



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002854

(51)⁷ **A61K 36/00**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00105

(22) 02/04/2019

(45) 25/04/2022 409

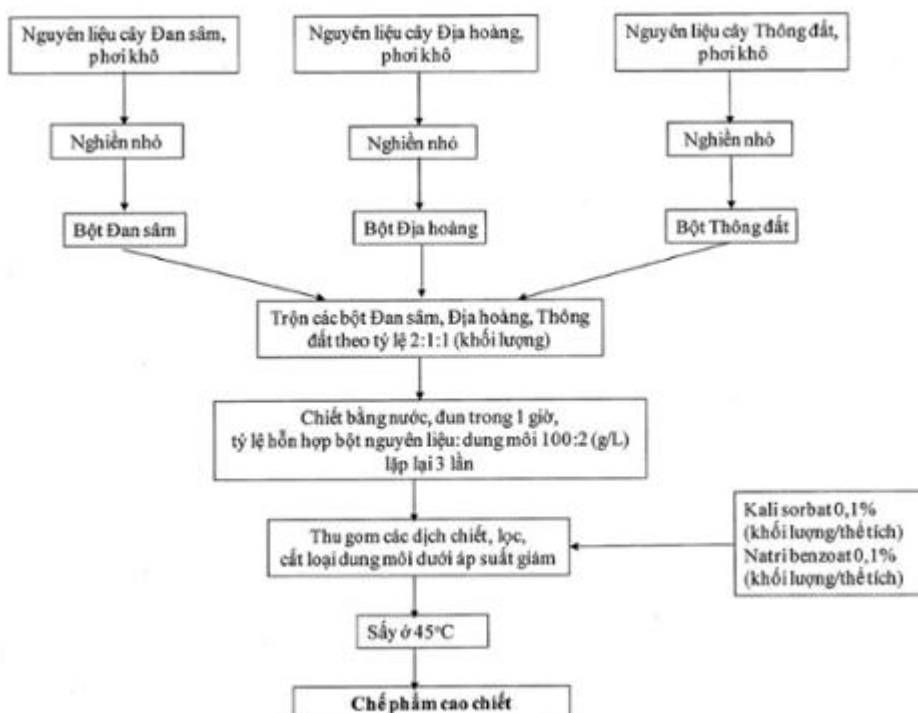
(43) 25/06/2019 375A

(73) Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
Nhà Y1, 144 Xuân Thủy, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Bùi Thanh Tùng (VN); Đặng Kim Thu (VN); Nguyễn Thanh Hải (VN); Phan Văn Ngọc (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM CAO CHIẾT HỖ TRỢ TĂNG CƯỜNG TRÍ NHỚ
VÀ CHẾ PHẨM CAO CHIẾT THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm cao chiết hỗ trợ tăng cường trí nhớ bao gồm các bước: i) chuẩn bị nguyên liệu cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), cây Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* Libosch), và cây Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trevis), sau đó phơi khô, nghiền nhỏ thu được bột nguyên liệu; ii) tạo hỗn hợp bột nguyên liệu bằng cách trộn các bột nguyên liệu từ cây Đan sâm, Địa hoàng và Thông đất theo tỷ lệ khối lượng Đan sâm : Địa hoàng : Thông đất = 2:1:1 thu được hỗn hợp bột nguyên liệu; iii) chiết hỗn hợp bột nguyên liệu bằng nước; và iv) chưng cất tạo chế phẩm cao chiết. Sáng chế cũng đề cập chế phẩm cao chiết thu được bởi quy trình này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm cao chiết hỗ trợ tăng cường trí nhớ từ cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), cây Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* Libosch), và cây Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trevis) và chế phẩm cao chiết thu được bởi quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật sáng chế

Suy giảm trí nhớ và rối loạn thần kinh có đặc điểm là các tế bào thần kinh và các mô trong não bị tổn thương. Nguyên nhân do có sự tích tụ các mảng xơ amyloid beta và các đám xơ rối protein tau. Một trong những thay đổi sinh hóa đáng chú ý nhất ở bệnh nhân bị suy giảm trí nhớ là sự suy giảm nồng độ Axetylcholin (ACh) trong vùng dưới đồi và vỏ não. Bởi vậy, các chất ức chế enzym axetylcholinesteraza (AChE), một enzym có chức năng thủy phân chất dẫn truyền thần kinh tại các synap thần kinh cholinergic đóng vai trò quan trọng trong việc điều trị suy giảm trí nhớ và rối loạn thần kinh. Ngoài ra, sự gia tăng quá mức các gốc tự do trong não gây ra hiện tượng “stress oxy hóa” được cho là một trong những nguyên nhân gây ra các bệnh suy giảm trí nhớ và rối loạn thần kinh. Hiện nay, các thuốc tân dược có nguồn gốc hóa học tổng hợp là những thuốc được sử dụng trong điều trị suy giảm trí nhớ, nhưng có rất nhiều tác dụng phụ. Vì vậy, việc sử dụng các dược liệu vừa có hoạt tính chống oxy hóa vừa có khả năng ức chế enzym AChE để phòng và điều trị bệnh suy giảm trí nhớ, rối loạn thần kinh thu hút sự quan tâm của nhiều công ty dược phẩm, do có ít tác dụng không mong muốn và giảm được chi phí điều trị. Việc kết hợp các dược liệu trong một chế phẩm sẽ phát huy được tác dụng tốt hơn từng thành phần dược liệu riêng biệt. Mặc dù đã có nhiều bài thuốc dân gian có tác dụng hỗ trợ tăng cường trí nhớ, 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 để giải quyết vấn đề nêu trên. Do đó, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm cao chiết hỗ trợ tăng cường trí nhớ bao gồm các bước: i) chuẩn bị nguyên liệu cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), cây Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* Libosch), và cây Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trevis), sau đó phơi khô, nghiền nhỏ thu được bột nguyên liệu; ii) tạo hỗn hợp bột nguyên liệu bằng cách trộn các bột nguyên liệu từ cây Đan sâm, Địa hoàng và Thông đất theo tỷ lệ khối lượng 2:1:1 thu được hỗn hợp bột nguyên liệu; iii) chiết hỗn hợp bột nguyên liệu bằng nước; và iv) chưng cất tạo chế phẩm cao chiết. Sáng chế cũng đề cập chế phẩm cao chiết thu được bởi quy trình này.

Sáng chế đã tìm ra công thức bài thuốc tối ưu để phát huy được dược tính hiệp đồng của các thành phần dược liệu từ cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), cây Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* Libosch), và cây Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trevis), trong đó việc kết hợp ba thành phần dược liệu từ cây Đan sâm, Địa hoàng và Thông đất theo tỷ lệ khối lượng 2:1:1 vào trong chế phẩm cao chiết theo sáng chế làm cho chế phẩm cao chiết tạo ra có hiệu quả điều trị cao hơn so với từng phần dược liệu riêng rẽ. Ngoài ra, việc bổ sung thêm các chất chống nấm mốc bao gồm kali sorbat 0,1% (khối lượng/thể tích) và natri benzoat 0,1% (khối lượng/thể tích) làm cho chế phẩm cao chiết tạo ra có khả năng bảo quản được lâu dài, thuận tiện cho việc thương mại hóa và sử dụng chế phẩm.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1. Là sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm cao chiết của các cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* Libosch), và Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trevis).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết các phương án cụ thể có tham khảo hình vẽ kèm theo.

Sáng chế sử dụng nguyên liệu từ các cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* Libosch) và Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trevis). Các nguyên liệu này đều đạt tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm.

Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), thuộc họ Lamiaceae, hay còn được gọi là Huyết sâm, Xích sâm là cây thân cỏ, sống lâu năm, được phân bố rộng rãi ở miền Bắc Trung Quốc và Nhật Bản. Đan sâm là một loại cây thuốc quý, dạng cây cỏ, sống lâu năm, cây cao khoảng 30-80cm, thân màu đỏ nâu, đường kính 0,5-1,5cm. Thân vuông, trên có các gân dọc. Lá kép mọc đối, thường gồm 3-7 lá chét; lá chét giữa thường lớn hơn, mép lá chét có răng cưa tù; mặt trên lá chét màu xanh tro, có lông. Hoa mọc thành chùm ở đầu cành, dài 10-15cm, với 6 vòng hoa; mỗi vòng 3-10 hoa, thông thường là 5 hoa, màu đỏ tím nhạt. Tràng hoa 2 môi, môi trên cong hình lưỡi liềm, môi dưới xẻ ba, 2 nhị ở môi dưới; bầu có vòi dài. Quả nhỏ, dài 3mm, rộng 1,5mm. Mùa ra hoa từ tháng 5 đến tháng 8. Mùa quả từ tháng 6-9 hàng năm. Trong y học cổ truyền, rễ Đan sâm được sử dụng để điều trị các bệnh như mất ngủ, suy nhược thần kinh, nhồi máu cơ tim, đau thắt ngực, thiếu máu, viêm gan, xơ gan, suy thận mạn tính, tiểu đường và các biến chứng của tiểu đường. Các hoạt chất có hoạt tính sinh học quan trọng của Đan sâm bao gồm các hợp chất diterpen thuộc nhóm “tanshinon”, trong đó các hợp chất quan trọng là tanshinon IIA, cryptotanshinon và axit salvianolic A. Các hợp chất này gần đây được chứng minh có tác dụng bảo vệ thần kinh, đặc biệt là điều trị bệnh Alzheimer, như chống kết tập các mảng protein amyloid beta, ức chế AChE, chống viêm, chống oxy hóa.

Địa hoàng hay sinh địa, có tên khoa học là *Rehmannia glutinosa* Libosch là một loài thực vật thuộc chi Địa hoàng, họ Cỏ chổi (Orobanchaceae). Trong Đông y, địa hoàng là một cây thuốc. Địa hoàng là loại cây thân cỏ, sống nhiều năm, toàn thân cây có lông trắng, mềm. Thuộc cây rễ củ, mỗi cây có 5 - 7 củ, củ có cuống dài, vỏ củ màu đỏ nhạt. Cây cao 20 - 30cm. Lá thường mọc tụm ở các đốt thân dưới gốc cây. Lá hình trứng lộn ngược hình bầu dục dài, đuôi lá tù, mép lá có răng cưa không đều nhau, lá có nhiều nếp nhăn, lá dưới gốc dài hẹp. Rễ củ dùng làm thuốc. Địa hoàng là cây bản địa của Trung Quốc. Tại Việt Nam, loài này

được trồng ở một số tỉnh phía Bắc. Trong rễ cây địa hoàng có các hoạt chất như iridoit, glycosit, cyclopentanoit monoterpen, và norcarotenoit. Địa hoàng có nhiều tác dụng dược lý như tác dụng kháng viêm, hạ đường huyết, cường tim, hạ áp, cầm máu, bảo vệ gan, lợi tiểu, chống nấm, có tác dụng ức chế miễn dịch kiểu corticoit nhưng không làm ức chế hoặc teo vỏ tuyến thượng thận.

Thông đất, có tên khoa học là *Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trevis, có hình dáng rất giống với cây thông. Loại cây này có chiều cao khoảng 20cm, mọc sát đất và thường thấy ở những vùng đất khô cằn. Theo Đông y cây thông đất có vị cay, đắng, tính ấm, có tác dụng khu phong, trừ thấp, trấn thái, thư cân hoạt huyết, lợi niệu. Cây thông đất được dùng để hỗ trợ điều trị các bệnh như: viêm gan cấp tính, phong thấp, đau nhức xương khớp, ho mãn tính, ra mồ hôi trộm, mất xung đỏ, quáng gà, phụ nữ có dấu hiệu đẻ non, cải thiện trí nhớ và giảm các rối loạn não. Thành phần hóa học chủ yếu có tác dụng của thông đất là alkaloit, triterpenoit và flavonoit, trong đó nhiều alkaloit phân lập được từ dược liệu này đã được chứng minh là có tác dụng ức chế enzym axetylcholinesteraza (AChE) – một enzym có vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn sự tiến triển của bệnh Alzheimer trên mô hình *in vitro*. Trong cây thông đất có chứa hoạt chất có tên là Huperzin A, có tác dụng dẫn truyền xung thần kinh, ngăn chặn các mảng bám rối loạn trong não, giúp hỗ trợ điều trị bệnh suy giảm trí nhớ, đột quỵ.

Các chất chống nấm mốc được sử dụng trong sáng chế bao gồm kali sorbat 0,1% (khối lượng/thể tích) và natri benzoat 0,1% (khối lượng/thể tích).

Theo khía cạnh thứ nhất, quy trình sản xuất chế phẩm cao chiết hỗ trợ tăng cường trí nhớ được tiến hành như sau:

i) chuẩn bị nguyên liệu

thu hái nguyên liệu từ cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), cây Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* Libosch), và cây Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trevis), sau đó phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, nghiền nhỏ đến kích cỡ nhỏ hơn 0,6mm thu được bột nguyên liệu riêng rẽ của từng dược liệu;

Theo một phương án ưu tiên, nguyên liệu của cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) là phần rễ cây Đan sâm, nguyên liệu của cây Địa hoàng là

phần rễ và củ của cây Địa hoàng và nguyên liệu của cây Thông đất là phần trên mặt đất cây Thông đất.

ii) tạo hỗn hợp bột nguyên liệu

trộn các bột nguyên liệu từ cây Đan sâm, Địa hoàng và Thông đất nêu trên theo tỷ lệ khối lượng 2:1:1 thu được hỗn hợp bột nguyên liệu;

iii) chiết hỗn hợp bột nguyên liệu

hỗn hợp bột nguyên liệu nêu trên được chiết bằng nước, đun trong 1 giờ theo tỷ lệ hỗn hợp bột nguyên liệu:dung môi 100:2 (g/L), trong đó, việc chiết này được lặp lại 3 lần; và

iv) chung cất tạo chế phẩm cao chiết

thu gom và trộn lẫn các dịch chiết thu được từ các lần chiết ở bước iii), lọc và lấy phần dịch lọc, bổ sung các chất chống nấm mốc bao gồm kali sorbat 0,1% (khối lượng/thể tích) và natri benzoat 0,1% (khối lượng/thể tích); cất loại dung môi dưới áp suất giảm rồi sấy trong tủ sấy ở 45°C tới khối lượng không đổi, thu được chế phẩm cao chiết của các cây Đan sâm, Địa hoàng và Thông đất.

Sáng chế cũng đề cập chế phẩm cao chiết thu được bởi quy trình nêu trên. Chế phẩm cao chiết này chứa kết hợp ba thành phần dược liệu từ cây Đan sâm, Địa hoàng và Thông đất theo tỷ lệ khối lượng 2:1:1. Ngoài ra, chế phẩm này còn chứa các chất chống nấm mốc bao gồm kali sorbat và natri benzoat. Chế phẩm cao chiết theo sáng chế có thể được dùng để sản xuất thuốc hoặc thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng hỗ trợ tăng cường trí nhớ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất chế phẩm cao chiết bằng quy trình theo sáng chế

Thu hái rễ cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, nghiền nhỏ đến kích cỡ nhỏ hơn 0,6mm tạo thành bột. Thu hái rễ và củ cây Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* Libosch) phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, nghiền nhỏ đến kích cỡ nhỏ hơn 0,6mm tạo thành bột. Thu hái phần trên mặt đất cây Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trevis), phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, nghiền nhỏ đến kích cỡ nhỏ hơn 0,6mm tạo thành bột.

Phối trộn 50g bột nguyên liệu của rễ cây Đan sâm, 25g bột rễ và củ cây Địa hoàng và 25g bột phần trên mặt đất cây Thông đất, thu được 100g hỗn hợp bột nguyên liệu.

Chiết 100g hỗn hợp nguyên liệu này bằng nước, đun trong 1 giờ theo tỷ lệ hỗn hợp nguyên liệu:dung môi 100(g):2(L), lặp lại 3 lần. Thu gom các dịch chiết, lọc và lấy phần dịch lọc; bổ sung kali sorbat 0,1% (khối lượng/thể tích) và natri benzoat 0,1% (khối lượng/thể tích); cất loại dung môi dưới áp suất giảm rồi sấy trong tủ sấy ở 45°C tới khối lượng không đổi, thu được 5g chế phẩm cao chiết. Hiệu suất đạt khoảng 5%.

Ví dụ 2. Thử nghiệm tác dụng dược lý

Động vật thử nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, cả 2 giống, khỏe mạnh, trọng lượng $25,0 \pm 2,0$ g để nghiên cứu tác dụng điều trị các bệnh suy giảm trí nhớ và rối loạn thần kinh 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 thử 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

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (Himedia, Ấn độ); axit 5,5'-dithio-bis-(2-nitro) benzoic (DTNB) (Himedia, Ấn độ); Axetylthiocholin iodua (Sigma, Singapore), Axetylcholinesteraza (Sigma, Singapore); 1-methyl-2-phenylindole (Himedia, Ấn độ); butylated hydroxytoluen (Himedia, Ấn độ); 1,1,3,3-tetramethoxypropan (Himedia, Ấn độ).

a) Tác dụng chống oxy hóa *in vitro*

Chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 được đánh giá khả năng quét gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Dựa vào phản ứng giữa gốc tự do DPPH màu tím đỏ với chất chống oxy hóa để tạo ra phức hợp của DPPH có màu vàng và không hấp thụ ánh sáng tử ngoại tại bước sóng 517 nm. Đo độ hấp thụ tại bước sóng 517 nm của dung dịch sau phản ứng sẽ cho biết lượng DPPH còn lại

sau phản ứng. Chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 được pha thành các nồng độ khác nhau. Thử nghiệm được tiến hành trên đĩa 96 giếng. Hỗn hợp phản ứng gồm: 40 μL dung dịch các mẫu thử, 160 μL dung dịch DPPH (nồng độ 150 μM) trong metanol. Ủ hỗn hợp phản ứng ở 37°C trong 30 phút. Song song với mỗi mẫu thử, một mẫu chứng được tiến hành trong cùng điều kiện với thành phần gồm: 40 μL MeOH và 160 μL dung dịch DPPH (nồng độ 150 μM) trong metanol. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần.

Hoạt tính quét gốc tự do DPPH được đánh giá thông qua giá trị phần trăm ức chế I (%) và được tính theo công thức: $I (\%) = [(A_{\text{đối chứng}} - A_{\text{thử}}) / A_{\text{đối chứng}}] \times 100$

b) Tác dụng ức chế enzym AChE

Chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 được đánh giá tác dụng ức chế AChE. Nguyên tắc của phương pháp là cơ chất axetylthiocholin iodua (ATCI) bị thủy phân nhờ xúc tác của AChE tạo thành thiocholin và axit axetic. Sản phẩm thiocholin thu được cho phản ứng với thuốc thử axit 5-5'- dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) tạo thành hợp chất axit 5-thio-2-nitro benzoic có màu vàng, có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 412 nm. Lượng hợp chất màu vàng được tạo thành này tỷ lệ thuận với hoạt độ của AChE. Xác định độ hấp thụ của mẫu thử ở 412 nm để đánh giá hoạt tính của AChE. Thêm lần lượt từng dung dịch gồm: 700 μL dung dịch đệm Natri phosphat 0,1 M (pH 8,0); 100 μL dung dịch thử ở các nồng độ khác nhau và 100 μL dung dịch enzym AChE 0,25 IU/mL vào cuvet 1 ml. Hỗn hợp các dung dịch này được trộn đều và ủ ở 25°C trong 15 phút. Sau đó, thêm 50 μL DTNB 2,5 mM và 50 μL ATCI 2,5 mM hỗn hợp và trộn đều. Tiếp tục ủ hỗn hợp trong 10 phút ở 25°C. Sau đó, dung dịch được đo độ hấp thụ ở bước sóng 412 nm. Tất cả các thử nghiệm được lặp lại 3 lần.

Hoạt tính ức chế AChE của mẫu thử được tính theo công thức:

$$I\% = (1 - A_{\text{thử}} / A_{\text{đối chứng}}) \times 100$$

Trong đó:

- I%: phần trăm hoạt tính AChE bị ức chế.

- Athử và Đối chứng lần lượt là độ hấp thụ của mẫu thử và mẫu đối chứng.

c) Thử nghiệm hành vi theo mê lộ nước Morris

Chuột nhất trắng được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con:

- + Lô 1 (Nhóm NC: chứng âm): chuột uống nước cất;
- + Lô 2 (Nhóm SCP, chứng bệnh): chuột tiêm màng bụng scopolamin liều 0,5 mg/kg và nước cất;
- + Lô 3 (Nhóm EXT-100) chuột được cho uống cao chiết thu được theo ví dụ 1 liều 100mg/kg thể trọng + tiêm màng bụng scopolamin liều 0,5 mg/kg;
- + Lô 4 (Nhóm EXT-200) chuột được cho uống cao chiết thu được theo ví dụ 1 liều 200mg/kg thể trọng + tiêm màng bụng scopolamin liều 0,5 mg/kg;

Chuột được cho uống chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 nước cất hoặc thuốc thử trong vòng 1 ngày. Đến ngày thứ 15, sau 60 phút uống nước cất hoặc thuốc thử, tiêm màng bụng scopolamin liều 0,5 mg/kg trong 8 ngày liên tục.

Mê lộ nước Morris là một bể nước hình tròn, lượng nước duy trì ở mức 15 cm, đường kính bể là 1,1m, chiều cao 30 cm, nhiệt độ nước được duy trì ở 25°C, theo nhiệt độ phòng. Bền đồ có đường kính 7,5 cm, làm bằng nhựa trong suốt, được đặt tại một góc phân tư của mê lộ. Toàn bộ thời gian chuột cần phải học là 8 ngày, bao gồm:

Bài tập có bền đồ: Bài tập này được tiến hành trong 7 ngày, chuột sẽ được luyện tập nhớ không gian (training trial) khi bền đồ đã được đặt dưới mặt nước 1 cm. Mỗi ngày chuột phải tập 3 lần, mỗi lần chuột được đặt vào một trong 3 góc phân tư còn lại của mê lộ. Nếu trong 60 giây chuột không tìm được bền đồ, chúng sẽ được hướng dẫn để tìm bền đồ. Khi đến được bền đồ, chuột sẽ được ở đó 20 giây. Khoảng cách giữa các lần tập là 1 phút, trong thời gian này, chuột nhanh chóng được lau khô và sưởi ấm. Toàn bộ quá trình chuột tập bài được ghi lại bằng camera, số liệu được tính toán để biết được thời gian tiềm tàng để chuột có thể tìm thấy bền đồ. Số liệu mỗi ngày sẽ được tính bằng giá trị trung bình của 3 lần luyện tập đối với mỗi chuột.

Bài tập không có bến đỗ: Đến ngày thứ 8 sau bài tập nhìn thấy bến đỗ, chuột sẽ được tập thử lại trí nhớ (probe trial). Trong bài tập này, bến đỗ được bỏ ra ngoài, chuột được bơi trong mê lộ 1 lần duy nhất trong 60 giây. Chuột sẽ nhớ lại vị trí của bến đỗ và có xu hướng bơi lâu hơn tại góc một phần tư của mê lộ có bến đỗ được đặt từ những ngày tập trước. Camera sẽ ghi lại và phân tích thời gian chuột bơi tại mỗi góc phần tư của mê lộ.

d) Hoạt tính ức chế peroxy hoá lipid trên thể đồng nhất não chuột

Vào ngày cuối của thử nghiệm mê lộ nước Morris, chuột bị giết và cẩn thận thu lấy não và rửa bằng nước muối sinh lý. Não chuột được nghiền đồng thể trong dung dịch đệm chứa 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride) và chất ức chế proteaza. Dung dịch đồng thể được ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ lạnh 4°C. Phần dịch nổi thu được mang đi định lượng malondialdehyt (MDA), sản phẩm của quá trình oxy hóa lipid màng tế bào, để đánh giá khả năng ức chế quá trình peroxy hóa lipid của cao chiết thu được theo ví dụ 1. Phương pháp được tiến hành bằng phản ứng của malonandehyt với 2 phân tử 1-methyl-2-phenylindol ở 45°C. Lấy 0.64 ml 1-methyl-2-phenylindol 10,3 mM, 0,2 mL mẫu thử và 10µL butylated hydroxytoluen 2µg/mL. Sau đó đem hỗn hợp phản ứng lắc đều, thêm tiếp 0,15 mL HCl 37%. Ủ hỗn hợp ở 45°C trong vòng 45 phút và ly tâm ở 10000 g trong vòng 10 phút. Lấy phần dịch nổi đem đo độ hấp thụ ở bước sóng 586 nm. Sử dụng 1,1,3,3-tetramethoxypropan để xây dựng đường chuẩn. Lượng peroxit hóa lipid được thể hiện bằng số nmol MDA tương đương /mg protein.

e) Nghiên cứu đánh giá độc tính cấp

Trước khi tiến hành thử nghiệm, cho chuột nhịn ăn qua đêm. Chuột được chia thành các lô khác nhau (mỗi lô 10 con). Cho chuột uống cao chiết liều duy nhất với liều tăng dần đến khoảng 20000 mg cao/kg (liều cao nhất có thể pha được, thiết kế bằng cách thêm dần nước vào cao đặc đến khi thể chất cao có dạng lỏng để có thể cho chuột uống, cho chuột uống 0,4 ml dịch đặc) 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 thử uống thuốc với các mức liều tăng dần từ với cùng thể tích uống 0,4 ml. 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...) và số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc.

f) Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình $\pm$ SEM (Standard Error of the Mean: Sai số chuẩn của giá trị trung bình) và được xử lý thống kê bằng phần mềm SigmaPlot 10.0 theo phép kiểm One-way ANOVA và Tukey test với độ tin cậy lớn hơn 95% ($p < 0,05$).

Tác dụng hỗ trợ tăng cường trí nhớ của chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1

g) Kết quả tác dụng chống oxy hóa

Tác dụng chống oxy hóa *in vitro* trên mô hình quét gốc tự do DPPH của cao chiết thu được theo ví dụ 1 được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Tác dụng chống oxy hóa *in vitro* trên mô hình quét gốc tự do DPPH của cao chiết thu được theo ví dụ 1

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Phần trăm ức chế (I%)
5	$4,75 \pm 1,19$
12,5	$16,84 \pm 2,27$
25	$26,13 \pm 2,69$
50	$39,47 \pm 2,53$
125	$75,69 \pm 4,81$
250	$98,45 \pm 5,27$
IC ₅₀	63,37

Từ kết quả ở bảng 1 cho thấy cao chiết thu được theo ví dụ 1 thể hiện tác dụng quét gốc tự do DPPH *in vitro* với giá trị I% ở nồng độ 50 $\mu\text{g/mL}$ đạt $39,47 \pm 2,53$ % và ở nồng độ 250 $\mu\text{g/mL}$ đạt $98,45 \pm 5,27$ %, giá trị IC₅₀ tính được là 63,37 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả cho thấy cao chiết thu được theo ví dụ 1 có tác dụng chống oxy hóa tốt.

h) Kết quả tác dụng ức chế enzym AChE

Hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của cao chiết thu được theo ví dụ 1 được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Phần trăm ức chế (I %)
5	$6,24 \pm 1,45$
12,5	$12,48 \pm 2,45$
25	$26,27 \pm 4,21$
50	$38,14 \pm 4,15$
125	$74,82 \pm 6,42$
250	$95,31 \pm 4,29$
IC ₅₀	66,25

Kết quả bảng 2 cho thấy chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 thể hiện khả năng ức chế enzym AChE với giá trị I% ở nồng độ 50 $\mu\text{g/mL}$ đạt $38,14 \pm 4,15$ % và ở nồng độ 250 $\mu\text{g/mL}$ đạt $95,31 \pm 4,29$ %, giá trị IC₅₀ tính được là 66,25 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả cho thấy chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 có tác dụng enzym AChE tốt.

i) Kết quả thử nghiệm hành vi theo mê lộ nước Morris

Trên mô hình suy giảm nhận thức gây ra bởi scopolamin ở chuột nhắt đã chỉ ra rằng chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 làm giảm thời gian tiềm tàng tìm thấy bến đỗ, tăng số vòng bơi và thời gian bơi ở tọa độ mục tiêu. Thời gian tiềm tàng tìm thấy bến đỗ của nhóm chứng âm giảm từ 62,3 giây xuống 30,2 giây trong thời gian huấn luyện, của nhóm SCP là từ 64,2 giây xuống 45,2 giây, nhóm chuột được cho uống chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 liều 100 mg/kg là từ 64,6 giây xuống 42,2 giây, và nhóm chuột được cho uống chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 liều 200 mg/kg là từ 63,5 giây xuống 38,3 giây trong thời gian huấn luyện (Bảng 3). Trong thử nghiệm kiểm tra, số vòng bơi và thời gian bơi ở tọa độ mục tiêu được sử dụng để đánh giá khả năng ghi nhớ không gian của

chuột. Ở nhóm chứng bệnh, chuột có số vòng bơi và thời gian bơi ở tọa độ mục tiêu giảm so với nhóm chứng sinh lý. Ở nhóm chuột được cho uống chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 với liều 100 mg/kg và liều 200 mg/kg có số vòng bơi và thời gian bơi ở tọa độ mục tiêu tăng đáng kể so với nhóm chứng bệnh (Bảng 4). Kết quả cho thấy chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 có tác dụng làm tăng đáng kể khả năng ghi nhớ không gian của chuột.

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm Morris. Thời gian tiềm tàng tìm thấy bèo nổi trong vòng 7 ngày;

Ngày	NC	SCP	EXT-100	EXT-200
1	62,3±1,5	64,2±2,4	64,6±2,1	63,5±3,1
3	46,8±2,6	56,5±2,9	53,2±3,2	50,5±2,4
5	36,4±3,2	50,3±1,5	46,3±3,5	42,7±2,5
7	30,2±3,4	45,2±3,5	42,2±2,3	38,3±3,2

*Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm NC; #Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm SCP;

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm Morris. Thời gian bơi ở tọa độ mục tiêu và số vòng bơi quanh tọa độ mục tiêu trong ngày thử nghiệm.

Nhóm nghiên cứu	Thời gian bơi ở tọa độ mục tiêu	Số vòng bơi quanh tọa độ mục tiêu
NC	45,3±3,5	3,90±0,25
SCP	19,6±4,2*	1,58±0,34*
EXT-100	27,9±3,1 [#]	2,62±0,32 [#]
EXT-200	34,5±4,2 [#]	3,21±0,26 [#]

*Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm NC; #Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm SCP;

k) Kết quả ức chế peroxyl hóa lipid trên thể đồng nhất não chuột

Các gốc tự do tấn công các axit béo không no và hình thành các andehyt 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 biomarker để đánh giá peroxyl hóa lipid trong cơ thể. Bảng 5 cho thấy lượng peroxyl hóa lipid

trong các nhóm nghiên cứu. Có sự gia tăng đáng kể nồng độ MDA trong nhóm chứng dương. Chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 làm giảm đáng kể nồng độ MDA đáng kể so với nhóm chứng dương, trong đó chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 liều 100 mg/kg làm giảm 18,75 % và liều 200 mg/kg làm giảm 28,12 % so với nhóm chứng dương.

Bảng 5. Tác dụng của chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 trên mô hình chuột suy giảm trí nhớ do scopolamin gây ra đối với nồng độ lipit hóa (MDA) trên mô não.

Nhóm nghiên cứu	MDA (nmol MDA tương đương /mg protein)
NC	$1,8 \pm 0,12$
SCP	$3,2 \pm 0,31^*$
EXT-100	$2,6 \pm 0,16$
EXT-200	$2,3 \pm 0,19^\#$

**Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm NC;* [#]*Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm SCP;*

1) Kết quả độc tính cấp

Triệu chứng lâm sàng:

Sau khi cho uống liều cao nhất 20 g/kg thể trọng chuột, 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.

Mổ khám và quan sát nội tạng sau 72 giờ dùng thuốc:

Mổ khám tất cả chuột thử nghiệm, 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 sau 72 giờ dùng thuốc:

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.

Các kết quả trên cho thấy khi cho chuột uống chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 liều 20g cao/kg cân nặng (liều cao nhất có thể cho chuột uống) sau 72 giờ, đã không gây chết hoặc có triệu chứng ngộ độc. Do đó, có thể thấy rằng chế phẩm cao chiết thu được theo ví dụ 1 có phạm vi an toàn khá rộng và vẫn chưa xác định được độc tính cấp và LD₅₀ (Lethal dose 50%).

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm cao chiết của các cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* Libosch) và Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trevis) và cao chiết dạng nước với liều 100 mg/kg và 200 mg/kg đều có tác dụng hỗ trợ tăng cường trí nhớ trên mô hình do scopolamin gây suy giảm trí nhớ 0,5 mg/kg ở chuột nhắt trắng. Tác dụng ấy thể hiện thông qua khả năng có tác dụng chống oxy hóa, có khả năng ức chế enzym AChE, làm giảm thời gian tiềm tàng tìm thấy bến đỗ, tăng số vòng bơi và thời gian bơi ở tọa độ mục tiêu trong thử nghiệm hành vi trên mô hình mê lộ nước Morris, ức chế peroxy hoá lipid trên thể đồng nhất não chuột. Ngoài ra, với liều cao nhất có thể cho uống, chế phẩm cao chiết không thể hiện độc tính cấp. Do đó, sáng chế đã tạo ra được chế phẩm cao chiết có hiệu quả hỗ trợ tăng cường trí nhớ và an toàn khi sử dụng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm cao chiết hỗ trợ tăng cường trí nhớ bao gồm các bước:

i) chuẩn bị nguyên liệu

thu hái nguyên liệu rễ cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), rễ và củ cây Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* Libosch), và phần trên mặt đất cây Thông đất (*Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trevis), sau đó phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, nghiền nhỏ đến kích cỡ nhỏ hơn 0,6mm thu được bột nguyên liệu;

ii) tạo hỗn hợp bột nguyên liệu

trộn các bột nguyên liệu từ cây Đan sâm, Địa hoàng và Thông đất nêu trên theo tỷ lệ khối lượng Đan sâm : Địa hoàng : Thông đất = 2:1:1, thu được hỗn hợp bột nguyên liệu;

iii) chiết hỗn hợp bột nguyên liệu

hỗn hợp bột nguyên liệu nêu trên được chiết bằng nước, đun trong 1 giờ theo tỷ lệ hỗn hợp bột nguyên liệu : dung môi = 100:2 (g/L), trong đó, việc chiết này được lặp lại 3 lần; và

iv) chưng cất tạo chế phẩm cao chiết

thu gom các dịch chiết ở bước iii), lọc và lấy phần dịch lọc, bổ sung các chất chống nấm mốc bao gồm kali sorbat 0,1% (khối lượng/thể tích) và natri benzoat 0,1% (khối lượng/thể tích); cất loại dung môi dưới áp suất giảm rồi sấy trong tủ sấy ở 45°C tới khối lượng không đổi, thu được chế phẩm cao chiết của các cây Đan sâm, Địa hoàng và Thông đất.

2. Chế phẩm cao chiết hỗ trợ tăng cường trí nhớ thu được từ quy trình theo điểm 1.

Hình 1