



(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)



2-0003221

(51) **A61K 36/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00467

(22) 20/05/2020

(67) 1-2020-02828

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/08/2020 389ASC

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC, ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI (VN)**

Nhà Y1, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Thành Phố Hà Nội

(72) **BÙI THANH TÙNG (VN); ĐẶNG KIM THU (VN).**

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM CAO CHIẾT DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH VIÊM
ĐẠI TRÀNG VÀ CHẾ PHẨM THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm cao chiết của các cây Hoàng liên (*Coptis chinensis* Franch.), cây Đẳng sâm (*Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf.), cây Bạch truật (*Atractylodes macrocephala* Koidz), cây Xoài (*Mangifera indica* L. Anacardiaceae) và cây Nghệ (*Curcuma longa* L. Zingiberaceae) có tác dụng điều trị bệnh viêm đại tràng mãn tính và chế phẩm cao chiết thu được từ quy trình này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm cao chiết dùng để điều trị bệnh viêm đại tràng mãn tính từ cây Hoàng liên (*Coptis chinensis* Franch.), cây Đảng sâm (*Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf.), cây Bạch truật (*Atractylodes macrocephala* Koidz), cây Xoài (*Mangifera indica* L. Anacardiaceae) và cây Nghệ (*Curcuma longa* L. Zingiberaceae); và chế phẩm cao chiết thu được bởi quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Viêm đại tràng là tình trạng viêm nhiễm gây ra các tổn thương khu trú hoặc lan toả ở niêm mạc đại tràng. Viêm đại tràng gây xuất hiện các vết viêm, các ổ loét, xuất huyết, ổ áp xe ở đại tràng, làm tăng nguy cơ ung thư ruột già. Tình trạng viêm đại tràng mãn tính thường kéo dài, khả năng điều trị khó dứt điểm và ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe, sinh hoạt của người bệnh. Nguyên nhân dẫn đến viêm đại tràng do nhiễm khuẩn, nhiễm trùng ở đại tràng, suy yếu hệ miễn dịch, rối loạn thần kinh. Bạch cầu trung tính đóng vai trò quan trọng trong việc gây tổn thương mô ở bệnh đại tràng. Bệnh viêm đại tràng có đặc trưng là tăng lượng lớn bạch cầu trung tính ở đại tràng, kích hoạt của các yếu tố nhân phiên mã-kappa B (NF- κ B) và tăng cường biểu hiện của các cytokin tiền viêm như interleukin (IL)-1 β , interferon (INF) - γ , yếu tố hoại tử khối u (TNF)- α và enzym cyclooxygenaza (COX)-2 và inducible nitric oxide synthaza (iNOS) trong các tế bào miễn dịch. Các triệu chứng viêm đại tràng mãn tính như đau bụng, đau âm ỉ hoặc quặn thắt từng cơn dọc khung đại tràng; rối loạn đại tiện, đi ngoài nhiều lần, nhất là vào buổi sáng, rối loạn tính chất phân, chướng bụng, đầy hơi, mệt mỏi, ăn uống kém, gầy sút cân. Các thuốc Tây Y được dùng để điều trị các triệu chứng, như thuốc chống viêm, thuốc kháng sinh, kháng

nấm, chống ký sinh trùng, thuốc giảm đau, chống co thắt đại tràng. Tuy nhiên, các thuốc Tây Y không điều trị được dứt điểm tình trạng viêm, bệnh tái phát khi ngừng sử dụng thuốc. Việc sử dụng các dược liệu vừa có hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm và kháng khuẩn để phòng và điều trị bệnh viêm đại tràng mãn tính ngày càng được quan tâm, do có độ an toàn và hiệu quả lâu dài. Các dược liệu được kết hợp với nhau sẽ phát huy được tác dụng tốt hơn từng thành phần riêng biệt. Ví dụ, xem các công bố đơn quốc tế số CN107693671A, CN107693671A. Tuy nhiên, sự kết hợp giữa các dược liệu Hoàng liên (*Coptis chinensis* Franch.), Đảng sâm (*Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf.), Bạch truật (*Atractylodes macrocephala* Koidz), cây Xoài (*Mangifera indica* L. Anacardiaceae) và Nghệ (*Curcuma longa* L. Zingiberaceae) này dùng để điều trị bệnh viêm đại tràng mãn tính thì chưa được đánh giá.

Bản chất của kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là để giải quyết các vấn đề nêu trên. Do đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm cao chiết của các dược liệu dùng để điều trị viêm đại tràng mãn tính gồm các bước:

- bước 1) Chuẩn bị nguyên liệu;
- bước 2) Tạo hỗn hợp nguyên liệu;
- bước 3) Chiết hỗn hợp nguyên liệu;
- bước 4) Chung cất tạo chế phẩm cao chiết.

Giải pháp hữu ích cũng đề cập chế phẩm cao chiết thu được bởi quy trình này.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích quy trình chiết xuất chế phẩm cao chiết của các dược liệu dùng để điều trị viêm đại tràng mãn tính gồm các bước như sau:

- bước 1) chuẩn bị nguyên liệu cây Hoàng liên (*Coptis chinensis* Franch.), cây Đảng sâm (*Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf.), cây Bạch truật (*Atractylodes macrocephala* Koidz), cây Xoài (*Mangifera indica* L. Anacardiaceae) và cây Nghệ

(*Curcuma longa* L. Zingiberaceae); rửa sạch, phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, sau đó thái nhỏ đến kích cỡ nhỏ hơn 2 cm thì thu được nguyên liệu riêng rẽ của từng dược liệu, đều đạt tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm;

- bước 2) tạo hỗn hợp nguyên liệu: bằng cách trộn các nguyên liệu từ cây Hoàng liên, cây Đẳng sâm, cây Bạch truật, cây Xoài và cây Nghệ; theo tỷ lệ Hoàng liên:Đẳng sâm:Bạch truật:Xoài:Nghệ là 20%:20%:20%:20%:20% thu được hỗn hợp bột nguyên liệu;

- bước 3) chiết hỗn hợp nguyên liệu bằng cồn có nồng độ từ 10%-90%, tốt hơn là cồn 30%, đun trong 1-3 giờ, tốt hơn là 2 giờ theo tỷ lệ hỗn hợp nguyên liệu:dung môi 100:1 (g/L), trong đó, việc chiết này được lặp lại 3 lần.

- bước 4) chưng cất tạo chế phẩm cao chiết: gộp các dịch chiết, lọc qua giấy lọc, gộp 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 Hoàng liên, cây Đẳng sâm, cây Bạch truật, cây Xoài và cây Nghệ.

Giải pháp hữu ích cũng đề cập chế phẩm cao chiết thu được bởi quy trình nêu trên. Chế phẩm cao chiết này chứa kết hợp các thành phần dược liệu từ các cây Hoàng liên, cây Đẳng sâm, cây Bạch truật, cây Xoài và cây Nghệ theo tỷ lệ Hoàng liên:Đẳng sâm:Bạch truật:Xoài:Nghệ là 20%:20%:20%:20%:20%. Ngoài ra, chế phẩm này còn chứa các chất chống nấm mốc bao gồm kali sorbat và natri benzoat. Chế phẩm cao chiết theo giải pháp hữu ích có thể được dùng để sản xuất thuốc hoặc thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng điều trị bệnh viêm đại tràng mãn tính.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Sản xuất chế phẩm cao chiết bằng quy trình theo giải pháp hữu ích

Thu hái thân rễ cây Hoàng liên, củ rễ cây Đẳng sâm, phần củ cây Bạch truật, lá cây Xoài và củ cây Nghệ, rồi phơi khô tất cả đến độ ẩm dưới 13%, thái nhỏ đến kích cỡ nhỏ hơn 2 cm tạo thành nguyên liệu dùng để chiết. Tạo hỗn hợp nguyên liệu gồm

100 g Hoàng liên, 100 g Đảng sâm, 100 g Bạch truật, 100 g Xoài và 100 g Nghệ. Chiết 500g hỗn hợp nguyên liệu này bằng cồn 30%, đun trong 2 giờ theo tỷ lệ hỗn hợp nguyên liệu: dung môi 500(g):5(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 50°C tới khối lượng không đổi, thu được 45g chế phẩm cao chiết. Hiệu suất đạt khoảng 9,0%.

Tác dụng dược lý

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, cả 2 giống, khoẻ mạnh, trọng lượng $25,0 \pm 2,0$ g để nghiên cứu tác dụng điều trị viêm đại tràng do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp. Động vật được nuôi trong điều kiện đầy đủ thức ăn và nước uống tại phòng thí nghiệm từ 3-5 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu. Hóa chất sử dụng gây viêm đại tràng là TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid) (Sigma-Aldrich)

Gây viêm đại tràng

Chuột bị gây viêm đại tràng do truyền dịch trực tiếp của TNBS (2 mg/chuột trong 50% ethanol) để gây viêm đại tràng trên chuột. Nhóm chứng điều trị bằng nước muối và được theo dõi trong 14 ngày.

Quá trình thí nghiệm

Chuột nhắt được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm, mỗi nhóm 10 con, được điều trị theo như sau:

Nhóm I là nhóm chứng sinh lý;

Nhóm II: Nhóm chứng bệnh TNBS;

Nhóm III: TNBS + cao chiết thu được theo ví dụ 1 (100mg/kg, thể trọng, đường uống) trong vòng 14 ngày;

Nhóm IV: TNBS + cao chiết thu được theo ví dụ 1 (200mg/kg, thể trọng, đường uống) trong vòng 14 ngày;

Trong suốt quá trình thí nghiệm, chỉ số bệnh (DAI) được đo và đánh giá. Tại ngày cuối của thí nghiệm, chuột bị bỏ đói qua đêm, bị giết bằng cách sử dụng thuốc gây mê liều cao. Tiến hành mổ lấy mô ruột, cân và đồng nhất trong hệ đệm Nonidet-P40 (NP40) lạnh gồm 150 mM natri clorua; 1.0% NP-40 và 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Sau đó, ly tâm ở điều kiện (12000g, 4°C) trong 15 phút rồi thu lấy phần dịch nổi phía trên và bảo quản ở nhiệt độ -80°C đến khi phân tích. Nồng độ protein được phân tích bằng phương pháp Bradford.

Chỉ số bệnh (DAI)

Trọng lượng cơ thể, độ cứng của phân và máu trong phân được đo mỗi ngày. Chỉ số bệnh được đo hàng ngày. DAI là giá trị trung bình của sự giảm trọng lượng, độ cứng của phân và điểm số máu trong phân. Mỗi điểm được xác định như sau: giảm trọng lượng cơ thể (0: <1%; 1: 1-5%; 2: 5-10%; 3: 10-15%, 4: > 15%), độ cứng phân (0 : bình thường, 2: mềm, 4: tiêu chảy) và sự hiện diện hay vắng mặt của máu trong phân (ghi là: 0, xét nghiệm máu hemoccult âm tính, 2, xét nghiệm máu hemoccult dương tính, 4, chảy máu toàn bộ). Giảm trọng lượng cơ thể đã được tính là phần trăm chênh lệch giữa trọng lượng cơ thể ban đầu (ngày 0) và trọng lượng cơ thể bất cứ ngày sau đó tại thời điểm đo.

Kết quả về chỉ số bệnh DAI (bao gồm giảm trọng lượng cơ thể, độ cứng của phân và máu trong phân). Ở những con chuột ở nhóm chứng bệnh do TNBS gây viêm đại tràng, quan sát thấy sự mất trọng lượng cơ thể và tiêu chảy nặng với phân có máu, dẫn đến sự gia tăng của chỉ số bệnh (DAI) từ ngày thứ 2 trở đi, so với những con chuột chứng khỏe mạnh. Tuy nhiên, giá trị DAI đã giảm đáng kể trong nhóm III và nhóm IV so với nhóm TNBS do tác dụng của cao chiết.

Hoạt tính myeloperoxidaza

Myeloperoxidaza (MPO) là một loại enzym được tìm thấy trong bạch cầu trung tính. Đánh giá hoạt tính MPO là một chỉ số để đánh giá quá trình thâm nhập tế bào bạch cầu vào ruột. Dịch đồng nhất của ruột được đem định lượng MPO. Thêm

dung dịch đệm kali phosphat (pH 6,0; 625 ml) chứa 0,5 mM O-dianisidine dihydroclorua (D3252 Sigma-Aldrich, Việt Nam) vào 125 μ L của phần dịch đồng nhất mô ruột và 0,05% hydro peroxit. Đo sự thay đổi trong hấp thụ ở bước sóng 450 nm bằng máy đo quang mỗi lần 30 giây trong hơn 3 phút. MPO được thể hiện trong đơn vị mỗi miligam mô, trong đó 1 đơn vị tương ứng với hoạt tính cần thiết để phân hủy 1 mmol H₂O₂/phút /ml ở 37°C.

Kết quả:

Bạch cầu trung tính là nguyên nhân chính của tổn thương mô ở bệnh viêm đường ruột. Sau 14 ngày kể từ ngày bắt đầu điều trị TNBS, bạch cầu trung tính niêm mạc thâm nhiễm vào ruột được xác định gián tiếp bằng cách đo hoạt tính MPO. Mẫu nghiên cứu đại tràng từ nhóm chuột điều trị DSS cho thấy gia tăng đáng kể hoạt tính enzym MPO so với những con chuột khỏe mạnh ở nhóm chứng bệnh. Cao chiết đã làm giảm đáng kể hoạt tính enzym MPO ở nhóm III và nhóm IV có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh TNBS (Bảng 1). Như vậy cao chiết có tác dụng làm suy giảm mức độ tổn thương do TNBS gây viêm đại tràng

Bảng 1. Kết quả đánh giá hoạt tính myeloperoxidaza

	MPO (đơn vị/mg protein)
Nhóm I (Nhóm sinh lý)	0,5 $\pm$ 0,06
Nhóm II (chứng bệnh TNBS)	1,6 $\pm$ 0,3 [*]
Nhóm III	1,2 $\pm$ 0,2 [#]
Nhóm IV	1,0 $\pm$ 0,2 [#]

^{*} Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm I; [#] Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm II;

Đánh giá các xytokin tiền viêm

Thẻ đồng chất mô đại tràng được sử dụng để nghiên cứu. IL-1 β , INF- γ và TNF α của đại tràng được xác định bằng Kit ELISA thương mại có sẵn trên thị trường và tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kết quả:

Nồng độ TNF- α , IL-1 β , và INF- γ được tăng lên đáng kể do TNBS gây viêm đại tràng. Trong nhóm III và nhóm IV, điều trị bằng cao chiết đã giảm đáng kể mức độ của TNF- α , IL-1 β , INF- γ có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh II trong mô đại tràng ($p < 0,05$) (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả đánh giá các xytokin tiền viêm

	TNF- α (pg/mg protein)	IL-1 β (pg/mg protein)	INF- γ (pg/mg protein)
Nhóm I (Nhóm sinh lý)	50,5 $\pm$ 2,8	58,3 $\pm$ 4,2	62,7 $\pm$ 7,1
Nhóm II (chứng bệnh TNBS)	150,8 $\pm$ 5,1 [*]	185,2 $\pm$ 6,1 [*]	175,6 $\pm$ 4,5 [*]
Nhóm III	90,2 $\pm$ 5,8 [#]	120,2 $\pm$ 7,4 [#]	100,6 $\pm$ 6,7 [#]
Nhóm IV	86,5 $\pm$ 5,3 [#]	110,8 $\pm$ 5,4 [#]	102,2 $\pm$ 8,1 [#]

^{*} Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm I; [#] Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm II;

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Cao chiết của các cây Hoàng liên, cây Đảng sâm, cây Bạch truật, cây Xoài và cây Nghệ với liều 100 mg/kg và liều 200 mg/kg có tác dụng điều trị bệnh viêm đại tràng mãn tính trên mô hình do TNBS gây tổn thương viêm đại tràng ở chuột nhắt trắng. Tác dụng ấy thể hiện thông qua làm giảm chỉ số bệnh DAI, giảm hoạt tính enzym MPO và giảm các chỉ số tiền viêm như TNF- α , IL-1 β , và INF- γ .

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm cao chiết dùng để điều trị bệnh viêm đại tràng bao gồm các bước:

- bước 1, chuẩn bị nguyên liệu cây Hoàng liên (*Coptis chinensis* Franch.), cây Đẳng sâm (*Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf.), cây Bạch truật (*Atractylodes macrocephala* Koidz), cây Xoài (*Mangifera indica* L. Anacardiaceae) và cây Nghệ (*Curcuma longa* L. Zingiberaceae) bằng cách rửa sạch, phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, sau đó thái nhỏ đến kích cỡ nhỏ hơn 2 cm thì thu được nguyên liệu;
- bước 2, tạo hỗn hợp nguyên liệu bằng cách trộn các nguyên liệu từ cây Hoàng liên, cây Đẳng sâm, cây Bạch truật, cây Xoài và cây Nghệ, theo tỷ lệ Hoàng liên:Đẳng sâm:Bạch truật:Xoài:Nghệ là 20%:20%:20%:20%:20% thu được hỗn hợp bột nguyên liệu;
- bước 3, chiết hỗn hợp nguyên liệu bằng cồn có nồng độ từ 10%-90%, tốt hơn là cồn 30%, đun trong 1-3 giờ, tốt hơn là 2 giờ theo tỷ lệ hỗn hợp nguyên liệu:dung môi là 100:1 (g/L), trong đó, việc chiết này được lặp lại 3 lần;
- bước 4, chưng cất tạo chế phẩm cao chiết bằng cách gộp các dịch chiết, lọc qua giấy lọc, gộp 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 Hoàng liên, cây Đẳng sâm, cây Bạch truật, cây Xoài và cây Nghệ.

2. Chế phẩm cao chiết gồm các thành phần Hoàng liên, cây Đẳng sâm, cây Bạch truật, cây Xoài và cây Nghệ dùng để điều trị bệnh viêm đại tràng mãn tính, trong đó chế phẩm cao chiết này thu được từ quy trình theo điểm 1.