



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

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

(11)



1-0031385

(51)^{2008.04} A61K 35/407; A61K 36/48

(13) B

(21) 1-2020-02491

(22) 29/04/2020

(45) 25/03/2022 408

(43) 27/07/2020 388ASC

(76) Nguyễn Thị Ngọc Trâm (VN)

163/48 Thành Thái, phường 14, quận 10, thành phố Hồ Chí Minh

(54) HỖN HỢP ỨC CHẾ TẾ BÀO UNG THƯ GAN ĐƯỢC CHIẾT TỪ HOA CỦA CÂY *CRINUM LATIFOLIUM* L. VAR. *CRILAE*. TRAM & KHANH, QUY TRÌNH SẢN XUẤT VÀ THUỐC ĐỂ HỖ TRỢ ĐIỀU TRỊ BỆNH UNG THƯ GAN CHỨA HỖN HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan bao gồm nhóm các hoạt chất flavonoid và ancaloit có hoạt tính sinh học được chiết từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh, trong đó nhóm hoạt chất flavonoid chiếm 25% trọng lượng hỗn hợp và nhóm ancaloit chiếm 75% trọng lượng hỗn hợp. Hỗn hợp theo sáng chế cho phép ức chế hiệu quả tế bào ung thư gan. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan và quy trình sản xuất thuốc này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa học các hợp chất thiên nhiên và dược phẩm từ thảo dược, cụ thể sáng chế đề cập đến hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan được chiết từ cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae*. Tram & Khanh và thuốc hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan chứa hỗn hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việt Nam là quốc gia nằm trong vùng dịch tễ có tỷ lệ viêm gan cao, do đó có tỷ lệ ung thư gan cao. Ước tính trung bình mỗi năm cả nước có khoảng 10.000 ca ung thư gan mới phát hiện, và khoảng 22.000 ca tử vong, tỷ lệ này là cao nhất trên thế giới. Trong đó, ung thư tế bào gan HCC chiếm tỷ lệ gây tử vong lên tới 80% tổng số các ca ung thư gan. Đã có nhiều nỗ lực phát triển dược phẩm nhằm ức chế tế bào ung thư gan, kéo dài thời gian sống cho bệnh nhân ung thư gan. Ví dụ về các loại dược phẩm hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan bao gồm Cabometyx (Cabozantinib-S-Malate), Cyramza (Ramucirumab), Keytruda (Pembrolizumab), Levima (Lenvatinib Mesylate), Nexavar (Sorafenib Tosylate), Opdivo (Nivolumab), Stivarga (Regorafenib). Tuy nhiên, những dược phẩm này chủ yếu là các hoạt chất tổng hợp, có nhiều tác dụng phụ mà ảnh hưởng đến gan, thận, và do đó, gây ra sự quá tải cho việc đào thải chất độc vốn đã yếu của người bệnh.

Đã có nhiều nghiên cứu nhằm phát triển các loại thuốc ngăn ngừa và điều trị bệnh ung thư. Đến nay, ung thư vẫn là bệnh mà y học chưa có liệu pháp điều trị triệt để. Các phương pháp điều trị phụ trợ như hóa trị hoặc xạ trị kết hợp với các loại thuốc ức chế cũng chỉ nhằm kéo dài thời gian sống cho bệnh nhân. Mặc dù vậy, bệnh ung thư gan vẫn có thời gian tử vong nhanh nhất, thường bệnh nhân cũng chỉ kéo dài thời gian sống từ 3 đến 6 tháng kể từ khi phát hiện tế bào ung thư.

Một trong những hướng nghiên cứu đó là tìm kiếm và phát triển các hoạt chất có nguồn gốc từ thiên nhiên để làm nguồn dược liệu để phát triển thuốc. Các loại ancaloit

và flavonoit là các ứng viên hàng đầu trong việc nghiên cứu, sàng lọc nhằm đưa ra được các thuốc để điều trị các bệnh khác nhau.

Cây trinh nữ hoàng cung *Crinum Latifolium* L. là một cây thuộc loài Crinane, họ Amaryllidaceae đã được nghiên cứu và đã phát triển thành thuốc có hiệu quả trong việc điều trị u xơ tuyến tiền liệt. Đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền giải pháp hữu ích số 2-2019-0136 đã đề cập đến quy trình chiết ancaloit toàn phần từ cây trinh nữ hoàng cung nhằm phát triển thuốc điều trị u xơ tuyến tiền liệt. Trong đó, giải pháp đã tiến hành chiết tách ancaloit toàn phần từ lá cây bằng phương pháp chiết kết tủa với các hệ dung môi etanol/axit axetic. Dựa trên đặc tính của ancaloit, các tác giả đã loại tạp chất bằng cách điều chỉnh pH nhằm thu được ancaloit tổng số. Theo đó, ancaloit được chiết từ lá cây trinh nữ hoàng cung có hiệu suất chiết ancaloit toàn phần chỉ đạt 2,35%. Một điều thú vị là từng thành phần ancaloit tinh sạch chiết theo từng phân đoạn không thể hiện hoạt tính tác dụng lên tế bào khối u mạnh, tuy nhiên, khi kết hợp các phân đoạn thì cho thấy hiệu quả tác dụng lên tế bào ung thư phổi, gan, màng tim thử nghiệm. Các phân đoạn kết hợp này cho thấy có khả năng chống các gốc tự do, ngăn ngừa sự phát triển của khối u.

Đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền giải pháp hữu ích số 2-2019-0136 đã đề cập đến quy trình chiết flavonoit toàn phần từ cây trinh nữ hoàng cung, trong đó flavonoit được chiết phân đoạn bằng CHCl_3 để thu flavonoit tổng số. Flavonoit tổng số này cho thấy có khả năng tác dụng lên tế bào u tủy Graffi RPMI 1640 thử nghiệm. Tuy nhiên, hiệu suất chiết flavonoit từ lá cây theo tài liệu này rất thấp, chỉ đạt khoảng 0,36%, điều này rất khó có thể phát triển được nguồn dược liệu với giá thành cạnh tranh được với các thuốc tổng hợp.

Bằng độc quyền giải pháp hữu ích số 483 của cùng tác giả đã đề cập đến thuốc chữa bệnh u xơ tuyến tiền liệt bào chế từ alcaloit được chiết xuất từ lá cây trinh nữ hoàng cung và phương pháp bào chế thuốc này, trong đó đã đề cập đến quy trình chiết xuất toàn phần các alcaloit có trong lá cây trinh nữ hoàng cung để thu được dạng cao khô có tác dụng chữa bệnh u xơ tuyến tiền liệt. Trong đó, quy trình chiết alcaloit toàn phần bao gồm các bước chiết bột lá cây trinh nữ hoàng cung bằng dung môi cồn 70° và dung dịch axit axetic 2%, sau khi loại bỏ dung môi thu được hỗn hợp dạng cao khô. Tuy nhiên, tài liệu này mới chỉ đề cập đến việc chiết toàn phần các alcaloit có trong lá cây trinh nữ hoàng cung mà không đề cập đến việc chiết chọn lọc các phân đoạn có

hoạt tính nên hiệu quả của hỗn hợp thu được này còn nhiều hạn chế do tác dụng phụ của các alcaloit tạp không có tác dụng điều trị bệnh.

Bằng độc quyền giải pháp hữu ích số 2-0000388 đã đề cập đến quy trình chiết xuất flavonoit từ củ ráy. Quy trình này bao gồm các bước chiết nguyên liệu đã được pha chế bằng cồn 80%, cất dịch chiết thu được để thu hồi dung môi tạo ra cao lỏng, tiếp đó chiết cao lỏng thu được này bằng xăng trắng, chiết lại dịch chiết thu được bằng etyl axetat, thu gom dịch chiết etyl axetat và làm bay hơi dung môi, thu được dịch chiết chứa flavonoit. Dịch chiết này được dùng để điều trị vết bỏng ngoài da.

Bằng độc quyền giải pháp hữu ích số 2-0000387 đã đề cập đến quy trình chiết xuất flavonoit từ vỏ hạt đậu xanh. Quy trình này bao gồm các bước chiết nguyên liệu đã được pha chế bằng cồn 80-85%, cất dịch chiết thu được để thu hồi dung môi tạo ra cao lỏng, tiếp đó chiết cao lỏng thu được bằng xăng trắng hoặc n-hexan, cô đặc dịch chiết thu được cho đến khi xuất hiện kết tủa, làm lạnh rồi lọc thu được chất kết tủa dạng bột nhão chứa flavonoit.

Mặc dù cây trinh nữ hoàng cung (*Crinum Latifolium* L.) đã được chứng minh có tác dụng điều trị bệnh ung thư dựa trên thành phần alcaloit, tuy nhiên, các thành phần flavonoit cũng có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh ung thư có trong lá cây trinh nữ hoàng cung vẫn chưa được nghiên cứu.

Ngoài ra, cũng có nhiều nghiên cứu cho thấy rằng, không phải những hoạt chất tinh khiết mới có được hoạt tính sinh học vượt trội, nhưng ngược lại, nhiều khi việc sử dụng cao chiết tổng lại cũng không thể hiện tác dụng do đặc tính kìm hãm của các chất có trong cao chiết đó. Mặt khác việc lựa chọn nhóm hoạt chất có nguồn gốc từ tự nhiên vừa không kìm hãm nhau, vừa phải kết hợp để tạo hiệu quả hiệp đồng là điều hết sức khó. Ngoài ra, như đề cập ở trên, hiệu suất chiết các hoạt chất alcaloit và flavonoit từ lá cây trinh nữ hoàng cung là thấp, do đó cần có sự cải tiến về vật liệu khởi đầu, quy trình chiết và lựa chọn nhóm hoạt chất có tác dụng hiệp đồng để vừa tăng hiệu suất, vừa tăng được hoạt tính của chế phẩm thu được để phát triển thuốc điều trị bệnh ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể sáng chế đề cập đến hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan bao gồm nhóm các hoạt chất flavonoit và alcaloit có

hoạt tính sinh học được chiết từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae*. Tram & Khanh, và quy trình sản xuất hỗn hợp này. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan và quy trình sản xuất thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan bao gồm nhóm các hoạt chất flavonoid và ancaloit có hoạt tính sinh học được chiết từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh, trong đó hỗn hợp này bao gồm:

+ Nhóm các hoạt chất flavonoid chiếm 25% trọng lượng hỗn hợp, trong đó nhóm này bao gồm các thành phần sau:

4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphecol
kaempferol
quercetin
β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosit

+ Nhóm các hoạt chất ancaloit chiếm 75% trọng lượng hỗn hợp, trong đó nhóm này bao gồm các thành phần sau:

ambellin
1 β -2 β epoxyambellin
crinamidin
6-hydroxycrinamidin
powellin
6-hydroxypowellin.

Theo các phương án ưu tiên, trong đó nhóm hoạt chất flavonoid bao gồm các thành phần có tỷ lệ % trọng lượng sau:

4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphecol	10-15
kaempferol	15-25
quercetin	15-25
β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosit	40-60.

Theo các phương án ưu tiên, trong đó nhóm hoạt chất ancaloit bao gồm các thành phần có tỷ lệ % trọng lượng sau:

ambellin	5-15
1 β -2 β epoxyambellin	25-35
crinamidin	5-15
6-hydroxycrinamidin	5-15
powellin	15-25
6-hydroxypowellin.	15-25

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo sáng chế, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hái hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh, loại bỏ tạp chất rồi phơi khô, xay thành bột thu được nguyên liệu hoa khô dạng bột;

b) chiết hoàn lưu nguyên liệu bằng cách chiết bột hoa khô với dung môi là ete dầu hỏa (EP) trong thiết bị hoàn lưu theo tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:10 (trọng lượng: thể tích) trong thời gian 1 giờ, sau đó tách riêng phần dịch và phần bã;

c) chiết nhóm hoạt chất flavonoid:

- thu cao chiết ete dầu hỏa bằng cách thu hồi phần dịch chiết, lọc và loại dung môi dưới áp suất giảm còn khoảng 5% thể tích thu được cao chiết ete dầu hỏa;

- chiết phân đoạn flavonoid bằng cách nhồi cao chiết ete dầu hỏa (EP) lên cột silica gel, tiến hành rửa giải với hệ dung môi lần lượt EP/EtOAc theo tỷ lệ EP 100%, EP: EtOAc 75:25, EP:EtOAc 50:50, EP:EtOAc 25:75 và EtOAc 100% thu ba phân đoạn EP: EtOAc 75:25, EP:EtOAc 25:75 và EtOAc 100%; và

- thu các hoạt chất flavonoid có hoạt tính sinh học bằng cách:

+ nhồi phân đoạn EP: EtOAc 75:25 lên cột silica gel và ổn định bằng dung môi CHCl_3 100%, tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 98/2, sau khi cô loại dung môi thu được hợp chất 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol dạng tinh thể không màu;

+ nhồi phân đoạn EP:EtOAc 25:75 lên cột silicagel và ổn định bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 98/2, tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 9/1, sau khi loại bỏ dung môi thu hai hợp chất kaempferol và quercetin dạng bột màu vàng; và

+ nhồi phân đoạn EtOAc 100% lên cột silicagel và ổn định bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 95/5, tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH tỷ lệ 9/1, sau khi loại bỏ dung môi, kết tinh trong MeOH thu được hợp chất β -sitosterol-3-*O*- β -*D*-glucopyranosit dạng bột màu trắng;

- gom chung các hợp chất 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol, kaempferol, quercetin và β -sitosterol-3-*O*- β -*D*-glucopyranosit thu được nhóm hoạt chất flavonoid dạng bột;

d) chiết nhóm hoạt chất ancaloit:

- chiết cao ancaloit tổng số bằng cách chuyển phần bã sau khi chiết loại flavonoid vào bình ngâm kiệt và chiết bằng hệ dung môi etanol: axit axetic tỷ lệ 70:30, theo tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 1/10 (trọng lượng/thể tích) trong thời gian 24 giờ, sau khi lọc, thu phần dịch và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm đến khi còn 5% thu được cao ancaloit tổng số;

- chiết loại tạp chất bằng cách kiềm hóa cao ancaloit tổng số bằng NH_4OH đến pH nằm trong khoảng từ 9 đến 10, sau khi lọc kết tủa, chiết phân đoạn ancaloit bằng CHCl_3 theo tỷ lệ 1:1 (v/v), tiếp đó axit hóa bằng HCl 0,1N rồi kiềm hóa bằng NH_4OH đến pH nằm trong khoảng từ 9 đến 10, sau khi cô loại dung môi thu được alcaloit toàn phần ở dạng cao đặc; và

- thu nhóm hoạt chất alcaloit bằng cách cho phần cao đặc này hấp phụ lên cột silica gel rồi rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH với tỷ lệ MeOH tăng dần, thu phân đoạn MeOH nồng độ 10%, 50% và 70%, trong đó:

+ phân đoạn MeOH 10% được cô loại dung môi, thu được hai hợp chất bao gồm ambellin và 1 β -2 β epoxyambellin ở dạng bột;

+ phân đoạn MeOH 50% được loại bỏ dung môi, thu được hai hợp chất bao gồm crinamidin và 6-hydroxycrinamidin ở dạng bột;

+ phân đoạn MeOH 70% được loại bỏ dung môi, thu được hai hợp chất bao gồm powellin và 6-hydroxypowellin ở dạng bột;

- gom chung các hợp chất ambellin, 1 β -2 β epoxyambellin, crinamidin, 6-hydroxycrinamidin, powellin và 6-hydroxypowellin thu được nhóm hoạt chất ancaloit dạng bột; và

e) thu hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan bằng cách phối trộn nhóm hoạt chất flavonoit thu được ở bước b) và nhóm hoạt chất ancaloit thu được từ bước d) theo tỷ lệ 25/75 (w/w) thu được hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan, trong đó thuốc này chứa hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan nêu trên và tá dược.

Theo một phương án ưu tiên, thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan, trong đó tá dược được chọn từ nhóm bao gồm tinh bột, tá dược rã, bột talc, magnesi stearat và/hoặc aerosil.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan nêu trên, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan nêu trên, nghiền mịn và rây qua lưới cỡ lỗ 0,75mm, các tá dược bao gồm aerosil, tinh bột, tinh bột natri glycolat (DST), bột talc và magnesi stearat được nghiền và rây qua lưới cỡ lỗ 0,75mm;

b) thu bột khô bằng cách phối trộn lần lượt hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan với 5% aerosil, 20% tinh bột, sau khi trộn đều, phối trộn tiếp với 5% DST, trộn đều thu được bột khô;

c) tạo dạng cốm trơn bằng cách phối trộn bột talc với magnesi stearat theo tỷ lệ 1:1 rồi phối trộn với bột khô thu được ở bước b) theo tỷ lệ 5%, tiếp đó chuyển vào thiết bị xát để thu được dạng cốm trơn; và

d) tạo viên nang bằng cách đóng cốm trơn vào viên nang trong điều kiện nhiệt độ từ 20 đến 25°C, độ ẩm 35 đến 55% để thu được thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp giải phẫu tế bào gan của thỏ thu được từ Ví dụ 3 ở mức phóng đại 400 lần, trong đó (A) là hình ảnh chụp hình thái vi thể gan thỏ bình thường được nhuộm bằng Hematoxylin-Eosin, (B) là hình thái vi thể gan thỏ đối chứng có tế bào gan thoái hóa vừa. (C) là hình thái của tế bào gan lô thử nghiệm sau 4 tuần uống thuốc thử. (D) là hình thái của của tế bào gan lô thử nghiệm sau 4 tuần uống thuốc thử với tế bào gan thoái hóa vừa.

Hình 2 là ảnh chụp giải phẫu tế bào thận chuột thu được từ Ví dụ 3 ở mức phóng đại 400 lần, trong đó (A) là hình thái vi thể thận thỏ của lô đối chứng có cầu thận bình thường và ống thận bình thường, (B) là hình thái vi thể thận thỏ của lô đối chứng có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần, (C) và (D) là hình thái vi thể thận thỏ của lô thử nghiệm sau 4 tuần có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần.

Hình 3 là ảnh chụp giải phẫu tế bào gan của thỏ thu được từ Ví dụ 3 sau thử nghiệm 2, trong đó (A) là hình ảnh chụp hình thái vi thể gan thỏ bình, (B) là hình thái vi thể gan thỏ đối chứng có tế bào gan thoái hóa vừa. (C) là hình thái của tế bào gan lô thử nghiệm có tế bào thoái hóa vừa. (D) là hình thái của của tế bào gan lô thử nghiệm sau khi điều trị 2 tuần với tế bào gan thoái hóa nhẹ.

Hình 4 là ảnh chụp giải phẫu tế bào thận chuột thu được từ Ví dụ 3 sau 2 tuần ngừng thử nghiệm, trong đó (A) là hình thái vi thể thận thỏ của lô đối chứng có cầu thận bình thường và ống thận bình thường, (B) là hình thái vi thể thận thỏ của lô đối chứng có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần, (C) và (D) là hình thái vi thể thận thỏ của lô thử nghiệm sau 2 tuần có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần.

Hình 5 là ảnh chụp kết quả thử nghiệm khả năng ức chế khối u của các hợp chất thử nghiệm trên tế bào ung thư gan HEP-G2 sau 15 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch. (A) là hình thái của tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung DMSO 1% (ĐC). (B) là hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hỗn hợp A (TN1), (C) là hình thái tế bào ung thư phá triển trên môi trường bổ sung hỗn hợp B (TN2), (D) là hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hỗn hợp C (TN3), và (E) là hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hoạt chất Ramucirumab (TN4).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ cụ thể. Tuy nhiên, các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể này chỉ nhằm minh họa để hiểu rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh thuộc loài *C. latifolium* L. trong quần thể *Crinum*. Cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh đã được tác giả Nguyễn Thị Ngọc Trâm phát triển và đăng ký là giống cây trồng với tên gọi

Trinh nữ Crila với số văn bằng 26/VN 2015 do Cục trồng trọt cấp. Vật liệu khởi đầu để chiết xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo sáng chế được thu từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh. Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu và nhận thấy rằng, trong hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh (còn gọi là Trinh nữ Crila) có chứa các hoạt chất flavonoit và ancaloit.

Sáng chế đề cập đến hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan bao gồm nhóm các hoạt chất flavonoit và ancaloit có hoạt tính sinh học được chiết từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae*. Tram & Khanh, và quy trình sản xuất hỗn hợp này. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan và quy trình sản xuất thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan bao gồm nhóm các hoạt chất flavonoit và ancaloit có hoạt tính sinh học được chiết từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh, trong đó hỗn hợp này bao gồm:

+ Nhóm các hoạt chất flavonoit chiếm 25% trọng lượng hỗn hợp, trong đó nhóm này bao gồm các thành phần sau:

4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol
kaempferol
quercetin
β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosit

+ Nhóm các hoạt chất ancaloit chiếm 75% trọng lượng hỗn hợp, trong đó nhóm này bao gồm các thành phần sau:

ambellin
1 β -2 β epoxyambellin
crinamidin
6-hydroxycrinamidin
powellin
6-hydroxypowellin

Trong đó hợp chất 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol lần đầu tiên được tìm thấy và được phân lập từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh. Tác giả sáng chế đã khảo sát và đã phát hiện ra rằng, hợp chất

4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-methoxyphenol chỉ có trong hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh. Ngoài ra, mặc dù một số hợp chất đã được phân lập từ lá cây trinh nữ hoàng cung, ví dụ, kaempferol, quercetin, crinamidin, powellin đã được chứng minh có tác dụng với tế bào u xơ tử cung, nhưng không phải hợp chất nào cũng có tác dụng và thể hiện hoạt tính sinh học sinh học đối với tế bào ung thư, cụ thể tế bào ung thư gan. Tác giả sáng chế đã nghiên cứu và bất ngờ phát hiện ra rằng, nhóm gồm bốn hoạt chất flavonoid thu được từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh tập trung nhiều trong hoa theo tỷ lệ thích hợp, các hợp chất này thể hiện tác dụng ức chế tế bào ung thư gan với hiệu quả vượt trội. Cơ chế hiệp đồng của hỗn hợp có thể được giải thích theo cơ chế đồng vận, nghĩa là các hoạt chất flavonoid kết hợp với các hoạt chất ancaloit theo sáng chế với tỷ lệ thích hợp cho phép tác dụng trực tiếp lên tế bào ung thư gan.

Theo các phương án ưu tiên, trong đó nhóm hoạt chất flavonoid bao gồm các thành phần có tỷ lệ % trọng lượng sau:

4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-methoxyphenol	10-15
kaempferol	15-25
quercetin	15-25
β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosit	40-60.

Theo các phương án ưu tiên cụ thể, trong đó hàm lượng của hợp chất 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-methoxyphenol tốt hơn là 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15% theo trọng lượng của nhóm hoạt chất flavonoid có trong hỗn hợp theo sáng chế. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, trong đó hàm lượng của hợp chất kaempferol (có tên IUPAC là 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-on) tốt hơn là 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 hoặc 25% trọng lượng của nhóm hoạt chất flavonoid có trong hỗn hợp theo sáng chế. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, trong đó hàm lượng của hợp chất quercetin (có tên IUPAC là 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one), tốt hơn là 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 hoặc 25% trọng lượng của nhóm hoạt chất flavonoid có trong hỗn hợp theo sáng chế. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, trong đó hàm lượng của hợp chất β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranosit tốt hơn là 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 hoặc 60% trọng lượng của nhóm hoạt chất flavonoid có trong hỗn hợp theo sáng chế.

Theo các phương án ưu tiên, trong đó nhóm hoạt chất ancaloit bao gồm các thành phần có tỷ lệ % trọng lượng sau:

ambellin	5-15
1 β -2 β epoxyambellin	25-35
crinamidin	5-15
6-hydroxycrinamidin	5-15
powellin	15-25
6-hydroxypowellin	15-25

Theo các phương án ưu tiên cụ thể, trong đó hàm lượng của hợp chất ambellin (có tên IUPAC là (15*R*)-9,15-dimethoxy-5,7-dioxa-12-azapentacyclo [10.5.2.0^{1,13}.0^{2,10}.0^{4,8}]nonadeca-2,4(8),9,16-tetraen-18-ol) tốt hơn là 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15% theo trọng lượng của nhóm hoạt chất ancaloit có trong hỗn hợp theo sáng chế. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, trong đó hàm lượng của hợp chất 1 β -2 β epoxyambellin (có tên IUPAC là [(1*S*,13*R*,15*R*,16*S*,18*R*,19*S*)-9,15-dimethoxy-5,7,17-trioxa-12-azahexacyclo [10.6.2.0^{1,13}.0^{2,10}.0^{4,8}.0^{16,18}]icosa-2,4(8),9-trien-19-yl] axetat), tốt hơn là 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 hoặc 35% trọng lượng của nhóm hoạt chất ancaloit có trong hỗn hợp theo sáng chế. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, trong đó hàm lượng của hợp chất crinamidin (có tên IUPAC là (1*S*,13*R*,15*R*,16*S*,18*R*)-9-methoxy-5,7,17-trioxa-12-azahexacyclo [10.6.2.0^{1,13}.0^{2,10}.0^{4,8}.0^{16,18}]icosa-2,4(8),9-trien-15-ol), tốt hơn là 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15% trọng lượng của nhóm hoạt chất ancaloit có trong hỗn hợp theo sáng chế. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, trong đó hàm lượng của hợp chất 6-hydroxycrinamidin (có tên IUPAC là (1*S*,13*R*,15*R*,16*S*,18*R*)-9-methoxy-5,7,17-trioxa-12-azahexacyclo [10.6.2.0^{1,13}.0^{2,10}.0^{4,8}.0^{16,18}]icosa-2,4(8),9-trien-11,15-diol), tốt hơn là 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15% trọng lượng của nhóm hoạt chất ancaloit có trong hỗn hợp theo sáng chế. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, trong đó hàm lượng của hợp chất powellin (có tên IUPAC là (1*S*,13*R*,15*R*)-9-methoxy-5,7-dioxa-12-azapentacyclo [10.5.2.0^{1,13}.0^{2,10}.0^{4,8}]nonadeca-2,4(8),9,16-tetraen-15-ol), tốt hơn là 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 hoặc 25% trọng lượng của nhóm hoạt chất ancaloit có trong hỗn hợp theo sáng chế. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, trong đó hàm lượng của hợp chất 6-hydroxypowellin (có tên IUPAC là (1*S*,11*R*,13*R*,15*R*)-9-methoxy-5,7-dioxa-12-azapentacyclo [10.5.2.0^{1,13}.0^{2,10}.0^{4,8}] nonadeca-2,4(8),9,16-tetraen-11,15-

diol), tốt hơn là 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 hoặc 25% trọng lượng của nhóm hoạt chất ancaloit có trong hỗn hợp theo sáng chế.

Bằng rất nhiều thử nghiệm, các tác giả đã phát hiện ra rằng, khi phối trộn 4 thành phần từ nhóm flavonoit nêu trên với 6 thành phần ancaloit chiết được từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh theo tỷ lệ 25/75 (w/w) thu được hỗn hợp có tác dụng ức chế tế bào ung thư gan. Hỗn hợp này cho thấy có khả năng kìm hãm tế bào ung thư gan ở mức tế bào và trên động vật thử nghiệm. Đặc biệt, các hoạt chất này được phân bố với tỷ lệ khá tương đồng trong hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo sáng chế, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết hoàn lưu nguyên liệu; c) chiết nhóm hoạt chất flavonoit; d) chiết nhóm hoạt chất ancaloit; và e) thu hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, tiến hành thu hái hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh, sau khi loại bỏ tạp chất, phơi khô thu được nguyên liệu hoa khô, hoa được xay thành bột sàng qua lưới kích thước khoảng 5mm. Thông thường, hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh được tạo thành từng bông lớn, với ngồng phát triển từ nhánh bẹ và tạo thành cụm hoa lớn, có khoảng 6 bông, quá trình thu hái bao gồm thu cả hoa và ngồng hoa phát triển từ thân. Các phần này được tách rời và phơi hoặc sấy riêng do phần cuống lâu khô hơn phần hoa, tốt nhất là thu hái phần bông hoa, sau khi phơi hoặc sấy để thu được hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh khô. Hoa khô này được sử dụng làm nguyên liệu để sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo sáng chế.

Trong bước chiết hoàn lưu nguyên liệu, hoa khô được bổ sung vào thiết bị chiết hồi lưu với tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:10 (trọng lượng:thể tích), tiếp đó chiết hoàn lưu trong thời gian 1 giờ. Phần dịch được tách riêng để tiến hành chiết nhóm các hoạt chất flavonoit, phần bã được thu hồi để chiết nhóm các hoạt chất ancaloit, tương ứng.

Trong bước chiết nhóm hoạt chất flavonoit, bước này bao gồm các công đoạn thu cao chiết ete dầu hỏa; chiết phân đoạn flavonoit; và thu các hoạt chất flavonoit có hoạt tính sinh học. Các tác giả đã nghiên cứu và nhận thấy rằng, trong hoa của cây *Crinum*

latifolium L. var. *crilae* Tram & Khanh có 4 hoạt chất 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol, kaempferol, quercetin và β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranosit có hoạt tính sinh học, cụ thể là hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan vượt trội, các tác giả đã phát triển kỹ thuật chiết đặc hiệu nhằm chỉ thu các hoạt chất flavonoid mong muốn.

Trong công đoạn thu cao chiết ete dầu hỏa, tiến hành thu hồi phần dịch chiết ete dầu hỏa sau khi đã chiết hoàn lưu hoa khô ở trên và lọc bỏ cặn. Tiếp đó, dung môi này được cô loại dung môi dưới áp suất giảm đến khi còn khoảng 5% thể tích thu được cao chiết ete dầu hỏa dạng sệt. Cao chiết này được tiến hành chiết chọn lọc các phân đoạn flavonoid có hoạt tính sinh học.

Để chiết chọn lọc các phân đoạn flavonoid, tiến hành nhồi cao chiết ete dầu hỏa lên cột silica gel và tiến hành rửa giải với hệ dung môi là phức hợp của ete dầu hỏa (EP) với EtOAc. Nồng độ dung môi rửa giải EP/EtOAc được tiến hành theo các tỷ lệ: EP 100%, EP: EtOAc 75:25, EP:EtOAc 50:50, EP:EtOAc 25:75 và EtOAc 100%. Sau khi rửa giải, tiến hành thu ba phân đoạn EP: EtOAc 75:25, EP:EtOAc 25:75 và EtOAc 100%, tương ứng.

Trong công đoạn thu các hoạt chất flavonoid có hoạt tính sinh học, tiến hành nhồi từng phân đoạn thu được ở trên lên cột silica gel và tiến hành rửa giải trong các điều kiện tương ứng như sau:

+ Phân đoạn EP: EtOAc 75:25 sau khi được nhồi lên cột silica gel, cột được ổn định bằng dung môi CHCl_3 100%, tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 98/2. Sau khi cô loại dung môi thu được hợp chất 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol ở dạng tinh thể không màu.

+ Phân đoạn EP:EtOAc 25:75 sau khi được nhồi lên cột silicagel, cột được ổn định bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 98/2, tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH tỷ lệ 9/1. Sau khi loại bỏ dung môi thu hai hợp chất kaempferol và quercetin dạng bột màu vàng.

+ Phân đoạn EtOAc 100% sau khi được nhồi lên cột silicagel, cột được ổn định bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 95/5, tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH tỷ lệ 9/1. Sau khi loại bỏ dung môi, kết tinh sản phẩm trong MeOH thu được hợp chất β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranosit dạng bột màu trắng.

Hỗn hợp dạng bột của bốn hợp chất, bao gồm 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol, kaempferol, quercetin và β -sitosterol-3-*O*- β -*D*-glucopyranosit, thu được từ các phân đoạn nêu trên được thu gom, phối trộn với nhau để thu được nhóm hoạt chất flavonoid dạng bột.

Trong bước chiết nhóm hoạt chất ancaloit, bước này bao gồm các công đoạn chiết cao ancaloit tổng số; chiết loại tạp chất; thu nhóm hoạt chất ancaloit có hoạt tính sinh học. Các tác giả đã nghiên cứu và nhận thấy rằng, trong hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh có 6 hoạt chất ambellin và 1 β -2 β epoxyambellin, crinamidin và 6-hydroxycrinamidin, powellin và 6-hydroxypowellin có hoạt tính sinh học, cụ thể là hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan vượt trội. Tác giả sáng chế đã phát triển kỹ thuật chiết đặc hiệu nhằm chỉ thu các hoạt chất ancaloit mong muốn.

Trong công đoạn chiết cao ancaloit tổng số, tiến hành thu phần bã sau khi chiết hoàn lưu hoa khô ở trên và chuyển phần bã này vào bình ngâm kiệt. Tiến hành chiết bằng hệ dung môi etanol:axit axetic tỷ lệ 70:30 (thể tích/thể tích) theo tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là 1/5 (trọng lượng/thể tích). Thời gian chiết trong 24 giờ. Sau khi lọc, thu phần dịch và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm đến khi còn 5% thu được cao ancaloit tổng số dạng sệt. Cao chiết này được tiến hành tinh chế sơ bộ trước khi thu ancaloit tổng số.

Trong công đoạn chiết loại tạp chất, tiến hành kiềm hóa cao ancaloit tổng số bằng NH_4OH đến pH nằm trong khoảng từ 9 đến 10. Sau khi lọc kết tủa, bổ sung CHCl_3 theo tỷ lệ 1:1 (v/v) và tiến hành chiết phân đoạn. Quá trình này có thể lặp lại từ 2 đến 4 lần để tăng hiệu quả loại tạp chất. Tiếp đó, axit hóa phân đoạn dịch chiết bằng HCl 0,1N. Sau đó, kiềm hóa lại bằng NH_4OH đến pH nằm trong khoảng từ 9 đến 10. Sau khi cô loại dung môi thu được alcaloit toàn phần ở dạng cao đặc.

Trong công đoạn thu nhóm hoạt chất alcaloit, tiến hành hấp phụ phần cao đặc alcaloit toàn phần này lên cột silica gel. Tiếp đó tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ với tỷ lệ MeOH tăng dần. Thu phân đoạn MeOH nồng độ 10%, 50% và 70%. Các phân đoạn này có thể được tiến hành sắc ký bằng cột silica gel tiếp để thu từng chất tinh khiết.

+ Phân đoạn MeOH 10% được cô loại dung môi, thu được hai hợp chất bao gồm ambellin và 1 β -2 β epoxyambellin ở dạng bột.

+ Phân đoạn MeOH 50% được loại bỏ dung môi, thu được hai hợp chất bao gồm crinamidin và 6-hydroxycrinamidin ở dạng bột.

+ Phân đoạn MeOH 70% được loại bỏ dung môi, thu được hai hợp chất bao gồm powellin và 6-hydroxypowellin ở dạng bột.

Hỗn hợp dạng bột của sáu hợp chất trong ba phân đoạn nêu trên, bao gồm ambellin, 1 β -2 β epoxyambellin, crinamidin, 6-hydroxycrinamidin, powellin và 6-hydroxypowellin, được thu gom và phối trộn với nhau để thu được nhóm hoạt chất ancaloit dạng bột.

Trong bước thu hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan, tiến hành bằng cách phối trộn nhóm hoạt chất flavonoid thu được ở bước b) và nhóm hoạt chất ancaloit thu được từ bước d) theo tỷ lệ 25/75 (w/w) thu được hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan.

Theo các phương án cụ thể, việc phối trộn nhóm hoạt chất flavonoid và ancaloit nêu trên bao gồm bước hòa tan từng thành phần của nhóm chất flavonoid với etanol, tiếp đó bổ sung nhóm hoạt chất ancaloit theo tỷ lệ 25/75 (w/w), sau khi sấy khô trên thiết bị sấy tầng sôi, nghiền mịn thu được hỗn hợp dạng bột.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan, trong đó thuốc này chứa hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo sáng chế và tá dược.

Cụ thể, thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan theo sáng chế chứa hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan và tá dược, trong đó hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan này bao gồm nhóm các hoạt chất flavonoid và ancaloit có hoạt tính sinh học được chiết từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae*. Tram & Khanh và tá dược. Trong đó, hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan có trong thuốc này chiếm ít nhất 60% trọng lượng của thuốc và tá dược chiếm tối đa 40% trọng lượng thuốc.

Tá dược có trong thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan theo sáng chế tốt nhất được chọn từ nhóm bao gồm tinh bột, tá dược rã, bột talc, magnesi stearat và/hoặc aerosil. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hoàn toàn có thể

thay thế các loại tá dược tương đương để thu được thuốc có cùng tác dụng. Việc thay thế các tá dược này bằng các tá dược tương đương là thuộc phạm vi của sáng chế.

Theo phương án cụ thể, thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan theo sáng chế bao gồm 15% nhóm các hoạt chất flavonoid, 45% nhóm các hoạt chất ancaloit và 40% tá dược (theo trọng lượng). Theo phương án ưu tiên cụ thể, tỷ lệ của nhóm hoạt chất flavonoid/ancaloit là 25/75 (theo trọng lượng).

Theo các phương án cụ thể, nhóm hoạt chất flavonoid có trong thuốc theo sáng chế được chiết từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae*. Tram & Khanh bao gồm 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol, kaempferol, quercetin và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranosit. Theo phương án cụ thể, tỷ lệ giữa các thành phần trong nhóm flavonoid này (theo % trọng lượng) bao gồm từ 10 đến 15% 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol, từ 15 đến 25% kaempferol, từ 15 đến 25% quercetin và từ 40 đến 60% β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranosit.

Theo các phương án cụ thể, nhóm hoạt chất ancaloit có trong thuốc theo sáng chế được chiết từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae*. Tram & Khanh bao gồm ambellin, 1 β -2 β epoxyambellin, crinamidin, 6-hydroxycrinamidin, powellin và 6-hydroxypowellin. Theo phương án cụ thể, tỷ lệ giữa các thành phần trong nhóm ancaloit này (theo % trọng lượng) bao gồm từ 10 đến 30% ambellin, từ 20 đến 40% 1 β -2 β epoxyambellin, từ 5 đến 20% crinamidin, từ 10 đến 30% 6-hydroxycrinamidin, từ 10 đến 30% powellin và từ 5 đến 20% 6-hydroxypowellin.

Theo các phương án ưu tiên, thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan theo sáng chế được sử dụng để hỗ trợ điều trị khối u gan, bệnh ung thư gan và ung thư gan giai đoạn cuối nhằm kéo dài thời gian sống cho người bị bệnh ung thư gan.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan theo sáng chế, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu, b) thu bột khô; c) tạo dạng cốm tron; và d) tạo viên nang.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, tiến hành chiết nhóm hoạt chất flavonoid và ancaloit như được mô tả ở trên. Sau khi phối trộn nhóm hoạt chất flavonoid với nhóm hoạt chất ancaloit theo tỷ lệ 25/75 (w/w) thu được hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan, như đã được mô tả ở trên. Hỗn hợp này được nghiền mịn và rây qua lưới cỡ lỗ

0,75mm. Quá trình này nhằm tạo điều kiện cho quá trình phối trộn với các tá dược. Các thành phần tá dược bao gồm aerosil, tinh bột, tinh bột natri glycolat (DST), bột talc và magnesi stearat được nghiền và rây qua lưới cỡ lỗ 0,75mm để thu các dạng bột mịn.

Trong bước thu bột khô, tiến hành phối trộn lần lượt hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan với 5% aerosil. Tiếp đó là phối trộn với 20% tinh bột. Sau khi trộn đều, phối trộn tiếp với 5% tinh bột natri glycolat (DST) và trộn đều thu được bột khô. Quá trình này có thể được thực hiện trong thiết bị trộn bất kỳ đã được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, miễn sao thu được hỗn hợp bột đồng đều.

Trong bước tạo dạng cốm trơn, tiến hành phối trộn bột talc với magnesi stearat theo tỷ lệ 1:1 và trộn đều. Tiếp đó, phối trộn với bột khô theo tỷ lệ 5%. Các thành phần tá dược nhằm tạo thuận lợi cho quá trình bào chế, tạo độ trơn, tăng độ phân rã cũng như giúp bảo quản hỗn hợp tốt hơn trong điều kiện lưu hành. Hỗn hợp bột khô này được chuyển vào thiết bị xát để tạo dạng cốm trơn.

Trong bước tạo viên nang, tiến hành đóng cốm trơn vào viên nang trong điều kiện nhiệt độ từ 20 đến 25°C, độ ẩm 35 đến 55% để thu được thuốc hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất hỗn hợp ancaloit và flavonoid có hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan

Thu hái hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh, loại bỏ tạp chất rồi phơi héo, tách riêng phần cuống và phần hoa, sấy khô, nghiền qua sàng cỡ 5 mm, thu được nguyên liệu hoa khô.

Cân 1kg bột hoa khô chuyển vào thiết bị chiết hoàn lưu chứa 10 lít ete dầu hỏa, tiến hành gia nhiệt và chiết trong thời gian 1 giờ, sau đó tách riêng phần dịch và phần bã.

a) chiết nhóm hoạt chất flavonoid:

Phần dịch được lọc, sau đó được cô loại dung môi dưới áp suất giảm đến khi còn 500 ml cao đặc (khoảng 500g). Cao này được nhồi lên cột silica gel. Mỗi cột silica gel 180 g, đường kính cột 4cm, chiều cao lớp silica gel là 30 cm được nhồi 10g cao và tiến

hành rửa giải với hệ dung môi lần lượt EP/EtOAc theo tỷ lệ EP 100%, EP: EtOAc 75:25, EP:EtOAc 50:50, EP:EtOAc 25:75 và EtOAc 100% thu ba phân đoạn EP: EtOAc 75:25, EP:EtOAc 25:75 và EtOAc 100%. Thể tích mỗi phân đoạn là 250 ml. Sau khi loại dung môi còn 1/10 thể tích, các phần cao chiết phân đoạn được tiếp tục tách trên cột silica gel theo từng phân đoạn như sau:

+ Phân đoạn EP: EtOAc 75:25 được nhồi lên cột silica gel với mỗi cột silica gel được nhồi 100 mg cao chiết, khối lượng silica gel 33g, đường kính cột 1,4 cm, chiều cao lớp silica gel 30 cm. Sau khi ổn định bằng dung môi CHCl_3 , rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 98/2 thu 10 ml. Tổng lượng phân đoạn EP: EtOAc 75:25 thu được từ 1kg nguyên liệu ban đầu được thu gom, loại bỏ dung môi thu được 1g tinh thể không màu.

Phân đoạn EP:EtOAc 25:75 được nhồi lên cột silicagel với mỗi cột silicagel được nhồi 100 mg cao chiết, khối lượng silica gel 33g, đường kính cột 1,4 cm, chiều cao lớp silica gel 30 cm. Sau khi ổn định bằng dung môi CHCl_3 , rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 9/1 thu hai phân đoạn, mỗi phân đoạn 10 ml. Tổng mỗi phân đoạn thu được sau khi rửa giải từ phân đoạn EP:EtOAc 25:75 thu từ 1kg nguyên liệu ban đầu được thu gom, loại bỏ dung môi thu được lần lượt 2,1 g và 3,23 g dạng bột màu vàng.

Phân đoạn EtOAc 100% được nhồi lên cột silicagel với mỗi cột được nhồi 220mg cao chiết, khối lượng cột silica gel là 33g, đường kính cột 1,4 cm, chiều cao lớp silica gel là 30 cm. Sau khi ổn định bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 95/5, tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH tỷ lệ 9/1, thu 10 ml. Tổng lượng phân đoạn EP 100% thu được từ 1kg nguyên liệu ban đầu được thu gom, loại bỏ dung môi thu được 5,6g tinh thể không màu.

Gom chung các thành phần thu được tổng cộng 11,93 g hỗn hợp flavonoid tinh sạch dạng bột (ký hiệu bột F1A). Tỷ lệ chiết nhóm flavonoid mong muốn so với nguyên liệu ban đầu đạt 1,2%.

b) chiết nhóm hoạt chất ancaloit:

Gom 1kg bã sau khi đã chiết bằng ete dầu hỏa và đưa vào bình ngâm kiệt, bổ sung 10 lít hệ dung môi etanol: axit axetic tỷ lệ 70:30 và ngâm chiết trong thời gian 24

giờ. Sau khi lọc, thu phần dịch và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm đến khi còn 500 ml (khoảng 500 g) thu được cao ancaloit tổng số.

Kiểm hóa dịch chiết ancaloit bằng cách bổ sung NH_4OH vào cao ancaloit để đưa pH đến pH=9, sau khi lọc kết tủa. Bổ sung lượng CHCl_3 theo tỷ lệ 1:1 (v/v) và lắc đều. Sau đó, axit hóa bằng HCl 0,1N đến pH=3,5 rồi bổ sung NH_4OH đến pH=9 trở lại. Sau khi cô loại dung môi thu được 135 g cao đặc.

Tiến hành hấp phụ cao đặc này lên cột silica gel. Mỗi cột silica gel 180 g, đường kính cột 4cm, chiều cao lớp silica gel là 30 cm được nhồi 10g cao và tiến hành rửa giải với hệ dung môi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ với tỷ lệ MeOH tăng dần, thu phân đoạn MeOH nồng độ 10%, 50% và 70%, với thể tích mỗi phân đoạn là 250 ml. Sau khi gộp chung từng phân đoạn có nồng độ MeOH thu được tương ứng. Tiến hành cô loại dung môi, thu được tổng cộng 36,6g hỗn hợp ancaloit dạng bột (ký hiệu bột AnK). Hiệu suất chiết đạt 3,66% với độ tinh khiết của từng hợp chất lên tới 98%.

Phân đoạn MeOH 10% tổng cộng thu được 14,6 g, tiến hành phân tách thu được lần lượt 2 phân đoạn với trọng lượng 3,66 g và 10,98 g, tương ứng.

Phân đoạn MeOH 50% tổng cộng thu được 7,32 g, tiến hành phân tách tiếp thu được lần lượt hai phân đoạn với trọng lượng bằng nhau và khoảng 3,66 g.

Phân đoạn MeOH 70% tổng cộng thu được 14,64 g, tiến hành phân tách tiếp thu được lần lượt hai phân đoạn với trọng lượng bằng nhau và khoảng 7,32 g.

Hòa tan 10 g phần bột flavonoid (bột FIA) thu được ở trên với một lượng vừa đủ ethanol, tiếp đó bổ sung 30 g phần bột ancaloit (bột AnK) thu được ở trên và trộn đều, (tỷ lệ FIA/AnK là 25/75 w/w) sau khi sấy khô trên thiết bị sấy tầng sôi, nghiền mịn, thu được 40g hỗn hợp dạng bột (bột HCr).

Ví dụ 2. Xác định cấu trúc của thành phần hỗn hợp

Để xác định được chính xác thành phần và cấu trúc từng thành phần hóa học của hỗn hợp bột HCr thu được từ Ví dụ 1, hỗn hợp được gửi đi để xác định lại thành phần và cấu trúc, các hợp chất tinh sạch được xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ khối và phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton và cacbon 13 (^1H -, ^{13}C NMR). Hàm lượng của các chất được xác định bằng phương pháp HPLC. Kết quả so sánh được tổng hợp trong Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần các hoạt chất có trong hỗn hợp bột HCr từ Ví dụ 1 thu được từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh

stt	Tên theo IUPAC	Tên thông thường	Hàm lượng (mg/g)
1	4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol		21
2	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-on)	kaempferol	44
3	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-on)	quercetin	68
4	β -sitosterol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosit		119
5	(1 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,15 <i>R</i> ,16 <i>S</i> ,18 <i>R</i> ,19 <i>S</i>)-9,15-dimethoxy-5,7-dioxa-12-azapentacyclo [10.5.2.0 ^{1,13} .0 ^{2,10} .0 ^{4,8}]nonadeca-2,4(8),9,16-tetraen-18-ol)	ambellin	75
6	[(1 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,15 <i>R</i> ,16 <i>S</i> ,18 <i>R</i> ,19 <i>S</i>)-9,15-dimethoxy-5,7,17-trioxa-12-azahexacyclo [10.6.2.0 ^{1,13} .0 ^{2,10} .0 ^{4,8} .0 ^{16,18}]icosa-2,4(8),9-trien-19-yl] axetat)	1 β -2 β epoxyambellin	225
7	(1 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,15 <i>R</i> ,16 <i>S</i> ,18 <i>R</i>)-9-methoxy-5,7,17-trioxa-12-azahexacyclo [10.6.2.0 ^{1,13} .0 ^{2,10} .0 ^{4,8} .0 ^{16,18}]icosa-2,4(8),9-trien-15-ol)	crinamidin	75
8	(1 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,15 <i>R</i> ,16 <i>S</i> ,18 <i>R</i>)-9-methoxy-5,7,17-trioxa-12-azahexacyclo[10.6.2.0 ^{1,13} .0 ^{2,10} .0 ^{4,8} .0 ^{16,18}]icosa-2,4(8),9-trien-11,15-diol)	6-hydroxycrinamidin	75
9	(1 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,15 <i>R</i>)-9-methoxy-5,7-dioxa-12-azapentacyclo [10.5.2.0 ^{1,13} .0 ^{2,10} .0 ^{4,8}]nonadeca-2,4(8),9,16-tetraen-15-ol)	powellin	149
10	(1 <i>S</i> ,11 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,15 <i>R</i>)-9-methoxy-5,7-dioxa-12-azapentacyclo[10.5.2.0 ^{1,13} .0 ^{2,10} .0 ^{4,8}] nonadeca-2,4(8),9,16-tetraen-11,15-diol)	6-hydroxypowellin	149

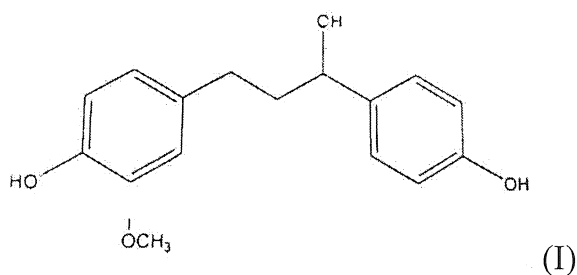
Trong số các hợp chất nêu trên có hợp chất 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol là hợp chất chưa được công bố.

Phổ khối lượng (MS): m/z (positive) $[M+H-H_2O]^+ = 257,2$, m/z (negative) $[M-H+H_2O]^- = 291$, suy ra phân tử khối của hợp chất này là 274 đvC, tương ứng với công thức chung $C_{16}H_{18}O_4$.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δppm) δH 7,29 (2H, d, $J = 8,5$, H_2' và H_6') *ortho* δH 6,84 (2H, dd, $J = 8,5$, H_3' , H_5'); δH 6,97 (1H, d, $J = 8$, H_6) *ortho* và *meta* δH 6,48 (1H, dd, $J = 3$ và $J = 8,5$, H_5) và δH 6,46 (1H, d, $J = 3$, H_3), δH 3,76 (3H, s).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , δppm) δC 159,05, 155,90 và 155,42, δC 133,85, 113,94; δC 129,94, 127,62, 115,37, 107,42 và 101,60. methylen δC 24,53 và 29,94, methoxy δC 55,33 và oxygen δC 77,69.

Từ các dữ liệu phổ trên, xác định cấu trúc của hợp chất mới là: 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-methoxyphenol có công thức (I) sau:



Các dữ liệu phổ cho các chất còn lại thể hiện tương ứng với các chất kaempferol, quercetin, β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranosit, ambellin, 1 β -2 β epoxyambellin, crinamidin, 6-hydroxycrinamidin, powellin và 6-hydroxypowellin đã được công bố trước đây.

Ví dụ 2. Sản xuất thuốc hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan

Cân lấy 400g hỗn hợp bột (bột HCr) từ Ví dụ 1, nghiền mịn và rây qua lưới cỡ lỗ 0,75mm. Các thành phần tá dược bao gồm aerosil, tinh bột, tinh bột natri glycolat (DST), bột talc và magnesi stearat được nghiền và rây qua lưới cỡ lỗ 0,75mm để thu các dạng bột mịn.

Phối trộn lần lượt 400 g hỗn hợp bột HCr với 20g aerosil. Tiếp đó là phối trộn với 80g tinh bột. Sau khi trộn đều, phối trộn tiếp với 20g tinh bột natri glycolat (DST) và trộn đều thu được bột khô. Quá trình này có thể được thực hiện trong thiết bị trộn trong 15 phút để thu được hỗn hợp bột đồng đều.

Trong bước tạo dạng cốm trơn, tiến hành phối trộn bột talc với magnesi stearat theo tỷ lệ 1:1 và trộn đều. Tiếp đó, phối trộn 20g hỗn hợp này với 520g bột khô. Tiếp đó, hỗn hợp bột khô này được chuyển vào thiết bị xát để tạo dạng cốm trơn và chuyển sang thiết bị đo tạo viên nang và đóng nang với lượng 380 mg hỗn hợp bột HCr/viên

nang trong điều kiện nhiệt độ từ 20 đến 25°C, độ ẩm 35 đến 55% để thu được thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan dạng viên nang (được ký hiệu là CRL).

Ví dụ 3. Thử nghiệm độc tính cấp và độc tính bán trường diễn

Chế phẩm thử nghiệm:

Chế phẩm thử nghiệm là hỗn hợp bột flavonoid (bột FIA), bột ancaloit (bột AnK) và bột phối hợp của hai loại bột này (bột HCr) thu được từ Ví dụ 1. Liều thử nghiệm dự kiến được áp dụng cho chuột với lượng từ 0,3 g/kg đến 7 g/kg thể trọng tùy theo từng lô thử nghiệm.

Động vật thử nghiệm:

Động vật được dùng để đánh giá là chuột nhắt trắng chủng *Wiss* khỏe mạnh, trong lượng $20,0 \pm 2$ g do Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp. Thỏ trắng chủng *Orytolagus cuniculus* trọng lượng từ 1,8 đến 2,5 kg do Trung tâm dê-thỏ Sơn Tây (Viện chăn nuôi) cung cấp. Thỏ và chuột thử nghiệm được nuôi nhốt riêng từ 3-5 ngày trước khi nghiên cứu chia ngẫu nhiên thành các lô, không phân biệt giống, đạt tiêu chuẩn thử nghiệm, mỗi con nhốt riêng một chuồng, được ăn bằng thức ăn dành riêng cho động vật thử nghiệm, tùy theo loài do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và Công ty liên doanh Guyomarc'h-VCN sản xuất, các con vật thử nghiệm được uống nước tự do. Hàng ngày theo dõi ghi chép diễn biến kết quả thử nghiệm.

Thử nghiệm độc tính cấp và xác định liều chết 50% (LD₅₀)

Chuột thử nghiệm được chia ngẫu nhiên thành các lô khác nhau (09 lô), mỗi lô 10 con.

Các mẫu bột FIA, bột AnK thu được từ Ví dụ 1 được pha trong dung môi là nước cất, mẫu bột FIA được ngâm trong nước nóng để tan chảy và hòa với dầu oliu thành các nồng độ khác nhau để có thể tích cho mỗi lần uống 0,25 ml/10g chuột, 3 lần trong 24 giờ, mỗi lần cách nhau ít nhất 2 giờ.

Cho chuột uống thuốc thử với liều tăng dần. Tìm liều cao nhất không gây chết chuột (0 %), liều thấp nhất gây chết chuột hoàn toàn (100 %) và các liều trung gian.

Theo dõi tình trạng chung của chuột, quá trình diễn biến bắt đầu có dấu hiệu nhiễm độc (như nôn, co giật, kích động, v/v.) và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong vòng 72 giờ sau khi cho chuột uống thuốc lần cuối. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính

để xác định LD₅₀ của thuốc thử. Sau đó, tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột (hoạt động, ăn uống, bài tiết, v/v.) ở mỗi lô cho đến hết 7 ngày sau khi uống thuốc.

Tiến hành phẫu tích quan sát tình trạng các tạng ngay sau khi có chuột chết (nếu có) để xác định nguyên nhân gây độc. Số liệu được xử lý theo toán thống kê T-test Student bằng phần mềm Excell.

Đối với mẫu bột flavonoit (bột FLA), sau khi uống thuốc thử với liều từ 1 g/kg đến liều cao nhất có thể cho uống (tối đa 31,44 g/kg) ở tất cả các lô, chuột vẫn hoạt động bình thường. Không quan sát thấy có chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc thử, không quan sát thấy dấu hiệu ngộ độc sau 7 ngày theo dõi. Như vậy chưa xác định được độc tính cấp và LD₅₀ của mẫu bột FLA.

Đối với mẫu bột ancaloit (bột AnK), kết quả thử nghiệm độc tính cấp được đưa ra và đánh giá trong khoảng an toàn đến khoảng gây độc, các số liệu dưới ngưỡng này hoặc trên ngưỡng này không được xem xét. Kết quả đánh giá, tổng hợp về độc tính cấp của nhóm chuột thử nghiệm với mẫu bột AnK được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2: Độc tính cấp theo đường uống của bột ancaloit (bột AnK) trên chuột

Lô NC	Liều sử dụng (g/kg)	Số chuột bị chết/tổng	% chuột bị chết
1	3,335	0/10	0,0
2	4,002	1/10	10,0
3	4,336	2/10	20,0
4	4,669	4/10	40,0
5	5,003	5/10	50,0
6	5,336	6/10	60,0
7	5,670	8/10	80,0
8	6,003	9/10	90,0
9	6,770	10/10	100,0

Kết quả cho thấy, sau khi uống thuốc thử, chuột ở lô 1 (3,335 g/kg) không có biểu hiện gì đặc biệt, chuột hoạt động bình thường, không có chuột chết sau 72 giờ thử nghiệm. Chuột ở các lô từ lô 2 đến lô 9 với các liều tăng dần từ 4,002 đến 6,770 g/kg có biểu hiện yếu mệt, nằm bất động hoặc ít hoạt động, ít phản ứng với kích thích, không ăn uống. Chuột có biểu hiện khó thở, thở giật hai thành bụng. Với các lô thử nghiệm ở liều cao, chuột yếu dần rồi chết trong vòng 6 giờ thử nghiệm. Sau khi uống

liều thử nghiệm, những con chuột không chết hồi tỉnh dần dần và không có chuột nào chết thêm. Theo phương pháp đánh giá của Litchfield-Wilcoxon, LD₅₀ của mẫu bột AnK thử nghiệm được xác định là 5,0027 g/kg thể trọng.

Đối với mẫu bột HCr, chuột được phân thành 5 lô, mỗi lô 10 con, tiến hành hòa mẫu bột HCr với nước theo nồng độ với nồng độ cao nhất là 332 mg/ml (tương ứng 2,49 g/kg). Cho chuột uống với liều từ thấp nhất đến cao nhất, tương đương từ 0,49 g/kg đến 2,49 g/kg, liều uống 0,25 ml/10g, 3 lần trong 24 giờ. Tiến hành theo dõi trong 72 giờ uống thuốc thử.

Bảng 3: Độc tính cấp theo đường uống của hỗn hợp bột (bột HCr) trên chuột

Lô NC	Liều sử dụng (ml/kg)	Liều bột khô (g/kg)	Tỷ lệ chết
1	15	0,4987	0
2	30	0,9975	0
3	45	1,4962	0
4	60	1,9950	0
5	75	2,4937	0

Kết quả cho thấy, với liều dự kiến sử dụng cho người, quy đổi tương đương cho chuột từ khoảng từ 0,49 g/kg đến 24,93 g/kg không có biểu hiện độc tính cấp. Điều này cho thấy mẫu bột HCr an toàn cho người trong khoảng liều lượng dự kiến tối đa 3800 mg/kg (liều lượng gấp 30,8 lần liều dùng cho người).

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn:

Để đánh giá độc tính bán trường diễn, tiến hành đánh giá độc tính đối với mẫu bột HCr thu được từ Ví dụ 1. Thử nghiệm được tiến hành với 30 con thỏ, được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 con, mỗi con nhốt riêng một chuồng. Thử nghiệm được tiến hành trong 4 tuần.

- ĐC: uống nước lọc 3 ml/kg/ngày vào buổi sáng.

- TN1: uống bột HCr với lượng 228 mg/kg/ngày (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người, tính theo hệ số 3) vào buổi sáng.

- TN2: uống bột HCr với lượng 1140 mg/kg/ngày (gấp 5 lần lô thử nghiệm 1).

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm đánh giá chức năng tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu. Đánh giá chức năng gan thông qua

định lượng một số enzym và chất chuyển hoá trong máu: ALT, AST, bilirubin toàn phần, albumin và cholesterol toàn phần. Đánh giá chức năng thận thông qua định lượng creatinin huyết thanh.

Các thông số theo dõi được kiểm tra vào 4 thời điểm trước lúc uống mẫu thử, sau 2 tuần và sau 4 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống.

Sau 8 tuần uống mẫu thử, thỏ 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 thỏ ở mỗi lô.

Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê y sinh học theo phương pháp t-test Student và test “trước - sau”. Số liệu được biểu diễn dưới dạng : $\bar{X} \pm SD$. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn.

Thỏ được theo dõi hàng ngày về tình trạng chung gồm hoạt động, ăn uống, tình trạng lông, da, niêm mạc, chất tiết. Các thỏ ở cả lô chứng và các lô dùng bột chiết đều hoạt động bình thường. Thỏ lông mượt, da niêm mạc bình thường, ăn uống bình thường, phân khô thành khuôn. Không thấy biểu hiện gì đặc biệt ở cả 3 lô thỏ trong suốt thời gian nghiên cứu. Ảnh hưởng của ATP thử nghiệm lên thỏ được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 4: Ảnh hưởng của bột HCr thử nghiệm đối với cân nặng thỏ

Thời gian	ĐC		TN1		TN2		p (t- test Student)
	Trọng lượng (kg)	% tăng trọng lượng	Trọng lượng (kg)	% tăng trọng lượng	Trọng lượng (kg)	% tăng trọng lượng	
Trước uống thuốc	1,85 $\pm 0,08$		1,88 $\pm 0,22$		1,84 $\pm 0,18$		$> 0,05$
Sau 2 tuần uống thuốc	2,18 $\pm 0,12$	18,25 $\pm 4,44$	2,25 $\pm 0,20$	20,13 $\pm 5,88$	2,22 $\pm 0,18$	21,16 $\pm 9,19$	$> 0,05$
p (trước - sau)	$< 0,05$		$< 0,05$		$< 0,05$		
Sau 4 tuần uống thuốc	2,33 $\pm 0,13$	26,24 $\pm 7,55$	2,37 $\pm 0,23$	26,75 $\pm 11,58$	2,34 $\pm 0,17$	27,82 $\pm 10,53$	$> 0,05$
p (trước - sau)	$< 0,05$		$< 0,05$		$< 0,05$		
Sau 2 tuần ngừng	2,37 $\pm 0,14$	27,02 $\pm 9,87$	2,50 $\pm 0,22$	27,25 $\pm 8,17$	2,41 $\pm 0,20$	29,44 $\pm 9,58$	$> 0,05$
p (trước - sau)	$< 0,05$		$< 0,05$		$< 0,05$		

So sánh giữa các thời điểm sau so với trước thấy cân nặng của thỏ ở cả ba lô nghiên cứu đều tăng, sự thay đổi có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Cân nặng của thỏ ở lô uống bột chiết với cân nặng của thỏ ở lô chứng tại tất cả các thời điểm đo không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy bột chiết với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên sự phát triển cân nặng của thỏ.

Các kết quả đánh giá theo dõi số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu, chức năng gan (ALT, AST, bilirubin toàn phần, albumin và cholesterol toàn phần), chức năng thận (creatinin huyết thanh) đều không thấy có sự bất thường liên quan đến chức năng sinh lý của thỏ thử nghiệm.

Các kết quả đánh giá chức năng máu của thỏ thử nghiệm được thể hiện trong các bảng từ Bảng 5 đến Bảng 11 sau:

Bảng 5. Ảnh hưởng của bột HCr đến số lượng hồng cầu trong máu thỏ

Thời gian	Số lượng hồng cầu (T/l)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	
Trước uống thuốc	5,18±0,38	5,21±0,39	5,13±0,34	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	5,20±0,44	5,20±0,26	5,29±0,42	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	5,39±0,26	5,40±0,44	5,44±0,51	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 2 tuần ngừng thuốc	5,41±0,71	5,38±0,36	5,42±0,32	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Bảng 6. Ảnh hưởng của bột HCr đến hàm lượng huyết sắc tố trong máu thỏ

Thời gian	Hàm lượng huyết sắc tố (g/dl)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	
Trước uống thuốc	10,23±0,67	10,19±0,50	10,15±0,57	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	10,27±0,80	10,39±0,27	10,32±0,67	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Sau 4 tuần uống thuốc	10,46±0,62	10,41±0,26	10,42±0,73	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 2 tuần ngừng thuốc	10,43±0,85	10,44±0,64	10,44±0,62	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Bảng 7. Ảnh hưởng của bột HCr đến hematocrit trong máu thỏ

Thời gian	Hematocrit (%)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	
Trước uống thuốc	31,23±1,67	31,19±1,40	31,25±1,37	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	31,67±1,90	31,98±1,17	31,92±1,17	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	32,25±1,62	31,16±1,42	31,22±1,37	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 2 tuần ngừng thuốc	32,13±1,35	32,21±1,04	32,54±1,92	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Bảng 8. Ảnh hưởng của bột HCr đến thể tích trung bình hồng cầu trong máu thỏ

Thời gian	Thể tích trung bình hồng cầu (fl)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	
Trước uống thuốc	61,45±2,37	61,90±1,80	61,85±3,17	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	62,45±2,25	63,00±1,37	61,62±3,37	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	62,16±1,42	62,81±1,76	61,92±3,33	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 2 tuần ngừng thuốc	61,03±0,85	62,54±1,64	61,44±3,12	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Bảng 9. Ảnh hưởng của bột HCr đến số lượng bạch cầu trong máu thỏ

Thời gian	Số lượng bạch cầu (g/l)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	
Trước uống thuốc	7,85±2,67	7,59±2,10	7,25±0,67	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	7,47±1,20	7,79±1,57	7,52±1,37	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	7,36±1,32	7,31±0,96	7,32±1,23	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 2 tuần ngừng thuốc	7,33±1,05	7,93±1,34	7,24±1,32	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Bảng 10. Ảnh hưởng của bột HCr đến số lượng bạch cầu trong máu thỏ

Thời gian	Công thức bạch cầu					
	ĐC		TN1		TN2	
	Lympho (%)	Trung tính (%)	Lympho (%)	Trung tính (%)	Lympho (%)	Trung tính (%)
Trước uống thuốc	81,55±4,11	18,45±4,11	82,90±4,09	17,10±4,09	83,70±5,74	16,30±5,74
Sau 2 tuần uống thuốc	77,18±7,40	22,82±7,40	83,30±6,06	16,70±6,06	82,20±6,09	17,80±6,09
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Sau 4 tuần uống thuốc	78,18±7,55	20,82±7,55	84,00±4,74	16,00±4,74	79,60±8,17	20,40±8,17
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Sau 2 tuần ngừng thuốc	77,18±7,55	27,82±7,55	87,00±4,74	19,29±5,11	80,60±3,17	19,40±3,17
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Bảng 11. Ảnh hưởng của bột HCr đến số lượng tiểu cầu trong máu thỏ

Thời gian	Số lượng tiểu cầu (g/l)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	
Trước uống thuốc	321,8±98,3	300,6±64,8	325,8±70,2	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	298,8±106,3	270,8±91,7	290,6±44,7	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Sau 4 tuần uống thuốc	294,4±106,3	270,8±91,7	290,6±44,7	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 2 tuần ngừng thuốc	294,4±77,7	267,7±56,3	288,6±68,4	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Các kết quả thể hiện trong Bảng 5 đến Bảng 11 cho thấy sau 2 tuần và 4 tuần uống bột HCr cũng như sau 2 tuần ngừng uống, tất cả các xét nghiệm đánh giá chức năng tạo máu (số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematorit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu ở cả lô ĐC cũng như các lô TN1 và TN2 không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các thời điểm trước, trong và sau khi uống thuốc thử ($p>0,05$)

Các kết quả đánh giá chức năng gan của thử nghiệm được thể hiện trong các bảng từ Bảng 12 đến Bảng 16 sau:

Bảng 12. Ảnh hưởng của bột HCr đến hoạt độ ATS trong máu thử

Thời gian	Hoạt độ ADT (UI/L)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	
Trước uống thuốc	28,57±5,10	30,20±5,77	28,15±5,57	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	33,26±7,52	31,92±4,99	32,16±7,32	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	33,92±5,33	32,33±6,74	29,45±7,09	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 2 tuần ngừng thuốc	31,43±3,01	32,63±0,21	29,59±4,87	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Bảng 13. Ảnh hưởng của bột HCr đến hoạt độ ALT trong máu thử

Thời gian	Hoạt độ ALT (UI/l)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	
Trước uống thuốc	43,23±6,04	41,09±8,80	43,67±9,69	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	46,18±9,40	44,91±5,37	45,52±11,41	>0,05

p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	48,51±7,22	47,47±8,12	43,78±9,66	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 2 tuần ngừng thuốc	48,36±8,19	43,30±6,09	47,16±9,03	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Bảng 14. Ảnh hưởng của bột HCr đến nồng độ bilirubin toàn phần trong máu thỏ

Thời gian	Bilirubin toàn phần (mmol/l)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	
Trước uống thuốc	12,19±0,36	12,15±0,55	12,23±0,29	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	12,17±0,25	12,23±0,36	12,20±0,33	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	12,17±0,25	12,23±0,36	12,20±0,33	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 2 tuần ngừng thuốc	12,15±0,28	12,13±0,23	12,28±0,36	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Bảng 15. Ảnh hưởng của bột HCr đến nồng độ albumin trong máu thỏ

Thời gian	Albumin (g/dl)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	
Trước uống thuốc	6,14±0,25	6,16±0,24	6,26±0,22	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	5,98±0,53	6,05±0,50	6,13±0,27	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	6,05±0,12	5,99±0,20	6,06±0,25	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 2 tuần ngừng thuốc	6,03±0,18	6,07±0,21	6,11±0,23	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Bảng 16. Ảnh hưởng của bột HCr đến nồng độ cholesterol trong máu thỏ

Thời gian	Cholesterol (mmol/l)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	

Thời gian	Cholesterpol (m mol/l)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	
Trước uống thuốc	2,15±0,24	2,05±0,22	2,15±0,45	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	2,16±0,25	2,13±0,24	2,10±0,38	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	2,04±0,19	2,17±0,32	2,07±0,16	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 2 tuần ngừng thuốc	2,07±0,21	2,13±0,39	2,19±0,41	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Kết quả từ Bảng 12 đến 16 cho thấy sau 2 tuần và 4 tuần uống thử nghiệm bột HCr, cũng như sau khi dừng uống 2 tuần, tất cả các xét nghiệm đánh giá chức năng gan (hoạt độ AST, ALT, nồng độ bilirubin toàn phần, albumin và cholesterol) trong máu thỏ ở cả lô TN1 và TN2 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ĐC và so sánh giữa hai thời điểm giữa và sau khi uống thuốc thử ($p>0,05$)

Các kết quả đánh giá chức năng thận của thỏ thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 17 sau:

Bảng 17. Ảnh hưởng của bột HCr đến creatinin trong máu thỏ

Thời gian	Creatinin (mg/dl)			p (t-test Student)
	ĐC	TN1	TN2	
Trước uống thuốc	1,06±0,05	1,04±0,05	1,06±0,05	>0,05
Sau 2 tuần uống thuốc	1,05±0,05	1,07±0,08	1,05±0,05	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 4 tuần uống thuốc	1,05±0,05	1,05±0,05	1,05±0,05	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	
Sau 2 tuần ngừng thuốc	1,06±0,05	1,06±0,05	1,04±0,05	>0,05
p (trước-sau)	>0,05	>0,05	>0,05	

Kết quả trên bảng 17 cho thấy sau 2 tuần uống hỗn hợp thử nghiệm ở cả lô TN1 và TN2, nồng độ của creatinin trong máu thỏ không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ĐC và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p>0,05$).

Ngoài ra, các đánh giá về mô bệnh học được thực hiện đối với tế bào gan, các hình ảnh giải phẫu được thể hiện trong các hình từ Hình 1 đến Hình 4. Các kết quả cho thấy nhìn chung mô gan và thận chuột có cấu trúc bình thường, không có sự thay đổi bệnh lý liên quan đến tế bào gan và thận của thử nghiệm.

Hình 1 là ảnh chụp giải phẫu tế bào gan của thử ở mức phóng đại 400 lần, trong đó (A) là hình ảnh chụp hình thái vi thể gan thử bình thường được nhuộm bằng Hematoxylin-Eosin, (B) là hình thái vi thể gan thử đối chứng có tế bào gan thoái hóa vừa. (C) là hình thái của tế bào gan lô thử nghiệm sau 4 tuần uống thuốc thử. (D) là hình thái của của tế bào gan lô thử nghiệm sau 4 tuần uống thuốc thử với tế bào gan thoái hóa vừa.

Hình 2 là ảnh chụp giải phẫu tế bào thận chuột ở mức phóng đại 400 lần, trong đó (A) là hình thái vi thể thận thử của lô đối chứng có cầu thận bình thường và ống thận bình thường, (B) là hình thái vi thể thận thử của lô đối chứng có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần, (C) và (D) là hình thái vi thể thận thử của lô thử nghiệm 4 tuần có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần.

Hình 3 là ảnh chụp giải phẫu tế bào gan của thử sau thử nghiệm, trong đó (A) là hình ảnh chụp hình thái vi thể gan thử bình, (B) là hình thái vi thể gan thử đối chứng có tế bào gan thoái hóa vừa. (C) là hình thái của tế bào gan lô thử nghiệm có tế bào thoái hóa vừa. (D) là hình thái của của tế bào gan lô thử nghiệm sau khi điều trị 2 tuần với tế bào gan thoái hóa nhẹ.

Hình 4 là ảnh chụp giải phẫu tế bào thận chuột thu được từ Ví dụ 3 sau 2 tuần ngừng thử nghiệm, trong đó (A) là hình thái vi thể thận thử của lô đối chứng có cầu thận bình thường và ống thận bình thường, (B) là hình thái vi thể thận thử của lô đối chứng có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần, (C) và (D) là hình thái vi thể thận thử của lô thử nghiệm sau 2 tuần có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần.

Kết luận: Không thấy có độc tính bán trường diễn ảnh hưởng đến thử nghiệm liên quan đến các thay đổi chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận, hình thái đại thể các cơ quan và cấu trúc vi thể gan, thận của thử. Tất cả các chỉ số theo dõi đều nằm trong giới hạn bình thường, không có sự khác biệt rõ rệt so với lô chứng. Điều đó chứng tỏ bột HCr thử nghiệm an toàn với thử nghiệm.

Ví dụ 4. Thử nghiệm ức chế dòng tế bào ung thư gan

Để đánh giá hiệu quả ức chế dòng tế bào ung thư gan, các thử nghiệm được tiến hành với tế bào Hep-G2 với các mẫu bột FIA, bột AnK và bột HCr thu được từ Ví dụ 1.

Tế bào Hep-G2 được nuôi trong môi trường MEM bổ sung 10% FBS ở 37°C trong tủ ẩm CO₂ (5% CO₂). Tế bào phát triển trong bình nuôi cấy 1 lớp, đạt đến pha log. Tế bào được tách khỏi bình và tách rời nhau bằng trypsin. Tiếp đó đếm và cấy lại vào môi trường thạch loãng (0,35 % với thạch mặt và 0,5% với thạch nền) với nồng độ tế bào $3,33 \times 10^3/\text{mL}$.

Các mẫu thử được trộn với nồng độ đầu 5-25 µg/ml. Thử nghiệm được tiến hành trên phiên 6 giếng, lặp lại 3 lần.

ĐC: Bổ sung DMSO 1%.

TN1: Bổ sung dịch pha bột FIA (bột flavonoid) thu được từ Ví dụ 1.

TN2: Bổ sung dịch pha bột AnK (bột ancaloit) thu được từ Ví dụ 1.

TN3: Bổ sung dịch pha bột HCr (hỗn hợp bột flavonoid và ancaloit) thu được từ Ví dụ 1.

TN4: Bổ sung chế phẩm thương mại chứa hoạt chất Ramucirumab.

Các hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ 500µg/ml. Tế bào được nhân, nuôi cấy trong điều kiện chuẩn theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Sau 15 ngày nuôi cấy, tế bào được lấy ra và nhuộm bằng tím kết tinh 0,005%, đọc kết quả dưới kính hiển vi đảo pha có gắn camera và nối ra máy tính. Hoạt tính ức chế hình thành khối u trên thạch được tính lặp lại 3 lần so sánh % số lượng khuẩn lạc hình thành khối u, kích thước khối u so với đối chứng (DMSO 1%).

Bảng 18. Hiệu quả ức chế khối u mật độ khối u

Kí hiệu mẫu	Nồng độ mẫu thử (µg/ml)	Kích thước trung bình của khối u		Mật độ hình thành khối u giảm so với đối chứng (%)
		Đường kính (µm)	% giảm so với đối chứng	
ĐC		27,23±1,14	0	100
TN1	500	12,35±0,85	54,65	45,42±0,81
TN2	500	20,51±0,98	24,68	35,21±0,32

Kí hiệu mẫu	Nồng độ mẫu thử ($\mu\text{g/ml}$)	Kích thước trung bình của khối u		Mật độ hình thành khối u giảm so với đối chứng (%)
		Đường kính (μm)	% giảm so với đối chứng	
TN3	500	7,78 $\pm$ 0,56	71,43	75,31 $\pm$ 1,23
TN4	500	9,22 $\pm$ 1,07	66,28	52,27 $\pm$ 1,56

Kết quả trên Bảng 18 cho thấy, so với nhóm ĐC, các nhóm TN1 và TN2 đều thể hiện khả năng ức chế khối u cũng như giảm được mật độ hình thành khối u. Điều này minh chứng cho các thử nghiệm trước liên quan đến nhóm ancaloit và flavonoit đã được chiết độc lập là có khả năng ức chế sự phát triển của khối u và giảm được kích thước khối u thông qua thử nghiệm tế bào. Tuy nhiên, hoạt tính này khi so với nhóm TN4, là nhóm sử dụng Ramucirumab, tỷ lệ ức chế khối u và ức chế sự hình thành khối u đều kém hơn. Tuy nhiên, bất ngờ thấy rằng, với hỗn hợp của cả nhóm flavonoit và ancaloit, với cùng nồng độ, hiệu quả ức chế khối u và ức chế sự hình thành khối u đều tăng, lên tới 71 và 75%, tương ứng. Nếu so sánh với TN1 và TN2, tỷ lệ giảm kích thước khối u của của TN3 ở cùng nồng độ thử nghiệm tăng tới 70,8 và 195%, tương ứng, mật độ hình thành khối u giảm 38% và 114%, tương ứng.

Kết quả này còn được xác nhận trên hình ảnh nuôi cấy. Hình 5 là ảnh chụp kết quả thử nghiệm khả năng ức chế khối u của các hợp chất thử nghiệm trên tế bào ung thư gan HEP-G2 sau 15 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch. (A) là hình thái của tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung DMSO 1% (ĐC). (B) là hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hỗn hợp A (TN1), (C) là hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hỗn hợp B (TN2), (D) là hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hỗn hợp C (TN3), và (E) là hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hoạt chất Ramucirumab (TN4).

Cả 4 mẫu thử đều biểu hiện hoạt tính ức chế hình thành khối u trên thạch mềm *in vitro* với dòng tế Hep-G2 ở mức độ khác nhau: mật độ hình thành khối u của các mẫu TN1, TN2, TN3 và TN4 giảm lần lượt là 45,42%; 35,21%; 75,31% và 52,27% so với đối chứng. Kích thước trung bình của khối u trong các thử nghiệm này giảm lần lượt là 54,65; 24,68; 60,41 và 47,78% so với đối chứng. Đặc biệt TN3 có hiệu quả vượt trội,

lên tới 60,41% so với đối chứng. So sánh tương quan với TN1 và TN2, tỷ lệ giảm kích thước khối u của TN3 tăng lần lượt là 10,53% và 144,77%, tương ứng.

Ví dụ 5. Điều trị lâm sàng bệnh nhân ung thư gan

Sau khi tiến hành thử nghiệm trên động vật cho kết quả tốt, các nghiên cứu được tiến hành thử nghiệm lâm sàng trên người. Sau khi xin giấy phép và đề cương nghiên cứu được chấp thuận cho thử nghiệm lâm sàng trên người từ Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học, tác giả đã tiến hành thử nghiệm lâm sàng đối với thuốc viên (ký hiệu CRL thu được từ Ví dụ 2, địa chỉ nghiên cứu lâm sàng tại Bệnh viện Ung Bướu theo Hướng dẫn thực hành lâm sàng tốt (GCP).

Đối tượng thử nghiệm: Người từ 18 tuổi trở lên, đã được chẩn đoán bị mắc bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) theo thực hành chẩn đoán thường quy của bệnh viện. Các đối tượng tham gia được xác định là ung thư giai đoạn cuối, được chẩn đoán, sinh thiết có tế bào ung thư, các tình nguyện viên được thông báo, chấp thuận tình nguyện tham gia và được dùng thử nghiệm bất kỳ theo yêu cầu của đối tượng tham gia.

Thử nghiệm được tiến hành với thuốc dạng viên nang (được ký hiệu CRL) được bào chế theo Ví dụ 2 (mỗi viên nang được đóng với lượng 380mg hỗn hợp bột HCr) Liều lượng sử dụng khởi đầu với bệnh nhân là 5 viên/bệnh nhân/ngày (50% liều dùng dự kiến). Thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp liều tăng dần theo thời gian và khả năng đáp ứng của bệnh nhân mỗi 3 tháng tăng dần liều lượng. Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp nhãn mở nhằm đánh giá độ an toàn và hiệu quả điều trị bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC).

Thời gian thử nghiệm được tiến hành từ thời điểm bệnh nhân bị chẩn đoán, sinh thiết tế bào ung thư giai đoạn cuối. Các bệnh nhân tham gia thử nghiệm thường có biểu hiện mệt mỏi, rối loạn tiêu hóa, đau và sưng bụng, sụt cân, vàng da, ngứa, nước tiểu sẫm màu.

Các bệnh nhân tham gia thử nghiệm được yêu cầu tuân thủ phác đồ điều trị đối với bệnh nhân điều trị ung thư gan giai đoạn cuối của bệnh viện theo hướng dẫn của Bộ Y tế. Quá trình điều trị, bệnh nhân được uống bổ sung viên CRL và được lấy mẫu, phân tích, đánh giá các thông tin bao gồm WBC (White Blood Cell), LYM, LYM#, tỷ lệ tế bào T-CD4, số lượng tế bào T-CD4, Tỷ lệ tế bào T-CD8, số lượng tế bào T-CD8

và tỷ lệ TCD4/TCD8 theo chu kỳ. Loại bỏ ra khỏi thử nghiệm những bệnh nhân không tuân thủ phác đồ và/hoặc những bệnh nhân tự ý bổ sung những liệu pháp điều trị khác.

Tổng số 16 bệnh nhân tình nguyện tham gia nghiên cứu, trong đó có 2 bệnh nhân thông qua sàng lọc sơ bộ không đáp ứng tiêu chuẩn thử nghiệm do tiểu cầu không đạt. Có 4 bệnh nhân bị từ chối, rút khỏi thử nghiệm do không tuân thủ liệu pháp điều trị.

Có 2 bệnh nhân rút lại chấp thuận tham gia thử nghiệm sau 6 tháng và 2 bệnh nhân rút khỏi tham gia thử nghiệm sau 4 tháng tham gia. Mặc dù các bệnh nhân này bỏ tham gia thử nghiệm và từ chối cung cấp thông tin sức khỏe sau đó, tuy nhiên thời gian sống của bệnh nhân cho thấy đã kéo dài hơn so với thời gian sống trung bình của các bệnh nhân không theo liệu pháp điều trị bỏ điều trị giữa chừng sau hơn 4 tháng điều trị kết hợp (như vậy thời gian sống của hai bệnh nhân này ít nhất là 125 ngày và 180 ngày, tương ứng).

Trong số những bệnh nhân nghiên cứu, có hai bệnh nhân cho thấy đáp ứng rất tốt với thuốc (bệnh nhân số 2 và bệnh nhân số 8). Các chỉ số xét nghiệm cho thấy hai bệnh nhân này thể hiện được khả năng kìm hãm khối u rất tốt. Liệu pháp điều trị được áp dụng lên tới 150% so với liều dự kiến ban đầu (15 viên/ngày). Các bệnh nhân vượt qua ngưỡng kỳ vọng 1 năm, riêng bệnh nhân số 2 đã vượt qua ngưỡng 660 ngày.

Các bệnh nhân không tuân thủ hoặc rút khỏi liệu pháp điều trị bị tử vong sau từ 2 đến 4 tháng kể từ thời điểm phát hiện bệnh. Số ngày sống của các bệnh nhân này trung bình 105 ngày. Diễn tiến bệnh của bệnh nhân số 2 và bệnh nhân số 20 được thể hiện trong Bảng 19 và 20 sau.

Bảng 19. Diễn tiến bệnh của bệnh nhân số 2 trong quá trình thử nghiệm

Chỉ số xét nghiệm	Ngày điều trị							Đơn vị
	D0	D60	D180	D300	D420	D540	D660	
WBC	4,81	4,66	5,36	6,45	5,71	5,34	5,38	10 ⁹ /L
LYM	28,9	25,8	33	25,3	25,7	27,5	27,1	%
LYM#	1,39	1,2	1,77	1,63	1,47	1,47	1,46	10 ⁹ /L
Tỷ lệ tế bào T-CD4	49,3	47,44	43,4	44,9	46,4	41,1	52,8	%
Số lượng tế bào T-CD4	685	569	768	732	682	604	771	mm ³
Tỷ lệ tế bào T-CD8	24,2	19,42	17,5	21	19,6	16,9	18,5	%
Số lượng tế bào T-CD8	336	233	310	342	288	248	270	mm ³
Tỷ lệ TCD4/TCD8	2,04	2,44	2,48	2,14	2,37	2,43	2,85	%

Bảng 20. Diễn tiến bệnh của bệnh nhân số 8 trong quá trình thử nghiệm

Chỉ số xét nghiệm	Ngày điều trị							Đơn vị
	D0	D60	D180	D240	D300	D360	D420	
WBC	7,08	10,06	5,54	8,80	8,53	7,31	8,59	10 ⁹ /L
LYM	27,4	22	31,0	14,5	20,2	19,3	23,6	%
LYM#	1,94	2,21	1,72	1,28	1,72	1,41	2,03	10 ⁹ /L
Tỷ lệ tế bào T-CD4	33,6	36,1	32,7	42,1	36,4	37,9	36,9	%
Số lượng tế bào T-CD4	652	798	562	539	626	534	749	mm ³
Tỷ lệ tế bào T-CD8	26	27	28,5	27	26,4	27,4	28,4	%
Số lượng tế bào T-CD8	504	597	490	346	454	386	577	mm ³
Tỉ lệ TCD4/TCD8	1,29	1,34	1,15	1,56	1,38	1,38	1,30	%

Các chỉ số đặc trưng của cả hai bệnh nhân tuân thủ phác đồ điều trị đối với bệnh tiến triển khá tốt, khả năng kìm hãm khối u hiệu quả, các chỉ số liên quan đến bệnh ung thư gan như số lượng tế bào T-CD4 đã tăng chậm, số lượng tế bào T-CD8 giảm và tỷ lệ tế bào lympho giảm cho thấy khả năng kìm hãm của thuốc là khá tốt. Từ ngày điều trị 60, bệnh nhân được tăng liều đến 100% liều dự kiến và từ ngày điều trị 180 bệnh nhân được tăng liều lên đến 150% liều dự kiến cho thấy đáp ứng tốt. Số lượng tế bào ung thư tăng chậm. Diễn tiến phát triển bệnh chậm. Điều này cho thấy rằng, thuốc theo sáng chế cho phép kéo dài thời gian sống của bệnh nhân ung thư gan giai đoạn cuối. Thời gian sống của bệnh nhân được ghi nhận lên tới 420 ngày và 660 ngày (so với số ngày sống trung bình của bệnh nhân không sử dụng là 105 ngày) đã chứng tỏ hiệu quả của thuốc thử nghiệm.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo sáng chế được phối trộn một cách chọn lọc 4 thành phần từ nhóm hoạt chất flavonoid và 6 thành phần từ nhóm hoạt chất ancaloit được chiết chọn lọc từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh cho thấy khoảng an toàn độc tính cho người được quy đổi tương đương 3800 mg/kg (gấp 30,8 lần liều thường dùng cho người). Qua thử nghiệm, hỗn hợp theo sáng chế còn thấy không gây độc tính bán trường diễn trên động vật thử nghiệm. Việc thử nghiệm thành công và chứng minh hiệu quả của hỗn hợp trên tế bào ung thư gan cho

phép mở ra hướng phát triển nguồn dược chất trên cơ sở các hợp chất từ tự nhiên để phát triển thuốc điều trị bệnh ung thư.

Hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo sáng chế có hiệu quả tác dụng trên tế bào ung thư gan theo cách hiệp đồng. Bằng thực nghiệm đã chứng tỏ rằng, khi kết hợp nhóm hợp chất flavonoid và nhóm hợp chất ancaloit thu được từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh theo tỷ lệ thành phần 25/75 (w/w) theo trọng lượng, hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan thu được có hiệu quả hiệp đồng lên tế bào thử nghiệm, hiệu quả cho thấy có tác dụng ức chế và làm giảm mật độ phát triển của tế bào ung thư Hep-G2 trên môi trường MEM lên tới 71,73% và 75,31%, tương ứng. Hiệu quả hiệp đồng tác dụng kìm hãm sự phát triển của khối u so với hỗn hợp chỉ sử dụng flavonoid hoặc ancaloit lên tới 70,8 và 195% và mật độ giảm sự hình thành khối u là 38% và 114%, tương ứng và tỷ lệ giảm kích thước khối u là 10,53 và 144,77%, tương ứng. Điều này cho thấy hiệu quả vượt trội của hỗn hợp theo sáng chế khi thử nghiệm trên tế bào ung thư gan.

Quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo sáng chế cho phép chiết chọn lọc từng phân đoạn có hoạt tính sinh học từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh với hiệu suất cao, lần lượt 1,2% và 3,66%, tương ứng, với độ tinh khiết của từng hợp chất lên tới 98%. Tổng lượng hoạt chất tinh sạch thu được từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh đạt hiệu suất lên tới 4,86%. Quy trình cho phép cạnh tranh được với các quy trình sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học, cho phép phát triển được nguồn hoạt chất phục vụ cho công nghiệp dược.

Thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan theo sáng chế được thử nghiệm lâm sàng với người mắc bệnh ung thư gan giai đoạn cuối, khả năng ức chế sự hình thành và phát triển tế bào ung thư gan của thuốc cho phép kéo dài thời gian sống của bệnh nhân được ghi nhận lên tới 660 ngày.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan bao gồm nhóm các hoạt chất flavonoit và ancaloit có hoạt tính sinh học được chiết từ hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh, trong đó hỗn hợp này bao gồm:

+ nhóm các hoạt chất flavonoit chiếm 25% trọng lượng hỗn hợp, trong đó nhóm này bao gồm các thành phần sau:

4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol
kaempferol
quercetin
β -sitosterol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosit

+ nhóm các hoạt chất ancaloit chiếm 75% trọng lượng hỗn hợp, trong đó nhóm này bao gồm các thành phần sau:

ambellin
1 β -2 β epoxyambellin
crinamidin
6-hydroxycrinamidin
powellin
6-hydroxypowellin.

2. Hỗn hợp theo điểm 1, trong đó nhóm hoạt chất flavonoit bao gồm các thành phần có tỷ lệ % trọng lượng sau:

4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphenol	10-15
kaempferol	15-25
quercetin	15-25
β -sitosterol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosit	40-60.

3. Hỗn hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nhóm hoạt chất ancaloit bao gồm các thành phần có tỷ lệ % trọng lượng sau:

ambellin	5-15
1 β -2 β epoxyambellin	25-35
crinamidin	5-15
6-hydroxycrinamidin	5-25
powellin	15-25

6-hydroxypowellin.

15-25.

4. Quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hái hoa của cây *Crinum latifolium* L. var. *crilae* Tram & Khanh, loại bỏ tạp chất rồi phơi khô, xay thành bột thu được nguyên liệu hoa khô dạng bột;

b) chiết hoàn lưu nguyên liệu bằng cách chiết bột hoa khô với dung môi là ete dầu hỏa (EP) trong thiết bị hoàn lưu theo tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:10 (trọng lượng: thể tích) trong thời gian 1 giờ, sau đó tách riêng phần dịch và phần bã;

c) chiết nhóm hoạt chất flavonoid:

- thu cao chiết ete dầu hỏa bằng cách thu hồi phần dịch chiết, lọc và loại dung môi dưới áp suất giảm còn khoảng 5% thể tích thu được cao chiết ete dầu hỏa;

- chiết phân đoạn flavonoid bằng cách nhồi cao chiết ete dầu hỏa (EP) lên cột silica gel, tiến hành rửa giải với hệ dung môi lần lượt EP/EtOAc theo tỷ lệ EP 100%, EP: EtOAc 75:25, EP:EtOAc 50:50, EP:EtOAc 25:75 và EtOAc 100% thu ba phân đoạn EP: EtOAc 75:25, EP:EtOAc 25:75 và EtOAc 100%; và

- thu các hoạt chất flavonoid có hoạt tính sinh học bằng cách:

- + nhồi phân đoạn EP:EtOAc 75:25 lên cột silica gel và ổn định bằng dung môi CHCl_3 100%, tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 98/2, sau khi cô loại dung môi thu được hợp chất 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-methoxyphenol dạng tinh thể không màu;

- + nhồi phân đoạn EP:EtOAc 25:75 lên cột silicagel và ổn định bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 98/2, tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH tỷ lệ 9/1, sau khi loại bỏ dung môi thu hai hợp chất kaempferol và quercetin dạng bột màu vàng; và

- + nhồi phân đoạn EtOAc 100% lên cột silicagel và ổn định bằng hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 95/5, tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH tỷ lệ 9/1, sau khi loại bỏ dung môi, kết tinh trong MeOH thu được hợp chất β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranosit dạng bột màu trắng;

- gom chung các hợp chất 4-(3-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propyl)-2-metoxyphecol, kaempferol, quercetin và β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranosit thu được nhóm hoạt chất flavonoid dạng bột;

d) chiết nhóm hoạt chất ancaloit:

- chiết cao ancaloit tổng số bằng cách chuyển phần bã sau khi chiết loại flavonoid vào bình ngấm kiệt và chiết bằng hệ dung môi etanol: axit axetic tỷ lệ 70:30, theo tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 1/10 (trọng lượng/thể tích) trong thời gian 24 giờ, sau khi lọc, thu phần dịch và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm đến khi còn 5% thu được cao ancaloit tổng số;

- chiết loại tạp chất bằng cách kiềm hóa cao ancaloit tổng số bằng NH_4OH đến pH nằm trong khoảng từ 9 đến 10, sau khi lọc kết tủa, chiết phân đoạn ancaloit bằng CHCl_3 theo tỷ lệ 1:1 (v/v), tiếp đó axit hóa bằng HCl 0,1N rồi kiềm hóa bằng NH_4OH đến pH nằm trong khoảng từ 9 đến 10, sau khi cô loại dung môi thu được alcaloit toàn phần ở dạng cao đặc; và

-thu nhóm hoạt chất alcaloit bằng cách cho phần cao đặc này hấp phụ lên cột silica gel rồi rửa giải bằng hệ dung môi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ với tỷ lệ MeOH tăng dần, thu phân đoạn MeOH nồng độ 1%, 5% và 7%, trong đó:

+ phân đoạn MeOH 1% được cô loại dung môi, thu được hai hợp chất bao gồm ambellin và 1β - 2β epoxyambellin ở dạng bột;

+ phân đoạn MeOH 5% được loại bỏ dung môi, thu được hai hợp chất bao gồm crinamidin và 6-hydroxycrinamidin ở dạng bột;

+ phân đoạn MeOH 7% được loại bỏ dung môi, thu được hai hợp chất bao gồm powellin và 6-hydroxypowellin ở dạng bột;

- gom chung các hợp chất ambellin, 1β - 2β epoxyambellin, crinamidin, 6-hydroxycrinamidin, powellin và 6-hydroxypowellin thu được nhóm hoạt chất ancaloit dạng bột; và

e) thu hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan bằng cách phối trộn nhóm hoạt chất flavonoid thu được ở bước b) và nhóm hoạt chất ancaloit thu được từ bước d) theo tỷ lệ 25/75 (w/w) thu được hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan.

5. Thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan, trong đó thuốc này chứa hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 và tá dược.

6. Thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan theo điểm 5, trong đó tá dược được chọn từ nhóm bao gồm: tinh bột, tá dược rã, bột talc, magnesi stearat và/hoặc aerosil.

7. Quy trình sản xuất thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan theo điểm 5 hoặc 6, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

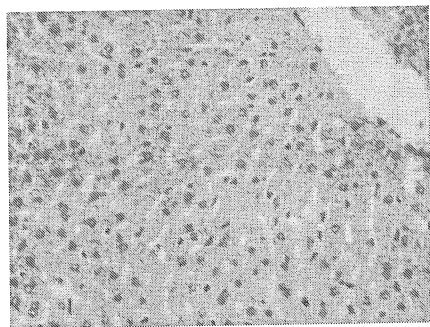
a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, nghiền mịn và rây qua lưới cỡ lỗ 0,75mm, các tá dược bao gồm aerosil, tinh bột, tinh bột natri glycolat (DST), bột talc và magnesi stearat được nghiền và rây qua lưới cỡ lỗ 0,75mm;

b) thu bột khô bằng cách phối trộn lần lượt hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan với 5% aerosil, 20% tinh bột, sau khi trộn đều, phối trộn tiếp với 5% DST, trộn đều thu được bột khô;

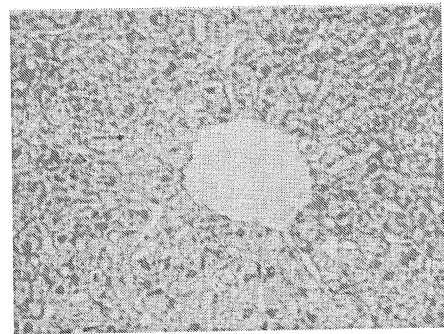
c) tạo dạng cốm trơn bằng cách phối trộn bột talc với magnesi stearat theo tỷ lệ 1:1 rồi phối trộn với bột khô thu được ở bước b) theo tỷ lệ 5%, tiếp đó chuyển vào thiết bị xát để thu được dạng cốm trơn; và

d) tạo viên nang bằng cách đóng cốm trơn vào viên nang trong điều kiện nhiệt độ từ 20 đến 25°C, độ ẩm 35 đến 55% để thu được thuốc để hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan.

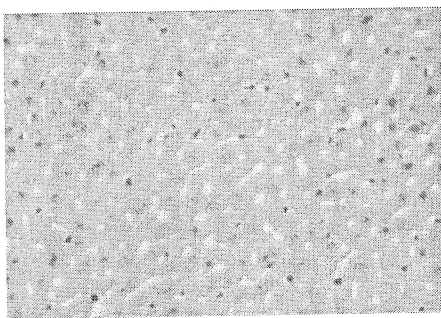
HÌNH 1



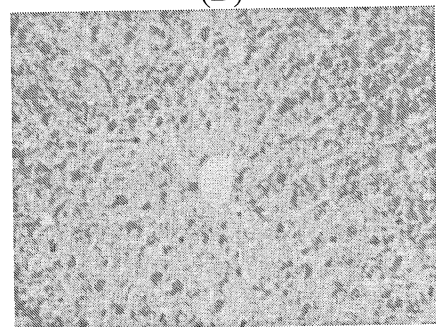
(A)



(B)

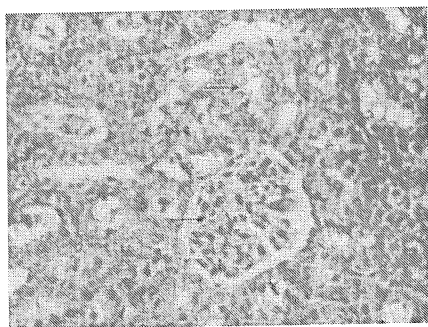


(C)

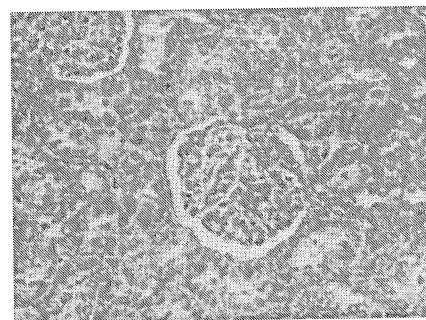


(D)

HÌNH 2



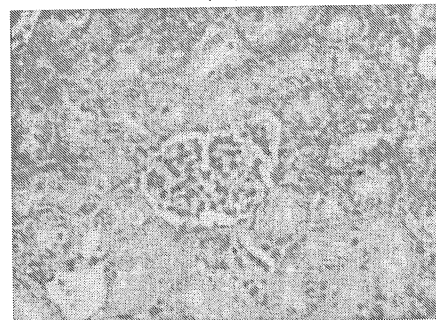
(A)



(B)

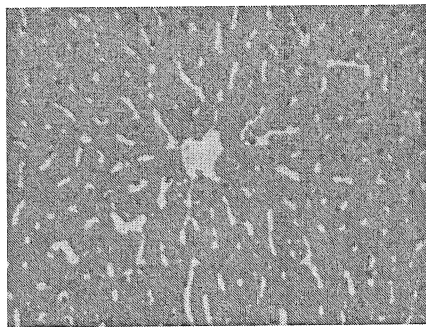


(C)

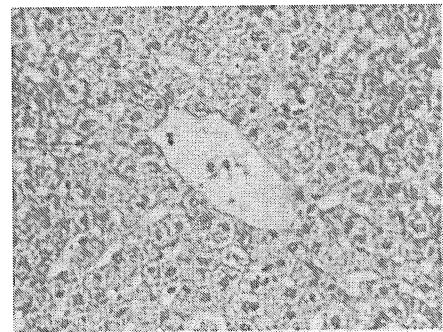


(D)

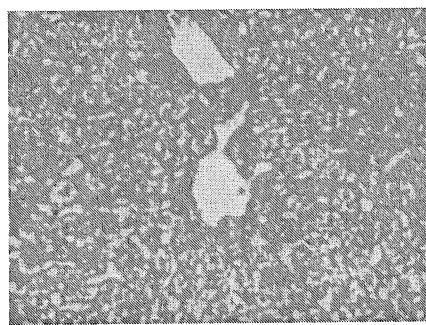
HÌNH 3



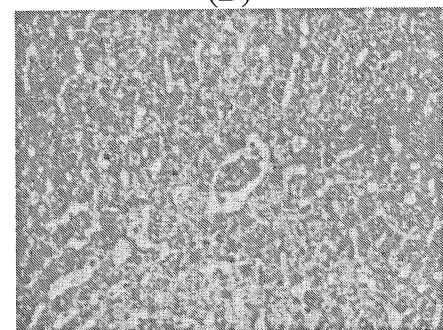
(A)



(B)

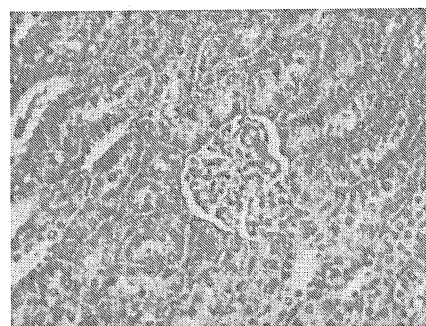


(C)

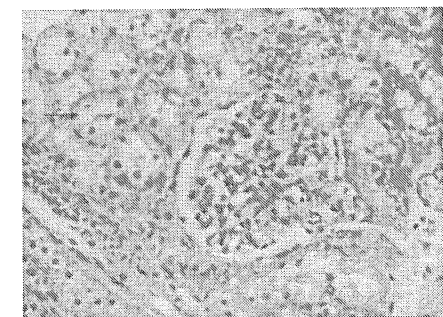


(D)

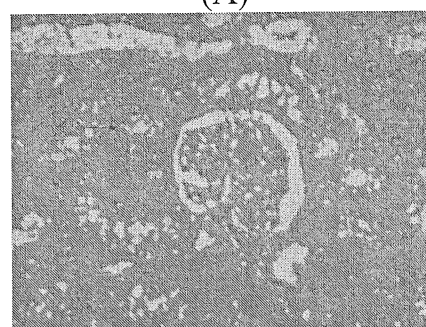
HÌNH 4



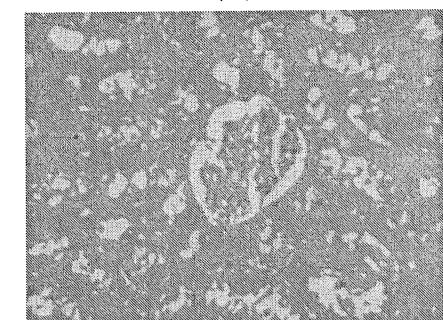
(A)



(B)

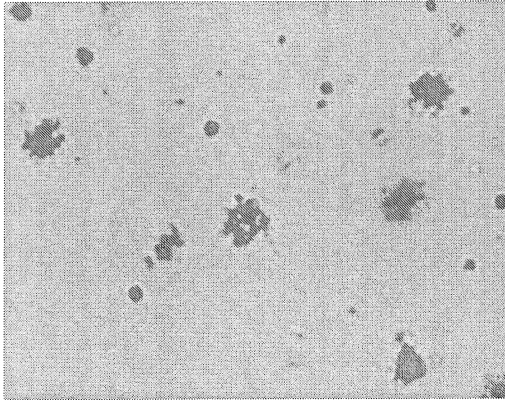


(C)

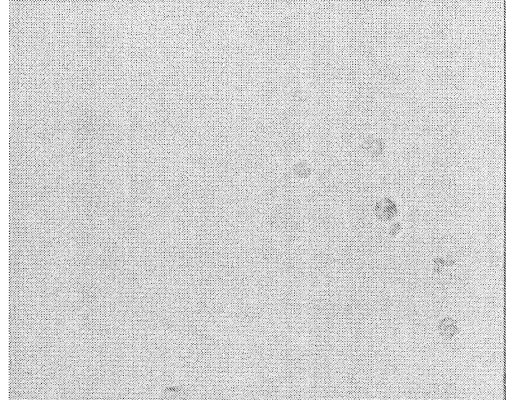


(D)

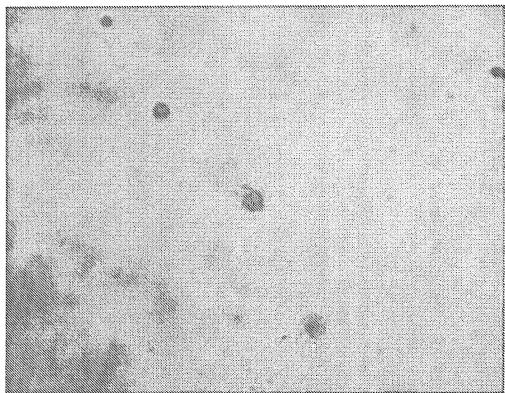
HÌNH 5



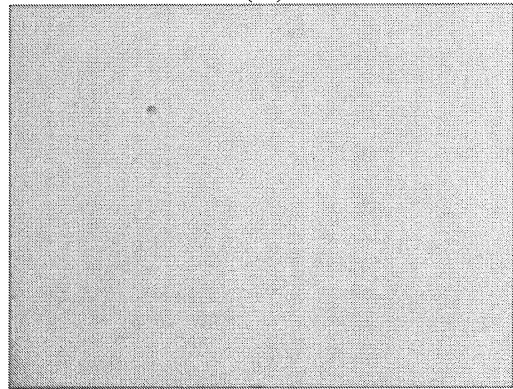
(A)



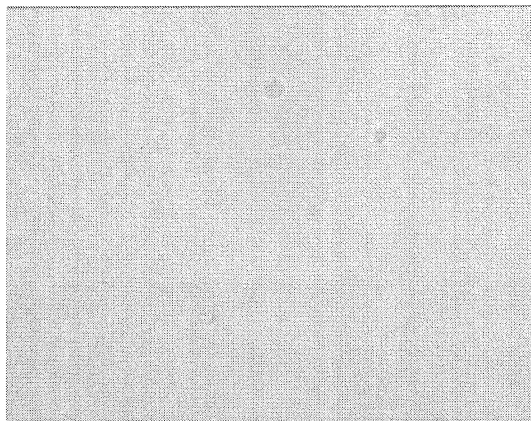
(B)



(C)



(D)



(E)