

THU NHẬN VÀ PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN ACID AMIN TRONG NHAU THAI HEO LAI

TAKE SAMPLES AND ANALYSIS ACID AMIN IN PORCINE PLACENTA

LÊ PHÚC CHIẾN^(*), ĐẶNG NGUYỄN THỊ THANH LỢI^(**),
TRẦN THỊ MINH^(***), HUỖNH KIM HOA^(**) và TRẦN CẨM TÚ^(****)

TÓM TẮT: Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu và ứng dụng về nhau thai heo như chữa lành vết thương, kháng viêm, giảm nếp nhăn, tăng cường collagen, đặc biệt là ứng dụng dịch chiết nhau thai heo trong ngành mỹ phẩm. Mục tiêu của nghiên cứu là tìm được phương pháp thủy phân thích hợp để thu được dịch thủy phân nhau thai heo mang thành phần acid amin tối ưu. Nhau thai heo được khảo sát thủy phân bằng phương pháp: thời gian, áp suất, tác nhân acid và bazơ. Sử dụng phương pháp sắc ký để định tính và định lượng hàm lượng acid amin có trong dịch thu được, từ đó xác định phương pháp thủy phân tối ưu. Thành phần acid amin đạt tối ưu khi thủy phân nhau thai heo ở áp suất 1 atm, 30 phút.

Từ khóa: nhau thai heo; dịch chiết nhau thai heo; acid amin; phương pháp thủy phân tối ưu.

ABSTRACTS: In recent, some papers have publiced studying and application on porcine placenta such as wound healing, anti inflammatory, wrinkle reduction, collagen enhancement. Especially, the application of porcine placental extracts in cosmetic industry. The objective of the study was to find the appropriate hydrolysis method to obtain porcine placental extract having optimal amino acid composition. Porcine were hydrolyzed by time, pressure, acid and base. Using the chromatographic method to quantify and quantify the amount of amino acid present in the fluid, thereby determining the optimal hydrolysis method. In conclusion, when porcine placenta is hydrolyzed at 1 atm and 30 min, amino acid composition is optimum.

Key words: porcine placenta; porcine placental extract; amino acid; optimal hydrolysis method.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ thời cổ đại, nhau thai đã được sử dụng như một loại thuốc, tuy nhiên các thành phần và hiệu quả của nó không được làm rõ chi tiết. Ngày nay, sự phát triển của khoa học kỹ thuật đã dần dần phát hiện ra rằng, nhau thai có chứa nhiều hợp chất sinh

học có giá trị như: chất đạm, lipid, acid nucleic, glycosaminoglycan, acid amin, vitamin, khoáng chất, và các loại tương tự,... Ngoài ra, nhau thai còn bao gồm các yếu tố tăng trưởng khác như: yếu tố tăng trưởng tế bào gan, yếu tố tăng trưởng neuron, yếu tố tăng trưởng biểu mô, yếu tố

(*) ThS. Viện Sinh học nhiệt đới, lephucchien@gmail.com, Mã số: TCKH13-03-2019

(**) CN. Trường Đại học Văn Lang

(***) ThS. Trường Đại học Văn Lang, tranthiminh@vanlanguni.edu.vn

(****) TS. Viện Sinh học nhiệt đới

tăng trưởng nguyên bào sợi, yếu tố tăng insulin, hoặc yếu tố tăng trưởng để tăng cường miễn dịch [13, tr.474-480]. Nhau thai có chức năng đa dạng bao gồm ức chế lão hóa, chống viêm, chấy nắng, và oxy hóa [7, tr.1612-1618]. Nhau thai đã được sử dụng như là một liệu pháp y sinh học để chữa lành vết thương trong y học Hàn Quốc [5, tr.96-100], [15, tr.732] và các hiệu ứng miễn dịch điều hòa của nhau thai người đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu [3, tr.173-184], [10, tr.291]. Chiết xuất từ nhau thai đã được sử dụng cho các sản phẩm mỹ phẩm và dược phẩm để làm trắng và chữa các bệnh liên quan đến oxy hóa [17, tr.497-502]. Nhau thai heo thường được sử dụng trong y học cổ truyền Trung Quốc [1, tr.9-13], các sản phẩm nhau thai còn được sản xuất ở nhiều nước. Nhiều loại được sử dụng cho mục đích điều trị và còn lại chủ yếu được sử dụng sản xuất các loại kem dưỡng [20, tr.186]. Khi nói đến các nguồn nhau thai, chiết xuất nhau thai người là nguồn chất chiết xuất mang giá trị dưỡng chất cao nhất. Tuy nhiên, việc sử dụng nhau thai người là rất hạn chế do vấn đề đạo đức trong việc thu thập nhau thai người. Ngoài ra, chiết xuất nhau thai cừu đã được sử dụng để thay thế các chiết xuất nhau thai người. Tuy nhiên, việc sử dụng chất chiết xuất nhau thai cừu mang nguy cơ bệnh não xốp [18, tr.240-264]. Để tránh những vấn đề này, nhau thai heo đang được mong đợi như một nguồn chiết xuất nhau thai công nghiệp. Chiết xuất nhau thai heo được coi là một sự thay thế phù hợp của chiết xuất nhau thai do sự đồng nhất về di truyền cao giữa nhau thai người và heo [12, tr.844-851].

Gần đây, dịch chiết nhau thai heo (PPE: *Porcine Placental Extract*) đã được phát triển như một viên uống chức năng cùng mục đích như nhau thai người. PPE thúc đẩy việc chữa lành vết thương ở chuột khi bị bỏng [19, tr.236-245]. Điều trị bằng PPE cũng ức chế kích hoạt tế bào biểu hiện kháng nguyên, bao gồm các đại thực bào, một ứng dụng tiềm năng sử dụng PPE trong điều trị viêm da [6, tr.654-662]. Các nghiên cứu cho rằng, PPE đối với người có hiệu quả đáng kể để giảm đau đầu gối ở phụ nữ sau mãn kinh và cải thiện các triệu chứng do khí hậu ở phụ nữ tiền và sau mãn kinh [8, tr.30-35], [9, tr.28-35]. Nhà khoa học Yoshikawa cho rằng, nhau thai heo có khả năng thúc đẩy sản xuất tế bào da người bình thường đồng thời có thể giảm các nếp nhăn ở mắt bằng cách tăng cường phát triển các nguyên bào sợi, và ức chế biểu hiện men tiêu hủy cấu trúc nền [9, tr.28-35]. Không phát hiện dấu hiệu lâm sàng bất thường hoặc độc tính của chiết xuất nhau thai heo và chiết xuất nhau thai thường được sử dụng như một thành phần của thuốc mỡ cho da [14, tr.13-20]. Một nghiên cứu đáng chú ý của Kim và cộng sự đã kết luận rằng, dịch chiết nhau heo có khả năng bảo vệ tế bào xương khỏi các tác nhân phá hủy làm giảm khả năng bị loãng xương [11, tr.2405-2413]. Do tiềm năng lớn trong lĩnh vực y học và dược mỹ phẩm của nhau thai heo, nên sự quan tâm về vấn đề chiết xuất như thế nào nhau thai heo để có được sự thâm thấu tốt được đặt ra, đồng thời các nhà khoa học đã nghiên cứu và kết luận rằng, muốn tăng cường hấp thu tốt, nhau thai nên được chiết xuất bằng phương pháp thủy phân, khi đó các polypeptide bị cắt đứt thành

những phân tử có khối lượng nhỏ nên dễ dàng được hấp thu [4, tr.356-362].

Dịch chiết nhau thai heo đã được chứng minh có tiềm năng sinh học lớn và có thể ứng dụng sản xuất các sản phẩm mỹ phẩm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát một số phương pháp thủy phân nhau thai heo để xác định phương pháp cho dịch chiết nhau thai heo thu được có hàm lượng acid amin tối ưu.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu nhau thai heo lai mang 3 dòng máu Lanrace, Yorshire, Duroc, thu từ Xí nghiệp chăn nuôi heo Phước Long, ấp 3, xã Phạm Văn Cội, huyện Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh (thuộc Công ty Chăn nuôi và Chế biến Thực phẩm Sài Gòn (Sagrifood)). Công ty đã có các chứng nhận Vietgap, Globalgap, theo đó heo được tiêm phòng định kỳ và đầy đủ phòng chống các bệnh: *E.coli*, bệnh tai xanh, lở mồm long móng và một số thuốc/vaccine khác.

2.2. Phương pháp

Mẫu nhau thai heo khi thu nhận từ xí nghiệp được bảo quản lạnh trong suốt quá trình vận chuyển. Tất cả mẫu nhau sau khi xử lý sơ bộ bằng cách rửa nước thường và nước cất, loại bỏ cát sạn và những thành phần không sử dụng, trộn tất cả với nhau, xay, chia vào mỗi phần 75g. Bảo quản mẫu ở -20°C .

Đối chứng dịch nhau thai heo tươi: 75g mẫu + 37.5ml NaCl 0.9%. Ly tâm (10.000xg, 20 phút, 40°C). Thu dịch. [16, tr.1861-1866], [2, tr.1056].

Phương pháp 1: Khảo sát thủy phân theo thời gian [2, tr.1056].

75g nhau thai, thêm 37.5ml NaCl 0.9%. Thủy phân ở điều kiện 0.5atm, thời

gian khảo sát khác nhau là 1, 2, 3, 4, 5 giờ. Sau đó thu dịch, ly tâm (10.000xg, 20 phút, 40°C). Thu dịch nổi.

Phương pháp 2: Khảo sát thủy phân theo áp suất [10, tr.291]

75g nhau thai, thêm 37.5ml NaCl 0.9%. Thủy phân (Bảng 1). Sau đó ly tâm (10.000xg, 20 phút, 40°C). Thu dịch nổi.

Bảng 1. Thiết kế điều kiện thủy phân theo áp suất

| Thí nghiệm | Nghiệm thức | Áp suất (atm) | Thời gian (phút) |
|------------|-------------|---------------|------------------|
| 1 | 1 | 0.8 | 30 |
| | 2 | 1 | |
| | 3 | 1.5 | |
| 2 | 1 | 1 | 60 |
| | 2 | 1.5 | |

Phương pháp 3: Khảo sát thủy phân bằng HCl ở các nồng độ khác nhau [2, tr.1056]

75g nhau thai, sử dụng 37.5ml dung dịch HCl cho mỗi thí nghiệm (Bảng 2). Tiếp đến ly tâm dịch thủy phân (10.000xg, 20 phút, 40°C). Thu dịch nổi.

Bảng 2. Thí nghiệm thủy phân bằng HCl

| Nghiệm thức | Nồng độ HCL | Điều kiện |
|-------------|----------------|---|
| 1 | 0N (NaCl 0.9%) | Thủy phân ở 110°C , trong 30 phút, 0.8atm |
| 2 | 0.5N | |
| 3 | 1N | |
| 4 | 2N | |
| 5 | 3N | |

Phương pháp 4: Khảo sát thủy phân bằng NaOH ở các nồng độ khác nhau [2, tr.1056]

Thiết kế thí nghiệm như phương pháp 3, thay dung dịch HCl bằng NaOH.

Phương pháp xác định thành phần acid amin có trong các dịch nhau thai heo

Sau khi thực hiện các phương pháp thủy phân như trên, chúng ta có các dịch thủy phân nhau thai heo. Sử dụng phương pháp sắc ký bản mỏng hai chiều để xác định acid amin trong dịch thủy phân thu được.

Định lượng hàm lượng acid amin trong dịch thủy phân nhau thai heo tối ưu

Sau quá trình thủy phân, dịch chiết được định tính bằng phương pháp sắc ký bản mỏng, dịch chiết nhau thai heo nào có kết quả nhiều vết acid amin nhất sẽ được chọn để định lượng acid amin, thực hiện tại Trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh (CASE).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

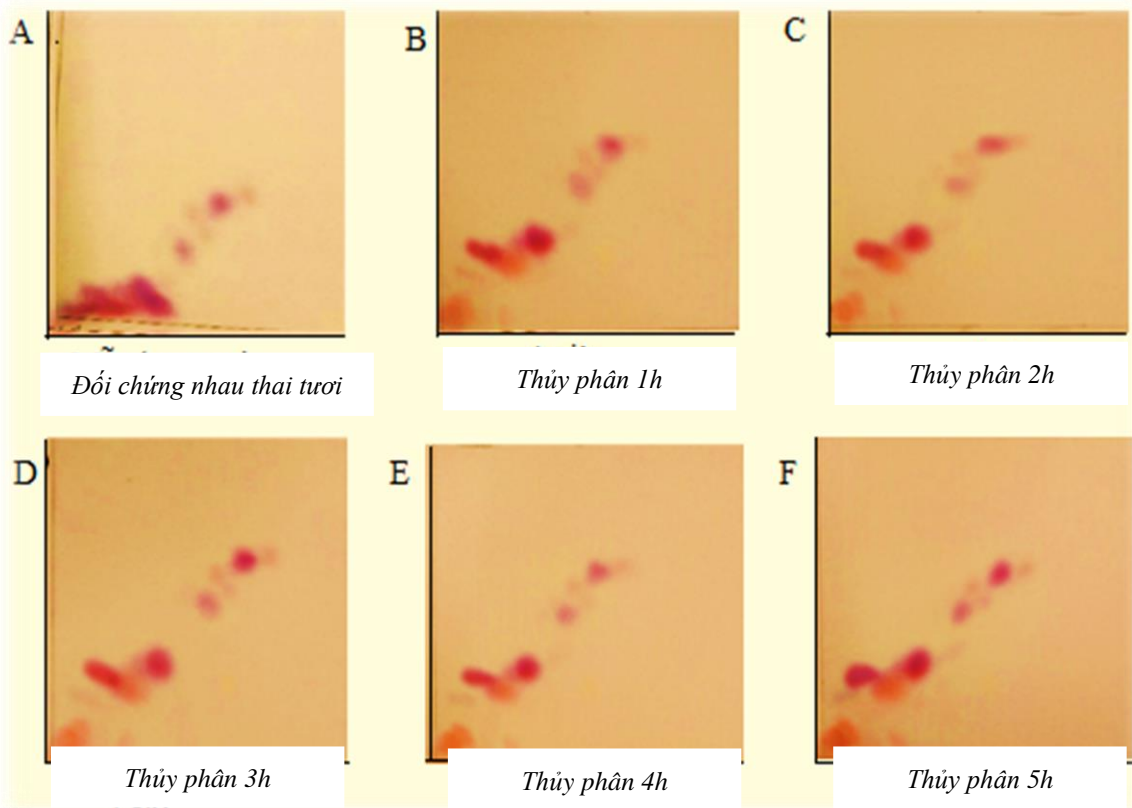
3.1. Dịch nhau thai heo thu trước thủy phân

Dịch chiết thu được có màu đỏ tươi, mùi nồng. Trong dịch chiết nhau thai tươi không cho nhiều vết acid amin, so với 18 acid amin

chuẩn, chỉ có 4 loại acid amin được phát hiện: Aspartic acid, Histidine monohydrochloride, Valine, Methionine (Hình 1.A).

3.2. Kết quả sắc ký phương pháp khảo sát thủy phân theo thời gian

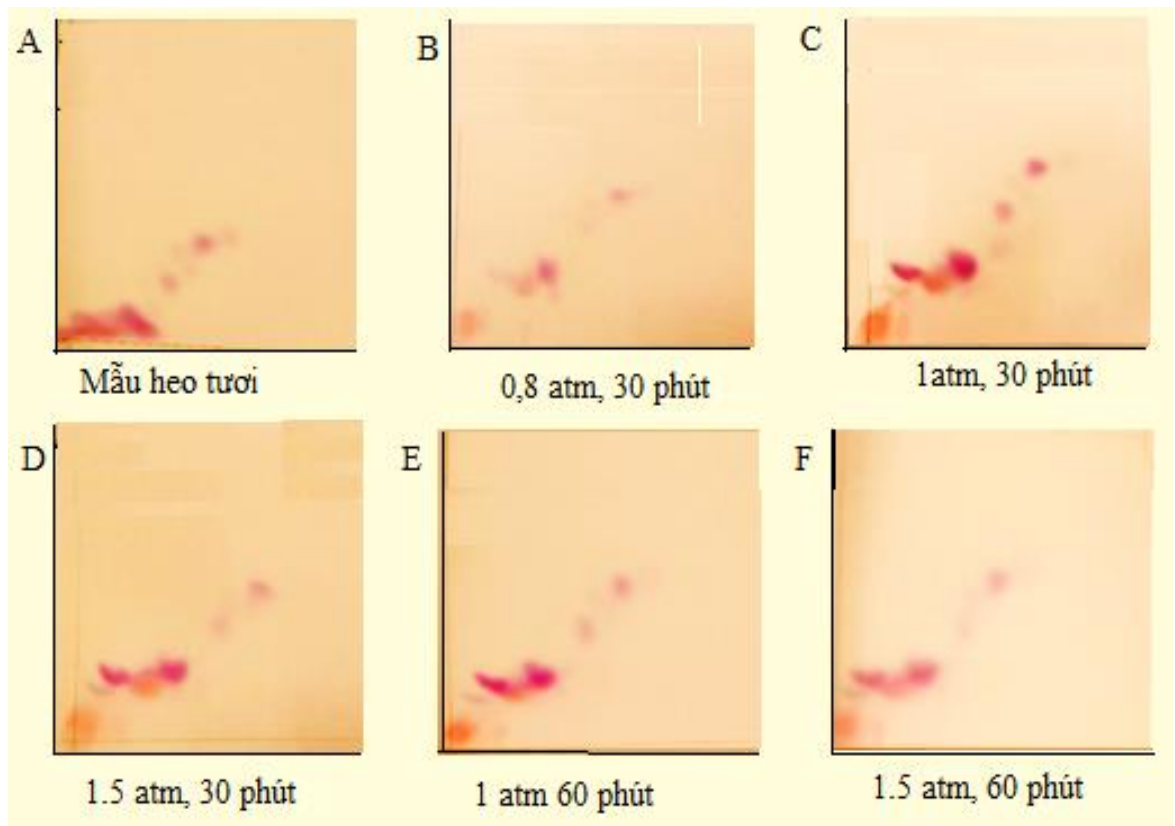
Dựa vào kết quả sắc ký bản mỏng (Hình 1) có thể thấy rằng: các dịch chiết thu được qua thủy phân ở thời gian tăng dần cho số lượng vết acid amin nhiều hơn, màu sắc đậm hơn mẫu đối chứng. Theo thời gian tăng dần số lượng vết tăng lên, ở 3, 4 và 5 giờ (11 vết) nhiều hơn 2 và 3 giờ 3 vết acid amin. Tối ưu ở phương pháp này đạt 11 vết, 9 acid amin.



Hình 1. Sắc ký dịch thủy phân khảo sát theo thời gian

3.3. Kết quả sắc ký phương pháp khảo sát thủy phân theo áp suất

Kết quả sắc ký thu được của dịch chiết nhau thai heo khi thủy phân theo áp suất được thể hiện như sau (Hình 2):

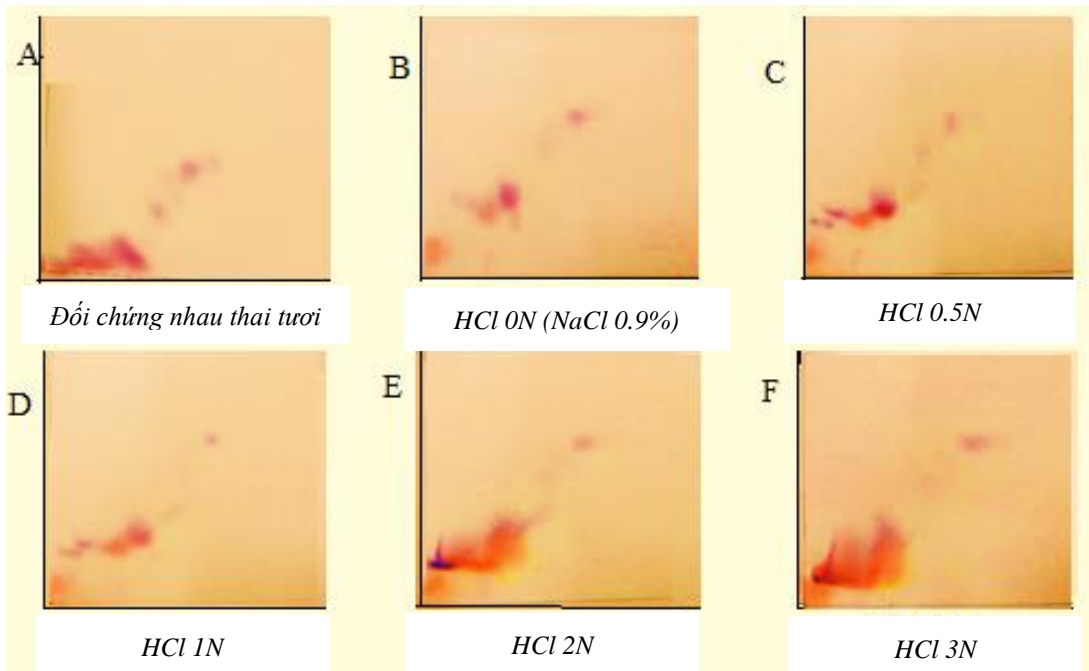


Hình 2. Sắc ký dịch thủy phân khảo sát theo áp suất

Bắt đầu thủy phân nhau thai heo áp suất 0.8atm, trong 60 phút, số acid amin có được (5 acid amin) cao hơn mẫu tươi. Chúng tôi tiếp tục tăng áp suất lên 1atm, số acid amin tăng đến 11. Ở cùng áp suất 1atm hoặc 1.5atm, mẫu thủy phân có thời gian ngắn hơn (30 phút) cho nhiều acid amin hơn. Ở cùng thời gian 60 phút hoặc 30 phút, mẫu thủy phân ở áp suất 1atm có nhiều vết acid amin hơn mẫu được thủy phân ở 1.5atm. Vì vậy, có thể kết luận tổ hợp điều kiện thủy phân với áp suất 1atm và thời gian 30 phút cho số acid amin cao nhất trong phương pháp này. Thêm vào đó, so với phương pháp khảo sát theo thời gian, nhìn chung khảo sát áp suất cho kết quả có nhiều vết acid amin hơn.

3.4. Kết quả sắc ký phương pháp khảo sát thủy phân bằng HCl

Khi HCl vừa tiếp xúc mẫu nhau thai, mẫu ngay lập tức có phản ứng tái, màu đỏ máu mất dần. Sau khi thủy phân, phần mẫu nhau bị thủy phân hoàn toàn chỉ còn các vụn nhỏ như hạt cát, dịch thu được có màu đen, mùi hắc, khó ngửi. So với đối chứng, tất cả các mẫu cho số lượng acid amin còn nguyên vẹn ít hơn hẳn. Mẫu HCl 0.5N thấy được rõ 6 vết acid amin. Mẫu HCl 1N được 5 vết acid amin. Mẫu HCl 3N và 2N: màu của acid amin đậm hơn, nhiều hơn, nhưng bị nhòe, chỉ phát hiện 1 acid amin. Như vậy, nồng độ HCl càng nhỏ số acid amin còn nguyên vẹn càng nhiều và dễ phát hiện (Hình 3).

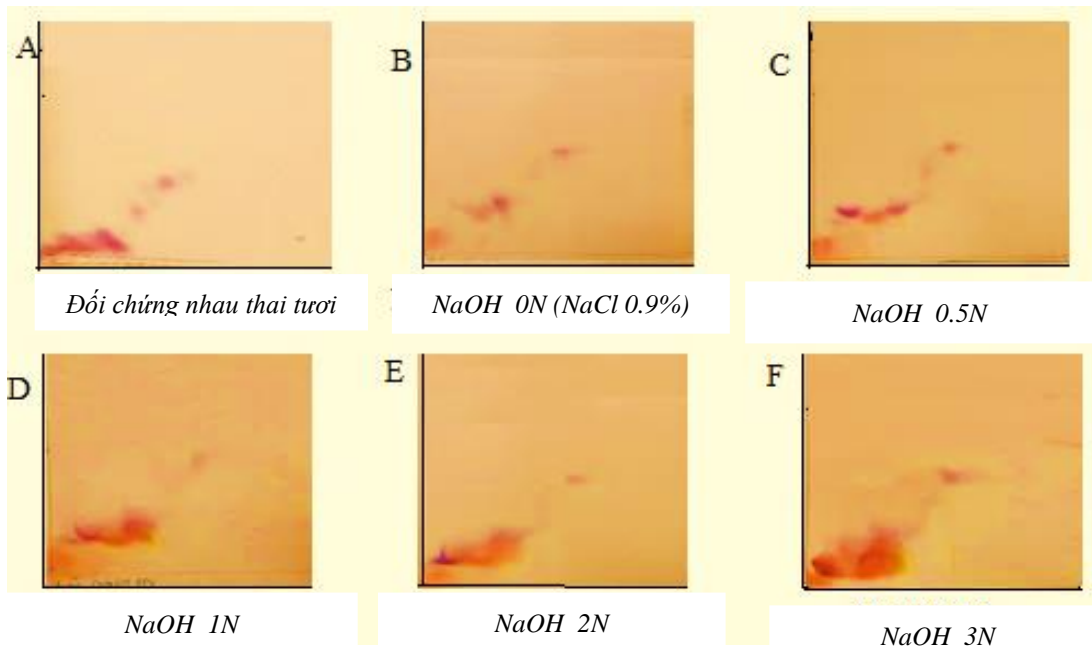


Hình 3. Sắc ký dịch thủy phân bằng HCl

3.5. Kết quả sắc ký phương pháp khảo sát thủy phân bằng NaOH

So với đối chứng, thủy phân bằng NaOH thu được nhiều vết màu acid amin hơn. Tuy nhiên, các vết màu này không còn giữ nguyên vẹn, không xác định được Rf. Mẫu NaOH 0.5N: có 6 vết acid amin nhìn thấy rõ.

Mẫu NaOH 1N, 2N, 3N: nhìn thấy nhiều vết acid amin hơn nhưng bị nhòe, chỉ xác định được 1 acid amin. Ở nồng độ 2N và 3N màu các vết acid amin đậm hơn. Tương tự, khi thủy phân bằng HCl, khi sử dụng NaOH nồng độ càng nhỏ, cho ít vết hơn nhưng các vết này tròn và dễ dàng đo được Rf (Hình 4).



Hình 4. Sắc ký dịch thủy phân bằng NaOH

3.6. Định lượng acid amin trong dịch thủy phân

Sau khi thực hiện các phương pháp thủy phân, các dịch chiết nhau thai heo thu

được đã định tính và định lượng acid amin tương đối bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (Bảng 3).

Bảng 3. Thành phần acid amin của dịch nhau thai heo đã phân tích

| STT | Thành phần acid amin (mg/100g) | Dịch đối chứng tươi | Dịch thủy phân ở 1 atm, 30 phút | Sắc ký bản mỏng (11 aa) |
|-------------|--------------------------------|---------------------|---------------------------------|-------------------------|
| 1 | 4-Hydroxyproline | 0.00 | 0.00 | |
| 2 | Alanine | 10.47 | 10.34 | |
| 3 | Aspartic acid | 5.30 | 8.89 | x |
| 4 | Glutamic acid | 17.82 | 22.53 | x |
| 5 | Glycine | 10.44 | 8.83 | x |
| 6 | <u>Histidine</u> | 5.39 | 23.56 | |
| 7 | Hydroxylysine | 0.00 | 0.00 | |
| 8 | <u>Isoleucine</u> | 6.29 | 7.76 | x |
| 9 | <u>Leucine</u> | 9.50 | 5.47 | |
| 10 | <u>Lysine</u> | 8.92 | 7.56 | |
| 11 | <u>Methionine</u> | 4.46 | 7.08 | |
| 12 | <u>Phenylalanine</u> | 4.8 | 3.66 | x |
| 13 | Proline | 4.82 | 7.63 | x |
| 14 | Serine | 9.22 | 52.94 | x |
| 15 | <u>Threonine</u> | 6.45 | 3.08 | x |
| 16 | Tyrosine | 4.61 | 7.56 | |
| 17 | <u>Valine</u> | 7.79 | 8.28 | |
| Tổng | | 118.28 | 185.16 | |
| 18 | Amino-n-butyric acid | | | x |
| 19 | Cystine | | | x |
| 20 | Arginine | | | x |

Qua phân tích như trên, chúng tôi chọn mẫu dịch chiết được thủy phân ở điều kiện 1atm, 30 phút có số được acid amin cao nhất (11 acid amin) để định lượng tại trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh (CASE). Kết quả trình bày (Bảng 3). Trong dịch chiết qua thủy phân, các acid amin: Alanine, Glycine, Leucine, Lysine, Phenylalanine, Threonine hầu như không thay đổi hoặc giảm so với dịch chưa thủy phân, trong khi đó hàm lượng của 9 acid amin là Aspartic acid, Glutamic acid, Histidine, Isoleucine, Methionine,

Proline, Serine, Tyrosine, Valine tăng đáng kể. Đặc biệt, hàm lượng của Serine và Histidine trong dịch thủy phân cao gần 5 lần so với dịch nhau thai tươi. Kết hợp với kết quả sắc ký bản mỏng, kiểm tra được trong dịch chiết sau khi thủy phân có thêm 3 loại acid amin: Amino-n-butyric acid, Cystine, Arginine. Như vậy, trong dịch chiết nhau thai heo của chúng tôi có mặt 18 loại acid amin thiết yếu (những acid amin được gạch chân) và không thiết yếu.

4. KẾT LUẬN

Thủy phân theo phân đoạn đạt số lượng tối đa là 10 vệt trong đó có 8 acid amin.

Thủy phân theo thời gian cho dịch có số vệt acid amin nhiều nhất là 11 vệt, với 9 acid amin.

Thủy phân nhau thai heo bằng HCl và NaOH, hầu như các vệt acid amin không nguyên vẹn. Thủy phân bằng áp suất cho

dịch nhau thai heo đạt 15 vệt, xác định 11 acid amin ở điều kiện 1 atm, 30 phút và hàm lượng 185.16 mg acid amin.

5. KIẾN NGHỊ

Khảo sát dịch thủy phân nhau thai heo trên *in vitro* và *in vivo*. Nghiên cứu sử dụng dịch thủy phân nhau thai heo, tạo sản phẩm thương mại trong ngành mỹ phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Chen L, Zhang LP, Luo YH, Su X, Kou JQ, Tan G. (1999), *Studies on characteristic and preparation of pig placenta polypeptide (Transfer Factor)*, J East China Nor Univ 11.
- [2] Dong Whan Gu, Myeong Jin Kim, Min Geun Gwak, Hu Jin Cho, Hyo Sang Lee (2006), *A method for preparing pig placental extract to use as a feed additive and use thereof*, Patent WO2008002005A1.
- [3] Fang, X. P., Xia, W. S., Sheng, Q. H., and Wang, Y. L. (2007), *Purification and characterization of an immunomodulatory Peptide from bovine placenta water-soluble extract*, Prep. Biochem. Biotechnol. 37.
- [4] Han Jeung Hi, Kim Mi Ryung, Park Yoo Heon, Yang Hee Hong, and Hyung Joo Su (2013), *Skin Permeability of Porcine Placenta Extracts and Its Physiological Activities*, Korean J. Food Sci. An, 33.
- [5] Hong, J. W., Lee, W. J., Hahn, S. B., Kim, B. J., and Lew, D. H. (2010), *The Effect of Human Placenta Extract in a Wound Healing Model*, Ann. Plast. Surg. 65.
- [6] Jash A, Kwon HK, Sahoo A, Lee CG, So JS (2011), *Topical Application of Porcine Placenta Extract Inhibits the Progression of Experimental Contact Hypersensitivity*, J Ethnopharmacol 133.
- [7] Kim, H. J., Lee, J. W., Kim, Y. I., and Lee, M. H. (2003), *The Effect of Placental Extract on the Expression of Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in SK30 Melanoma Cells*, Korean J. Dermatol. 41.
- [8] Koike K, Yamamoto Y, Suzuki N, Yamazaki R, Yoshikawa C, et al. (2012), *Efficacy of Porcine Placental Extracts with Hormone Therapy for Postmenopausal Women with Knee Pain*, Climacteric 15.
- [9] Koike K, Yamamoto Y, Suzuki N, Yamazaki R, Yoshikawa C. (2013), *Efficacy of Porcine Placental Extract on Climacteric Symptoms in Peri- and Postmenopausal Women*, Climacteric 16.

- [10] Lee Hwa Young, Han Jung Chae¹, SunYoung Park, Jong Hyun Kim (2013), *Porcine Placenta Hydrolysates Enhance Osteoblast Differentiation through Their Antioxidant Activity and Effects on ER Stress*, BMC Complementary and Alternative Medicine 16.
- [11] Lee, K. H., Park, H. J., Seo, H. G., Kim, J. H., Lim, G. S., Lee, W. Y., Kim, N. H., Lee, J. H., Jung, H. S., Sung, S. H., and Song, H. (2013), *Immune Modulation Effect of Porcine Placenta Extracts in Weaned the Pig*, J. Anim. Sci. 91.
- [12] McGregor, C. G., Davies, W. R., Oi, K., Teotia, S. S., Schirmer, J. M., Risdahl, J. M., Tazelaar, H. D., Kremers, W. K., Walker, R. C., Byrne, G. W., and Logan, J. S. (2005), *Cardiac Xenotransplantation: Recent Preclinical Progress with 3-month Median Survival*, J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 130.
- [13] Mi Yeon Lee, Ye Chul Choi, Ji Yeon Chun, Sang Gi Min, Geun Pyo Hong (2013), *Effects of High Pressure/High Temperature Processing on the Recovery and Characteristics of Porcine Placenta Hydrolysates*, Korean J. Food Sci. 33.
- [14] Mitsui, Y., Bagchi, M., Marone, P. A., Moriyama, H., and Bagchi, D. (2015), *Safety and Toxicological Evaluation of a Novel, Fermented, Peptide-enriched, Hydrolyzed Swine Placenta Extract Powder*, Toxicol. Mech. Methods 25.
- [15] Nath, S. and Bhattacharyya, D. (2007), *Cell Adhesion by Aqueous Extract of Human Placenta used as Wound Healer*, Indian J. Exp. Biol. 45.
- [16] Phillips A. L, Means W. J, Kalchayanand N, McCormick R. J, Miller K. W. (2000), *Bovine Placental Protease Specificity toward Muscle Connective Tissue Proteins*, J. Anim. Sci. 78.
- [17] Togashi, S., Takahashi, N., Iwama, M., Watanabe, S., Tamagawa, K. Fukui, T. (2002), *Antioxidative Collagen-Derived Peptides in Human-Placenta Extract*, Placenta 23.
- [18] Wrathall, A. E. (1997), *Risks of Transmitting Scrapie and Bovine Spongiform Encephalopathy by Semen and Embryos*, Rev. Sci. Tech. 16.
- [19] Wu CH, Chang GY, Chang WC, Hsu CT, Chen RS (2003), *Wound Healing Effects of Porcine Placental Extracts on Rats with Thermal Injury*, Br J Dermatol 148.
- [20] Yoshikawa C, Takano F, Ishigaki Y, Okada M, KYO S (2013), *Effect of Porcine Placental Extract on Collagen Production in Human Skin Fibroblasts In Vitro*, Gynecol Obstet 3.

Ngày nhận bài: 24-10-2018. Ngày biên tập xong: 15-12-2018. Duyệt đăng: 21-01-2019