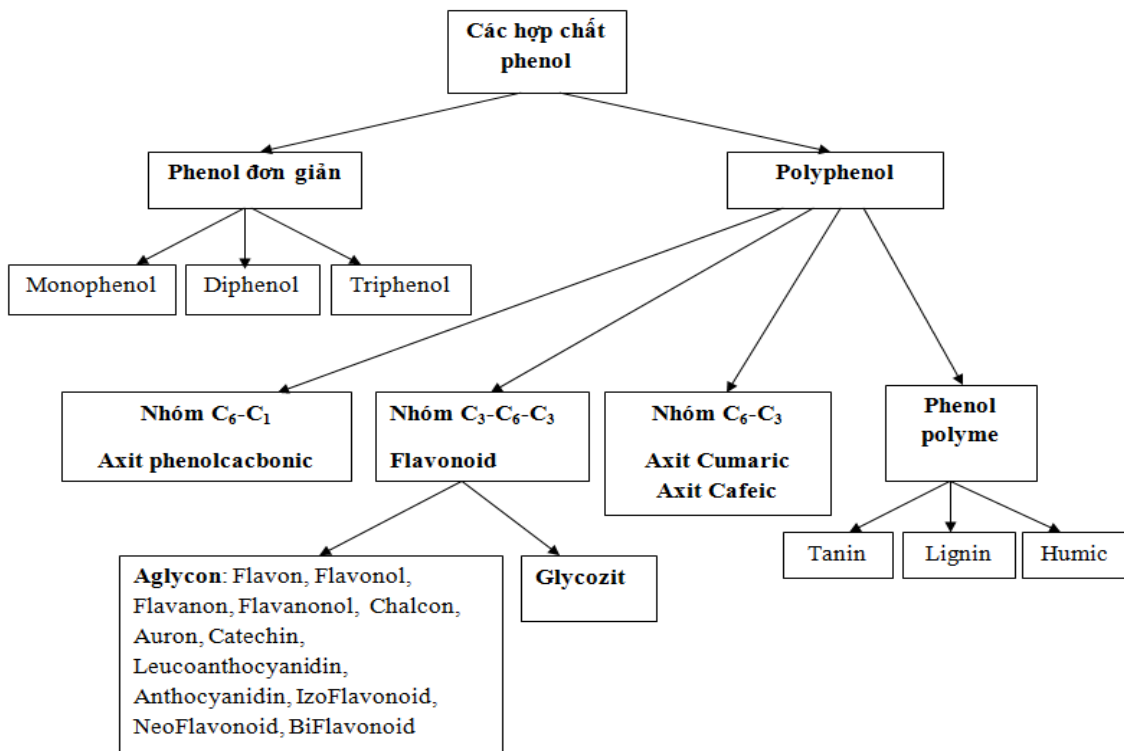
Polyphenol là một hợp chất có trong thực vật tự nhiên mà nó có thể cho màu và mùi vị. Polyphenol cấu thành từ các vòng benzene với vị trí các gốc OH khác nhau chia thành nhiều nhóm polyphenol khác nhau. Polyphenol chia thành: nhóm non-flavonoid và nhóm flavonoid. Nhóm non-flavonoid gồm ellagic acid, có trong loại quả dâu, đào, chanh. Nhóm flavonoid xác định có hơn 4.000 loại. Bao gồm anthocyanin có trong một số quả chín, catechins có trong chè xanh, rượu vang, flavanones, flavones có trong quả và các loại rau, chè xanh, rượu vang [95, 163].

1.2.2. Phân loại

Dựa theo số lượng nhóm hydroxyl mà người ta phân biệt thành:

- *Nhóm phenol đơn giản*: gồm các hợp chất được cấu tạo từ 1 vòng benzen và một hay nhiều nhóm OH, được phân thành các: mono phenol; di phenol (pyrocatechin, rezoxyn); tri phenol (pyrogalon, oxy hydroquinon).

- *Nhóm hợp chất phenol phức tạp (polyphenol)*: trong thành phần cấu tạo, ngoài vòng benzen có dị vòng mạch nhánh, được phân thành các nhóm [65, 85, 127], minh họa ở hình 1.4.



Hình 1.4. Sơ đồ phân loại các hợp chất phenol và polyphenol

- Monome hay polyphenol đơn giản được chia thành:
 - + Nhóm C₆-C₁ (axit phenol cacbonic): trong cấu trúc phân tử có thêm nhóm cacbonyl, thường gặp ở hạt nảy mầm.
 - + Nhóm C₆-C₃ (axit cumaric, axit cafeic): có gốc cacbonyl được nối với nhân benzen qua 2 nguyên tử cacbon, thường gặp ở thực vật bậc cao.
 - + Nhóm C₆-C₃-C₆: gọi là các Flavonoid, được chia thành 2 dạng: dạng tự do (Aglycon) và dạng liên kết với đường (glycozit). Aglycon chia thành các nhóm phụ như flavon, flavonol (sắc tố vàng), antoxyanidin (sắc tố xanh, đỏ và tím), catechin (không màu).

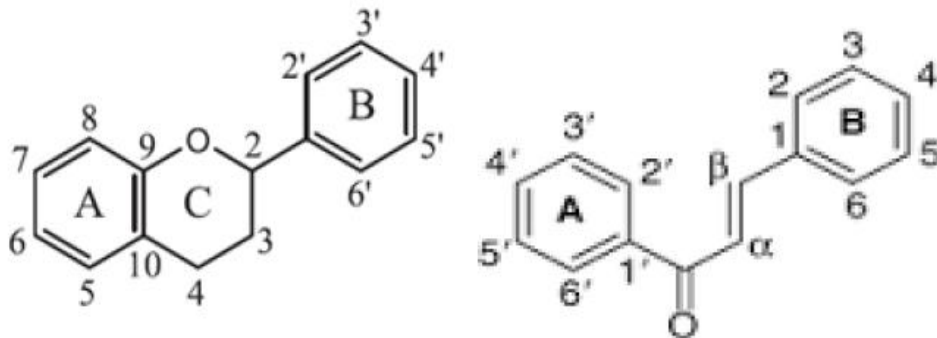
- Nhóm hợp chất polyphenol polyme: được chia thành các nhóm phụ như Tanin, Lignin, Axit Humic.

Trên thế giới có khoảng 1200 cây thực vật đã được ghi nhận có tác dụng trên bệnh nhân ĐTĐ. Mỗi cây thực vật có thể chứa một hoặc nhiều hoạt chất khác nhau tác dụng hạn chế tăng glucose máu như: polyphenol, flavonoid, alkanoids, terpenoid, anthocyanins và các hoạt chất khác đã được phân lập từ thực vật [95, 163]. Trong nhóm hợp chất polyphenol thực vật, hợp chất flavonoid được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu do vai trò ngày càng quan trọng đối với sức khỏe con người.

1.2.3. Flavonoid

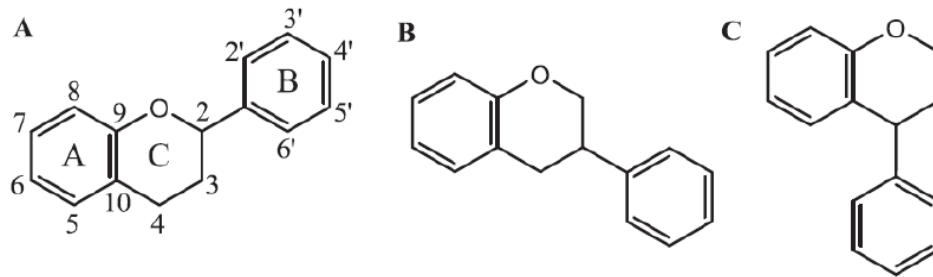
1.2.3.1. Cấu trúc

Flavonoid là những hợp chất màu phenol thực vật, tạo màu cho rất nhiều loại rau, hoa và quả. Flavonoid có cấu trúc cơ bản là 1,3-diphenylpropan, nghĩa là gồm 2 vòng benzen (vòng A và B) nối với nhau qua 1 dây 3 carbon (vòng pyron - vòng C).



Hình 1.5. Khung sườn cơ bản của flavonoid [30]

Flavonoid được chia thành ba phân nhóm chính: euflavonoid (2-phenylbenzopyrans), isoflavonoid (3-benzopyrans) và neoflavonoid (4-benzopyrans). Trong mỗi nhóm này các flavonoid lại được chia thành các nhóm phụ khác nhau dựa vào sự khác biệt trong cấu tạo của vòng C [22], [23].



Hình 1.6. Các phân nhóm chính của flavonoid

(A: euflavonoid, B: iso-flavonoid, C: neo-flavonoid)

- Phân nhóm của euflavonoid gồm các nhóm phụ: flavan, flavan 3-ol (catechin), flavan 4-ol, flavan 3,4-diol, anthocyanidin, flavanone, flavone, flavonol, 3-hydroxy flavanon, chalcon, dihydrochalcon, aurone.
- Phân nhóm isoflavonoid gồm các nhóm phụ: iso flavan, iso flavan-4-ol, isoflavan, isoflavanon, rotenoid. Thường gặp nhất là isoflavan trong cây họ đậu.
- Neoflavan chỉ giới hạn trong một số cây gồm các nhóm phụ 4-aryl-chroman, 4-aryl-coumarin, dalbergion.

1.2.3.2. Đặc điểm, tính chất

Trong thực vật, flavonoid tồn tại ở 2 dạng: dạng tự do (gọi là aglycon) và dạng liên kết với đường (glycoside). Các glycoside khi bị thủy phân bằng acid hoặc enzyme sẽ giải phóng ra đường và aglycon. Các đường thường gặp nhất là D-glucose, D-galactose, L-rhamnose, L-arabinose, D-xylose, D-apiose [27].

Tính tan: aglycon kém tan trong dung môi kém phân cực (hexan, benzen, ether dầu hỏa), tan trong dung môi phân cực vừa và mạnh (ethyl acetate, dimethyl ether, methanol, ethanol), tan trong kiềm loãng, kém tan trong dung dịch acid. Glycoside: tan trong ethanol, methanol. Các glycoside càng có nhiều nhóm đường và mạch đường càng dài thì tan tốt trong nước nóng. Các flavonoid glycoside có nhóm -OH tại vị trí C7 còn tan được trong dung dịch NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃ do có tính acid. Các flavonoid dạng aglycon thường dễ kết tinh, trong khi các glycoside thường khó kết tinh hơn [27].

Các flavonoid thường có màu. Flavon có màu vàng nhạt hoặc màu cam; flavonol có màu vàng đến vàng nhạt; chalcon có màu vàng đến cam đỏ. Các isoflavon, flavanon, flavanonol, leucoanthocyanidin, catechin kết tinh không màu. Anthocyanidin thường hiện diện ở dạng glycosid: pelargonidin, cyanidin, delphinidin tạo màu xanh dương, đỏ, tím cho hoa và trái [27, 30].

Các flavonoid dễ tạo muối tan trong nước với các hydroxyd kiềm, nhạy cảm với pH, nhiệt độ và ánh sáng. Có khả năng tạo phức với các ion kim loại cho sản phẩm có màu đặc trưng.

Hệ thống nối đôi liên hợp tạo ra bởi 2 vòng benzen và vòng pyron làm cho flavonoid có khả năng hấp thụ tia tử ngoại. Thường thu được 2 dải hấp thụ cực đại, dải 1 có $\lambda_{\max} = 320 - 380 \text{ nm}$, dải 2 có $\lambda_{\max} = 240 - 280 \text{ nm}$ [27].

1.2.3.3. Một số thực vật giàu flavonoid trên thế giới và tại Việt Nam

Flavonoid là hợp chất thuộc nhóm hợp chất polyphenol phổ biến nhất được tìm thấy trong tất cả các loại thực vật. Chúng được phân phối rộng rãi trong nhiều bộ phận và đảm nhiệm nhiều chức năng khác nhau chỉ ra ở bảng 1.3.

Bảng 1.3. Một số thực vật giàu flavonoid [125]

Phân nhóm Flavonoid	Tên aglycone	Thực vật phân bố
Flavonol	Isorhamnetin, Kaempferol, Myricetin, Quercetin	Các loại trà, hành tây, hành lá, rau diếp, bông cải xanh, táo, quả mọng
Flavone	Apigenin, Luteolin, Baicalin, Chrysin	Cần tây, mùi tây, ớt, xạ hương
Flavanone	Eriodictyol, Hesperetin, Naringenin	Quả thuộc họ cam chanh
Isoflavone	Daidzein, Genistein, Glycitein, Biochanin A, Formononetin	Đậu tương, các cây họ đậu

Flavonoid chủ yếu phân bố trong lá, hoa và các bộ phận gỗ như thân cây và vỏ cây. Chúng rất quan trọng cho sự tăng trưởng và phòng vệ, chống lại nhiễm trùng và chấn thương cho cây. Một số thực vật giàu flavonoid được thể hiện trong bảng 1.3.

1.2.3.4. Cơ chế tác dụng của flavonoid đối với kiểm soát glucose máu

Tác động bảo vệ của các flavonoid đối với tim mạch có thể do khả năng của chúng trong việc ngăn ngừa sự oxy hóa các lipoprotein tỷ trọng thấp, phòng ngừa xơ vữa động mạch, chặn sự kết tụ huyết khối, điều hòa nhịp tim, ngăn ngừa bệnh mạch vành và nhồi máu cơ tim, điều hòa huyết áp... Các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng các flavonoid tự nó có vai trò như chất kích thích insulin hay bất chức năng của insulin; ngoài ra chúng còn có sự ảnh hưởng đến hoạt động của các enzyme trong quá trình chuyển hóa đường [97].

Chất ức chế α -Glucosidase (α -Glucosidase inhibitors) được mô tả là có hiệu quả trong việc điều hòa đường huyết sau ăn ở bệnh nhân ĐTD típ 2. Các chất ức chế α -glucosidase có thể làm chậm quá trình phân hủy và hấp thụ carbohydrate trong chế độ ăn uống bằng cách hạn chế phân hủy các đơn vị oligosaccharide mạch thẳng hoặc mạch nhánh như dextrin, maltose và maltotriose để sản xuất glucose, do đó ngăn chặn sự hấp thụ glucose vào tuần hoàn [134].

Theo một nghiên cứu của Guasch-Ferré và cộng sự [96], một loại flavonoid được gọi là flavan-3-ols có thể đặc biệt có lợi cho việc giảm kháng insulin. Đánh giá tương tự cũng cho thấy flavonoid đường như là loại polyphenol thường liên quan đến nguy cơ mắc bệnh ĐTD típ 2.

Một phân tích các nghiên cứu về lượng flavonoid và bệnh ĐTD típ 2 đã kết luận rằng những người tiêu thụ nhiều flavonoid có nguy cơ mắc bệnh ĐTD típ 2 thấp hơn so với những người dùng ít nhất. Tăng lượng flavonoid cũng là một cách để giảm nguy cơ mắc bệnh đáng kể [119].

Các nghiên cứu cho thấy Flavonoid thuộc nhóm polyphenol và saponin thực vật như Giáo cổ lam có tác dụng kiểm soát glucose máu trên chuột khỏe mạnh và chuột ĐTĐ [166].

1.2.3.5. Hỗ trợ phòng chống đái tháo đường và một số bệnh mạn tính bằng các sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật

Theo ước tính của Tổ chức Y tế Thế giới, hiện có khoảng 80% dân số ở các nước đang phát triển sử dụng y học cổ truyền hoặc sản phẩm có nguồn gốc từ thảo dược để chăm sóc sức khỏe và dự phòng các bệnh mạn tính không lây do thường ít gây tác dụng phụ và có thể dùng lâu dài đối với người mắc bệnh mạn tính, trong đó có bệnh ĐTĐ. Các nghiên cứu về cây cỏ thực vật có khả năng hỗ trợ phòng, điều trị bệnh ĐTĐ và các biến chứng gây nên đang ngày càng thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới [75, 87, 92]. Đã có khoảng 1200 loài thực vật được xác định là có khả năng giảm glucose máu [75]. Bên cạnh việc nghiên cứu chiết tách các thành phần hoạt tính đơn lẻ từ nguyên liệu thực vật nhằm tạo ra các dược phẩm, các nhà khoa học hiện nay chú trọng tới các thực vật có chứa nhiều hoạt tính, các hoạt tính có thể tương hỗ nhau, có nhiều tác dụng cùng lúc. Một nguyên liệu thực vật lý tưởng cho việc phòng trị bệnh đái tháo đường là nguyên liệu đó chứa nhiều hoạt tính có lợi, bao gồm khả năng kiểm soát đường huyết, cải thiện tình trạng hoạt động và bài tiết của insulin, giảm tình trạng stress cũng như việc cải thiện sự rối loạn các chuyển hóa lipid, đồng thời nguyên liệu đó không có tác phụ [75, 92].

Từ các nghiên cứu trên động vật, thử nghiệm trên người, các nhà khoa học và các nhà sản xuất thực phẩm chức năng trên thế giới đã và đang tạo ra các sản phẩm có khả năng phòng trị bệnh đái tháo đường từ các loại thực vật chứa nhiều polyphenol [65, 85, 150, 162]. Các nghiên cứu về nguyên liệu dạng hạt, lá cho thấy nguyên liệu khi được xay nhỏ mịn thì khi pha chế sẽ có hàm lượng polyphenol cao hơn do tăng diện tích tiếp xúc của nguyên liệu với dung môi chiết tách dùng trong pha chế [65].

1.2.3.5.1. Các nghiên cứu trên thế giới

Ngày nay xu hướng dùng các sản phẩm từ thảo dược trong phòng bệnh, cải thiện sức khỏe và hỗ trợ điều trị bệnh ĐTD ngày càng phổ biến. Các hợp chất trong các loại thảo dược trực tiếp tác động vào cơ chế bệnh sinh của bệnh ĐTD bằng cách kích thích sản xuất insulin, nâng cao độ nhạy cảm insulin hoặc điều chỉnh khả năng hấp thụ glucose của ruột [22, 150]. Có nhiều loại thực vật được tìm thấy có khả năng hỗ trợ kiểm soát glucose máu.

Cỏ cà ri (Trigonella foenum-graecum)

Cỏ cà ri là một loại cây thuộc về họ Đậu, phần là được sử dụng như là cây thuốc, được trồng rộng khắp trên thế giới như là một loại cây trồng bán khô hạn. Người Ấn độ sử dụng hạt làm một loại gia vị truyền thống, dùng từ thời xa xưa làm thảo dược chữa bệnh nay trở lên phổ biến nhờ khả năng kiểm soát glucose máu của bệnh nhân ĐTD đến 45% bằng cách làm chậm sự hấp thu các loại thực phẩm có glucose cao sau ăn. Ngoài ra, phần chất xơ hòa tan (galactomannan) của cỏ cà ri ngoài giảm lượng glucose trong máu của bệnh nhân ĐTD còn làm giảm cholesterol và đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ kiểm soát cân nặng. Kết quả này có được là nhờ hai chất là galactomannan làm chậm hấp thu glucose vào máu và acid amin 4-hydroxyisoleucin kích thích tiết insulin. Chính vì vậy, cỏ cà ri là một trong số ít thảo dược được WHO và nhiều quốc gia công nhận là có hoạt tính hạ lượng glucose trong máu, hỗ trợ điều trị cho các bệnh nhân ĐTD type 2 [150, 155].

Quế (Cinnamon)

Quế là phần thu được từ lớp vỏ thân cành của một số loài thực vật thuộc chi *Cinnamomum*, có vị cay, mùi thơm được dùng để làm thuốc và gia vị trong chế biến thực phẩm. Nhiều nghiên cứu cho thấy, thành phần chiết xuất từ quế có tác dụng chống bệnh ĐTD bằng cách hạn chế lượng glucose máu và giảm thiểu sự đề kháng insulin. Trong mô hình động vật thực nghiệm, quế làm giảm đường huyết lúc đói và huyết tương sau ăn và HbA1c. Ngoài ra quế còn có tác dụng

làm giảm glucose máu, mỡ máu và cholesterol. Thử nghiệm lâm sàng trên bệnh nhân ĐTĐ, người mắc bệnh tiền ĐTĐ và người có HbA1c trước điều trị cao dùng sản phẩm *Cinnamomum cassia* của Now Foods ở dạng bột với liều từ 500 mg đến 6 g mỗi ngày trong thời gian kéo dài từ 40 ngày đến 4 tháng cho thấy có sự cải thiện đáng kể trong kiểm soát glucose máu [125].

Nghiên cứu của Richard A. Anderson cho thấy, nếu bệnh nhân ĐTĐ bổ sung vào bữa ăn 1g quế liên tục trong 40 ngày thì lượng glucose máu, mỡ máu và cholesterol sẽ giảm đáng kể. Trong 60 bệnh nhân ĐTĐ típ 2 thuộc nghiên cứu, một số người được dùng 1; 3 hoặc 6g quế mỗi ngày, số khác dùng giả dược ở mức tương đương, liên tục trong 40 ngày. Kết quả cho thấy, tất cả những người dùng quế đều có lượng glucose, mỡ máu và cholesterol giảm 30%, còn nhóm dùng giả dược không thay đổi. Nhưng vì có thể biến thành độc tố nếu ở hàm lượng cao nên chỉ dùng 1g/ngày là an toàn [160].

Nhân sâm (Panax Ginseng)

Nhân sâm là một loài thực vật thuộc họ Cuồng, là một trong 4 loại thuốc quý của Đông y từ hàng ngàn năm trước. Ngày nay Y học hiện đại đã có nhiều công trình nghiên cứu chứng minh tác dụng dược lý, trong đó có nghiên cứu đã chỉ ra rằng nhân sâm có thể cải thiện việc kiểm soát glucose máu và mức hemoglobin glycosyl hóa (HbA1c) trong máu. Một nghiên cứu khác cho thấy các bệnh nhân dùng liều 3g nhân sâm có lượng glucose trong máu thấp hơn nhóm dùng giả dược là 59,1%. Nhân sâm được chứng minh có tác dụng tăng cường sinh insulin của tuyến tụy, và tăng số lượng thụ thể của insulin [158].

Mướp đắng (Momordica charantia)

Mướp đắng hay còn gọi là khổ qua có tên khoa học là *Momordica charantia*, là một cây leo ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới Châu Á, châu Phi và Châu Mỹ, thuộc họ Bầu bí, có quả, được sử dụng thông dụng ở miền Nam Việt Nam. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng trong Mướp đắng có charantin có tác dụng hạ glucose máu. Trà được chế biến từ quả mướp đắng dưới dạng đóng gói túi

lọc, bệnh nhân ĐTĐ sử dụng bằng cách nhúng gói trà vào nước sôi để uống hàng ngày, được sử dụng phổ biến tại một số nước châu Á [145]. Nghiên cứu tác dụng chống đái tháo đường của dịch chiết từ hạt mướp đắng ở chuột bị tiểu đường do alloxan gây ra cho thấy dùng đường uống chiết xuất hạt mướp đắng giúp đường huyết lúc đói giảm đáng kể [116].

Hành tây và tỏi (Allium CEPA và Allium sativum)

Bằng chứng thực nghiệm lâm sàng cho thấy allyl propyl disulphide (APDS) trong hành tỏi tây làm giảm nồng độ glucose trong máu bằng cách cạnh tranh với insulin tại nơi insulin khử hoạt tính trong gan, điều này dẫn đến sự tăng insulin tự do. Liều dùng 125mg/kg cân nặng trong bữa ăn làm giảm đáng kể lượng glucose trong máu và tăng insulin huyết thanh. Chất allicin trong hành tỏi tây có tác dụng tương tự với liều 100mg/kg cân nặng [69].

Trà Ô long

Trà Ô long là một loại trà truyền thống của Trung Quốc (*Camellia sinensis*). Một nghiên cứu của Hollman, P đã chứng minh trà Ô long có chứa chất chống oxy hóa epigallocatechin gallate (EGCG) và đưa ra sản xuất dưới dạng trà uống có tác dụng hỗ trợ cho bệnh nhân đái tháo đường [100].

Lá ổi

Lá ổi được nghiên cứu trên ống nghiệm về khả năng ức chế tạm thời men tiêu hóa đường, sau đó được thử nghiệm trên chuột và thử nghiệm hiệu quả kiểm soát đường huyết sau ăn nước trà lá ổi. Cho đến nay nước trà lá ổi được dùng hạn chế tăng đường huyết sau ăn là một hình thái dưới dạng nước chiết tách từ lá ổi, sau đó pha chế để đóng chai, và đã được sử dụng phổ biến tại nước Nhật [138].

1.2.3.5.2. Các nghiên cứu tại Việt Nam

Việc sử dụng các nguyên liệu thực vật, một nguồn nguyên liệu phong phú của Việt Nam, cũng đang được các nhà nghiên cứu quan tâm khai thác. Các bài thuốc đông y, các cây thuốc dân gian có tác dụng phòng trị bệnh đái tháo đường

của cha ông để lại cũng đã góp phần giúp cho các nhà khoa học định hướng nghiên cứu sâu hơn để tìm ra các bằng chứng khoa học. Cùng với các nhà khoa học trên thế giới, các nhà khoa học Việt Nam cũng đã và đang nghiên cứu tìm ra các biện pháp nhằm hỗ trợ việc phòng trị bệnh đái tháo đường [38, 39, 62]. Đã có các nghiên cứu về quả khổ qua (mướp đắng) về hiệu quả giảm đường huyết, hay nghiên cứu lá khoai lang với tác dụng giảm đường huyết trên chuột. Các nghiên cứu về nụ vôi trên chuột ĐTD và trên bệnh nhân ĐTD đã cho thấy nụ vôi có tác dụng kiểm soát glucose máu [147].

Sau khi sàng lọc trên 28 loại thực vật ăn được ở Việt Nam, một nghiên cứu đã tìm thấy nụ Vôi với hàm lượng polyphenol cao (128 mg catechin/gram trọng lượng khô) với khả năng ức chế enzyme α -glucosidase [121]. Thử nghiệm khả năng hạn chế tăng glucose máu sau ăn của nụ Vôi trên người khỏe mạnh cho thấy, cùng trên một nhóm đối tượng, lượng đường huyết sau ăn tăng ít hơn một cách có ý nghĩa ở ngày uống nụ Vôi so với ngày uống nước sôi [53].

Nghiên cứu về dây thìa canh hay còn gọi là lã ti rừng có tên khoa học là *gymnema sylvestre*. Đây là một loại cây dây leo, thân gỗ, được sử dụng tại Việt Nam, Ấn Độ, Trung Quốc hơn 2.000 năm. Thảo dược có chứa hoạt chất chính là gymnemic acid này được sử dụng rộng rãi tại nhiều nước trong đó có Việt Nam, cơ chế tác dụng đã được chứng minh là tăng tiết insulin của tuyến tụy, tăng cường hoạt lực của insulin, ức chế hấp thu glucose ở ruột, làm tăng hoạt tính của men hấp thu và sử dụng glucose, giảm cholesterol và lipid máu [114]. Theo kết quả nghiên cứu của tác giả Trần Văn Ôn và cs năm 2008 cho thấy dây thìa canh tại Việt Nam cũng cho tác dụng hạ glucose máu như dây thìa canh ở nhiều nước khác. Tác dụng hạ glucose máu của dây thìa canh có những điểm tương tự như insulin nhanh: đỉnh tác dụng hạ glucose máu ở 2h và duy trì đến 4h; mức độ hạ glucose máu tương đương ở thời điểm 2h và 4h [50].

Nghiên cứu về cây giảo cổ lam, trong một nghiên cứu được sự tài trợ của Cơ quan Hợp tác Phát triển Thụy Điển, Hội ĐTD Thụy Điển, Hội đồng Nghiên

cứu Thụy Điển và Viện Nghiên cứu Karolinska Institutet, các nhà khoa học Việt Nam (Viện Dược liệu Trung ương và Đại học Y Hà Nội) đã tìm thấy một hoạt chất hoàn toàn mới, chưa từng được phát hiện và công bố trên thế giới từ dịch chiết của cây *Gynostemma pentaphyllum* Makino (Cucurbitaceae), một loại thảo dược tại Việt Nam với tên gọi giáo cỏ lam, được báo cáo là có rất nhiều tác dụng tốt như ngăn chặn sự phát triển của khối u, tác dụng hạ cholesterol, tác dụng tăng cường, kích thích miễn dịch, chống ôxy hoá và tác dụng hạ huyết áp rất tốt, đặc biệt trong cây Giáo cỏ lam chứa hợp chất flavonoid có tác dụng hạ glucose máu [166]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh giáo cỏ lam có rất nhiều tác dụng tốt như ngăn chặn sự phát triển của khối u, tác dụng hạ cholesterol, tác dụng tăng cường, kích thích miễn dịch, chống ôxy hoá và tác dụng hạ huyết áp rất tốt, đặc biệt có tác dụng hạ glucose máu [103].

Quả citrus là loại quả có mùi thuộc chi cam chanh (*Citrus*) họ cam Rutaceae, có nguồn gốc từ khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới ở Đông nam Châu Á. Nước quả giàu vitamin C và flavonoid. Vỏ quả citrus chứa nhiều flavonoid chủ yếu là hesperidin và naringin. Hesperidin và naringin là một hợp chất bioflavanoid tự nhiên, được sử dụng rộng rãi trong bào chế nhiều loại thuốc, biệt dược và thực phẩm chức năng. Hesperidin và naringin có tác dụng kháng viêm, chống ôxy hóa, chống dị ứng, chống ung thư, kháng vi sinh vật (vi khuẩn, nấm, vi rút), giảm đau, hạ sốt, chống độc, chống loãng xương và đặc biệt khi dùng phối hợp với vitamin C có tác dụng hỗ trợ hấp thụ vitamin C [26].

Hiện nay, các nhà khoa học Việt Nam tiếp tục nghiên cứu các loại thực vật đã được sử dụng theo kinh nghiệm dân gian nhằm phòng chống đái tháo đường, như mướp đắng, giáo cỏ lam, để tìm ra các nguyên liệu cây cỏ ăn được trong tự nhiên dùng làm nước uống. Ở các tỉnh phía Nam có cây cỏ sữa đã được dân gian sử dụng nhiều trong chữa trị một số bệnh như: lỵ, tiêu khát, có hàm lượng polyphenol khá cao. Tuy vậy ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào đầy đủ về thông tin khoa học trong tiềm năng ứng dụng cây cỏ sữa trong hỗ trợ phòng

ngừa và điều trị đái tháo đường. Đây cũng là lý do mà chúng tôi chọn cỏ sữa là nguyên liệu chính để tiến hành nghiên cứu và tính đến việc sản xuất nước uống giàu dinh dưỡng từ cây cỏ sữa lá lớn ở quy mô công nghiệp thành một dạng thực phẩm bảo vệ sức khỏe sau này, góp phần vào đa dạng hoá các sản phẩm đồ uống cũng như sản phẩm hỗ trợ phòng và hỗ trợ điều trị bệnh ĐTĐ.

1.3. Cỏ sữa lá lớn

1.3.1. Đặc điểm thực vật và thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn

Cỏ sữa lá lớn có tên khoa học là *Euphorbia hirta* L. thuộc họ thầu dầu (*Euphorbiaceae*). Theo hệ thống phân loại Takhtajan (2009), chỉ *Euphorbia* thuộc họ Thầu dầu (*Euphorbiaceae*), bộ Thầu dầu (*Euphorbiales*), phân lớp Số (*Dilleniidae*), lớp Ngọc Lan (*Magnoliopsida*), ngành Ngọc lan (*Magnoliophyta*), giới Thực vật (*Plantae*).

+ Tên gọi:

- Tên khác vú sữa đất, cỏ sữa lông - Tên khoa học *Euphorbia hirta* L., thuộc họ Thầu dầu (*Euphorbiaceae*)

- Tên nước ngoài: Ấn độ (Lal dudhi, chitakuti, dhali, đudhani), Úc (có hạn, cỏ rần, có lông mèo), Tiếng Anh (asthmaweed spolge blotchedleaf, lông spurge, dỏ euphorbia), Campuchia (tuk das khla thom), Colombia (pimpinela), Nhật Bản (shima-nishikiso), Đài Loan (ru-tzutsau).

+ Nguồn gốc xuất xứ:

- Trong Hệ thực vật Việt Nam, Họ Thầu dầu hay họ Đại kích (*Euphorbiaceae*) là một họ lớn của thực vật có hoa, rất đa dạng với 218| 290 chi và khoảng (6.700-7.500 loài).

- Nó xuất xứ từ Ấn Độ, được bảo chế thành thuốc và sau đó du nhập vào một vài vùng ở châu Âu từ năm 1884.

+ Phân loại khoa học

- Ngành Ngọc lan: *Magnoliophyta*

- Lớp: Ngọc lan *Magnoliopsida*

- Giới: Plantae, Angiospermae, Eudicots

- Bộ: Thầu dầu Malpighiales

- Họ: Thầu dầu *Euphorbiaceae*

- Chi: *Euphorbia* Loài: *Euphorbia hirta*

+ Đặc điểm hình thái của loài *Euphorbia hirta* L.

- Cây thảo, sống hằng năm, cao 30-60 (70) cm. Rễ cọc, đường kính 3-5 mm. Thân thường ít phân nhánh, phân nhánh từ giữa hoặc phía trên, đường kính 3 mm, màu đỏ nhạt, có nhựa mủ trắng và có nhiều lông che chở dài màu vàng nâu và lông ngắn hơn màu trắng. Lá đơn, mọc đối, gốc cuống lá có hai lá kèm nhỏ hình tam giác hay hình lông cứng, kích thước 0,8-1,7 mm, rụng sớm. Cuống lá dài 13,5 mm, phiến lá hình mác-thuôn, elip dài, hoặc hình trứng-mác, kích thước 10-50 x 3-6 mm, màu không đồng đều từ xanh đến đỏ, thỉnh thoảng có các đốm màu đỏ tía dọc theo gân giữa, cả hai mặt đều có lông dày, gốc phiến lá tròn, hơi lệch. Mép lá nửa dưới toàn bộ hoặc một phần có răng cưa, nửa trên có răng cưa nhỏ hơn, ngọn lá nhọn, hoặc tù. Cụm hoa mọc ở nách lá, có cuống dài 25 mm, tất cả các bộ phận đều nhiều lông, hoa đơn tính. Một cụm hoa bao gồm 4-5 hoa đực. Hoa cái có cuống ngắn, bầu cao, nhô ra khỏi tổng bao hình chuông, bầu 3 ngăn, có lông thưa thớt, vòi nhụy chia 2 thùy.

+ Phân bố và thu hái

- Loài *Euphorbia hirta* L., có nguồn gốc từ vùng Trung Mỹ nhưng phân bố chủ yếu ở một số nước thuộc khu vực nhiệt đới Đông Nam Á, Nam Á gồm Ấn Độ, Malaysia, Philippin, Thái Lan, Lào, Việt Nam và một số nơi ở phía nam Trung Quốc. Ở Việt Nam, cây mọc hoang khắp nơi tương đối phổ biến ở hầu hết các tỉnh phía nam [71, 91]. Cây được thu hái vào mùa hè thu, rửa sạch, dùng tươi hay phơi khô, dùng làm thuốc [22, 54]. Hình ảnh cây cỏ sữa lá lớn được minh họa ở hình 1.7.



Hình 1.7. Cây cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* L.)

Euphorbia là một chi khá lớn của họ thầu dầu, một số loài khác cũng có tác dụng tương tự nhưng lại chứa các diterpene ester có độc tính. Riêng ở Việt Nam, một số cây khác cũng được gọi là cỏ sữa do thân có nhựa mủ trắng, như: *Euphorbia microphylla* - cỏ sữa lá tròn; *Euphorbia hypericifolia* - cỏ sữa lá ban; *Euphorbia thymifolia* – cỏ sữa lá nhỏ. Một số người đã nhầm cỏ sữa lá lớn với cỏ sữa lá nhỏ, cây này cũng có tác dụng thông sữa, cầm tiêu chảy, kiết lỵ, tẩy giun [92, 121], có thể phân biệt cỏ sữa lá lớn với cỏ sữa lá nhỏ qua hình thái thực vật.

Thành phần hóa học của cỏ sữa lá lớn đã được các nhà khoa học thế giới và Việt Nam xác định, gồm có: *polyphenol* (gallic acid, myricitrin, 3,4-di-O-galloylquilic acid, 2,4,6-tri-O-galloyl-D-glucose, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose); *flavonoids* (euphorbianin, leucocyanidol, camphol, quercitrin, quercitrol); *tannins* (euphorbins A,B,C,D, E); *alkanes* (heptacosane, nonacosane); *triterpenes* và *phytosterol* (β -amyrin, 24-methylenecycloartenon và β -sitosterol) [22, 101, 130].

Theo kinh nghiệm dân gian, cây cỏ sữa lá lớn được sử dụng để chữa các bệnh về đường tiêu hóa: tiêu chảy, kiết lỵ, viêm ruột, nhiễm khuẩn đường ruột [22, 92]. Các bệnh đường hô hấp: ho, hen, viêm phế quản, khí phế thũng, các bệnh đường niệu, sinh dục: bệnh lậu [56], viêm thận, viêm bể thận [54]. Nhiều

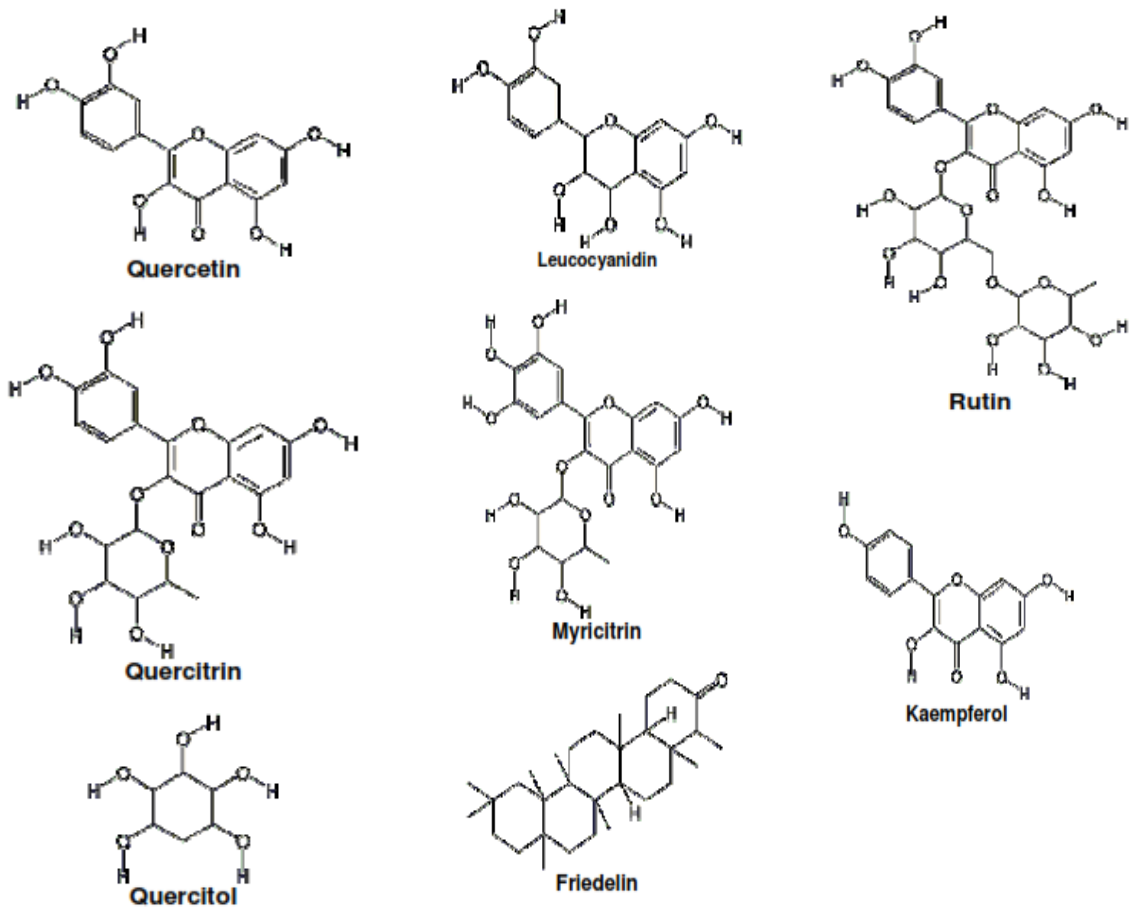
công trình nghiên cứu trên thế giới gần đây đã chứng minh cỏ sữa lá lớn có các tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm [92, 101, 112], chống dị ứng chống viêm, ức chế miễn dịch ức chế khối u, chống virus, tác dụng an thần, giảm đau, bảo vệ gan tác dụng trên hệ thống thận và đáng chú ý là tác dụng hạ glucose máu [92, 101, 112]. Tác dụng chống oxy hóa và phòng chống ung thư vú [113].

Bảng 1.4. Thành phần hóa học của cỏ sữa lá lớn *Euphobia hirta* L.[101, 130]

STT	Tên chất	Kết quả
1	Alkaloids	++
2	Flavonoids	+
3	Saponin	+
4	Caumarins	+
5	Polyphenols	++
6	Cardica Glycosides	+
7	Triterpenes	+++
8	Cyanogenic Glycosides	-
9	Tannins	+

Chú thích: - : Phản ứng âm tính. ++ : phản ứng dương tính rõ.
+ : Phản ứng dương tính. +++ : Phản ứng dương tính rất rõ.

Các nghiên cứu phân lập thành phần hóa học của cây cỏ sữa cho thấy sự có mặt của các hoạt chất nhóm terpenoid, alkaloid, steroid, tannin, flavonoid, saponin, coumarin, anthroquinones, chlorophyll và một số hợp chất khác. Trong đó các hoạt chất nhóm flavonoid, chủ yếu thuộc hai phân nhóm lớn flavones và flavanols, có vai trò quan trọng, gồm các chất như quercetin, quercitrin, quercitol, và các dẫn xuất có chứa rhamnose, quercetin-rhamoside, một loại axit chlorophenolic, rutin, myricitrin, cyanidin 3,5-diglucoside, pelargonium 3,5-diglucoside và camphol. Trong mũ cây có chứa inositol, taraxerol, friedelin, β -sitosterol, axit ellagic, kaempferol, quercitol và quercitrin. Các cấu trúc hóa học chính của các hợp chất này được thể hiện trong Hình 1.8 [118, 133].



Hình 1.8. Công thức phân tử một số hoạt chất thuộc nhóm hợp chất flavonoid trong cây cỏ sữa lá lớn

1.3.2. Các nghiên cứu đánh giá tính an toàn của cây cỏ sữa lá lớn

Trên thế giới, tác giả Tamboli P và Sunil Kumar [112, 143] đã nghiên cứu thử nghiệm kiểm soát glucose máu và chống oxy hóa trên chuột đái tháo đường với lượng 500 mg chiết xuất/kg trọng lượng cơ thể chuột trong 8 tuần nhưng chưa thấy có biểu hiện độc tính. Đối với cây cỏ sữa lá lớn, y học cổ truyền các nước đã thường sử dụng toàn bộ cây để làm thuốc điều trị nhiều bệnh và thực tế trên lâm sàng chưa phát hiện triệu chứng độc trong và sau khi dùng thuốc [22, 56]. Đồng thời, theo WHO, những thực vật đã được dùng trong dân gian từ nhiều năm an toàn thì được coi là an toàn [150]. Do vậy, cỏ sữa lá lớn được coi là an toàn khi sử dụng với mục đích phòng và điều trị bệnh.

1.3.3. Hiệu quả kiểm soát glucose máu của cây cỏ sữa lá lớn

1.3.3.1. Cơ chế kiểm soát glucose máu của flavonoid cỏ sữa lá lớn

Bước đầu tiên trong quá trình tiêu hóa carbohydrate là sự phân hủy của chúng thành các monosacarit có thể hấp thụ trong ruột non. Carbohydrate được tiêu hóa bởi các enzyme như α -amylase và α -glucosidase, và sau đó bởi maltase ruột non, saccharase (invertase) và lactase [60]. Sự hấp thụ glucose ở ruột non được tạo điều kiện thông qua các chất mang như GLUT2 và SGLT1. Sự ức chế được lý của các enzyme tiêu hóa và/hoặc chất vận chuyển glucose sẽ làm giảm sự hấp thụ glucose, do đó làm giảm mức đường huyết sau ăn [120]. Các flavonol rutin, kaempferol và quercetin ức chế tiêu hóa và hấp thu carbohydrate trong các nghiên cứu thực nghiệm. Rutin ức chế hoạt động của α -glycosidase trong ống nghiệm bằng cách liên kết trực tiếp với enzyme thông qua liên kết kỵ nước [117]. Kaempferol ức chế hoạt động của α -glycosidase trong ống nghiệm [136] và quercetin thể hiện các hoạt động ức chế nhiều hơn thông qua việc ức chế cả hoạt động maltase và sucrase trong ống nghiệm và *in vivo* [131] và ức chế sự hấp thu glucoside qua trung gian SGLT1 trong các tế bào Caco-2 ở ruột của con người thông qua tương tác với chất vận chuyển [84]. Ngoài ra, quercetin ức chế sự hấp thu qua trung gian GLUT2 trong ống nghiệm (ức chế không cạnh tranh) và giảm mức đường huyết sau ăn ở chuột bị tiểu đường khi dùng đường uống bằng glucose so với chỉ dùng glucose [141].

1.3.3.2. Nghiên cứu về hiệu quả kiểm soát glucose máu của cỏ sữa lá lớn

Trên thế giới và Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu trong phòng thí nghiệm và trên động vật về tác dụng của cây cỏ sữa lá lớn trong phòng và chữa bệnh ĐTĐ.

Tamboli P và cộng sự tại Ấn Độ nghiên cứu về hiệu quả giảm glucose máu của các chiết xuất cây cỏ sữa lá lớn trên chuột ĐTĐ gây bởi alloxan và fructose. ĐTĐ gây ra bằng cách tiêm màng bụng alloxan monohydrate (5% w/v) cho chuột chủng *Wistar* có khối lượng 180-240 mg, nhịn ăn 1 đêm. Chia chuột thành 5 nhóm, mỗi nhóm 6 con. Nhóm A là nhóm chuột khỏe mạnh, nhóm B, C,

D và E dùng chiết xuất ethanol của cỏ sữa lá lớn với liều 100, 200, 400 và 800 mg/kg cân nặng trong 21 và 30 ngày. Kết quả cho thấy giảm đáng kể lượng glucose trong máu, cholesterol huyết thanh, triglyceride, creatinine và tăng HDL-C. Sự tập trung kiểm soát glucose máu ở chuột điều trị bằng chiết xuất cỏ sữa lá lớn qua đường uống với liều khác nhau sau những khoảng thời gian khác nhau (0, 30, 60, 90 và 120 phút) cho kết quả tương ứng là 79,31; 78,42; 78,04; 76,48 và 75,94 mg/dl. Nghiên cứu đã cho thấy tiềm năng của cỏ sữa lá lớn trong chống ĐTĐ cũng như kiểm soát glucose máu [143].

Tương tự, nghiên cứu của Sunil Kumar và cs cũng đã chỉ ra hiệu quả giảm glucose máu của dịch chiết cỏ Sữa lá lớn trên chuột ĐTĐ. Hiệu quả giảm glucose máu lớn nhất sau 15 ngày điều trị và duy trì trong 3 tuần [112]. Ngoài tác dụng giảm glucose máu, nghiên cứu cũng chỉ ra được tác dụng giảm mỡ máu và chống oxy hóa của chất chiết xuất từ thân cây cỏ sữa lá lớn [92].

Năm 2010, tại Indonesia, R.M. Widharna đã nghiên cứu hoạt động chống ĐTĐ của chiết xuất cồn và ethyl acetate từ cây cỏ sữa lá lớn. Các thử nghiệm *in vivo* và *in vitro* đã chứng minh cơ chế hạ glucose máu của dịch chiết ethanol và phân đoạn ethyl acetate chiết xuất từ lá cỏ sữa lá lớn, có liên quan đến khả năng chống oxy hóa và ức chế men α -glucosidase. Trong khi đó các phân đoạn n-hexane, chloroform, butanol và dịch chiết nước không thể hiện tác dụng này. Kết quả thực nghiệm cho thấy cỏ sữa lá lớn có triển vọng trong điều trị ĐTĐ [151].

Tác giả Anup K. Maurya và cộng sự (2012) đã tiến hành nghiên cứu đánh giá tiềm năng chống bệnh tiểu đường của cây cỏ sữa chống lại streptozotocin (STZ) gây ra trên chuột thí nghiệm. Chiết xuất ethanol của lá cây cỏ sữa lá lớn được dùng cho chuột đái tháo đường. Glibenclamide đã được sử dụng như một loại thuốc chuẩn. Nồng độ glucose trong máu được xác định sau khi uống một liều cây cỏ sữa (400 mg/kg trọng lượng) trong các nhóm bệnh tiểu đường. Nồng độ glucose trong máu được xác định vào 0, 7, 14 và 21 ngày sau khi uống chiết xuất etanolic của *E. hirta* (400 mg/kg). Chiết xuất ethanol của cây cỏ sữa đã được tìm thấy để làm giảm lượng đường trong máu ở chuột đái tháo đường. Giảm lượng đường trong máu có thể được nhìn thấy từ ngày thứ 7 sau khi uống

chiết xuất liên tục. Tác dụng của chiết xuất cây cỏ sữa đối với hàm lượng lipid huyết thanh như cholesterol toàn phần, triglyceride, lipoprotein mật độ thấp (LDL-C), lipoprotein mật độ rất thấp (VLDL) và lipoprotein mật độ cao (HDL) cũng được đo ở chuột mắc tiểu đường và không mắc bệnh tiểu đường. Có sự giảm đáng kể về cholesterol toàn phần, cholesterol LDL-C, cholesterol VLDL và cải thiện cholesterol HDL ở chuột mắc bệnh đái tháo đường. Những kết quả này chỉ ra rằng cây cỏ sữa có tác dụng kiểm soát đường huyết và giảm đường huyết đáng kể [66].

Tác giả Mathivanan K. và cộng sự (2014) đã tiến hành thử nghiệm ức chế hoạt tính α -amylase đối với đánh giá điều trị bệnh tiểu đường và thử nghiệm 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl thể hiện hoạt tính chống oxy hóa của các hoạt chất từ cỏ sữa. Các hoạt chất này được chiết xuất với các dung môi khác nhau như chloroform, ethyl acetate và methanol. Kết quả cho thấy chiết xuất bằng methanol cho thấy hiệu quả cao hơn. Các kết quả cho xét nghiệm chống đái tháo đường đối với ức chế α -amylase thể hiện từ 4,4% - 35,7% và glycosyl hóa hemoglobin cho thấy 22% - 55% ở nồng độ 250 - 1000 $\mu\text{g/ml}$ [124].

Tại Việt Nam, trong tài liệu Cây thuốc và động vật làm thuốc có đề cập đến chi tiết cây cỏ sữa lá lớn giúp kiểm soát glucose máu trên động vật [22, 56]. Trên thực tế, cây cỏ sữa lá lớn đã được người dân Nam Bộ sử dụng theo phương pháp đông y để dùng chữa bệnh cho bệnh nhân ĐTĐ [18].

Gần đây, theo kết quả nghiên cứu thử nghiệm kiểm soát glucose máu sau ăn của trà cỏ sữa lá lớn trên bệnh nhân ĐTĐ và trên người khỏe mạnh cho thấy trà cỏ sữa lá lớn có khả năng kiểm soát glucose máu, không làm tăng glucose máu sau ăn trên cả hai đối tượng. Nồng độ glucose máu giảm ở nhóm can thiệp 2 sau 12 tuần so với trước khi can thiệp và so với nhóm can thiệp 1 (6,22 mmol/L so với 5,84 mmol/L, $p > 0,05$). Mức độ giảm glucose máu ở nhóm can thiệp 2 nhiều hơn so với nhóm can thiệp 1 ($-0,39 \pm 0,38$ mmol/L so với $-0,12 \pm 0,41$ mmol/L, $p < 0,05$) [51]. Các nghiên cứu trên đã cho thấy cây cỏ sữa lá lớn có nhiều tác dụng có lợi cho sức khỏe, mở ra tiềm năng ứng dụng trong hỗ trợ điều trị tiểu đường và chống oxy hóa trong *in vitro* của loại thảo dược này.

1.3.4. Một số chế phẩm từ cây cỏ sữa lá lớn ứng dụng trong kiểm soát glucose máu

1.3.4.1. Trên Thế giới

Hiện tại trên thế giới sử dụng nhiều dạng sản phẩm khác nhau:

Tại Philippin sản phẩm CSLL được đóng gói dưới dạng trà có tên thương mại là Carica Euphorbia / Tawa-tawa / Tawa-tawa Tea (Euphorbia hirta) – Hộp 30 gói x 2 gam/gói.



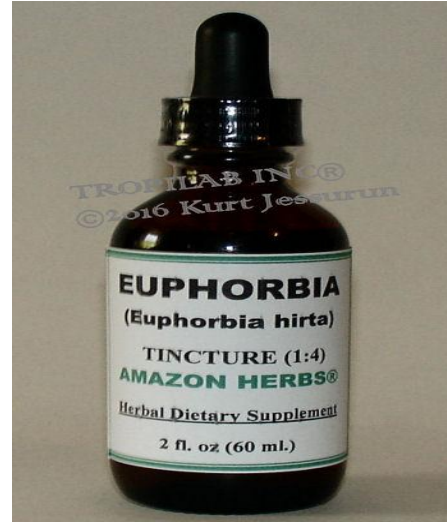
Thực phẩm bổ sung Euphorbia Capsule/Tawa-tawa dạng viên được đóng gói trong lọ plastic 30 viên/lọ.



Sản phẩm dạng trà gói/Tawa-Tawa



Cao lỏng/ Syrup



Dược liệu khô để pha trà



1.3.4.2. Tại Việt Nam

Ở Việt Nam, trên thị trường mới chỉ phân phối cây cỏ sữa lá lớn dưới dạng vị thuốc dược liệu, được sử dụng như vị thuốc dân gian để phòng ngừa bệnh ĐTD và chữa tiêu chảy, kiết lỵ,

Với mục đích xây dựng công thức trà cỏ sữa lá lớn có chất lượng cảm quan và hàm lượng polyphenol cao, một nghiên cứu đã được tiến hành. Trà cỏ sữa lá lớn được chế biến theo các công thức khác nhau, đóng gói 2g cỏ sữa lá lớn/gói. Đánh giá chất lượng của các công thức trà cỏ sữa khác nhau với 2 kiểu pha chế (đun sôi trong 10 phút và đun sôi trong 30 phút), tiến hành đánh giá cảm quan và xác định hàm lượng polyphenol trong nước trà cỏ sữa thu cho thấy đun sôi trong 30 phút đã giúp chiết tách được hàm lượng polyphenol tối ưu nhất, nhiều hơn so với cách hãm nước sôi. Điểm cảm quan tại phòng thí nghiệm cao nhất thuộc về công thức trà chứa 90% cỏ sữa lá lớn, 8% nụ vối và 2% cỏ ngọt.

Đánh giá tính chấp nhận của công thức nêu trên tại cộng đồng cho thấy, tỷ lệ chấp nhận màu sắc, mùi, vị đạt 84,3% [38].

Một nghiên cứu can thiệp đối chứng nhằm đánh giá khả năng kiểm soát tăng đường huyết sau ăn của trà cỏ sữa đã được tiến hành trên 15 bệnh nhân ĐTĐ type 2 tại thành phố Hạ Long, Quảng Ninh. Tiến hành trong 2 ngày khác nhau: ngày thứ nhất đối tượng chỉ uống 150 ml nước trắng và ăn một bữa ăn với tổng năng lượng 250 Kcal, ngày thứ 2 (cách ngày thứ nhất 7 ngày) bệnh nhân uống sản phẩm trà cỏ sữa (30 gram/lần/bệnh nhân) và ăn bữa ăn giống như ngày thứ 1. Đường huyết được xác định trước ăn và sau ăn 15, 30, 60, và 120 phút. Kết quả cho thấy nồng độ đường huyết sau ăn của ngày uống trà cỏ sữa đã giảm xuống thấp hơn so với ngày không uống trà cỏ sữa. Tại thời điểm 15 phút và 30 phút sau ăn, nồng độ đường huyết của ngày uống trà cỏ sữa đã giảm một cách có ý nghĩa thống kê so với ngày chứng (8,94 so với 10,63 mmol/L tại 15 phút; $p < 0,001$). Diện tích dưới đường cong của ngày uống trà cỏ sữa cũng có xu hướng thấp hơn so với ngày chứng (496,6 so với 586,7 mmol/L.giờ; $p = 0,17$). Với khả năng hạn chế tăng đường huyết sau ăn, trà cỏ sữa (liều trung bình 30 gram cỏ sữa/lần thử nghiệm) có khả năng kiểm soát đường huyết sau ăn trên bệnh nhân đái tháo đường type 2 [51]

Chính vì vậy, cỏ sữa lá lớn có thể được xem là nguồn nguyên liệu từ thiên nhiên có tiềm năng trong việc hỗ trợ phòng trị bệnh ĐTĐ, hữu ích cho ngành sản xuất thực phẩm nói chung và đồ uống giàu dinh dưỡng nói riêng.

1.4. Quá trình tách chiết và điều chế cao chiết xuất từ thực vật

1.4.1. Khái niệm cơ bản về quá trình chiết [29]

Chiết là quá trình chuyển chất cần chiết rút trong nguyên liệu vào dung môi và được thực hiện bằng khuếch tán phân tử và khuếch tán đối lưu.

+ Khuếch tán phân tử: là sự chuyển vật chất cần chiết rút từ pha này sang pha khác do sự chuyển động nhiệt hỗn loạn trong môi trường tĩnh.

$$\frac{dm}{dt} = -DS \frac{dC}{dx}$$

Khuếch tán phân tử theo định luật Fick I:

trong đó : - $\frac{dm}{dt}$: tốc độ hòa tan chất cần chiết

- S: diện tích tiếp xúc giữa chất cần chiết và dung môi

- $\frac{dC}{dt}$: gradient nồng độ

- D: hệ số khuếch tán phân tử, phụ thuộc vào nhiệt độ (T), độ nhớt của dung môi (η) và bán kính phân tử chất cần chiết (r) theo công thức Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (\text{k: hằng số Boltzmann})$$

Như vậy, tốc độ khuếch tán phân tử càng mạnh khi chênh lệch nồng độ chất cần chiết giữa 2 pha tiếp xúc nhau, diện tích bề mặt tiếp xúc giữ nguyên liệu và dung môi càng lớn, nhiệt độ càng cao và kích thước phân tử chất cần chiết càng nhỏ.

+ Khuếch tán đối lưu:

Là sự vận chuyển vật chất từ môi trường này sang môi trường khác trong dòng chuyển động của chất lỏng ở chế độ chảy xoáy. Khuếch tán đối lưu là hình thái di chuyển vật chất trong dung dịch ở phạm vi nhỏ.

Khuếch tán đối lưu theo định luật Sutarep: $dm/dt = B.S.d$ trong đó: dm, dt, dC và S có ý nghĩa giống như công thức khuếch tán phân tử ở trên; B: hằng số tốc độ khuếch tán đối lưu.

Trong khuếch tán phân tử sự di chuyển vật chất nhờ vào động năng của chuyển động nhiệt phân tử. Trong khuếch tán đối lưu di chuyển vật chất nhờ vào năng lượng bên ngoài dẫn tới. Khuếch tán phân tử và khuếch tán đối lưu được gọi là khuếch tán nồng độ vì động lực của quá trình khuếch tán đều là do chênh lệch nồng độ.

+ Các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết

Trong quá trình chiết, để đạt được vận tốc chiết và hiệu suất chiết cao, cần lưu ý các yếu tố sau:

- Chênh lệch nồng độ chất cần chiết ở trong nguyên liệu và dung môi phải lớn. Muốn vậy, nguyên liệu phải có lực hút nhỏ nhất đối với dung môi để tạo ra

nồng độ chất cần chiết trong dung môi phía trong nguyên liệu càng lớn thì quá trình khuếch tán các phân tử chất cần chiết đi ra càng mạnh.

- Tỷ lệ dung môi trên nguyên liệu phải lớn. Tuy nhiên phải ở mức độ hợp lý, nếu tỷ lệ quá lớn làm cho nồng độ chất cần chiết trong dung môi chiết rút thấp gây khó khăn, công kênh trong sản xuất.

Có thể lợi dụng nguyên lý ngược dòng hoặc thay đổi dung môi chiết nhiều lần để tạo được sự chênh lệch nồng độ lớn

- Hình thái, tính chất và cấu tạo của tổ chức nguyên liệu

Mức độ phá vỡ cấu trúc tế bào càng nhiều thì sự tiếp xúc giữa chất cần chiết và dung môi càng tăng nên rút ngắn thời gian chiết và chiết triệt để hơn.

Kích thước càng nhỏ thì diện tích tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi càng tăng, hiệu suất chiết tăng. Tuy nhiên cũng chỉ nên nhỏ tới mức nhất định vì quá nhỏ nguyên liệu dễ bị vón lại các hạt mịn lắng đọng trên các lớp nguyên liệu. Mặt khác, nguyên liệu quá nhỏ sẽ bị cuốn vào dịch chiết gây khó khăn cho quá trình xử lý dịch chiết sau khi chiết.

Tính chất của nguyên liệu cũng ảnh hưởng lớn đến hiệu suất chiết. Khi chiết bằng dung môi hữu cơ, độ ẩm nguyên liệu giảm thì tốc độ chiết tăng lên.

- Ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ chiết

Thời gian càng dài thì lượng chất khuếch tán tăng, nhưng thời gian phải có giới hạn. Khi đạt được mức độ trích ly cao nhất nếu kéo dài thời gian thì sẽ không mang lại hiệu quả kinh tế.

Nhiệt độ có tác dụng tăng tốc độ khuếch tán và giảm độ nhớt, do đó phân tử chất hòa tan chuyển động dễ dàng khi khuếch tán giữa các phân tử dung môi. Tuy nhiên, nhiệt độ tăng có giới hạn, vì nhiệt độ quá cao sẽ có thể phân hủy phân tử cần chiết và gây khó khăn cho quá trình công nghệ.

- Dung môi chiết: Dung môi chiết cần thỏa mãn các điều kiện sau:

- + Hòa tan chất cần chiết ở bất kì tỷ lệ nào.
- + Có nhiệt độ sôi thấp để dễ dàng tách dung môi ra khỏi dịch chiết.
- + Có thành phần hóa học ổn định, không phản ứng phụ với nguyên liệu.

- + Không độc hại, không ảnh hưởng sức khỏe và chất lượng sản phẩm.
- + Khó cháy nổ, an toàn cho quá trình sản xuất.
- + Không ăn mòn thiết bị.
- + Rẻ tiền, dễ kiểm, có khả năng sử dụng trong sản xuất.

Tuy nhiên hiện nay chưa có loại dung môi nào đáp ứng đầy đủ tất cả những điều kiện trên. Do đó, tùy trường hợp chiết cụ thể để chọn dung môi cho phù hợp.

+ Các phương pháp chiết

Dựa vào cách tiến hành, có thể chia thành các phương pháp chiết sau:

Chiết gián đoạn:

Theo phương pháp này ta ngâm nguyên liệu vào dung môi. Sau một thời gian nhất định, khi giữa dung môi và nguyên liệu đạt nồng độ chất cần chiết ở mức độ cân bằng, tiến hành đổ dung môi cũ ra, thay dung môi mới vào. Cứ như thế cho đến khi chiết hết chất cần chiết. Phương pháp này có ưu điểm là đơn giản, dễ thực hiện. Nhược điểm là tốn công, tốn thời gian cũng như tốn dung môi chiết nên không kinh tế, không phù hợp với quy mô sản xuất lớn.

Chiết bán liên tục:

Nguyên lý của phương pháp này là dùng nhiều thiết bị chiết gián đoạn bố trí thành một hệ thống liên hợp tuần hoàn nhằm mục đích giảm thời gian chiết, ít tốn công hơn, tiết kiệm được nhiều dung môi hơn. Đối với phương pháp này quá trình chiết thực hiện theo nguyên tắc dung môi đi từ nơi có nồng độ chất chiết cao đến nồng độ chất chiết thấp.

Chiết liên tục:

Nguyên lý là ngâm dung môi trong dòng chuyển động cùng chiều hay ngược chiều của dung môi. Ưu điểm của phương pháp này là cho hiệu quả kinh tế cao, thích hợp cho sản xuất công suất lớn, áp dụng cho quy mô công nghiệp. Tuy nhiên, nhược điểm là thiết bị khá phức tạp, chi phí đầu tư lớn.

+ Một số kỹ thuật chiết hiện đại dùng để chiết xuất các hoạt chất sinh học

- *Chiết kết hợp siêu âm (Ultrasound-assisted extraction):*

Nguyên liệu được trộn với dung môi thích hợp rồi chiết bằng siêu âm. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng siêu âm có khả năng phá vỡ màng tế bào của nguyên liệu, do đó giúp cho xâm nhập của dung môi vào bên trong tế bào dễ dàng hơn. Ngoài ra, siêu âm còn có tác dụng khuấy trộn mạnh dung môi, do đó gia tăng sự tiếp xúc của dung môi với chất cần chiết và cải thiện đáng kể hiệu suất chiết.

- *Chiết siêu tới hạn (SFE: Supercritical Fluid Extraction):*

Đây là phương pháp chiết được quan tâm nhiều nhất hiện nay trong lĩnh vực chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nguyên liệu tự nhiên nhằm ứng dụng trong công nghiệp dược phẩm và thực phẩm. Phương pháp này cho phép tự động hóa quá trình chiết và hạn chế việc sử dụng các dung môi hữu cơ độc hại. Dung môi chiết là một chất lỏng ở trạng thái siêu tới hạn (tức là ở nhiệt độ và áp suất cao hơn điểm tới hạn của nó). Ở trạng thái này, chất lỏng có những tính chất đặc biệt như có tính chịu nén cao, khuếch tán nhanh, độ nhớt và sức căng bề mặt thấp. Do đó, nó có khả năng khuếch tán mạnh vào nền nguyên liệu tốt hơn nhiều so với các dung môi thông thường, vì thế làm tăng hiệu suất chiết lên nhiều lần. Trong phương pháp này, thường dùng CO₂ trạng thái siêu tới hạn làm dung môi chiết (đôi khi trộn với vài % dung môi phân cực nào đó như etanol, metanol, 2-propanol để làm tăng khả năng hòa tan carotenoit của CO₂) do nó cho phép chiết nhanh, chọn lọc, không làm oxy hóa carotenoit và an toàn trong vận hành.

- *Chiết dung môi tăng tốc (ASE: Accelerated Solvent Extraction) hay chiết dưới áp suất cao (PFE : Pressurized Fluid Extraction):*

Đây cũng là một phương pháp chiết mới, cho phép chiết rất nhanh, tự động hóa, hiệu quả và tiết kiệm dung môi. Nguyên tắc của nó tương tự như phương pháp chiết Soxhlet cổ điển, ngoại trừ việc quá trình chiết được thực hiện ở nhiệt độ và áp suất cao (nhưng vẫn dưới điểm tới hạn của dung môi sử dụng). Trong phương pháp ASE, nguyên liệu cần chiết được xay nhỏ, làm khô (thường là đông khô), rồi nhồi vào một ống chiết (extraction cell). Ống chiết này được

đặt trong lò duy trì ở nhiệt độ thích hợp (có thể điều chỉnh từ 40 – 200°C). Dung môi được bơm vào ống chiết và giữ ở áp suất 10 -20 MPa trong vài phút (static time), sau đó dịch chiết được đẩy vào một bình hứng bằng một thể tích dung môi mới (flush volume). Quá trình được lặp lại vài lần (cycles). Cuối cùng, toàn bộ dịch chiết được đẩy ra bằng một dòng khí trơ (N₂).

1.4.2. Điều chế cao chiết xuất từ thực vật

Chiết xuất là một quá trình công nghệ liên quan đến việc tách các phần có dược tính từ mô thực vật hoặc động vật khỏi các thành phần không có hoạt tính bằng cách sử dụng dung môi và theo một quy trình tiêu chuẩn. Các sản phẩm thu được thường không tinh khiết và có thể dịch chiết, dạng bán rắn (hay cao đặc), hoặc dạng bột (cao khô). Các sản phẩm mong muốn có thể là các chế phẩm như thuốc sắc, nước hãm, cao lỏng, cồn thuốc, dạng viên tròn hay dạng bột. Mục đích của quy trình chiết xuất được chuẩn hóa đối với dược liệu thô là để đạt được phần mong muốn về mặt trị liệu và loại bỏ vật liệu trơ bằng cách xử lý bằng dung môi. Do đó, chiết xuất thu được có thể sẵn sàng để sử dụng trực tiếp hay được xử lý thêm như một nguyên liệu cho bào chế, chế biến hay sản xuất các sản phẩm chăm sóc sức khỏe ví dụ như nước uống chức năng, viên nén hoặc viên nang, hoặc có thể được sử dụng để phân lập các hợp chất hóa học tinh khiết dùng để bào chế các loại thuốc hiện đại. Do đó, tiêu chuẩn hóa các quy trình chiết xuất đóng góp đáng kể vào chất lượng cuối cùng của thuốc từ thảo dược [142].

Chiết xuất là bước đầu tiên để tách sản phẩm mong muốn từ nguyên liệu tự nhiên. Phương pháp chiết xuất bao gồm chiết dung môi, phương pháp chưng cất, ép và thăng hoa theo các nguyên tắc cơ bản của chiết xuất. Trong số đó, chiết bằng dung môi là phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất. Công việc chiết xuất các sản phẩm từ nguyên liệu tự nhiên thường trải qua các công đoạn sau [164]:

- Giai đoạn dung môi thấm vào nguyên liệu.
- Chất tan hòa tan trong dung môi chiết.
- Chất tan được khuếch tán ra khỏi nguyên liệu.

- Trích xuất các chất hòa tan được thu thập lại.

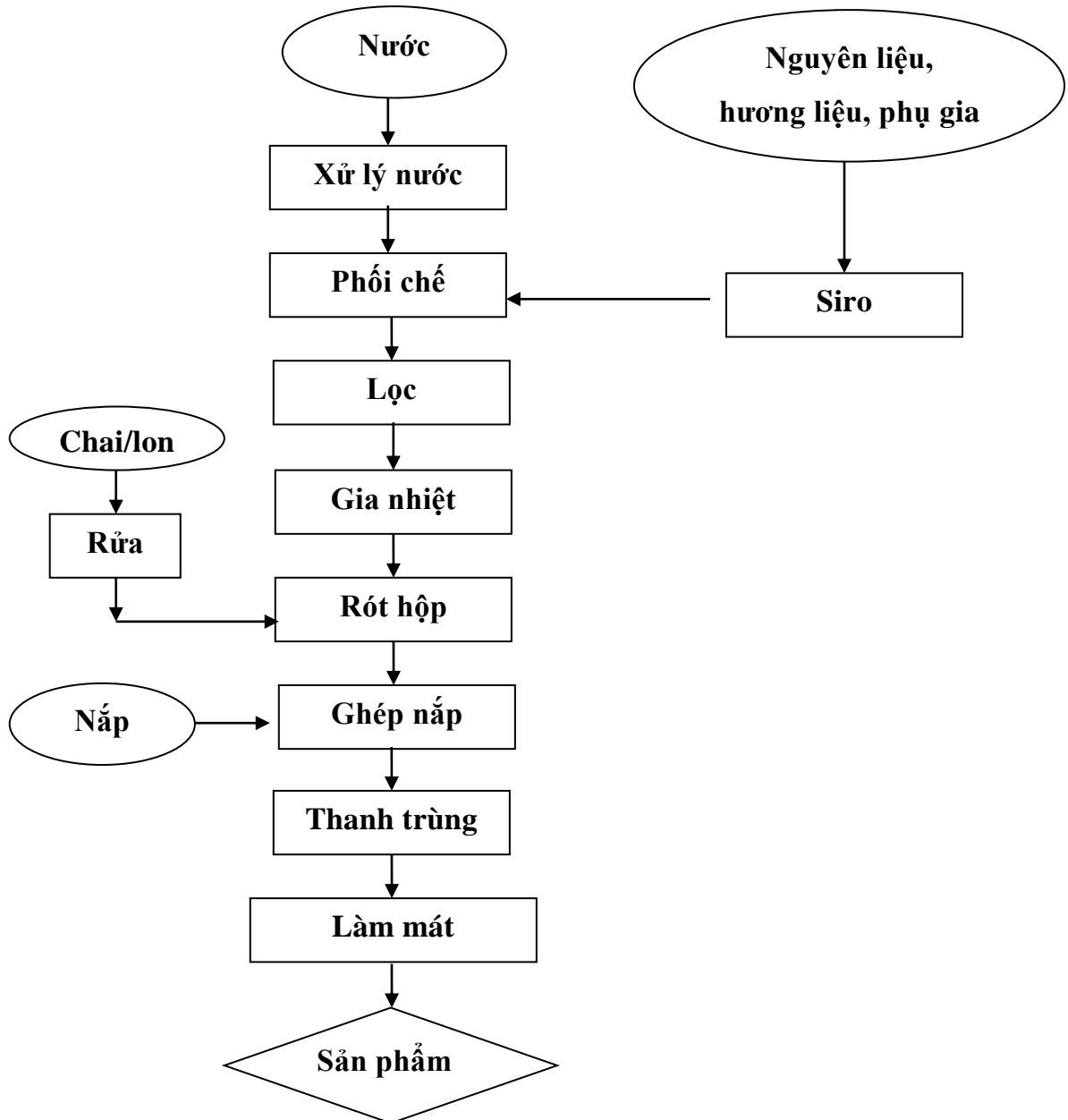
Các yếu tố giúp tăng cường độ khuếch tán và độ hòa tan trong các bước trên sẽ tạo điều kiện cho việc chiết xuất đạt hiệu quả cao. Tính chất của dung môi chiết, kích thước của nguyên liệu thô, tỷ lệ dung môi so với dược liệu, nhiệt độ và thời gian chiết sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả của quy trình chiết xuất. Trong số các phương pháp chiết bằng dung môi có: phương pháp chiết ngâm, chiết ngấm kiệt, chiết hồi lưu, chiết soxhlet, chiết với sự hỗ trợ của siêu âm hay vi sóng, chiết với chất lỏng siêu tới hạn hay với chất lỏng ở áp suất cao, chiết với sự hỗ trợ của enzyme hoặc chưng cất với hơi nước. Mỗi phương pháp có ưu việt riêng, tùy thuộc định hướng tách các nhóm chất với tính chất cụ thể cũng như mục đích khác nhau mà phương pháp nào sẽ được ưu tiên lựa chọn.

Tuy nhiên, các phương pháp được sử dụng phổ biến trong công nghiệp hiện nay gồm chiết ngâm, chiết ngấm kiệt hay chiết hồi lưu. Các phương pháp còn lại như hỗ trợ vi sóng, siêu âm, enzyme hay chất lỏng siêu tới hạn có giới hạn áp dụng cho những mục đích đặc thù hoặc nhóm hoạt chất dễ bị phân hủy bởi nhiệt. Nhóm hoạt chất flavonoid, được cho là khá bền bởi nhiệt và có độ tan tốt trong nước, các phương pháp chiết xuất có thể được sử dụng gồm chiết ngâm, chiết ngấm kiệt, chiết soxhlet hay chiết hồi lưu [70]. Tuy nhiên, phương pháp chiết hồi lưu cho hiệu quả hơn phương pháp chiết ngấm kiệt, chiết ngâm hay chiết soxhlet do nhu cầu về lượng dung môi sử dụng cũng như về thời gian thường ít hơn. Bên cạnh đó, trong cỏ sữa cho thấy nhóm hoạt chất chính là các flavonoid, các polyphenolic và tannin [37]. Các chất này đều thuộc nhóm hoạt chất khá phân cực và dễ tan trong nước. Do vậy, với quy trình chiết có thể sử dụng là chiết hồi lưu với nước hoặc hệ dung môi cồn nước. Tuy nhiên, chiết hồi lưu với nước thường cho hiệu suất chiết cao hơn và kinh tế hơn. Thêm nữa, sản phẩm cao chiết thu được được định hướng sử dụng làm đồ uống nên cao chiết nước sẽ giúp cho quá trình chuẩn bị bán thành phẩm hay thành phẩm được thuận lợi hơn khi pha chế.

1.5. Công nghệ sản xuất đồ uống từ thảo dược ứng dụng hỗ trợ phòng và kiểm soát glucose máu.

1.5.1. Công nghệ sản xuất đồ uống pha chế

Nước uống pha chế là đồ uống được pha chế từ các nguồn nguyên liệu tự nhiên hay tổng hợp. Sơ đồ dây chuyền sản xuất đồ uống pha chế được chỉ ra ở Hình 1.9



Hình 1.9. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất đồ uống pha chế [28]

Xử lý nước: Nước sau khi đã xử lý sẽ thu được nước tinh khiết, thỏa mãn đầy đủ các yêu cầu hóa lý, yêu cầu sinh học và có độ trong đạt yêu cầu.

Chuẩn bị siro: Nguyên liệu bao gồm các nguyên liệu tự nhiên – bột rau, bột quả, bột/cao dược liệu hoặc tổng hợp và các phụ gia (như đường sacaroza, chất tạo ngọt, axit hữu cơ.....) cùng với nước được cân đong theo tỷ lệ tùy thuộc vào yêu cầu của sản phẩm, sau đó được khuấy trộn kỹ sao cho các chất được hoà tan hoàn toàn vào nước.

Phối chế: Phối chế là trộn lẫn nước và siro, hương đã chuẩn bị để nhận được sản phẩm cuối cùng có hương vị thích hợp với thị hiếu của người tiêu dùng. Quá trình phối chế được thực hiện trong các thùng phối chế chuyên dùng có trang bị cánh khuấy để trộn đều. Theo đó, dịch Siro cùng hương thơm được bơm vào thiết bị để hòa trộn, trong quá trình đảo trộn, cánh khuấy hoạt động mạnh và thời gian phối trộn phải nhanh, và đủ để tạo thành dung dịch đồng nhất.

Lọc: Trong công nghệ sản xuất nước quả pha chế cần lọc tinh để loại bỏ những phần tử có kích thước nhỏ để tránh hiện tượng kết lắng của các thành phần này trong quá trình bảo quản.

Gia nhiệt: Gia nhiệt là một phương pháp có tác dụng bài khí. Ngoài ra, trong giai đoạn này nhằm nâng nhiệt độ cho sản phẩm khi rót hộp, nên có thể tiêu diệt một phần vi sinh vật và các nhân tố gây oxyhóa trong sản phẩm. Thời gian nâng nhiệt càng nhanh càng tốt.

Rót hộp: Dịch sau gia nhiệt được rót vào các loại bao bì đã được tiệt trùng bằng hơi nước và cần phải rót nóng ngay để tránh sản phẩm nhiễm vi sinh trở lại. Sản phẩm khi rót vào bao bì phải có nhiệt độ cao để sau khi ghép kín có thể tạo ra độ chân không cần thiết trong bao bì và để rút ngắn thời gian thanh trùng.

Ghép nắp: Ngay sau khi rót xong, bao bì phải được ghép kín. Sau khi ghép kín, phải đưa đi thanh trùng ngay. Thời gian chờ thanh trùng không quá 30 phút, nếu không nhiệt độ sản phẩm sẽ giảm, gây ảnh hưởng đến chế độ thanh trùng.

Thanh trùng: Mục đích của quá trình này là tiêu diệt đến mức tối đa các vi sinh vật gây hư hỏng có trong sản phẩm trong thời gian bảo quản, nhờ vậy sản phẩm để được lâu hơn, không bị hỏng. Chế độ thanh trùng (nhiệt độ và thời gian thanh trùng) phụ thuộc vào kích cỡ, chất liệu của bao bì và tính chất của nguyên liệu.

Làm mát: Sản phẩm sau thanh trùng được tiến hành làm nguội bằng nước mát luân lưu.

Tồn trữ sản phẩm: Sau khi sản phẩm đã được làm nguội, đem bảo ôn lưu trữ sản phẩm trong kho, với mục đích loại bỏ các sản phẩm bị hư hỏng hay khuyết tật chưa nhận thấy ngay khi sản xuất. Các loại bao bì thường sử dụng để chứa đựng đối với loại hình sản phẩm này là chai thủy tinh, lon nhôm, lon sắt có tráng thiếc.

1.5.2. Một số sản phẩm đồ uống trong phòng và hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường

Hiện nay ở Việt Nam đang xuất hiện một số sản phẩm đồ uống có tác dụng trong phòng và hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường.

Mướp đắng (*Momordica charantia*) là thực phẩm lâu đời tại Việt Nam. Mướp đắng đã được sử dụng làm thuốc thảo dược và đã được sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường. Polysaccharides là một trong các thành phần có hoạt tính quan trọng của cây mướp đắng như hoạt tính chống oxi hoá, điều trị đái tháo đường, tăng cường hệ miễn dịch, chống ung thư, kháng khuẩn [107].

Cây nhàu (*Morinda citrifolia*) được xem là cây thuốc quý vì phần lớn các bộ phận đều có thể sử dụng làm thuốc. Theo nghiên cứu của Đái Xuân Trang và cs., chiết xuất từ nhàu có tác dụng làm giảm hoạt tính của enzyme glucose-6-phosphatase có ở gan và thận chuột bệnh tiểu đường. Kết quả của việc điều hòa hoạt động của enzyme glucose-6-phosphatase là sự ổn định đường huyết sau 20 ngày chuột bệnh tiểu đường được điều trị. Tác động hạ đường huyết và điều hòa hoạt động của enzyme glucose-6-phosphatase của cao rễ và cao trái chín Nhàu tương đương với thuốc trị bệnh tiểu đường glucofast [21].

Nước uống dinh dưỡng phòng và điều trị bệnh đái tháo đường được chiết xuất từ mướp đắng do Công ty Korea Ginseng Bio-Science Co., Ltd Hàn Quốc sản xuất giúp ổn định đường huyết trong máu, cải thiện sinh lý cho bệnh nhân mắc chứng bệnh tiểu đường, thanh nhiệt. Sản phẩm dạng lỏng được đóng theo quy cách 70ml/gói, 30 gói/hộp.



Nước sâm dành cho người bệnh đái tháo đường có tác dụng phòng chống ung thư, đái tháo đường, chống xơ cứng động mạch giảm stress được sản xuất bởi Công ty Gyeongbuk Nongchuksan Yeongnong Hàn Quốc. Sản phẩm dạng lỏng được đóng gói theo quy cách 80ml/gói; 30 gói/hộp.



Được nhập khẩu từ Ấn độ, một sản phẩm nước uống dinh dưỡng phòng chống bệnh tiểu đường đóng chai nhãn hiệu DrNacure được sản xuất từ cỏ gà, dấm táo, mật ong có tác dụng kiểm soát lượng cholesterol và đường huyết.



Xu hướng sử dụng các loại đồ uống có thành phần là các loại nguyên liệu tự nhiên ngày càng tăng, đặc biệt là các loại đồ uống được chiết xuất từ thảo dược, trái cây. Loại đồ uống này vừa có công dụng giải khát, vừa cung cấp cho cơ thể những chất dinh dưỡng và đang là xu hướng chung của thị trường, sẽ dần thay thế các loại đồ uống có gas.

CHƯƠNG 2

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Nguyên liệu

Phần trên mặt đất cây cỏ sữa lá lớn được thu hái tại tỉnh Bình Dương, được phơi khô đến độ ẩm $\leq 11\%$, cắt thành các đoạn dài 4-6 cm và được bảo quản trong túi nilon, để nơi khô ráo, thoáng mát. Thời gian từ khi thu hái đến khi đưa vào thí nghiệm tối thiểu là 30 ngày.

Mẫu cây có hoa được ép tiêu bản, lưu trữ tại Phòng Tiêu bản - Bộ môn Thực vật - Trường Đại học Dược Hà Nội với số hiệu tiêu bản là HNIP/18112/15. Ảnh chụp phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn nghiên cứu được trình bày ở hình 2.1



Hình 2.1. Ảnh chụp phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn khô

Cao cỏ sữa lá lớn (Cao CSLL): sử dụng cao CSLL thu được sau quá trình điều chế cao.

Mật ong: Mật ong được thu hoạch tại Sơn La có chất lượng đạt tiêu chuẩn TCVN 12605:2019.

Cao sâm: Cao sâm của K-Gin, Hàn Quốc.

Chất tạo ngọt: Chất tạo ngọt Morita RA95 từ cây cỏ ngọt Stevia có hàm lượng Rebaudioside A 95% của Tập đoàn Morita Kagaku Kogyo. Co., LTD-Nhật bản.

Quế: Quế khô được trồng tại Yên Bái, đạt tiêu chuẩn TCVN 3230:1979.

Gừng: Gừng củ tươi được trồng tại Lâm Đồng. Thời gian từ khi thu hái đến khi sử dụng trong thí nghiệm từ 1-1,5 tháng.

Các loại nguyên liệu khác:

Bột trợ lọc: Diatomite Hyflo Supracel Z và Standard Supracel Z của hãng IMERYS do Công ty Cổ phần Behn Meyer Vietnam cung cấp.

Nước: dùng nước sạch qua lọc RO hoặc nước máy.

Bao bì: Lon nhôm loại bao bì dùng cho thực phẩm của Công ty Liên Doanh TNHH Crown; Chai thủy tinh của Công ty TNHH Thủy tinh Samiguel Yamamura Hải Phòng đều có dung tích V=200ml.

2.1.2. Hóa chất, dụng cụ

- Hóa chất: ethanol tuyệt đối, methanol, ether dầu hỏa, chloroform, ethyl acetat, n-hexan, toluen, diethyl ether, acid acetic, acid formic, amoniac, dung dịch Cloramin B, xanh methylen, son phen, Quercetin chuẩn, NaNO_2 , AlCl_3 , CH_3COOK , NaOH , Ethanol, Cơ chất L-aspartat và L-alanin, Cơ chất Blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7) (Hãng Megazyme), Cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) (Sigma), Natri cacbonat (Merck), Tri-natri photphat (Megazyme), Natri dihidrophotphat (Merck), Axit clohidric (Merck), Methanol (Merck), Nước cất, Streptozocin (Sigma-Aldrich Co., Ltd, USA), Nước muối sinh lý 0,9%, Folin (của hãng Sigma, Mỹ), Na_2CO_3 (Merck, Đức), chất catechin (Wako-Nhật Bản), $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CH_3COONa , quercitrin.

- Thuốc thử: Các thuốc thử dùng trong các phản ứng định tính và thuốc

thử hiện màu sắc ký (Mayer, Dragendorff, Bouchardat, dd FeCl₃ 5%, dd gelatin 1%, dd chì acetat 10%, Lugol, Fehling A, Fehling B, vanillin-acid sulfuric).

- Bản mỏng silica gel F₂₅₄ trắng sẵn (MERCK), độ dày 0,2 mm, hoạt hóa trong tủ sấy ở 110°C trong 60 phút.

- Dụng cụ:

+ Pipet, micropipet, bình định mức, ống nghiệm, bình cầu, cốc có mỏ, ống đong, phễu, giấy lọc, ống ly tâm, bình gạn, đĩa thủy tinh

+ Bộ dụng cụ chiết hồi lưu: Bình cầu các loại từ 100 - 2000 ml và sinh hàn.

+ Bơm tiêm, kim tiêm.

+ Kít định lượng glucose, HbA1c (Wako Pure Chemicals, Nhật Bản).

2.1.3. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino*, cả 2 giống đực và cái, khỏe mạnh, có trọng lượng 18-22 g, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm do Học Viện Quân Y cung cấp được sử dụng để đánh giá độc tính cấp.

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino* đực, trọng lượng 29-30g, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và sản xuất động vật thí nghiệm chuẩn thức thuộc Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương được sử dụng để đánh giá tác dụng hạ glucose máu của cao chiết cỏ sữa lá lớn. Chuột nhắt trắng cũng được chăm sóc, nuôi dưỡng theo đúng chế độ đối với động vật thí nghiệm.

Chuột cống trắng chủng *Wistar*, cả 2 giống, khỏe mạnh, cân nặng từ 150-200g, do Học viện Quân y cung cấp. Động vật được nuôi ổn định trong điều kiện phòng thí nghiệm 5 ngày trước khi thực hiện nghiên cứu, được nuôi dưỡng bằng thức ăn chuẩn, uống nước tự do, sử dụng trong đánh giá độc tính bán trường diễn.

Chuột được chăm sóc và nuôi trong phòng thí nghiệm 3 -5 ngày trước và

trong suốt thời gian nghiên cứu với nhiệt độ duy trì $22 \pm 1^\circ\text{C}$, ăn uống đầy đủ, chu kỳ sáng tối là 12/12 h (chu kỳ sáng từ 7:00 - 19:00).

2.1.4. Thiết bị

- Thiết bị trong phòng thí nghiệm:

- + Cân phân tích Mettler Toledo AB204-S9 (Thụy Sĩ) độ chính xác 0,01 mg.

- + Cân phân tích Precisa (Thụy Sĩ) độ chính xác 0,1 mg.

- + Cân kỹ thuật Sartorius, độ chính xác 0.001g.

- + Máy đo quang Hitachi U-1900 Spectrophotometer.

- + Máy đo quang phổ UV-VIS, đặt ở bước sóng 400 nm.

- + Hệ thống phun mẫu trên máy Linomat 5.

- + Tủ sấy Memmert (Đức).

- + Máy đo độ ẩm MB 25 Ohaus (Mỹ)

- + Kính hiển vi Leica (Đức).

- + Kính lúp soi nổi Leica EZ4.

- + Máy cắt vi phẫu cầm tay.

- + Máy ảnh Canon.

- + Máy đun cách thủy Memmert (Đức).

- + Tủ sấy chân không Heraeus Vacutherm.

- + Máy phân tích máu tự động SYSMEX KX21-Mỹ.

- + Bể ổn nhiệt, $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

- + Máy đo pH.

- + Máy ly tâm.

- + Đồng hồ bấm giờ.

- Thiết bị dùng trong sản xuất thử nghiệm:

- + Tủ sấy thường 60 lít Memmert (Đức)

- + Máy cắt dược liệu.

- + Máy xay dược liệu

- + Máy siêu âm có gia nhiệt Power sonic 405
- + Máy cắt quay 20 lít Buchi, máy cắt quay R-200 Buchi (Thụy Sĩ).
- + Thiết bị bơm.
- + Máy trộn tự động.
- + Hệ thống máy đóng lon.
- + Hệ thống thanh trùng.

2.1.5. Địa điểm nghiên cứu

Sau khi trực tiếp khảo sát thực tế nguồn cỏ sữa lá lớn phát triển tự nhiên tại Bình Dương, nghiên cứu sinh đã thu hái cỏ sữa lá lớn tươi (nguyên rễ), rửa sạch và vận chuyển ra Hà Nội để tiến hành các thí nghiệm. Tác giả đã thực hiện các nghiên cứu: Đặc điểm thực vật và thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn tại Bộ môn Dược liệu thuộc Trường Đại học Dược Hà Nội; Điều chế cao cỏ sữa lá lớn tại Khoa Hóa Thực vật thuộc Viện Dược liệu; Đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn tại Khoa Dược lý Sinh hóa thuộc Viện Dược liệu; Xác định hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và enzyme α -glucosidase tại Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia thuộc Bộ Y tế; Đánh giá tính hiệu quả được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu và sản xuất động vật thí nghiệm chuẩn thức thuộc Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương; Xây dựng công thức, qui trình sản phẩm đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa từ cao chiết cỏ sữa lá lớn tại Công ty cổ phần rượu bia nước giải khát Aroma; Sản xuất thử nghiệm và đóng lon tại Viện nghiên cứu Rau quả và Đánh giá sự chấp nhận của cộng đồng tại Hà Nội và Hưng Yên.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát đặc điểm thực vật, thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn

2.2.1.1. Nghiên cứu đặc điểm thực vật

Mô tả đặc điểm hình thái và xác định tên khoa học: Mẫu cây cỏ sữa lá lớn được mô tả theo phương pháp mô tả phân tích, đối chiếu với khóa phân loại chi *Euphorbia*, bản mô tả loài *Euphorbia hirta* L. trong Thực vật chí Trung Quốc [161] và Khóa xác định và hệ thống họ Thầu dầu Việt Nam của GS.TSKH Nguyễn Nghĩa Thìn [12] để xác định tên khoa học.

Mô tả đặc điểm vi phẫu thân, lá: Mẫu thân, lá cỏ sữa lá lớn được cắt vi

phẫu bằng máy cắt cầm tay, tẩy bằng Cloramin B, nhuộm theo phương pháp nhuộm kép. Quan sát dưới kính hiển vi, chụp ảnh và mô tả các đặc điểm vi phẫu.

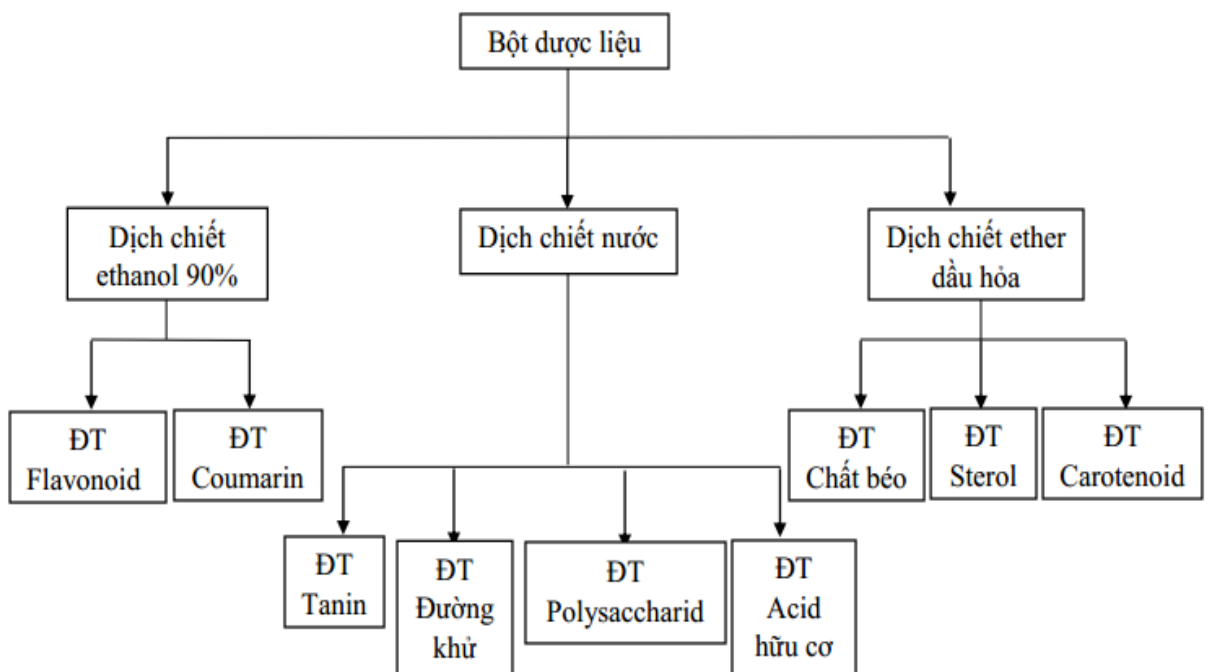
Mô tả đặc điểm bột thân, lá, hoa, quả: Sấy dược liệu (thân, lá, hoa, quả) trong tủ sấy ở nhiệt độ 60°C, sau đó dùng thuyền tán và chày cối sứ nghiền nhỏ. Rây lấy bột mịn, dùng kim mũi mác lấy bột dược liệu cho lên phiến kính đã nhỏ sẵn một giọt nước cất, đặt lamên lên. Quan sát dưới kính hiển vi, chụp ảnh và mô tả các đặc điểm bột.

Chụp ảnh các đặc điểm vi phẫu và bột bằng máy ảnh Canon. Xử lý ảnh bằng phần mềm PHOTOSHOP CS6.

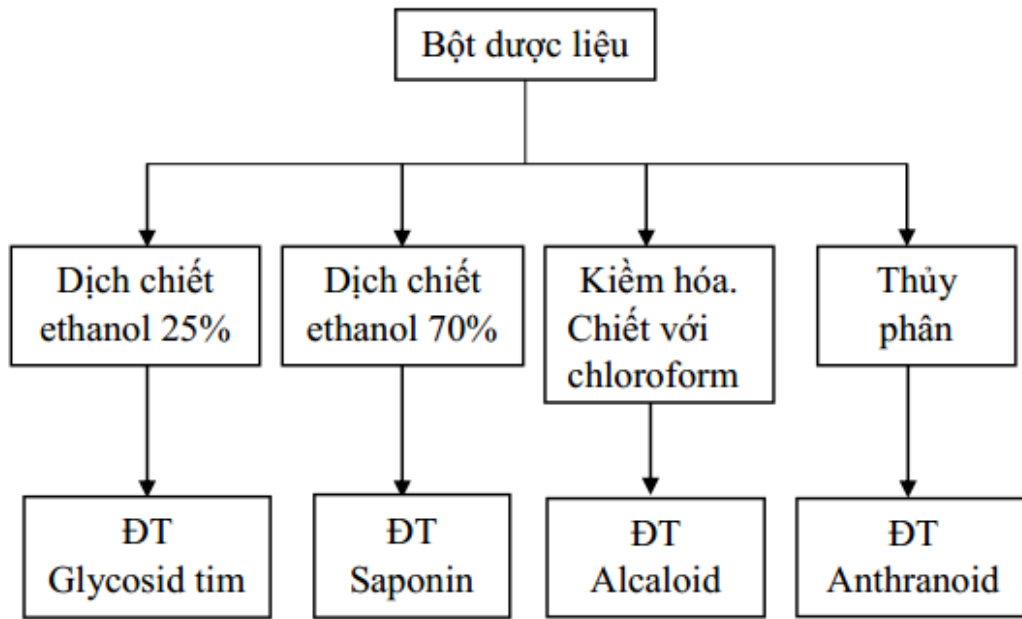
2.2.1.2. Nghiên cứu thành phần hóa học

Định tính các nhóm hợp chất bằng phản ứng hóa học: Tiến hành theo phương pháp ghi trong tài liệu [12].

Quy trình định tính các nhóm hợp chất trong phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn bằng phản ứng hóa học được tóm tắt ở các sơ đồ hình 2.2 và 2.3. Cách tiến hành các phản ứng định tính được trình bày chi tiết ở phụ lục 2.



Hình 2.2. Sơ đồ định tính các nhóm hợp chất trong dịch chiết cồn, dịch chiết nước và dịch chiết ether dầu hỏa phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn



Hình 2.3. Sơ đồ định tính các nhóm hợp chất khác trong phần trên mặt đất vỏ sừa lá lớn

Định tính các phân đoạn dịch chiết n-hexan, chloroform, ethyl acetat bằng sắc ký lớp mỏng

- Chiết xuất các phân đoạn dịch chiết từ phần trên mặt đất vỏ sừa lá lớn:

Dược liệu (1,0320 kg, H= 9,4%) được đun sôi với nước cất trong 1 giờ, thỉnh thoảng bổ sung nước cất. Sau đó lọc nóng bằng bơm hút chân không. Bổ sung thêm nước cất và tiến hành chiết lần 2 và lần 3 như trên. Gộp các dịch chiết và cô đặc dịch chiết đến tỷ lệ 1 kg dược liệu: 1 L dịch chiết, để nguội. Dịch chiết thu được được chiết với các dung môi n-hexan, chloroform, ethyl acetat thu được các phân đoạn dịch chiết tương ứng là phân đoạn n-hexan, phân đoạn chloroform, phân đoạn ethyl acetat. Cất thu hồi dung môi các phân đoạn dịch chiết dưới áp suất giảm và cô cách thủy thu được các căn phân đoạn tương ứng là căn n-hexan (0,1001 g), căn chloroform (0,5912 g), căn ethyl acetat (14,4499 g).

- Chuẩn bị các dung dịch để chấm sắc ký:

+ Dung dịch thử: Lấy 1 mg căn mỗi phân đoạn vào 3 ống nghiệm rồi thêm vào mỗi ống 1 ml methanol.

+ Dung dịch chuẩn: Dung dịch quercitrin có nồng độ 0,1 mg/ml trong methanol và dung dịch rutin có nồng độ 0,1 mg/ml trong methanol.

- *Thuốc thử: vanilin-acid sulfuric*

- *Quy trình thực hiện:*

+ Bản mỏng silica gel F₂₅₄ đã hoạt hóa ở 110°C trong 1 giờ.

+ Chấm các dịch chiết lên bản mỏng và khai triển với hệ dung môi tương ứng.

+ Quan sát vết ở ánh sáng thường, sau đó quan sát dưới ánh sáng tử ngoại (UV₂₅₄ và UV₃₆₆).

+ Hiện vết bằng thuốc thử vanillin-acid sulfuric.

+ Phân đoạn ethyl acetat được chấm so sánh với quercitrin và rutin chuẩn.

Định lượng flavonoid có trong cây cỏ sữa lá lớn bằng phương pháp đo quang

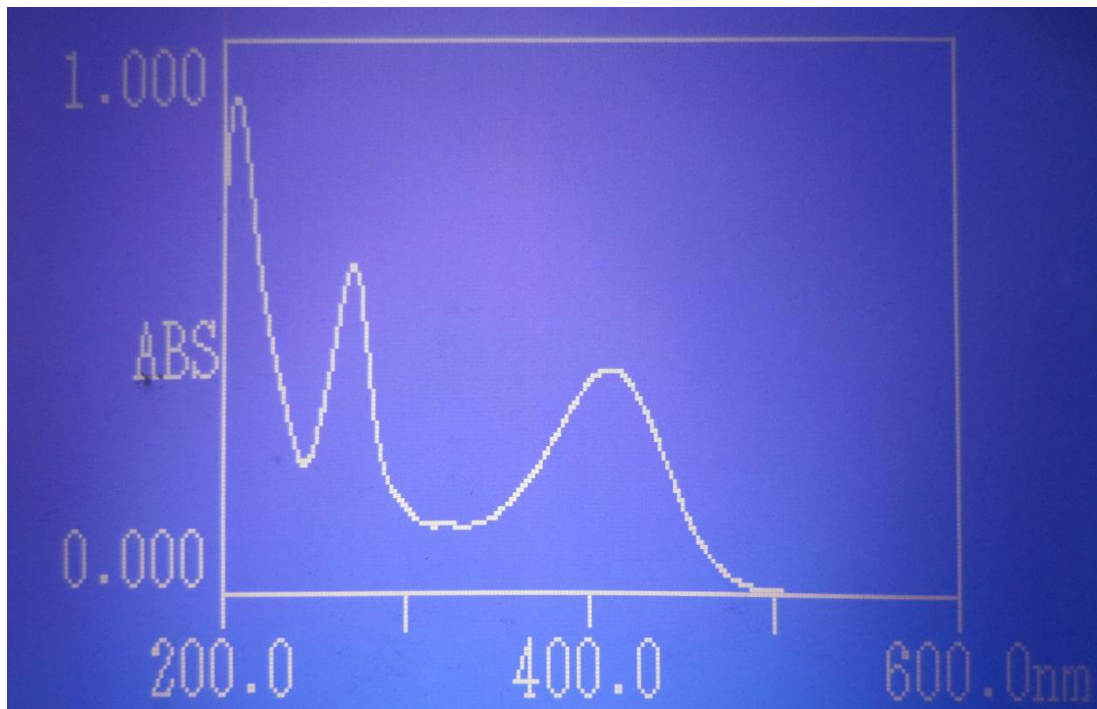
- *Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc*

Cân chính xác 0,98 mg quercitrin chuẩn, cho vào bình định mức 10 ml, thêm 6 ml methanol, lắc cho tan hoàn toàn. Bổ sung methanol đến vạch thu được dung dịch chuẩn gốc S có nồng độ 98 µg/ml.

- *Khảo sát cực đại hấp thụ*

Lấy chính xác 1 ml dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức 10 ml, thêm 0,3 ml dung dịch nhôm clorid 10% (TT), 0,3 ml dung dịch natri acetat 1M (TT), thêm nước cất đến vạch, lắc đều, sau đó để yên trong 30 phút. Tiến hành quét phổ từ bước sóng 200-600 nm. Kết quả quét phổ cho thấy dung dịch có 3 cực đại hấp thụ ở các bước sóng 207,5 nm, 270,5 nm và 412,0 nm. Do đó, chọn bước sóng 412,0 nm làm bước sóng đo quang.

Hình ảnh phổ quercitrin chuẩn tạo phức với nhôm clorid được trình bày ở hình 2.4.



Hình 2.4. Hình ảnh phổ quercitrin chuẩn tạo phức với nhôm clorid

- *Xây dựng đường chuẩn*

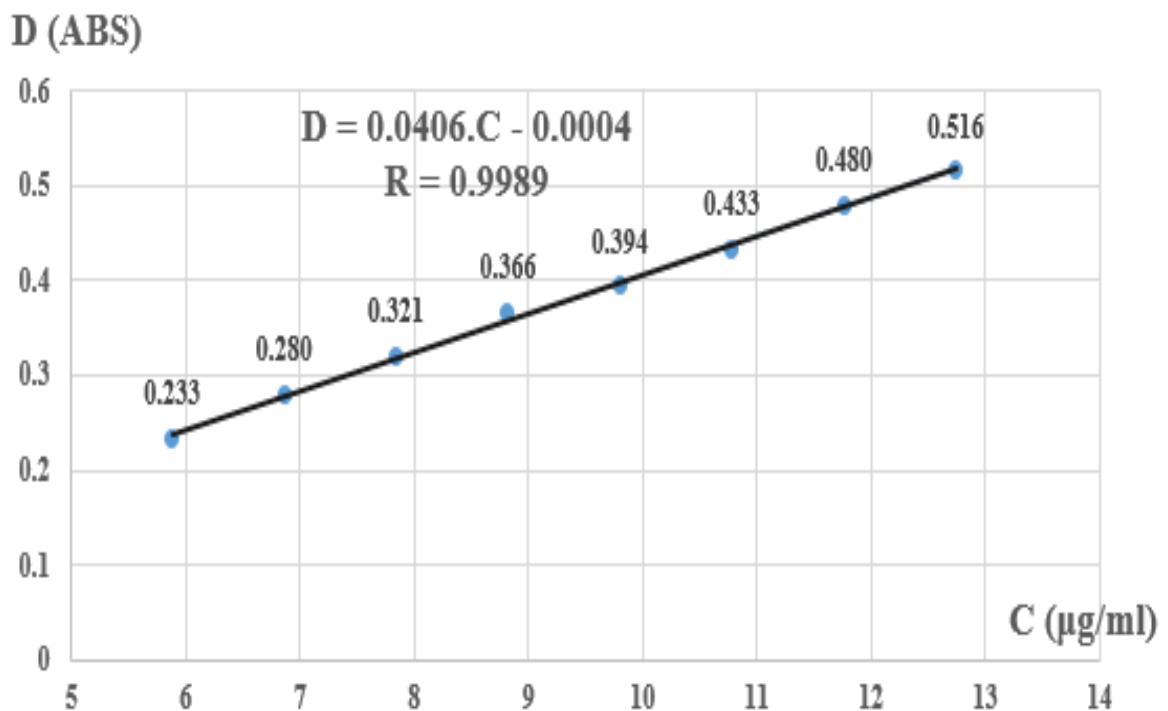
+ Chuẩn bị dãy chuẩn: Lấy chính xác 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3 ml dung dịch chuẩn gốc S cho vào lần lượt 8 bình định mức 10 ml đem cô cách thủy cho bay hết dung môi, để nguội, thêm vào mỗi bình 1 ml methanol lắc cho tan hoàn toàn, thêm 0,3 ml dung dịch nhôm clorid 10 % (TT), 0,3 ml dung dịch natri acetat 1 M (TT), thêm nước cất đến vạch, lắc đều, thu được dãy chuẩn ký hiệu lần lượt S₁, S₂, S₃, S₄, S₅, S₆, S₇, S₈ có nồng độ tương ứng là 5,88; 6,86; 7,84; 8,82; 9,80; 10,78; 11,76; 12,74 µg/ml.

+ Xây dựng đường chuẩn: Tiến hành đo độ hấp thụ dãy dung dịch chuẩn S₁ – S₈ ở bước sóng 412,0 nm với mẫu trắng được chuẩn bị bằng cách lấy chính xác 1ml methanol, 0,3 ml dung dịch nhôm clorid 10% (TT), 0,3 ml dung dịch natri acetat 1M (TT) cho vào bình định mức 10 ml, bổ sung nước cất đến vạch.

Kết quả đo độ hấp thụ dãy dung dịch chuẩn và đồ thị biểu diễn sự tương quan tuyến tính giữa độ hấp thụ và nồng độ quercitrin được trình bày ở bảng 2.1 và hình 2.5.

Bảng 2.1. Sự phụ thuộc của độ hấp thụ vào nồng độ quercitrin chuẩn

Nồng độ quercitrin ($\mu\text{g/ml}$)	Độ hấp thụ			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
5,88	0,233	0,233	0,233	0,233
6,86	0,280	0,280	0,280	0,280
7,84	0,321	0,321	0,321	0,321
8,82	0,366	0,365	0,366	0,366
9,80	0,394	0,392	0,397	0,394
10,78	0,432	0,433	0,434	0,433
11,76	0,480	0,480	0,480	0,480
12,74	0,516	0,516	0,516	0,516

**Hình 2.5. Đồ thị biểu diễn sự tương quan tuyến tính giữa độ hấp thụ và nồng độ quercitrin**

Kết quả trên cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát, độ hấp thụ và nồng độ quercitrin có quan hệ tương quan tuyến tính rất chặt chẽ với hệ số tương quan $R = 0,9989$ (hệ số xác định $R^2 = 0,9978$).

Phương trình hồi quy tuyến tính: $D = 0,0406.C - 0,0004$ (*)

Trong đó: D: Độ hấp thụ của dung dịch.

C: Nồng độ dung dịch ($\mu\text{g/ml}$).

- *Chuẩn bị dung dịch thử*

Cân chính xác khoảng 5 g bột dược liệu cho vào bình nón dung tích 250 ml, thêm 75 ml nước cất, đun sôi trong 30 phút. Lọc nóng qua giấy lọc vào cốc có mỏ dung tích 250 ml. Bổ sung thêm nước cất vào bình nón tiến hành chiết lần 2 và lần 3 như trên. Gộp các dịch chiết, đem cô cách thủy cho đến cạn. Sau đó thêm 20 ml methanol vào cốc cạn đem siêu âm trong 10 phút, để lắng, lọc qua giấy lọc vào cốc có mỏ dung tích 100 ml. Lặp lại quy trình hòa tan trên đến khi dịch chiết thu được phản ứng âm tính với sắt (III) clorid (khoảng 4-5 lần). Lấy dịch chiết methanol cho vào bình định mức 100 ml, bổ sung methanol vừa đủ tới vạch thu được dung dịch thử T.

- *Đo độ hấp thụ của mẫu thử*

Lấy chính xác 0,4 ml dung dịch thử T vào bình định mức 10 ml, đem cô cách thủy cho bay hơi hết dung môi, để nguội, thêm chính xác 1 ml methanol, 0,3 ml dung dịch nhôm clorid 10% (TT), 0,3 ml dung dịch natri acetat 1M (TT), thêm nước cất đến vạch, lắc đều được dung dịch ký hiệu T₁. Để yên dung dịch T₁ trong 30 phút rồi đem đo quang ở bước sóng 412,0 nm với mẫu trắng được chuẩn bị bằng cách lấy chính xác 1 ml methanol, 0,3 ml dung dịch nhôm clorid 10 % (TT), dung dịch natri acetat 1M (TT) cho vào bình định mức 10 ml, bổ sung nước cất đến vạch, lắc đều.

Tiến hành định lượng flavonoid toàn phần trong phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn 6 lần ở cùng điều kiện.

Từ độ hấp thụ của mẫu thử, tính nồng độ flavonoid toàn phần trong dung dịch thử tương ứng theo phương trình (*).

Hàm lượng flavonoid toàn phần trong cò sữa lá lớn được tính theo công thức (**):

$$\text{Hàm lượng flavonoid toàn phần (\%)} = \frac{c \times k}{m \times 10^2 (100 - H)} \times 100 (**)$$

Trong đó: C : nồng độ dung dịch ($\mu\text{g/ml}$). m : Khối lượng dược liệu (g).
k : Hệ số pha loãng (k=25). H : Độ ẩm (%).

- Quy trình tiến hành thí nghiệm

- + Tiến hành chiết xuất dịch chiết cò sữa lá lớn và loại tạp.
- + Làm phản ứng với dung dịch nhôm clorid 10% trong nước .
- + Khảo sát cực đại hấp thụ
- + Khảo sát khoảng tuyến tính.
- + Sử dụng kỹ thuật đường chuẩn để xác định được nồng độ chất cần phân tích có trong mẫu định lượng. Hàm lượng flavonoid toàn phần được tính toán theo chất chuẩn quercitrin trong dược liệu khô tuyệt đối.

- Xử lý kết quả thực nghiệm

Kết quả thực nghiệm được lưu trữ và xử lý thống kê bằng phần mềm MICROSOFT EXCEL.

2.2.2. Điều chế cao cò sữa lá lớn, đánh giá tính an toàn và hiệu quả của chế phẩm trong kiểm soát glucose máu

2.2.2.1. Khảo sát yếu tố ảnh hưởng đến quá trình điều chế cao cò sữa lá lớn

Áp dụng phương pháp định lượng hợp chất flavonoid toàn phần theo phương pháp đã được xây dựng. Tham khảo các tài liệu đề cập việc khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quy trình chiết xuất chung và các nghiên cứu đã được áp dụng với nguyên liệu chứa hàm lượng flavonoid cao [35, 64, 88, 102], sử dụng phương pháp thay đổi một nhân tố, các nhân tố khác giữ nguyên, sau khi chọn được giá trị thích hợp của nhân tố đó thì giá trị này được sử dụng cho các nghiên

cứu tiếp theo [32] chúng tôi lựa chọn quy trình chiết xuất chung với quy mô 10g dược liệu/mẻ để khảo sát các yếu tố ảnh hưởng chính đến quy trình điều chế cao cỏ sữa lá lớn gồm:

Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết

Lấy 10 g dược liệu đã được xay nhỏ đem chiết với 200 ml nước ở 100°C, 95°C, 80°C, 70°C, 60°C trong 3 giờ. Lọc dịch chiết qua giấy lọc. Bã dược liệu được chiết lặp lại 2 lần với 100 ml nước ở cùng nhiệt độ trên trong thời gian lần lượt 2,5 h và 2 h. Dịch lọc 3 lần được gộp lại, cô kiệt dung môi bằng máy cất quay dưới áp suất giảm nhiệt độ 60°C, sấy khô trong tủ sấy chân không 50°C. Cân khối lượng, xay nhỏ cao khô, đồng đều mẫu cao chiết và xác định hàm lượng flavonoid toàn phần và hiệu suất điều chế của cao chiết.

Trong thí nghiệm khác, 10g dược liệu được chiết lặp lại 3 lần, lần lượt với 200, 100, 100 ml nước ở nhiệt độ phòng trong thời gian 7,5 giờ cho mỗi mẫu chiết. Dịch lọc được lọc qua giấy lọc, gộp lại và cô cạn dưới áp suất giảm, sấy khô trong tủ sấy chân không. Cân khối lượng cao, xay nhỏ cao khô. Tiến hành xác định hàm lượng flavonoid toàn phần và hiệu suất điều chế của cao chiết. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình.

Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi và dược liệu

Lấy 10g dược liệu xay nhỏ, tiến hành các thí nghiệm với tỷ lệ dung môi/dược liệu tương ứng với 3 lần chiết ở nhiệt độ thích hợp (là kết quả của thí nghiệm 1), cụ thể như sau:

TN1: 20/1, 10/1, 10/1 (ký hiệu 20/10/10)

TN2: 15/1, 10/1, 10/1 (ký hiệu 15/10/10)

TN3: 12/1, 10/1, 10/1 (ký hiệu 12/10/10)

TN4: 10/1, 8/1, 8/1 (ký hiệu 10/8/8)

TN5: 8/1, 6/1, 6/1 (ký hiệu 8/6/6)

Thời gian chiết cho mỗi thí nghiệm là 3h/2,5h/2h. Dịch lọc 3 lần được lọc qua giấy lọc, cô kiệt dung môi và sấy khô ở nhiệt độ 50°C đến độ ẩm 5%. Cân

khối lượng, xay nhỏ cao khô. Tiến hành xác định hàm lượng flavonoid toàn phần và hiệu suất điều chế của cao chiết. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình.

Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của số lần chiết

- Chiết 1 lần: Tỷ lệ dung môi/dược liệu là 10/1, thời gian chiết là 3 h.
- Chiết 2 lần: Tỷ lệ dung môi/dược liệu lần thứ nhất là 10/1, lần thứ hai là 8/1, thời gian chiết tương ứng của 2 lần chiết là 3h/2,5h.
- Chiết 3 lần: Tỷ lệ dung môi/dược liệu lần thứ nhất là 10/1, lần thứ hai là 8/1, lần thứ 3 là 8/1, thời gian chiết tương ứng của 3 lần chiết là 3h/2,5h/2h.
- Chiết 4 lần: Tỷ lệ dung môi/dược liệu tương ứng với 4 lần chiết là 10/8/8/8, thời gian chiết của 4 lần chiết là 3h/2,5h/2h/2h.

Các mẫu đều có khối lượng như nhau và =10g dược liệu và được chiết ở cùng một nhiệt độ thích hợp (là kết quả của thí nghiệm 1).

Ở các mẫu thí nghiệm, dịch lọc được tiến hành cô, sấy đến độ ẩm 5% như các thí nghiệm trên. Tiến hành xác định hàm lượng flavonoid toàn phần và hiệu suất điều chế của cao chiết. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần rồi lấy kết quả trung bình.

Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết

Tiến hành khảo sát thời gian chiết với các bước thời gian như sau:

- + 3 lần chiết với thời gian tương ứng lần lượt là 3h, 2,5h, 2h
- + 3 lần chiết với thời gian tương ứng lần lượt là 2,5h, 2h, 1,5h
- + 3 lần chiết với thời gian tương ứng lần lượt là 2h, 1,5h, 1h
- + 3 lần chiết với thời gian tương ứng lần lượt là 1,5h, 1,0h, 0,5h

Ở tất cả các thí nghiệm trên đều được tiến hành ở cùng các điều kiện sau: Dược liệu xay nhỏ được chiết với dung môi nước ở nhiệt độ thích hợp (là kết quả của thí nghiệm 1) với tỷ lệ dung môi/dược liệu thích hợp (là kết quả của thí nghiệm 2 và 3). Dịch chiết của 3 lần được gộp lại, cô loại dung môi ở điều kiện áp suất giảm, nhiệt độ 60°C, sấy trong tủ sấy chân không ở nhiệt độ 50°C đến

cao khô. Cân khối lượng cao, xác định độ ẩm, hàm lượng flavonoid toàn phần và hiệu suất điều chế của cao. Làm lặp lại 3 lần rồi lấy kết quả trung bình.

Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng của kích thước dược liệu đến quá trình chiết

Tiến hành thí nghiệm với dược liệu ở các kích thước $d \leq 0,3 \text{ cm}$; $0,3 \text{ cm} < d < 1,0 \text{ cm}$ và $1,0 \text{ cm} \leq d \leq 3,0 \text{ cm}$. Tất cả các mẫu đều được thực hiện ở các điều kiện cố định như sau: Nhiệt độ chiết là kết quả của thí nghiệm 1, số lần chiết và tỷ lệ dung môi/dược liệu là kết quả của thí nghiệm 2, 3, thời gian chiết là kết quả của thí nghiệm 4.

Dịch sau chiết được gộp lại, lọc, cô quay chân không ở 60°C , sấy khô trong tủ sấy chân không ở nhiệt độ 50°C đến cao khô, xác định độ ẩm, hàm lượng flavonoid toàn phần và hiệu suất điều chế của cao. Làm lặp lại 3 lần rồi lấy kết quả trung bình.

2.2.2.2. Phương pháp thu nhận cao từ dịch chiết cỏ sữa lá lớn

Dược liệu cỏ sữa lá lớn phơi khô (độ ẩm $<10\%$), cắt nhỏ 1-3 cm, chiết 3 lần với nước ở 95°C , thể tích dung môi so với khối lượng dược liệu tương ứng lần lượt gấp 10, 8, 8 lần. Chiết trong thời gian tương ứng lần lượt là 2,5h; 2h và 1,5h. Dịch chiết 3 lần chiết được lọc, gộp chung dịch chiết, cô cạn ở điều kiện áp suất giảm (nhiệt độ cô 60°C), sấy trong tủ sấy chân không ở nhiệt độ 50°C đến cao khô (độ ẩm $<5\%$).

2.2.2.3. Đánh giá tính an toàn của cao cỏ sữa lá lớn

Đánh giá độc tính cấp

Độc tính cấp theo đường uống của cao cỏ sữa lá lớn được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong tài liệu [23, 57, 149].

- Chuột mua về được nuôi 3 ngày trước khi thí nghiệm để chuột thích nghi điều kiện thí nghiệm. Trước khi thí nghiệm, cho chuột nhịn đói 12 giờ, để nước uống theo nhu cầu của chuột, Chuột được chia thành các lô thí nghiệm (mỗi lô 10 chuột), mỗi lô chuột được uống các mức liều khác nhau của mẫu thử dựa vào tính toán và thăm dò.

- Đường dùng thuốc: đường uống, cho chuột uống bằng cách dùng bơm tiêm có kim đầu tù để đưa mẫu thử một cách nhẹ nhàng vào dạ dày chuột.

- Mẫu thử: Cao chiết được nghiền tan trong nước với những nồng độ khác nhau. Chuột được cho uống cao với những liều khác nhau tính theo gam cao. Chuột được cho uống thử liều khác nhau với thể tích 0,2ml/10g thể trọng chuột

- Thời gian theo dõi: Sau khi được uống mẫu thử, chuột được cho ăn và uống đầy đủ, để ở phòng thí nghiệm có khí hậu đảm bảo để mọi hoạt động của chuột bình thường. Theo dõi và quan sát các biểu hiện về hành vi, hoạt động, ăn uống, bài tiết của chuột và số chuột sống chết trong 3 ngày (72 giờ).

- Tìm liều tối đa mà không có chuột nào của lô thí nghiệm chết (LD_{0}) và liều tối thiểu để 100% chuột của lô thí nghiệm chết (LD_{100}). Thử thêm 2-4 liều trung gian giữa 2 liều nói trên để xác định LD_{50} .

LD_{50} được tính theo phương pháp Behrens-Karber [23].

- Công thức tính: $LD_{50} = LD_{100} - \frac{\sum (d \times z)}{n}$

Trong đó:

d: hiệu số của hai liều kế tiếp

z: trung bình số chuột chết giữa 2 liều kế tiếp

n: số chuột trong 1 lô

Chuột được giữ ở phòng thí nghiệm có khí hậu đảm bảo để mọi hoạt động của chuột bình thường. Hành vi, hoạt động, ăn uống, bài tiết của chuột và số chuột sống chết trong 3 ngày được theo dõi. Chuột chết được mổ để đánh giá tổn thương đại thể.

Đánh giá độc tính bán trường diễn

Chuột cống được nuôi ổn định 5 ngày trước khi thực hiện nghiên cứu, được nuôi dưỡng bằng thức ăn chuẩn, uống nước tự do [57, 129]. Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 3 lô:

- Lô chứng (n =10): uống nước với thể tích 1ml/100g chuột

- Lô thử liệu 1 (n = 10): uống cao chiết CSLL với liều 0,30 g/kg chuột
- Lô thử liệu 2 (n = 11): uống cao chiết CSLL với liều 3,0 g/kg chuột

Chuột được cho uống cao chiết CSLL liên tục trong 30 ngày. Cân chuột hàng tuần để theo dõi cân nặng. Để theo dõi chức năng gan, thận, chức năng tạo máu, chuột được lấy máu vào 4 thời điểm khác nhau: trước khi dùng mẫu thử (N0), sau khi uống 15 ngày (N15), sau khi uống 30 ngày (N30) và sau khi dừng uống 15 ngày. Máu chuột được lấy thành 2 loại: Loại 1 máu được chống đông bằng EDTA (để xác định các thông số huyết học), loại 2 máu được để đông tự nhiên, ly tâm thu huyết thanh để làm xét nghiệm sinh hóa.

Theo dõi chức năng gan:

- Định lượng AST, ALT theo phương pháp Reitman-Franker dùng cơ chất L-aspartat và L-alanin.
- Định lượng protein toàn phần bằng phương pháp Biuret.
- Định lượng bilirubin bằng phương pháp lên màu.

Theo dõi chức năng thận: Định lượng creatinin và ure lần lượt bằng các phương pháp Jaffe và phương pháp Rappoport.

Theo dõi chức năng tạo máu: Phân tích số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, giá trị hematocrit, nồng độ huyết sắc tố, % lympho trên máy phân tích máu tự động SYSMEX KX21-Mỹ.

Ảnh hưởng đến đường huyết: Định lượng glucose huyết theo phương pháp so màu sử dụng kit glucose liquicolor (Human, Đức).

Xét nghiệm mô bệnh học: Sau 30 ngày uống mẫu thử, lấy ngẫu nhiên mỗi lô 3 con để cắt và đọc tiêu bản gan, thận. Xét nghiệm vi thể gan, thận được thực hiện bởi khoa giải phẫu bệnh - Bệnh viện Quân y 108.

Xử lý số liệu

Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình cộng/trừ sai số chuẩn: $M \pm SEM$ (M: giá trị trung bình từng lô, SEM: sai số chuẩn) và được so sánh thống kê sử dụng phần mềm SPSS 16.0. Sử dụng test Mann Whitney và

Wilcoxon để kiểm định trung bình 2 nhóm, 2 thời điểm khác nhau. Kết quả được xem là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

2.2.2.4. Đánh giá hiệu quả kiểm soát glucose máu của cao cỏ sữa lá lớn

2.2.2.4.1. Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -amylase in vitro [67]

- Chuẩn bị mẫu thử:

Cân chính xác khoảng 0,5 g cao Cỏ sữa lá lớn vào ống ly tâm dung tích 50 mL. Thêm 30 mL dung môi chiết (Methanol: Nước = 75 : 25) vào ống ly tâm, lắc đều ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút. Gạn dịch chiết vào bình định mức dung tích 100 mL. Tiến hành chiết lặp lại tương tự hai lần, sau đó gộp dịch chiết. Định mức đến vạch bằng dung môi chiết (Methanol : Nước = 75 : 25). Lọc, thu lấy dịch trong. Tiến hành pha loãng mẫu thử ở 6 độ pha loãng khác nhau (5; 10; 20; 50; 100; 200) và tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế enzyme.

- Hoạt tính ức chế α -amylase được xác định dựa trên phương pháp sử dụng cơ chất Blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside (BNPG7).

- Cách tiến hành:

Cho 200 μ L mẫu dịch chiết cao cỏ sữa lá lớn vào ống nghiệm chứa 200 μ L enzyme α -amylase (1,0 U/mL) trong đệm photphat 0.1M pH 6,9. Ống nghiệm được ủ ở 40°C trong 5 phút. Thêm 200 μ L cơ chất Blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside (BNPG7). Ủ ở 40°C trong chính xác 10 phút. Thêm 3,0 mL dung dịch Tri-natri photphat pH 11,0 vào ống nghiệm để dừng phản ứng. Đo độ hấp thụ của mẫu thử ở bước sóng 400 nm bằng máy quang phổ UV-VIS.

Tiến hành song song với mẫu kiểm soát và mẫu trắng. Trong đó mẫu kiểm soát chứa 200 μ L dung dịch đệm thay cho mẫu thử và mẫu trắng chứa 200 μ L dung dịch đệm thay cho enzyme.

- Tính kết quả:

Hoạt tính ức chế enzyme được tính theo công thức sau:

$$\text{Hoạt tính ức chế (\%)} = (A_{\text{Control}} - [A_{\text{Test}} - A_{\text{Blank}}]) / A_{\text{Control}} \times 100$$

Trong đó:

A_{Control} : Độ hấp thụ của mẫu kiểm soát

A_{Test} : Độ hấp thụ của mẫu thử

A_{Blank} : Độ hấp thụ của mẫu trắng

- Khả năng ức chế enzyme được xác định thông qua chỉ số IC_{50} . IC_{50} được định nghĩa là nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) của mẫu khảo sát có thể ức chế 50% hoạt tính của enzyme.

2.2.2.4.2. Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase in vitro [122]

Chuẩn bị mẫu thử:

Cân chính xác khoảng 0,5 g cao Cỏ sữa lá lớn vào ống ly tâm dung tích 50 mL. Thêm 30 mL dung môi chiết (Methanol : Nước = 75 : 25) vào ống ly tâm, lắc đều ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút. Gạn dịch chiết vào bình định mức dung tích 100 mL. Tiến hành chiết lặp lại tương tự hai lần, sau đó gộp dịch chiết. Định mức đến vạch bằng dung môi chiết (Methanol : Nước = 75 : 25). Lọc, thu lấy dịch trong. Tiến hành pha loãng mẫu thử ở 6 độ pha loãng khác nhau (5; 10; 20; 50; 100; 200) và tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế enzyme.

- Hoạt tính ức chế α -glucosidase được xác định dựa trên phương pháp sử dụng cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG).

- Cách tiến hành:

Cho 500 μL mẫu dịch chiết cao cỏ sữa lá lớn vào ống nghiệm chứa 500 μL enzyme α -glucosidase (0,1 U/mL) trong đệm photphat 0.1M pH 6,8. Ống nghiệm được ủ ở 37°C trong 10 phút. Thêm 500 μL cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) 2.5mM. Ủ ở 37°C trong chính xác 20 phút. Thêm 1,0 mL dung dịch Na_2CO_3 0,2M vào ống nghiệm để dừng phản ứng. Đo độ hấp thụ của mẫu thử ở bước sóng 405 nm bằng máy quang phổ UV-VIS.

Tiến hành song song với mẫu kiểm soát và mẫu trắng. Trong đó mẫu kiểm soát chứa 500 μL dung dịch đệm thay cho mẫu thử, và mẫu trắng chứa 500 μL dung dịch đệm thay cho enzyme.

- Tính kết quả:

Hoạt tính ức chế enzyme được tính theo công thức sau:

$$\text{Hoạt tính ức chế (\%)} = (A_{\text{Control}} - [A_{\text{Test}} - A_{\text{Blank}}]) / A_{\text{Control}} \times 100$$

Trong đó:

A_{Control} : Độ hấp thụ của mẫu kiểm soát

A_{Test} : Độ hấp thụ của mẫu thử

A_{Blank} : Độ hấp thụ của mẫu trắng

- Khả năng ức chế enzyme được xác định thông qua chỉ số IC_{50} . IC_{50} được định nghĩa là nồng độ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) của mẫu khảo sát có thể ức chế 50% hoạt tính của enzyme.

2.2.2.4.3. Đánh giá tác dụng kiểm soát glucose máu trên mô hình động vật thực nghiệm [57].

Gây tăng glucose máu cho chuột bằng cách tiêm phúc mạc dung dịch streptozocin (STZ) pha trong nước muối sinh lý 0,9% lạnh với liều 100 mg/kg. Sau 7 ngày tiêm STZ, lấy máu chuột để định lượng glucose máu. Những chuột có glucose máu ≥ 10 mmol/L được đưa vào nghiên cứu tiếp theo. Chuột được chia thành 4 (n = 10/ nhóm):

Nhóm 1 (chứng sinh lý): chuột khỏe mạnh, uống nước cất; Nhóm 2 (chứng bệnh lý): chuột bị tăng glucose máu, uống nước cất; Nhóm 3 và 4: chuột bị tăng glucose máu, uống cao CSLL liều lần lượt là 250 và 500 mg/kg. Chuột được uống mẫu nghiên cứu hoặc nước trong 8 tuần liên tiếp. Đến ngày cuối cùng của tuần thứ 8, sau khi uống mẫu nghiên cứu 1 giờ, lấy máu tĩnh mạch chuột, ly tâm thu huyết thanh để định lượng glucose máu và HbA1c theo Kít của nhà sản xuất.

Cách đánh giá kết quả: So sánh giá trị glucose máu sau khi uống mẫu thử 8 tuần so với nhóm chứng. Các số liệu thực nghiệm được xử lý bằng phương pháp phân tích phương sai (one way ANOVA), sử dụng kiểm định Mann-Whitney.

2.2.3. Ứng dụng cao cỏ sữa lá lớn thử nghiệm sản xuất đồ uống dinh dưỡng dùng trong kiểm soát glucose máu

2.2.3.1. Phương pháp công nghệ

Lựa chọn công thức

Nguyên liệu chính để làm đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa đóng lon là cây cỏ sữa lá lớn. Tuy nhiên, theo các tài liệu y dược học cổ truyền thì nước cỏ sữa có màu vàng nhạt, vị hơi chát, ngái [22, 54]. Mục đích là sản phẩm nước uống cỏ sữa giữ được hương vị đặc trưng của cỏ sữa nhưng được cải tiến về màu sắc và hương vị bằng dược liệu có tính chất điều vị, chúng tôi đã khảo sát và dùng kết hợp với một số nguyên liệu như mật ong, chất tạo ngọt, quế, gừng.

Công thức phối trộn nguyên liệu phải đáp ứng được 2 vấn đề:

+ Thành phần nguyên liệu phụ ở tỷ lệ nào giúp tăng chất lượng cảm quan về màu sắc và vị ngọt cho sản phẩm.

+ Đảm bảo sản phẩm vẫn giữ được mùi vị đặc trưng của cỏ sữa mà không bị nguyên liệu phụ lấn át mùi vị.

Trên cơ sở một số nghiên cứu trước và thực tế khảo sát thực tiễn cho thấy: để đảm bảo độ ngọt vừa phải; để không ảnh hưởng đến vị của sản phẩm thì tỷ lệ chất tạo ngọt, quế, gừng, mật ong phải phù hợp để tăng chất lượng cảm quan màu nước và không ảnh hưởng đến mùi vị cỏ sữa [24]. Từ đó, tiến hành khảo sát trên 5 công thức phối trộn.

Các công thức phối trộn được tiến hành xác định hàm lượng flavonoid toàn phần và đánh giá chất lượng cảm quan; phân tích để lựa chọn ra công thức tối ưu dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 2.2. Lựa chọn công thức phối trộn

Công thức	Công thức 1 (CT1)	Công thức 2 (CT2)	Công thức 3 (CT3)	Công thức 4 (CT4)	Công thức 5 (CT5)
Cao CSLL	X	X	X	X	X
Mật ong		X	X	X	X
Chất tạo ngọt		X	X	X	X
Quế			X		
Gừng				X	
Cao sâm					X

Phương pháp nghiên cứu bao bì đóng gói

Sản phẩm sau phối trộn được đóng trong 2 loại bao bì là lon nhôm và chai thủy tinh màu trắng có dung tích V=200 ml. Tiến hành ghép nắp và thanh trùng ở 90°C trong 15 phút rồi được theo dõi sự thay đổi chất lượng của sản phẩm khi bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng. Sau 6 tháng, xác định các chỉ tiêu lý hóa và vi sinh vật của sản phẩm.

Phương pháp xác định thời gian thanh trùng

Sản phẩm đóng trong lon nhôm và chai thủy tinh được thanh trùng ở 90°C với công thức thanh trùng như sau:

$$\frac{15-a-15}{90^{\circ}\text{C}}$$

Thời gian giữ nhiệt a: 5, 10, 15 phút

Sản phẩm được theo dõi bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng. Sau 6 tháng, xác định các chỉ tiêu lý hóa và vi sinh vật của sản phẩm.

Đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa từ cao CSLL ở quy mô thí nghiệm: tham khảo qui trình sản xuất nước quả, nước uống dinh dưỡng [25, 128]. Trên cơ sở tham khảo các quy trình sản xuất các sản phẩm trà, đồ uống hoa quả, nước khoáng, chúng tôi nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất nước cỏ sữa và các yêu cầu công nghệ riêng.

2.2.3.2. Phương pháp hóa lý

Phương pháp xác định hàm lượng đường tổng số: Bằng phương pháp Acid Dinitro-Salicylic (DNS) [Miller, 1959].

Xác định hàm lượng flavonoid toàn phần: Bằng phương pháp đo quang.

Phương pháp xác định độ đục: Xác định độ đục của dịch bằng máy đo độ đục HANNA HI88713-02 (0.00 đến 4000 NTU).

Phương pháp xác định độ ẩm: Độ ẩm của sản phẩm hoặc bán thành phẩm trong quá trình nghiên cứu được xác định theo TCVN 5613-1991.

Xác định hiệu suất điều chế: Hiệu suất chiết được xác định bằng tỷ lệ của khối lượng cao chiết thu được so với khối lượng bột dược liệu được tách chiết

- Công thức tính như sau:

$$M = \frac{M_2}{M_1} \times 100\%$$

- Trong đó:

- M: Hiệu suất chiết (%)

- M₂: Khối lượng cao thu được (mg)

- M₁: Khối lượng bột dược liệu (bột cỏ sữa lá lớn) đưa vào tách chiết (mg)

2.2.3.3. Phương pháp vi sinh

Phương pháp phân tích Tổng số vi sinh vật hiếu khí theo TCVN 4884-1:2015 [10].

Phương pháp định lượng coliform theo TCVN 6848:2007 [5].

Phương pháp định lượng *E. coli* theo TCVN 7924-2:2008 [6].

Phương pháp phân tích *Staphylococci* có phản ứng dương tính coagulase theo TCVN 4830-1:2005 [5]

Phương pháp định lượng *Clostridium perfringens* theo TCVN 4991 : 2005 [4]

Phương pháp phát hiện *Salmonella* spp. bằng phương pháp TCVN 10780-1:2017 [11].

Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc theo TCVN 8275-1:2010 [8].

Phương pháp định lượng *Pseudomonas aeruginosa* theo TCVN 8881:2011 [9].

Phương pháp định lượng *Streptococci faecalis* theo TCVN 6189-2:2009 [7].

2.2.3.4. Phương pháp cảm quan

Đánh giá chất lượng cảm quan của đồ uống dinh dưỡng có sữa lá lớn bằng phương pháp cho điểm theo TCVN 3216 – 1994.

2.2.3.5. Đánh giá chất lượng, an toàn thực phẩm

Đánh giá chất lượng, an toàn thực phẩm theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với các sản phẩm đồ uống không cồn QCVN 6-2:2010/BYT [40] và Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7041:2009 về đồ uống không cồn.

Chọn mẫu đánh giá: Chọn lấy ngẫu nhiên tại 3 điểm, điểm đầu, giữa và cuối của mẻ sản xuất, mỗi điểm lấy 10 sản phẩm. Các mẫu được ghi code, ghi ngày tháng và thời điểm. Trước khi kiểm tra các chỉ tiêu, các mẫu ở các điểm đầu, cuối, giữa sẽ được trộn đều với nhau.

Các tiêu chí được dùng để đánh giá gồm: cảm quan, hàm lượng flavonoid toàn phần, chỉ tiêu hóa lý và chỉ tiêu vi sinh.

Chỉ tiêu cảm quan:

- Màu sắc: Quan sát màu sắc sản phẩm.
- Mùi vị: Dùng vị giác và khứu giác đánh giá rồi rút ra kết luận.

Chỉ tiêu hàm lượng flavonoid toàn phần

Định lượng hợp chất flavonoid toàn phần bằng phương pháp đã được xây dựng.

Chỉ tiêu hóa lý, chất lượng:

TT	Chỉ tiêu phân tích	Phương pháp
1	<i>Độ đường</i>	DNS
2	<i>Độ đục</i>	Đo quang
3	<i>Flavonoid toàn phần</i>	UV-VIS

Các chỉ tiêu vi sinh :

TT	Chỉ tiêu phân tích	Phương pháp
1	<i>Tổng số vi khuẩn hiếu khí</i>	TCVN 5165:1990
2	<i>Tổng số bào tử nấm men, mốc</i>	TCVN 51666:1990

2.2.3.6. Đánh giá sự chấp nhận của cộng đồng

Sản phẩm đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa khi sản xuất thử nghiệm được đánh giá sự chấp nhận của cộng đồng bằng phép thử cho điểm thị hiếu thực hiện trên số đông người tiêu dùng.

Đối tượng:

- Cỡ mẫu: 98 người
- Tiêu chuẩn: người trưởng thành độ tuổi 24-65 tuổi, cả nam và nữ, hiện tại không hút thuốc, không bị các bệnh về mũi họng, và tự nguyện tham gia nghiên cứu

Địa điểm: Hà Nội và Hưng Yên.

Thử cảm quan: Tác giả tiến hành đánh giá thị hiếu bằng phép thử cho điểm thị hiếu theo thang điểm Hedonic : 1-9 [24].

Các thành viên trong hội đồng cảm quan bày tỏ sự ưa thích của mình theo thang điểm 9 bậc:

Cực kỳ thích: 9 điểm

Rất thích: 8 điểm

Thích: 7 điểm

Hơi thích: 6 điểm

Bình thường: 5 điểm

Hơi chán: 4 điểm

Chán: 3 điểm

Rất chán: 2 điểm

Cực kỳ chán: 1 điểm

* Cách tiến hành: Nhóm phân tích gồm 9 thành viên

- Đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa lá lớn được đựng trong cốc thủy tinh trong suốt, tại nhiệt độ môi trường từ 20⁰C đến 30⁰C.

- Các đối tượng lần lượt thử nếm mẫu và cho điểm theo phiếu.

Người thử đánh giá mức độ ưa thích theo thang điểm này cho từng tính chất của sản phẩm là màu nước, mùi, vị và cho toàn diện sản phẩm đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa lá lớn. Dựa trên kết quả của các phiếu đánh giá hợp lệ, theo đúng yêu cầu, tính tỷ lệ % lựa chọn sự ưa thích sản phẩm.

2.3. Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu được sự đồng ý của: Viện Dinh dưỡng Quốc gia; Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia; Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương; Viện Dược liệu; Trường Đại học Dược Hà Nội; Viện Nghiên cứu rau quả và Công ty cổ phần rượu bia nước giải khát Aroma trước khi tiến hành nghiên cứu.

- Đối với các thử nghiệm trên mô hình động vật thực nghiệm, việc lấy mẫu máu, giết mổ được thực hiện nghiêm ngặt đúng quy trình và các quy định của phòng thí nghiệm.

- Đối với đánh giá chấp nhận tại cộng đồng, các đối tượng tham gia nghiên cứu tình nguyện, có thể tham gia hoặc không bất cứ lúc nào.

- Các thông tin và kết quả trả lời được bảo mật và chỉ được sử dụng vào mục đích nghiên cứu mà không sử dụng vào bất kỳ mục đích nào khác.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm thực vật và thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn

Nghiên cứu đặc điểm thực vật và thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn giúp nhận diện tính đúng của mẫu nghiên cứu làm căn cứ giám định tên khoa học của mẫu nghiên cứu, chọn được nguyên liệu chuẩn phù hợp trong nghiên cứu để ứng dụng triển khai sản xuất với lượng nguyên liệu lớn và ổn định như nghiên cứu đưa ra.

3.1.1. Nghiên cứu đặc điểm thực vật

3.1.1.1. Mô tả đặc điểm hình thái

Quan sát tại thực địa, cây cỏ sữa lá lớn có những đặc điểm sau đây:

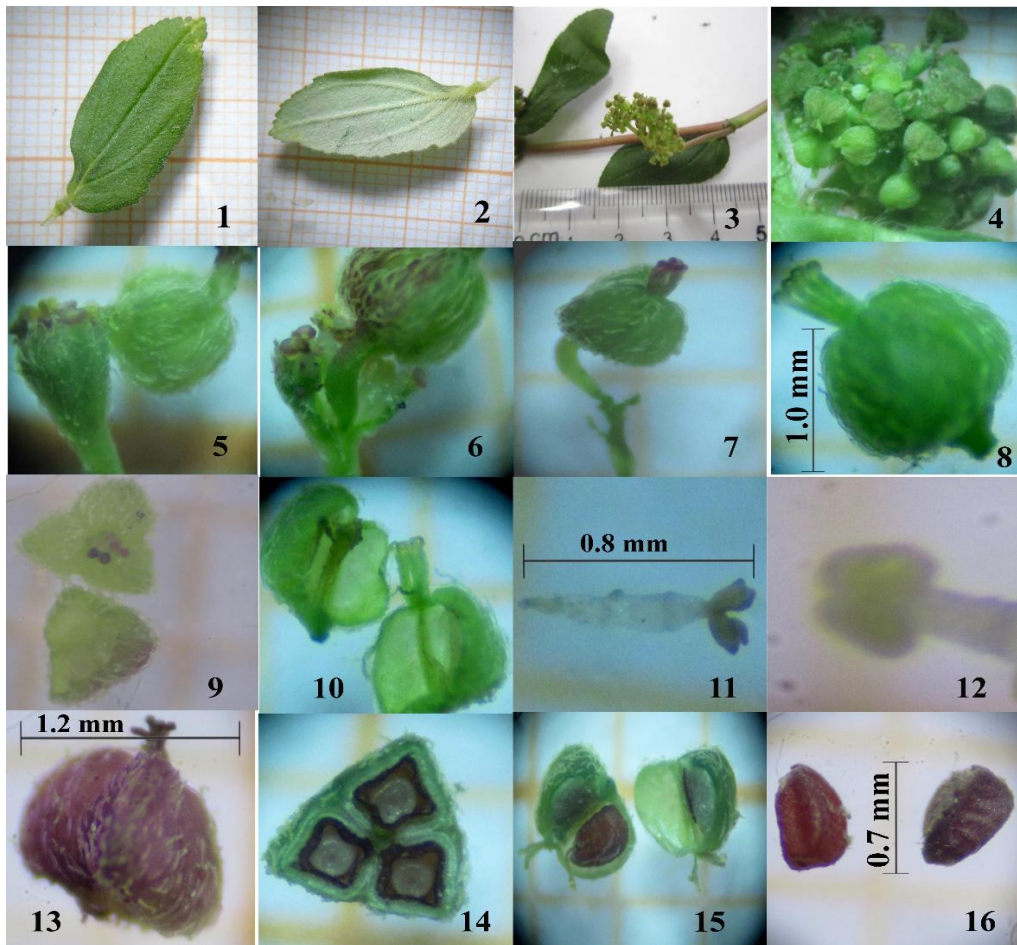
Cây thảo, sống hằng năm, cao từ 20-50 cm, có nhựa mủ trắng. Rễ cọc, màu vàng nâu, rễ chính dài 5-10 cm, đường kính 1-3 mm. Thân mọc thẳng đôi khi gấp khúc, hình trụ, đường kính 1-4 mm, màu từ xanh nhạt (khi còn non) đến hồng, đỏ tím (khi trưởng thành), chia thành nhiều đốt, các đốt ở gần rễ thường ngắn hơn dài 2-3 cm, các đốt ở phía trên dài từ 3-7 cm, các mấu giữa các đốt thân hơi phình ra. Thân thường phân nhánh ở phần giữa và phần trên của cây, đôi khi cả ở gần gốc. Thân thường phân từ 2-4 nhánh, có khi nhiều hơn, các nhánh mọc ra từ mấu thân. Trên thân có nhiều lông che chở đa bào màu vàng nâu, lông nhỏ màu trắng. Lá đơn, mọc đối, thành hàng, có 2 lá kèm mỏng hình lông cứng dài 1-2 mm ở hai bên cuống lá. Cuống lá ngắn, dài 1-3 mm, có lông. Phiến lá hình bầu dục hoặc elip dài, lá non dài từ 1-2 cm, rộng 0,4-0,8 cm; lá trưởng thành dài từ 2-4 cm, rộng 0,8-1,5 cm. Mặt trên của lá có màu biến đổi từ xanh đậm đến đỏ, mặt dưới có màu xanh nhạt, cả hai mặt đều có lông. Góc lá không đối xứng một bên tròn, một bên hình khiên, mép lá có răng cưa, ngọn lá nhọn. Hoa đơn tính cùng gốc. Cụm hoa hình chén, các cụm tụ lại thành xim có cuống, mọc ở nách lá, cuống dài 2-4 mm. Chén của cụm hoa có kích thước 0,5-1 x 1 mm, có 4 tuyến tiết hình đĩa, màu đỏ xếp thành hình

elip trên thành chén. Bên trong mỗi chén có 1 hoa cái và 2-5 hoa đực. Hoa đực: Hoa trần không cuống, chỉ gồm 1 nhị, kích thước 0,1 x 0,8 mm, chỉ nhị mảnh màu trắng trong, chia 2-3 đốt, có 2 bao phấn màu vàng, bao phấn dính gốc. Hoa cái: Hoa trần có cuống ngắn dài 1 mm, nhô ra khỏi chén. Bầu nhụy hình cầu, kích thước 1 x 1 mm, có nhiều lông nhỏ, vòi nhụy rời gồm 6 vòi, núm nhụy có màu vàng hoặc đỏ, bầu 3 ô. Quả nang 3 ô, mỗi ô chứa 1 hạt, kích thước 1-1,5 x 1-1,5, có nhiều lông nhỏ, quả có cuống dài 1,5 mm. Hạt hình cầu hoặc tứ giác, kích thước 0,3-0,4 x 0,7-0,9 mm, màu đỏ, bên trong hạt màu trắng, bề mặt vỏ hơi nhăn nheo, có rãnh nhỏ.



Hình 3.1. Ảnh chụp toàn cây cỏ sữa lá lớn

Ảnh chụp các đặc điểm hình thái cây cỏ sữa lá lớn được trình bày ở hình 3.1 và hình 3.2.



Hình 3.2. Ảnh chụp các đặc điểm cây cỏ sữa lá lớn

Chú thích:

- | | | | |
|------------------------|------------------|--------------|-------------------|
| 1, 2. Lá | 7. Hoa cái | 11. Hoa đực | 14. Quả cắt ngang |
| 3,4. Cụm hoa tổng | 8. Bầu | 12. Bao phấn | 15. Quả cắt dọc |
| 5. Cụm hoa | 9. Bầu cắt ngang | 13. Quả | 16. Hạt |
| 6. Cụm hoa đã bóc tách | 10. Bầu cắt dọc | | |

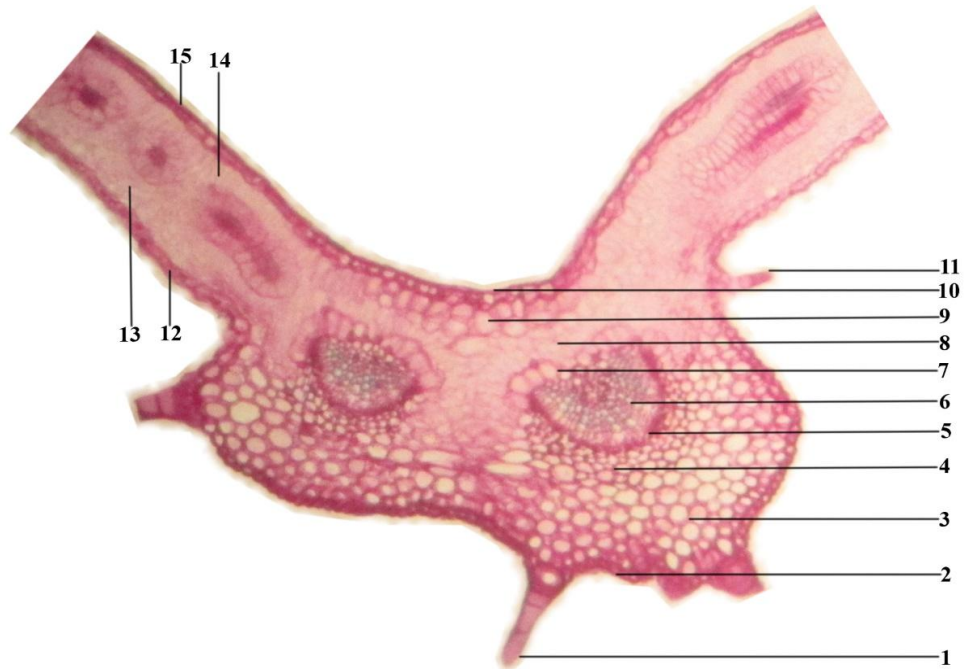
3.1.1.2. Xác định tên khoa học của mẫu nghiên cứu

Căn cứ vào đặc điểm hình thái của mẫu nghiên cứu, đối chiếu với khóa phân loại chi *Euphorbia*, bản mô tả loài *Euphorbia hirta* L. của *Thực vật chí Trung Quốc* [161] và Khóa xác định và hệ thống họ Thầu dầu Việt Nam của GS.TSKH Nguyễn Nghĩa Thìn [31] cùng với sự giúp đỡ của TS. Nguyễn Quốc Huy, mẫu cỏ sữa lá lớn nghiên cứu đã được xác định tên khoa học là *Euphorbia hirta* L., thuộc họ Thầu dầu (Euphorbiaceae).

3.1.1.3. Đặc điểm vi phẫu

Đặc điểm vi phẫu lá

Phần gân lá: Mặt trên hơi lõm, mặt dưới lồi. Biểu bì dưới (2) gồm 1 hàng tế bào hình trứng xếp đều đặn, mang lông che chở đa bào (1). Mô mềm (3) gồm 4-5 hàng tế bào hình gần tròn, kích thước khác nhau, xếp lộn xộn. Mô dày (4) gồm 3-4 hàng tế bào đa giác, thành dày, xếp lộn xộn nằm sát bó libe-gỗ. Gân lá có 2 bó libe-gỗ hình cung, libe (5) ở phía ngoài, gỗ (6) ở trong. Phía trên bó libe-gỗ có 1 hàng tế bào mô mềm (7) có kích thước lớn bao quanh. Mô giậu (8) gồm 2-3 hàng tế bào nằm sát với 2 hàng tế bào mô dày (9) phía trên. Biểu bì trên (10) gồm 1 hàng tế bào hình trứng xếp đều đặn.



Hình 3.3. Ảnh chụp vi phẫu lá cỏ sữa lá lớn

Chú thích :

Gân lá

- | | |
|---------------------------------------|------------------|
| 1. Lông che chở | 5. Libe |
| 2. Biểu bì dưới | 6. Gỗ |
| 3. Mô mềm | 8. Mô giậu |
| 4. Mô dày | 10. Biểu bì trên |
| 7. Tế bào mô mềm bao quanh bó libe-gỗ | |

Phiến lá

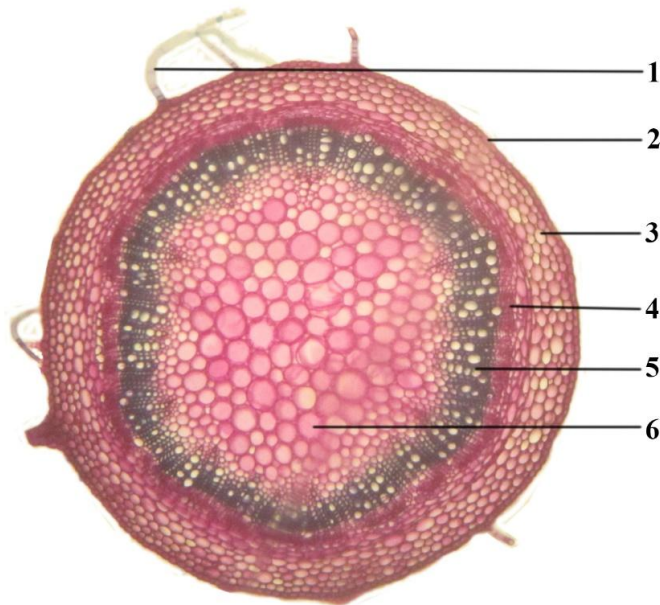
- | | |
|------------------|------------------|
| 11. Lông che chở | 14. Mô giậu |
| 12. Biểu bì dưới | 15. Biểu bì trên |
| 13. Mô mềm | |

Phần phiến lá: Biểu bì dưới (12) gồm 1 hàng tế bào hình chữ nhật xếp đều đặn và mang lông che chở đa bào (11). Mô mềm (13) gồm 2-3 hàng tế bào, kích thước không đều, xếp lộn xộn. Mô giậu (14) gồm 2-3 hàng tế bào xếp tương đối đều đặn, nằm sát biểu bì trên. Biểu bì trên (15) gồm 1 hàng tế bào hình chữ nhật xếp đều đặn.

Ảnh chụp vi phẫu lá cỏ sữa lá lớn dưới kính hiển vi được trình bày ở hình 3.3.

Đặc điểm vi phẫu thân

Mặt cắt vi phẫu thân hình gần tròn. Ngoài cùng là lớp biểu bì (2) gồm 1 lớp tế bào hình trứng xếp đều đặn, mang lông che chở đa bào (1). Dưới lớp biểu bì là mô mềm vỏ (3) cấu tạo gồm 5-6 lớp tế bào hình trứng, xếp tương đối đều đặn thành các vòng tròn đồng tâm. Các bó libe-gỗ xếp sát nhau tạo thành vòng hướng tâm, mỗi bó gồm libe (4) ở phía ngoài, gỗ (5) ở phía trong, ngăn cách với libe bởi tầng phát sinh libe-gỗ. Tâm là mô mềm ruột (6) chiếm một phần hai chiều dày thân gồm các tế bào hình tròn thành mỏng, càng vào trong các tế bào có kích thước càng lớn.



Hình 3.4. Ảnh chụp vi phẫu thân cỏ sữa lá lớn

Chú thích: 1. Lông che chở đa bào 2. Biểu bì 3. Mô mềm vỏ
4. Libe 5. Gỗ 6. Mô mềm ruột

Ảnh chụp vi phẫu thân cỏ sữa lá lớn dưới kính hiển vi được trình bày ở Hình 3.4.

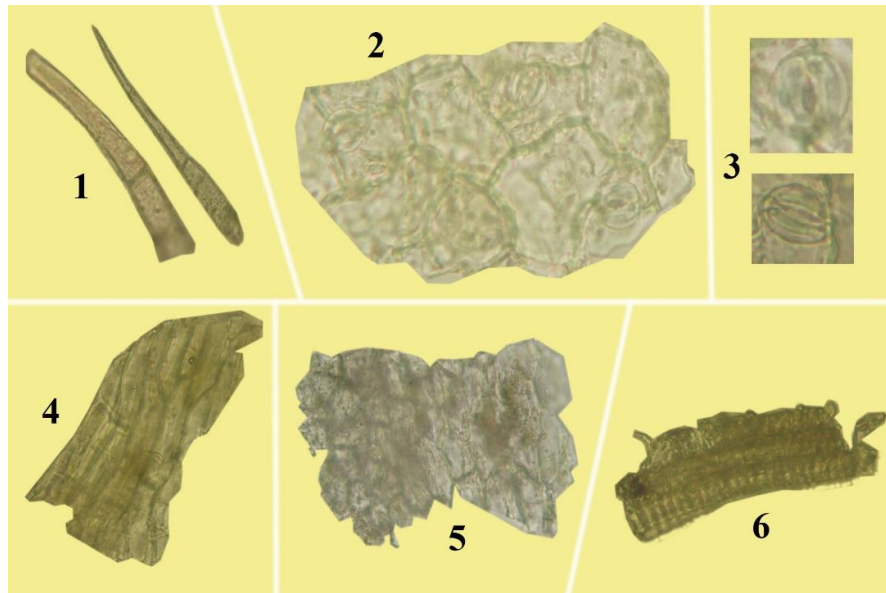
3.1.1.4. Đặc điểm bột dược liệu

Bột lá

Bột lá có màu xanh lục, mùi thơm, không vị. Quan sát dưới kính hiển vi, bột lá có những đặc điểm sau :

Lông che chở đa bào gồm 3-4 tế bào, đầu nhọn (1), biểu bì dưới gồm những tế bào thành mỏng mang lỗ khí (2), lỗ khí (3), mảnh biểu bì trên gồm các tế bào hình chữ nhật (4), mảnh mô mềm gồm các tế bào thành mỏng xếp lộn xộn (5), mạch xoắn (6).

Ảnh chụp đặc điểm bột lá được trình bày ở Hình 3.5.



Hình 3.5. Ảnh chụp các đặc điểm bột lá cỏ sữa lá lớn dưới kính hiển vi

Chú thích: 1. Lông che chở đa bào; 2. Mảnh biểu bì mang lỗ khí; 3. Lỗ khí;
4. Mảnh biểu bì; 5. Mô mềm; 6. Mạch xoắn

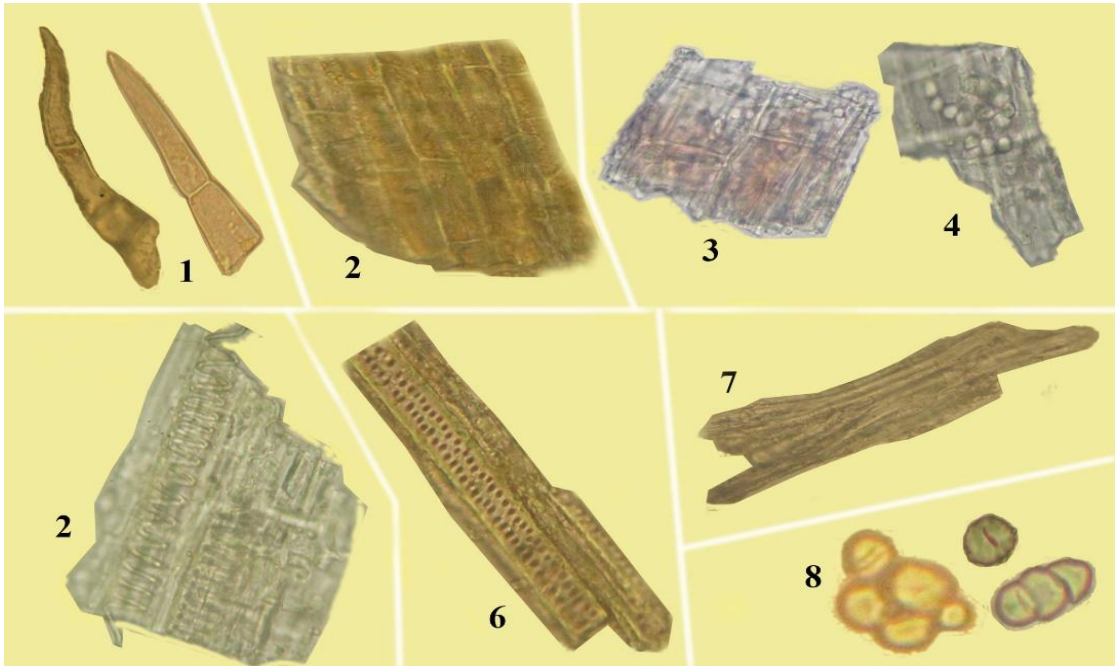
Bột thân

Thân được sấy khô, nghiền thành bột mịn. Bột có màu vàng nâu, mùi thơm, vị hơi đắng. Quan sát dưới kính hiển vi, bột thân có những đặc điểm sau:

Lông che chở đa bào gồm 3-4 tế bào, đầu nhọn (1), biểu bì gồm các tế bào

hình chữ nhật xếp đều đặn (2), mô mềm gồm các tế bào thành mỏng xếp đều đặn (3), mảnh mô mềm chứa tinh bột (4), mạch xoắn (5), mạch điểm (6), sợi tụ lại thành bó sợi, thành dày (7), các hạt tinh bột hình tròn, hình trứng (8).

Ảnh chụp đặc điểm bột thân được trình bày ở Hình 3.6.



Hình 3.6. Ảnh chụp các đặc điểm bột thân cỏ sữa lá lớn dưới kính hiển vi

Chú thích: 1. Lôông che chở đa bào; 2. Mảnh biểu bì; 3. Mô mềm;

4. Mô mềm chứa tinh bột; 5. Mạch xoắn; 6. Mạch điểm; 7. Bó sợi; 8.

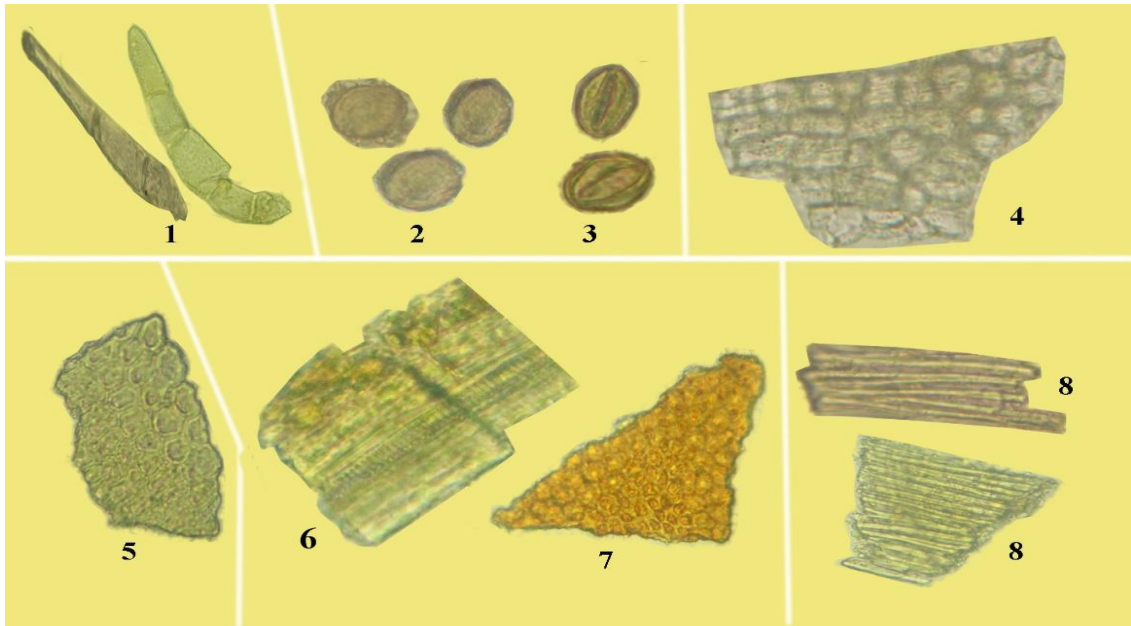
Tinh bột

Bột hoa

Hoa được sấy khô, nghiền thành bột mịn. Bột có màu nâu, mùi thơm, vị hơi đắng. Quan sát bột dưới kính hiển vi, bột hoa có những đặc điểm sau:

Lông che chở đa bào gồm 4-5 tế bào, đầu nhọn (1), hạt phấn hoa hình gần tròn (2), hoặc hình bầu dục (3) màu vàng nhạt, mô mềm gồm các tế bào thành mỏng, hình đa giác (4), (5), mảnh mạch (6), mảnh mang màu (7), bó sợi (8).

Ảnh chụp đặc điểm bột hoa được trình bày ở Hình 3.7.



Hình 3.7. Ảnh chụp các đặc điểm bột hoa cỏ sữa lá lớn dưới kính hiển vi

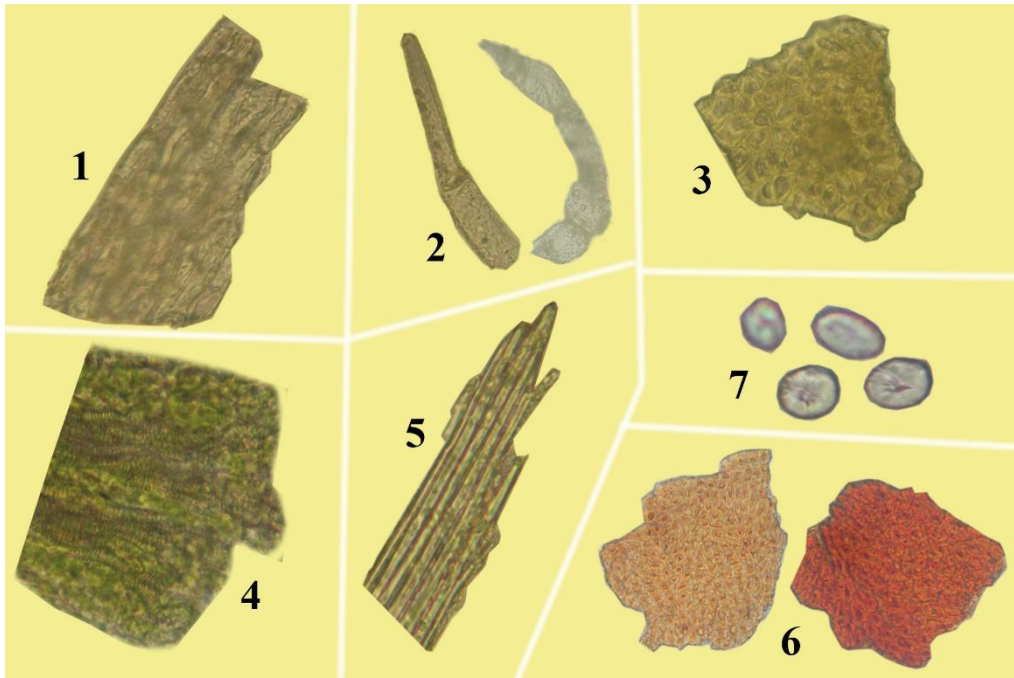
Chú thích: 1. Lông che chở đa bào; 2,3. Hạt phấn; 4,5. Mô mềm; 6. Mạch mạch; 7. Mảnh mang màu; 8. Bó sợi

Bột quả

Quả được sấy khô, nghiền thành bột mịn. Bột có màu nâu, mùi thơm, không vị. Quan sát bột dưới kính hiển vi, bột quả có những đặc điểm sau:

Lông che chở đa bào gồm 4-5 tế bào, đầu nhọn (1), mảnh biểu bì gồm các tế bào hình chữ nhật (2), mô mềm cấu tạo bởi các tế bào hình đa giác (3), mạch xoắn (4), bó sợi (5), mảnh nội nhũ màu cam hoặc đỏ (6), các hạt tinh bột hình tròn, hình trứng (7).

Ảnh chụp đặc điểm bột quả được trình bày ở hình 3.8.



Hình 3.8. Ảnh chụp các đặc điểm bột quả cỏ sữa lá lớn dưới kính hiển vi

Chú thích: 1. Mảnh biểu bì; 2. Lông che chở đa bào; 3. Mô mềm;
4. Mạch xoắn; 5. Bó sợi; 6. Mảnh nội nhũ; 7. Tinh bột

3.1.2. Xác định thành phần hóa học

3.1.2.1. Định tính các nhóm hợp chất bằng phản ứng hóa học

Tiến hành phản ứng định tính các nhóm hợp chất có trong phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn theo phương pháp mô tả tại chương 2, kết quả được tóm tắt ở bảng 3.1.

**Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm hợp chất
trong phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn**

STT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận
1	Glycosid tim	Phản ứng Libermann-Burchard	++	Không có
		Phản ứng Legal	-	
		Phản ứng Baljet	-	
		Phản ứng Keller - Kiliani	++	
2	Alcaloid	Phản ứng với TT Mayer	+	Có
		Phản ứng với TT Bouchardat	+	
		Phản ứng với TT Dragendorff	+	
3	Anthranoid	Phản ứng Borntraeger	-	Không có
4	Flavonoid	Phản ứng Cyanidin	+++	Có
		Phản ứng với dd NaOH 10%	+++	
		Phản ứng với NH ₃	+++	
		Phản ứng với dd FeCl ₃ 5%	+++	
5	Coumarin	Phản ứng mở, đóng vòng lacton	-	Không có
		Quan sát hiện tượng huỳnh quang	-	
6	Saponin	Quan sát hiện tượng tạo bọt	+	Có
7	Tanin	Phản ứng với dd gelatin 1%	+	Có
		Phản ứng với dd FeCl ₃ 5%	+++	
		Phản ứng với dd chì acetat 10%	+++	
		Phản ứng Stiasny	Có tanin pyrogallic và tanin pyrocatechic	
8	Đường khử	Phản ứng với TT Fehling	++	Có
9	Polysaccharid	Phản ứng với TT Lugol	+	Có
10	Acid hữu cơ	Phản ứng với Na ₂ CO ₃	-	Không có
11	Chất béo	Tạo vết mờ trên giấy lọc	-	Không có
12	Sterol	Phản ứng Liebermann	++	Có
13	Carotenoid	Phản ứng với H ₂ SO ₄ đặc	-	Không có

Chú thích: - : Phản ứng âm tính.

++ : phản ứng dương tính rõ.

+ : Phản ứng dương tính.

+++ : Phản ứng dương tính rất rõ.

Từ kết quả định tính bằng phản ứng hóa học trình này ở bảng 3.1 cho thấy trong phần trên mặt đất cây cỏ sữa lá lớn có các nhóm hợp chất: flavonoid, tanin, saponin, alcaloid, sterol, đường khử, polysaccharid.

3.1.2.2. Định tính các phân đoạn dịch chiết bằng sắc ký lớp mỏng

3.1.2.2.1. Định tính phân đoạn dịch chiết n-hexan bằng sắc ký lớp mỏng

Tiến hành SKLM theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.2 với hệ dung môi khai triển: toluene-ethyl acetat-acid formic (7:1,5:0,1). Kết quả định tính bằng sắc ký lớp mỏng của phân đoạn dịch chiết n-hexan với hệ dung môi toluene-ethyl acetat-acid formic (7:1,5:0,1) được trình bày ở bảng 3.2.

Bảng 3.2. Kết quả định tính phân đoạn dịch chiết n-hexan

STT	R _f	Màu sắc		
		UV-254	UV-366	TT Vanilin-acid sulfuric
1	0,083	(++)	Xanh (++)	Hồng (+)
2	0,112	(+)	Xanh (++)	Nâu (++)
3	0,137	(-)	Xanh (++)	(-)
4	0,171	(+)	(-)	Hồng (++)
5	0,222	(++)	(-)	Hồng (++)
6	0,269	(+)	Xanh (++)	Nâu (+)
7	0,344	(+)	(-)	Xanh dương (++)
8	0,359	(-)	Xanh (++)	Vàng (+)
9	0,385	(+)	(-)	(-)
10	0,402	(-)	Xanh (++)	Xanh dương (+)
11	0,443	(+)	Xanh (+)	Tím (++)
12	0,513	(-)	Vàng (+)	Xanh rêu (++)
13	0,598	(-)	(-)	Tím (+)
14	0,628	(-)	Xanh (+)	(-)
15	0,677	(++)	Vàng (+)	(-)
16	0,708	(-)	Vàng (+)	(-)
17	0,772	(++)	Xanh (++)	Tím (+)

Chú thích:

(-) : không hiện vết

(+) : hiện vết

(++): hiện vết rõ và đậm

Kết quả phân tích tại Bảng 3.2 cho thấy phân đoạn dịch chiết n-hexan của phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn khi khai triển sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi toluene-ethyl acetat-acid formic (7:1,5:0,1) cho 17 vết, trong đó: các vết 1, 5, 15, 17 dưới UV-254 hiện vết đậm, các vết 1, 2, 3, 6, 8, 10, 17 dưới UV-366 rõ và đậm, sau khi phun thuốc thử các vết 2, 4, 5, 7, 11, 12 hiện màu đậm.

3.1.2.2.2. Định tính phân đoạn dịch chiết chloroform

Tiến hành thực hiện phân tích bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.2 với hệ dung môi là: toluen-chloroform-methanol (5:4:0,5). Kết quả định tính bằng SKLM của phân đoạn dịch chiết chloroform với hệ dung môi toluen-chloroform-methanol (5:4:0,5) được trình bày ở Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Kết quả định tính phân đoạn dịch chiết chloroform

STT	R _f	Màu sắc		
		UV-254	UV-366	TT Vanilin-acid sulfuric
1	0,179	(+)	Vàng (+)	Nâu (+)
2	0,224	(-)	(-)	Nâu (+)
3	0,274	(++)	Đỏ (+)	Nâu (+)
4	0,333	(-)	Đỏ (+)	(-)
5	0,362	(++)	Xanh (+)	Nâu (+)
6	0,427	(+)	Xanh (+)	Nâu (+)
7	0,460	(-)	Xanh (++)	(-)
8	0,476	(++)	Xanh (++)	Nâu (+)
9	0,556	Xanh (++)	Xanh (++)	Xám (+)
10	0,633	(-)	Xanh (+)	(-)
11	0,624	(+)	Xanh (++)	(-)
12	0,654	(+)	Xanh (+)	(-)
13	0,709	(-)	Vàng (+)	(-)
14	0,761	(-)	Xanh (+)	Tím than (++)
15	0,812	(-)	Vàng (+)	(-)
16	0,876	(+)	Đỏ (+)	(-)

Chú thích: (-) : không hiện vết
 (+) : hiện vết
 (++) : hiện vết rõ và đậm

Bảng 3.3 cho thấy phân đoạn dịch chiết chloroform của phần trên mặt đất của cỏ sữa lá lớn khi khai triển SKLM với hệ dung môi toluen-chloroform-methanol (5:4:0,5) cho 16 vết, trong đó: dưới UV-254 các vết 3, 5, 8 đậm và hai vết 9 phát huỳnh quang, dưới UV-366 các vết 7, 8, 9, 11 rõ và đậm, sau khi phun thuốc thử vết 14 hiện màu rõ.

3.1.2.2.3. Định tính phân đoạn dịch chiết ethyl acetat

Tiến hành sắc ký lớp mỏng theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.2 với hệ dung môi khai triển: toluen-ethyl acetat-methanol-acid formic (3:6:1:1). Các dung dịch thử và dung dịch chuẩn quercitrin, rutin chấm trên cùng một bản mỏng để so sánh.

Kết quả định tính bằng sắc ký lớp mỏng của phân đoạn dịch chiết ethyl acetat với hệ dung môi toluen-ethyl acetat-methanol-acid formic (3:6:1:1) được trình bày bảng 3.4.

Bảng 3.4. Kết quả định tính phân đoạn dịch chiết ethyl acetat

STT	R _f	Màu sắc		
		UV-254	UV-366	TT Vanilin-acid sulfuric
1	0,112	(+)	(-)	(-)
2	0,146	(+)	(-)	(-)
3	0,180	(+)	Xanh (+)	(-)
4	0,249	(++)	(-)	(-)
5	0,305	(+)	Đen (+)	Cam (+)
6	0,356	(-)	Xanh (+)	(-)
7	0,403	(++)	Đen (++)	Cam (++)
8	0,457	(-)	Xanh (++)	Vàng (+)
9	0,506	(++)	Đen (++)	Cam (++)
10	0,576	(-)	Xanh (+)	(-)
11	0,592	(++)	Đen (+)	Xanh đen (+)
12	0,619	(-)	Xanh (++)	(-)
13	0,635	(++)	Vàng (++)	Cam (+)

Chú thích: (-) : không hiện vết

(+) : hiện vết

(++): hiện vết rõ và đậm

Bảng 3.4 cho thấy phân đoạn dịch chiết ethyl acetat của phần trên mặt đất của cỏ sữa lá lớn khi khai triển SKLM với hệ dung môi toluen-ethyl acetat-methanol-acid formic (3:6:1:1) cho kết quả hiện 13 vết, trong đó: vết 4, 7, 9, 11, 13 dưới UV-254 rõ và đậm, vết 7, 8, 9, 12, 13 dưới UV-366 hiện màu đậm, sau khi phun thuốc thử vết 7, 9 hiện màu rõ. Đối chiếu với chất chuẩn nhận thấy trong phân đoạn ethyl acetat có quercitrin cho vết có độ đậm lớn chứng tỏ quercitrin là 1 thành phần chính trong phân đoạn ethyl acetat.

3.1.2.3. Định lượng flavonoid toàn phần trong cỏ sữa lá lớn

Tiến hành định lượng flavonoid toàn phần trong phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn theo phương pháp được mô tả tại chương 2, kết quả được trình bày ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Kết quả định lượng flavonoid toàn phần trong cỏ sữa lá lớn

Lần	Khối lượng (g)	Độ ẩm (%)	Độ hấp thụ				C (µg/ml)	Hàm lượng flavonoid toàn phần
			Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB		
L ₁	5,0522	9,50	0,264	0,263	0,260	0,2623	6,47	0,35
L ₂	5,0298		0,279	0,278	0,279	0,2787	6,87	0,38
L ₃	5,0462		0,281	0,281	0,281	0,2810	6,93	0,38
L ₄	5,0422		0,286	0,286	0,287	0,2863	7,06	0,39
L ₅	5,0279		0,272	0,272	0,272	0,2720	6,71	0,37
L ₆	5,0499		0,284	0,284	0,283	0,2837	7,00	0,38
Thông kê		Hàm lượng flavonoid toàn phần = $0,375 \pm 0,014\%$ RSD = 3,676%						

Từ kết quả bảng 3.5 cho thấy:

- Kết quả định lượng có độ chính xác chấp nhận được với RSD = 3,676 %.
- Hàm lượng flavonoid toàn phần trong phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn tính theo quercitrin là $0,375 \pm 0,014\%$ trong dược liệu khô tuyệt đối.

3.2. Điều chế cao cỏ sữa lá lớn, đánh giá tính an toàn và hiệu quả của chế phẩm trong kiểm soát glucose máu

Chiết xuất được các hàm lượng hợp chất flavonoid và hiệu suất cao nhất, tăng thời gian bảo quản, dùng để chế biến, đa dạng hóa sản phẩm, chủ động nguồn nguyên liệu không theo thời vụ. Nghiên cứu đánh giá tính an toàn và hiệu quả làm cơ sở cho pha chế vào các loại thực phẩm dinh dưỡng để hạn chế phòng và điều trị bệnh ĐTD.

3.2.1. Điều chế cao cỏ sữa lá lớn

3.2.1.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình điều chế cao cỏ sữa lá lớn

Mục tiêu của điều chế cao cỏ sữa lá lớn là chiết xuất được hàm lượng hợp chất flavonoid với hiệu suất cao nhất, tăng thời gian bảo quản, đồng thời dùng để chế biến, đa dạng hóa sản phẩm, chủ động nguồn nguyên liệu không theo thời vụ. Cao CSLL được nghiên cứu đánh giá tính an toàn và hiệu quả làm cơ sở cho pha chế các loại thực phẩm dinh dưỡng để phòng và điều trị bệnh ĐTD.

Để nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ đến quá trình điều chế cao chúng tôi dựa trên nguyên tắc: Khi nghiên cứu ảnh hưởng của một yếu tố nhất định thì các thí nghiệm đều được tiến hành ở cùng các điều kiện công nghệ (trừ các yếu tố đang được khảo sát). Sau khi đã chọn được giá trị thích hợp của các yếu tố đã được nghiên cứu thì giá trị đã lựa chọn được cố định trong các thí nghiệm tiếp theo để khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố còn lại [33].

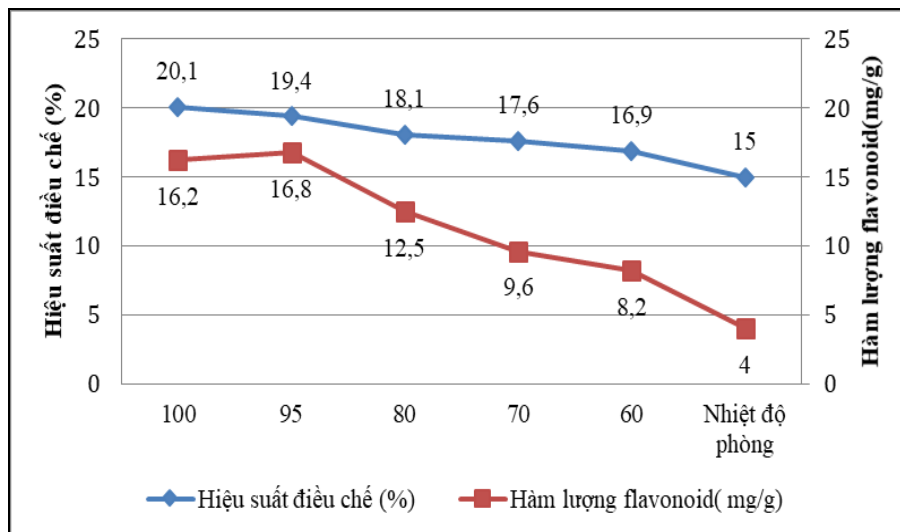
Nước là dung môi có giá thành hạ và thân thiện với môi trường và đặc biệt là an toàn, phù hợp với các sản phẩm dùng cho người như nước uống, thực phẩm bảo vệ sức khỏe ... hơn so với các loại dung môi hữu cơ như EtOH và MeOH. Bên cạnh đó, các kết quả thăm dò cũng cho thấy, hàm lượng flavonoid toàn phần tính theo quercitrin trong cao chiết nước đạt khá cao, lên tới gần 2%. Chính vì các lý do này, chúng tôi chọn nước là dung môi để khảo sát các điều kiện chiết xuất cao cỏ sữa lá lớn.

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết

Nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến quá trình chiết các hoạt chất nói chung

(thể hiện một phần thông qua khối lượng cao toàn phần) cũng như flavonoid nói riêng ra khỏi dược liệu. Khi tăng nhiệt độ thì hệ số khuếch tán cũng tăng do đó chất khuếch tán từ nguyên liệu ra dung môi cũng tăng. Đồng thời, khi tăng nhiệt độ thì độ nhớt dung môi giảm, tạo điều kiện cho quá trình chiết xuất. Tuy nhiên, nhiệt độ tăng cao quá gây phân hủy một số chất kém bền. Do đó cần lựa chọn nhiệt độ phù hợp cho quá trình chiết.

Tiến hành chiết dược liệu CSLL với các điều kiện nhiệt độ thay đổi khác nhau là: nhiệt độ phòng, 60°C, 70°C, 80°C, 95°C và 100°C theo phương pháp ở mục chương 2. Thu nhận các mẫu cao chiết và xác định hàm lượng flavonoid toàn phần và hiệu suất điều chế của cao chiết. Kết quả các thí nghiệm được trình bày trong hình 3.9.



Hình 3.9. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hiệu suất điều chế và hàm lượng flavonoid trong cao chiết cỏ sữa lá lớn

Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy, hiệu suất điều chế cao tăng tỷ lệ thuận với nhiệt độ chiết, điều đó được giải thích là do nhiệt độ tăng sẽ làm tăng khả năng trích ly các thành phần có trong bột dược liệu.

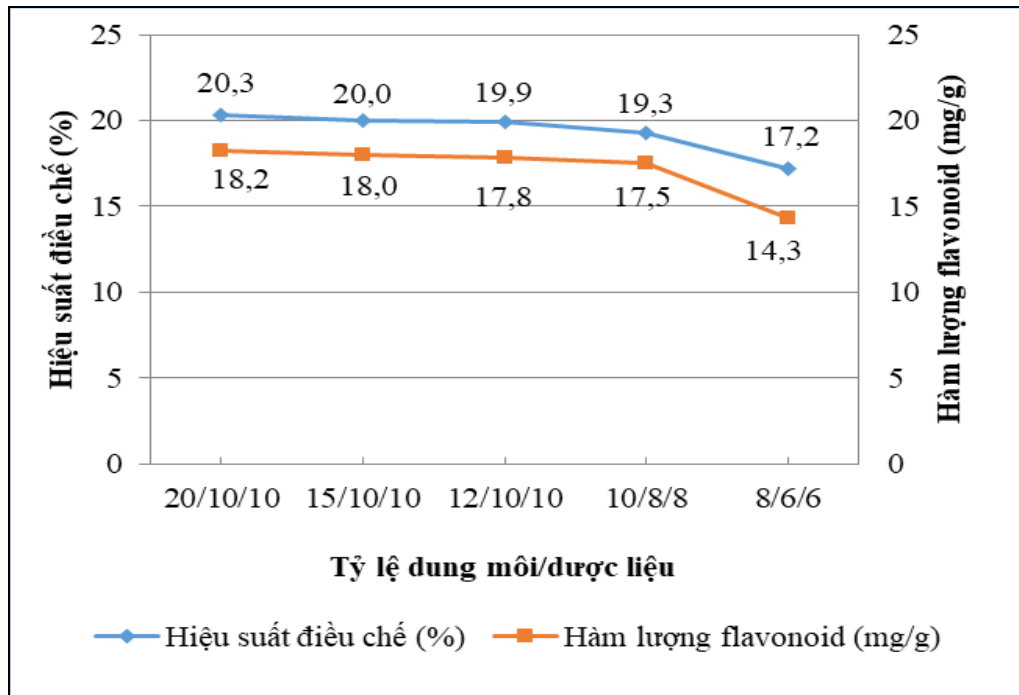
Cũng từ kết quả cho thấy, mẫu được trích ly ở nhiệt độ 95°C có hàm lượng flavonoid cao nhất. Điều đó cho thấy ở nhiệt độ trích ly từ 95°C đến 100°C, lượng flavonoid được chiết ra gần như nhau, nhưng do hiệu suất điều chế ở mẫu 100°C cao nên hàm lượng flavonoid được tính trên tổng khối lượng cao

điều chế được sẽ giảm đi chút ít. Từ các kết quả thu được cho thấy 95°C là nhiệt độ thích hợp nhất, ở nhiệt độ này cho hiệu suất điều chế và hàm lượng flavonoid cao nhất.

Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi và dược liệu

Tỷ lệ dung môi/dược liệu cũng ảnh hưởng lớn đến hiệu suất chiết và hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao chiết. Nếu sử dụng quá ít dung môi sẽ không chiết kiệt được hoạt chất. Tuy nhiên sử dụng quá nhiều dung môi sẽ làm giảm hiệu quả sử dụng thiết bị, gây lãng phí thời gian và năng lượng để loại dung môi và trong trường hợp này có thể ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm do quá trình thu hồi dung môi, sấy kéo dài. Do đó cần lựa chọn tỷ lệ dược liệu /dung môi thích hợp.

Tiến hành các thí nghiệm như đã trình bày ở phần 2.2.2.1, theo đó 10 g dược liệu xay nhỏ, tiến hành các thí nghiệm với tỷ lệ dung môi/dược liệu tương ứng với 3 lần chiết ở nhiệt độ 95°C. Kết quả xác định hiệu suất điều chế cao và hàm lượng flavonoid toàn phần được minh họa ở hình 3.10.

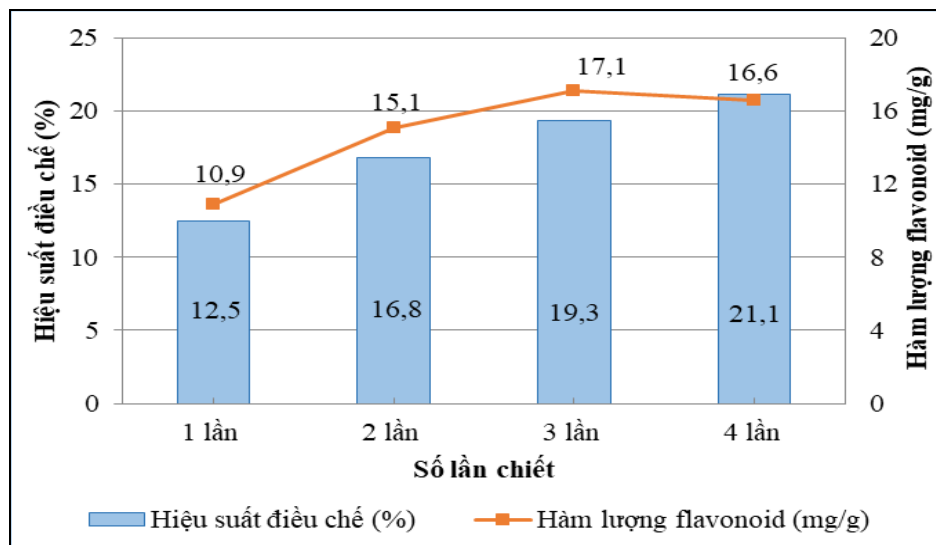


Hình 3.10. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/dược liệu đến hiệu suất điều chế và hàm lượng flavonoid trong cao chiết cỏ sữa lá lớn

Như vậy, lượng dung môi sử dụng cho mỗi lần chiết cũng có ảnh hưởng đến hiệu suất và hàm lượng flavonoid trong cao chiết. Với tỷ lệ dung môi/dược liệu cho 3 lần chiết là 10/8/8 cho hiệu suất và hàm lượng flavonoid gần như cao nhất và tiết kiệm được các chi phí phát sinh cho dung môi, năng lượng và nhân công.

Khảo sát ảnh hưởng của số lần chiết

Với một số nhóm hoạt chất khó chiết xuất từ nguyên liệu do cấu trúc vững chắc của nguyên liệu thì sau 3 lần chiết khó chiết được hầu hết hoạt chất. Trong trường hợp nguyên liệu đắt tiền, cần thiết phải nghiên cứu tối ưu quá trình chiết để thu được hiệu suất chiết cao nhất nhưng vẫn phải đảm bảo hiệu quả kinh tế. Các yếu tố có thể khảo sát thêm là kích thước nguyên liệu và số lần chiết. Cỏ sữa lá lớn có thân và lá khá mềm, do vậy tiến hành các thí nghiệm chiết từ 1-4 lần và so sánh hiệu suất chiết và hàm lượng flavonoid. Kết quả được thể hiện ở hình 3.11.



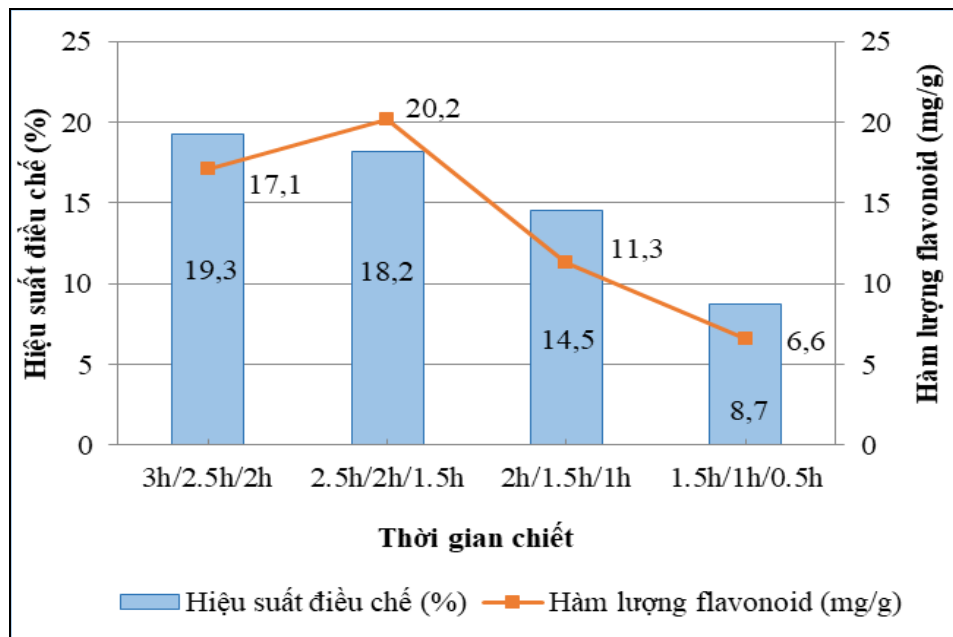
Hình 3.11. Ảnh hưởng của số lần chiết đến hiệu suất điều chế và hàm lượng flavonoid trong cao chiết cỏ sữa lá lớn

Như vậy khi chiết 4 lần hiệu suất chiết tăng rất ít so với chiết 3 lần, hàm lượng flavonoid toàn phần giảm nhẹ do khối lượng cao thu được tăng lên. Lựa chọn chiết 3 lần cho các thí nghiệm.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết

Khi bắt đầu chiết, các chất có phân tử lượng nhỏ sẽ được hòa tan, khuếch tán vào dung môi trước, sau đó mới đến các chất có phân tử lượng lớn (nhựa, keo). Do đó, trong nhiều trường hợp, nếu thời gian chiết suất ngắn sẽ không chiết được hết hoạt chất, còn nếu kéo dài thời gian chiết xuất, tạp chất sẽ khuếch tán vào dịch chiết làm tăng tạp chất trong dịch chiết. Bên cạnh đó, thời gian chiết dài ở nhiệt độ cao cũng có thể làm phân hủy hoạt chất. Vì vậy, cần thiết khảo sát thời gian chiết xuất phù hợp.

Sau khi khảo sát nhiệt độ, tỷ lệ dung môi/dược liệu, phương pháp loại dung môi, số lần chiết, lựa chọn điều kiện chiết như sau: Dược liệu xay nhỏ chiết với dung môi nước, nhiệt độ chiết 95°C, chiết 3 lần với tỷ lệ dung môi/dược liệu = 10/8/8. Tiến hành khảo sát thời gian chiết theo phương pháp nghiên cứu được trình bày ở phần 2.2.2.1, kết quả được trình bày ở hình 3.12.



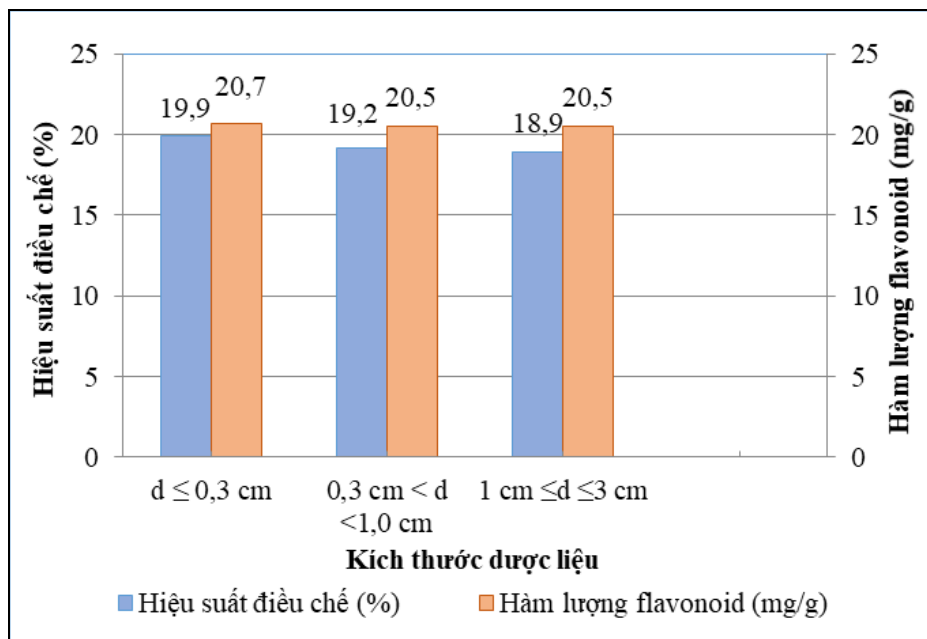
Hình 3.12. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hiệu suất điều chế và hàm lượng flavonoid trong cao chiết cỏ sữa lá lớn

Kết quả trên hình 3.12 cho thấy thời gian chiết càng dài thì hiệu suất điều chế cao càng tăng lên. Tuy nhiên, khi chiết 3 lần với thời gian lần lượt là 3h/2,5h/2h hoặc 2,5h/2h/1,5h thì không có sự khác nhau nhiều về hiệu suất chiết.

Đối với hàm lượng flavonoid, thời gian chiết ngắn quá là 1,5h/1h/0,5h và 2h/1,5h/1h đều cho giá trị thấp nhưng ở thời gian chiết 2,5h/2h/1,5h lại cho kết quả cao hơn rõ rệt ở thời gian chiết dài là 3h/2,5h/2h. Do đó chọn thời gian chiết cho 3 lần là 2,5h/2h/1,5h.

Khảo sát ảnh hưởng của kích thước dược liệu đến quá trình chiết

Kích thước dược liệu cũng có ảnh hưởng nhất định đến hiệu suất và hàm lượng hoạt chất chiết ra được. Dược liệu càng xay nhỏ thì khả năng thẩm thấu dung môi càng tốt, các hoạt chất tiếp xúc với dung môi càng cao do đó tăng khả năng chiết xuất các chất. Tuy nhiên, kích thước dược liệu quá nhỏ lại làm quá trình lọc khó khăn hơn, dịch lọc dễ lẫn nhiều tạp chất, nhiều tạp chất không mong muốn cũng dễ dàng bị chiết ra khỏi nguyên liệu. Tiến hành thí nghiệm với dược liệu ở các kích thước $d \leq 0,3$ cm; $0,3$ cm $< d < 1,0$ cm và $1,0$ cm $\leq d \leq 3,0$ cm với các điều kiện chiết đã được trình bày trong phần 2.2.2.1, thu được kết quả trên hình 3.13.



Hình 3.13. Ảnh hưởng của kích thước dược liệu đến hiệu suất điều chế và hàm lượng flavonoid trong cao chiết cỏ sữa lá lớn

Cỏ sữa lá lớn có thân mảnh và mềm, do đó các kích thước dược liệu $d \leq 0,3$ cm; $0,3$ cm $< d < 1,0$ cm và $1,0$ cm $\leq d \leq 3,0$ cm không ảnh hưởng lớn đến quá

trình chiết ở điều kiện nhiệt độ cao, lượng dung môi đủ lớn và thời gian chiết đủ dài (3 lần chiết tổng cộng 6 giờ). Tuy nhiên, mẫu dược liệu xay nhỏ $d \leq 0,3$ cm khó lọc hơn 2 mẫu còn lại, do vậy để thuận tiện cho các thao tác của quá trình sản xuất, lựa chọn kích thước dược liệu cho quá trình chiết là 1-3 cm.

Quy trình điều chế cao cỏ sữa lá lớn ở quy mô phòng thí nghiệm được trình bày như sau::

Dược liệu cỏ sữa lá lớn phơi khô (độ ẩm <12%), cắt nhỏ 1-3 cm, chiết 3 lần với nước ở 95°C, thể tích dung môi so với khối lượng dược liệu tương ứng lần lượt gấp 10, 8, 8 lần. Chiết trong thời gian tương ứng lần lượt là 2,5h; 2h và 1,5h. Dịch chiết 3 lần chiết được lọc, gộp chung dịch chiết, cô cạn ở điều kiện áp suất giảm (nhiệt độ cô 60°C), sấy trong tủ sấy chân không ở nhiệt độ 50°C đến cao khô (độ ẩm <5%). Hiệu suất quá trình chiết đạt 19-20%, hàm lượng flavonoid trong cao tính theo quercitrin đạt 20-21 mg/g.

3.2.1.2. Xây dựng quy trình điều chế cao cỏ sữa lá lớn ở quy mô 1kg dược liệu/mẻ

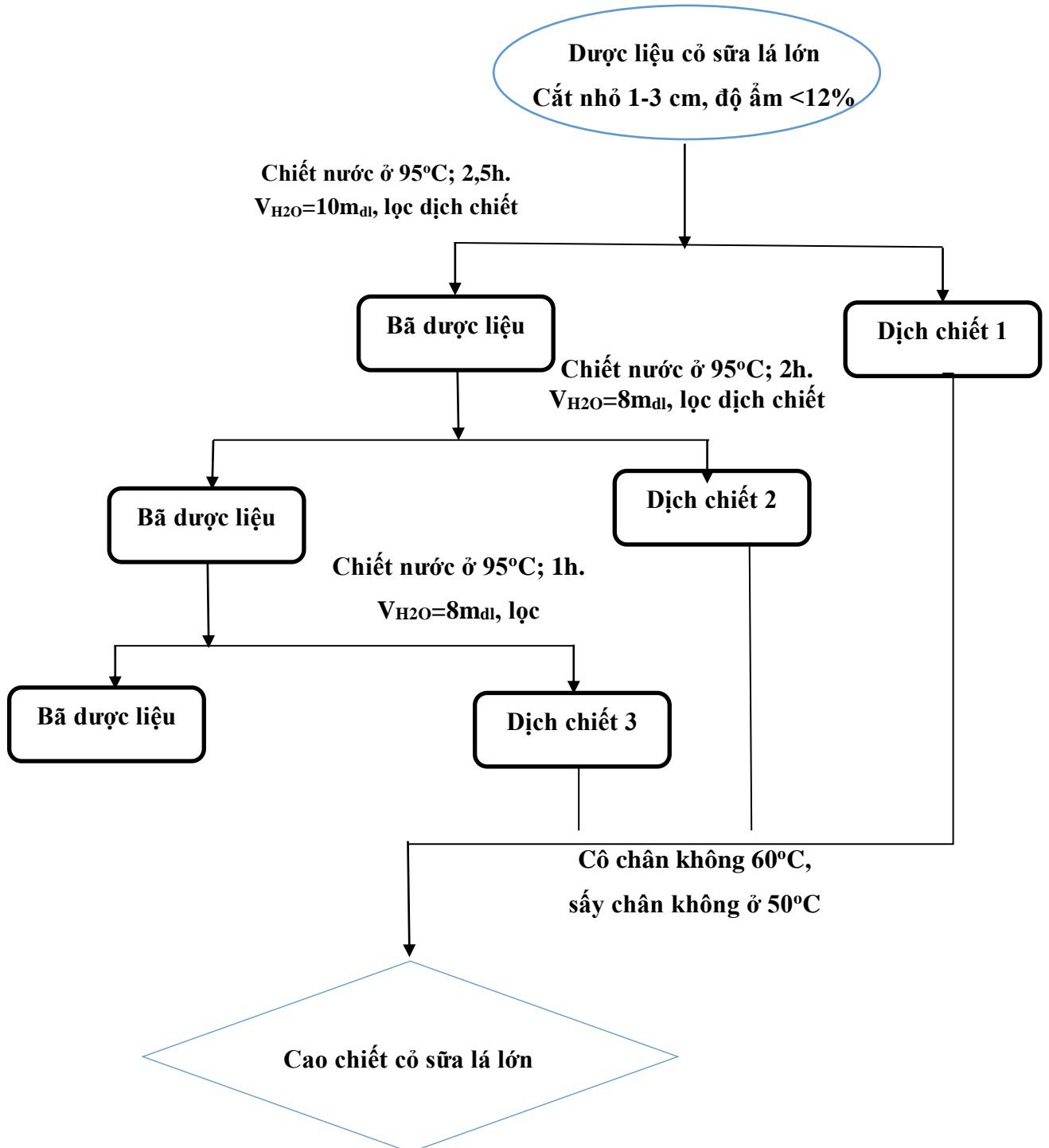
Tiến hành điều chế cao cỏ sữa lá lớn theo quy trình đã xây dựng được ở quy mô phòng thí nghiệm với nguyên liệu đầu vào được nâng lên 1 kg/mẻ. Tiến hành 3 mẻ chiết thu được kết quả trong bảng sau:

Bảng 3.6. Kết quả điều chế cao cỏ sữa lá lớn ở quy mô 1 kg nguyên liệu/mẻ

STT	Hiệu suất chiết (%)	Độ ẩm (%)	Hàm lượng flavonoid toàn phần (mg/g)
Mẻ 1	22,8	3,4	22,9
Mẻ 2	21,2	3,6	21,6
Mẻ 3	21,4	3,4	22,7
TB	21,8	3,47	22,4

Kết quả cho thấy, khi nâng quy mô lên 1 kg nguyên liệu/mẻ, quy trình chiết xuất đã xây dựng được khá ổn định cả về hiệu suất chiết cao cũng như hàm lượng flavonoid toàn phần. Cao chiết được nghiền nhỏ, độ ẩm dưới 5%, được bảo quản trong túi nylon kín. Quy trình này được sử dụng để điều chế cao CSLL

ở quy mô lớn phục vụ nghiên cứu thử nghiệm sản xuất đồ uống dinh dưỡng từ cỏ sữa lá lớn tiếp theo.



Hình 3.14. Quy trình điều chế cao cỏ sữa lá lớn quy mô 1kg/m³

Thuyết minh quy trình chiết cao cỏ sữa lá lớn

Dược liệu CSLL, sau khi được sấy khô (đạt hàm ẩm nhỏ hơn 12%), được cắt nhỏ theo kích thước 1-3 cm và đem chiết với nước (03 lần) ở nhiệt độ 95°C theo tỷ lệ dung môi/dược liệu tương ứng là 10/8/8 (lit/kg); thời gian chiết tương ứng cho mỗi lần là 2,5h/2h/1,5h. Dịch chiết của 3 lần được gộp lại và cô dưới áp suất giảm ở 60°C để thu được cao đặc. Cao đặc được sấy trong tủ sấy chân không ở 50°C cho cao khô CSLL (đạt độ ẩm không quá 5%). Cao khô CSLL thu được với hiệu suất điều chế trung bình là 21,8%, hàm lượng flavonoid tương ứng trung bình là 22,4 mg/g.

3.2.2. Đánh giá tính an toàn của cao cỏ sữa lá lớn

3.2.2.1. Đánh giá độc tính cấp

Đã cho 5 lô chuột uống mẫu thử ở các liều tương ứng là 40,35 g; 30,30 g; 25,84 g; 20,67 g và 16,54 g cao/kg thể trọng chuột. Chuột ở các lô được uống một lần duy nhất với thể tích tối đa 0,8 ml/20 g thể trọng chuột. Tuy nhiên khi chuột uống đến mức liều 32,30 g/kg (mức đặc nhất và thể tích uống là tối đa) mà tỷ lệ chuột chết chưa đạt 100 % nên để tính toán được LD₅₀ cần phải tăng liều cho chuột uống (40,35 g/kg) bằng cách cho chuột uống làm 2 lần cách nhau khoảng 3 giờ.

Chuột sau khi uống mẫu thử được theo dõi thấy rằng, ở lô chuột được uống liều cao 40,35 g, tổng số chuột chết là 10/10, 2 chuột chết sau khi uống lần 2 khoảng 30-60 phút, số còn lại thì có biểu hiện chậm chạp, ít vận động, ăn uống ít, và chết hết trong vòng 24 giờ.

Ở các mức liều thấp hơn (30,30 g; 25,84 g; 20,67 g/kg), sau khi uống một số chuột có biểu hiện hơi chậm chạp, ít vận động hơn, đi ngoài phân ướt hơn bình thường, chuột thường chết trong vòng 4- 24 h sau khi uống. Mổ bụng chuột chết thì thấy dạ dày căng, ruột bình thường, tim, gan, phổi không phát hiện được bất thường. Với những chuột còn sống sót, hoạt động bình thường, ăn uống lúc đầu ít hơn, sau đó thì bình thường.

Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 3.7.

Bảng 3.7. Số liệu thử độc tính cấp của cao chiết nước cỏ sữa.

Lô thí nghiệm	Liều uống (g /kg)	N	Số chuột chết / lô	d	z	d x z
1	16,54	10	0			
2	20,67	10	1	4.13	0.5	2.07
3	25,84	10	5	5.17	3.0	15.51
4	32,30	10	6	6.46	5.5	35.53
5	40,35	10	10	8.05	8.0	64.40
$\Sigma (d \times z)$						117,51

$$LD_{50} = 40,35 - (117,51/10) = 28,6 \text{ (g cao/kg)}$$

Như vậy, đã xác định được liều LD_{100} là 40,35 g/kg và liều LD_0 là 16,54 g/kg. Liều LD_{50} của cao chiết nước cỏ sữa là 28,6 g cao tương đương 147,4 g dược liệu/kg. Nếu liều dùng có tác dụng dược lý trên chuột là 500 mg cao/kg thì liều LD_{50} này gấp khoảng 57 lần.

3.2.2.2. Đánh giá độc tính bán trường diễn

3.2.2.2.1. Tình trạng chung và cân nặng động vật thí nghiệm

Ở các lô uống mẫu thử và lô chứng hoạt động ăn uống, bài tiết của các chuột vẫn bình thường, không có sự khác biệt nào. Không có chuột nào chết. Trọng lượng chuột ở tất cả các lô đều tăng lên so với an đầu, có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê của lần sau so với ban đầu trong cùng một lô. Tuy nhiên, sự tăng lên này giữa lô chứng và lô thử là như nhau, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa cân nặng của các lô thí nghiệm trong cùng thời điểm đánh giá. Điều này cho thấy mẫu thử không có ảnh hưởng đến cân nặng chuột, kết quả được chỉ ra ở bảng 3.8.

Bảng 3.8. Trọng lượng chuột thí nghiệm ở các thời điểm theo dõi.

Lô chuột	Ngày 0	Ngày 15	Ngày 30
Sinh lý	170,8 ± 5,8	209,5 ± 10,9***	242,1 ± 14,3***
Cỏ sữa 0,3 g/kg	177,2 ± 5,5	216,9 ± 7,1***	248,9 ± 9,5***
Cỏ sữa 3,0 g/kg	176,0 ± 5,9	209,3 ± 7,9***	242,4 ± 6,8***

** : $p < 0,01$ so với thời điểm đo trước trong cùng 1 lô.

*** : $p < 0,001$ so với lần đo trước trong cùng 1 lô.

3.2.2.2.2. Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học

Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học được trình bày trong bảng 3.9 cho thấy: sau 15 ngày, 30 ngày uống thuốc, tất cả các xét nghiệm đánh giá như số lượng hồng cầu, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu, nồng độ hemoglobin, giá trị hematocrit ở cả 2 lô cao chiết cỏ sữa lá lớn (liều 0,3 g cao/kg và 3,0 g cao/kg) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng ở cùng thời điểm ($p > 0,05$).

Bảng 3.9. Các chỉ số huyết học của các lô chuột thí nghiệm

Chỉ số	Lô thí nghiệm	Ngày 0	Ngày 15	Ngày 30
Bạch cầu ($10^3/\mu\text{L}$)	Sinh lý	10 \pm 1,1	13,2 \pm 1,1	12,1 \pm 1,9
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	9,9 \pm 1,3	12 \pm 1,0	9,6 \pm 0,8
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	9,5 \pm 0,8	11,4 \pm 1,1	10 \pm 0,9
Hồng cầu ($10^6/\mu\text{L}$)	Sinh lý	9 \pm 0,3	8,7 \pm 0,3	9,9 \pm 0,2
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	9,6 \pm 0,2	10 \pm 0,3	9,8 \pm 0,3
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	9 \pm 0,2	9,7 \pm 0,2	9,8 \pm 0,3
Hemoglobin (g/dL)	Sinh lý	14,3 \pm 0,5	14,5 \pm 0,3	14,9 \pm 0,3
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	15,3 \pm 0,3	14,6 \pm 0,5	14,7 \pm 0,3
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	14,6 \pm 0,3	14,2 \pm 0,4	14,4 \pm 0,5
Hematocrit (%)	Sinh lý	46,5 \pm 1,1	55,2 \pm 1,1	49,3 \pm 4,1
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	52,2 \pm 0,9	54,3 \pm 0,9	52,5 \pm 1,0
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	48,7 \pm 1,1	52,6 \pm 1,2	51,9 \pm 1,5
Tiểu cầu ($10^3/\mu\text{L}$)	Sinh lý	677,8 \pm 28,9	869,8 \pm 28,9	966 \pm 29,2
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	698,3 \pm 89	754,4 \pm 39,6	817,1 \pm 27,6
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	646,4 \pm 67,6	818,6 \pm 50,3	814,5 \pm 76,9
Lympho bào (%)	Sinh lý	88,5 \pm 1,1	84,3 \pm 1,2	79,2 \pm 1,8
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	82,2 \pm 3,1	80,7 \pm 1,6	80,7 \pm 0,6
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	83,4 \pm 2,3	80,7 \pm 2,4	78,4 \pm 1,7
Lympho bào ($10^3/\mu\text{L}$)	Sinh lý	8,9 \pm 0,8	11,8 \pm 1	9,7 \pm 1,7
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	7,9 \pm 0,7	9,7 \pm 0,8	7,7 \pm 0,7
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	7,7 \pm 0,6	9,2 \pm 1	7,5 \pm 0,6

Kết quả theo dõi các chỉ số thuộc chức năng gan và thận

Kết quả từ bảng 3.10 cho thấy: sau 15 ngày, 30 ngày uống mẫu thử, tất cả các xét nghiệm đánh giá chức năng gan: nồng độ bilirubin, nồng độ protein, hoạt độ enzym AST và ALT huyết thanh và chức năng thận: nồng độ ure và nồng độ creatinin huyết thanh ở cả 2 lô cỏ sữa (liều 0,3 g cao/kg và 3,0 g cao/kg) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng ở cùng thời ($p > 0,05$).

Bảng 3.10. Các chỉ số sinh hóa của các lô chuột thí nghiệm

Chỉ số	Lô thí nghiệm	Ngày 0	Ngày 15	Ngày 30
ALT (U/L)	Sinh lý	75,8±5	89,9±4,3	51,5±3,5
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	71,2±4,9	87±3,4	57,4±2,4
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	65,9±4,6	81,6±4,8	60,7±4
AST (U/L)	Sinh lý	193,7±17,8	170±19,7	179,1±14,1
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	170,5±14,1	188,4±4,2	188,1±11,3
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	168,3±12,3	161±10,9	179,9±14,5
Creatinin ($\mu\text{mol/L}$)	Sinh lý	96,8±3,7	98,2±3,4	84±3,1
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	92,9±2,2	96,4±2,9	81,2±2,2
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	89±5,5	84,8±5,5	86,4±2,5
Protein tp (g/dL)	Sinh lý	70,5±1,5	72±3,3	76,9±3,2
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	67±2,2	3,9±0,7	71,4±0,9
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	69,1±1,5	4,2±0,3	76,9±1,6
Ure (mg/dL)	Sinh lý	8,7±0,7	4,2±0,3	3,5±0,3
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	6,9±0,6	4,5±0,3	2,8±0,4
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	7,0±0,6	3,1±0,6	3,2±0,4
Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	Sinh lý	4,3±0,5	2,8±0,3	3,1±0,4
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	4,9±0,6	3,6±2,2	3,6±0,5
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	5,2±0,5	3,9±0,2	4,1±0,5
Glucose (mmol/L)	Sinh lý	4,1±0,5	4,1±0,3	5,5±0,5
	Cỏ sữa 0,3 g/kg	4,6±0,5	4,1±0,3	5,1±0,3
	Cỏ sữa 3,0 g/kg	4,0±0,3	3,9±0,2	4,5±0,3

3.2.2.2.3. Kết quả xét nghiệm mô học

Về đại thể các cơ quan: tất cả các chuột ở cả 3 lô không thấy có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan gan, thận, lách, tim. Tỷ lệ khối lượng của các cơ quan so với khối lượng cơ thể được trình bày ở bảng 3.11

Bảng 3.11. Tỷ lệ khối lượng các cơ quan so với khối lượng cơ thể chuột thí nghiệm (%)

Lô thí nghiệm	Gan	Thận	Lách	Tim
Sinh lý	2,94±0,13	0,29±0,02	0,24±0,01	0,34±0,03
Cỏ sữa 0,3 g/kg	2,77±0,11	0,29±0,03	0,26±0,02	0,30±0,01
Cỏ sữa 3,0 g/kg	2,88±0,11	0,31±0,03	0,26±0,02	0,32±0,01

Số liệu ở bảng 3.11 đã cho thấy, tỷ lệ khối lượng các cơ quan tim, gan, thận, lách so với khối lượng cơ thể của động vật ở lô thử và lô chứng không khác biệt ($p>0,05$).

Về vi thể:

Hình ảnh vi thể gan cho thấy, sau 30 ngày uống thuốc, lô uống cao chiết cỏ sữa liều 0,3 g/kg và 3,0 g/kg có các tế bào gan đều bình thường, có kích thước đều, tĩnh mạch trung tâm và xoang mạch không xung huyết, không có thoái hóa, hoại tử, khoảng cửa không viêm. Kết quả xét nghiệm vi thể thận cũng cho thấy, các lô thử thí nghiệm đều có cầu thận kích thước đều, mô kẽ không viêm, ống thận không có tổn thương, không xung huyết. Không có sự khác biệt về cấu trúc vi thể gan, thận giữa lô dùng thuốc với lô chứng.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết cỏ sữa với liều 0,3 g/kg và 3,0 g/kg dùng theo đường uống liên tục trong 30 ngày trên chuột cống trắng không ảnh hưởng đến các chỉ số huyết học như số lượng bạch cầu, hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, số lượng tiểu cầu, lympho bào; không ảnh hưởng đến các thông số hóa sinh máu như hoạt độ AST, ALT, creatinin, protein toàn phần, urê, bilirubin, glucose và cấu trúc đại thể, vi thể cũng như tỷ khối gan, thận, lách, tim so với khối lượng cơ thể chuột, chức năng tạo máu, chức năng gan, thận, đại thể cơ quan và mô bệnh học.

3.2.3. Đánh giá hiệu quả của cao cỏ sữa lá lớn trong kiểm soát glucose máu

3.2.3.1. Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase

Hoạt tính ức chế enzyme α -amylase

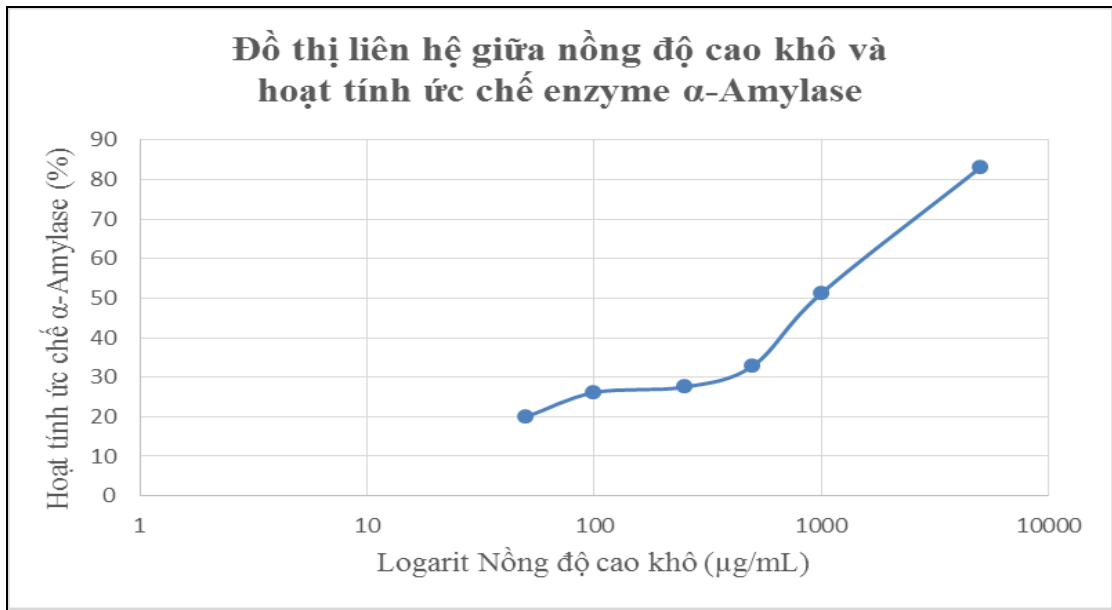
Tiến hành đánh giá thử hoạt tính của mẫu cao CSLL ở các độ pha loãng khác nhau, kết quả thu được chỉ ra ở bảng 3.12.

Bảng 3.12. Hoạt tính ức chế enzyme α -amylase của mẫu cao cỏ sữa lá lớn ở các độ pha loãng khác nhau

C, ($\mu\text{g/mL}$)	C-Fla, ($\mu\text{g/mL}$)	Abs, (Control)	Abs, (Test)	TB	Abs, (Blank)	TB	%, Inh
5000	91,00	1,214	0,836	0,837	0,633	0,631	83,00
			0,842		0,630		
			0,833		0,629		
1000	18,20	1,214	0,744	0,747	0,152	0,155	51,21
			0,747		0,160		
			0,750		0,152		
500	9,10	1,214	0,938	0,943	0,131	0,129	32,89
			0,944		0,120		
			0,948		0,135		
250	4,55	1,214	0,984	0,982	0,103	0,102	27,51
			0,985		0,097		
			0,978		0,107		
100	1,82	1,214	0,984	0,990	0,094	0,093	26,11
			0,997		0,089		
			0,990		0,097		
50	0,91	1,214	1,066	1,066	0,093	0,094	19,93
			1,045		0,089		
			1,086		0,099		

Chú thích:

- C ($\mu\text{g/mL}$): Nồng độ cao Cỏ sữa lá lớn
 C-Fla ($\mu\text{g/mL}$): Nồng độ Flavonoid tương ứng trong cao
 Abs (Control): Độ hấp thụ quang của ống kiểm soát
 Abs (Test): Độ hấp thụ quang của ống thử
 Abs (Blank): Độ hấp thụ quang của ống trắng
 Inh (%): Hoạt tính ức chế enzyme α -Amylase



Hình 3.15. Biểu đồ hoạt tính ức chế enzyme α -amylase của mẫu cao cỏ sữa lá lớn ở các độ pha loãng khác nhau

Các nồng độ khác nhau của dịch chiết cao cỏ sữa lá lớn được thêm vào phản ứng giữa enzyme và cơ chất Blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7). Đối với mẫu thử không pha loãng, hoạt tính ức chế đạt 83.0%, trong khi đó khi pha loãng mẫu thử 200 lần, hoạt tính ức chế chỉ còn 19.9%. Kết quả thực nghiệm cho thấy, khi nồng độ dịch chiết cao càng lớn, lượng PNP tự do tạo thành càng nhỏ, điều này cho thấy khả năng ức chế enzyme α -Amylase càng cao.

Giá trị IC_{50} được xác định:

$y = ax + b$	Hàm lượng cao	Hàm lượng Flavonoid toàn phần (mg/g)
a =	0,037	2,013
b =	14,580	14,580
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	967,016	17,600

Dựa trên đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa nồng độ mẫu thử và hoạt tính ức chế enzyme α -amylase, giá trị IC_{50} được xác định là 967 $\mu\text{g/mL}$.

Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

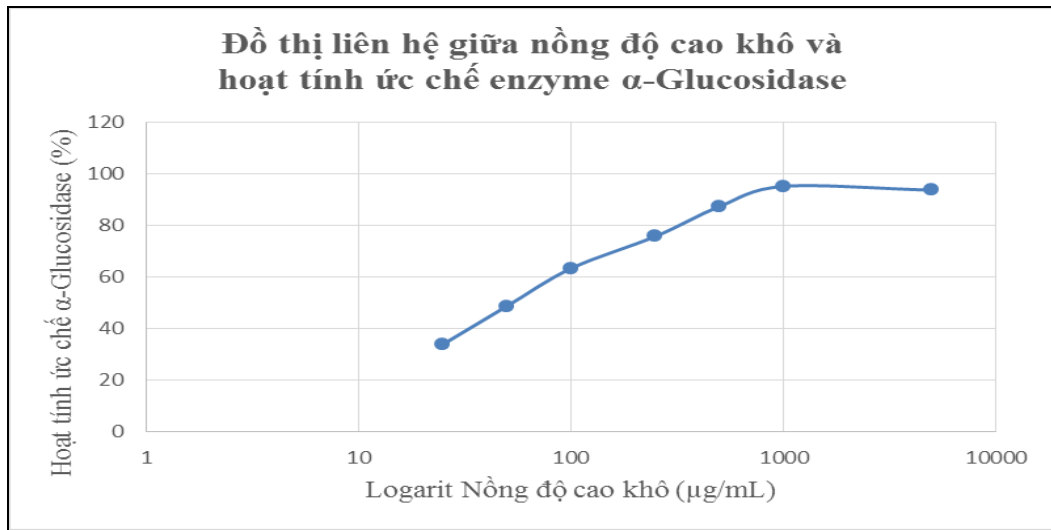
Tiến hành đánh giá thử hoạt tính của mẫu cao CSLL ở các độ pha loãng khác nhau. Kết quả thu được như sau:

Bảng 3.13. Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của mẫu cao cỏ sữa lá lớn ở các độ pha loãng khác nhau

C ($\mu\text{g/mL}$)	C-Fla ($\mu\text{g/mL}$)	Abs (Control)	Abs (Test)	TB	Abs (Blank)	TB	% Inh
5000	91,00	1,803	2,061	2,026	1,924	1,913	93,77
			2,004		1,905		
			2,012		1,911		
1000	18,20	1,803	0,494	0,493	0,407	0,408	95,25
			0,501		0,406		
			0,485		0,410		
500	9,10	1,803	0,443	0,439	0,212	0,213	87,47
			0,452		0,210		
			0,422		0,217		
250	4,55	1,803	0,528	0,522	0,085	0,087	75,89
			0,517		0,087		
			0,520		0,089		
100	1,82	1,803	0,730	0,722	0,058	0,063	63,43
			0,714		0,063		
			0,722		0,067		
50	0,91	1,803	0,973	0,962	0,038	0,040	48,84
			0,955		0,039		
			0,958		0,042		
25	0,46	1,803	1,206	1,211	0,023	0,021	34,04
			1,194		0,022		
			1,232		0,019		

Chú thích:

- C ($\mu\text{g/mL}$): Nồng độ cao Cỏ sữa lá lớn
 C-Fla ($\mu\text{g/mL}$): Nồng độ Flavonoid tương ứng trong cao
 Abs (Control): Độ hấp thụ quang của ống kiểm soát
 Abs (Test): Độ hấp thụ quang của ống thử
 Abs (Blank): Độ hấp thụ quang của ống trắng
 Inh (%): Hoạt tính ức chế enzyme α -Glucosidase



Hình 3.16. Biểu đồ hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của mẫu cao cỏ sữa lá lớn ở các độ pha loãng khác nhau

Các nồng độ khác nhau của dịch chiết cao Cỏ sữa lá lớn được thêm vào phản ứng giữa enzyme và cơ chất PNPG. Đối với mẫu thử không pha loãng, hoạt tính ức chế đạt 93.8%, trong khi đó khi pha loãng mẫu thử 200 lần, hoạt tính ức chế chỉ còn 34.0%. Kết quả thực nghiệm cho thấy, khi nồng độ dịch chiết cao càng lớn, lượng PNP tự do tạo thành càng nhỏ, điều này cho thấy khả năng ức chế enzyme α -Glucosidase càng mạnh.

Giá trị IC_{50} được xác định:

$y = ax + b$	Hàm lượng cao	Hàm lượng Flavonoid toàn phần (mg/g)
=	0,292	16,029
b =	34,258	34,258
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	53,961	0,982

Dựa trên đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa nồng độ mẫu thử và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase, giá trị IC_{50} được xác định là 53,96 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.3.2. Hiệu quả kiểm soát glucose máu trên mô hình động vật thực nghiệm

Theo một số công trình nghiên cứu trên thế giới, liều dùng của cao chiết CSLL dao động trong khoảng 100-800 mg cao/kg thể trọng chuột nhắt trắng [149]. Do vậy, chúng tôi quyết định dùng liều 250 mg/kg và liều 500 mg/kg thể trọng chuột nhắt trắng làm liều thử tác dụng hạ glucose máu trên mô hình động vật thực nghiệm. Kết quả được trình bày ở bảng 3.14.

Bảng 3.14. Sự thay đổi nồng độ glucose máu và HbA1c sau 8 tuần điều trị cao chiết cỏ sữa lá lớn

Chỉ tiêu Nhóm chuột	n (con)	Glucose máu (mmol/L)		HbA1c (%)	
		Ban đầu	Sau 8 tuần	Ban đầu	Sau 8 tuần
Chứng sinh lý	10	6,0 ± 0,8	6,1 ± 1,9	4,2 ± 0,6	4,3 ± 0,5
Chứng bệnh lý	10	10,9 ± 1,1	14,3 ± 1,5*	4,8 ± 0,9	5,3 ± 0,8
CSLL (250 mg/kg)	10	11,3 ± 1,2	14,1 ± 2,5	4,9 ± 0,8	5,2 ± 0,5
CSLL (500 mg/kg)	10	11,2 ± 1,1	10,2 ± 1,3^{*,a}	4,8 ± 0,6	4,7 ± 0,6

*: $p < 0,005$ so với nhóm chứng bệnh lý

^a: $p < 0,01$ so với nhóm sinh lý

Kết quả ở bảng 3.14. cho thấy: nồng độ glucose máu ở nhóm chứng bệnh lý cao hơn rõ rệt so với nhóm chứng sinh lý ($p < 0,05$) chứng tỏ mô hình gây tăng glucose máu trên chuột nhắt trắng đã thành công. Sau khi điều trị 8 tuần liên tục bằng cao chiết CSLL với liều 500 mg/kg thể trọng, nồng độ glucose máu ở nhóm chuột đái tháo đường can thiệp đã giảm thấp hơn đáng kể so với nhóm chứng bệnh lý với $p < 0,05$, $10,2 \pm 1,3$ mmol/L so với $14,3 \pm 1,5$ mmol/L. Mặc dù giá trị HbA1c ở nhóm chuột được điều trị cao chiết CSLL với liều 500 mg/kg thể trọng trong 8 tuần liên tục có xu hướng giảm hơn so với nhóm chứng bệnh lý, tuy nhiên mức độ giảm này chưa đạt ý nghĩa thống kê. Như vậy, cao chiết CSLL với liều 500 mg/kg thể trọng chuột nhắt trắng có tác dụng điều trị đái tháo đường trên mô hình động vật thực nghiệm thông qua tiêu chí làm giảm nồng độ glucose máu.

3.3. Ứng dụng cao cỏ sữa lá lớn để thử nghiệm sản xuất đồ uống dinh dưỡng dùng trong kiểm soát glucose máu

Cao cỏ sữa lá lớn thu được có thể ứng dụng để thử nghiệm sản xuất các sản phẩm thực phẩm dinh dưỡng. Trong khuôn khổ luận án, chúng tôi thực hiện tạo ra một sản phẩm đồ uống pha chế bổ dưỡng có bổ sung cao cỏ sữa lá lớn để sử dụng cho nhiều đối tượng khác nhau, trong đó có người bị bệnh ĐTD.

3.3.1. Nghiên cứu lựa chọn công thức sản phẩm

Nghiên cứu đã thử nghiệm 5 công thức phối chế khác nhau, kết quả phân tích hàm lượng flavonoid và đường được thể hiện ở bảng 3.15 và kết quả đánh giá cảm quan được trình bày ở bảng 3.16.

Kết quả bảng 3.15 cho thấy hàm lượng flavonoid toàn phần của các mẫu phối chế gần như tương đồng, dao động trong khoảng từ 501,2 mg/l (mẫu CT1) đến 512 mg/l (mẫu CT5). Hàm lượng đường tổng số và đường khử của mẫu CT1 (chỉ có cao CSLL) rất thấp (0,2 g/l) do không phối trộn với mật ong và các nguyên liệu khác, trong khi đó mẫu CT2 và CT3 có hàm lượng cao nhất do sử dụng mật ong có hàm lượng 30 g/l. Mẫu CT4 và CT5 có hàm lượng đường tổng và đường khử thấp hơn một chút so với 2 mẫu CT 2 và CT3 (do chỉ sử dụng mật ong với tỷ lệ 25 g/l) nhưng chính vì vậy lại tạo ra vị được đánh giá là vừa phải và hài hòa hơn các mẫu khác (bảng 3.16).

Bảng 3.15. Một số chỉ tiêu hóa lý của các công thức phối chế đồ uống dinh dưỡng cao cỏ sữa lá lớn

Công thức	Nguyên liệu	Hàm lượng Flavonoid toàn phần (mg/l)	Hàm lượng đường khử (g/l)	Hàm lượng đường tổng số (g/l)
CT1	Cao CSLL 25 g/l	501,2	0,2	0,2
CT2	Cao CSLL 25 g/l, mật ong 30 g/l; chất tạo ngọt 0,3 g/l	511,5	19,0	21,2
CT3	Cao CSLL 25 g/l, mật ong 30 g/l; chất tạo ngọt 0,3 g/l, quế 5 g/l	510,4	19,2	21,3
CT4	Cao CSLL 25 g/l, mật ong 25 g/l; chất tạo ngọt 0,3 g/l; gừng 10 g/l	508,9	15,95	17,70
CT5	Cao CSLL 25 g/l, mật ong 25 g/l; chất tạo ngọt 0,3 g/l; cao sâm 3g/l.	512,0	15,75	17,50

Bảng 3.16. Kết quả đánh giá chất lượng cảm quan của các công thức phối chế đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa lá lớn (thang điểm 10)

Thành viên	CT1	CT2	CT3	CT4	CT5
1	3	6	7	9	7
2	4	7	8	9	8
3	5	6	6	8	7
4	4	7	7	10	8
5	4	6	7	8	8
6	3	5	8	8	8
7	5	7	8	10	8
Điểm trung bình	4,00	6,28	7,29	8,86	7,71
Nhận xét	Vị chát, xít, mùi khó chịu, rất khó uống	Vị ngọt hơi chát, mùi dễ chịu, khó uống	Vị ngọt, mùi quá nhiều, dễ uống	Vị hơi ngọt, chát hài hòa, mùi dễ chịu, dễ uống	Vị hơi ngọt, chát hài hòa, mùi sâm rõ, dễ uống

Kết quả bảng 3.16 cũng cho thấy mẫu CT1 sử dụng 100% cao cỏ sữa lá lớn có điểm cảm quan rất thấp (4 điểm) do có vị chát xít, mùi khó chịu, rất khó uống, trong khi đó mẫu CT4 có điểm cảm quan cao nhất (8,86 điểm) do có vị ngọt, chát hài hòa, mùi dễ chịu, dễ uống. Công thức CT2, CT3 và CT5 có điểm cảm quan thấp hơn CT4 có thể là do mùi quá, mùi cao sâm không thích hợp khi kết hợp với mùi cao cỏ sữa lá lớn. Như vậy công thức số 4 (CT4) được lựa chọn để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3.2. Nghiên cứu bao bì sản phẩm và điều kiện thanh trùng sản phẩm

3.3.2.1. Nghiên cứu lựa chọn bao bì sản phẩm

Sản phẩm sau khi pha được đóng trong lon nhôm và chai thủy tinh. Sau khi thanh trùng được theo dõi ở điều kiện nhiệt độ phòng để đánh giá mức độ ổn định chất lượng sản phẩm sau 6 tháng. Kết quả được trình bày ở bảng 3.17.

**Bảng 3.17. Chất lượng sản phẩm sau 6 tháng bảo quản
với các bao bì khác nhau**

Các chỉ tiêu	Các dạng bao bì	
	Lon nhôm	Chai thủy tinh trắng
Đường tổng số (g/l)	17,65	17,01
Độ đục (NTU)	23,2	23,8
Flavonoid toàn phần (mg/l)	506,7	480,4
Tổng số vi sinh vật hiếu khí (CFU/ml)	0	0
Tổng số bào tử nấm men, mốc (CFU/ml)	0	0
Cảm quan (điểm trung bình)	8,68	8,31

Từ kết quả thu được ở Bảng 3.17 có thể nhận thấy mẫu đồ uống cỏ sữa lá lớn được đóng trong lon nhôm có hàm lượng flavonoid cao hơn ở mẫu chai thủy tinh, là 506,7 mg/l so với 480,4 mg/l. Điều này có thể được giải thích là ở chai thủy tinh sáng màu, flavonoid bị giảm đi do quá trình oxy hoá bởi tác động của ánh sáng. Hàm lượng đường trong mẫu lon nhôm cũng cao hơn một chút so với chai thủy tinh do ở chai thủy tinh có phản ứng caramen hóa của đường ở điều kiện bảo quản nhiệt độ phòng và không có sự sai khác về mặt thống kê ở mức $\alpha=0,05\%$. Về mặt vi sinh, sản phẩm đóng trong lon nhôm hay trong chai thủy tinh đều đạt yêu cầu với kết quả tổng số vi sinh vật hiếu khí và tổng số bào tử nấm men, nấm mốc đều không phát hiện.

Kết quả ở bảng 3.17 cũng cho thấy khi đánh giá cảm quan thì chất lượng của sản phẩm trong lon nhôm đạt 8,68 điểm, cao hơn so với sản phẩm đóng trong chai thủy tinh. Do vậy, xét về tổng thể thì sử dụng lon nhôm để đóng đồ uống CSSL là thích hợp hơn so với dùng chai thủy tinh sáng màu. Hơn nữa, sử dụng lon nhôm có một số lợi thế là nhẹ hơn, tiện dụng hơn đối với người tiêu dùng và chiếm ít diện tích bảo quản hơn đối với nhà sản xuất, phân phối (do có thể xếp chồng lên nhau).

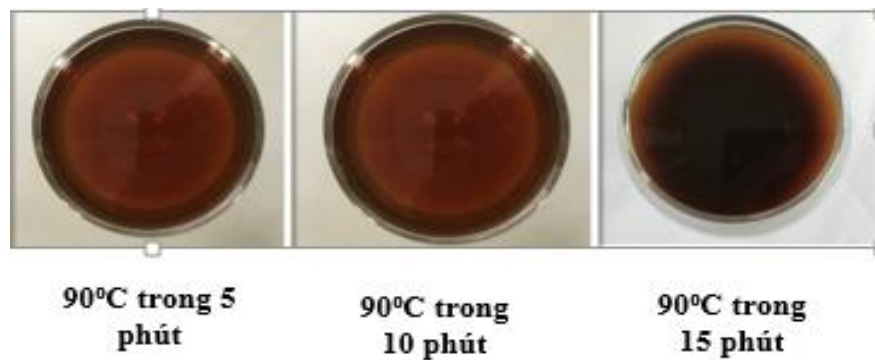
3.3.2.2. Nghiên cứu chế độ thanh trùng đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa lá lớn

Nhiệt độ và thời gian thanh trùng có tác động trực tiếp đến chất lượng sản phẩm. Tăng thời gian thanh trùng đồng nghĩa với việc tăng thời gian tác động nhiệt lên hàm lượng flavonoid và hàm lượng đường, dẫn đến màu sản phẩm thay

đổi và hàm lượng flavonoid của sản phẩm giảm [128]. Do vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu thanh trùng sản phẩm ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau. Đồ uống CSLL được đóng lon nhôm 200ml với điều kiện nâng nhiệt và làm nguội không quá 15 phút, thời gian giữ nhiệt ở 90°C trong 5; 10 và 15 phút. Kết quả thu được trình bày ở bảng 3.18.

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của điều kiện thanh trùng đến chất lượng đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa lá lớn

Thông số	Thanh trùng nhiệt 90°C (thời gian giữ nhiệt phút)		
	5	10	15
Độ đường (g/l)	17,71	17,70	17,50
Độ đục (NTU)	22,0	22,2	22,1
Flavonoid toàn phần (mg/l)	513,2	508,0	502,5
Tổng số vi khuẩn hiếu khí (CFU/ml)	10	0	0
Tổng số bào tử nấm men, mốc (CFU/ml)	10	0	0
Cảm quan (điểm)	8,75	8,80	7,50



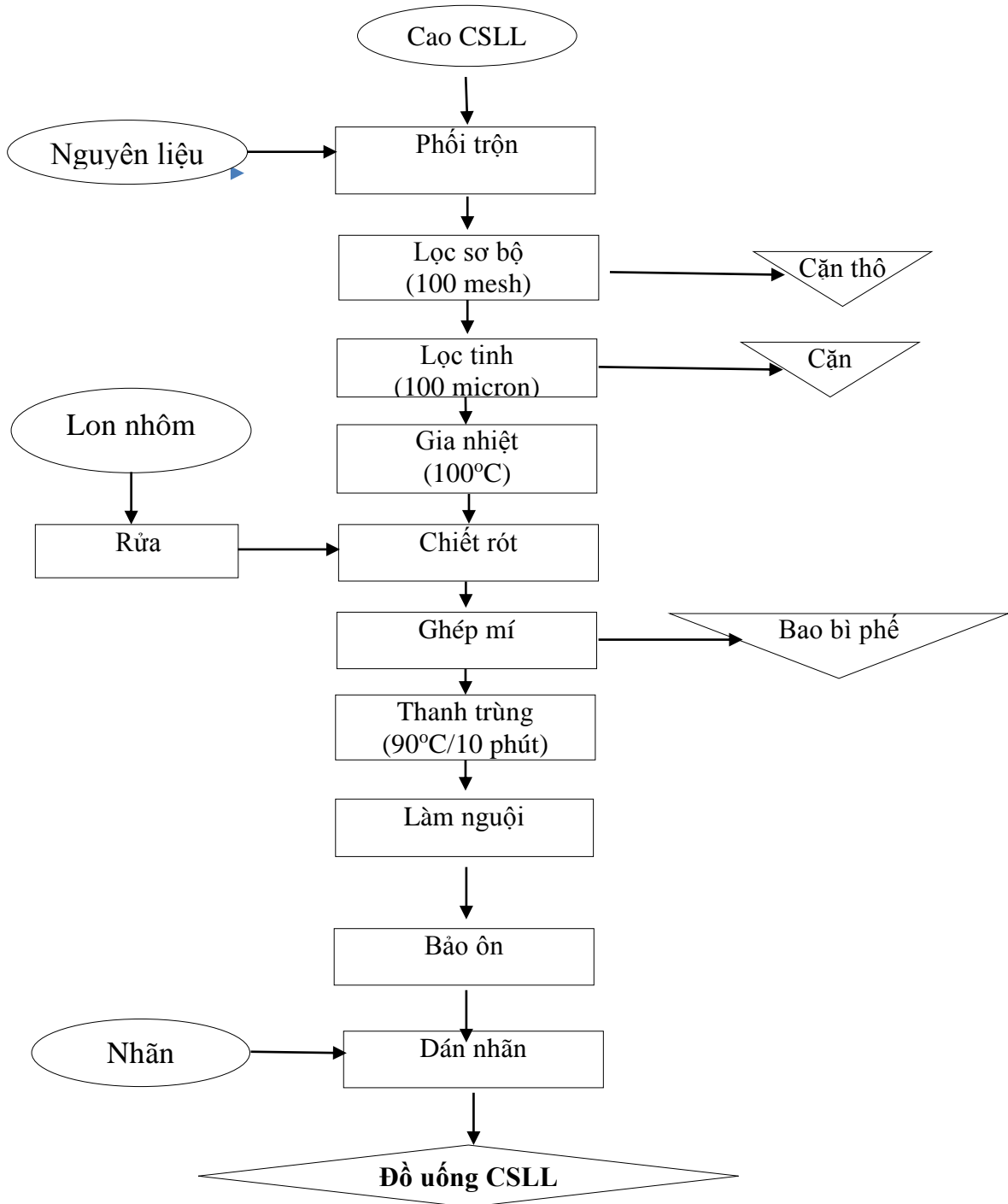
Hình 3.17. Ảnh hưởng của điều kiện thanh trùng đến màu sắc của sản phẩm

Kết quả ở bảng 3.18 cho thấy ở cả 2 chế độ thanh trùng đều không có sự sai khác về sự biến đổi các thành phần hóa học và vật lý của sản phẩm. Mẫu được thanh trùng ở 90°C trong 10 phút cho sản phẩm có giá trị cảm quan tương đồng với mẫu 5 phút, do ở điều kiện này màu sắc của sản phẩm đẹp, không bị nâu quá (Hình 3.17) và mùi thơm đặc trưng, không bị nồng như ở điều kiện thanh trùng 15 phút. Tuy nhiên, mẫu được thanh trùng với thời gian 5 phút vẫn còn tồn tại 1 lượng nấm men và nấm mốc, điều này sẽ ảnh hưởng đến chất lượng

sản phẩm trong quá trình bảo quản và không đảm bảo chỉ tiêu về an toàn thực phẩm theo QCVN 8-3:2012/BYT về ô nhiễm vi sinh vật trong thực phẩm.

3.3.3. Xây dựng quy trình sản xuất đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa lá lớn

Từ những thông số công nghệ đã xác định, quy trình sản xuất đồ uống dinh dưỡng CSLL đã được xây dựng và trình bày trong hình 3.



Hình 3.18. Quy trình sản xuất đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa lá lớn

Thuyết minh quy trình:

Nguyên liệu: Cao CSLL được điều chế từ cỏ sữa lá lớn, có hàm lượng flavonoid = 22,4mg/g cùng các nguyên liệu khác: mật ong; chất tạo ngọt stevia; gừng và nước.

Phối trộn: Nguyên liệu được định lượng để phối trộn theo công thức Cao CSLL sữa 25 g/l, mật ong 25 g/l; chất tạo ngọt 0,3 g/l; gừng 10 g/l và nước vừa đủ, đảo trộn trong thời gian 10 phút. Tại đây tiến hành kiểm tra độ Brix, màu sắc, cảm quan sản phẩm.

Lọc (sơ bộ, tinh): Dịch được chạy qua lọc 100 mesh để loại bỏ cặn thô, sau đó được chạy qua lọc 100 micron để loại bỏ cặn, ổn định chất lượng trong thời gian lưu thông trên thị trường

Chiết rót: Lon nhôm được rửa sạch, sau đó được tiến hành chiết dịch.

Ghép mí: Lon sau chiết được bổ sung nitơ, sau đó tiến hành ghép mí

Thanh trùng: Các lon nhôm chứa sản phẩm được đưa vào thiết bị thanh trùng và tiến hành gia nhiệt đến nhiệt độ 90°C và giữ trong 10 phút, sau đó được làm nguội đến nhiệt độ thường trong thời gian 15 phút..

Dán nhãn: Lon được dán nhãn sản phẩm thử nghiệm sản xuất.

Bảo quản: Đóng thùng 24 lon/thùng. Thùng được chuyển qua thiết bị cân để kiểm tra số lon trong thùng, được xếp lên pallet và nhập kho bảo quản.

3.3.4. Đánh giá chất lượng, an toàn thực phẩm

Sản phẩm đồ uống dinh dưỡng CSLL trong nghiên cứu sản xuất thử nghiệm được kiểm nghiệm các chỉ tiêu chất lượng và các chỉ tiêu an toàn tại các phòng thử nghiệm đạt Tiêu chuẩn quốc gia *TCVN ISO/IEC 17025* của Viện Dinh dưỡng Quốc gia và Công ty TNHH Eurofins Sắc ký Hải Đăng. Kết quả kiểm nghiệm được trình bày ở bảng 3.19.

**Bảng 3.19. Chỉ tiêu hóa lý và an toàn thực phẩm của
đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa lá lớn**

STT	Chỉ tiêu	Đơn vị	Hàm lượng
I	Hóa lý		
1	Hàm lượng đường tổng số	(g/lit)	2,34
2	Độ chua	g/100ml	0.005
3	Flavonoid toàn phần	mg/100ml	80,3
4	Hàm lượng cacbon dioxit (CO ₂)	g/l	Không phát hiện (LOD=0.1)
II	Kim loại nặng		
1	Chì (Pb)	mg/l	Không phát hiện (LOD=0.02)
2	Thiếc (Sn)	mg/l	Không phát hiện (LOD=0.02)
III	Độc tố vi nấm		
1	Patulin	µg/l	Không phát hiện (LOD=10)
IV	Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật		
1	Piperonyl butoxid	mg/l	Không phát hiện (LOD=0.003)
2	2-Phenylphenol	mg/l	Không phát hiện (LOD=0.003)
3	Propargit	mg/l	Không phát hiện (LOD=0.003)
4	Diphenylamin	mg/l	Không phát hiện (LOD=0.003)
5	Malathion	mg/l	Không phát hiện (LOD=0.003)
V	Vi sinh vật		
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/ml	Không phát hiện
2	Coliforms	CFU/ml	Không phát hiện
3	<i>E. coli</i>	CFU/ml	Không phát hiện
4	<i>Streptococci faecal</i>	CFU/ml	Không phát hiện
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CFU/ml	Không phát hiện
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	CFU/ml	Không phát hiện
7	<i>Clostridium perfringens</i>	CFU/ml	Không phát hiện
8	Tổng số nấm men và nấm mốc	CFU/ml	Không phát hiện
9	<i>Salmonella spp</i>	CFU/25 ml	Không phát hiện

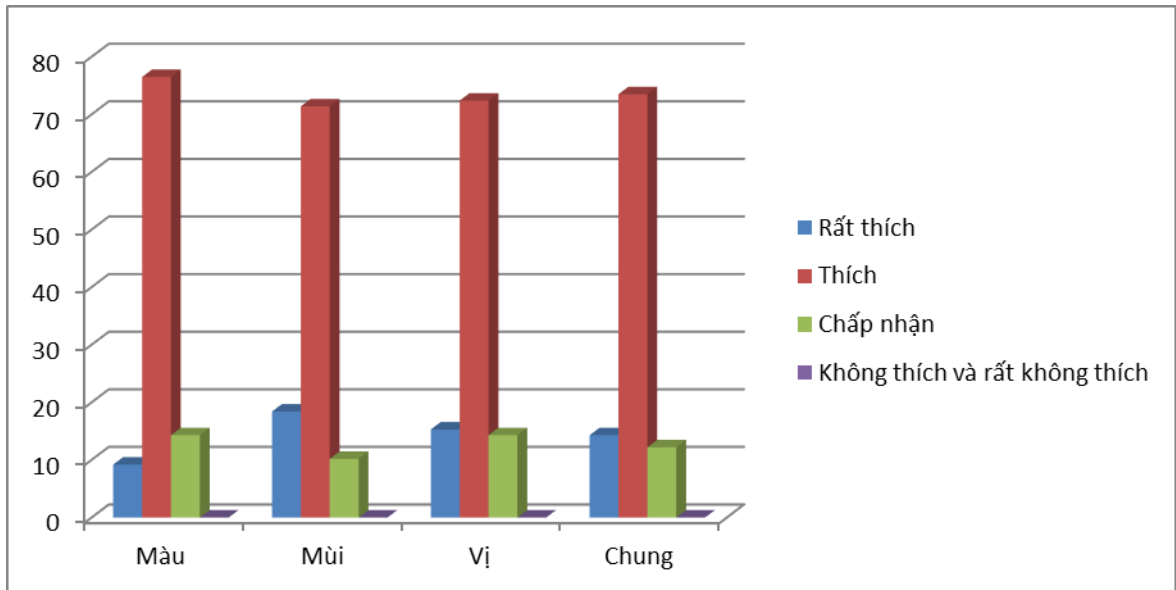
Kết quả ở bảng 3.19 cho thấy, sản phẩm đồ uống cỏ sữa lá lớn có hàm lượng flavonoid toàn phần cao (80,3 mg/100ml). Các chỉ tiêu hóa lý và an toàn thực phẩm đều đáp ứng mức giới hạn an toàn theo quy định tại Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với sản phẩm đồ uống không cồn (QCVN 6-2:2010/BYT), Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm (QCVN 8-1:2011/BYT), Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm kim loại nặng trong thực phẩm (QCVN 8-2:2011/BYT) và Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với ô nhiễm vi sinh vật trong thực phẩm (QCVN 8-3:2012/BYT).

3.3.5. Đánh giá khả năng chấp nhận tại cộng đồng

Sản phẩm đồ uống CSLL sản xuất thử nghiệm được đánh giá chấp nhận thị hiếu trên 98 đối tượng là người tiêu dùng. Đặc điểm đối tượng thử thị hiếu là người trưởng thành có độ tuổi từ 24 đến 65 tuổi, có hiểu biết về sản phẩm đồ uống, hiện tại không hút thuốc và không mắc các bệnh mũi họng. Người thử đánh giá mức độ ưa thích sản phẩm theo thang điểm từ 1 đến 4 theo mức độ yêu thích giảm dần cho từng tính chất của sản phẩm là màu, mùi, vị và cho toàn diện sản phẩm đồ uống CSLL. Kết quả được trình bày ở bảng 3.20 và hình 3.19.

**Bảng 3.20. Kết quả đánh giá chấp nhận tại cộng đồng (n=98)
của đồ uống dinh dưỡng cỏ sữa lá lớn**

Mức độ	Màu		Mùi		Vị		Chung	
	%	n	%	n	%	n	%	n
Rất thích	9,2	9	18,4	18	15,3	15	14,3	14
Thích	76,5	75	71,4	70	72,4	71	73,5	72
Chấp nhận	14,3	14	10,2	10	14,3	14	12,2	12
Không thích và rất không thích	0	0	0	0	0	0	0	0
Cộng dồn từ thích đến rất thích	85,7		89,8		87,7		87,8	



**Hình 3.19. Tỷ lệ chấp nhận sản phẩm đồ uống dinh dưỡng
cỏ sữa lá lớn tại cộng đồng**

Kết quả đánh giá sự chấp nhận của người tiêu dùng ở bảng 3.26 cho thấy có 85,7% người tiêu dùng thích màu của đồ uống cỏ sữa, 89,8% người tiêu dùng thích mùi hương và 87,7% người tiêu dùng thích vị của sản phẩm. Đa số người tiêu dùng tham gia đánh giá thích màu và mùi vị của sản phẩm. Như vậy, xét chung các tiêu chí về sự chấp nhận sản phẩm đồ uống cỏ sữa cho thấy không có người tiêu dùng đánh giá không thích sản phẩm, còn lại là chấp nhận sản phẩm với tỷ lệ cộng dồn từ thích đến rất thích là 87,8%.

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm thực vật và thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn

Nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên về đặc điểm thực vật để mô tả hình thái của CSLL ở khu vực Miền Nam là tỉnh Bình Dương. Theo các tài liệu trên thế giới đã được công bố cho thấy CSLL chứa flavonoids [133, 150] nhiều hơn cỏ sữa lá nhỏ cũng như các thực vật cùng loài khác. Nhằm tìm hiểu và bổ sung thêm các thông tin khoa học về cây cỏ sữa lá lớn, chúng tôi thực hiện đề tài “Nghiên cứu đặc điểm thực vật và thành phần hóa học của cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* L.)” để tìm hiểu chi tiết, hệ thống về đặc điểm thực vật, thành phần hóa học của CSLL. Tại Việt Nam, chưa có nhiều các nghiên cứu về cây CSLL, chỉ có một vài nghiên cứu phản ánh từng góc độ nhỏ lẻ, chưa toàn diện của cây như đặc điểm hiển vi [34], thành phần hóa học [36]. Nghiên cứu này của chúng tôi đã mô tả CSLL một cách hệ thống, toàn diện.

4.1.1. Đặc điểm thực vật

Nghiên cứu của Nguyễn Thu Hằng so sánh về mặt vi phẫu giữa Cỏ sữa lá lớn và Cỏ sữa lá nhỏ cho thấy thân Cỏ sữa lá lớn, mô mềm ruột chiếm phần lớn diện tích (tỷ lệ diện tích mô mềm vỏ/mô mềm ruột là 1/3), trong khi đó thân Cỏ sữa lá nhỏ, mô mềm vỏ chiếm phần lớn diện tích. Ở vi phẫu phiến lá Cỏ sữa lá to có lông che chở ở biểu bì dưới và không có các bó libe gỗ phụ, còn ở phiến lá Cỏ sữa lá nhỏ không có lông che chở nhưng có 2-3 bó libe gỗ phụ có cấu tạo tương tự bó libe gỗ ở gân chính. Libe-gỗ chia thành 2-3 bó kích thước không đều ở vi phẫu rễ Cỏ sữa lá nhỏ là đặc điểm khác biệt so với Cỏ sữa lá to (libe gỗ không chia bó). Nghiên cứu này cho phép phân biệt sự khác nhau rõ ràng giữa Cỏ sữa lá to và Cỏ sữa lá nhỏ dựa trên các đặc điểm vi phẫu và bột dược liệu [34]. Tuy nhiên, nghiên cứu này không đề cập đến thành phần hóa học, cũng như định danh khoa học của hai loài cỏ sữa này. Nghiên cứu của chúng tôi, bên cạnh việc

xác định hình ảnh vi phẫu cho kết quả tương tự như nghiên cứu của Nguyễn Thu Hằng, bên cạnh đó chúng tôi còn xác định tên khoa học của Cỏ sữa lá lớn và thành phần hóa học của loài cây này.

Cây cỏ sữa lá lớn được phân bố rộng rãi tại Trung Quốc, Ấn độ, Malaysia, Philippines, Sundan, New Guinea, Lào, Campuchia, Bangladesh, Australia, Nhật Bản, Việt Nam... [133]. Tại Việt Nam, CSLL phân bố rộng khắp cả nước, trong đó có Miền đông Nam bộ. Ở khu vực này đặc điểm thổ nhưỡng, khí hậu phù hợp hơn với CSLL nên cây đã phát triển tốt, nhiều dưới các cánh rừng cao su, rừng điều. Mẫu cỏ sữa lá lớn được sử dụng trong nghiên cứu này đã được thu hái tại tỉnh Bình Dương.

Đặc điểm hình thái là cây thảo, sống hằng năm, cao từ 20-50 cm, có nhựa mủ trắng. Rễ cọc, màu vàng nâu, rễ chính dài 5-10 cm, đường kính 1-3 mm. Thân mọc thẳng đôi khi gấp khúc, hình trụ, đường kính 1-4 mm, màu từ xanh nhạt (cây non) đến hồng, đỏ tím (trưởng thành), chia thành nhiều đốt dài 2-3 cm ở gần gốc, dài từ 3-7 cm ở phần xa gốc. Lá đơn, mọc đối, thành hàng. Mặt trên của lá có màu biến đổi từ xanh đậm đến đỏ, mặt dưới có màu xanh nhạt, cả hai mặt đều có lông. Góc lá không đối xứng một bên tròn, một bên hình khiên, mép lá có răng cưa, ngọn lá nhọn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã phù hợp với các nghiên cứu đã được tiến hành trong nước [22, 56] và các nghiên cứu đã được tiến hành tại nước ngoài [133]. Dựa trên đặc điểm hình thái đã được mô tả của mẫu nghiên cứu, chúng tôi đã sử dụng khóa phân loại của chi *Euphorbia* trong *Thực vật chí Trung Quốc* để xác định tên khoa học cây cỏ sữa lá lớn ở Bình Dương là *Euphorbia hirta* L.[161]. Như vậy cây cỏ sữa lá lớn sử dụng trong nghiên cứu đã được sử dụng để làm thuốc chữa bệnh cho người dân từ lâu đời, trải qua thời gian đã được các nhà nghiên cứu về y học cổ truyền nhận dạng, mô tả trong các tài liệu kinh điển [22, 56, 133]. Hơn thế nữa, cỏ sữa lá lớn của Việt Nam rất sẵn có và phân bố rộng rãi khắp toàn quốc trong đó có tỉnh Bình Dương. Thổ nhưỡng khí hậu phù hợp nên có thể mở rộng trồng để phục vụ ngành công

nghiệp dược và công nghiệp thực phẩm ứng dụng trong phòng và hỗ trợ điều trị các bệnh mạn tính không lây tại Việt Nam trong tương lai gần.

4.1.2. Thành phần hóa học

Nghiên cứu của chúng tôi đã tiến hành chiết xuất phân đoạn dịch chiết các bộ phận trên mặt đất của CSLL sử dụng n-hexan, chloroform, ethyl acetat, sau đó tiến hành định tính dịch chiết bằng sắc ký lớp mỏng:

+ Định tính phân đoạn dịch chiết n-hexan bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi toluene-ethyl acetat-acid formic (7:1,5:0,1) cho 17 vết, trong đó: các vết 1, 5, 15, 17 dưới UV-254 hiện vết đậm, các vết 1, 2, 3, 6, 8, 10, 17 dưới UV-366 rõ và đậm, sau khi phun thuốc thử các vết 2, 4, 5, 7, 11, 12 hiện màu đậm.

+ Định tính phân đoạn dịch chiết chloroform bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi toluen-chloroform-methanol (5:4:0,5) cho 16 vết, trong đó: dưới UV-254 các vết 3, 5, 8 đậm và hai vết 9 phát huỳnh quang, dưới UV-366 các vết 7, 8, 9, 11 rõ và đậm, sau khi phun thuốc thử vết 14 hiện màu rõ.

+ Định tính phân đoạn dịch chiết ethyl acetat bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi toluen-ethyl acetat-methanol-acid formic (3:6:1:1) cho kết quả hiện 13 vết, trong đó: vết 4, 7, 9, 11, 13 dưới UV-254 rõ và đậm, vết 7, 8, 9, 12, 13 dưới UV-366 hiện màu đậm, sau khi phun thuốc thử vết 7, 9 hiện màu rõ. Đối chiếu với chất chuẩn nhận thấy trong phân đoạn ethyl acetat có quercitrin với độ đậm của vết lớn. Do đó, kết quả nghiên cứu cho thấy quercitrin là một flavonoid chính trong cây. Đây là cơ sở khoa học để lựa chọn quercitrin làm chất chuẩn để định tính bằng sắc ký lớp mỏng và định lượng flavonoid toàn phần trong bộ phận trên mặt đất cỏ sữa lá lớn bằng phương pháp đo quang. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong bộ phận trên mặt đất của cỏ sữa lá lớn được định lượng bằng phương pháp đo quang (tiến hành phản ứng với nhôm clorid). Phương pháp này có ưu điểm là tiến hành đơn giản, dễ thực hiện và ít tốn kém. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong bộ phận trên mặt đất của cỏ sữa lá lớn tính theo quercitrin là $0,375 \pm 0,014$ % trong dược liệu khô tuyệt đối. Kết quả định lượng có độ chính xác chấp nhận được với $RSD = 3,676$ %.

Các nhóm hợp chất chính trong phần trên mặt đất của cỏ sữa lá lớn cũng được tiến hành định tính và đã được xác định là các nhóm hợp chất: flavonoid, saponin, tanin, alcaloid, đường khử, polysaccharid, sterol. Trong đó, các phản ứng định tính flavonoid dương tính rõ nên đó là cơ sở khoa học để kết luận flavonoid là thành phần chính trong cây.

Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu đã được công bố trước đây về thành phần hóa học cỏ sữa lá lớn tại Việt Nam và trên thế giới [36, 133, 161].

Phương pháp chiết xuất của chúng tôi cũng đã được nhiều tác giả sử dụng, đặc biệt là các nghiên cứu quan tâm đến hợp chất flavonoid. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã áp dụng phương pháp sử dụng dung môi chiết xuất là methanol để chiết xuất nhiều hợp chất khác ngoài hợp chất flavonoid. Do đó, nhìn vào góc độ vai trò của hợp chất flavonoid đối với kiểm soát glucose máu thì tiếp cận nghiên cứu của chúng tôi là hoàn toàn phù hợp [139]. Flavonoid là nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học mạnh được biết đến với các tác dụng như tác dụng chống oxy hóa [75, 78], hạ đường huyết [75], chống xơ vữa động mạch [98], chống viêm, ức chế khối u [81], kháng khuẩn [92], kháng nấm [92], chống virus [74]. Những nghiên cứu gần đây đã chứng minh nhiều tác dụng sinh học của cỏ sữa lá lớn có liên quan đến nhóm hợp chất flavonoid đặc biệt là tác dụng chống oxy hóa [110] và hạ đường huyết [75]. Do đó, việc định tính và định lượng flavonoid toàn phần trong phần trên mặt đất của cỏ sữa lá lớn là cần thiết.

Flavonoid là một trong những hợp chất có cấu trúc polyphenol. Kết quả của đề tài và các nghiên cứu trước đây cho thấy rằng ngoài flavonoid, trong cỏ sữa lá lớn có chứa các hợp chất polyphenol khác [162]. Các hợp chất này cũng có liên quan với tác dụng sinh học của cây [110]. Do đó, nhóm nghiên cứu đề nghị tiếp tục nghiên cứu các hợp chất polyphenol trong bộ phận trên mặt đất của cỏ sữa lá lớn.

Nghiên cứu của Trần Thị Kim Ngân và cộng sự cho thấy cao methanol của Cỏ sữa lá lớn *Euphorbia hirta* L. chiết tách được bốn cao phân đoạn, gồm cao ether dầu hỏa, cao chloroform, cao ethyl acetate và cao n-butanol. Các tác giả đã xác định được bốn hợp chất gồm methyl gallate, quercetin, myrecitin, và quercitrin được cô lập từ cao ethyl acetate [49]. Quercitrin là một flavonoid chính trong cây cỏ sữa lá lớn và có các tác dụng sinh học mạnh như chống oxy hóa [72], chống viêm [90], hạ đường huyết [72], chống ung thư [113], chống tiêu chảy. Nhiều tác dụng sinh học của của cỏ sữa lá lớn được cho rằng có liên quan đến quercitrin gần đây đã được chứng minh bằng thực nghiệm trong đó có tác dụng hạ đường huyết [146].

Pranabesh Ghosh, Chandreyi Ghosh và cộng sự tổng quan 90 nghiên cứu trên thế giới về Cây cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* L.) cho thấy các thành phần nổi bật bao gồm các hoạt chất sinh học có tính chống oxy hóa cao như flavonoids, polyphenols, ascorbic acids. Trong thành phần của flavonoids có chứa quercetin, quercitrin, quercitol and its derivatives such as rhamnose, quercetin rhamnoside, chlorophenolic acid, rutin, leucocyanidin, myricitrin, cyaniding 3,5-diglucoside, camphol, flavonol, inositol, tetraerol, β -sitosterol, and kaempferol. Bên cạnh đó các tác giả còn tìm ra trong thành phần của cây Cỏ sữa lá lớn còn có các hoạt chất: alkaloids, steroids, tannins, proteins, fats, oils, glycoside, saponin, coumarin, anthroquinones, chlorophyll và carotenoids [133].

Đây chính là lý do tại sao chúng tôi lại chọn cây Cỏ sữa lá lớn trong nghiên cứu để tạo ra sản phẩm hỗ trợ kiểm soát đường huyết. Quá trình chiết xuất thành công các hợp chất trên tạo cơ sở thúc đẩy cho việc phân lập các hợp chất tự nhiên có tiềm năng trong nghiên cứu y học, là tiền đề cho quá trình nghiên cứu các hoạt tính sinh học của cây cỏ sữa lá lớn trong thời gian tới. Trong nghiên cứu của chúng tôi chưa có điều kiện để tiến hành chiết tách một cách đầy đủ và toàn diện như các tác giả trong nghiên cứu tổng quan của Pranabesh Ghosh, Chandreyi Ghosh và cộng sự đã tiến hành [133]. Đây cũng là một hướng

nghiên cứu quan trọng trong thời gian tới để tìm hiểu một cách khoa học và kỹ lưỡng về cây Cỏ sữa lá lớn ở Việt Nam, cũng như việc áp dụng các sản phẩm của nó trong cải thiện sức khỏe, dự phòng các bệnh mạn tính nói chung và ĐTĐ nói riêng. Đây cũng là cơ sở để tiêu chuẩn hóa và kiểm nghiệm dược liệu cỏ sữa lá lớn, làm cơ sở bổ sung vào Dược điển Việt Nam.

Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi không chỉ bổ sung thêm các thông tin khoa học cơ bản, quan trọng về đặc điểm thực vật và thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn ở Việt Nam mà còn mở ra hướng để phát triển vùng trồng với cây Cỏ sữa lá lớn ở Việt Nam. Nghiên cứu tổng quan của Pranabesh Ghosh, Chandreyi Ghosh và cộng sự [133] cho thấy cây Cỏ sữa lá lớn phân bố nhiều ở các nước nhiệt đới như Ấn độ, Bangladesh và Africa. Việt Nam là một nước nhiệt đới nên có khả năng trồng và phát triển cây Cỏ sữa lá lớn cho nên chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu này tại Bình Dương là địa phương thuộc vùng khí hậu nhiệt đới điển hình, thuận lợi để phát triển nguồn dược liệu quý này.

4.2. Điều chế cao cỏ sữa lá lớn, đánh giá tính an toàn và hiệu quả của chế phẩm trong kiểm soát glucose máu

4.2.1. Điều chế cao cỏ sữa lá lớn

Theo mục tiêu đề ra, chúng tôi tiến hành sản xuất thử nghiệm chế phẩm sử dụng cho người với mục đích kiểm soát glucose máu, vì vậy cần nghiên cứu các điều kiện chiết xuất để tìm được điều kiện điều chế cao CSLL đạt hiệu suất cao, giảm giá thành, quá trình thao tác thuận tiện, an toàn, đầy đủ thông số kỹ thuật, quy trình ổn định. Để đạt được điều này, cần phải khảo sát các điều kiện chiết xuất nhằm tối ưu hóa quy trình điều chế cao. Để sản phẩm giữ được các thành phần hoạt tính sinh học trong quá trình sản xuất, việc tối ưu hóa quy trình điều chế cao là khâu then chốt. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã lựa chọn các thông số kỹ thuật thích hợp để tối ưu hóa quy trình điều chế cao như nhiệt độ chiết, thời gian chiết, tỷ lệ dung môi/dược liệu, số lần chiết. Quá trình tối ưu hóa cao chiết CSLL của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu của nhiều tác giả ở

Việt Nam đã sản xuất ra các sản phẩm ứng dụng trong bảo vệ và nâng cao sức khỏe được tiêu thụ rộng rãi trên thị trường [50, 166].

Các sản phẩm thực phẩm là đồ uống có yêu cầu vô cùng khắt khe về độ an toàn bên cạnh yêu cầu về giá thành. Vì vậy việc lựa chọn dung môi để chiết xuất có ý nghĩa rất quan trọng để hướng đến sản xuất. Các nghiên cứu đã chỉ ra flavonoid là nhóm hoạt chất có tác dụng trong cây cỏ sữa lá lớn. Thực nghiệm đã cho thấy khi chiết bằng nước nóng có thể chiết ra được flavonoid với hàm lượng khá cao. Theo y học cổ truyền, cỏ sữa được sử dụng dưới dạng thuốc sắc truyền thống. Tác giả Phan Văn Cư và cộng sự cũng đã sử dụng nước làm dung môi để điều chế cao chứa các hoạt chất sinh học từ cây cỏ sữa lá nhỏ (*euphorbia thymifolia burm. (L)*) [37]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng dung môi nước trong chiết xuất hoạt chất ra khỏi dược liệu cỏ sữa lá lớn. Đây cũng là dung môi thân thiện với môi trường, an toàn, đầu tư thiết bị đơn giản phù hợp với hầu hết các đơn vị sản xuất tại Việt Nam, đặc biệt là giá thành sản xuất hợp lý. Để tối ưu hóa quy trình, giảm giá thành sản xuất, chúng tôi tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng nêu trên đến hiệu suất điều chế cao và hàm lượng hợp chất flavonoid toàn phần.

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết cho thấy: flavonoid là nhóm hợp chất khá bền với nhiệt độ, nhưng có độ tan trong nước rất khác nhau nên ở nhiệt độ thấp, dung môi là nước khó có thể phá vỡ được cấu trúc tế bào dược liệu và hòa tan flavonoid để chiết một cách hiệu quả.

Trong trường hợp dược liệu là cỏ sữa lá lớn, có cấu trúc không quá vững chắc nên dung môi nước dễ dàng thẩm thấu, ngấm vào trong toàn bộ dược liệu. Khi đó, hiệu suất chiết phụ thuộc chủ yếu vào độ tan của các chất trong dung môi nước. Khi nhiệt độ chiết giảm từ 95°C xuống 60°C hiệu suất chiết tính theo khối lượng cao khô tuyệt đối (đã trừ độ ẩm) giảm từ 19,4% xuống 16,9%, tuy nhiên hàm lượng flavonoid tổng số giảm mạnh, chỉ còn một nửa từ 16,8 còn 8,2 mg/g. Khi chiết ngâm ở nhiệt độ phòng 3 ngày đêm (1 ngày đêm cho 1 lần chiết) hiệu

suất chiết cao (tính theo khối lượng cao khô tuyệt đối) có tăng hơn chút ít so với chiết ở 60°C trong thời gian ngắn hơn. Bên cạnh đó hàm lượng flavonoid lại giảm chỉ còn 4,0 mg/g, thấp hơn nhiều so với chiết ở nhiệt độ cao, mặc dù thời gian chiết lên tới 3 ngày đêm. Điều này cho thấy độ tan trong nước của các chất có trong cỏ sữa lá lớn phụ thuộc vào nhiệt độ ít hơn so với flavonoid. Trên thế giới, nhiều tác giả cho thấy ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chế biến cao và chiết xuất flavonoid từ thực vật. Asha và cộng sự công bố qui trình chiết xuất lá CSLL bằng nước 3 lần ở nhiệt độ phòng, mỗi lần 24 h cho hiệu suất chiết rất thấp, chỉ có 7% [68]. Khi chiết xuất flavonoid từ đậu tương, Jokic và cộng sự đã xác định được hàm lượng flavonoid tăng lên tỷ lệ thuận với nhiệt độ. Hàm lượng flavonoid tăng từ 1,01 mg/g ở 25°C lên 2,56 mg/g ở 80°C độ [108]. Tương tự, Rajha và cộng sự cũng cho thấy rằng nhiệt độ trích ly tăng dẫn tới hàm lượng flavonoid tăng và đạt tối ưu khi chiết xuất vỏ nho ở 94°C [135]. Sheng và cộng sự cũng đã tối ưu hóa quá trình chiết xuất flavonoid từ cây *Flos populi* với năng suất tối đa ở nhiệt độ chiết 94,66°C. Các tác giả đã giải thích là ở điều kiện nhiệt độ cao, sự giải phóng các chất có hoạt tính sinh học từ tế bào thực vật được thuận lợi hơn nhờ giảm độ nhớt của dung môi và tăng sự chuyển động của các phân tử [140].

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự cần thiết và hiệu quả vượt trội khi chiết cỏ sữa lá lớn bằng nước ở nhiệt độ cao. Quá trình gia nhiệt vừa giúp rút ngắn thời gian chiết xuất, vừa tăng hiệu suất chiết xuất do làm tăng mạnh độ tan của cả nhóm chất flavonoid lẫn các nhóm chất khác có trong cỏ sữa lá lớn. Bên cạnh đó, kết quả cũng chỉ ra, khi tăng nhiệt độ thì độ tan của nhóm chất flavonoid trong nước tăng mạnh hơn các chất còn lại trong cỏ sữa lá lớn. Vì vậy, chiết ở nhiệt độ cao vừa giúp cho hiệu suất chiết cao lớn nhất, nhưng đồng thời hàm lượng flavonoid trong cao khi chiết ở 95° cũng đạt cao nhất. Do đó, lựa chọn chiết nóng ở 95°C để thu được hiệu suất chiết cao toàn phần cao, cao chiết có hàm lượng flavonoid lớn, giảm thời gian chiết, hạ giá thành sản phẩm.

Khảo sát tỷ lệ dung môi chiết so với dược liệu là thông số quan trọng giúp tăng năng suất lao động, tăng hiệu quả của thiết bị, giảm hao hụt hoặc giúp giảm giá thành sản phẩm. Nếu chiết với lượng dung môi lớn quá, hiệu suất thu được cao chiết có thể cao nhưng hiệu quả sử dụng thiết bị sẽ giảm mạnh, làm giảm năng suất lao động. Ngoài ra còn làm tăng chi phí dung môi, tăng chi phí năng lượng và gia tăng tiền công do kéo dài thời gian làm việc... Nhưng nếu chiết với lượng dung môi quá ít cũng có thể gây giảm hiệu suất của quá trình chiết. Điều này làm tăng giá thành sản phẩm. Trong một số trường hợp, có thể làm giảm hàm lượng hoạt chất ở sản phẩm. Lượng dung môi tối thiểu phải vừa ngập qua bề mặt của lớp dược liệu khoảng 1 cm, khi đó các lớp nguyên liệu phía trên mới tiếp xúc được với dung môi.

Trong nghiên cứu này, khi tỷ lệ dung môi/dược liệu tăng từ công thức 8/6/6 (8:1; 6:1 ; 6:1) lên 10/8/8 (10:1 ; 8:1 ; 8:1) thì hàm lượng flavonoid tăng từ 14,3 lên 17,5 mg/g và hiệu suất điều chế tăng từ 17,2 lên 19,3% tương ứng. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng tỷ lệ dung môi/dược liệu thì lượng flavonoid không tăng lên mà có xu hướng tiệm cận ngang, đồng thời hiệu suất điều chế cao cũng không tăng nhiều. Điều này được giải thích là khi trích ly CSLL với lượng dung môi quá nhiều trong khi flavonoid và các chất hòa tan của nguyên liệu là một số cố định nên sẽ nhanh chóng dẫn đến sự cân bằng giữa các pha, làm hiệu quả trích ly không tăng. Do vậy, chọn tỷ lệ thể tích dung môi chiết /khối lượng dược liệu cho 3 lần chiết lần lượt là 10/1; 8/1 và 8/1. Tỷ lệ này vừa chiết được gần như tối đa flavonoid với dung môi nước lại giảm thể tích thiết bị, giảm thiểu cho quá trình cô loại dung môi.

Việc khảo sát số lần chiết cũng giúp tìm được điều kiện tối ưu trong quá trình sản xuất. Theo lý thuyết, số lần trích ly càng nhiều thì hàm lượng hoạt chất thu được càng cao. Tuy nhiên, khi trích ly tới một thời điểm nào đó thì lượng hoạt chất thu được không đáng kể, trong khi đó phải tiêu tốn thời gian và dung môi để trích ly. Do đó, cần xác định số lần trích ly thích hợp để có được hiệu quả kinh tế cao.

Đối với nguyên liệu CSLL, chiết lần thứ nhất thu được flavonoid và các chất hòa tan nhiều nhất so với các lần chiết sau đó, với giá trị tương ứng là 10,9 mg/g và 12,5%. Khi tăng số lần chiết, cả chất hòa tan và hàm lượng flavonoid đều tăng dần nhưng nếu chiết nhiều lần quá (4 lần) thì lượng chất hòa tan không tăng nhiều (từ 19,3 lên 21,1%) mà hàm lượng flavonoid có xu hướng giảm (từ 17,1 mg/g xuống còn 16,6 mg/g), có thể do flavonoid bị thoái biến trong lần chiết thứ tư. Như vậy, chỉ cần chiết 3 lần đã đảm bảo chiết hầu hết các flavonoid ra khỏi nguyên liệu. Trên thực tế sản xuất lớn, nếu tiến hành chiết liên tục nhiều mẻ, thì dịch chiết nước lần 3 sẽ được dùng làm dung môi chiết mẻ tiếp theo.

Khảo sát thời gian chiết: Thời gian chiết có ảnh hưởng đến 2 yếu tố chính là hiệu suất chiết (khi tăng thời gian chiết sẽ tăng hiệu suất chiết) và khả năng phân hủy hoạt chất (khi tăng thời gian chiết sẽ tăng khả năng phân hủy hoạt chất). Trong nghiên cứu này, khi chiết 3 lần với thời gian lần lượt là 3h/2,5h/2h (tổng thời gian 7,5h) hoặc 2,5h/2h/1,5h (tổng thời gian 6h) thì không thấy có sự khác nhau về mặt thống kê ở mức ý nghĩa $\alpha=005\%$ của hiệu suất chiết (19,3% và 18,2% tương ứng), tuy nhiên hàm lượng flavonoid khi chiết ở thời gian 6 h lại tăng lên rõ rệt so với thời gian chiết 7,5 h, là 20,2 mg/g so với 17,1 mg/g tương ứng. Về nguyên tắc, trong giai đoạn đầu của quá trình chiết, thời gian dài giúp cho quá trình chuyển flavonoid từ tế bào thực vật sang dịch chiết. Tuy nhiên, flavonoid trong dung dịch có thể bị phá hủy ở nhiệt độ cao hoặc bị oxy hóa tiếp xúc với các tác nhân oxy hóa từ môi trường nếu thời gian chiết kéo dài và do vậy làm giảm hàm lượng trong dịch chiết. Nghiên cứu về ảnh hưởng của các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết sa nhân *Amomum Chinese C*, Busat và cộng sự cho thấy hàm lượng flavonoid giảm mạnh từ 0,47 mg/g sau 6 h chiết xuống còn 0,14 mg/g sau 24 h chiết bằng dung môi nước ở nhiệt độ 50°C [80]. Tương tự, các tác giả người Ấn Độ cũng công bố kết quả chiết flavonoid từ lá cây *Tabernaemontana heyneana Wall.*, theo đó, thời gian chiết flavonoid 2 h là tối ưu. Có sự giảm dần flavonoid sau 3 h trích ly và giảm mạnh sau 4 h trích ly

[137]. Một nghiên cứu của các tác giả người Trung Quốc chiết xuất flavonoid từ quả hoa hồng *Rosa Davurica Pall* cũng cho thấy sau thời gian chiết 3 h, hàm lượng flavonoid có xu hướng giảm xuống rõ rệt [115].

Trong nghiên cứu này, khi giảm thời gian của 3 lần chiết xuống còn 4,5 h (2h/1,5h/1h) hoặc ngắn hơn nữa (1,5h/1h/0,5h) thì hiệu suất điều chế cao giảm rõ rệt, bên cạnh đó hàm lượng flavonoid cũng giảm. Do đó chọn thời gian chiết cho 3 lần là 2,5h/2h/1,5h. Trong thực tế sản xuất, tổng thời gian chiết là 6 h cũng phù hợp 1 ca làm việc. Điều này sẽ giúp quá trình tổ chức sản xuất được thuận lợi.

Khảo sát kích thước dược liệu: Trong nhiều trường hợp, kích thước nguyên liệu là yếu tố rất quan trọng, có ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất chiết. Tuy nhiên, trong trường hợp cỏ sữa lá lớn là thân mảnh và mềm, lá nhỏ, kết quả khảo sát cho thấy kích thước dược liệu xay nhỏ và dược liệu được cắt nhỏ không ảnh hưởng lớn đến hiệu suất chiết ở điều kiện nhiệt độ cao, lượng dung môi đủ lớn và thời gian chiết đủ dài (3 lần chiết tổng cộng 6 giờ). Do vậy, có thể sử dụng kích thước dược liệu là từ 1-3 cm ở các nghiên cứu tiếp theo qui mô lớn hơn. Điều này cho phép trong thực tế sản xuất giảm chi phí nghiền dược liệu cỏ sữa.

Nâng quy mô điều chế cao 1 kg dược liệu/mẻ: Trong nhiều trường hợp, khi khảo sát ở quy mô nhỏ, các thông số không lặp lại ở quy mô lớn hoặc thu được kết quả không ổn định hoặc thao tác khó khăn, không phù hợp ở quy mô lớn hơn. Chính vì vậy, nhằm hướng đến sản xuất ở quy mô lớn và đặc biệt là áp dụng thực tế cho quá trình sản xuất thử nước uống đóng chai trong thí nghiệm sau, cần thiết phải khảo sát quy trình chiết xuất ở quy mô lớn hơn, ở đây là quy mô 1 kg dược liệu cỏ sữa lá lớn/mẻ.

Kết quả thu được cho thấy quy trình chiết xuất cỏ sữa lá lớn xây dựng được ở quy mô nhỏ lặp lại và ổn định ở quy mô 1 kg/mẻ. Kết quả ban đầu cho thấy cả hiệu suất chiết và hàm lượng flavonoid thu được ở qui mô 1 kg/mẻ đều

đạt tương tự như ở qui mô nhỏ (10g/m²), do vậy có triển vọng lớn khi áp dụng ở quy mô lớn hơn. Như vậy, sau khi khảo sát các yếu tố có ảnh hưởng đến hiệu suất, hàm lượng hợp chất flavonoid toàn phần, sự thuận tiện trong thao tác, hướng tới sản phẩm có giá thành hạ, quy trình ổn định và thân thiện với môi trường, chúng tôi đã xây dựng được quy trình điều chế cao cỏ sữa lá lớn ổn định, hiệu suất đạt trung bình là 21,8% so với nguyên liệu đầu vào, hàm lượng flavonoid toàn phần tính theo quercitrin ổn định và đạt trung bình 22,4 mg/g.

4.2.2. Đánh giá tính an toàn của cao cỏ sữa lá lớn

4.2.2.1. Đánh giá độc tính cấp

Đã cho 5 lô chuột uống mẫu thử ở các liều tương ứng là 16,54 g; 20,67 g; 25,84 g; 32,30 g và 40,35 g cao/kg thể trọng chuột. Chuột ở các lô được uống một lần duy nhất với thể tích tối đa 0,8 ml/20 g thể trọng chuột. Tuy nhiên khi chuột uống đến mức liều 32,30 g/kg (mức đặc nhất và thể tích uống là tối đa) mà tỷ lệ chuột chết chưa đạt 100% nên để tính toán được LD₅₀ cần phải tăng liều cho chuột uống lên đến 40,35 g/kg bằng cách cho chuột uống làm 2 lần cách nhau khoảng 3 giờ. Chuột sau khi uống mẫu thử được theo dõi thấy rằng, ở lô chuột được uống liều cao 40,35 g, tổng số chuột chết là 10/10; 2 chuột chết sau khi uống lần 2 khoảng 30 - 60 phút, số còn lại thì có biểu hiện chậm chạp, ít vận động, ăn uống ít, và chết hết trong vòng 24 giờ. Ở các mức liều thấp hơn (32,30 g; 25,84 g; 20,67 g/kg), sau khi uống một số chuột có biểu hiện chậm chạp, ít vận động hơn, đi ngoài phân ướt hơn bình thường, chuột chết trong vòng 4 - 24 h sau khi uống. Mô bụng chuột chết thấy dạ dày căng, ruột bình thường, tim, gan, phổi không phát hiện được bất thường. Với những chuột còn sống sót, hoạt động bình thường, ăn uống lúc đầu ít hơn, sau đó thì bình thường. Căn cứ vào phương pháp tính toán, chúng tôi đã xác định liều được liều LD₀ là 16,54 g/kg, LD₁₀₀ là 40,35 g/kg, liều LD₅₀ là 28,6 g cao/kg.

Tác giả Ali Esmail Al-Snafi nghiên cứu trên chuột thực nghiệm để xác định tính an toàn của CSLL bằng việc cho chuột uống dịch chiết với các liều

tương ứng 1, 10 and 50 mg/kg trong 50 ngày so với nhóm chứng, kết quả kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử cho kết quả không tìm thấy các tổn thương ở gan, thận và các nội tạng. Sau khi mổ để nghiên cứu cho thấy không có sự thay đổi về mặt mô học của thận, gan ở nhóm thực nghiệm cũng như ở nhóm chứng. Các tác giả kết luận là cỏ sữa lá lớn có tính an toàn cao [59, 152].

Nghiên cứu độc tính cấp của dịch chiết Cỏ sữa lá lớn, các tác giả Goldie Uppal, Vijay Nigam, Anil Kumar cho thấy với chuột cái thực nghiệm có cân nặng từ 25 đến 30 gam, liều thử tính an toàn được nâng theo bậc thang cho đến liều 5000 mg/kg cân nặng. Các tác giả đã chọn ngưỡng 1/10 liều nói trên (tức là 500 mg/kg thể trọng) là liều để tính hiệu quả [149]. Nghiên cứu của chúng tôi chọn liều 500 mg/kg cân nặng để tiến hành đánh giá tính hiệu quả.

4.2.2.2. Đánh giá độc tính bán trường diễn

Ưu điểm của nổi trội của nghiên cứu này là được làm trên chuột thực nghiệm tại Viện Dược liệu, Bộ Y tế, là cơ sở nghiên cứu có uy tín, đội ngũ nhà khoa học nhiều kinh nghiệm trong nghiên cứu, đánh giá độc tính cấp, độc tính bán trường diễn trên mô hình động vật thực nghiệm đối với các điều liệu của Việt Nam. Nghiên cứu được thực hiện theo đúng quy trình và các chỉ tiêu được theo dõi một cách chặt chẽ.

Với phương pháp đánh giá độc tính bán trường diễn, kết quả nghiên cứu cho thấy, cao cỏ sữa lá lớn không ảnh hưởng đến tình trạng chung của chuột cống trắng, không ảnh hưởng đến các chỉ số huyết học như số lượng bạch cầu, hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, số lượng tiểu cầu, lympho bào; không ảnh hưởng đến các thông số hóa sinh máu như hoạt độ AST, ALT, creatinin, protein toàn phần, urê, bilirubin, glucose; không ảnh hưởng đến cấu trúc đại thể, vi thể cũng như tỷ khối gan, thận, lách, tim so với khối lượng cơ thể chuột.

Nhóm các tác giả KwanYuetPing, IbrahimDarah, YengChen và cộng sự (2013) nghiên cứu độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của CSLL trên chuột

thực nghiệm đối với độc tính bán trường diễn, các tác giả sử dụng ở các liều uống lần lượt là 50mg/kg, 250mg/kg và 1000mg/kg/ngày trong thời gian 90 ngày. Các chỉ số theo dõi gồm cân nặng của chuột, các chỉ số sinh hóa và huyết học, biến đổi của một số nội tạng so sánh với nhóm chứng. Kết quả về giải phẫu bệnh học cho thấy với các liều trên là không ghi nhận các biến đổi bệnh lý cũng như các dấu hiệu về hành vi, sức khỏe của chuột [159]. Nghiên cứu bán trường diễn của chúng tôi sử dụng 300mg/kg trong 30 ngày thì cho thấy CSLL của Việt Nam có tính an toàn, trong khi các tác giả nói trên sử dụng 1000mg/kg trong 90 ngày vẫn được ghi nhận an toàn. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi về độc tính bán trường diễn của CSLL thu hái tại Việt Nam có cơ sở khoa học để cho phép đưa ra mức liều an toàn trong nghiên cứu tiếp theo đánh giá hiệu quả của CSLL.

Từ nghiên cứu tính an toàn và hiệu quả trên mô hình động vật thực nghiệm là cơ sở để phát triển sản phẩm ứng dụng trong tương lai.

4.2.3. Đánh giá tính hiệu quả của cao cỏ sữa lá lớn trong kiểm soát glucose máu

4.2.3.1. Khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của flavonoid

Ranganathan Babuja narthanama và cộng sự nghiên cứu vai trò của quercitrin, đối với chuyển hóa carbohydrate ở nhóm chuột bình thường và nhóm chuột gây ĐTĐ thực nghiệm cho thấy sử dụng liều 30 mg/kg cân nặng bằng đường uống trên chuột ĐTĐ trong thời gian 30 ngày làm giảm một cách có ý nghĩa đường glucose máu do giảm hoạt tính của hexokinase trong nội tạng [73].

Sự ức chế enzyme thủy phân carbohydrate như α -amylase và α -glucosidase được biết đến như là quá trình làm trì hoãn sự tiêu hóa và sự hấp thụ carbohydrate từ hệ thống ruột non. Bởi có sự ức chế các enzyme này nên việc hấp thụ glucose vào máu là thấp nhất [86, 144]

Khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của mẫu khảo sát được đánh giá thông qua giá trị IC_{50} . IC_{50} được định nghĩa là nồng độ (μ g/mL) của mẫu thử khảo sát có thể ức chế 50% hoạt tính của enzyme, mẫu có hoạt tính

ức chế càng cao thì giá trị IC_{50} càng thấp. Trong nghiên cứu này, dựa trên đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa nồng độ mẫu thử và hoạt tính ức chế, giá trị IC_{50} được xác định lần lượt là 967 $\mu\text{g/mL}$ (α -amylase), 53,96 $\mu\text{g/mL}$ (α -glucosidase). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự nghiên cứu của tác giả Manjur Ali Sheliya và cộng sự [122], theo đó chất chiết nước của *E. hirta* (toàn bộ cây) có khả năng ức chế mạnh hoạt tính α -glucosidase và ức chế trung bình hoạt tính α -amylase. Tuy nhiên, giá trị ức chế enzyme α -amylase trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn (967 $\mu\text{g/mL}$) giá trị IC_{50} do các tác giả Manjur Ali Sheliya và cộng sự (202,24 $\mu\text{g/mL}$). Trong khi đó, giá trị ức chế enzyme α -glucosidase của chúng tôi là cao hơn so với nghiên cứu của Manjur Ali Sheliya và cộng sự (53,96 $\mu\text{g/mL}$ so với 146,9 $\mu\text{g/mL}$). Cũng theo Shelliya (2015), sự ức chế α -glucosidase có được là bởi nhóm flavonoid có mặt trong CSLL và điều này minh chứng cho việc sử dụng các cây cỏ dân gian trong kiểm soát bệnh ĐTĐ [167]. Kết quả nghiên cứu của Chipiti và cộng sự cũng cho thấy chiết xuất thô và chiết xuất ethyl acetate của CSLL ức chế trung bình α -amylase và ức chế mạnh α -glucosidase tương tự như mô hình thuốc trị đái tháo đường [86]. Ngay tại Việt Nam, năm 2018, các tác giả Minh Tran, Ngan Tran, Han Truong, Ly Le nghiên cứu in vitro về hoạt tính ức chế α -amylase và α -glucosidase của chiết xuất methanol cỏ sữa lá lớn thu hái tại TP. Hồ Chí Minh cho thấy chất chiết CSLL có khả năng ức chế α -glucosidase tốt hơn chất chuẩn acarbose với giá trị IC_{50} thấp hơn. Tuy nhiên, chất chiết CSLL thô ức chế hoạt tính α -amylase thấp hơn so với chất chuẩn acarbose. Acarbose ở nồng độ 10 mg/ml cho thấy ức chế 94,69% đối với α -amylase và 54,91% đối với α -glucosidase với giá trị IC_{50} là 3,998 và 8,242 mg/ml tương ứng. Trong khi đó chất chiết CSLL thô ở nồng độ 10 mg/ml ức chế 55,06% hoạt tính α -amylase và 76,67% hoạt tính α -glucosidase với giá trị IC là 8,192 và 5,791 mg/ml tương ứng [126].

Như vậy, các kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các tài liệu tham khảo và phù hợp với các giả thuyết đặt ra. Trên cơ sở đó, tiến hành các

ngiên cứu in vivo tiếp theo để khẳng định tác dụng giảm đường huyết của cao cỏ sữa lá lớn.

4.2.3.2. Hiệu quả kiểm soát glucose máu trên mô hình động vật thực nghiệm

Theo một số công trình nghiên cứu trên thế giới, liều dùng của cao chiết còn CSLL dao động trong khoảng 100-800 mg cao/kg thể trọng chuột cống trắng [9]. Hơn thế nữa, theo y học cổ truyền cỏ sữa lá lớn được dùng với liều 4-6 g dược liệu/ người/ngày, do vậy chúng tôi sử dụng cao chiết liều 250 mg/kg và cao chiết liều 500 mg/kg để thử tác dụng hạ glucose máu.

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, sau khi điều trị 8 tuần liên tục bằng cao chiết cỏ sữa lá lớn với liều 500 mg/kg thể trọng, nồng độ glucose máu giảm đáng kể so với nhóm chứng bệnh lý với $p < 0,05$ (Bảng 3.14). Mặc dù giá trị HbA1c ở nhóm chuột được điều trị cao chiết cỏ sữa lá lớn với liều 500 mg/kg thể trọng trong 8 tuần liên tục có xu hướng giảm hơn so với nhóm chứng bệnh lý, tuy nhiên mức độ giảm này chưa đạt ý nghĩa thống kê. Như vậy, cao chiết cỏ sữa lá lớn với liều 500 mg/kg thể trọng chuột nhắt trắng có tác dụng điều trị đái tháo đường trên mô hình động vật thực nghiệm thông qua tiêu chí làm giảm nồng độ glucose máu.

Mặc dù nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh cao chiết từ lá cỏ sữa lá lớn có tác dụng hạ glucose máu trên các mô hình động thực nghiệm đái tháo đường gây bởi STZ hoặc alloxan [111, 112, 143]. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu tác dụng của cỏ sữa lá lớn khá bài bản trên động vật thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu này cũng hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới, cũng như nghiên cứu ở Việt Nam về tác dụng điều trị đái tháo đường của cỏ sữa lá lớn trên thử nghiệm lâm sàng [38, 51].

Dịch chiết còn CSLL cho thấy giảm một cách đáng kể hàm lượng đường trong máu ở chuột ĐTD gây bởi alloxan [149]. Tác dụng chống đái tháo đường của dịch chiết lá, hoa và thân CSLL cũng được khảo sát ở chuột ĐTD gây bởi streptozocin. Việc uống các loại dịch chiết đã làm giảm đáng kể hàm lượng đường trong máu vào ngày thứ 15 của quá trình nghiên cứu [112].

Dịch chiết cò CSLL và dịch chiết ethyl acetate CSLL cho thấy hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase. Dựa trên các test in vitro và in vivo, cơ chế điều trị ĐTĐ của dịch chiết cò CSLL và dịch chiết ethyl acetate CSLL có liên quan đến khả năng chống oxy hóa và đặc tính ức chế α -glucosidase [151].

R. Babujanathanam, P. Kavitha và G. Rajalakshmi nghiên cứu tại Ấn Độ về vai trò của flavonoids và quercitrin cho thấy chúng đều có vai trò trong hỗ trợ điều trị ĐTĐ và làm giảm biến chứng do ĐTĐ trên chuột thực nghiệm. Từ nghiên cứu này các tác giả đã chỉ ra việc tăng cường tiêu thụ thực phẩm và đồ uống giàu flavonoids được xem là can thiệp có tính hiệu quả đối với việc làm giảm những tác động có hại của tổn thương do oxy hóa trong cơ thể [71].

Nghiên cứu của Widharna RM và cộng sự cho thấy cây Cỏ sữa lá lớn được dùng như là một loại thuốc truyền thống trong điều trị nhiễm khuẩn, hen, vết thương và ỉa chảy. Theo các tác giả các tác dụng nói trên có thể liên quan đến việc tăng cường khả năng miễn dịch trong cơ thể, chủ yếu do vai trò của các flavonoids có trong cây Cỏ sữa lá lớn. Khả năng chống oxy hóa cùng với việc ức chế enzyme α -glucosidase tham gia vào cơ chế chống ĐTĐ [151].

Nghiên cứu thực nghiệm của Goldie Uppal, Vijay Nigam và Anil Kumar tại Ấn Độ [149] cho thấy dịch chiết của cây Cỏ sữa lá lớn có tác dụng làm giảm glucose máu có ý nghĩa trên mô hình chuột thực nghiệm gây đái tháo đường. Theo các tác giả tác dụng này liên quan đến cơ chế phụ thuộc insulin bởi việc ức chế sản xuất glucose trong gan và hạn chế hấp thu glucose tại ruột non hoặc có thể điều chỉnh sự kháng insulin thông qua cơ chế tế bào thụ cảm insulin [122, 149].

Tác giả Manjur Ali Sheliya và cộng sự [122] đã nghiên cứu cụ thể cơ chế của sự điều chỉnh insulin trong cơ thể thông qua việc xác định hoạt tính ức chế enzym α -amylase và α -glucosidase. Nghiên cứu của chúng tôi cũng đồng thời xác định hoạt tính ức chế hai men nói trên của dịch chiết Cỏ sữa lá lớn.

4.2.3.3. Vai trò của flavonoid với antioxidant

Nghiên cứu mới đây (2016) của Cao Huy Bình, Phạm Bá Hạnh, Nguyễn Ngọc Cầu, Nguyễn Thu Hằng, Đỗ Thị Hà về tác dụng chống oxy hóa bằng phương pháp phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất của cỏ sữa lá lớn cho thấy hai hợp chất thuộc nhóm flavonoid là quercetin và quercitrin thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh ngay ở nồng độ thấp 21,0 µg/ml với giá trị phần trăm ức chế tương ứng là 92,91 và 93,49 %, giá trị IC50 tương ứng là 7,18 µg/ml và 3,04 µg/ml [17].

Abu Arra Basma, Zuraini Zakaria và cộng sự nghiên cứu khả năng chống oxy hóa của 4 phần khác nhau của cây Cỏ sữa lá lớn gồm lá, thân, rễ, hoa cho thấy tất cả các bộ phận của cây cỏ sữa lá lớn có chứa flavonoids để có tác dụng chống oxy hóa một cách có ý nghĩa. Các tác giả cho rằng sử dụng cỏ sữa lá lớn như là một thảo dược tự nhiên có vai trò chống oxy hóa và là một nguồn nguyên liệu để sản xuất ra các hợp chất chống oxy hóa [77].

Nghiên cứu in vitro về các gốc tự do của dịch chiết Cỏ sữa lá lớn do nhóm tác giả Ấn Độ gồm Kumar S, Malhotra R và Kumar D thực hiện cho thấy dịch chiết có tác dụng giảm một cách có ý nghĩa nồng độ cholesterol, triglycerides, creatinine, urea huyết thanh. Để lý giải điều này các tác giả đã tiến hành nhiều thí nghiệm khác nhau về chống oxy hóa kể cả các chỉ số 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, superoxide anion, nitric oxide. Kết quả đã chỉ ra vai trò chống oxy hóa ở tất cả các thử nghiệm nói trên [111].

Ranganathan Babujanathanam, Purushothaman Kavith và cộng sự nghiên cứu vai trò của quercitrin, một thành phần sinh học của flavonoids về khả năng chống oxy hóa trên chuột thực nghiệm gây đái tháo đường cho thấy sử dụng quercitrin bằng đường uống với hàm lượng 30 mg/kg trong thời gian 30 ngày có tác dụng làm giảm một cách có ý nghĩa glucose máu khi đói, tăng hàm lượng insulin và cải thiện tình trạng chống oxy hóa của chuột đái tháo đường thực nghiệm. Cơ chế được xác định là do vai trò giảm các sản phẩm peroxidative từ

lipid và làm tăng enzymic chống oxy hóa, trong khi ở lô chuột bình thường mà được sử dụng quercitrin cũng với liều 30 mg/kg không có ý nghĩa làm thay đổi các chỉ số nói trên [72].

4.2.3.4. Vai trò của cỏ sữa lá lớn với lành vết thương và chống nhiễm khuẩn trong ĐTD

Nghiên cứu mới đây được xuất bản vào năm 2017 của các tác giả Riazul Haque Tuhin, Mst. Marium Begum và cộng sự nhằm đánh giá khả năng làm lành các vết thương trên chuột ĐTD thực nghiệm cho thấy Cỏ sữa lá lớn có tác dụng làm giảm rõ rệt quá trình viêm của vết thương trên chuột thí nghiệm khi cho chuột sử dụng bằng đường uống so với sử dụng bằng đường bôi tại chỗ qua da. Các tác giả đã chứng minh cơ chế do tác dụng của các thành phần flavonoids đối với hàm lượng malondialdehyde lipid và nitric oxide từ đó cải thiện không những các vết thương ngoài da mà còn ở các cơ quan nội tạng [148].

Mei-Fen Shih và cộng sự đã nghiên cứu hiệu quả chống viêm anti-inflammatoire của dịch chiết ethanol của cây Cỏ sữa lá lớn *Euphorbia hirta* (Eh) và thành phần hoạt động β -amyrine chống lại những tế bào đại thực bào macrophages được kích hoạt bởi lipopolysaccharide (LPS) [93]. Do đó, cây Cỏ sữa lá lớn *Euphorbia hirta* và β -amyrine thể hiện một tiềm năng chữa trị bệnh viêm xương khớp.

Prabhat Das và al., 2010 đã thực hiện một mô hình viêm gây ra bởi chất carragenan. Dịch chiết ether dầu hỏa, chloroforme, methanol, ethanol và nước của cây Cỏ sữa lá lớn *Euphorbia hirta* đã được thử nghiệm cho hoạt động chống viêm. Dịch chiết nước và ethanol cho thấy một tỷ lệ phần trăm tối đa của tác dụng chống viêm so với những dịch chiết khác [132].

Mariano Martinez-Vazquez và cộng sự đã phân lập và đã được xác định của những triterpenes như β -amyrine, 24-methyl encycloartenol và β -sitosterol từ dịch chiết của n-hexane của cây Cỏ sữa lá lớn *Euphorbia hirta*. Dịch chiết n-hexane và những triterpenes đã được đánh giá cho những hiệu quả chống viêm ở

chuột. Những dịch chiết và những triterpenes đều có tác dụng những hiệu quả chống viêm [123].

Geeta Singh và Padma Kumar nghiên cứu vai trò của flavonoids trong Cỏ sữa lá lớn đối với việc kháng khuẩn với liều lượng là 192.30 ml/g có khả năng ức chế tụ cầu vàng *S. aureus*. Cả hai dạng hợp chất flavonoid là quercetin và kaempferol đều có tác dụng chống lại các vi khuẩn gây bệnh. Kết quả nghiên cứu này cho thấy Cỏ sữa lá lớn có tác dụng kháng khuẩn ngay cả ở liều thấp do đó là nguồn dược liệu rất có triển vọng trong nghiên cứu sản xuất các loại kháng sinh thực vật [94].

Xiao Qian Dai, Ye Ding và cộng sự nghiên cứu vai trò của quercitrin đối với viêm nhiễm trên động vật thí nghiệm cho thấy khả năng tăng hoạt tính cytokine trong việc tiêu các tế bào viêm khi sử dụng quercitrin [157].

4.3. Ứng dụng cao cỏ sữa lá lớn để thử nghiệm sản xuất thực phẩm dinh dưỡng trong kiểm soát glucose máu

Cây cỏ sữa lá lớn đã được sử dụng trong y học cổ truyền các nước bằng cách sử dụng toàn bộ cây để làm thuốc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn đường hô hấp như ho, cảm lạnh, sổ mũi, viêm phổi, hen suyễn và một số triệu chứng hô hấp. Trên lâm sàng chưa phát hiện triệu chứng độc trong và sau khi dùng thuốc [56, 58]. Trên thực tế, cây cỏ Sữa lá lớn đã được người dân Nam Bộ sử dụng theo phương pháp đông y để dùng chữa bệnh cho bệnh nhân ĐTD [18]. Do đó, dựa vào kết quả nghiên cứu về cỏ sữa lá lớn đã được tiến hành ở Việt Nam và trên thế giới và theo khuyến nghị của WHO cỏ sữa lá lớn là an toàn khi sử dụng [150].

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, thành phần các nhóm hợp chất chính trong phần trên mặt đất của cỏ sữa lá lớn đã được xác định là: flavonoid, saponin, tanin, alcaloid, đường khử, polysaccharid, sterol. Theo các tài liệu nước ngoài đã công bố, thành phần hóa học của cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* L.) gồm flavonoid, tanin, triterpen, diterpen, sterol, acid hữu cơ, tinh dầu và các

thành phần khác [133, 161]. Trong đó, thành phần flavonoid trong một số cây thực vật đã được các nhà khoa học nghiên cứu có khả năng ức chế tạm thời hoạt động của men tiêu hóa glucose, giúp hạn chế tăng glucose máu sau ăn. Ngoài ra, một số flavonoid lại có tác dụng cải thiện hoạt động và bài tiết của insulin. Một số khác lại thể hiện khả năng chống oxy hóa rất mạnh thông qua khả năng tiêu diệt gốc tự do. Một số hợp chất flavonoid lại có khả năng hỗ trợ giảm mỡ máu, giúp cho việc phòng trị bệnh béo phì và các bệnh liên quan đến béo phì [85, 99]. Như vậy, cỏ sữa lá lớn là thực vật có chứa hàm lượng hợp chất flavonoid cao nên khả năng có tác dụng phòng và hỗ trợ điều trị bệnh tương tự một số thực vật đã được nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam như: Lá Ôi, lá Sen, Chè xanh, Vối, Quế, Giảo cổ lam.

Nghiên cứu này của của chúng tôi lần đầu tiên xây dựng thành công quy trình chiết xuất được dịch chiết ổn định từ bộ phận từ mặt đất trở lên của cây cỏ sữa lá lớn từ các công nghệ hiện đại thích hợp, các hóa chất thích hợp, thời gian chiết thích hợp. Từ bộ phận trên mặt đất của cây cỏ sữa lá lớn chúng tôi lần đầu tiên xây dựng công thức, tiến hành chọn lựa và đã sản xuất thành công nước uống dùng cho người ĐTĐ. Quá trình tiến hành từ thu hái nguyên liệu, làm sạch tạp chất và phơi khô, tách chiết để thu được cao cỏ sữa được tiến hành đúng nguyên tắc chiết tách dược liệu giúp đảm bảo hiệu suất và chất lượng của cao chiết. Cao chiết CSLL phối hợp với một số nguyên liệu để tạo ra sản phẩm nước đồ uống CSLL.

Nghiên cứu của chúng tôi đã đưa ra được quy trình sản xuất thử nghiệm đồ uống từ cao CSLL theo công thức: Cao CSLL 25 g/l, mật ong 25 g/l; chất tạo ngọt stevia 0,3 g/l; gừng 10 g/l. Kết quả kiểm tra chất lượng sản phẩm sau sản xuất thử nghiệm cho thấy sản phẩm đạt tiêu chuẩn chất lượng về các chỉ tiêu hóa lý, vi sinh. Hàm lượng flavonoid toàn phần là 506,7 mg/L nằm trong giới hạn cho phép và kỳ vọng của đề tài. Sản phẩm nước cỏ sữa sản xuất thử nghiệm được đem đánh giá chấp nhận thị hiếu trên 98 đối tượng là người trưởng thành

có độ tuổi từ 24 đến 65 tuổi, có hiểu biết về đồ uống không cồn, hiện tại không hút thuốc và không mắc các bệnh mũi họng. Kết quả đánh giá sự chấp nhận của cộng đồng có 85,7% người thử thích màu nước cỏ sữa, 89,8% thích mùi hương và 87,7% thích vị của sản phẩm. Tỷ lệ người chấp nhận sản phẩm với tỷ lệ cộng đồng từ người thích đến rất thích là 87,8%. Kết quả kiểm nghiệm sản phẩm đạt tiêu yêu cầu theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với các sản phẩm đồ uống không cồn của Bộ Y tế QCVN 6-2:2010/BYT[46].

Trong nghiên cứu chúng tôi cũng đã kiểm tra ngẫu nhiên một số mẫu đồ uống CSLL về hàm lượng flavonoid toàn phần và kết quả cho thấy không có sự khác biệt đáng kể nào giữa các lần kiểm tra, điều này nói lên sự ổn định về hàm lượng flavonoid toàn phần trong đồ uống CSLL khi sản xuất thử nghiệm. Trung bình hàm lượng flavonoid toàn phần trong các lon đạt từ 503 – 520 mg/l và các kết quả xét nghiệm ATTP đều nằm dưới tiêu chuẩn cho phép[46].

Nghiên cứu của Trương Hoàng Kiên cho thấy, việc bệnh nhân rối loạn đường huyết tiêu thụ 30 g trà cỏ sữa/ngày tương ứng 972mg flavonoid/ngày có hiệu quả kiểm soát glucose máu và giảm nồng độ HbA1c sau 12 tuần can thiệp [51]. Dựa vào hàm lượng flavonoid toàn phần trong đồ uống cỏ sữa lá lớn trong nghiên cứu của chúng tôi, ước tính lượng đồ uống dinh dưỡng CSLL cần tiêu thụ là 1,21 (l/ngày).

Chế độ ăn uống giữ vai trò quan trọng trong phòng và điều trị bệnh ĐTĐ. Chế độ ăn, uống cần đảm bảo cung cấp đủ dinh dưỡng, năng lượng, nước và điện giải cần thiết cho bệnh nhân và không làm đường huyết tăng cao, kiểm soát đường huyết trong giới hạn cho phép [106]. Nghiên cứu của chúng tôi đã sản xuất ra được đồ uống CSLL từ dịch chiết của cây CSLL thu hái tại Bình Dương để sử dụng cho người bị ĐTĐ. Sản phẩm dễ uống, mùi vị phù hợp với đa số thị hiếu của người Việt Nam, trong đó có người bị ĐTĐ, giúp cung cấp thêm nước và bổ sung một lượng phù hợp hoạt chất có lợi cho việc kiểm soát đường huyết của bệnh nhân đó là flavonoids.

Kiểm soát chặt glucose máu là mục tiêu hàng đầu trong điều trị ĐTĐ, nhưng đây lại là nguy cơ hàng đầu gây cơn hạ glucose máu. Mục tiêu điều trị đối với bệnh nhân ĐTĐ là duy trì nồng độ glucose máu khi đói gần với mức bình thường, không có hạ glucose máu [106]. Bệnh ĐTĐ là bệnh rối loạn chuyển hóa glucid, nhưng lâu dần sẽ kéo theo rối loạn chuyển hóa lipid máu, và ngược lại khi rối loạn chuyển hóa lipid máu lâu ngày cũng kéo theo rối loạn chuyển hóa glucid [105, 106]. Đái tháo đường cũng là điều kiện thuận lợi cho những tổn thương mạch máu. So với những người cùng độ tuổi, nghề nghiệp thì người ĐTĐ gặp phải tổn thương mạch máu nhiều gấp 10 lần những người không mắc bệnh. Phần lớn các tổn thương mạch máu trong bệnh ĐTĐ đều là hậu quả của việc rối loạn chuyển hóa lipid máu. Chính vì vậy rối loạn chuyển hóa lipid máu trên bệnh nhân ĐTĐ, nếu không được điều trị kịp thời, sẽ làm cho biến chứng của bệnh ĐTĐ xuất hiện sớm và nặng lên rất nhiều, nhất là biến chứng về tim mạch [43, 105, 106].

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng các flavonoid của cây CSLL có tác dụng kích thích insulin, làm ảnh hưởng đến hoạt động của các enzyme trong quá trình chuyển hóa đường giúp cơ thể cân bằng trong quá trình chuyển hóa glucid. Tác động bảo vệ của các flavonoid đối với tim mạch cũng đã được chứng minh do khả năng của chúng trong việc ngăn ngừa sự oxi hóa các lipoprotein tỷ trọng thấp, phòng ngừa xơ vữa động mạch, chặn sự kết tụ huyết khối, điều hòa nhịp tim, ngăn ngừa bệnh mạch vành và nhồi máu cơ tim, điều hòa huyết áp [97, 133]. Do vậy sử dụng đồ uống CSLL cung cấp cho cơ thể một lượng hợp lý flavonoid giúp người bị ĐTĐ kiểm soát hiệu quả glucose máu, làm giảm rối loạn chuyển hóa lipid, giúp bền thành mạch và là hướng tiếp cận hiệu quả cho các nghiên cứu trong tương lai gần nhằm hỗ trợ điều trị, giảm nhẹ các biến chứng trên bệnh nhân ĐTĐ.

Một nghiên cứu gần đây chứng tỏ quercetin có vai trò chính trong kích thích chuyển hóa glucose bằng cách tăng cường hoạt động của glucokinase gan,

tăng giải phóng insulin từ các tế bào beta bằng cách tăng nồng độ canxi nội bào, giúp ổn định đường huyết [76]. Kết quả kiểm nghiệm sản phẩm đồ uống CSLL tại Phòng thử nghiệm đạt chuẩn quốc gia thuộc Viện Dinh dưỡng Quốc gia cho thấy hàm lượng quercetin đạt 0,76 $\mu\text{g/ml}$. Đây là cơ sở khoa học, cho thấy tiềm năng phát triển của sản phẩm dạng nước từ cỏ sữa lá lớn trong kiểm soát glucose máu.

Việc đa dạng hóa các sản phẩm dinh dưỡng, trong đó có đồ uống ứng dụng trong bảo vệ sức khỏe ngày càng trở nên cần thiết nhằm đáp ứng nhu cầu của các đối tượng khác nhau trong cộng đồng cũng chính là phương hướng phát triển của các doanh nghiệp sản xuất, kinh doanh thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Đồng thời, các sản phẩm bảo vệ sức khỏe trên sẽ góp phần vào việc hỗ trợ điều trị và dự phòng các bệnh mạn tính không lây nói chung và bệnh ĐTĐ nói riêng, góp phần thực hiện chiến lược quốc gia phòng chống các bệnh không lây nhiễm ở Việt Nam.

4.4. Những ưu điểm và tính mới của nghiên cứu

- Lần đầu tiên đã mô tả toàn diện về đặc điểm thực vật và một số thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn phát triển tự nhiên tại Bình Dương, bổ sung các thông tin mới về loại thảo dược này vào cơ sở dữ liệu về các loại thảo dược ở Việt Nam, làm nền tảng cho việc khai thác các hợp chất thiên nhiên tạo ra các sản phẩm có lợi cho sức khỏe cộng đồng.

- Đã nghiên cứu một cách hệ thống, bài bản về tính hiệu quả và đặc biệt là tính an toàn trong việc sử dụng thảo dược này trong phòng chống đái tháo đường ở Việt Nam.

- Đã chứng minh được cơ chế làm giảm đường huyết của CSLL là do khả năng ức chế các enzyme thủy phân carbohydrate như α -amylase và α -glucosidase. Bởi có sự ức chế các enzyme này nên việc hấp thu glucose vào máu là thấp nhất. Đây là cơ sở khoa học chứng minh tác dụng của CSLL đối với việc làm giảm chỉ số đường huyết ở chuột bị gây ĐTĐ ở qui mô thực nghiệm

- Đã xây dựng được qui trình công nghệ điều chế cao chiết CSLL trên cơ sở xác định các điều kiện công nghệ trích ly, cô đặc và sấy tối ưu. Từ cao chiết CSLL có thể dễ dàng điều chế các dạng thực phẩm như viên nang, đồ uống.

- Xây dựng được qui trình công nghệ tạo ra sản phẩm cao điều chế từ CSLL có hàm lượng flavonoid cao, có thể ứng dụng sản xuất các sản phẩm khác nhau trong phòng chống ĐTD (viên nang, bột, đồ uống...). Đã tạo ra sản phẩm đồ uống dinh dưỡng giàu flavonoid từ thảo dược có nguồn gốc tự nhiên. Đây là lĩnh vực ở Việt Nam chưa phát triển nhiều, cần được đẩy mạnh trong thời gian tới, góp phần nâng cao sức khỏe cộng đồng.

4.5. Những hạn chế của nghiên cứu

Trong khuôn khổ của đề tài luận án, chúng tôi chưa có điều kiện áp dụng các phương pháp chiết tách khác nhau, do vậy chưa so sánh được hiệu suất chiết flavonoid cũng như chưa phân tích một cách đầy đủ các thành phần hóa học có hoạt tính sinh học cao trong hợp chất flavonoid từ cây CSLL.

KẾT LUẬN

Quá trình nghiên cứu của luận án đã thu được một số kết quả chính là:

1. Đặc điểm thực vật, thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn tại Bình Dương

1.1. Về đặc điểm thực vật

Cỏ sữa lá lớn tại Bình Dương đã được nghiên cứu và xác định có tên khoa học là *Euphorbia hirta* L., họ Thầu dầu (Euphorbiaceae). Cây cao từ 20-50 cm, rễ cọc, màu vàng nâu, lá đơn, mọc đối.

1.2. Về thành phần hóa học

- Phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn có chứa: flavonoid, saponin, tanin, alcaloid, đường khử, polysaccharid, sterol. Nhóm flavonoid trong cỏ sữa lá lớn chứa chủ yếu là quercitrin.

- Hàm lượng flavonoid toàn phần trong phần trên mặt đất cỏ sữa lá lớn tính theo quercitrin là $0,375 \pm 0,014$ % trong dược liệu khô tuyệt đối.

2. Điều chế cao cỏ sữa lá lớn, đánh giá tính an toàn và hiệu quả của chế phẩm trong kiểm soát glucose máu

2.1. Điều chế cao cỏ sữa lá lớn

Điều kiện thích hợp và đạt hiệu suất cho điều chế cao chiết CSLL là: Kích thước nguyên liệu 2-3cm; chiết xuất 3 lần với tỷ lệ dược liệu/dung môi 10/8/8 trong thời gian chiết xuất tương ứng 2,5h/2h/1,5h ở nhiệt độ chiết 95°C, sau đó cô trên bếp cách thủy ở 70°C.

Hàm lượng flavonoid toàn phần đạt 20-21 mg/g cao khô (độ ẩm $\leq 5\%$)

2.2. Đánh giá tính an toàn của cao cỏ sữa lá lớn

Cao cỏ sữa lá lớn đã được xác định đảm bảo an toàn trên động vật thực nghiệm:

- Độc tính cấp: xác định được giá trị LD₅₀ là 26,8 g cao/kg thể trọng chuột nhắt trắng.

- Độc tính bán trường diễn: sử dụng liều 0,3 g cao/kg và 3,0 g cao/kg bằng đường uống trong 30 ngày trên chuột cống trắng đã cho thấy không ảnh hưởng đến tình trạng toàn thân, sự phát triển khối lượng cơ thể, chức năng tạo máu, chức năng gan, thận, đại thể cơ quan và mô bệnh học.

2.3. Đã đánh giá được hiệu quả của cao cỏ sữa lá lớn trong kiểm soát glucose máu

- Khả năng ức chế hoạt động của enzyme α -amylase và α -glucosidase với giá trị IC50 tương ứng được xác định là 967 μ g/mL và 53,96 μ g/mL.

- Sử dụng cao chiết cỏ sữa lá lớn liều 500 mg/kg thể trọng trong 8 tuần có tác dụng hỗ trợ giảm glucose máu trên chuột đái tháo đường thực nghiệm: nồng độ glucose máu ở nhóm chuột can thiệp thấp hơn đáng kể so với ở nhóm chuột đái tháo đường chứng ($10,2 \pm 1,3$ mmol/L so với $14,3 \pm 1,5$ mmol/L, $p < 0,05$).

3. Đã ứng dụng cao cỏ sữa lá lớn để sản xuất đồ uống dinh dưỡng dùng trong kiểm soát glucose máu

Quy trình sản xuất thử nghiệm đồ uống dinh dưỡng từ cao chiết CSLL đã được xây dựng với công thức: cao Cỏ sữa lá lớn 25 g/L, mật ong 25 g/L; chất tạo ngọt 0,3 g/L; gừng 10 g/L; sản phẩm được đóng lon 200ml và thanh trùng ở điều kiện 90°C trong 10 phút đã tạo ra sản phẩm có hàm lượng flavonoid toàn phần là 80,3 mg/100ml, đạt chất lượng tốt về mặt dinh dưỡng, cảm quan và đảm bảo yêu cầu theo QCVN 6-2:2010/BYT. Sản phẩm được đánh giá cao bởi người tiêu dùng (85,7% thích màu, 89,8% thích mùi hương và 87,7% thích vị).

KHUYẾN NGHỊ

1. Tiếp tục nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng và thử nghiệm trên cộng đồng về hiệu quả kiểm soát glucose máu, chống oxy hóa của đồ uống CSLL trong hỗ trợ phòng và điều trị bệnh đái tháo đường.
2. Tiếp tục hoàn thiện qui trình công nghệ sản xuất đồ uống CSLL và ứng dụng ở qui mô công nghiệp.
3. Đề nghị các cơ quan nghiên cứu và quản lý nhà nước quan tâm trong việc phát triển vùng trồng cây CSLL, nâng cao chất lượng nguồn thảo dược này ứng dụng trong chăm sóc và nâng cao sức khỏe của nhân dân.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyễn Mạnh Thắng, Nguyễn Công Khẩn, Trương Tuyết Mai, Nguyễn Thu Hằng, Nguyễn Thị Thúy Quỳnh (2018). Nghiên cứu đặc điểm của cây cỏ sữa lá lớn tại tỉnh Bình Dương. *Tạp chí Dược học*. Số 511, tr. 77-81.
2. Nguyễn Mạnh Thắng, Nguyễn Công Khẩn, Trương Tuyết Mai, Trương Hoàng Kiên, Phạm Thị Nguyệt Hằng (2017). Nghiên cứu tác dụng chống đái tháo đường thực nghiệm và tính an toàn của cao chiết nước cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* L.). *Tạp chí Dược học*. Số 497, tr. 51-53.
3. Nguyễn Mạnh Thắng, Nguyễn Công Khẩn, Trương Tuyết Mai, Hoàng Liên Hương, Nguyễn Đức Hạnh (2019). Nghiên cứu thử nghiệm sản xuất nước giải khát cỏ sữa từ cao chiết cỏ sữa lá lớn. *Tạp chí Dinh dưỡng và An toàn thực phẩm*. Số 15(4), tr. 73-82.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Bệnh viện Nội tiết Trung ương (2006), *Dịch tễ học bệnh đái tháo đường ở Việt Nam các phương pháp điều trị và biện pháp dự phòng*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Bệnh viện Nội tiết Trung ương (2013), *Báo cáo Hội nghị tổng kết hoạt động của Dự án phòng chống đái tháo đường quốc gia năm 2012 và triển khai kế hoạch 2013*, Hà Nội.
3. Bệnh viện Nội tiết Trung ương (2014), *Báo cáo kết quả điều tra dịch tễ học bệnh đái tháo đường toàn quốc năm 2012*.
4. Bộ Khoa học và Công nghệ (2005), Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4991:2005 (ISO 7937 : 2004) về Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp định lượng *Clostridium perfringens* trên đĩa thạch - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.
5. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007), Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2006). Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng coliform – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.
6. Bộ Khoa học và Công nghệ (2008), Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng *Escherichia coli* dương tính b-glucuronidaza – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl β -D-glucuronid.
7. Bộ Khoa học và Công nghệ (2009), Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 6189-2:2009 (ISO 7899 - 2 : 2000) về Chất lượng nước - Phát hiện và đếm khuẩn đường ruột - Phần 2: Phương pháp màng lọc.
8. Bộ Khoa học và Công nghệ (2010), Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8275-1:2010 (ISO 21527-1:2008). Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước lớn hơn 0,95, chủ biên.

9. Bộ Khoa học và Công nghệ (2011), Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8881:2011 (ISO 16266:2006) về Chất lượng nước - Phát hiện và đếm *Pseudomonas aeruginosa* - Phương pháp màng lọc.
10. Bộ Khoa học và Công nghệ (2015), Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013). Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Phương pháp định lượng vi sinh vật - Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30°C bằng kỹ thuật đổ đĩa.
11. Bộ Khoa học và Công nghệ (2017), Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017). Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định typ huyết thanh của *Salmonella* – Phần 1: Phương pháp phát hiện *Salmonella* spp..
12. Bộ môn Dược liệu (2012), *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*, Trường Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh, thành phố Hồ Chí Minh.
13. Bộ Y tế (2015), *Báo cáo chung tổng quan ngành y tế năm 2014: Tăng cường dự phòng và kiểm soát bệnh không lây nhiễm*, Nhà xuất bản Y học.
14. Bộ Y tế (2016), *Báo cáo chung Tổng quan ngành Y tế năm 2015 – Tăng cường y tế cơ sở hướng tới bao phủ chăm sóc sức khỏe toàn dân*, Nhà xuất bản Y học.
15. Bộ Y tế (2017), "Quyết định số 3319/QĐ-BYT ngày 19/7/2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị đái tháo đường type 2”.”.
16. Bộ Y tế (2018), *Báo cáo chung tổng quan ngành y tế năm 2016. Hướng tới mục tiêu già hóa khỏe mạnh ở người Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học.
17. Cao Huy Bình và các cộng sự. (2016), "Phân lập, xác định cấu trúc và đánh giá tác dụng chống oxy hóa của một số flavonoid từ cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* L.)", *Tạp chí Dược học*. T. 56(S. 2).
18. Cao Mỹ Phượng (2012), *Nghiên cứu kết quả can thiệp cộng đồng phòng chống tiền đái tháo đường - đái tháo đường type 2 tại huyện Cầu Ngang, tỉnh Trà Vinh*, Trường Đại học Y Dược - Đại học Huế, Thừa Thiên Huế.

19. Cục Y tế Dự phòng - Bộ Y tế (2017), *Điều tra quốc gia yếu tố nguy cơ bệnh không lây nhiễm Việt Nam 2015-2016*.
20. Đại học Y tế Công cộng (2016), *Dịch tễ học các bệnh không truyền nhiễm: giáo trình cử nhân y tế công cộng*, Nhà xuất bản Y học.
21. Đái Xuân Trang và các cộng sự. (2013), "Khảo sát ảnh hưởng của cao chiết cây nhàu (*Morinda Citrifolia* L.) đến hoạt động của enzyme glucose-6-phosphatase ở chuột bệnh tiểu đường", *Tạp chí khoa học Trường đại học Cần Thơ*. 25, tr. 50-57.
22. Đỗ Tất Lợi (2001), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học.
23. Đỗ Trung Đàm (2014), "Phương pháp xác định độc tính của thuốc, Nhà xuất bản Y học – Hà Nội".
24. Hà Duyên Tư (2010), *Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật.
25. Lê Tuấn Anh, Đặng Xuân Cường và Vũ Ngọc Bội (2017), "Ảnh hưởng của quá trình chế biến lên chất lượng đồ uống giàu polyphenol từ thân cây ngô", *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*. Số 2/2017.
26. Lý Ngọc Trâm và Bùi Quang Thuật (2013), "Hội nghị Nghiên cứu và Phát triển các sản phẩm tự nhiên lần 3, Nghiên cứu công nghệ chiết tách flavonoid từ vỏ quả citrus".
27. Ngô Vân Thu và Trần Hùng (2011), *Dược liệu học*, Nhà xuất bản Y học.
28. Nguyễn Thị Hiền và cộng sự (2016), *Công Nghệ Sản xuất Bia và Nước Giải khát*, Nhà xuất bản Lao động.
29. Nguyễn Bin (2016), *Các quá trình, thiết bị trong công nghệ hóa học và công nghệ thực phẩm*, Vol. 4, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật.
30. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, NXB ĐH quốc gia TP.HCM.
31. Nguyễn Nghĩa Thìn (1999), *Khóa xác định và hệ thống họ Thầu Dầu Việt Nam*, NXB Nông Nghiệp, Hà Nội.

32. Nguyễn Thị Hoàng Lan, Bùi Quang Thuật và Lê Danh Tuyên (2018), "Nghiên cứu công nghệ khai thác dầu hạt tía tô", *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 16(4), tr. 389-397.
33. Nguyễn Thị Hoàng Lan, Bùi Quang Thuật và Lê Danh Tuyên (2018), "Xác định các thông số để xây dựng quy trình công nghệ chưng cất tinh dầu lá tía tô", *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 16(3), tr. 275-281.
34. Nguyễn Thu Hằng (2014), "Nghiên cứu đặc điểm hiển vi của cỏ sữa lá to và cỏ sữa lá nhỏ", *Tạp chí Dược học*. 455, tr. 51-57.
35. Nguyễn Văn Hân (2017), *Kỹ thuật chiết xuất dược liệu, Giáo trình Đào tạo Dược sĩ đại học, Trường Đại học Dược Hà Nội*.
36. Phan Minh Giang và các cộng sự (2012), "Nghiên cứu các thành phần hóa học của cây cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* L., Euphorbiaceae)", *Tạp chí Hóa học*. 50(4), tr. 440-443.
37. Phan Văn Cư và các cộng sự. (2019), "Tách chiết hoạt chất sinh học từ cây cỏ sữa lá nhỏ (*Euphorbia thymifolia* BURM. (L.)) và đánh giá khả năng kháng khuẩn đối với vi khuẩn *E. Coli* và *Salmonella* sp. gây tiêu chảy trên lợn con tại tỉnh Thừa Thiên - Huế", *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 128(3), tr. 5-14.
38. Phí Ngọc Quyên, Trương Hoàng Kiên và Trương Tuyết Mai (2013), "Khả năng kiểm soát đường huyết sau ăn của sản phẩm trà cỏ sữa trên bệnh nhân đái tháo đường type 2", *Tạp chí Y học thực hành*. 10(881), tr. 181-185.
39. Phùng Thanh Hương (2010), *Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết và ảnh hưởng trên chuyển hóa glucose của dịch chiết lá bằng lã nước ở Việt Nam*, Trường đại học Dược Hà Nội.
40. QCVN 6-2:2010/BYT Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với các sản phẩm đồ uống không cồn (2010).

41. Tạ Văn Bình (2003), *Dịch tễ học bệnh đái tháo đường. Các yếu tố nguy cơ và các vấn đề liên quan đến quản lý bệnh đái tháo đường tại khu vực nội thành 4 thành phố lớn*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
42. Tạ Văn Bình và Hoàng Kim Ước (2004), *Báo cáo tóm tắt những kết quả chính của nghiên cứu “Dịch tễ học bệnh đái tháo đường, các yếu tố nguy cơ và các vấn đề liên quan đến quản lý bệnh đái tháo đường trong phạm vi toàn quốc”, Một số công trình nghiên cứu khoa học tiêu biểu của các Dự án Quốc gia thực hiện tại Bệnh viện Nội tiết 1969 – 2003*, Nhà xuất bản Y học.
43. Tạ Văn Bình và Hoàng Kim Ước (2009), *Dịch tễ học bệnh đái tháo đường và Hội chứng chuyển hóa tại một số vùng sinh thái của Việt Nam”, Đề tài nghiên cứu cấp bộ, Bệnh viện Nội tiết.*
44. Thủ tướng Chính phủ (2015), *Quyết định số 376/QĐ-TTg ngày 20/3/2015 của Thủ tướng Chính phủ về việc Phê duyệt Chiến lược quốc gia phòng, chống bệnh ung thư, tim mạch, đái tháo đường, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, hen phế quản và các bệnh không lây nhiễm khác, giai đoạn 2015-2025.*
45. Thủ tướng Chính phủ (2013), *Quyết định số 122/QĐ - TTg của Thủ tướng Chính phủ : Phê duyệt Chiến lược quốc gia bảo vệ, chăm sóc và nâng cao sức khỏe nhân dân giai đoạn 2011 - 2020, tầm nhìn đến năm 2030.*
46. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7041:2009 về đồ uống không cồn (2009).
47. Tổng cục Thống kê (2009), *Kết quả tổng điều tra dân số và nhà ở năm 2009.*
48. Trần Hữu Dàng (1996), *Nghiên cứu về tình hình và đặc điểm đái tháo đường ở Huế, Luận án Tiến sĩ Y học, Trường Đại Học Y Hà Nội, Hà Nội.*

49. Trần Thị Kim Ngân và các cộng sự. (2017), "Khảo sát thành phần hóa học của dịch chiết ethyl acetate từ cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* Linn.)", *Tạp chí Phát triển KH&CN*. 20(T5), tr. 95-101.
50. Trần Văn Ôn, Phùng Thanh Hương và Đỗ Anh Vũ (2008), "Tác dụng hạ đường huyết của cây Dây thìa canh (*Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Schult) ở Việt Nam", *Tạp chí Dược học*. 391, tr. 31-34.
51. Trương Hoàng Kiên (2017), *Hiệu quả sử dụng trà cỏ sữa kết hợp chế độ ăn và tập luyện trên người 40-69 tuổi có rối loạn glucose máu lúc đói tại thành phố Hạ Long. Luận án tiến sĩ y học - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương*.
52. Trương Tuyết Mai và các cộng sự. (2010), "Kiểm soát glucose huyết sau ăn trên bệnh nhân đái tháo đường type 2 sau uống nụ Vôi", *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*. 6, tr. 14-24.
53. Trương Tuyết Mai, Nguyễn Xuân Ninh và Nguyễn Thị Lâm (2009), "Đánh giá chất lượng của trà nụ vôi dưới nhiều hình thái và cách pha chế", *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*. 5(2), tr. 14-24.
54. *Từ điển cây thuốc Việt Nam. Vol. 1* (2012), Nhà xuất bản Y học.
55. Viện Dinh Dưỡng *Kết quả điều tra Thừa cân - béo phì và một số yếu tố liên quan ở người Việt Nam 25- 64 tuổi năm 2005-2006*.
56. Viện Dược Liệu (2002), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Vol. 1, NXB Y học, 503-505.
57. Viện Dược liệu (2008), *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật
58. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam, Tập 1*. Nhà xuất bản Y học. Tr.544-545.

TIẾNG ANH

59. Adedapo AA, et al. (2003), "Morphaometric and histopathological studies on the effects of some chromatographic fractions of *Phyllanthus amarus* and *Euphorbia hirta* on the male reproductive organs of rats", *J Vet Sci.* 4(2), pp. 181-185.
60. Alkhalidy, H., Wang, Y., and Liu, D. (2018), "Dietary Flavonoids in the Prevention of T2D: An Overview", *Nutrients.* 10(4).
61. American Diabetes Association (2007), "Nutrition recommendation and intervention for diabetes: a position statement by American Diabetes Association", *Diabetes Care.* 30(1), pp. 48-65.
62. American Diabetes Association (2013), "*Diagnosis and classification of diabetes mellitus*", *Diabetes Care.*
63. American Diabetes Association (2019), "Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes - 2019", *Diabetes Care.* 42(Suppl. 1), pp. S13–S28.
64. Amit Jain and Sirshendu De (2016), "Aqueous extraction of bitter gourd (*Momordica Charantia* L.) juice and optimization of operating conditions", *Fruits.* 71, pp. 379-387.
65. Anderson, R. A. and Polansky, M. M. (2002), "Tea enhances insulin activity", *J Agric Food Chem.* 50(24), pp. 7182-6.
66. Anup Kumar Maurya, et al. (2012), "Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of *Euphorbia hirta* in streptozotocin induced diabetic rats", *Der Pharmacia Lettre.* 4(2), pp. 703-707.
67. AOAC (2002), "AOAC Official Method 2002.01 Measurement of α -Amylase Activity in White Wheat Flour, Milled Malt, and Microbial Enzyme Preparations".
68. Asha S, Thirunavukkarasu P, and Mohamad Sadiq A (2015), "Phytochemical screening of *Euphorbia hirta* linn leaf extracts", *World Journal of Pharmaceutical Sciences.* 3(6), pp. 2321-3310.

69. Ashraf, R., Khan, R. A., and Ashraf, I. (2011), "Garlic (*Allium sativum*) supplementation with standard antidiabetic agent provides better diabetic control in type 2 diabetes patients", *Pak J Pharm Sci.* 24(4), pp. 565-70.
70. Azwanida NN (2015), "A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation", *Medicinal Aromatic Plants.* 4, p. 3.
71. Babujanarthanam R, Kavitha P, and Rajalakshmi G (2011), "Antihyperglycaemic and Antioxidant Role of Quercitrin, a Bio-Flavonoid, in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rat tissues", *Journal of Pharmacy Research.* 4(10), pp. 3833-3837.
72. Babujanarthanam, R., et al. (2011), "Quercitrin a bioflavonoid improves the antioxidant status in streptozotocin: induced diabetic rat tissues", *Mol Cell Biochem.* 358(1-2), pp. 121-9.
73. Babujanarthanam, R., Kavitha, P., and Pandian, M. R. (2010), "Quercitrin, a bioflavonoid improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes", *Fundam Clin Pharmacol.* 24(3), pp. 357-64.
74. Bae, Eun-Ah, and al. (2000), ""In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity", *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 23(9), pp. 1122-1124.
75. Bailey, C. J. and Day, C. (1989), "Traditional plant medicines as treatments for diabetes", *Diabetes Care.* 12(8), pp. 553-64.
76. Bardy, G., et al. (2013), "Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells", *Br J Pharmacol.* 169(5), pp. 1102-13.
77. Basma, A. A., et al. (2011), "Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L", *Asian Pac J Trop Med.* 4(5), pp. 386-90.

78. Baynes, J. W. (1991), "Role of oxidative stress in development of complications in diabetes", *Diabetes*. 40(4), pp. 405-12.
79. Binh, T. Q., et al. (2014), "Metabolic syndrome among a middle-aged population in the Red River Delta region of Vietnam", *BMC Endocr Disord*. 14, p. 77.
80. Butsat S and Siriamornpun S (2016), "Effect of solvent types and extraction times on phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity in leaf extracts of *Amomum chinense* C.", *International Food Research Journal*. 23(1), pp. 180-187.
81. Caltagirone, S., et al. (2000), "Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential", *Int J Cancer*. 87(4), pp. 595-600.
82. Canada, Diabetes (2018), "Clinical Practice: New 2018 Guidelines".
83. CDC (2014), *National diabetes statistics report: estimates of diabetes and its burden in the United States*.
84. Cermak, R., Landgraf, S., and Wolffram, S. (2004), "Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum", *Br J Nutr*. 91(6), pp. 849-55.
85. Cheynier, V. (2005), "Polyphenols in foods are more complex than often thought", *Am J Clin Nutr*. 81(1 Suppl), pp. 223S-229S.
86. Chipiti, T., et al. (2015), "In vitro alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory effects and cytotoxic activity of *Albizia antunesiana* extracts", *Pharmacogn Mag*. 11(Suppl 2), pp. S231-6.
87. Chiva-Blanch, G. and Badimon, L. (2017), "Effects of Polyphenol Intake on Metabolic Syndrome: Current Evidences from Human Trials", *Oxid Med Cell Longev*. 2017, p. 5812401.
88. Chunhao Yu, et al. (2013), "Different extraction pretreatments significantly change the flavonoid contents of *Scutellaria baicalensis*", *Pharm Biol*. 51(10), pp. 1228–1235.

89. Collaborators, G. B. D. Risk Factors (2016), "Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015", *Lancet*. 388(10053), pp. 1659-1724.
90. Comalada, M., et al. (2005), "In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway", *Eur J Immunol*. 35(2), pp. 584-92.
91. Ekpo, O. E. and Pretorius, E. (2007), "Asthma, *Euphorbia hirta* and its anti-inflammatory properties", *South African Journal of Science*. 103(5-6), pp. 201-203.
92. Ernst, M., et al. (2015), "Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae)", *J Ethnopharmacol*. 176, pp. 90-101.
93. Fen M and Yuh J (2012), "Potential Applications of *Euphorbia hirta* in Pharmacology", *Drug Discovery Research in Pharmacognosy*.
94. Geeta Singh and Padma Kumar (2016), "Phytochemical study and screening for antimicrobial activity of flavonoids of *Euphorbia hirta*", *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. 3(2), pp. 111-116.
95. Gorzynik-Debicka, M., et al. (2018), "Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols", *Int J Mol Sci*. 19(3).
96. Guasch-Ferre, M., et al. (2017), "Dietary Polyphenols, Mediterranean Diet, Prediabetes, and Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence", *Oxid Med Cell Longev*. 2017, p. 6723931.
97. Harborne, J. B. and Williams, C. A. (2000), "Advances in flavonoid research since 1992", *Phytochemistry*. 55(6), pp. 481-504.
98. Hertog, M. G., et al. (1995), "Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study", *Arch Intern Med*. 155(4), pp. 381-6.

99. Hollman, P. C. H. and Arts, I. C. W. (2000), "Flavonols, flavones and flavanols: nature, occurrence and dietary burden", *J Sci Food Agric.* 80, pp. 1081–1093.
100. Hosoda, K., et al. (2003), "Antihyperglycemic effect of oolong tea in type 2 diabetes", *Diabetes Care.* 26(6), pp. 1714-8.
101. Huang, L., Chen, S., and Yang, M. (2012), "Euphorbia hirta (Feiyangcao): A review on its ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology", *Med. Plants Res.* 6(39), pp. 5176-5185.
102. Huilin Ni, et al. (2018), "Optimization of baicalin water extraction process from *Scutellaria baicalensis* (a traditional Chinese medicine) by using orthogonal test and HPLC", *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 28, pp. 151–155.
103. Huyen, V. T., et al. (2010), "Antidiabetic effect of *Gynostemma pentaphyllum* tea in randomly assigned type 2 diabetic patients", *Horm Metab Res.* 42(5), pp. 353-7.
104. International Diabetes Federation (2013), *Diabetes Atlas, 6th edition.*
105. International Diabetes Federation (2015), *Diabetes Atlas, 7th edition.* .
106. International Diabetes Federation (2017), *Diabetes Atlas, 8th edition.*
107. Jia, S., et al. (2017), "Recent Advances in *Momordica charantia*: Functional Components and Biological Activities", *Int. J. Mol. Sci.* 18, p. 2555.
108. Jokić S, et al. (2009), The effect of solvent and temperature on extraction yield of phenolic compounds from soybeans, antioxidant activity and colour of extracts, *5th International Congress FLOUR-BREAD '09*, Editor^Editors, pp. 293-299.
109. Kawasaki, K., et al. (2018), "Guava leaf extract suppresses osteoarthritis progression in a rat anterior cruciate ligament transection model", *Food Sci Nutr.* 6(4), pp. 800-805.

110. Kumar, et al. (2007), "In vitro antioxidant potential evaluation of *Euphorbia hirta* L", *Pharmacologyonline*. 1, pp. 91-98.
111. Kumar, S., Malhotra, R., and Kumar, D. (2010), "Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxydant activities of *Euphorbia hirta* stem extract", *International Research Journal of Pharmacy*. 1(1), pp. 150-156.
112. Kumar, S., Rashmi, and Kumar, D. (2010), "Evaluation of antidiabetic activity of *Euphorbia hirta* Linn. in streptozotocin induced diabetic mice", *India Journal of Natural Products and Resources*. 1(2), pp. 200-203.
113. Kwan, Y. P., et al. (2015), "Evaluation of the cytotoxicity, cell-cycle arrest, and apoptotic induction by *Euphorbia hirta* in MCF-7 breast cancer cells", *Pharm Biol*. 54(7), pp. 1223-36.
114. Leach, M. J. (2007), "Gymnema sylvestre for diabetes mellitus: a systematic review", *J Altern Complement Med*. 13(9), pp. 977-83.
115. Lei Yong-ping, et al. (2018), "Study On Extraction Of Flavonoids From Fruit Of *Rosa Davurica* Pall By Different Methods And Its Antioxidant Activity", *Topics in Chemical & Material Engineering*. 1(1), pp. 413-416.
116. Leung, L., et al. (2009), "Anti-diabetic and hypoglycaemic effects of *Momordica charantia* (bitter melon): a mini review", *Br J Nutr*. 102(12), pp. 1703-8.
117. Li, Y. Q., et al. (2009), "Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase", *J Agric Food Chem*. 57(24), pp. 11463-8.
118. Linfang Huang, Chen, Shilin, and Meihua Yang (2012), "*Euphorbia hirta* (Feiyangcao): A review on its ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology", *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(39), pp. 5176-5185.
119. Liu, Y. J., et al. (2014), "Dietary flavonoids intake and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies", *Clin Nutr*. 33(1), pp. 59-63.

120. Luna, B. and Feinglos, M. N. (2001), "Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus", *Am Fam Physician*. 63(9), pp. 1747-56.
121. Mai, T. T., et al. (2007), "Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents", *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 53(3), pp. 267-76.
122. Manjur Ali Sheliya, et al. (2016), "In vitro α -glucosidase and α -amylase inhibition by aqueous, hydroalcoholic, and alcoholic extract of *Euphorbia hirta* L.", *Drug Development and Therapeutics* 7(1), pp. 26-30.
123. Mariano Martínez-Vázquez, et al. (1999), " Anti-inflammatory Active Compounds from the n-Hexane Extract of *Euphorbia hirta*", *Revista de la Sociedad Química de México*. 43(3,4), pp. 103-105.
124. Mathivanan K, et al. (2014), "Phytochemical Potential of *Euphorbia hirta* Linn. and *Strychnos nuxvomica* Linn. With Reference to Antidiabetic and Antioxidant Properties", *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 6(4), pp. 1024-1031
125. Medagama, A. B. (2015), "The glycaemic outcomes of Cinnamon, a review of the experimental evidence and clinical trials", *Nutr J*. 14, p. 108.
126. Minh Tran, et al. (2018), "Phytochemical analysis and in vitro enzyme inhibitory activity of *Euphorbia Hirta* Linn extracts", *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 7(6), pp. 31-45.
127. Mukhtar, H. and Ahmad, N. (2000), "Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health", *Am J Clin Nutr*. 71(6 Suppl), pp. 1698S-702S; discussion 1703S-4S.
128. Neslihan, A., Savas, B. E. K., and Jale, A. (2005), " Influence of processing and pasteurization on color values and total phenolic compounds of pomegranate Juice", *Journal of Food Processing and Preservation*(29), pp. 357–368.

129. OECD (2011), *Repeated dose 28 day oral toxicity study in rodents (OECD TG 407)*". *OECD Guideline for The Testing of chemicals*.
130. Ogunlesi, M., et al. (2009), "Analysis of the essential oil from the dried leaves of *Euphorbia hirta* Linn (Euphorbiaceae), a potential medication for asthma", *African Journal of Biotechnology*. 8(24).
131. Pereira, D. F., et al. (2011), "Effects of flavonoids on alpha-glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis", *Nutrition*. 27(11-12), pp. 1161-7.
132. Prabhat Das, et al. (2010), "Pharmacological evaluation of anti-inflammatory activity of *Euphorbia hirta* against carrageenan induced paw edema in Rats", *Der Pharmacia Lettre*. 2(2), pp. 151-154.
133. Pranabesh Ghosh, et al. (2019), "Botanical Description, Phytochemical Constituents and Pharmacological Properties of *Euphorbia hirta* Linn: A Review", *International Journal of Health Sciences & Research*. 9(3), pp. 273-276.
134. Proenca, C., et al. (2017), "alpha-Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure-activity relationship study", *J Enzyme Inhib Med Chem*. 32(1), pp. 1216-1228.
135. Rajha, HN., et al. (2014), "Extraction of Total Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins and Tannins from Grape Byproducts by Response Surface Methodology. Influence of Solid-Liquid Ratio, Particle Size, Time, Temperature and Solvent Mixtures on the Optimization Process", *Food and Nutrition Sciences*. 5(4), pp. 1-13.
136. Reinehr, T. (2014), "Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents", *World J Diabetes*. 4(6), pp. 270-81.
137. Sathishkumar T, Baskar R, and Shanmugam S (2008), "Optimization of Flavonoids extraction from the leaves of *tabernaemontana heyneana* wall using L16 orthogonal design", *Nature and Science*. 6(3), pp. 10-21.

138. Scalbert, A., et al. (2005), "Dietary polyphenols and the prevention of diseases", *Crit Rev Food Sci Nutr.* 45(4), pp. 287-306.
139. Selvakumar, P., Devi Kaniakumari, and Loganathan, V. (2012), "Preliminary phytochemical investigation of extract of leaves and stem of *Euphorbia hirta*", *International Journal of Current Science*, pp. 48-51.
140. Sheng, Z. L., et al. (2013), "Optimization of Total Flavonoids Content Extracted from Flos Populi Using Response Surface Methodology", *Industrial Crops and Products.* 43, pp. 778-786.
141. Song, J., et al. (2002), "Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) and glucose transporter isoform 2 (GLUT2), intestinal transporters for vitamin C and Glucose", *J Biol Chem.* 277(18), pp. 15252-60.
142. Sukhdev Swami Handa (2008), *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International centre for science and high technology, Trieste.*
143. Tamboli, P., et al. (2008), "Hypoglycemic and anti-diabetic effect of ethanolic extract of *Euphorbia hirta* Linn", *R.C. Patel Institute of Pharmaceutical Education and Research, Shirpur, India.* 10/2008, p. 159.
144. Tamil, IG, et al. (2010), "In vitro study on α -amylase inhibitory activity of an Indian medicinal plant, *phyllanthus amarus*", *Indian Journal of Pharmacology.* 42, pp. 280–282.
145. Tongia, A., Tongia, S. K., and Dave, M. (2004), "Phytochemical determination and extraction of *Momordica charantia* fruit and its hypoglycemic potentiation of oral hypoglycemic drugs in diabetes mellitus (NIDDM)", *Indian J Physiol Pharmacol.* 48(2), pp. 241-4.
146. Trinh Quy and Le Ly (2014), "An investigation of antidiabetic activities of bioactive compounds in *Euphorbia hirta* Linn using molecular docking and pharmacophore", *Medicinal Chemistry Research.* 23(4), pp. 2033-2045.

147. Truong Tuyet Mai, Asano, and Nguyen Van Chuyen (2008), "On the anti-hyperglycemic effect of Nu Voi in vitro, in vivo and healthy human", *New Food Industry*. 50(3), pp. 16-19.
148. Tuhin, R. H., et al. (2017), "Wound healing effect of *Euphorbia hirta* linn. (Euphorbiaceae) in alloxan induced diabetic rats", *BMC Complement Altern Med*. 17(1), p. 423.
149. Uppal, G., Nigam, V., and Kumar, A. (2012), "Antidiabetic activity of ethanolic extract of *Euphorbia hirta* Linn.", *Der Pharmacia Lettre*. 4(4), pp. 1155-1161.
150. WHO (2013), *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023*.
151. Widharna, R. M., et al. (2010), "Anti Diabetes Mellitus Activity in vivo of Ethanolic Extract and Ethyl Acetate Fraction of *Euphorbia hirta* L. Herb", *International Journal of Pharmacology*. 6(3), pp. 231-240.
152. Wong JYR, et al. (2013), "The effects of *Euphorbia hirta* on the ultrastructure of the murine liver, kidney and aorta", *Exp Ther Med*. 6(5), pp. 1247–1250.
153. World Health Organization (2014), *Global health observation (GHO) data repository. Country data and statistics. Vietnam: country NCD profile*.
154. World Health Organization (2014,), "WHO Global Health Estimates (GHE): Disease and injury country mortality estimates".
155. World Health Organization (2016), *Global Report on Diabetes*.
156. World Health Organization (2016), *World Health Statistics 2016: monitoring health for the sustainable development goals, Geneva, Switzerland*.
157. XIAOQIAN DAI, et al. (2013), "Quercetin and quercitrin protect against cytokine-induced injuries in RINm5F β -cells via the mitochondrial pathway and NF- κ B signaling", *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*. 31, pp. 265-271.

158. Xie, J. T., McHendale, S., and Yuan, C. S. (2005), "Ginseng and diabetes", *Am J Chin Med.* 33(3), pp. 397-404.
159. Yuet Ping, K., et al. (2013), "Acute and subchronic toxicity study of *Euphorbia hirta* L. methanol extract in rats", *Biomed Res Int.* 2013, p. 182064.
160. Zare, R., et al. (2019), "Efficacy of cinnamon in patients with type II diabetes mellitus: A randomized controlled clinical trial", *Clin Nutr.* 38(2), pp. 549-556.
161. Bingtao Li and các cộng sự (2008), *Euphorbia, Flora of China.* 11, tr. 288-313.
162. Chen, L. (1991), "Polyphenols from leaves of *Euphorbia hirta* L.", *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 16(1), p. 38.
163. Dai, Y. L., et al. (2016), "[Review: plant polyphenols modulate lipid metabolism and related molecular mechanism]", *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 40(21), pp. 4136-41.
164. Qing-Wen Zhang, Li-Gen Lin, and Wen-Cai Ye (2018), "Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review", *Chin Med.* 13, p. 20.

WEBSITE

165. Bộ Y tế - Cục An toàn Thực phẩm, accessed, from <http://www.vfa.gov.vn/ngo-doc-thuc-pham.html>.
166. Tác dụng của Giáo cổ lam, accessed, from <http://www.thuocvuonnhua.com/c/giao-co-lam-co-nhung-tac-dung-gi/hoi-dap>.
167. Sheliya, M. A., et al. (2015), "Inhibition of alpha-glucosidase by new prenylated flavonoids from *euphorbia hirta* L. herb", *J Ethnopharmacol.* 176, pp. 1-8.

PHỤ LỤC 1 – QUÁ TRÌNH NGHIÊN CỨU

1. Hình ảnh nghiên cứu khảo sát đặc điểm thực vật và thành phần hóa học của CSLL



Khảo sát vùng cỏ sữa lá lớn



Khảo sát vùng cỏ sữa lá lớn



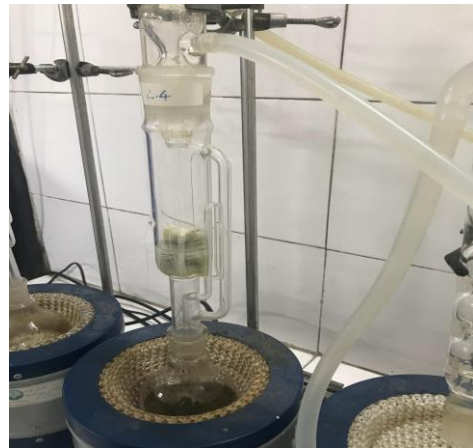
Cỏ sữa lá lớn tươi



Cỏ sữa lá lớn phơi khô



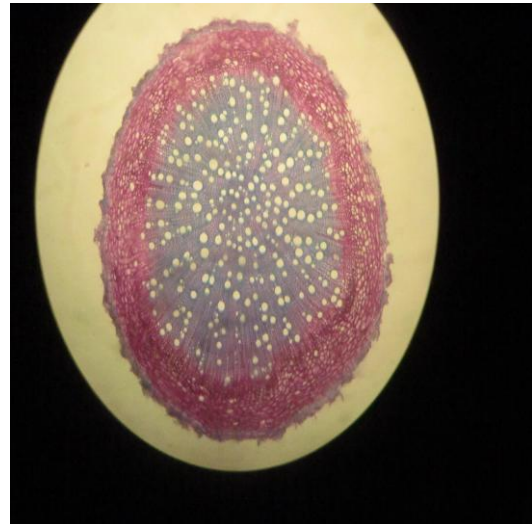
Thuyền tán nghiền CSLL



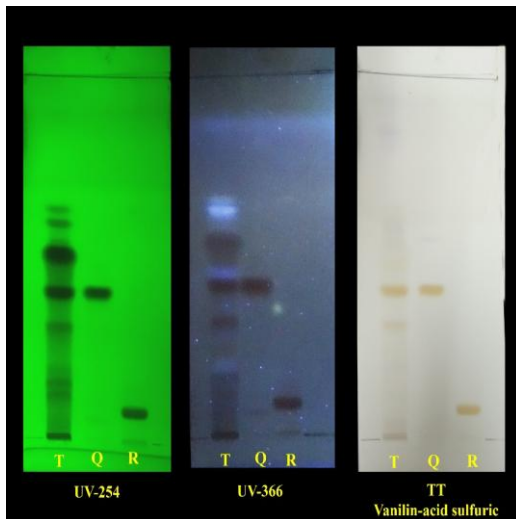
Chiết xuất dịch chiết CSLL



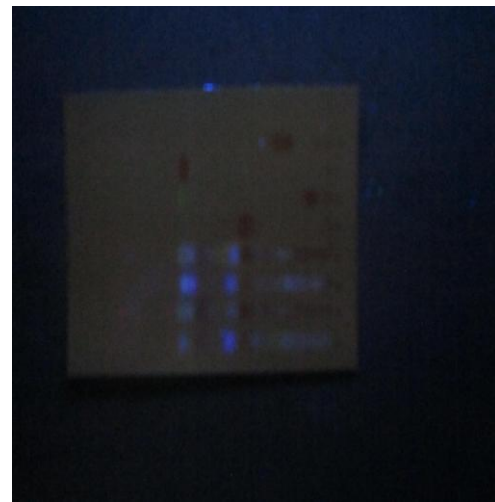
Ảnh vi phẫu



Ảnh vi phẫu



Sắc ký đồ phân đoạn ethyl axetat



Định lượng flavonoid toàn phần



Ảnh sắc ký

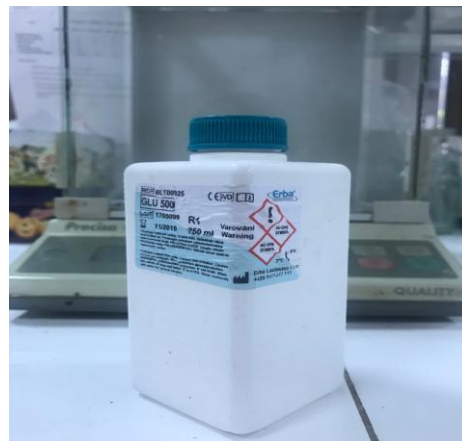


Khảo sát thành phần hóa học

2. Hình ảnh nghiên cứu đánh giá tính an toàn và hiệu quả trong việc kiểm soát glucose máu của cao chiết CSLL



Khảo sát khả năng ức chế enzyme



Kít định lượng glucose huyết trong thử nghiệm tính hiệu quả



Động vật đánh giá độc tính cấp



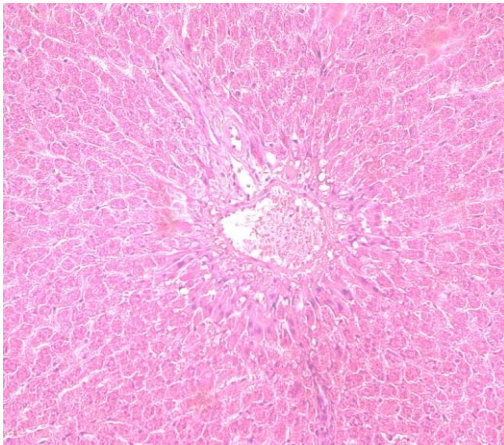
Động vật đánh giá độc tính bán trường diễn



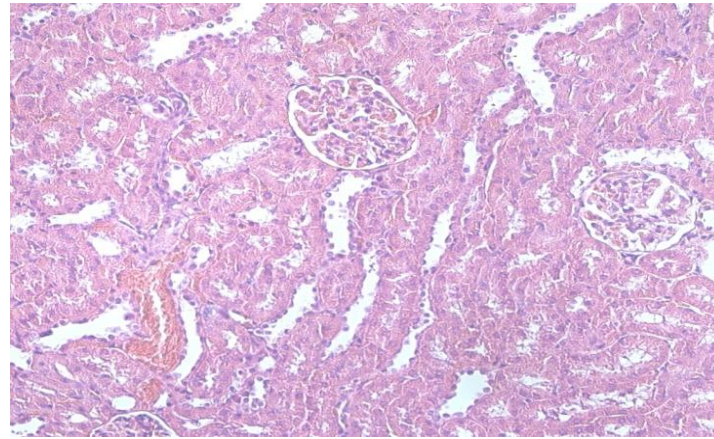
Hóa chất phục vụ đánh giá độc tính LTD (Kít định lượng của hãng Human)



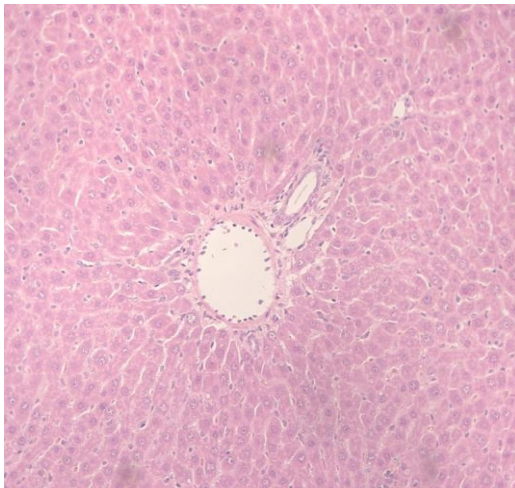
Nghiên cứu đánh giá độc tính LTD (Máy đo huyết học)



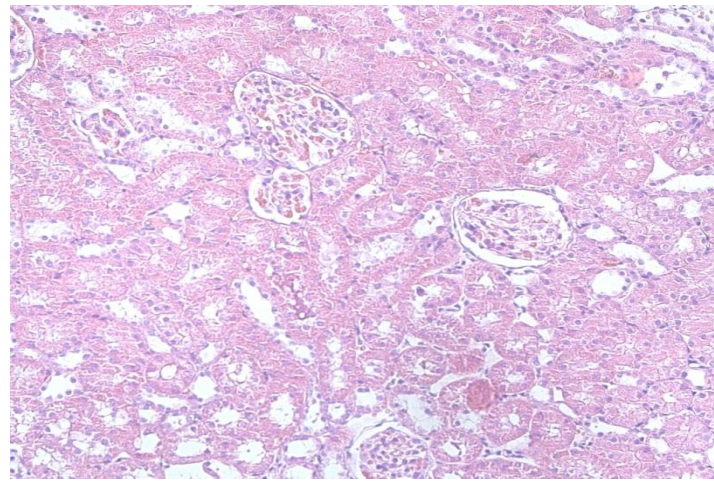
A1: Hình ảnh vi thể gan chuột sinh lý



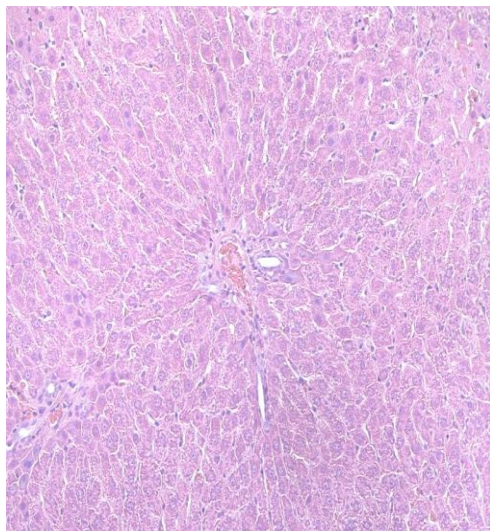
B1: thận chuột chứng sinh lý



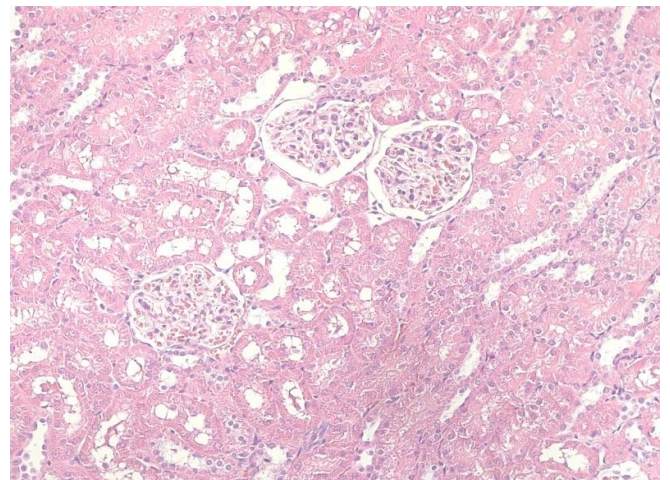
**A2: gan chuột uống cao cỏ sữa
liều 0,3 g/kg**



**B2:thận chuột uống cao chiết cỏ sữa
liều 0,3 g/kg.**



**A3: Gan chuột uống cao chiết
cỏ sữa liều 3,0 g/kg.**



**B3: thận chuột uống cao chiết cỏ
sữa liều 3,0 g/kg.**

3. Hình ảnh thử nghiệm sản xuất sản phẩm dinh dưỡng nước giải khát cỏ sữa từ dịch chiết CSLL



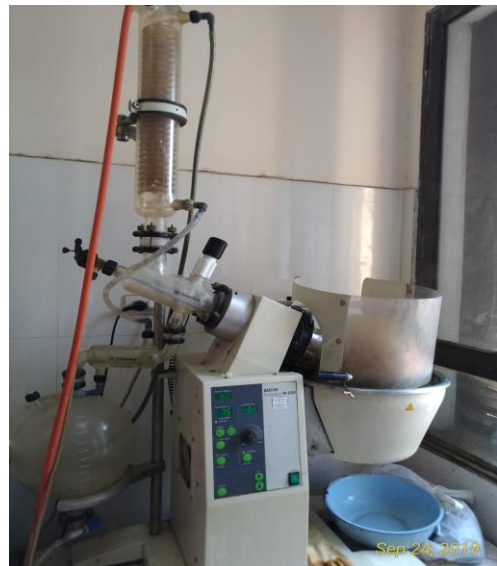
Cỏ sữa lá lớn tươi



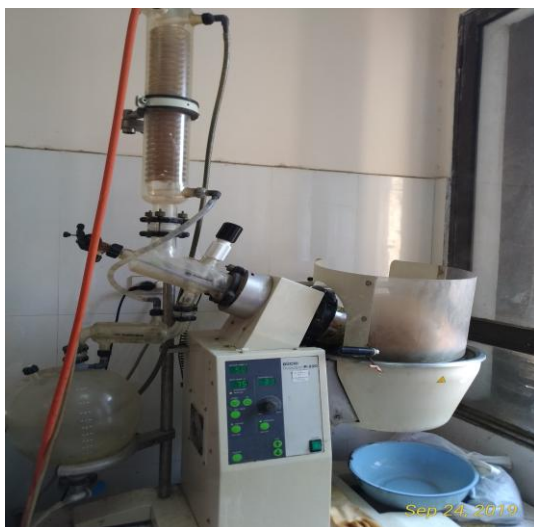
Cỏ sữa lá lớn khô



Cắt nhỏ cỏ sữa lá lớn



Chiết xuất cỏ sữa lá lớn



Cô đặc dịch chiết CSLL



Sấy dịch chiết sau cô đặc



Cao chiết CSLL chưa xay mịn



Cao chiết CSLL xay mịn



Pha chế nước giải khát CSLL



Đóng gói nước giải khát CSLL



Thanh trùng nước giải khát CSLL



Nhãn sản phẩm dinh dưỡng dự kiến

PHỤ LỤC 2 – CÁC TÀI LIỆU LIÊN QUAN QUÁ TRÌNH NGHIÊN CỨU

1. Phiếu đánh giá chấp nhận tại cộng đồng
2. Kết quả kiểm nghiệm sản phẩm tại Phòng thử nghiệm đạt tiêu chuẩn Quốc gia
3. Dự thảo công bố sản phẩm đồ uống dinh dưỡng từ cỏ sữa lá lớn
4. Cách tiến hành định tính các hợp chất trong cỏ sữa lá lớn bằng phản ứng hóa học

PHIẾU ĐÁNH GIÁ CHẤP NHẬN TẠI CỘNG ĐỒNG	Mã số:	01/VDD
	Ngày ban hành:/...../2019

Họ và tên (Full name):..... **Tình trạng sức khỏe (Medical condition):**.....

Tên mẫu (Name of sample):

Ngày cảm quan (Date):

Mục đích cảm quan: Đánh giá mức độ ưa thích (thị hiếu) của khách hàng (How much do you like or dislike the following sample).

Mẫu được đánh giá trên thang điểm 10	- Rất thích: 9 – 10	- Chấp nhận: 5 – 6
	- Thích: 7 – 8	- Không thích và rất không
Mức độ ưa thích (Like scale)	<i>Mẫu</i>	<i>Mẫu</i>
Màu sắc (Color)		
Mùi (Aroma)		
Vị (Taste)		

Ý kiến của người sử dụng

.....

Ký tên (Signature)



Số: 1871 /PKN-VDD

PHIẾU KẾT QUẢ KIỂM NGHIỆM
 (Chỉ có giá trị đối với mẫu khách hàng gửi)

Tên mẫu: Mẫu sản xuất thử nghiệm (nước giải khát có sữa lá lớn)
 Số lượng mẫu: 01
 Ngày nhận mẫu: 04/09/2019 Số PYC: 466/PYC-VDD Mã số mẫu PTN: 1909012
 Tình trạng mẫu: Mẫu dạng lỏng, đựng trong lon nhôm hàn kín, không có mẫu lưu
 Khách hàng: Nguyễn Mạnh Thắng
 Địa chỉ: Vụ Khoa học và Công nghệ - Bộ Công Thương
 Thời gian kiểm nghiệm: 05/09/2019

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

TT	Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	Kết quả	Phương pháp
1.	Flavonoid (tính theo catechin)	mg/100ml	80,3	NIN.G.01.M14
2.	Quercetin	µg/ml	0,76	NIN.G.01.M147
3.	Tổng số vi khuẩn hiếu khí*	CFU/ml	KPH	TCVN 4884:2015
4.	Coliforms*	CFU/ml	KPH	TCVN 6848:2007
5.	E.coli*	CFU/ml	KPH	TCVN 7924-2:2008
6.	S.aureus và Staphylococci coagulase(+)*	CFU/ml	KPH	TCVN 4830-1:2005
7.	Clostridium perfringens*	CFU/ml	KPH	TCVN 4991:2005
8.	Salmonella*	CFU/25ml	KPH	TCVN 10780-1:2017
9.	Tổng số bào tử nấm men – mốc*	CFU/ml	KPH	TCVN 8275-1:2010
10.	P.aeruginosa	CFU/ml	KPH	TCVN 8881:2011
11.	S.faecalis	CFU/ml	KPH	TCVN 6189-2:2009

Ghi chú: KPH: Không phát hiện (nghĩa là dưới ngưỡng phát hiện của phương pháp)

LOD phương pháp tiêu chuẩn của chỉ tiêu 2,3,4,5,6,8,9,10 là 1 CFU/ml, chỉ tiêu Salmonella là 1 CFU/25ml

Hà Nội, ngày 01 tháng 10 năm 2019

VIỆN TRƯỞNG



PHÓ VIỆN TRƯỞNG

Nguyễn Hồng Trường

NIN.P.F 16/02a

Lần ban hành:

Soát xét ngày: 21/03/2019

Trang 1/1

- Chỉ tiêu đánh dấu (*) là chỉ tiêu đã được công nhận VILAS; Chỉ tiêu đánh dấu (**) là chỉ tiêu được thực hiện bởi nhà thầu phụ

- Không được sao chép lại phiếu kết quả này nếu không được sự đồng ý bằng văn bản của PTN

- Tên mẫu và tên khách hàng được ghi theo yêu cầu của khách hàng

- Nếu kết quả kiểm nghiệm không ở trong ngưỡng quy định, khách hàng có trách nhiệm thực hiện nghĩa vụ của mình theo luật An toàn thực phẩm. Không nhận khiếu nại trong trường hợp không có mẫu lưu hoặc hết thời hạn lưu mẫu theo quy định

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

Mã số mẫu	743-2019-00077756
Mã số kết quả	AR-19-VD-082100-01 / EUVNHC-00080094


NGUYỄN MẠNH THẮNG - VỤ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ - BỘ CÔNG THƯƠNG

 Hà Nội
Việt Nam

Tên mẫu:	Sản phẩm sản xuất thử nghiệm (nước giải khát cỡ sữa lá lớn)
Tình trạng mẫu:	Mẫu được chứa trong lon nhôm
Ngày nhận mẫu :	19/09/2019
Thời gian thử nghiệm:	23/09/2019 - 25/09/2019
Ngày hẹn trả kết quả khách hàng:	25/09/2019

STT	CHỈ TIÊU THỬ NGHIỆM	ĐƠN VỊ	PHƯƠNG PHÁP THỬ	KẾT QUẢ
1	VD304 VD (a)(f) Đường tổng	g/100 ml	TCVN 7044:2009	2.34
2	VD131 VD (a) Carbon dioxide (CO ₂)	g/l	TCVN 5563:2009	Không phát hiện (LOD=0.1)
3	VD0HD VD (a) Độ chua/Độ acid theo acid citric	g/100 ml	AOAC 950.15	0.055
4	VD861 VD (a) Chì (Pb)	mg/l	TCVN 8126:2009	Không phát hiện (LOD=0.02)
5	VD887 VD (a) Thiếc (Sn)	mg/l	TCVN 7769:2007(Ref. AOAC 2015.01)	Không phát hiện (LOD=0.02)
6	VD070 VD Patulin	µg/l	TCVN 8161:2009 (EN 14177:2003)	Không phát hiện (LOD=10)
7	VD07C VD Diphenylamine	mg/l	EN 12393	Không phát hiện (LOD=0.003)
8	VD07D VD Propargite	mg/l	EN 12393	Không phát hiện (LOD=0.003)
9	VD07E VD 2-Phenylphenol	mg/l	EN 12393	Không phát hiện (LOD=0.003)
10	VD07F VD Piperonyl butoxide	mg/l	EN 12393	Không phát hiện (LOD=0.003)
11	VD0L3 VD (a) Malathion	mg/l	BS EN 15662:2017 mod.	Không phát hiện (LOD=0.003)

3. Dự thảo bản công bố sản phẩm

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BẢN CÔNG BỐ SẢN PHẨM

Số:01/2019/VDD

I. Thông tin về tổ chức, cá nhân công bố sản phẩm

Tên tổ chức: Viện Dinh dưỡng Quốc gia
Địa chỉ: 48B - Tầng Bạt Hồ - Quận Hai Bà Trưng - Hà Nội
Điện thoại: 02439.717.090 Fax: 02439.717.885
E-mail: ninvietnam@viendinhduong.vn
Mã số doanh nghiệp:

Số Giấy chứng nhận cơ sở đủ điều kiện ATTP: Ngày cấp/Nơi cấp:
(đối với cơ sở thuộc đối tượng phải cấp Giấy chứng nhận cơ sở đủ điều kiện an toàn thực phẩm theo quy định)

II. Thông tin về sản phẩm

1. Tên sản phẩm: Sản phẩm dinh dưỡng nước giải khát cỏ sữa thuộc nhóm Thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

2. Thành phần: Trong 100ml sản phẩm chứa các nguyên liệu:

Cao chiết cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* L.) : 2,5 g (tương đương 12,5 g cỏ sữa lá lớn khô)

Mật ong (honey): 2,5 g

Đường cỏ ngọt (stevia): 0,03 g

Gừng (ginger): 1g

Phụ liệu: Nước vừa đủ 100ml

3. Chỉ tiêu chất lượng chủ yếu tạo nên công dụng của sản phẩm (đối với thực phẩm bảo vệ sức khỏe):

STT	Chỉ tiêu đánh giá	Phương pháp thử	Mức chất lượng
1	Flavonoid toàn phần (mg/L)	NIN.G.01. M14 (UV-VIS)	≥ 550
2	Quercitin	NIN.G.01. M147 (HPLC)	

4. Chỉ tiêu chất lượng

STT	Chỉ tiêu đánh giá	Phương pháp thử	Mức chất lượng/ Mức tối đa
1	Màu sắc	TCVN 7041 : 2009	Đặc trưng cho từng loại sản phẩm
2	Mùi, Vị	TCVN 7041 : 2009	Đặc trưng cho từng loại sản phẩm, không có mùi, vị lạ
3	Trạng thái	TCVN 7041 : 2009	Dạng lỏng, đồng nhất, không có cặn
4	Độ axit (theo acid citric)	AOAC 950.15	
5	Hàm lượng cacbon dioxit (CO ₂)	TCVN 5563 : 2009	
6	Hàm lượng đường tổng số	TCVN 7044 : 2009	

5. Chỉ tiêu an toàn

STT	Chỉ tiêu đánh giá	Phương pháp thử	Mức chất lượng/ Mức tối đa
I	Kim loại nặng		
1	Pb (mg/L)	TCVN 8126:2009	0,05
2	Sn (mg/L)	TCVN 7769:2007	150
II	Độc tố vi nấm		
	Patulin (µg/L)	TCVN 8161:2009	50
III	Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật		
1	Piperonyl butoxid, mg/l	EN 12393:2013	0,05
2	2-Phenylphenol, mg/l	EN 12393:2013	0,5
3	Propargit, mg/l	EN 12393:2013	0,3

STT	Chỉ tiêu đánh giá	Phương pháp thử	Mức chất lượng/ Mức tối đa
4	Diphenylamin, mg/l	EN 12393:2013	0,5
5	Carbaryl, mg/l	BS EN 15662:2017 mod	3
6	Malathion, mg/l	BS EN 15662:2017 mod	0,01
IV	Vi Sinh		
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí, CFU/ml	TCVN 4884:2005 (ISO 4833:2003)	100
2	Coliforms, CFU/ml	TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2006)	10
3	<i>E. coli</i> , CFU/ml	TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001)	Không được có
4	<i>Streptococci faecal</i> , CFU/ml	TCVN 6189-2:2009 ISO 7899-2:2000	Không được có
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , CFU/ml	TCVN 8881:2011 (ISO 16266:2006)	Không được có
6	<i>Staphylococcus aureus</i> , CFU/ml	TCVN 4830-1:2005 (ISO 6888-1:1999, With Amd.1:2003); 2:2005 (ISO 6888-2:1999, With Amd. 1:2003); TCVN 4830-3:2005 (ISO 6888-2:2003)	Không được có
7	<i>Clostridium perfringens</i> , CFU/ml	TCVN 4991:2005 (ISO 7937:2004)	Không được có
8	Tổng số nấm men và nấm mốc, CFU/ml	TCVN 8275-1:2009 (ISO 21527-1:2008)	10
9	<i>Salmonella</i> spp (CFU/25 ml)	TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017)	Không được có

6. Thời hạn sử dụng sản phẩm: 6 tháng

7. Quy cách đóng gói và chất liệu bao bì: Đóng gói trong lon nhôm, 200ml

8. Tên và địa chỉ cơ sở sản xuất thử nghiệm sản phẩm: Viện nghiên cứu Rau quả.

9. Địa chỉ: Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội

III. Mẫu nhãn sản phẩm (*đính kèm mẫu nhãn sản phẩm hoặc mẫu nhãn sản phẩm dự kiến*)

IV. Yêu cầu về an toàn thực phẩm

Tổ chức, cá nhân sản xuất, kinh doanh thực phẩm đạt yêu cầu an toàn thực phẩm theo:

- Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với các sản phẩm đồ uống không cồn QCVN 6-2:2010/BYT;

- Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 7041 : 2009 về đồ uống không cồn.

Chúng tôi xin cam kết thực hiện đầy đủ các quy định của pháp luật về an toàn thực phẩm và hoàn toàn chịu trách nhiệm về tính pháp lý của hồ sơ công bố và chất lượng, an toàn thực phẩm đối với sản phẩm đã công bố và chỉ đưa sản phẩm vào sản xuất, kinh doanh khi đã được cấp Giấy tiếp nhận đăng ký bản công bố sản phẩm./.

Hà Nội, ngày.... tháng.... Năm 2019

ĐẠI DIỆN TỔ CHỨC, CÁ NHÂN

(Ký tên, đóng dấu)

4. Cách tiến hành định tính các hợp chất trong cỏ sữa lá lớn bằng phương pháp hóa học

***Tiến hành chiết xuất dịch chiết cồn để định tính flavonoid, coumarin**

Cân 10 g bột dược liệu cho vào bình nón dung tích 100 ml. Thêm 50 ml ethanol 90%, đun sôi cách thủy sôi trong 10 phút, lọc nóng. Dịch lọc thu được đem cô cách thủy cho bay hết dung môi. Cặn thu được hòa trong 20 ml nước cất đun sôi, lọc nóng. Dịch lọc thu được đem cô cách thủy cho bay hơi hết nước, cặn còn lại được hòa tan trong 15 ml ethanol 90%. Dịch thu được đem định tính flavonoid, coumarin.

1. Định tính flavonoid

- Phản ứng Cyanidin (phản ứng Shinoda):

Cho vào ống nghiệm nhỏ 1 ml dịch chiết cồn, thêm một ít bột magnesi kim loại (~10 mg). Nhỏ từng giọt HCl đặc (3-5 giọt). Để yên 1-2 phút.

Hiện tượng: Dung dịch chuyển từ màu vàng sang màu đỏ. Phản ứng dương tính (+).

- Phản ứng với kiềm:

+ **Phản ứng với NH₃**: Nhỏ 1-2 giọt dịch chiết cồn lên một mảnh giấy lọc. Hơ khô rồi để lên miệng lọ amoniac đặc đã được mở nút..

Hiện tượng: Màu vàng của vết dịch chiết tăng lên. Phản ứng dương tính (+).

+ **Phản ứng với dung dịch NaOH**: Cho vào ống nghiệm nhỏ 1 ml dịch chiết cồn. Thêm vài giọt dung dịch NaOH 10%. Sau đó thêm 1 ml nước cất.

Hiện tượng: Sau khi thêm NaOH dung dịch xuất hiện kết tủa vàng, thêm 1 ml nước cất thì kết tủa tan, màu vàng của dung dịch đậm lên. Phản ứng dương tính (+).

- Phản ứng với dd FeCl₃ 5%: Cho vào ống nghiệm nhỏ 1 ml dịch chiết cồn.

Thêm vào 2-3 giọt dd FeCl₃ 5%.

Hiện tượng: Dung dịch xuất hiện tủa màu xanh đen. Phản ứng dương tính (+).

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiên cứu có flavonoid.

2. Định tính coumarin

- Phản ứng mở, đóng vòng lacton

Cho vào 2 ống nghiệm nhỏ, mỗi ống 1 ml dịch chiết cồn.

Ống 1: Thêm 0,5 ml dung dịch NaOH 10%

Ống 2: Để nguyên

Đun cách thủy cả 2 ống đến sôi, để nguội, quan sát hiện tượng.

Hiện tượng:

Ống 1: Xuất hiện tủa đục màu vàng

Ống 2: Trong (phản ứng dương tính).

Thêm vào cả 2 ống nghiệm mỗi ống 2 ml nước cất. Lắc đều rồi quan sát thấy:

Ống 1: Dung dịch trong suốt có màu vàng đậm lên.

Ống 2: Trong (phản ứng âm tính).

Acid hóa ống 1 bằng vài giọt HCl đặc. Ống 1 vẫn trong suốt. (phản ứng âm tính).

- **Quan sát hiện tượng huỳnh quang**

Nhỏ lên một khoanh giấy thấm 2 vết dịch chiết còn (mỗi vết 2-3 giọt dịch chiết). Nhỏ 2-3 giọt dung dịch NaOH 5% lên 2 vết dịch chiết. Sấy nhẹ. Che một vết dịch chiết trên giấy thấm bằng một miếng kim loại, rồi chiếu tia tử ngoại trong vài phút. Bỏ miếng kim loại ra, quan sát hiện tượng.

Hiện tượng: Vết dịch chiết không bị che có huỳnh quang không sáng hơn vết dịch chiết bị che.

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiên cứu không có coumarin.

3. Định tính saponin

- **Quan sát hiện tượng tạo bọt**

Cho 5 g bột dược liệu vào bình định mức 250 ml, thêm 50 ml ethanol 70%. Đun cách thủy đến sôi trong 30 phút. Lọc nóng. Dịch lọc thu được đem cô cách thủy đến cạn. Hòa tan lượng cặn thu được trong 5 ml nước nóng. Lọc vào một ống nghiệm 1,6 cm x 16 cm và để nguội, thêm nước cho đủ 10 ml, dung ngón tay cái bịt miệng ống nghiệm và lắc mạnh theo chiều dọc ống nghiệm trong 5 phút. Để yên ống nghiệm.

Quan sát thấy cột bọt bền trong 15 phút.

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiên cứu có saponin.

4. Định tính glycosid tim

Cân 10 g bột dược liệu vào bình nón dung tích 200 ml. Thêm 100 ml ethanol 25 % rồi ngâm trong 24 giờ. Gạn lấy dịch chiết vào cốc có mỏ có dung tích 100 ml. Thêm vào dịch chiết 3 ml chì acetat 30%, khuấy đều. Lọc qua giấy lọc gấp nếp vào một cốc có mỏ dung tích 100 ml. Nhỏ vài giọt dịch lọc đầu tiên vào một ống nghiệm, thêm một giọt chì acetat. Nếu xuất hiện tủa thì ngừng lọc, thêm khoảng 1 ml chì acetat 30% vào dịch chiết, khuấy đều, lọc lại, và tiếp tục thử đến khi dịch lọc không còn tủa với chì acetat. Chuyển toàn bộ dịch lọc vào bình gạn dung tích 125 ml. Lắc kỹ 2 lần với hỗn hợp chloroform: ethanol (4:1), mỗi lần với 8 ml. Gạn dịch chiết chloroform vào cốc có mỏ, loại nước bằng natri sulfat khan. Chia đều dịch chiết vào 4 ống nghiệm nhỏ đã được sấy khô và đem bốc hơi trên nồi cách thủy đến khô. Cặn thu được đem tiến hành các phản ứng sau:

- **Phản ứng Liebermann- Burchard:** Cho vào ống nghiệm chứa cặn 1 ml anhydrid acetic, lắc đều cho tan hết cặn. Nghiêng ống nghiệm 45°. Cho từ từ theo thành ống 0,5 ml H₂SO₄ đặc, tránh xáo trộn chất lỏng trong ống. Quan sát hiện tượng.

Hiện tượng: Ở giữa hai lớp chất lỏng thấy xuất hiện vòng màu tím đỏ. Phản ứng dương tính (+).

- **Phản ứng Legal:** Hòa tan cẩn trong ống nghiệm bằng 0,5 ml ethanol 90%. Nhỏ 1 giọt thuốc thử natri nitroprussinat 0,5% và 2 giọt dung dịch NaOH 10% . Lắc đều.

Hiện tượng: Ống nghiệm không thấy xuất hiện màu đỏ cam. Phản ứng âm tính (-).

- **Phản ứng Baljet:** Hoà tan cẩn trong ống nghiệm bằng 0,5 ml ethanol 90%. Lắc đều cho tan hết cẩn. Nhỏ từng giọt thuốc thử Baljet (gồm 1 phần dung dịch acid picric 1% và 9 phần dung dịch NaOH 10%) .

Hiện tượng: Ống nghiệm không thấy xuất hiện màu đỏ cam. Phản ứng âm tính (-).

- **Phản ứng Keller- Kiliani:** Hòa tan cẩn trong ống nghiệm bằng 0,5 ml ethanol 90°. Lắc đều cho tan hết cẩn. Nhỏ vài giọt dung dịch FeCl₃ 5% trong acid acetic, lắc đều. Nghiêng ống nghiệm 45° cho từ từ theo thành ống 0,5 ml H₂SO₄ đặc, tránh xáo trộn chất lỏng trong ống.

Hiện tượng: Ở giữa hai lớp chất lỏng thấy xuất hiện vòng màu tím đỏ. Phản ứng dương tính (+).

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiên cứu không có glycosid tim.

5. Định tính alkaloid

Cân 15 g bột dược liệu cho vào bình cầu dung tích 250 ml. Kiểm hóa bằng NH₄OH 25%. Thêm 50 ml chloroform. Đun hồi lưu trong 2 giờ, lọc nóng vào cốc có mỏ 100 ml, để nguội. Chuyển toàn bộ dịch trên vào bình gạn dung tích 100 ml. Lắc kỹ 3 lần với dung dịch acid sulfuric 2%, mỗi lần 5 ml. Gộp các dịch chiết nước thu được cho vào 3 ống nghiệm:

- Ống 1: 1 ml dịch chiết + 2 giọt thuốc thử Mayer.

Hiện tượng: Ống nghiệm xuất hiện tủa trắng. Phản ứng dương tính (+).

- Ống 2: 1 ml dịch chiết + 2 giọt thuốc thử Bouchardat.

Hiện tượng: Ống nghiệm xuất hiện tủa nâu. Phản ứng dương tính (+).

- Ống 3: 1 ml dịch chiết + 2 giọt thuốc thử Dragendorff.

Hiện tượng: Ống nghiệm xuất hiện tủa vàng. Phản ứng dương tính (+).

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiên cứu có alkaloid.

6. Định tính anthranoid

Phản ứng Borntraeger:

Lấy 2 g bột dược liệu cho vào bình nón dung tích 100ml. Thêm 10 ml dung dịch H₂SO₄ 1N. Đun trực tiếp trên nguồn nhiệt đến sôi khoảng 15 phút . Lọc dịch chiết còn nóng qua giấy lọc vào bình gạn dung tích 50 ml. Để nguội dịch lọc. Thêm 5 ml chloroform, lắc nhẹ, gạn bỏ lớp nước, giữ lớp chloroform để làm phản ứng.

Lấy 1 ml dịch chiết chloroform, cho vào ống nghiệm nhỏ. Thêm 1 ml dung dịch NaOH 10%. Lắc nhẹ.

Hiện tượng: Lớp nước không chuyển sang màu đỏ sim. Phản ứng âm tính (-).

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiên cứu không có anthranoid.

***Tiến hành chiết xuất dịch chiết nước để làm các phản ứng định tính tanin, acid hữu cơ, acid amin, polysaccharid, đường khử**

Cân 5 g bột dược liệu cho vào bình nón dung tích 100 ml. Thêm 50 ml nước cất, đun sôi cách thủy 20 phút, lọc nóng. Dùng dịch lọc làm các phản ứng.

7. Định tính tanin

a. Định tính chung

Cho vào 3 ống nghiệm nhỏ, mỗi ống 1 ml dịch chiết nước, làm các phản ứng sau:

- Phản ứng với dung dịch gelatin 1%: thêm 2-3 giọt dung dịch gelatin 1% mới pha vào ống nghiệm chứa dịch chiết nước.

Hiện tượng: Xuất hiện tủa bông trắng. Phản ứng dương tính (+).

- Phản ứng với dung dịch $FeCl_3$ 5%: Cho vào ống nghiệm chứa dịch chiết nước 2-3 giọt dd $FeCl_3$ 5%.

Hiện tượng: Xuất hiện kết tủa màu xanh đen. Phản ứng dương tính (+).

- Phản ứng với dung dịch chì acetat: cho vào ống nghiệm chứa dịch chiết nước 2-3 giọt dung dịch chì acetat 10%.

Hiện tượng: Xuất hiện tủa bông trắng. Phản ứng dương tính (+).

b. Định tính phân biệt 2 loại tanin: phản ứng Stiasny

Lấy 20 ml dịch chiết nước cho vào cốc có mỏ dung tích 50 ml. Cho 5ml thuốc thử Stiasny (formol và HCl đặc tỷ lệ 2:1), đun nóng, khuấy đều. Thấy xuất hiện tủa màu đỏ gạch. Lọc qua giấy lọc gấp nếp vào một cốc có mỏ dung tích 50 ml. nhỏ vài giọt dịch lọc đầu tiên vào ống nghiệm, thêm một giọt thuốc thử Stiasny. Nếu xuất hiện tủa thì ngừng lọc, tiếp 1 ml thuốc thử Stiasny vào dịch chiết, khuấy đều, lọc lại và tiếp tục thử đến khi dịch lọc không còn tủa với thuốc thử Stiasny. Thêm vào dịch lọc thu được natri acetat đến dư. Lấy 2 ml dịch lọc cho vào ống nghiệm nhỏ. Nhỏ 2-3 giọt dung dịch $FeCl_3$ 5% (TT) vào ống nghiệm. Xuất hiện tủa màu xanh đen.

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiên cứu có cả hai loại tanin: tanin pyrogalllic và tanin pyrocatechic.

8. Định tính đường khử

Cho vào ống nghiệm nhỏ 2 ml dịch chiết nước. Thêm vào 0,5 ml thuốc thử Fehling A và 0,5 ml Fehling B, đun cách thủy 10 phút. Quan sát hiện tượng.

Hiện tượng: Xuất hiện kết tủa đỏ gạch. Phản ứng dương tính (+).

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiên cứu có chứa đường khử.

9. Định tính polysaccharid

Lấy 2 ống nghiệm lớn, cho vào mỗi ống:

Ống 1: 3 ml dịch chiết nước và 5 giọt thuốc thử Lugol.

Ống 2: 3 ml nước cất và 5 giọt thuốc thử Lugol.

Ống 3: 3 ml dịch chiết nước.

Hiện tượng: Ống 1 có màu xanh đậm hơn ống 2 và ống 3. Phản ứng dương tính (+).

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiền cứu có polysaccharid.

10. Định tính acid hữu cơ

Cho vào ống nghiệm lớn 3 ml dịch chiết nước. Thêm 1 ít bột Na_2CO_3 vào ống nghiệm. Quan sát hiện tượng.

Hiện tượng: Không xuất hiện bọt khí bay lên. Phản ứng âm tính (-).

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiền cứu không có acid hữu cơ.

*** Tiến hành chiết xuất dịch chiết ether dầu hỏa để làm các phản ứng định tính sterol, chất béo, caroten như sau:**

Cân 5 g bột dược liệu cho vào bình nón 100 ml. Đổ ngập ether dầu hỏa, chiết hồi lưu trong 1 giờ. Lọc thu lấy dịch lọc để làm các phản ứng.

11. Định tính chất béo

Nhỏ 2 giọt dịch chiết ether dầu hỏa lên giấy lọc, hơi nóng cho bay hơi hết dung môi. Quan sát.

Hiện tượng: Không có vết mờ trên giấy lọc. Phản ứng âm tính (-).

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiền cứu không có chất béo.

12. Định tính sterol

Cho vào ống nghiệm nhỏ 2 ml dịch chiết ether dầu hỏa, cô cách thủy bốc hơi dung môi đến khô. Thêm vào ống nghiệm 1ml anhydrid acetic, lắc kỹ. Để nghiêng ống nghiệm 45° , nhỏ từ từ 3 giọt acid sulfuric đặc theo thành ống nghiệm. Quan sát hiện tượng.

Hiện tượng: Tại mặt phân cách giữa hai lớp chất lỏng xuất hiện vòng tròn màu tím đỏ. Phản ứng dương tính (+).

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiền cứu có sterol.

13. Định tính caroten

Cho vào chén sứ nhỏ 2 ml dịch chiết ether dầu hỏa, cô cách thủy bốc hơi dung môi đến cạn. Thêm 2 giọt H_2SO_4 đặc vào chén. Quan sát hiện tượng.

Hiện tượng: không thấy xuất hiện màu xanh lá. Phản ứng âm tính (-)

Kết luận: Mẫu cỏ sữa lá lớn nghiền cứu không có chứa caroten.