



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0030076

(51)⁷ A61K 36/00; A61K 36/81; A61K 36/42 (13) B

(21) 1-2019-00603

(22) 30/01/2019

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/09/2019 378A

(73) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên (VN)

334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) Phạm Hùng Việt (VN); Trần Văn Ôn (VN); Nghiêm Đức Trọng (VN); Nguyễn Thanh Hải (VN); Bùi Thanh Tùng (VN); Dương Hồng Anh (VN).

(54) HỖN HỢP CHỨA CAO CHIẾT CỦA CÁC CÂY TRỨNG QUỐC (*STIXIS SUAVEOLENS* (ROXB.) PIERRE) VÀ DỨA DẠI (*PANDANUS TONKINENSIS* MARTELLI), THUỐC VÀ THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE CHỨA HỖN HỢP NÀY CÓ TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN VÀ LỢI MẬT

(57) Sáng chế đề cập đến hỗn hợp chứa cao chiết của các cây trứng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Pierre) và dứa dại (*Pandanus tonkinensis* Martelli) có tác dụng bảo vệ gan, lợi mật, không có độc tính cấp và bán trường diễn. Sáng chế cũng đề cập đến thuốc và thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng bảo vệ gan và lợi mật chứa hỗn hợp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hỗn hợp chứa cao chiết của các cây trướng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Pierre) và dứa dại (*Pandanus tonkinensis* Martelli) có tác dụng bảo vệ gan, lợi mật, không có độc tính cấp và bán trường diễn. Sáng chế cũng đề cập đến thuốc và thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng bảo vệ gan và lợi mật chứa hỗn hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gan là một trong những cơ quan lớn nhất của cơ thể, có tính chất sinh mạng và đảm nhận những chức năng vô cùng quan trọng đối với cơ thể như: biến đổi thức ăn thành những chất cần thiết cho sự sống và phát triển; sản xuất ra nhiều chất quan trọng sử dụng cho cơ thể; giải độc và bài tiết các chất độc trong cơ thể. Ngoài ra, gan cũng tạo ra mật, một chất dịch cần thiết cho sự tiêu hóa. Hiện nay số người mắc các bệnh về gan mật ngày càng gia tăng và mức độ nghiêm trọng của bệnh cũng tăng lên đáng kể. Cây thuốc đóng một vai trò quan trọng trong hệ thống chăm sóc sức khỏe con người. Hiện nay, dược liệu đang được ưa dùng vì tính hiệu quả, an toàn và ít tác dụng phụ. Trong số đó, một số lượng lớn các loài cây cỏ và các hợp chất tự nhiên đã được thử nghiệm trong điều trị bệnh lý gan. Y học cổ truyền từ lâu đã sử dụng các loại thảo dược với mục đích: kích thích tiêu hóa thông qua tác dụng tăng hoạt tính của men tụy như Bạch truật, Phục linh, Trần bì, v.v.; bảo vệ tế bào gan: Sài hồ, Đương quy, Đại táo, Glycyrrhizine của Cam thảo; điều hòa chức năng miễn dịch: Sài hồ, Đảng sâm, Bạch truật, Bạch thược, v.v.. Mặc dù đã có nhiều bài thuốc dân gian có tác dụng điều trị bệnh gan mật, nhưng vẫn cần có bài thuốc hữu hiệu để điều trị các bệnh này.

Bản chất của kỹ thuật sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hỗn hợp chứa cao chiết của các cây trướng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Pierre) và dứa dại (*Pandanus tonkinensis* Martelli) có tác dụng bảo vệ gan, lợi mật, không có độc tính cấp và bán trường diễn, thuốc và thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng bảo vệ gan và lợi mật chứa hỗn hợp này để giải quyết vấn đề nêu trên.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất hỗn hợp chứa cao chiết của các cây trướng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Pierre) và dứa dại (*Pandanus tonkinensis* Martelli), trong đó hỗn hợp này được điều chế như sau:

- (i) thu hái nguyên liệu cây trướng quốc (thân, lá), phơi khô, nghiền nhỏ thu được bột nguyên liệu;
- (ii) thu hái nguyên liệu cây dứa dại (thân, lá, quả), phơi khô, nghiền nhỏ thu được bột nguyên liệu;
- (iii) phối trộn các bột nguyên liệu của cây trướng quốc và dứa dại theo tỷ lệ 1:1 thu được hỗn hợp bột nguyên liệu;
- (iv) chiết lần 1 hỗn hợp bột nguyên liệu này bằng nước, đun sôi ở 100°C trong 3 giờ, lọc dịch chiết qua thiết bị lọc có đường kính lỗ lọc 160µm, cô dịch chiết ở nhiệt độ từ 70 đến 85°C, áp suất từ -0,04 đến -0,08MPa; tiếp tục chiết lần 2 với các điều kiện tương tự như lần 1 và gộp dịch chiết lần 1 và lần 2 thu được hỗn hợp dịch chiết;
- (v) cô đặc hỗn hợp dịch chiết bằng thiết bị cô chân không tuần hoàn cấp I đến khi đạt được tỷ trọng là 1,10 ở nhiệt độ 30°C, lọc qua thiết bị lọc có đường kính lỗ lọc 160µm, sau đó bổ sung natri benzoat và kali sorbat vào hỗn hợp dịch cô theo tỷ lệ khối lượng natri benzoat:kali sorbat:hỗn hợp bột nguyên liệu là $1,25 \times 10^{-4}$: $1,25 \times 10^{-4}$: 1 và khuấy đến khi hòa tan hòa toàn trong thời gian 30 phút;
- (vi) sấy phun hỗn hợp dịch cô bằng máy sấy phun để thu được cao khô có hàm ẩm $\leq 5\%$ và trộn đồng nhất trong thời gian 30 phút, thu được hỗn hợp chứa cao chiết của các cây trướng quốc và dứa dại.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là Tác dụng của hỗn hợp chứa cao chiết trên mô hình chuột tổn thương gan do PAR gây ra đối với nồng độ lipid hóa trên mô gan. Trong đó, # để chỉ khác biệt so với nhóm đối chứng; * để chỉ khác biệt so với nhóm PAR.

Hình 2 là Tác dụng của hỗn hợp chứa cao chiết trên mô hình chuột tổn thương gan do PAR gây ra đối với nồng độ TNF- α trên mô gan. Trong đó, # để chỉ khác biệt so với nhóm đối chứng; * để chỉ khác biệt so với nhóm PAR và hỗn hợp chứa cao chiết là L2 với 14,4g được liệu/kg chuột.

Hình 3 là Tác dụng của hỗn hợp chứa cao chiết trên mô hình chuột tổn thương gan do PAR gây ra đối với nồng độ IFN- γ trên mô gan. Trong đó, # để chỉ khác biệt so với nhóm đối chứng; * để chỉ khác biệt so với nhóm PAR và hỗn hợp chứa cao chiết là L2 với 14,4g được liệu/kg chuột.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết các phương án cụ thể.

Sáng chế đề cập đến hỗn hợp có tác dụng bảo vệ gan và lợi mật chứa cao chiết của các cây trướng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Pierre) và dứa dại (*Pandanus tonkinensis* Martelli).

Cây trướng quốc có tên khoa học là *Stixis suaveolens* (Roxb.) Pierre và tên gọi khác là Tiết xích, Mác nam ngoa (Tày), Co sáy tấu (Thái), họ thực vật: Capparaceae. Cây nhỏ trườn; nhánh màu nâu tươi với những lỗ bì trắng tròn, lúc non có lông mịn. Lá mọc so le, phiến thon, dài 10cm, rộng 4cm, tù hai đầu, không lông, gân phụ 8-9 cặp, lồi ở mặt dưới, cuống dài 1,5cm, có lỗ bì. Hoa mọc thành chùm hay chùy dài 8-15cm ở nách lá, có lông, nụ hoa hai đầu; lá đài 6, có lông ở cả hai mặt, không có cánh hoa; nhị 20 trên cuống nhị ngắn; bầu 3 ô. Quả hình giống quả Trám, to 2cm, vỏ ngoài dày cứng, có đốm trắng, hạt 1, thuôn dài. Ra hoa tháng 3-5, có quả tháng 6-8. Công dụng được dùng để chữa đau xương, viêm dây thần kinh tọa (Rễ sắc uống), lá để chữa đau mắt, rễ khô sắc uống chữa ho, ho ra máu. Cây mọc ở đồi núi nhiều nơi thuộc các tỉnh Vĩnh Phú, Bắc Thái, Hà

Bắc, Hải Hưng, Lạng Sơn, Quảng Trị. Cây mọc tự nhiên ở các trảng cây bụi, ven rừng.

Cây dứa dại có tên khoa học là *Pandanus tonkinensis* Martelli. Cây nhỡ, cao 1-2m, thân phân nhánh, mang nhiều rễ phụ. Lá ở ngọn cành, hẹp, dài đến 80cm, rộng 4cm, đầu có đuôi dài 8cm, hình máng xối, mép và gân giữa có gai thưa. Cụm hoa ở ngọn hoặc ở nách lá, gồm nhiều hoa nhỏ; lá bắc như lá mà ngắn hơn. Quả to, có cuống dài, gồm khoảng 80 quả hạch có vôi nhụy cong tồn tại. Hoa quả vào tháng 2-5. Cây mọc hoang ở rừng thường xanh, từ vùng thấp đến 400m ở các tỉnh Hoà Bình tới Quảng Trị, Quảng Nam - Đà Nẵng, Khánh Hoà. Cây cũng được trồng làm hàng rào. Thu hái đợt non vào mùa xuân, dùng tươi. Rễ thu hái quanh năm, phơi khô. Tính vị và tác dụng của cây là vị ngọt, hơi ngứa, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt, lợi tiểu, tiêu độc, chỉ huyết. Công dụng, chỉ định và phối hợp để dùng chữa đái dầm, buốt hoặc ra máu, đái ra sỏi; cũng dùng trị phù thũng, lòi dom, mất ngủ.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất hỗn hợp chứa cao chiết của các cây trướng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Pierre) và dứa dại (*Pandanus tonkinensis* Martelli), trong đó hỗn hợp này được điều chế như được mô tả dưới đây.

Thu hái các nguyên liệu cây trướng quốc (thân, lá) và cây dứa dại (thân, lá, quả), phơi khô, nghiền nhỏ thu được các bột nguyên liệu rồi phối trộn các bột nguyên liệu của cây trướng quốc và dứa dại theo tỷ lệ 1:1 thu được hỗn hợp bột nguyên liệu. Chiết lần 1 hỗn hợp bột nguyên liệu này bằng nước, đun sôi ở 100°C trong 3 giờ, lọc dịch chiết qua thiết bị lọc có đường kính lỗ lọc 160µm, cô dịch chiết ở nhiệt độ từ 70 đến 85°C, áp suất từ -0,04 đến -0,08MPa. Lặp lại chiết lần 2 tương tự như lần 1 và gộp dịch chiết lần 1 và lần 2 thu được hỗn hợp dịch chiết. Sau đó, cô đặc hỗn hợp dịch chiết bằng thiết bị cô chân không tuần hoàn cấp I đến khi đạt được tỷ trọng là 1,10 ở nhiệt độ 30°C, lọc qua thiết bị lọc có đường kính lỗ lọc 160µm, sau đó bổ sung natri benzoat và kali sorbat vào hỗn hợp dịch cô theo tỷ lệ khối lượng natri benzoat:kali sorbat:hỗn hợp bột nguyên liệu là $1,25 \times 10^{-4}$: $1,25 \times 10^{-4}$: 1 và khuấy đến khi hòa tan hòa toàn trong thời gian 30 phút. Sấy phun hỗn

hợp dịch cô bằng máy sấy phun để thu được cao khô có hàm ẩm $\leq 5\%$ và trộn đồng nhất trong thời gian 30 phút, thu được hỗn hợp chứa cao chiết của các cây trướng quốc và dứa dại.

Các nguyên liệu đạt tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm.

Sáng chế còn đề cập đến thuốc có tác dụng bảo vệ gan và lợi mật chứa hỗn hợp này.

Sáng chế còn đề cập đến thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng bảo vệ gan và lợi mật chứa hỗn hợp này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Điều chế hỗn hợp chứa cao chiết của các cây trướng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Pierre) và dứa dại (*Pandanus tonkinensis* Martelli)

Thu hái 80kg nguyên liệu cây trướng quốc (thân, lá) và 80kg nguyên liệu cây dứa dại, phơi khô (thân, lá, quả), nghiền nhỏ thu được các bột nguyên liệu rồi phối trộn các bột nguyên liệu của cây trướng quốc và dứa dại thu được hỗn hợp bột nguyên liệu. Chiết lần 1 hỗn hợp bột nguyên liệu này bằng nước, đun sôi ở 100°C trong 3 giờ, lọc dịch chiết qua thiết bị lọc có đường kính lỗ lọc 160µm, cô dịch chiết ở nhiệt độ từ 70 đến 85°C, áp suất từ -0,04 đến -0,08MPa. Lặp lại chiết lần 2 tương tự như lần 1 và gộp dịch chiết lần 1 và lần 2 thu được hỗn hợp dịch chiết. Sau đó, cô đặc hỗn hợp dịch chiết bằng thiết bị cô chân không tuần hoàn cấp I đến khi đạt được tỷ trọng là 1,10 ở nhiệt độ 30°C, lọc qua thiết bị lọc có đường kính lỗ lọc 160µm, sau đó bổ sung 0,02kg natri benzoat và 0,02kg kali sorbat vào hỗn hợp dịch cô và khuấy đến khi hòa tan hòa toàn trong thời gian 30 phút. Sấy phun hỗn hợp dịch cô bằng máy sấy phun để thu được cao khô có hàm ẩm $\leq 5\%$ và trộn đồng nhất trong thời gian 30 phút, thu được 7,6kg hỗn hợp chứa cao chiết của các cây trướng quốc và dứa dại.

Ví dụ 2. Tác dụng dược lý

Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng swiss, cả 2 giống, khoẻ mạnh, trọng lượng $25,0 \pm 2,0$ gam để nghiên cứu tác dụng do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp. Động vật được nuôi trong điều kiện đầy đủ thức ăn và nước uống tại phòng thí nghiệm từ 3 - 5 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu tại Khoa Y Dược, Đại Học Quốc Gia Hà Nội

Hóa chất

Paracetamol (A7085 – Sigma Aldrich) dạng bột tinh khiết; Silymarin; Formol; Kít định lượng ALT, AST của hãng Human (Đức).

Dụng cụ nghiên cứu

- Máy định lượng sinh hóa bán tự động HumaLyzer 2000 (Đức)
- Các dụng cụ thí nghiệm thông thường của Khoa Y Dược, ĐHQGHN

a) Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp của hỗn hợp chứa cao chiết theo sáng chế

Nghiên cứu đánh giá độc tính cấp được tiến hành theo phương pháp công bố trước đây. Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhện ăn qua đêm. Chuột được chia thành các lô khác nhau (mỗi lô 10 chuột). Với hỗn hợp chứa cao chiết, cho chuột uống với liều tăng dần từ 10g hỗn hợp/kg, 15g hỗn hợp/kg và đến 17,5g hỗn hợp/kg thể trọng (liều cao nhất được thiết kế bằng cách thêm dần nước vào chế phẩm đến khi thể chất cao có dạng lỏng để có thể cho chuột uống) trong cùng một thể tích để xác định liều thấp nhất gây chết 100% chuột và liều cao nhất không gây chết chuột (gây chết 0% chuột). Lô đối chứng uống nước cất, lô thử uống thuốc với các mức liều tăng dần từ với cùng thể tích uống 0,4ml. Nước cất và thuốc thử được đưa thẳng vào dạ dày chuột bằng kim cong đầu tù. Theo dõi tình trạng chung của chuột, quá trình diễn biến bắt đầu có dấu hiệu nhiễm độc (như co giật, kích động, run rẩy, lơ lơ, v.v.) và số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc.

b) Phương pháp nghiên cứu độc tính bán trường diễn của hỗn hợp chứa cao chiết

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn trên chuột theo đường uống

Các tác giả sáng chế tiến hành đánh giá độc tính bán trường diễn với liều 2 của hỗn hợp chứa cao chiết bài thuốc theo hướng dẫn của OECD 407. Chuột được chia làm 3 lô, mỗi lô 10 con.

Lô chứng sinh lý: uống nước cất 0,4 ml/con

Lô trị: uống hỗn hợp chứa cao chiết liều 2, cụ thể như sau: cân lấy khối lượng 450 mg cao, hòa lượng vừa cân trong 10,4 ml nước, trộn đều, cho chuột uống 0,4 ml

Chuột được uống nước hoặc hỗn hợp chứa cao chiết trong 4 tuần liên, mỗi ngày một lần vào buổi sáng với thể tích 0,4 ml/con.

Các chỉ tiêu theo dõi trước và trong quá trình nghiên cứu

- Tình trạng chung, thể trọng của chuột.
- Đánh giá chức phận tạo máu: thông qua số lượng hồng cầu, số lượng huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và lượng tiểu cầu.
- Đánh giá chức năng gan: thông qua định lượng một số enzym và chất chuyển hoá trong máu ALT, AST, albumin và cholesterol.
- Đánh giá chức năng thận: thông qua định lượng creatinin huyết thanh.

Các thông số theo dõi được kiểm tra trước lúc uống thuốc, sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc.

Mô bệnh học

Sau 4 tuần uống thuốc, chuột được mổ để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, thận của 30% số chuột mỗi lô.

c) Phương pháp thử tác dụng bảo vệ gan với hỗn hợp chứa cao chiết

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con:

Lô 1 (đối chứng sinh lý, C(-)): chuột được cho uống nước cất

Lô 2 (đối chứng bệnh, mô hình viêm gan, C(+)): chuột được cho uống paraceramol mà không điều trị

Lô 3 (Silymarin): chuột được cho uống Silymarin 70 mg/kg + paraceramol

Lô 4 (hỗn hợp chứa cao chiết-L1): chuột được cho uống hỗn hợp chứa cao chiết-liều 1 + paraceramol

Lô 5 (hỗn hợp chứa cao chiết-L2): chuột được cho uống hỗn hợp chứa cao chiết-liều 2 + paraceramol

Liều 1 của bài thuốc cho chuột uống dựa trên liều sử dụng trong dân gian, sau đó quy đổi từ người sang chuột nhất, theo công bố trước đây trên tạp chí Journal of basic and clinical pharmacy. Liều 2 có giá trị gấp đôi liều 1. Cụ thể như sau: Liều 1 (L1)- tương đương 7,2g dược liệu/kg chuột: cân lấy khối lượng 450mg cao, hòa lượng vừa cân trong 20,7ml nước, trộn đều, cho chuột uống 0,4ml; Liều 2 (L2) – tương đương 14,4g dược liệu/kg chuột: cân lấy khối lượng 450mg cao, hòa lượng vừa cân trong 10,4ml nước, trộn đều, cho chuột uống 0,4ml.

Chuột được uống nước hoặc thuốc thử liên tục trong 8 ngày. Ngày thứ 8, sau uống thuốc 1 giờ, chuột được nhin đói 16 - 18 giờ trước đó, gây tổn thương gan chuột ở các lô từ lô 2 đến lô 5 bằng uống paracetamol (PAR) liều 400mg/kg với thể tích 0,2ml/10g. 48 giờ sau gây độc bằng paracetamol, lấy máu động mạch cảnh của chuột để định lượng enzym AST, ALT và quan sát mô bệnh học (đại thể và vi thể). Gan chuột thí nghiệm sau khi mổ được cố định bằng Formol 10%, xử lý và nhuộm Hematoxylin-Eosin và được thực hiện tại bộ môn Y Dược học cơ sở, Khoa Y Dược, ĐHQGHN. Nhuộm PAS (Periodic acid Schiff): Đây là kỹ thuật nhuộm chất nhầy với nguyên lý dùng tác nhân oxy hóa là axit periodic để phá vỡ mối liên kết của hai nguyên tử cacbon làm xuất hiện nhóm aldehyt. Các nhóm aldehyd này nhìn được nhờ phản ứng với thuốc thử Schiff. Nhuộm HE (Hematoxylin –eosin): Đây là phương pháp nhuộm hai màu liên tiếp. Nhuộm nhân theo nguyên tắc tăng dần, nhuộm bào tương theo nguyên tắc giảm dần. Kết quả vi thể (độ phóng đại 40X) được phân tích bởi Khoa Giải Phẫu Bệnh, Bệnh Viện Đại Học Y Hà Nội.

d) Phương pháp nghiên cứu các chỉ thị sinh học phân tử liên quan đến quá trình viêm của chế phẩm viên nang hỗn hợp chứa cao chiết trên mô hình chuột nhắt do Paracetamol gây ra

Trong nghiên cứu này, dựa trên kết quả tác dụng bảo vệ gan của hai bài thuốc, liều 2 cho tác dụng tốt hơn so với liều 1, nên các tác giả sáng chế lựa chọn liều 2 để đánh giá tác dụng ảnh hưởng đến chỉ thị sinh học phân tử liên quan đến quá trình viêm của hỗn hợp chứa cao chiết trên mô hình chuột nhắt do Paracetamol gây ra.

Sử dụng chuột nhắt trắng, cả 2 giống, đủ tiêu chuẩn nghiên cứu. Chuột được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con:

Lô 1 (chứng sinh lý, C(-)): chuột được cho uống nước cất

Lô 2 (chứng bệnh, mô hình viêm gan, C(+)): chuột được cho uống paraceramol mà không có điều trị.

Lô 3 (Silymarin): chuột được cho uống Silymarin 70mg/kg + paraceramol

Lô 4 (hỗn hợp chứa cao chiết - L2): chuột được cho uống hỗn hợp chứa cao chiết-liều 2 + paraceramol

Chuột được uống nước hoặc thuốc thử liên tục trong 8 ngày. Ngày thứ 8, sau uống thuốc 1 giờ, chuột được nhịn đói 16 - 18 giờ trước đó, gây tổn thương gan chuột ở các lô từ lô 2 đến lô 4 bằng uống paracetamol (PAR) liều 400mg/kg với thể tích 0,2 ml/10g. 48 giờ sau gây độc bằng paracetamol, giết chuột, lấy gan, bỏ vào nitrogen lỏng và bảo quản ở -80 °C. Mô gan được cân và đồng nhất trong hệ đệm lạnh Nonidet-P40 (NP40) gồm (150mM natri clorua, 1,0% Triton X-100, 50 mM Tris, độ pH 8,0). Sau đó, ly tâm (ở điều kiện 12000g, 4°C) trong 15 phút rồi thu lấy phần dịch nổi phía trên và bảo quản ở nhiệt độ -80°C đến khi phân tích.

Đánh giá hoạt tính chống peroxit hóa lipid

Khả năng ức chế quá trình peroxy hóa lipid của các chất được đánh giá thông qua việc xác định hàm lượng malonyl dialdehyt (MDA) - sản phẩm của quá trình oxy hóa lipid màng tế bào. Phương pháp được tiến hành bằng phản ứng của

malonaldehyt với 2 phân tử 1-metyl-2-phenylindol ở 45°C. Lấy 0,64ml 1-metyl-2-phenylindol 10,3mM, 0,2ml mẫu thử và 10µl butylat hydroxytoluen 2µg/ml. Sau đó đem hỗn hợp phản ứng lắc đều, thêm tiếp 0,15ml HCl 37%. Ủ hỗn hợp ở 45°C trong vòng 45 phút và ly tâm ở 10000g trong vòng 10 phút. Lấy phần dịch nổi đem đo độ hấp thụ ở bước sóng 586nm. Sử dụng 1,1,3,3-tetrametoxipropan (Sigma-Aldrich, Singapore) để xây dựng đường chuẩn. Lượng peroxit hóa lipid được thể hiện bằng số nmol MDA tương đương /mg protein. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Định lượng nồng độ TNF-alpha, INF-gamma bằng phương pháp ELISA

Phương pháp này dựa trên nguyên tắc là kháng nguyên đã hoà tan trong dung dịch đệm thích hợp có thể phủ lên bề mặt plastic (như polystyren). Quá trình này có thể là trực tiếp hoặc thông qua một kháng thể. Xét nghiệm ELISA được thực hiện trong đĩa plastic kích thước 8cmx12cm, chứa 8x12 giếng. Các kháng thể sử dụng trong phương pháp ELISA được gắn với enzym bằng liên kết đồng hoá trị. Kháng nguyên được gắn với giếng plastic và kháng thể liên kết với enzym được gắn với kháng nguyên. Kháng thể không gắn kháng nguyên sẽ bị rửa trôi đi. Enzym được giữ lại và lượng kháng thể gắn enzym được phát hiện bằng cách cho thêm vào một cơ chất làm thay đổi màu do hoạt tính của enzym. Độ màu tạo thành là tỉ lệ với lượng enzym bám ở giếng plastic, từ đó suy ra lượng kháng thể, sau đó tiếp tục suy ra lượng kháng nguyên.

Định lượng protein

Lượng protein được đo theo phương pháp của Bradford sử dụng bovin serum albumin (BSA) làm chất chuẩn. 20µl dung dịch protein được thêm vào 1ml dung dịch Bradford và được ủ trong bóng tối 10 phút. Đo mật độ quang tại bước sóng 595nm.

e) Phương pháp nghiên cứu tác dụng lợi mật của hỗn hợp chứa cao chiết trên mô hình *in vivo*

Tiến hành: Dùng 30 chuột nhắt trắng chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 con. Theo phương pháp của Rudi.

Lô 1 - lô chứng sinh lý: chuột uống NaCl 0,9%

Lô 2 - lô thử: chuột uống viên nang hỗn hợp chứa cao chiết-liều 2

Chuột ở 2 lô được uống mẫu thử theo liều quy định trong 3 ngày liên tục, ngày thứ 4 sau khi uống thuốc 30 phút tiến hành gây mê bằng ether etylic và mổ bụng để thắt ống dẫn mật rồi khâu thành bụng lại, sau 30 phút bóc tách túi mật, thấm qua giấy lọc, cân ngay được m_1 (mg). Rạch túi mật cho mật chảy ra hết rồi thấm vào giấy lọc và cân lại được m_2 (mg). Khối lượng mật mỗi con là $m = m_1 - m_2$ (mg)

Lượng sinh mật ở lô thử tăng hơn so với lô chứng tính theo công thức:

$$L\% = \frac{m_t - m_c}{m_c} \times 100\%$$

Xử lý số liệu:

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp t-test student và test “trước-sau” (Avant-After). Số liệu được biểu diễn dưới dạng $X \pm SD$. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

f) Kết quả nghiên cứu

Kết quả độc tính cấp của hỗn hợp chứa cao chiết

Triệu chứng lâm sàng

Sau khi cho uống, tất cả chuột giảm hoạt động, đi lại chậm chạp (sau 15 phút), chuột nằm cụp lại (sau 30 phút), chuột ít ăn uống, có vẻ mệt (sau 45 phút), sau 60 phút phân nửa số chuột bắt đầu ăn uống khá hơn và linh hoạt trở lại và sau 90 phút chuột hoạt động và ăn uống bình thường, khảo sát đến 72 giờ không có chuột chết. Tiếp tục theo dõi đến 7 ngày, không thấy có hiện tượng chuột bị ngộ độc.

Mổ khám và quan sát nội tạng

Mổ khám tất cả chuột thí nghiệm, sau 7 ngày, nhận thấy: cơ tim bình thường, toàn bộ gan có màu đỏ tươi (hai chuột gan có màu đỏ sậm), túi mật đầy,

dịch mật có màu vàng trong, phổi trắng hồng và ruột tiêu hóa tốt (không biểu hiện bất thường).

Khảo sát vi thể ở gan chuột

Khảo sát vi thể gan của các chuột thử nghiệm và chuột đối chứng cho thấy: các tế bào gan, khoảng cửa ở gan có hình thái bình thường và mô kẽ bình thường; không có hiện tượng hủy hoại tế bào gan. Nhìn chung, cho chuột uống liều 17,5 g/kg cân nặng sau 72 giờ, mà đây là liều cao nhất có thể cho chuột uống, đã không gây chết hoặc có triệu chứng ngộ độc, Như vậy, chế phẩm có phạm vi an toàn khá rộng, không thể hiện độc tính cấp và không có LD₅₀ (Lethal dose 50%).

Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn của hỗn hợp chứa cao chiết

Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng của chuột

- Biểu hiện chung: Sau 30 ngày uống chế phẩm, tất cả chuột ở lô chứng và lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết liều 2 đều hoạt động, đi lại bình thường, ăn uống tốt, phân khô, lông mượt.
- Về cân nặng: Thể trọng chuột trung bình giữa các lô được so sánh vào các khoảng thời điểm mỗi 7 ngày, chuột ở các lô tăng trưởng bình thường và khác nhau không có ý nghĩa trong suốt thời gian thử nghiệm

Trong suốt thời gian thí nghiệm, chuột ở cả 2 lô hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, lông mượt, ăn uống tốt, phân khô. Không thấy biểu hiện gì đặc biệt ở cả 2 lô chuột trong suốt thời gian nghiên cứu.

Sự thay đổi thể trọng chuột

Bảng 1. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết đến thể trọng của chuột

Thời gian	Trọng lượng (g)		P (t-test Student)
	Lô chứng	Lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết -L2	
Trước uống thuốc	25,7±0,39	25,8±0,25	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	29,4±0,45	28.2±0,41	>0,05

Sau 4 tuần uống thuốc	35,7±0,98	36,2±0,37	>0,05
-----------------------	-----------	-----------	-------

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Kết quả ở bảng trên cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống thuốc, trọng lượng của chuột ở cả 3 lô (lô chứng và lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết) đều tăng so với trước khi nghiên cứu ($p>0,05$). Không có sự khác biệt rõ rệt về mức độ gia tăng trọng lượng chuột giữa lô chứng và các lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết.

Đánh giá chức năng tạo máu

Bảng 2. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết đến số lượng hồng cầu trong máu chuột

Thời gian	Số lượng hồng cầu (triệu/ μ L)		P (t-test Sudent)
	Lô chứng	Lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết -L2	
Trước uống thuốc	8,42±0,14	8,74±0,29	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	8,23±0,32	8,27±0,32	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	8,43±0,24	8,57±0,63	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Bảng 3. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết đến thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột

Thời gian	Thể tích trung bình hồng cầu (fl)		P (t-test Sudent)
	Lô chứng	Lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết -L2	
Trước uống thuốc	44,19±2,38	45,27±2,98	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	46,28±3,19	46,49±3,16	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	48,18±3,47	49,47±3,75	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Bảng 4. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết đến số lượng huyết sắc tố (Haemoglobin) trong máu chuột

Thời gian	Số lượng huyết sắc tố (g/dL)		P (t-test Sudent)
	Lô chứng	Lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết –L2	
Trước uống thuốc	15,03±0,90	14,66±0,92	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	14,39±0,81	15,67±0,55	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	15,48±1,25	15,28±1,35	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Bảng 5. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết đến hematocrit trong máu chuột

Thời gian	Hematocrit (%)		P (t-test Sudent)
	Lô chứng	Lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết –L2	
Trước uống thuốc	35,25±2,36	34,21±2,98	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	36,57±1,23	36,12±1,29	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	36,57±2,67	33,67±1,41	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Bảng 6. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết đến số lượng bạch cầu trong máu chuột

Thời gian	Số lượng bạch cầu (nghìn/mm ³)		P (t-test Sudent)
	Lô chứng	Lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết –L2	
Trước uống thuốc	7,39±1,12	7,89±1,57	>0,05

Sau 2 tuần uống thuốc	7,57±1,68	7,57±1,49	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	7,31±1,74	7,64±1,39	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Bảng 7. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết đến công thức bạch cầu trong máu chuột

Thời gian	Công thức bạch cầu			
	Lô chứng		Lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết -L2	
	Lympho (%)	Trung tính (%)	Lympho (%)	Trung tính (%)
Trước uống thuốc	75,5± 11,9	28,2± 12,7	78,7±8,6	24,3±7,8
Sau 2 tuần uống thuốc	77,4±8,4	24,8±5,7	79,4±8,1	25,7 ± 8,1
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Sau 4 tuần uống thuốc	79,1±7,8	26,9±7,5	81,9±4,6	27,4±6,1
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Bảng 8. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết đến số lượng tiểu cầu trong máu chuột

Thời gian	Số lượng tiểu cầu ($10^9/L$)		P (t-test Sudent)
	Lô chứng	Lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết -L2	
Trước uống thuốc	326,4±48,7	326,7±38,4	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	329,1±49,5	333,8±37,4	>0,05

P (trước-sau)	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	331,7±37,5	339,7±38,1	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Kết quả ở các bảng trên cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống hỗn hợp chứa cao chiết ở liều 2, tất cả các xét nghiệm đánh giá chức năng tạo máu (số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng huyết sắc tố, hematocrit, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu) ở lô hỗn hợp chứa cao chiết không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc ($p > 0,05$).

Đánh giá chức năng gan

Kết quả cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống hỗn hợp chứa cao chiết – L2, các xét nghiệm đánh giá chức năng gan (ALT, AST) ở lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc ($p > 0,05$).

Bảng 9. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết đến hoạt độ AST và ALT trong máu chuột

Thời gian	Hoạt độ AST(IU/U)			Hoạt độ ALT(IU/U)		
	Lô chứng	Lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết – L2	P (t-test Student)	Lô chứng	Lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết – L2	P (t-test Student)
Trước uống thuốc	65,74 ±8,25	64,12 ±8,32	>0,05	93,7 ±6,24	91,5 ±6,318	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	65,29 ±7,54	65,71 ±7,19	>0,05	94,8 ±9,18	93,4 ±7,13	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05		>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống	64,16 ±7,51	67,34 ±8,17	>0,05	95,7 ±7,35	96,1 ±6,86	>0,05

thuốc						
P (trước-sau)	>0,05	>0,05		>0,05	>0,05	

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Đánh giá chức năng thận

Bảng 10. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết đến hàm lượng creatinin trong máu chuột

Thời gian	Creatinin ($\mu\text{M/L}$)		P (t-test Student)
	Lô chứng	Lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết -L2	
Trước uống thuốc	27,34 $\pm$ 3,12	27,13 $\pm$ 2,27	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	28,13 $\pm$ 2,24	29,24 $\pm$ 3,28	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	29,15 $\pm$ 2,75	29,21 $\pm$ 2,14	>0,05
P (trước-sau)	>0,05	>0,05	

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Kết quả cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống hỗn hợp chứa cao chiết -L2, ở lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết, lượng creatinin trong máu chuột không có sự thay đổi khác biệt so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc ($p > 0,05$).

Thay đổi về hình thái

Đại thể:

Trên tất cả các chuột thực nghiệm (cả lô chứng và lô trị) không quan sát thấy có sự thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của chuột.

Vi thể:

* Hình thái vi thể gan:

- Lô chứng: tế bào gan bình thường, không thoái hoá, không hoại tử, xoang mạch không sung huyết.
- Lô hỗn hợp chứa cao chiết: hầu hết tế bào gan không có tổn thương thoái hoá, hoại tử, khoang cửa không viêm.

Tóm tắt kết quả về nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Trên lô chuột uống hỗn hợp chứa cao chiết, liên tục trong 4 tuần liền, kết quả cho thấy:

- Liều thuốc thử không làm ảnh hưởng xấu đến tình trạng chung, sự gia tăng trọng lượng của chuột.
- Không làm thay đổi kết quả các xét nghiệm đánh giá chức năng tạo máu của chuột (số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng huyết sắc tố, hematocrit, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu).
- Không làm thay đổi kết quả các xét nghiệm đánh giá chức năng gan (ALT, AST) và chức năng thận (creatinin).
- Mô bệnh học không gây tổn thương về mặt hình thái khi quan sát đại thể các cơ quan và vi thể gan của chuột.

Kết quả nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ gan mật của hỗn hợp chứa cao chiết trên động vật thí nghiệm

Tác dụng bảo vệ gan của hỗn hợp chứa cao chiết

Kết quả định lượng men gan

Các enzym bao gồm AST và ALT là các enzym transaminaza chính ở gan, dùng trong đánh giá các tổn thương gan. Kết quả tác dụng lên các enzym gan của các nhóm nghiên cứu trình bày ở bảng 11. Các enzym này nằm trong nội bào và được giải phóng ra hệ tuần hoàn chung sau khi tế bào bị tổn thương.

Bảng 11. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết lên hoạt độ AST và ALT trong huyết thanh chuột bị gây độc bằng paracetamol

	C(-)	C(+)	Silymarin	Hỗn hợp chứa cao chiết-L1	Hỗn hợp chứa cao chiết-L2
Aspartat transaminaza (AST) (UI/L) (TB $\pm$ SE)	66,23 $\pm 12,19$	179,37 $\pm 22,29$	101,61 $\pm 8,97^*$	139,25 $\pm 19,24$	102,19 $\pm 19,27^*$
Alanin transaminaza (ALT) (UI/L) (TB $\pm$ SE)	102,33 $\pm 14,23$	161,18 $\pm 13,87$	122,69 $\pm 11,83^*$	123,33 $\pm 22,35$	109,28 $\pm 14,57^*$

*: Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh C(+);

(hỗn hợp chứa cao chiết- L1: 7,2 g dược liệu/kg chuột; -L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Paracetamol làm tăng đáng kể men gan so với nhóm chứng âm. Liều 1 có xu hướng có tác dụng làm hạ men gan, nhưng chưa có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh. Liều 2 làm giảm men gan đáng kể, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh.

Kết quả giải phẫu bệnh

Bảng 12. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết lên sự thay đổi đại phẫu mô bệnh học gan chuột bị gây độc bằng paracetamol

	Đại phẫu
C(-)	Gan màu đỏ, mặt nhẵn, mật độ mềm, không phù nề, không sung huyết
C(+)	Gan bị bạc màu đỏ, phù nề, sung huyết, bề mặt sần sùi, có các chấm xuất huyết, các điểm tổn thương trải khắp bề mặt.
Silymarin	Gan màu đỏ, sung huyết nhẹ, có một vài điểm tổn thương, một vài điểm bạc màu

Hỗn hợp chứa cao chiết-L1	Gan màu đỏ, ít bị bạc màu, có các điểm tổn thương và sung huyết nhẹ, bề mặt ít sần sùi.
Hỗn hợp chứa cao chiết-L2	Gan màu đỏ, ít bị bạc màu, có một số điểm tổn thương và sung huyết nhẹ, bề mặt ít sần sùi.

Bảng 13. Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết lên sự thay đổi vi phẫu mô bệnh học gan chuột bị gây độc bằng paracetamol

Chỉ tiêu	C(-) (%)	C(+) (%)	Silymarin	Hỗn hợp chứa cao chiết-L1 (%)	Hỗn hợp chứa cao chiết-L2 (%)
Thoái hóa tế bào gan	0	70	0	30	0
Chảy máu	0	80	0	0	0
Hoại tử gan cấp	0	70	0	0	0
Xâm nhập viêm khoảng cửa	30	100	40	70	40

(hỗn hợp chứa cao chiết- L1: 7,2 g dược liệu/kg chuột; -L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Paracetamol có tác dụng làm tăng thoái hóa tế bào gan và xâm nhập viêm ở khoảng cửa, gây chảy máu, và hoại tử gan. Silymarin có ở hoại tử nhỏ rải rác, thoái hóa tế bào gan nhẹ.

Ảnh hưởng của hỗn hợp chứa cao chiết tới gan với kích ứng của paracetamol cho thấy: hỗn hợp chứa cao chiết ở liều 1 gây ra thoái hóa tế bào gan thấp và có tác dụng giảm rõ rệt so với chứng bệnh. Ở liều hai không gây thoái hoá gan, chảy máu, hay hoại tử gan cấp. Vẫn quan sát thấy hiện tượng xâm nhập viêm khoảng cửa.

Như vậy, qua kết quả đánh giá sinh hóa và kết quả vi phẫu thì nhận thấy hỗn hợp chứa cao chiết có tác dụng bảo vệ gan, tác dụng đặc biệt tốt ở liều 2.

Tác dụng của hỗn hợp chứa cao chiết lên các chỉ thị sinh học phân tử liên quan đến quá trình viêm trên mô hình chuột nhất do Paracetamol gây ra

Peroxit hóa lipid trong mô gan

Các gốc tự do tấn công các axit béo không no và hình thành các aldehyt electrophin có khả năng kích hoạt phản ứng rất cao, bao gồm cả malondialdehyt (MDA) và 4 - hydroxy - 2 – nonenal. MDA được sử dụng như một chỉ thị sinh học để đánh giá peroxid hóa lipid trong cơ thể.

Hình 1 biểu diễn lượng peroxid hóa lipid (MDA) trong các nhóm nghiên cứu. Có sự gia tăng đáng kể nồng độ MDA trong nhóm chứng dương. Silymarin và hỗn hợp chứa cao chiết ở liều 2 (- L2) làm giảm đáng kể nồng độ MDA so với nhóm chứng dương, trong đó Silymarin làm giảm 60,11%, hỗn hợp chứa cao chiết - L2 làm giảm 28,98 % so với nhóm chứng dương.

Bảng 14. Tác dụng của hỗn hợp chứa cao chiết trên mô hình chuột tổn thương gan do PAR gây ra đối với nồng độ lipid hóa trên mô gan

MDA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)				
STT	Chứng sinh lý (CONTROL)	Chứng dương (PAR)	Silymarin	hỗn hợp chứa cao chiết-L2
TB (n=10)	2,77	12,40	4,61	8,20
SD (n=10)	0,38	2,30	0,91	1,19

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Các yếu tố tiền viêm trong mô gan

Hình 2 và 3 biểu diễn lượng các yếu tố tiền viêm trong mô gan trong các nhóm nghiên cứu. Hàm lượng protein của TNF- α tăng đáng kể trong mô gan bởi PAR. Silymarin và hỗn hợp chứa cao chiết - L2 làm giảm đáng kể nồng độ TNF- α so với nhóm chứng dương, trong đó Silymarin làm giảm 53,58%, viên nang bài thuốc 2 làm giảm 39,36 % so với nhóm chứng dương. Kết quả tương tự với IFN- γ , trong đó Silymarin làm giảm 56,87%, hỗn hợp chứa cao chiết - L2 làm giảm 24,59 % so với nhóm chứng dương. Kết quả này gợi ý tác dụng bảo vệ gan của hỗn hợp chứa cao chiết là nhờ cơ chế chống viêm.

Bảng 15. Tác dụng của hỗn hợp chứa cao chiết trên mô hình chuột tổn thương gan do PAR gây ra đối với nồng độ TNF- α trên mô gan

TNF α (μ g/mg protein)				
STT	Chứng âm (CONTROL)	Chứng dương (PAR)	Silymarin	hỗn hợp chứa cao chiết-L2
TB (n=10)	51,86	154,92	77,66	104,57
SD (n=10)	6,45	15,54	13,32	8,20

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Bảng 16. Tác dụng của hỗn hợp chứa cao chiết trên mô hình chuột tổn thương gan do PAR gây ra đối với nồng độ IFN- γ trên mô gan

IFN (μ g/mgprotein)				
STT	Chứng âm (CONTROL)	Chứng dương (PAR)	Silymarin	hỗn hợp chứa cao chiết-L2
TB (n=10)	34,02	129,37	61,60	86,31
SD (n=10)	6,29	13,01	20,89	13,93

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

Tác dụng lợi mật của hỗn hợp chứa cao chiết trên mô hình *in vivo*

Bảng 17. Kết quả thử tác dụng lợi mật của hỗn hợp chứa cao chiết

TT	Lô dùng hỗn hợp chứa cao chiết - L2 m_t (mg)			Lô chứng m_c (mg)		
	m_1	m_2	m_t	m_1	m_2	m_c
TB (n=10)	5,31	1,18	4,13	3,42	0,93	2,49
L%	65,86%					

(hỗn hợp chứa cao chiết- L2: 14,4 g dược liệu/kg chuột)

trong đó: L: lượng mật sinh tăng,

m_1 (khối lượng túi mật, mg);

m_2 (khối lượng vỏ túi mật, mg);

m_t (khối lượng mật của lô thử, mg);

m_c (khối lượng mật của lô chứng, mg);

$$m_t = m_1 - m_2; m_c = m_1 - m_2.$$

Kết quả ở bảng trên cho thấy: hỗn hợp chứa cao chiết làm tăng 65,86% lượng mật tiết ra,. Kết quả này cho thấy hỗn hợp chứa cao chiết có tác dụng lợi mật.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Hỗn hợp chứa cao chiết có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol 400mg/kg ở chuột nhắt trắng: giảm hoạt độ enzym AST, ALT, giảm các chỉ số viêm TNF- α , IFN- γ , MDA, giảm tổn thương gan trên đại thể và vi thể rõ rệt so với lô chuột nhắt trắng bị gây độc bằng paracetamol, không dùng thuốc thử.

Hỗn hợp chứa cao chiết cũng cho thấy tác dụng lợi mật rõ rệt khi làm tăng lượng mật tiết ra so với nhóm chứng trắng và không thể hiện độc tính cấp. Ngoài ra, hỗn hợp chứa cao chiết không gây độc tính bán trường diễn trên chuột khi cho chuột uống liều 2. Tất cả các chỉ số theo dõi về tình trạng chung, cân nặng, chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận và mô bệnh học gan, thận đều nằm trong giới hạn bình thường, không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hỗn hợp chứa cao chiết của các cây trướng quốc (*Stixis suaveolens* (Roxb.) Pierre) và dứa dại (*Pandanus tonkinensis* Martelli) có tác dụng bảo vệ gan và lợi mật, trong đó hỗn hợp này được điều chế như sau:

(i) thu hái nguyên liệu cây trướng quốc (thân, lá), phơi khô, nghiền nhỏ thu được bột nguyên liệu;

(ii) thu hái nguyên liệu cây dứa dại (thân, lá, quả), phơi khô, nghiền nhỏ thu được bột nguyên liệu;

(iii) phối trộn các bột nguyên liệu của cây trướng quốc và dứa dại theo tỷ lệ 1:1 thu được hỗn hợp bột nguyên liệu;

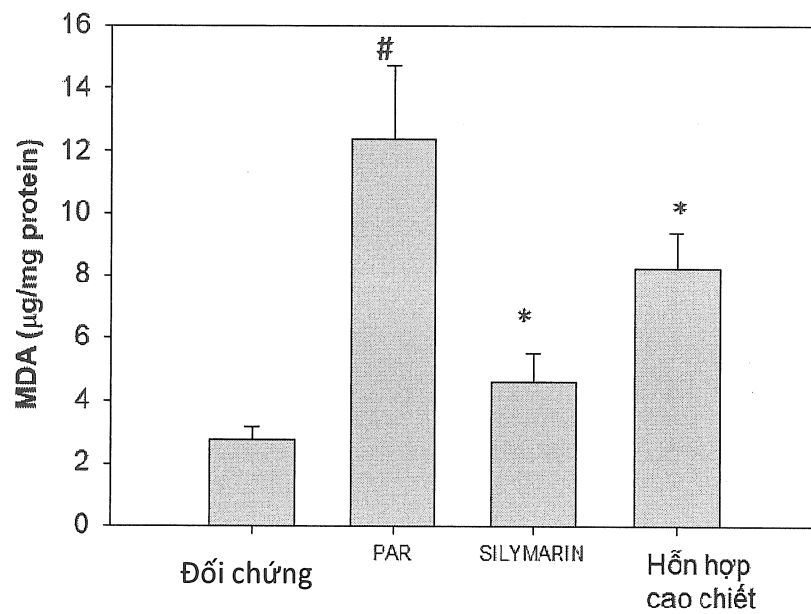
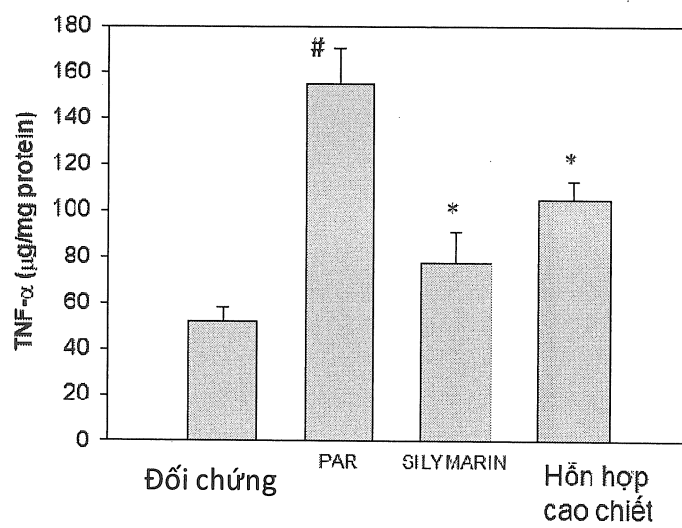
(iv) chiết lần 1 hỗn hợp bột nguyên liệu này bằng nước, đun sôi ở 100°C trong 3 giờ, lọc dịch chiết qua thiết bị lọc có đường kính lỗ lọc 160µm, cô dịch chiết ở nhiệt độ từ 70 đến 85°C, áp suất từ -0,04 đến -0,08MPa; tiếp tục chiết lần 2 với các điều kiện tương tự như lần 1 và gộp dịch chiết lần 1 và lần 2 thu được hỗn hợp dịch chiết;

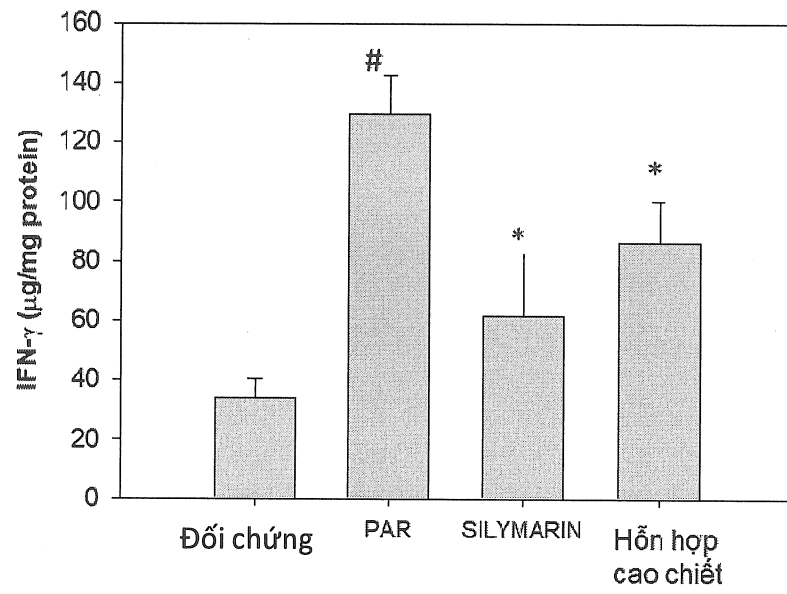
(v) cô đặc hỗn hợp dịch chiết bằng thiết bị cô chân không tuần hoàn cấp I đến khi đạt được tỷ trọng là 1,10 ở nhiệt độ 30°C, lọc qua thiết bị lọc có đường kính lỗ lọc 160µm, sau đó bổ sung natri benzoat và kali sorbat vào hỗn hợp dịch cô theo tỷ lệ khối lượng natri benzoat:kali sorbat:hỗn hợp bột nguyên liệu là $1,25 \times 10^{-4} : 1,25 \times 10^{-4} : 1$ và khuấy đến khi hòa tan hòa toàn trong thời gian 30 phút;

(vi) sấy phun hỗn hợp dịch cô bằng máy sấy phun để thu được cao khô có hàm ẩm $\leq 5\%$ và trộn đồng nhất trong thời gian 30 phút, thu được hỗn hợp chứa cao chiết của các cây trướng quốc và dứa dại.

2. Thuốc có tác dụng bảo vệ gan và lợi mật chứa hỗn hợp theo điểm 1.

3. Thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng bảo vệ gan và lợi mật chứa hỗn hợp theo điểm 1.

**Hình 1****Hình 2**

**Hình 3**