



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

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

(11)



2-0002888

(51) **C12P 5/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00152

(22) 21/04/2020

(45) 25/04/2022 409

(43) 27/07/2020 388AHI

(73) VIỆN HÓA HỌC, VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
(VN)

Số 18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Trịnh Thị Thủy (VN); Nguyễn Thị Hoàng Anh (VN); Bá Thị Châm (VN); Nguyễn
Thị Thùy Linh (VN); Trần Đức Quân (VN); Nguyễn Thanh Tâm (VN).

(54) QUY TRÌNH CHIẾT HỖN HỢP PHENOLIC TỪ LÁ CÂY CHAY VÀ HỖN HỢP
PHENOLIC CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng
viêm từ lá cây chay (*Artocarpus tonkinensis* Cheval. ex Gagnep.) và hỗn hợp phenolic thu
được từ quy trình này. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép chiết được đồng thời bảy
hoạt chất có hoạt tính kháng viêm với hiệu suất cao thích hợp để phát triển nguồn dược liệu
từ lá cây chay để bào chế thuốc kháng viêm trên cơ sở ức chế chức năng tế bào Th17. Hỗn
hợp phenolic thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích kháng viêm thu được từ quy
trình theo giải pháp hữu ích thể hiện tác dụng kháng viêm hiệp đồng vượt trội.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến lĩnh vực hóa học các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp phenolic từ lá cây chay (*Artocarpus tonkinensis* Cheval. ex Gagnep.) và hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm thu được từ quy trình này để làm nguồn dược liệu phát triển thuốc với cơ chế tác dụng liên quan đến các bệnh tự miễn như viêm khớp dạng thấp.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đã có nhiều nghiên cứu, tìm kiếm các hoạt chất có tác dụng sinh học từ dược liệu để góp phần phát triển dược phẩm, đặc biệt là những dược phẩm có tác dụng ức chế miễn dịch nhằm điều trị bệnh tự miễn. Cây chay (*Artocarpus tonkinensis* Cheval. ex Gagnep.), thuộc họ Dâu tằm (Moraceae) được trồng phổ biến ở Việt Nam. Theo kinh nghiệm dân gian, lá cây chay dùng để chữa đau lưng và bệnh thấp khớp, vỏ và rễ có màu đỏ thường dùng để ăn trầu (Đỗ Tất Lợi 1991, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nxb Khoa học kỹ thuật, p.597). Trong chiến tranh, lá chay đã được dùng để điều trị các bệnh tự miễn như nhược cơ, luput ban đỏ. Dịch chiết tổng từ lá cây chay đã được thử nghiệm sử dụng trong điều trị bệnh nhược cơ và làm chất chống thải ghép cho các ca cấy ghép da trên chuột thực nghiệm (Ha N.T.V, Anh P.T, Chinh T.T, Phi P.T.P, Lam P.C (1994), “Anapathological changes in spleen, thymus and bone-marrow of mice treated by products of traditional medicine plant (DY1)”, *Revue Pharmaceutique*, 2, pp.51-55).

Dịch chiết lá cây chay cho thấy có tác dụng ức chế miễn dịch và đã có nhiều nghiên cứu cho thấy chúng thuộc về các nhóm phenolic trong đó có các hợp chất thuộc auronol và flavonoit (Immunosuppressive auronol glycosides from *Artocarpus tonkinensis*, *Die Pharmazie*, 59, 297-300, 2004). Bằng độc quyền giải pháp hữu ích số VN 1183 đã mô tả quy trình chiết các hợp chất auronol glucosit có hoạt tính sinh học từ lá cây chay. Theo đó, giải pháp hữu ích đã công bố quy trình chiết hai hợp chất auronol glucosit là maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosit và alphononin 4-*O*- β -D-

glucopyranosit có hoạt tính sinh học chống viêm với hiệu suất 0,67% với độ tinh sạch khoảng 97 % theo HPLC.

Đi sâu nghiên cứu thành phần hóa học cho thấy thành phần hóa học chủ yếu từ lá chay đều thuộc nhóm chất phenolic và dẫn xuất glycosit của chúng. Mỗi hợp chất có hoạt tính kháng viêm ở mức độ khác nhau (Thuy T. T., Kamperdick C., Ninh P. T., Lien T. P., Thao T. T. P., Sung T. V. (2004), Immunosuppressive auronol glycosides from *Artocarpus tonkinensis*, Die Pharmazie 59, 297-300). Trong đó, chất chính maesopsin 4-O- β -D-glucosit có tác dụng kìm hãm tăng sinh tế bào ung thư tủy xương cấp (OCI-AML) *in vitro* và kìm hãm khối u *in vivo* cao nhất (Pozzese N, Pierangeli S, Vacca C, Falchi L, Pettorossi V, Martelli M P, Thuy TT, Ninh PT, Liberati A.M, Riccardi C, Sung TV, Delfino DV (2011), Maesopsin 4-O- β -D-glucoside, a natural compound isolated from the leaves of *Artocarpus tonkinensis*, inhibits the growth of acute myeloid leukemia cells: a gene expression profile study", Journal of Chemotherapy 23 (3), 150-157; Trinh Thi Thuy, Dao Duc Thien, Tran Quang Hung, Nguyen Thanh Tam, Nguyen Thi Hoang Anh, Nguyen Thi Nga, Le Phuong Mai, Tran VanSung, Domenico V. Delfino, Do Thi Thao, *In vivo* anticancer activity of maesopsin 4-O- β -glucoside isolated from the leaves of *Artocarpus tonkinensis* A. Chev. ex Gagnep. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 9(4), 351-356, 2016).

Theo thống kê gần đây 70-80% bệnh nhân nhiễm virus corona chủng mới (SARS-CoV-2) không ho, sốt, khó thở, nhưng bị tổn thương phổi nặng. Theo Dimitra Kelepouri và cộng sự các hợp chất phenolic có vai trò quan trọng sự phát triển của tế bào Th17 (Dimitra Kelepouri, Athanasios Mavropoulos, Dimitrios P. Bogdanos, Lazaros I. Sakkas. The role of flavonoids in inhibiting Th17 responses in inflammatory arthritis. Journal of Immunology Research, 2018, vol. 2018). Đã có một số thử nghiệm cho thấy rằng nước sắc từ lá cây chay có tác dụng bảo vệ và chống lại viêm khớp ở chuột bị gây viêm bởi collagen và làm giảm chức năng tế bào Th17. Theo đó, chuột bị viêm khớp do collagen được điều trị bằng hỗn hợp các hợp chất phenolic từ lá chay (ký hiệu ATP) giảm đáng kể chứng phù khớp và thâm nhiễm viêm, hơn nữa ngăn ngừa tổn thương sụn. Hồ sơ biểu hiện gen cho thấy chemokin CCL20 và cytokin liên quan đến tế bào Th17, IL-6, IL-17 và IL-22 bị giảm mạnh khi thử với ATP. Bằng kỹ thuật real-time PCR đã xác nhận biểu hiện IL-2, IL-17, IL-22 và FasL yếu đi trong các tế bào bạch huyết. ATP cũng ức chế sự phân cực của các tế bào Th17 *in vitro* từ các

tế bào lách CD4 T (Sabrina Adorisio, Alessandra Fierabracci, Isabella Muscari, Anna Marina Liberati, Mario Calvitti, Lina Cossignani, Francesca Blasi, Tran Duc Quan, Nguyen Thanh Tam, Tran Van Sung, Carlo Riccardi, Trinh Thi Thuy, Domenico Delfino. *Artocarpus tonkinensis* protects mice against collagen-induced arthritis and decreases Th17 cell function, *Frontiers in Pharmacology* 10, 503, 2019). Cơ chế tác dụng của ATP rất giống với thuốc Tocilizumab, một kháng thể đơn dòng chống thụ thể IL-6, được sản xuất bởi công ty dược phẩm Roche của Thụy Sĩ, đã được chấp thuận ở Trung Quốc để điều trị cho bệnh nhân mắc virus corona và nay đang được thử nghiệm lâm sàng (pha III) để điều trị biến chứng ở bệnh nhân COVID-19 tại Italia và một số nước khác (Heidi Ledford *Nature* 2020, doi: 10.1038/d41586-020-01056-7). Bằng chứng cho thấy hội chứng hô hấp làm tăng sự sản xuất các cytokin trong máu (còn gọi là bão cytokin). Cytokin bao gồm một protein mạnh gọi là interleukin-6 (IL-6), gây viêm và có thể làm hỏng các tế bào phổi. Cơ chế tác dụng được giải thích là việc ức chế IL-6 có tác dụng điều trị trong nhiều bệnh viêm nhiễm, bao gồm các căn bệnh lây nhiễm do virus.

Các phương pháp phân lập đã biết chủ yếu tập trung vào thành phần auronol là maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosit và alphononin 4-*O*- β -D-glucopyranosit, là hai thành phần có hoạt tính sinh học và mặc dù theo VN 1183, hiệu suất chiết hai hợp chất này lên tới 0,67%, nhưng việc sử dụng dung môi etanol 90% để chiết với thời gian chiết dài, 12 giờ và việc loại tạp chất bằng *n*-hexan được thực hiện lặp lại tới 4 lần, tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel mới thu được hoạt chất có độ tinh khiết 97% khiến chi phí cho quá trình sản xuất cao. Ngoài ra, hoạt tính của hợp chất tinh sạch thu được không được như mong muốn, khiến sản phẩm khó cạnh tranh được với sản phẩm tổng hợp. Hơn nữa, kết quả thử nghiệm khẳng định rằng thành phần maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosit tác động đến sự biểu hiện của các gen điều chỉnh kháng viêm không ổn định và đáng kể về mặt thống kê và hiệu quả thử tác dụng lâm sàng trên *in vivo* của chất này trên mô hình CIA không đảm bảo.

Tuy nhiên, việc sử dụng hỗn hợp cao chiết của lá cây chay lại khó có thể được chấp nhận trong điều trị, nhất là trong y học hiện đại. Vì vậy, việc chiết riêng rẽ các hoạt chất chất này vừa cho hiệu suất thấp, vừa cho thấy mức độ kém ổn định của hoạt chất thu được, ngược lại việc sử dụng cao chiết toàn phần, có nhiều tạp chất, khó khăn trong việc phát triển dược phẩm tiêu chuẩn do hiệu quả không ổn định, nguy cơ gây

độc không kiểm soát được do lẫn nhiều tạp chất không mong muốn. Theo đó, nguồn nguyên liệu để phát triển được phẩm dựa trên các kỹ thuật đã biết là không hiệu quả và khó được chấp thuận để có thể phát triển thành được liệu ổn định để sản xuất thuốc chống viêm. Do đó, cần có một quy trình chiết một cách chọn lọc đồng thời các hoạt chất có khả năng kháng viêm từ lá cây chay *Artocarpus tonkinensis* Cheval. ex Gagnep. với hiệu suất khả thi đủ để phát triển thành được phẩm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Giải pháp hữu ích nhằm khắc phục các nhược điểm nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm từ lá cây chay *Artocarpus tonkinensis* Cheval. ex Gagnep. và hoạt tính kháng viêm của hỗn hợp phenolic thu được từ quy trình này. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép chiết một cách chọn lọc hỗn hợp phenolic có hoạt tính sinh học với hiệu suất và độ tinh sạch đủ để có thể phát triển được nguồn nguyên liệu cho ngành dược phẩm.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình chiết hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm từ lá cây chay *Artocarpus tonkinensis* Cheval. ex Gagnep., trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu gom lá cây chay, loại bỏ tạp chất và sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 50°C đến khô giòn, sau đó xay nhỏ qua cỡ sàng 5mm thu được bột lá cây chay có độ ẩm khoảng 10%;

b) chiết nguyên liệu bằng cách tiến hành chiết bột lá cây chay trong dung môi etanol nồng độ từ 10 đến 20% theo tỷ lệ bột lá chay:dung môi là 1:3 (khối lượng/thể tích) trong khoảng từ 5 đến 7 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C, rút lấy dịch chiết, cô loại dung môi trong điều kiện áp suất giảm nằm trong khoảng từ 6500 đến 8000 Pa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C đến khi còn 1/3 thể tích, thu được dịch chiết dạng lỏng;

c) chiết phân bố bằng *n*-hexan bằng cách bổ sung *n*-hexan vào dịch chiết theo tỷ lệ dịch chiết:*n*-hexan là 3:1 (thể tích/thể tích) và khuấy đều trong 10 phút để loại các chất tan trong *n*-hexan, lặp lại quá trình chiết này 2 lần, thu phân đoạn nước;

d) tinh chế sơ bộ hỗn hợp phenolic bằng cách đưa phân đoạn nước sau khi chiết phân bố bằng *n*-hexan qua cột trao đổi ion với dung dịch rửa giải lần lượt là nước,

nước/metanol tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích) và metanol 100% để thu phân đoạn nước/metanol tỷ lệ 1:1, sau khi loại bỏ dung môi, thu được phân bột mịn màu nâu; và

e) thu hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm bằng cách chuyển phân bột thu được lên cột gel Sephadex LH-20 với dung môi rửa là etanol, phân dịch sau khi lọc được cô loại dung môi dưới áp suất giảm, thu được hỗn hợp phenolic màu vàng nâu, mùi thơm.

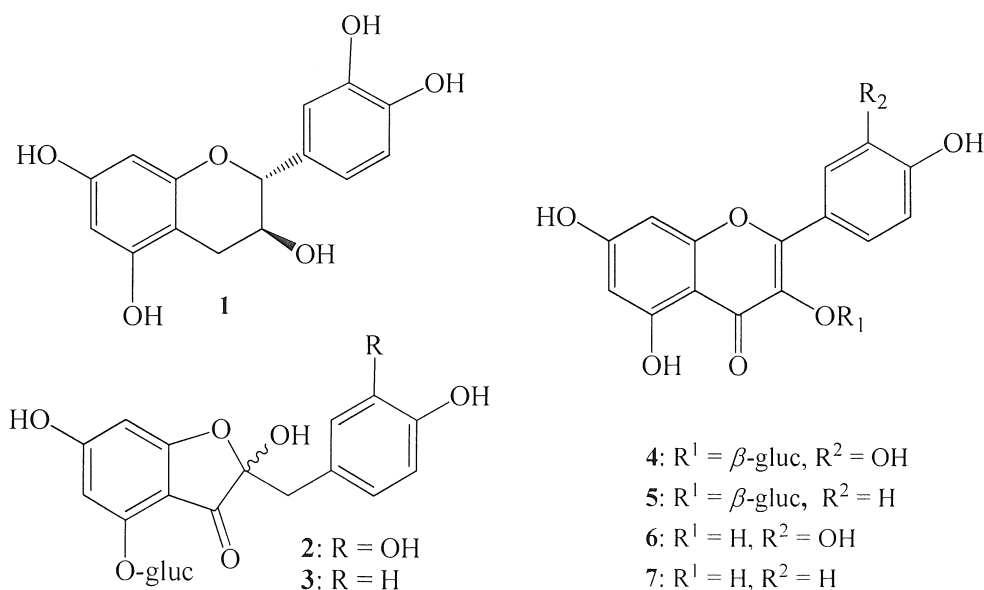
Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết nguyên liệu còn được thực hiện trong điều kiện chiết siêu âm với tần số từ 30 kHz đến 50 kHz.

Theo một phương án ưu tiên, điều kiện ưu tiên để chiết nguyên liệu là dung môi etanol có nồng độ 20% và nhiệt độ chiết là 80°C trong thời gian 6 giờ.

Theo một phương án ưu tiên, điều kiện ưu tiên để chiết nguyên liệu là dung môi etanol có nồng độ 15% và nhiệt độ chiết là 85°C trong thời gian 6 giờ.

Theo một phương án ưu tiên, điều kiện ưu tiên để chiết nguyên liệu là dung môi etanol có nồng độ 10% và nhiệt độ chiết là 90°C trong thời gian 6 giờ.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó hỗn hợp này bao gồm catechin (1), alphitonin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (2), maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (3), quercetin 3-*O*-glucopyranosit (4), kaempferol 3-*O*-glucopyranosit (5), quercetin (6) và kaempferol (7) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm catechin (1) từ 115 đến 155

$\mu\text{g/g}$, alphononin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (2) từ 360 đến 380 $\mu\text{g/g}$, maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (3) từ 305 đến 330 $\mu\text{g/g}$, quercetin 3-*O*-glucopyranosit (4) từ 20 đến 30 $\mu\text{g/g}$, kaempferol 3-*O*-glucopyranosit (5) từ 100 đến 115 $\mu\text{g/g}$, quercetin (6) từ 10 đến 15 $\mu\text{g/g}$ và kaempferol (7) từ 7 đến 10 $\mu\text{g/g}$.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả sắc ký đồ HPLC kiểm tra hàm lượng của bảy hoạt chất trong hỗn hợp phenolic thu được theo quy trình của giải pháp hữu ích.

Hình 2 là biểu đồ mô tả tác dụng của hỗn hợp thử nghiệm trên khớp. (A) Điểm viêm khớp (trục y, đường thẳng); (B) Điểm viêm khớp (trục y, thanh).

Hình 3 là ảnh chụp kết quả đánh giá mô học của mô khớp từ chuột đại diện trong mỗi nhóm thử. ĐC1: nhóm đối chứng âm, chuột bình thường; ĐC2: nhóm đối chứng dương, chuột bị gây viêm khớp bằng collagen, TN (ngày 1) nhóm chuột được sử dụng hỗn hợp theo sáng chế ngay từ ngày đầu gây viêm, TN (ngày 43) nhóm chuột được sử dụng hỗn hợp theo sáng chế từ ngày 43 sau khi gây viêm.

Hình 4 là biểu đồ mô tả hồ sơ biểu hiện điều hòa gen tự miễn. Các gen liên quan đến phản ứng tự miễn dịch tăng hoặc giảm đáng kể theo tác dụng của hỗn hợp thử nghiệm.

Hình 5 là biểu đồ mô tả kỹ thuật PCR của các đích liên quan đến tự miễn dịch gen từ hạch bạch huyết chuột với các gen IL-17a, IL-22, IL-2 và FasL, tương ứng.

Hình 6 là biểu đồ mô tả kỹ thuật PCR của các gen đích. (A) là biểu đồ mô tả thời gian thực PCR của tế bào IL-17, IL-22 và IL-6 ở lách chuột, hạch bạch huyết và tế bào khớp. (B) là biểu đồ mô tả biểu hiện của RORC (trái) hoặc IL-17 (phải) được đo bằng kỹ thuật PCR.

Hình 7 là biểu đồ mô tả tác dụng của hợp chất thử nghiệm và maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosit tinh sạch (TAT-2) đối với tế bào lympho T CD4C phân lập từ chuột. (A) Số lượng tế bào lympho T CD4C chuột không được điều trị (ĐC), các tế bào phân cực Th17 (Th17) và các phân cực Th17 được xử lý bằng hợp chất thử nghiệm (Th17-TN). (B) Biểu hiện của IL-17 (trái) hoặc RORC (phải) trong các nhóm này được đo bằng kỹ thuật realtime-PCR. (C) Biểu hiện của IL-17 (trái) hoặc RORC (phải) trong nhóm thử nghiệm với hợp chất TAT-2 tinh sạch với các nồng độ khác nhau được đo bằng realtime-PCR.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án và các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm từ lá cây chay *Artocarpus tonkinensis* Cheval. ex Gagnep. và hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm thu được từ quy trình này.

Lá cây chay là phần lá thu được từ cây chay có tên khoa học là *Artocarpus tonkinensis* A. Chev. ex Gagnep., đây là một loài thực vật thuộc họ Dâu tằm (Moraceae). Cây chay một loại cây gỗ, cao khoảng từ 15 đến 20m, mọc hoang hoặc được trồng nhiều ở miền Bắc Việt Nam. Lá cây chay được thu hái quanh năm, phơi hoặc sấy khô. Nước sắc từ lá cây chay từ lâu đã được sử dụng như một phương thuốc truyền thống của dân tộc H'mông để điều trị viêm khớp dạng thấp. Nguyên liệu được sử dụng làm nguyên liệu chiết hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm từ lá cây chay là lá tươi thu hái được từ cây chay.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình chiết hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm từ lá cây chay *Artocarpus tonkinensis* Cheval. ex Gagnep., trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết nguyên liệu; c) chiết phân bố bằng *n*-hexan; d) tinh chế sơ bộ hỗn hợp phenolic; và e) thu hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, lá cây chay *Artocarpus tonkinensis* Cheval. ex Gagnep. được thu hái, loại bỏ tạp chất. Sau khi sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 50°C đến khô giòn, lá được xay nhỏ qua cỡ sàng 5mm, thu được bột lá cây chay có độ ẩm khoảng 10%.

Bước chuẩn bị nguyên liệu cho phép thu được bột lá cây chay có chất lượng đảm bảo. Lưu ý rằng, quá trình sơ chế nguyên liệu được thực hiện ngay khi lá chay còn tươi, mới được thu hái để thu được bột lá có chất lượng, tránh sử dụng lá chay đã bị lên men do không được sấy ngay sau khi được thu hái, ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi hỗn hợp phenolic do hoạt chất bị biến tính bởi quá trình lên men. Bột lá cây chay sau khi sơ chế có màu vàng nhạt, mùi thơm nhẹ.

Trong bước chiết nguyên liệu, đã có nhiều tác giả sử dụng các hệ dung môi như etanol, metanol và nước để chiết các hoạt chất có trong nguyên liệu thực vật. Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi các hoạt chất khi sử dụng hệ dung môi, ví dụ metanol nồng độ 70% hoặc 90%, hiệu suất thu hồi hoạt chất mong muốn lại thấp. Các tác giả bằng thực nghiệm đã phát hiện ra, đối với lá cây chay, khi sử dụng hệ dung môi metanol nồng độ 70%, do cấu trúc lá dày và xốp, ngoài những hoạt chất phenolic, chúng còn chiết đồng thời nhiều tạp chất không mong muốn khác. Điều này ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình tinh chế về sau. Ngược lại, nếu sử dụng hệ dung môi metanol 90% với nhiệt độ chiết cao, khoảng 65-70°C, thì hiệu suất thu hồi các hoạt chất không những giảm mà còn ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của hợp chất mong muốn thu được.

Do đó, các tác giả đã nghiên cứu và phát hiện rằng, để chiết đặc hiệu các hoạt chất phenolic có hoạt tính sinh học từ lá cây chay, bột lá cây chay cần được chiết trong dung môi etanol nồng độ thấp, chỉ từ 10 đến 20% và trong khoảng thời gian ngắn, không quá 7 giờ với nhiệt độ không quá 90°C để thu được hỗn hợp phenolic có hoạt tính sinh học. Tốt hơn là được chiết trong điều kiện siêu âm. Theo đó, bột lá cây chay được chiết trong dung môi etanol nồng độ từ 10 đến 20% theo tỷ lệ bột lá chay:dung môi là 1:3 (khối lượng/thể tích) trong khoảng từ 5 đến 7 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước chiết nguyên liệu còn được thực hiện trong điều kiện chiết siêu âm với tần số từ 30 kHz đến 50 kHz. Tốt hơn là được thực hiện trong điều kiện chiết siêu âm với tần số 50Hz.

Theo một phương án ưu tiên, điều kiện ưu tiên để chiết nguyên liệu là dung môi etanol có nồng độ 20% và nhiệt độ chiết là 80°C trong thời gian 6 giờ. Tốt hơn là được thực hiện trong điều kiện chiết siêu âm với tần số 30-50Hz.

Theo một phương án ưu tiên, điều kiện ưu tiên để chiết nguyên liệu là dung môi etanol có nồng độ 15% và nhiệt độ chiết là 85°C trong thời gian 6 giờ. Tốt hơn là được thực hiện trong điều kiện chiết siêu âm với tần số 30-50Hz.

Theo một phương án ưu tiên, điều kiện ưu tiên để chiết nguyên liệu là dung môi etanol có nồng độ 10% và nhiệt độ chiết là 90°C trong thời gian 6 giờ. Tốt hơn là được thực hiện trong điều kiện chiết siêu âm với tần số 30-50Hz.

Sau khi chiết, tiến hành lọc bỏ phần bã, cô loại dung môi trong điều kiện áp suất nằm trong khoảng từ 6500 đến 8000 Pa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C đến khi còn 1/3 thể tích, thu được dịch chiết dạng lỏng. Việc khống chế nhiệt độ, thời gian và nồng độ dung môi trong bước chiết cho phép chiết chọn lọc được thành phần hoạt chất mong muốn, giảm thiểu được các hoạt chất không mong muốn, có lợi cho các bước tinh chế về sau.

Trong bước chiết phân bố bằng *n*-hexan, tiến hành bổ sung *n*-hexan vào dịch chiết theo tỷ lệ dịch chiết:*n*-hexan là 3:1 (thể tích/thể tích) và khuấy đều trong 10 phút. Quá trình này nhằm loại các chất tan trong *n*-hexan. Quá trình này được lặp lại 2 lần, thu phân đoạn nước.

Kỹ thuật chiết phân đoạn nước: *n*-hexan là đã được sử dụng rộng rãi và về bản chất nhằm tách riêng rẽ các hợp chất tan trong hệ dung môi phân cực và hệ dung môi không phân cực. Thông thường, việc chiết phải thực hiện nhiều lần để có thể thu được các nhóm hợp chất có cùng bản chất. Tuy nhiên, bằng cách đưa ra điều kiện chiết chọn lọc ở bước trên, trong bước này, lượng *n*-hexan sử dụng được giảm thiểu, đồng thời giảm được số lần chiết phân đoạn. Điều này có lợi cho quá trình sản xuất do giảm được lượng hóa chất sử dụng, thời gian trong quá trình tinh chế, tăng hiệu quả của quy trình chiết. Theo cách khác, việc chiết phân đoạn cho phép thu được nhóm hợp chất phenolic tan trong nước, đồng thời loại được nhóm các tạp chất tan trong *n*-hexan một cách đơn giản, hiệu quả tạo tiền đề cho các bước tinh sạch tiếp theo.

Trong bước tinh chế sơ bộ hỗn hợp phenolic, tiến hành đưa phân đoạn nước sau khi đã được chiết phân bố bằng *n*-hexan qua cột trao đổi ion. Tiến hành rửa giải lần lượt với các hệ dung dịch rửa giải là nước, nước/metanol tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích) và metanol 100%. Tiến hành thu phân đoạn nước/metanol tỷ lệ 1:1. Phân đoạn này sau khi loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm, thu được phần bột mịn màu nâu.

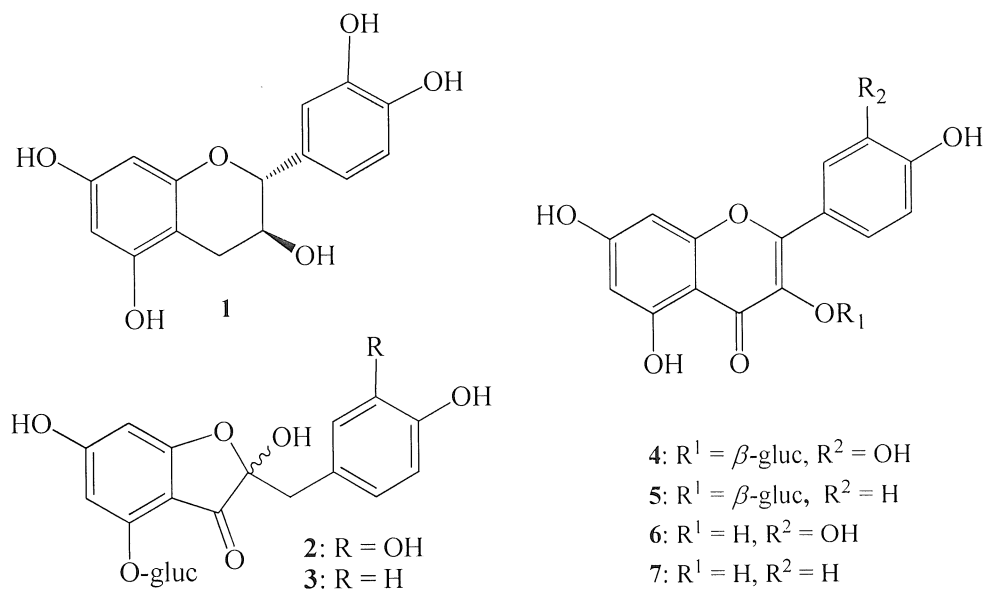
Theo một phương án cụ thể, dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất nằm trong khoảng từ 6500 đến 8000 Pa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C để thu được phần bột mịn.

Trong bước thu hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm, tiến hành chuyển phần bột thu được lên cột gel Sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là etanol. Cột gel Sephadex LH-20 cho phép lọc thu các hợp chất phenolic có khối lượng phân tử mong

muối. Sau khi lọc, thu phần dịch và cô loại dung môi dưới áp suất giảm, thu được hỗn hợp phenolic màu vàng nâu, mùi thơm bao gồm catechin (1) từ 115 đến 155 $\mu\text{g/g}$, alphitinin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (2) từ 360 đến 380 $\mu\text{g/g}$, maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (3) từ 305 đến 330 $\mu\text{g/g}$, quercetin 3-*O*-glucopyranosit (4) từ 20 đến 30 $\mu\text{g/g}$, kaempferol 3-*O*-glucopyranosit (5) từ 100 đến 115 $\mu\text{g/g}$, quercetin (6) từ 10 đến 15 $\mu\text{g/g}$ và kaempferol (7) từ 7 đến 10 $\mu\text{g/g}$.

Theo một phương án cụ thể, dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất nằm trong khoảng từ 6500 đến 8000 Pa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C để thu được hỗn hợp phenolic dạng bột mịn.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó hỗn hợp này bao gồm catechin (1), alphitinin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (2), maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (3), quercetin 3-*O*-glucopyranosit (4), kaempferol 3-*O*-glucopyranosit (5), quercetin (6) và kaempferol (7) sau:



Theo một phương án ưu tiên, trong đó hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm catechin (1) từ 115 đến 155 $\mu\text{g/g}$, alphitinin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (2) từ 360 đến 380 $\mu\text{g/g}$, maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (3) từ 305 đến 330 $\mu\text{g/g}$, quercetin 3-*O*-glucopyranosit (4) từ 20 đến 30 $\mu\text{g/g}$, kaempferol 3-*O*-glucopyranosit (5) từ 100 đến 115 $\mu\text{g/g}$, quercetin (6) từ 10 đến 15 $\mu\text{g/g}$ và kaempferol (7) từ 7 đến 10 $\mu\text{g/g}$.

Hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích thích hợp để làm nguồn dược liệu phát triển thuốc với cơ chế tác dụng liên quan đến các bệnh tự miễn như viêm khớp dạng thấp.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Chiết hỗn hợp phenolic từ lá cây chay *Artocarpus tonkinensis* Cheval. ex Gagnep.

Lá cây chay *Artocarpus tonkinensis* Cheval. ex Gagnep. được thu hái, loại bỏ tạp chất và sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ khoảng 50°C đến khô giòn. Sau khi xay nhỏ qua cỡ sàng 5mm thu được bột lá cây chay có độ ẩm khoảng 10%.

Tiến hành thử nghiệm với 3 lần, mỗi lần 500 gam bột lá khô. TN1 thực hiện trong điều kiện cho 500 g bột lá khô vào bình chiết chứa 1500ml etanol 10%. Sau khi siêu âm 30 phút với tần số 40Hz, chiết trong 6 giờ ở nhiệt độ 90°C. TN2 thực hiện chiết trong điều kiện cho 500 g bột lá khô vào bình chiết chứa 1500ml etanol 15%. Sau khi siêu âm 30 phút với tần số 40Hz, chiết trong 6 giờ ở nhiệt độ 85°C. TN3 thực hiện chiết trong điều kiện cho 500 g bột lá khô vào bình chiết chứa 1500ml etanol 20%. Sau khi siêu âm 30 phút với tần số 40Hz, chiết trong 6 giờ ở nhiệt độ 80°C. Sau khi loại bỏ phần bã, thu phần dịch chiết của mỗi thử nghiệm và cô loại dung môi trong điều kiện áp suất 6700 Pa trên máy quay chân không, nhiệt độ 80°C cho đến khi còn khoảng 500ml dịch chiết dạng lỏng sánh.

Phần dịch chiết dạng lỏng của TN1 được chiết phân bố lặp lại hai lần với mỗi lần khoảng 150ml dung môi *n*-hexan để loại tạp chất, thu được dịch chiết nước không tan trong *n*-hexan. Phần đoạn nước được đưa qua cột trao đổi ion với dung dịch rửa giải lần lượt là nước, phức hợp nước:metanol (1:1, v/v) và cuối cùng là metanol, thu phần đoạn nước-MeOH, tương ứng. Tiếp đó, sau khi cô loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất 6700 Pa trên máy quay chân không, nhiệt độ 80°C thu được 7,5g bột mịn. Phần bột này tiếp tục được nhồi lên cột gel Sephadex LH-20 với dung môi etanol, thu phần dịch sau khi lọc. Sau khi sấy khô, thu được 6,8g chất bột màu vàng nâu, mùi thơm, tan tốt trong metanol, etanol, nước, DMSO, ít tan trong *n*-hexan và dichlometan. Hiệu suất chiết đạt 1,36% so với nguyên liệu khô, độ tinh khiết trên 96% (xác định bằng phương pháp HPLC). TN2 và TN3 cho kết quả chiết tương đương 6,6g (1,32%) và 6,75g (1,35%).

Ví dụ 2. Xác định thành phần và hàm lượng của hỗn hợp phenolic thu được theo giải pháp hữu ích

Để xác định được chính xác thành phần và cấu trúc của các thành phần hóa học chính của ba hỗn hợp thu được từ ba lần chiết theo Ví dụ 1, tiến hành nhồi 1000 mg hỗn hợp thu được từ Ví dụ 1 lên cột silica gel, với hệ dung môi rửa giải là dichlometan/metanol/nước với tỷ lệ 40/10/1, thu được bảy phân đoạn như nêu trên Hình 1, và tách từng phân đoạn này thu được 7 hoạt chất chính tương ứng. Cấu trúc của các chất này được xác định bằng phương pháp phổ khối (LC-MS) (bảng 1) 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.

Hệ thiết bị HPLC của Hệ thống Spectra (Thermo Separation, San Jose, CA, United States, Hoa Kỳ), được trang bị môđun bơm bậc bốn (P4000), bộ khử khí trực tuyến và đầu dò điốt (DAD) SpectroSystem UV 6000lp (Thermo Separation). Các phân tích được phân tách bằng cột ODS Agilent Zorbax pha đảo (kích thước hạt 5 μm , 3,0 $\times$ 150 mm; Agilent Technologies, Milan, Italia), được nhồi trong cột RP18 (20 $\times$ 4,6 mm). Rửa giải gradient với tốc độ dòng 1 ml/phút. Pha động: (A) nước chứa 0,1% axit formic và (B) acetonitril chứa axit formic 0,1%. Thành phần pha động ban đầu là 95% (A). Tỷ lệ phần trăm của (B) được tăng tuyến tính lên 20% sau 30 phút và lên 55% sau 50 phút. Cuối cùng, tỷ lệ phần trăm của B đã giảm xuống còn 5% và cột được cân bằng lại với các điều kiện ban đầu trong 7 phút. Thể tích tiêm là 20 μL . Phát hiện bằng DAD trong khoảng từ 200 đến 700nm. Sắc ký đồ đã được thu thập và dữ liệu được xử lý bằng phần mềm Xcalibur phiên bản 1.2 (Finnigan Corporation 1998-2000, San Jose, CA, Hoa Kỳ). Kết quả của TN1 được thể hiện trên Hình 1. Thành phần của hỗn hợp phenolic thu được từ lá cây chay theo quy trình chiết theo giải pháp hữu ích được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần của hỗn hợp phenolic thu được từ lá cây chay

TT	m/z	Chất	Hàm lượng mg/g		
			TN1	TN2	TN3
1	325,0 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$	Catechin	117,5	147,2	150,5
2	465,0 $[\text{M}-\text{H}]^-$	Alphitoinin 4- <i>O</i> - β -D-glucopyranosit	376,0	365,8	361,1

TT	<i>m/z</i>	Chất	Hàm lượng mg/g		
			TN1	TN2	TN3
3	449,0 [M-H] ⁻	Maesopsin 4- <i>O</i> - β -D-glucopyranosit	328,8	306,1	309,7
4	453,0 [M-H] ⁻	Quercetin 3- <i>O</i> - β -D-glucosit	22,4	25,3	20,2
5	447,0 [M-H] ⁻	Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-glucosit	106,9	110,6	110,8
6	301,0 [M-H] ⁻	Quercetin	10,8	12,2	12,0
7	285,0 [M-H] ⁻	Kaempferol	7,7	8,5	9,0

Ví dụ 2. Thử nghiệm độc tính cấp và độc tính bán trường diễn

Chế phẩm thử nghiệm:

Chế phẩm thử nghiệm là hỗn hợp bột chiết thu được theo TN2 của Ví dụ 1 (ATP). Liều thử nghiệm được áp dụng cho thỏ với lượng từ 240 mg/kg đến 3600mg/kg thể trọng theo từng lô thử nghiệm.

Động vật thử nghiệm:

Động vật được dùng để đánh giá là thỏ trắng Newzeland, chia ngẫu nhiên thành các lô, không phân biệt giống, đạt tiêu chuẩn thử nghiệm, cân nặng mỗi con tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm là 2,2-2,5 kg, mỗi con nhốt riêng một chuồng

Động vật thử nghiệm được ăn thức ăn theo tiêu chuẩn thức ăn cho thỏ, nước sạch đun sôi để nguội uống 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)

Trước khi tiến hành thử nghiệm, cho thỏ nhịn ăn qua đêm. Thỏ được chia ngẫu nhiên thành các lô khác nhau (06 lô), mỗi lô 5 con.

Bột chiết thu được theo TN2 của Ví dụ 1 (ATP) được pha trong dung môi là nước cất với nồng độ khác nhau để có thể tích cho mỗi lần uống 0,2 mL/10g thỏ, 3 lần trong 24 giờ, mỗi lần cách nhau ít nhất 2 giờ. Cho thỏ uống thuốc thử với liều tăng dần. Tìm liều cao nhất không gây chết thỏ (0 %), liều thấp nhất gây chết thỏ hoàn toàn (100 %) và các liều trung gian.

Theo dõi tình trạng chung của thỏ, quá trình diễn biến bắt đầu có dấu hiệu nhiễm độc (như nôn, co giật, kích động, v/v.) và số lượng thỏ chết ở mỗi lô trong vòng 72 giờ sau khi cho thỏ 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 thỏ (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 thỏ chết (nếu có) để xác định nguyên nhân gây độc. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: Độc tính cấp theo đường uống của hỗn hợp trên thỏ

Lô chuột	Số thỏ thử nghiệm	Liều sử dụng (tỷ lệ bột/nước)	Thể tích cho uống	Số thỏ sống/chết sau 72 giờ
Lô 1	10	24,0(bột 0,4:1)	0,2 mL/10g x 3 lần	5/0
Lô 2	10	48,0 (bột 0,8:1)	0,2 mL/10g x 3 lần	5/0
Lô 3	10	72,0 (bột 1,2:1)	0,2 mL/10g x 3 lần	5/0
Lô 4	10	96,0 (bột 1,6:1)	0,2 mL/10g x 3 lần	5/0
Lô 5	10	120,0 (bột 2:1)	0,2 mL/10g x 3 lần	5/0
Lô 6	10	360,0 (bột 6:1)	0,2 mL/10g x 3 lần	5/0

Kết quả cho thấy ngay cả với liều cao nhất là 3600mg/kg thể trọng mà không thấy xuất hiện bất kỳ triệu chứng bất thường trong 72 giờ sau uống thuốc và trong suốt 7 ngày sau uống thuốc. Điều này chứng tỏ hỗn hợp bột chiết an toàn khi đánh giá độc tính cấp theo đường uống, khoảng an toàn của bột chiết rộng.

Kết luận: Chưa tìm thấy LD₅₀ của hỗn hợp bột thử nghiệm theo đường uống trên thỏ. Với mức liều cao nhất cho thỏ uống trong 24 giờ là 3600mg/kg thể trọng, gấp 75 lần liều dự kiến có tác dụng, không xuất hiện độc tính cấp.

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn:

Để đánh giá độc tính bán trường diễn, thử nghiệm được tiến hành với 30 con thỏ trắng Newzeland, được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 con, mỗi con nhốt riêng một chuồng. Thử nghiệm được tiến hành trong 8 tuần.

- ĐC: uống nước lọc 3 ml/kg/ngày vào buổi sáng.
- TN1: uống ATP với lượng 0,6g/kg/ngày (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người, tính theo hệ số 3) vào buổi sáng.
- TN2: uống ATP với lượng 1,8g /kg/ngày (gấp 3 lần lô trị 1) vào buổi sáng.

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 trước lúc uống mẫu thử, sau 4 tuần và sau 8 tuần uống mẫu thử.

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 3: Ảnh hưởng của chế phẩm 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	1,90 $\pm 0,16$		1,88 $\pm 0,17$		1,84 $\pm 0,12$		$> 0,05$
Sau 4 tuần uống thuốc	2,31 $\pm 0,14$	22,17 $\pm 10,63$	2,34 $\pm 0,22$	24,90 $\pm 7,08$	2,28 $\pm 0,17$	24,41 $\pm 8,50$	$> 0,05$
p (trước - sau)	$< 0,05$		$< 0,05$		$< 0,05$		
Sau 8 tuần uống thuốc	2,51 $\pm 0,12$	37,19 $\pm 7,08$	2,59 $\pm 0,23$	38,25 $\pm 5,82$	2,54 $\pm 0,16$	38,70 $\pm 9,18$	$> 0,05$
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.

Kết luận: Không thấy có độc tính bán trường diễn ảnh hưởng đến thỏ 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 thỏ. 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 chế phẩm thử nghiệm an toàn với thỏ thử nghiệm.

Ví dụ 3. Thử nghiệm hoạt tính kháng viêm

Viêm khớp dạng thấp (RA) là một bệnh tự miễn đặc trưng bởi sự hủy hoại xương và khớp liên quan trực tiếp đến những thay đổi trong cấu trúc khớp. Sự phá hủy các khớp xương xảy ra liên quan đến nguyên bào xương mà được biệt hóa từ bạch cầu đơn nhân chịu ảnh hưởng của chất kích hoạt thụ thể nhân tố phối hợp Kappa-B (RANKL). Các tế bào Helper T xâm nhập vào các khớp đóng vai trò then chốt trong quá trình này, và các tế bào Th17 đặc biệt đã được tìm thấy trong mô hoạt dịch của bệnh nhân RA.

Interleukin IL-17 gây ra biểu hiện RANKL và kích thích hủy xương tiến triển và rất quan trọng đối với bệnh sinh RA ở người và trong các mô hình động vật thí nghiệm với viêm khớp do collagen (CIA). Sau khi khám phá tế bào Th17, cơ chế cảm ứng phụ thuộc RANKL của các nguyên bào xương thông qua các tế bào Th17 trong RA đã rất rõ ràng.

Cả RA và CIA đều đặc trưng bởi viêm khớp mãn tính qua yếu tố trung gian IL-22 được sản xuất bởi Th17, kích thích các nguyên bào sợi hoạt dịch gây ra sự tăng sinh tế bào và bài tiết các cytokin gây viêm khởi đầu của quá trình tạo xương. Hơn nữa, IL-6 được sản xuất bởi nguyên bào sợi đáp ứng với IL-17 có nguồn gốc từ tế bào đại thực

bào gây viêm và kích thích mô hoạt dịch một cách tự động, do đó IL-17 duy trì chu kỳ viêm thông qua hoạt động của cytokin.

Để thử nghiệm hoạt tính kháng viêm của hỗn hợp bột chiết thu được từ Ví dụ 1, tiến hành thử nghiệm trên mô hình động vật là chuột bị gây viêm khớp bởi collagen (CIA).

Chuột cái DBA/1J, từ 8 đến 12 tuần tuổi được cung cấp bởi hãng Biogem SCARL (Ariano Irpino, Italia). Chuột C57BL/6 và chuột DBA/1J cái bổ sung được cung cấp bởi Charles River (Wilmington, MA, Hoa Kỳ) và được đặt trong cơ sở nuôi động vật của Đại học Perugia, Italia. Mô hình động vật bị viêm khớp (CIA) được tạo ra bằng cách tiêm chủng qua da với mỗi con chuột thử nghiệm với collagen II (collagen được cung cấp bởi Sigma, C9301-5MG, Lô # 016M4158V; St. Louis, MO, Hoa Kỳ) được nhũ hóa hoàn toàn trong tá dược Freund (Sigma, F5881-10ML vào ngày 1 với lượng 50 μ L/con chuột và collagen được nhũ hóa hoàn toàn trong tá dược Freund không hoàn chỉnh (Sigma, F5506-10ML, Lô # SLBL9742V), vào ngày 31 với lượng 50 μ L/con chuột để gây viêm khớp.

Nhóm thử nghiệm (TN) bao gồm 15 con chuột (mỗi nhóm 5 con chuột), nhóm đối chứng âm (ĐC1) là chuột khỏe mạnh, không được gây viêm khớp. Nhóm đối chứng dương (ĐC2) là nhóm chuột được gây viêm khớp, nhưng không được điều trị. Nhóm chủng ngừa bao gồm 12 con chuột (4 con chuột/nhóm) đã được chủng ngừa và được sử dụng để lập hồ sơ biểu hiện gen với các nhóm ĐC và nhóm TN.

Hợp chất thử nghiệm (ATP) bao gồm hỗn hợp thu được từ TN2 của Ví dụ 1 được pha với nước cất với nồng độ 250 μ g/ml. Đối với nghiên cứu *in vitro*, hỗn hợp thu được từ Ví dụ 1 được pha trong nước cất vô trùng khử ion và lọc toàn bộ dịch bằng bộ lọc 0,22 μ m trước khi sử dụng. Chuột được uống với lượng 4ml/ngày cho nhóm thử nghiệm (TN).

Số liệu thu được đánh giá ý nghĩa thống kê bằng cách sử dụng phần mềm Mann-Whitney *U*-test hoặc Student's *t*-test. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê theo các tiêu chí sau: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Đánh giá mô học bằng cách gỡ khớp gối của chuột, cố định trong 10% (v/v) chính thức trong 24 giờ, được khử keo trong axit trichloroacetic 5% (v/v) trong 7 ngày,

khử nước, nhúng parafin, chia thành phần dày 3 đến 4 μm , và nhuộm bằng hematoxylin và eosin.

Đánh giá hồ sơ biểu hiện gen tự miễn bằng cách thực hiện phản ứng mản PCR phản ứng viêm Qiagen và phản ứng tự miễn RT2 Profiler PCR được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Valencia, CA, Hoa Kỳ). Cụ thể, việc chuyển đổi mARN thử nghiệm sang cADN chuỗi đầu tiên đã được thực hiện bằng kit phiên mã ngược Quantitect. RT-PCR được thực hiện bằng thiết bị ABI-7300 Real-Time Cyclor (AppliedBiosystems, Foster City, CA, United States) và khuếch đại bằng phân tích TaqMan (Mm00439618 đối với IL-17a, Mm04209823 đối với IL-22, Mm01261022 đối với RORC, Mm00438864 đối với FasL, và Mm00434256 đối với IL-2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Hoa Kỳ). Phương pháp $\Delta\Delta\text{Ct}$ được sử dụng để đánh giá mức biểu hiện của IL-17a, IL-22, IL-2, FasL và RORC.

+ Đánh giá mô hình viêm khớp

Cảm ứng viêm khớp được tính theo các tiêu chí đánh giá với thang điểm từ 1 đến 4. Bắt đầu từ ngày 32, các dấu hiệu viêm khớp xuất hiện, với điểm số từ 1 đến 2. Sự phát triển viêm khớp trở nên rõ ràng hơn vào ngày 43, với điểm số từ 1 đến 4. Quá trình theo dõi cho thấy số viêm khớp tăng rõ rệt ở nhóm ĐC2 (nhóm đối chứng dương, không được điều trị bằng ATP) do CIA gây ra so với nhóm ĐC1 (nhóm chuột bình thường) (Hình 2A). Đồng thời với sự phát triển của CIA, phát hiện thấy các dấu hiệu lâm sàng gây đau, nhưng không ảnh hưởng đến động vật. Kéo dài thời gian thử nghiệm, nhóm (ĐC2) trở nên ít hoạt động hơn. Hình 2B trình bày điểm số viêm khớp trung bình của những con chuột thí nghiệm từ khởi phát CIA (ngày 32). Vào ngày 46, điểm số khác biệt đáng kể giữa ĐC2 với TN (ngày 1) và TN (ngày 44) ($p < 0,001$ và $p < 0,05$, tương ứng), giảm khoảng 50% điểm so với chuột không được điều trị (ĐC2). Mặc dù sự phát triển viêm khớp trở nên rõ rệt ở nhóm ĐC2, nhưng việc sử dụng ATP từ ngày 1 hoặc từ ngày 43 đã làm giảm đáng kể tiến triển của CIA khi được đánh giá bởi phù khớp.

Kết quả mô học được thể hiện trên Hình 3 cho thấy có sự khác biệt lớn về mô học giữa nhóm chuột ĐC1 và ĐC2. Với nhóm ĐC1, sụn còn nguyên vẹn và mịn màng, và không xuất hiện vết thâm nhiễm do viêm. Nhóm ĐC2, chuột CIA, cho thấy sụn có sự thay đổi với nhiều hốc có thể nhìn thấy và xuất hiện vết thâm nhiễm viêm cấp.

Với nhóm TN (ngày 1) được sử dụng ATP ngay từ ngày đầu, cho thấy sụn vẫn còn nguyên vẹn và mịn màng như ở nhóm ĐC1 và chỉ quan sát thấy tình trạng viêm nhẹ. Ở nhóm TN (ngày 43), chuột được sử dụng ATP để điều trị CIA cho thấy sụn đã bị thay đổi tương tự như chuột không được điều trị của CIA, nhưng thâm nhiễm viêm đã giảm. Do đó, việc sử dụng ATP đã ngăn ngừa CIA nếu được đưa ra trước khi xuất hiện các dấu hiệu lâm sàng và hạn chế tiến triển của CIA sau khi phát triển viêm khớp, mặc dù các hợp chất này không đảo ngược tổn thương sụn liên quan đến CIA.

+ *Đánh giá sự điều hòa biểu hiện mARN*

Hồ sơ biểu hiện của các gen liên quan đến bệnh tự miễn được tạo ra từ mARN được chiết xuất từ các khớp của chuột ĐC2 và TN (ngày 1) (Hình 4A). Chúng tôi đã xác định được 29 gen được điều chỉnh đáng kể, bao gồm một gen *Cebpb* (gen liên kết mã hóa CCAAT/protein tăng cường gen), với biểu hiện tăng gấp 3 lần khi được điều trị. 28 gen còn lại được điều chỉnh bao gồm những gen mã hóa 9 chemokin (*CCL1*, *CCL20*, *CCL22*, *CCL3*, *CCL4*, *CXCL1*, *CXCL5* và *CXCL9*), 6 thụ thể chemokin (*CCR1*, *CCR4*, *CCR7*, *CXCR1*, *CXCR2*, và *CXCR4*), 9 interleukin và thụ thể interleukin (*IL-10*, *IL-17a*, *IL-18*, *IL-1a*, *IL-1b*, *IL-1RN*, *IL-22*, *IL-23r*, *IL-6*), 3 protein liên quan đến tế bào chết theo chương trình *apoptosis* (*FasL*, *Ripk2*, và *TNFSF14*) và kininogen *KNG1*. Biểu hiện của gen mã hóa *IL-17* và *IL-22* không được phát hiện trong các khớp được điều trị và biểu hiện *CCL20* và *IL-6* giảm hơn 10 lần (Hình 4A).

Bốn gen điều hòa *IL-17*, *IL-22*, *CCL20* và *IL-6* là đáng chú ý do chúng liên quan đến sự biệt hóa và /hoặc chức năng của các tế bào Th17. Đặc biệt, các cytokin tiền viêm *IL-17* và *IL-22* thường được sản xuất bởi các tế bào Th17 (Pelaia, G., Vatrella, A., and Maselli, R. (2012). The potential of biologics for the treatment of asthma. *Nat Rev Drug Discov* 11(12), 958-972) và *CCL20* tăng cường di chuyển tế bào Th17 (Kaneko, S., Kondo, Y., Yokosawa, M., Furuyama, K., Segawa, S., Tsuboi, H., et al. (2018). The ROR γ mat-CCR6-CCL20 axis augments Th17 cells invasion into the synovia of rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol*, 1-12). Những hồ sơ biểu hiện gen này gợi ý các phản ứng miễn dịch liên quan đến tế bào Th17 trong các khớp của chuột CIA.

+ *Đánh giá sự biểu hiện của các cytokine Th17*

Kết quả biểu hiện gen cho thấy cần đánh giá thêm biểu hiện của các cytokin Th17 và các dấu hiệu kích hoạt tế bào T trong các hạch kiểm soát và chuột thí nghiệm thông qua kỹ thuật RT-PCR. Kết quả đo biểu hiện gen mã hóa IL-17a, IL-22, IL-2 và FasL được thể hiện trên Hình 5. Theo đó cho thấy, IL-17a, IL-22, IL-2 và FasL là dấu hiệu kích hoạt tế bào T và chết theo chương trình. Hình 5 cho thấy biểu hiện của IL-17 bị ức chế đáng kể ở nhóm TN, trong khi IL-2, IL-22 và FasL chỉ bị ức chế đáng kể chỉ ở ngày 1 khi chuột được điều trị. Các mẫu biểu hiện này phản ánh tác dụng bảo vệ một phần của ATP ở chuột sau khi xuất hiện các dấu hiệu CIA được quan sát trong phân tích mô học.

+ *Đánh giá độc tính lên Cytokine và Th17*

Để xác định ảnh hưởng của ATP ở chuột DBA1J khỏe mạnh (cùng loại động vật được sử dụng cho thí nghiệm CIA *in vivo*), dịch pha hỗn hợp thử nghiệm được sử dụng cho chuột thử nghiệm cùng với nồng độ được sử dụng cho các thí nghiệm CIA nêu trên. Sau 10 ngày, giết những con chuột này, thu hồi lá lách, hạch bạch huyết và các tế bào khớp. ARN được chiết xuất để phân tích thêm. Không có sự khác biệt đáng kể đã được quan sát thấy ở các nhóm ĐC và nhóm TN. Không có sự khác biệt đáng kể giữa số lượng tế bào lách và hạch bạch huyết từ chuột được điều trị bằng nước hoặc ATP. Như được hiển thị trong Hình 6A, các phân tích RT-PCR cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về biểu hiện mRNA của IL-6, IL-17 hoặc IL-22 ở lách, hạch bạch huyết hoặc tế bào khớp giữa các nhóm động vật. Tương tự, không có sự khác biệt đáng kể nào được phát hiện giữa nhóm ĐC1 với nhóm TN trong phân biệt tế bào T CD4 + được phân lập với tế bào Th17, mặc dù đã có nhiều chuyển biến trong nhóm TN (Hình 6B). Do đó, khi uống nước sắc lá chay trong 10 ngày không liên quan đến bất kỳ sự khác biệt đáng kể nào so với 10 ngày uống nước, cho thấy rằng thuốc sắc không có độc tính cấp và không gây tác dụng phụ nào khác ở chuột DBA1J khỏe mạnh.

+ *Tác động in vitro lên tế bào Th17 phân cực từ tế bào lympho TCD4+*

Để xác định khả năng ức chế tế bào Th17 của hỗn hợp thử nghiệm, tiến hành đánh giá vai trò của hỗn hợp thử nghiệm đến sự phát triển *in vitro* của các tế bào Th17. Tế bào lympho T CD4 + được phân lập từ chuột và nuôi cấy trong các nhóm sau:

(1) trong các đĩa chống dính CD3 với kháng thể chống CD28 để kích thích kích hoạt tế bào T (ĐC);

(2) giống như nhóm 1 với việc bổ sung IL-6 và TGF- β thúc đẩy quá trình biệt hóa với các tế bào Th17 và bổ sung các kháng thể đơn dòng chống IL-4 và chống IL-12 (mAbs) để ngăn chặn sự khác biệt với Th1 và các tế bào Th2, tương ứng (Th17); và

(3) giống như nhóm 2 nhưng có bổ sung hợp chất ATP (Th17-TN).

Biểu hiện của IL-17, IL-22 và RORC, yếu tố phiên mã đặc hiệu tế bào Th17, khi có hoặc không có ATP sau đó được đo bằng kỹ thuật RT-PCR. Như được hiển thị trong Hình 7A, ATP đã giảm đáng kể tổng số ô Th17 so với các ô trong các ô không được xử lý. Tế bào phân cực Th17 đã ức chế thành công trong các tế bào đối chứng, nhưng không phải trong các tế bào được xử lý, như được chỉ ra bởi sự ức chế trung gian của IL-17 và RORC (Hình 7B). Do đó, ATP đã ức chế sự biệt hóa trong ống nghiệm (*in vitro*) của các tế bào Th17 từ các tế bào T CD4 + lách.

+ Tác dụng hiệp đồng so với maesopsin 4-O- β -D-glucopyranosit (TAT-2) tinh sạch

Maesopsin 4-O- β -D-glucopyranosit được xác định là thành phần hoạt chất mạnh của lá cây chay (Pozzesi, N., Pierangeli, S., Vacca, C., Falchi, L., Pettorossi, V., Martelli, M.P., et al. (2011). Maesopsin 4-O-beta-D-glucoside, a natural compound isolated from the leaves of *Artocarpus tonkinensis*, inhibits proliferation and up-regulates HMOX1, SRXN1 and BCAS3 in acute myeloid leukemia. J Chemother 23(3), 150-157), tiến hành đánh giá tác dụng của chất maesopsin 4-O- β -D-glucopyranosit đối với sự biệt hóa của các tế bào Th17 từ tế bào lympho T CD4 + đã được thử nghiệm. Bất ngờ là, như được hiển thị trong Hình 6C, chất maesopsin 4-O- β -D-glucopyranosit ở nồng độ 0,01 và 0,001 mg/mL làm giảm biểu hiện IL-17 và RORC, nhưng vẫn kém hơn hỗn hợp theo giải pháp hữu ích (AT) ở nồng độ 0,01 mg/ml. Điều này cho thấy, ngay cả với nồng độ maesopsin 4-O- β -D-glucopyranosit 0,1 mg/ml, hiệu quả tác động lên Th17 ở chuột được điều trị không bằng hỗn hợp theo giải pháp hữu ích (AT) ở nồng độ 0,01mg/ml. Điều này cho thấy, hỗn hợp thu được theo giải pháp hữu ích có tác dụng hiệp đồng lên tế bào thử nghiệm.

Tóm lại, hồ sơ biểu hiện gen cho thấy chemokine CCL20 và cytokine liên quan đến tế bào Th17 IL-6, IL-17 và IL-22 bị giảm mạnh. Bằng kỹ thuật real-time PCR đã xác nhận biểu hiện IL-2, IL-17, IL-22 và FasL yếu đi trong các tế bào hạch bạch huyết. Các chất này còn có tác dụng ức chế sự phân hóa của các tế bào Th17 *in vitro* từ những

tế bào T ở lách CD4, theo mức độ của IL-17 và RORC, một tác nhân phiên mã đặc hiệu của tế bào Th17.

Kết quả trên cho thấy hỗn hợp thu được từ Ví dụ 1 có thể ức chế sự biệt hóa của các tế bào Th17 *in vitro*. Như vậy các chất này làm giảm đáng kể các dấu hiệu và triệu chứng viêm và kìm hãm sự phát triển của tế bào Th17, đồng thời giảm chức năng của Th17. Hỗn hợp thử nghiệm cho thấy tác dụng kháng viêm tiềm năng vượt trội trên cơ sở điều hòa gen khi so với hợp chất maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (TAT-2) tinh khiết, một hợp chất được cho là có hoạt tính kháng viêm mạnh nhất được chiết xuất từ lá cây chay, điều này cho thấy hoạt tính hiệp đồng vượt trội của hỗn hợp thu được theo giải pháp hữu ích.

Ngoài ra, theo nghiên cứu, nhiều bệnh nhân COVID-19 phát triển hội chứng suy hô hấp cấp tính bị gây ra bởi virus corona chủng mới (SARS-CoV-2) dẫn đến phù phổi và suy phổi, tổn thương gan, tim và thận. Máu ngoại vi của một bệnh nhân mắc COVID-19 nặng có số lượng tế bào Th17 tăng rất cao, càng tăng nguy cơ bão cytokin xuất hiện ở căn bệnh này. Chúng ta quan sát thấy phản ứng mạnh với Th17 và chuỗi phản ứng sinh hoá tăng cường liên quan đến IL-17 ở bệnh nhân nhiễm MERS-CoV và SARS-CoV, điều này gây ra các tổn hại nghiêm trọng, gây tử vong ở nhiều bệnh nhân. Các hoạt chất kháng viêm ức chế liên quan đến việc ức chế sự biểu hiện của IL-17 có khả năng kìm hãm và giảm thiểu được các tác động liên quan đến dịch bệnh này.

Điều thú vị là cơ chế tác dụng của các chất phenolic rất giống với cơ chế tác dụng của thuốc Tocilizumab, một kháng thể đơn dòng chống thụ thể IL-6, đang được thử nghiệm lâm sàng (Pha III) để điều trị biến chứng ở bệnh nhân COVID-19 tại Trung Quốc, Italia và một số nước khác. Như vậy hỗn hợp thu được theo giải pháp hữu ích là rất có tiềm năng để phát triển thành thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ tích cực bệnh viêm phổi do virus, COVID -19 hướng tới phát triển thành thuốc, do có cùng cơ chế tác dụng. Hơn nữa thuốc theo cơ chế này còn có tác dụng để điều trị nhiều bệnh tự miễn, viêm nhiễm và các biến chứng do virus khác.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép chiết chọn lọc được các chất phenolic có tác dụng chống viêm từ lá cây chay với hiệu suất cao, lên tới 13,6% theo nguyên liệu khô. Điều này cho phép phát triển được nguồn dược liệu từ các thành phần thảo

được tự nhiên với giá thành đủ sức cạnh tranh với nguồn tổng hợp. Ngoài ra, quy trình theo giải pháp hữu ích sử dụng hệ dung môi chiết với nồng độ etanol thấp, chỉ 10-20% trong thời gian 6 giờ ở nhiệt độ 80-90°C cho phép chiết chọn lọc những hợp chất mong muốn, giảm thiểu chi phí hóa chất, đồng thời tăng được hiệu suất chiết.

Hỗn hợp phenolic thu được theo giải pháp hữu ích trong thử nghiệm lâm sàng đã chứng tỏ có tác dụng ức chế miễn dịch chọn lọc mạnh, hơn nữa chỉ ức chế miễn dịch gây bệnh mà không ảnh hưởng đến các miễn dịch có lợi của cơ thể và không có độc tính. Kết quả thử nghiệm trên động vật bị viêm khớp do collagen cho thấy làm giảm đáng kể chứng phù khớp và thâm nhiễm viêm, hơn nữa ngăn ngừa được tổn thương sụn. Điều này mở ra một hướng phát triển thuốc điều trị viêm trên cơ sở điều hòa gen một cách an toàn và hiệp đồng vượt trội. Đáng chú ý là hỗn hợp phenolic theo giải pháp hữu ích có khả năng điều hòa biểu hiện 28 gen, bốn trong số đó mã hóa protein liên quan đến sự phát triển và chức năng của tế bào Th-17 (IL-6, IL-17, IL-22 và CCL20) và đóng góp gián tiếp vào bệnh học RA. Cụ thể, các tế bào Th17 biệt hóa trong các cơ quan bạch huyết dưới sự kích thích của IL-6 và TGF- β và sau đó sản xuất IL-17 và IL-22.

Ngoài ra các tế bào Th17 di chuyển đến các khớp do hoạt động hóa học của CCL20. IL-6 cũng ức chế sự biệt hóa của các tế bào điều hòa T được sản xuất trong tuyến ức và các hạch bạch huyết ngoại vi để bảo vệ chống tự miễn mà không ảnh hưởng đến các phản ứng miễn dịch của cơ thể. Hồ sơ biểu hiện gen cho thấy chemokine CCL20 và cytokine liên quan đến tế bào Th17, IL-6, IL-17 và IL-22 bị giảm mạnh. Bằng kỹ thuật (real-time PCR: RT-PCR) đã xác nhận biểu hiện IL-2, IL-17, IL-22 và FasL yếu đi trong các tế bào hạch bạch huyết (*FasL* in lymph node cells). Đồng thời cũng ức chế sự phân cực của các tế bào Th17 *in vitro* từ các tế bào lách CD4 T. Đây là hướng mới cho phép can thiệp chọn lọc các tế bào gây bệnh trong nhiều bệnh tự miễn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chiết hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm từ lá cây chay *Artocarpus tonkinensis* Cheval. ex Gagnep., trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu gom lá cây chay, loại bỏ tạp chất và sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 50°C đến khô giòn, sau đó xay nhỏ qua cỡ sàng 5mm thu được bột lá cây chay có độ ẩm khoảng 10%;

b) chiết nguyên liệu bằng cách tiến hành chiết bột lá cây chay trong dung môi etanol nồng độ từ 10 đến 20% theo tỷ lệ bột lá chay:dung môi là 1:3 (khối lượng/thể tích) trong 6 giờ, trong điều kiện chiết siêu âm với tần số từ 30 kHz đến 50 kHz ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C, sau khi lọc bã, cô loại dung môi trong điều kiện áp suất nằm trong khoảng từ 6500 đến 8000 Pa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 90°C đến khi còn 1/3 thể tích, thu được dịch chiết dạng lỏng;

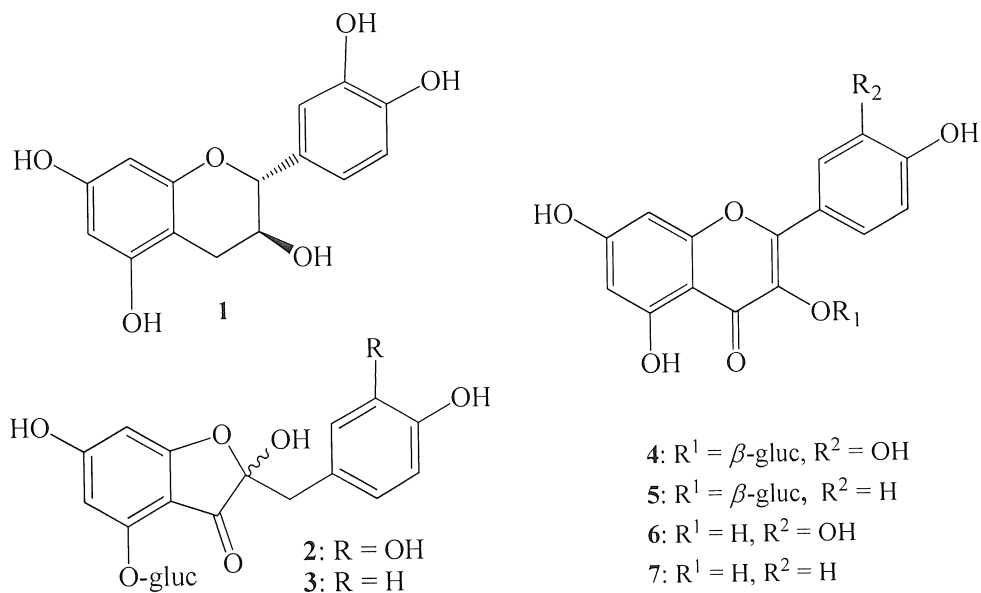
c) chiết phân bố bằng *n*-hexan bằng cách bổ sung *n*-hexan vào dịch chiết theo tỷ lệ dịch chiết:*n*-hexan là 3:1 (thể tích/thể tích) và khuấy đều trong 10 phút để loại các chất tan trong *n*-hexan, lặp lại quá trình chiết này 2 lần, thu phân đoạn nước;

d) tinh chế sơ bộ hỗn hợp phenolic bằng cách đưa phân đoạn nước sau khi chiết phân bố bằng *n*-hexan qua cột trao đổi ion với dung dịch rửa giải lần lượt là nước, nước/metanol tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích) và metanol 100% để thu phân đoạn nước/metanol tỷ lệ 1:1, sau khi loại bỏ dung môi, thu được phần bột mịn màu nâu; và

e) thu hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm bằng cách chuyển phần bột thu được lên cột gel Sephadex LH-20 với dung môi rửa là etanol, phần dịch sau khi lọc được cô loại dung môi dưới áp suất giảm, thu được hỗn hợp phenolic màu vàng nâu, mùi thơm bao gồm catechin (1) từ 115 đến 155 µg/g, alphononin 4-*O*-β-D-glucopyranosit (2) từ 360 đến 380 µg/g, maesopsin 4-*O*-β-D-glucopyranosit (3) từ 305 đến 330 µg/g, quercetin 3-*O*-glucopyranosit (4) từ 20 đến 30 µg/g, kaempferol 3-*O*-glucopyranosit (5) từ 100 đến 115 µg/g, quercetin (6) từ 10 đến 15 µg/g và kaempferol (7) từ 7 đến 10 µg/g.

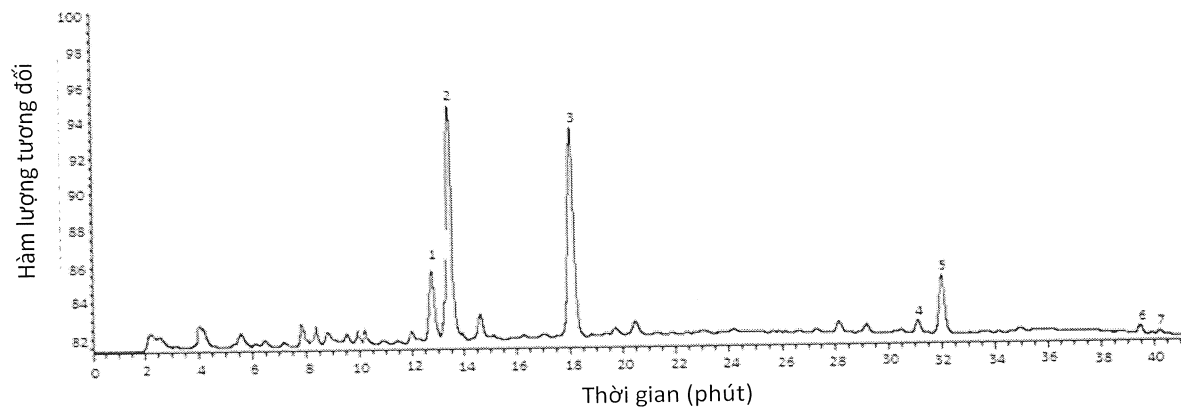
2. Hỗn hợp phenolic có hoạt tính kháng viêm thu được từ quy trình theo điểm 1, trong đó hỗn hợp này bao gồm catechin (1), alphononin 4-*O*-β-D-glucopyranosit (2),

maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (3), quercetin 3-*O*-glucopyranosit (4), kaempferol 3-*O*-glucopyranosit (5), quercetin (6) và kaempferol (7) sau:

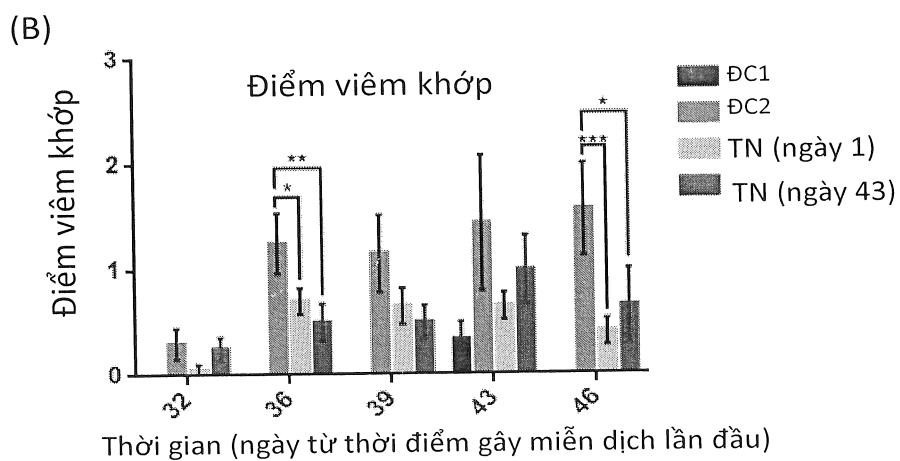
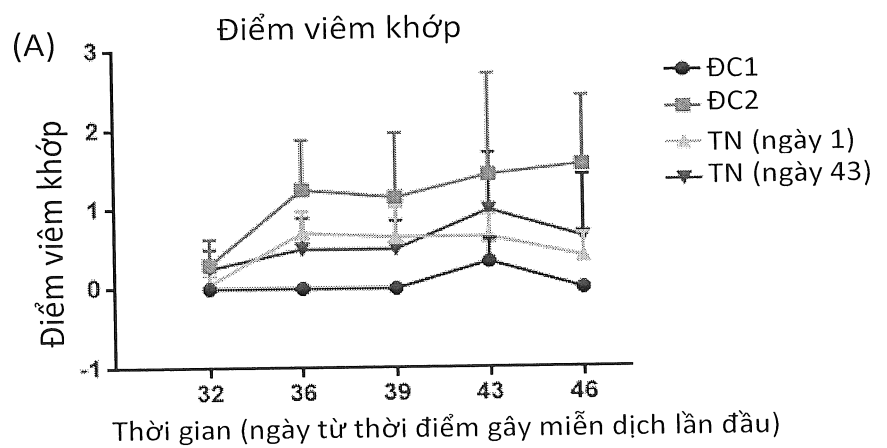


trong đó catechin (1) từ 115 đến 155 $\mu\text{g/g}$, alphitinin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (2) từ 360 đến 380 $\mu\text{g/g}$, maesopsin 4-*O*- β -D-glucopyranosit (3) từ 305 đến 330 $\mu\text{g/g}$, quercetin 3-*O*-glucopyranosit (4) từ 20 đến 30 $\mu\text{g/g}$, kaempferol 3-*O*-glucopyranosit (5) từ 100 đến 115 $\mu\text{g/g}$, quercetin (6) từ 10 đến 15 $\mu\text{g/g}$ và kaempferol (7) từ 7 đến 10 $\mu\text{g/g}$.

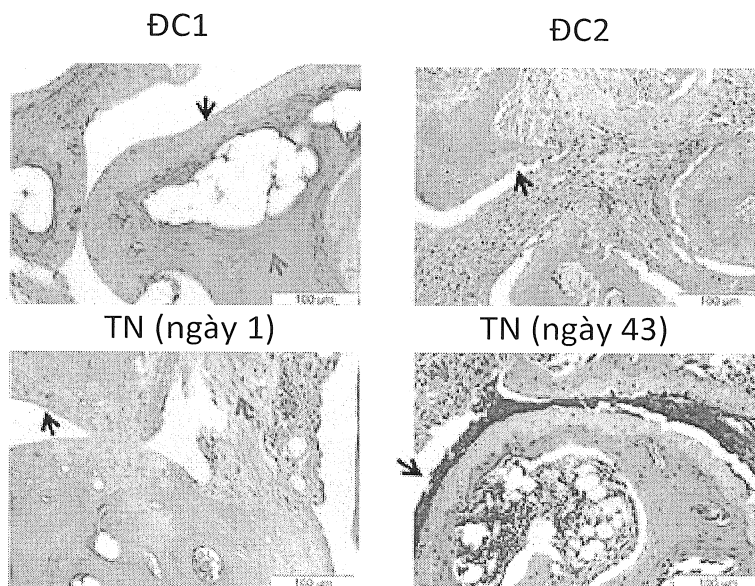
HÌNH 1



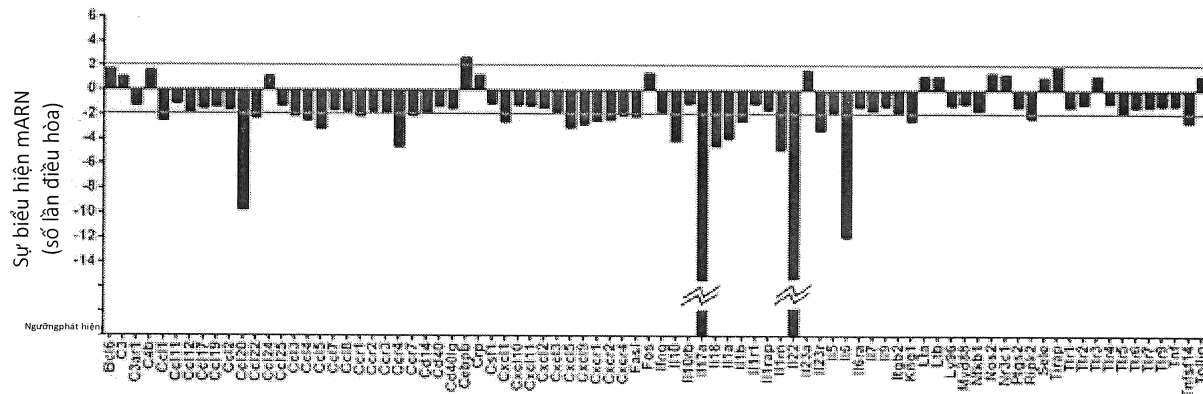
HÌNH 2



HÌNH 3

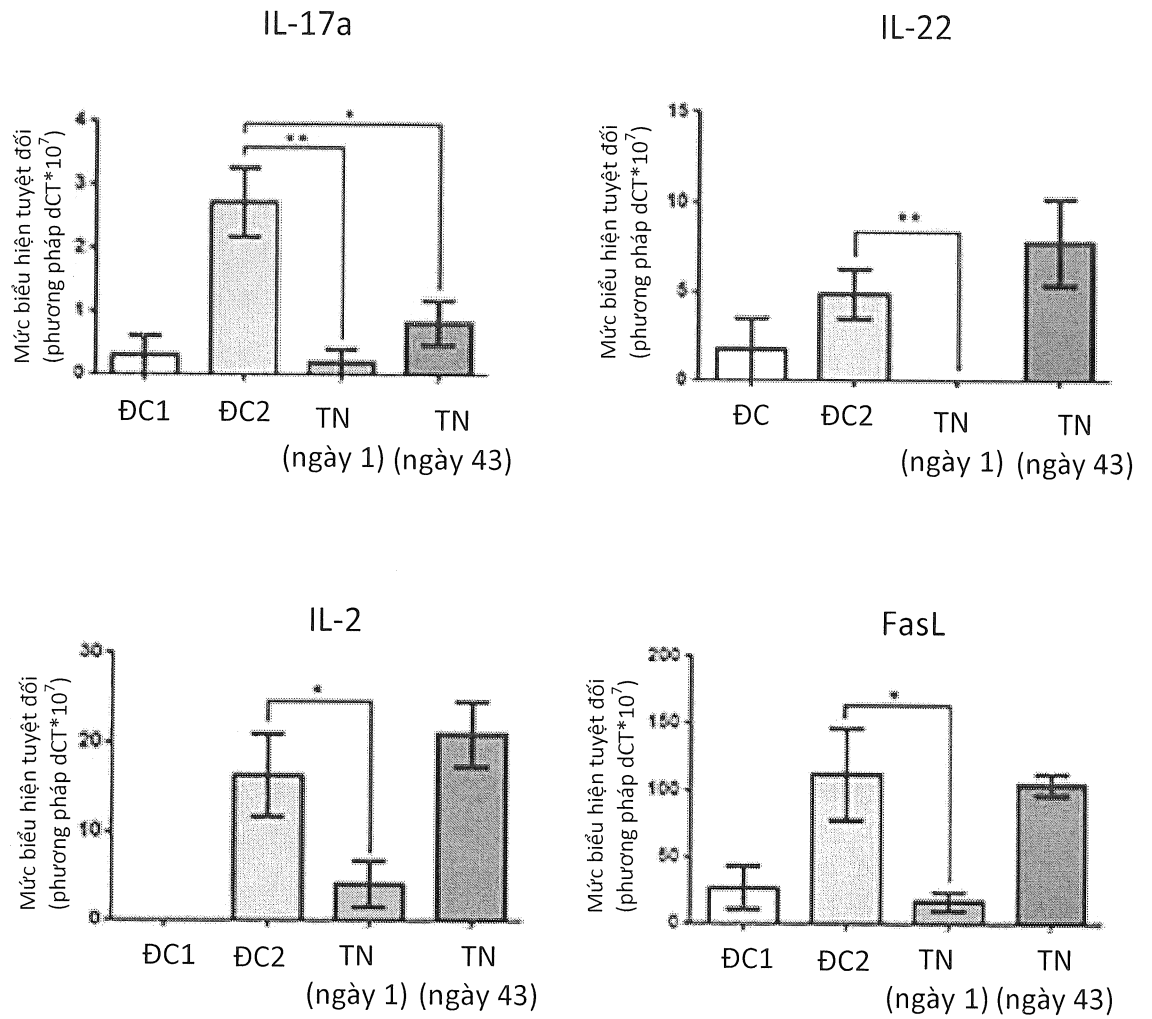


HÌNH 4



Điều hòa dương	
Cebpb	<i>CCAT/chất tăng cường gắn kết protein</i>
Điều hòa âm	
Ccl1, Ccl20, Ccl22, Ccl3, Ccl4, Ccl5, Cxcl1, Cxcl5, Cxcl9	<i>Chemokine</i>
Ccr1, Ccr4, Ccr7, Cxcr1, Cxcr2, Cxcr4	<i>Thụ thể chemokine</i>
Il10, Il17a, Il18, Il11a, Il11b, Il1m, Il22, Il23r, Il6	<i>Interleukin và thụ thể interleukin</i>
Fas1, Tnfrsf14	<i>Siêu họ TNF</i>
Kng1	<i>Kininogen</i>
Ripk2	<i>Thụ thể-serin can thiệp-treonin kinaza</i>

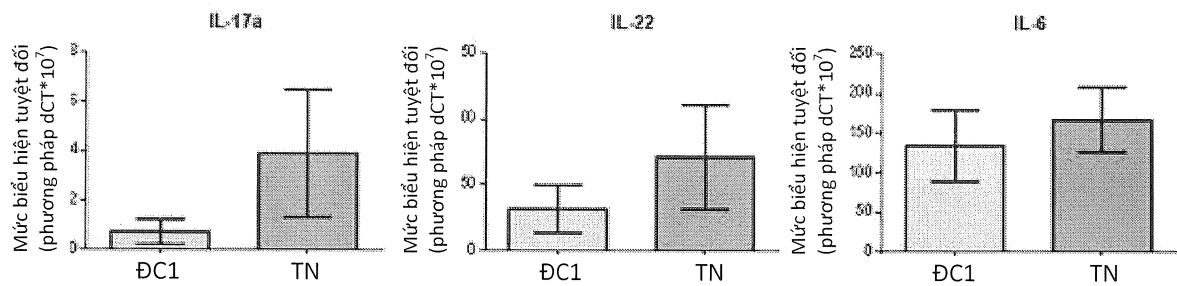
HÌNH 5



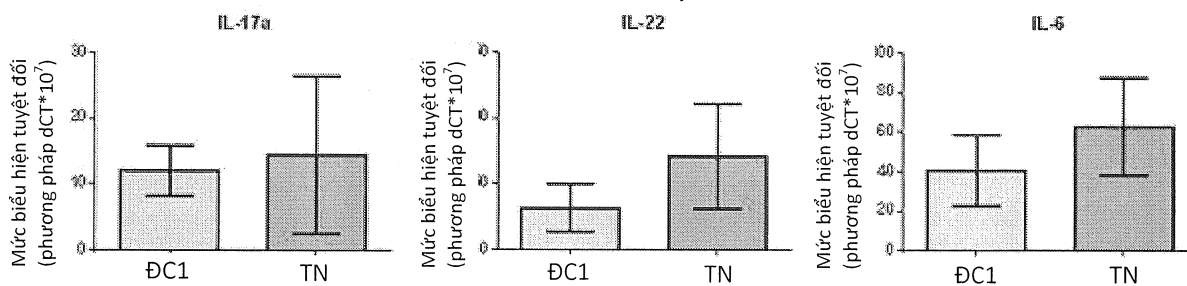
HÌNH 6

(A)

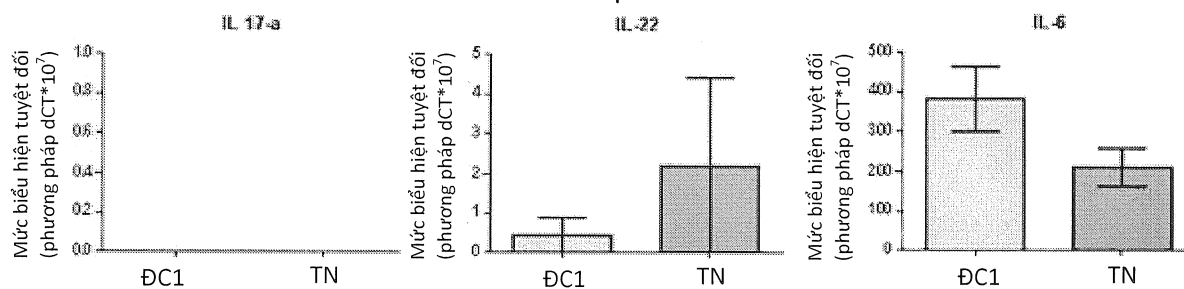
Lá lách



Hạch bạch huyết



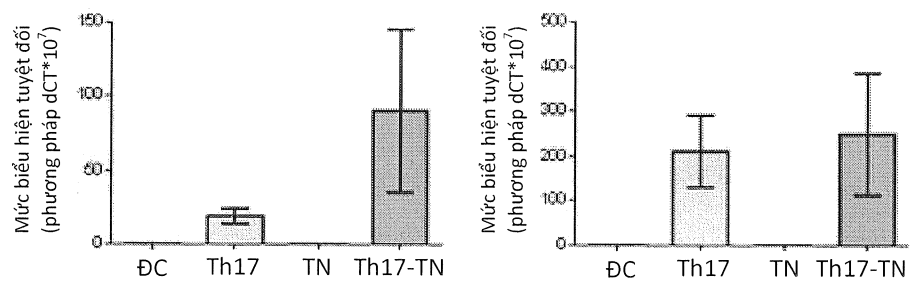
Khớp



(B)

ROR γ

IL-17a



HÌNH 7

