



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

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



1-0037249

(51)^{2022.01} A61K 36/73; A61K 36/48; A61K 36/82; (13) B
A61K 36/45; A61K 36/61

(21) 1-2019-02304

(22) 01/11/2017

(86) PCT/EP2017/077956 01/11/2017

(87) WO 2018/083115 11/05/2018

(30) 1660588 02/11/2016 FR; 16197217.9 04/11/2016 EP

(45) 25/10/2023 427

(43) 25/10/2019 379A

(73) Alphanosos S.A.S. (FR)

20-22 rue Henri et Gilberte Goudier - Zone Industrielle La Varenne, Riom, 63200, France

(72) Pascal MAYER (FR); Laure BREUILS (FR).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) CHIẾT XUẤT CỦA CHẾ PHẨM THẢO DƯỢC DƯỚI DẠNG CHẤT KHÁNG VI SINH VẬT VÀ/HOẶC CHẤT CHỐNG TẠO MÀNG SINH HỌC VÀ QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ CHIẾT XUẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm ít nhất hai loại thực vật khô khác nhau hữu dụng dưới dạng chất kháng vi sinh vật và/hoặc chất chống tạo màng sinh học trong việc điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm vi sinh vật gây ra bởi vi khuẩn, ví dụ như Escherichia, Klebsiella, Listeria, Pseudomonas, Salmonella, Streptococcus hoặc Staphylococcus, hoặc bởi nấm, chẳng hạn như được mô tả trong bản mô tả này. Đã thấy rằng trong các chiết xuất này, các thành phần hoạt tính tạo ra tác dụng sinh học của chúng theo kiểu hiệp đồng. Chiết xuất có thể tạo thành thành phần hoạt tính của thực phẩm bổ sung, dược thực phẩm, dược phẩm hoặc mỹ phẩm hoặc thực phẩm chức năng hoặc phụ gia thực phẩm. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình điều chế chiết xuất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm ít nhất hai loại thực vật khô khác nhau hữu dụng dưới dạng chất kháng vi sinh vật và/hoặc chất chống tạo màng sinh học. Cũng đã thấy rằng trong chiết xuất này thì các thành phần hoạt tính tạo ra tác dụng sinh học của chúng theo cách hiệp đồng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Giống như cơ thể sống bất kỳ, thực vật chứa nhiều chất hóa học, bao gồm các hợp chất khối lượng phân tử thấp, polypeptit, poly-sacarit, enzym. Bởi vậy chiết xuất thực vật là một ví dụ thông thường về hỗn hợp của các chất hóa học xuất hiện trong tự nhiên.

Hoạt tính sinh học và hoạt tính điều trị của nhiều hỗn hợp hóa học thu được từ các thực vật là đã biết từ lâu và được đề cập trong nhiều bản thảo (ví dụ xem, Encyclopedia of Herbal Medicine: The Definitive Home Reference Guide to 550 Key Herbs with all their Uses as Remedies for Common Ailments Hardcover – 15.11.2000, bởi Andrew Chevallier).

Khoa học hiện đại cho phép quan sát các tác dụng sinh học và tác dụng điều trị của sự kết hợp của chất hóa học thu được từ các thực vật trên nhiều sinh vật.

Ví dụ, Scheggi (Scheggi S. et al, Pharm. Biol. 2016 Jan 5:1-11. [Epub ahead of print]) mô tả cách mô hình chuột cho phép thử nghiệm tác dụng chống trầm cảm của sự kết hợp của các chất hóa học thu được từ các thực vật.

Zhipeng QU (Oncotarget. 2016 Sep 1 Epub) thể hiện cách có thể nhận biết cơ chế phân tử kháng ung thư lựa chọn của hợp chất tiêm Kushen (Compound Kushen Injection) bằng cách sử dụng hệ gen chức năng. Hợp chất tiêm Kushen (CKI) đã được sử dụng trên lâm sàng ở Trung Quốc trong hơn 15 năm để điều trị các loại khối u rắn khác nhau. Tuy nhiên, vì các chế phẩm thuốc cổ truyền Trung Quốc (Traditional Chinese Medicine - TCM) là các hỗn hợp phức tạp của các chất chuyển hóa thứ cấp ở thực vật,

nên cần nghiên cứu cơ chế phân tử cơ bản của chúng theo kiểu hệ thống. Nghiên cứu này cho thấy rằng CKI ức chế sự tăng sinh tế bào MCF-7 và gây chết tế bào theo chương trình theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Nhiều con đường đã được thấy bị nhiễu loạn và chu kỳ tế bào được nhận biết dưới dạng con đường đích chính tiềm năng của CKI ở tế bào MCF-7. CKI cũng có thể gây chết tế bào MCF-7 theo chương trình nhờ cơ chế độc lập p53. Ngoài ra, chúng nhận biết lncARN mới và cho thấy rằng nhiều loại trong số chúng có thể được biểu hiện dưới dạng đáp ứng với điều trị CKI.

Tác dụng của các hỗn hợp chất hóa học thu được ví dụ từ thực vật, nấm hoặc vi khuẩn lên sự phát triển của các vi sinh vật như vi khuẩn và nấm đã được mô tả nhiều lần, ví dụ trong Venkatadri (Venkatadri B. et al., Indian J. Pharm. Sci. 2015 Nov-Dec;77(6):788-91).

Tác dụng của các hỗn hợp chất hóa học thu được ví dụ từ thực vật, nấm hoặc vi khuẩn lên sự tạo màng sinh học (quần thể vi sinh vật gắn trong chất nền polyme được gắn vào bề mặt) cũng đã được mô tả nhiều lần, ví dụ trong Süntar ((Suntar I. et al., Pharm. Biol. 2016 Jun;54(6):1065-70Epub 2015 Oct 29).

Shimizu M. và cộng sự (Antimicrob Agents Chemother. 11.2001;45(11):3198-201) tìm thấy rằng chiết xuất của *Arctostaphylos uva-ursi* làm giảm rõ rệt nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) của chất kháng sinh beta-lactam, như oxaxilin và cefmetazol, đối với *Staphylococcus aureus* kháng metixilin. Nhóm tương tự cũng được tách hợp chất hiệu quả và nhận biết nó dưới dạng corilagin.

Nhóm khác (Denev P. et al., Acta Biochim. Pol. 2014;61(2):359-67. Epub 2014 Jun 18) nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa, kháng vi sinh vật và hoạt tính điều biến bạch cầu trung tính của các chiết xuất từ sáu loại thảo dược – lá cây mâm xôi (*Rubus fruticosus*), lá cây anh đào dại (*Aronia melanocarpa*), lá cây táo gai (*Crataegus monogyna*), phần trên không của cây áo choàng quý bà (*Alchemilla glabra*), phần trên không của cây râu dê (*Filipendula ulmaria*) và lá cây phúc bồn tử (*Rubus idaeus*). Hoạt tính kháng vi sinh vật của các chiết xuất nghiên cứu đối với 11 tác nhân gây bệnh cho người được nghiên cứu bằng cách sử dụng ba phương pháp khác nhau và các kết quả của nghiên cứu này cho phép kết luận rằng chiết xuất lá cây râu dê và lá cây mâm xôi có tác dụng kháng vi sinh vật cao nhất và nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) thấp nhất đối với các vi sinh vật thử nghiệm.

Yam T. và cộng sự (FEMS Microbiol Lett. 1997 Jul 1;152(1):169-74) tập trung nghiên cứu hoạt tính vi sinh của toàn bộ và chiết xuất thô phân đoạn của chè (*Camellia sinensis*), và của các thành phần của chè. Chiết xuất dạng nước của chè (*Camellia sinensis*) thuộc các loại khác nhau và từ các nguồn khác nhau được thử nghiệm và được thấy ức chế một phạm vi rộng vi khuẩn gây bệnh, bao gồm *Staphylococcus aureus* kháng metixilin. Các chiết xuất của chè có tính diệt khuẩn với *staphylococcus* và *Yersinia enterocolitica* ở nồng độ thấp hơn nhiều nồng độ ưa thích. Hoạt tính hạn chế ở một trong bốn phân đoạn thu được từ chiết xuất chè xanh bằng phương pháp sắc ký phân đoạn. Thử nghiệm các hợp chất trong chè nguyên chất và các hóa chất có liên quan gần gợi ý rằng hoạt tính kháng vi sinh vật của các chiết xuất của chè xanh có thể được giải thích bởi hàm lượng epigallocatechin, epigallocatechin galat và epicatechin galat của nó. Trong chiết xuất chè đen, theaflavin và galat của chúng là các thành phần hoạt tính kháng vi sinh vật bổ sung.

WO 2009/031041 đề cập đến chế phẩm chứa (a) hợp chất kháng vi sinh vật có công thức cấu trúc hóa học nhất định, (b) chất kháng vi sinh vật được chọn từ lantionin bacterioxin, chiết xuất chè [*Camellia sinensis*], chiết xuất hublông [*Humulus lupulus* L], chiết xuất vỏ nho, chiết xuất hạt nho, chiết xuất *Uva Ursi* [*Arctostaphylos uva-ursi*] và sự kết hợp của chúng.

WO 99/20289 đề cập đến dung dịch chiết thảo dược trong suốt chứa chiết xuất thảo dược cô đặc và chất lỏng làm đầy. Chiết xuất thảo dược cô đặc được báo cáo là được chọn từ danh sách dài các chiết xuất thực vật, trong đó danh sách này bao gồm *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* và *Arctostaphylos uva-ursi*. Tuy nhiên, WO 99/20289 không đề cập đến việc sử dụng điều trị hoặc sử dụng y khoa cụ thể bất kỳ của dung dịch thảo dược yêu cầu bảo hộ.

US 2015/0056255 đề cập đến sản phẩm để sử dụng làm thuốc, mỹ phẩm, tạo màu hoặc sử dụng ngoài da, sản phẩm này bao gồm lớp sản phẩm thực vật dạng sợi và chiết xuất thực vật được áp dụng lên lớp sản phẩm thực vật dạng sợi này. Chiết xuất thực vật được nói rằng chứa các chất từ một hoặc nhiều phần cụ thể của một hoặc nhiều loại thực vật, trong đó các thực vật được chọn từ ít nhất một trong số danh sách dài các thực vật.

Azanida NN (Med. Aromat. Plants, 4:3, p.1-6, 2015) công bố bài đánh giá, mà đề cập đến sự mô tả và so sánh các phương pháp sử dụng phổ biến nhất để điều chế chiết

xuất thực vật dùng làm thuốc. Các tác giả sáng chế kết luận bài báo của họ bằng tuyên bố rằng "không có phương pháp chiết nào trên thế giới là phương pháp lý tưởng và mỗi phương thức chiết là duy nhất với một loại thực vật" (xem kết luận « Conclusions\», dòng 5-7).

Selman A. Wachsman và cộng sự (Bacteriology, 31, p.157-164, 1945) nêu rằng các chủng khác nhau của cùng loài vi khuẩn có thể thay đổi lớn về tính kháng streptomycin của chúng. Các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* khác nhau được sử dụng tài liệu này để thử nghiệm hoạt tính của streptomycin. Tuy nhiên, không có chiết xuất thực vật nào được thử nghiệm trên cùng một chủng và do đó không có hướng dẫn rõ ràng nào có thể được đưa ra từ tài liệu này.

Tác dụng sinh học như dự tính trong các ví dụ trước có thể được tạo ra bởi một chất hóa học, như trong các thuốc chuẩn, hoặc bởi tác dụng hiệp đồng của các chất hóa học khác nhau, như trong chiết xuất. Trong một số trường hợp, tác dụng sinh học gần như hoàn toàn thuộc về một chất hóa học chứa trong chiết xuất. Trong trường hợp này, chiết xuất có thể được thay thế bằng chất hóa học nguyên chất có hoạt tính.

Tác dụng sinh học của chất hóa học có thể là do các phản ứng hóa học (biến đổi) với các chất hóa học tạo thành sinh vật hoặc là do liên kết tạm thời hoặc liên kết cố định với chất hóa học, cụ thể là các phân tử lớn, tạo thành sinh vật. Liên kết này sẽ điều biến hoạt tính của chất hóa học của sinh vật, cụ thể là các phân tử lớn, ví dụ, tăng hoặc giảm hoạt tính của enzym.

Không may là chất hóa học chưa từng có tác dụng đơn lên sinh vật. Cụ thể là, các tương tác với các thành phần cấu thành phân tử lớn là rất lớn. Dưới dạng một vấn đề thực tế, đã biết rõ rằng chất hóa học bất kỳ, cho dù tự nhiên hoặc thu được từ việc tổng hợp hóa học, sẽ có tác dụng có hại lên sinh vật (người, động vật, thực vật, vi thực vật địa phương, v.v.) theo kiểu có liên quan đến liều lượng. Cuối cùng, tác dụng tích cực hoặc tác dụng điều trị có liên quan đến liều lượng cũng có thể được quan sát thấy. Hiển nhiên là đối với chất hóa học có sự quan tâm công nghiệp, liều lượng yêu cầu để quan sát thấy tác dụng tích cực hoặc tác dụng điều trị cần thấp hơn so với liều lượng với đó tác dụng có hại trở nên không chấp nhận được.

Chất hóa học khác về thành phần hóa học hoặc cấu trúc của chúng sẽ có các ái lực (hoặc hằng số liên kết) khác nhau với các phân tử lớn khác nhau tạo thành sinh vật,

và bởi vậy các kiểu tác động khác nhau dẫn đến các tác dụng có hại, tác dụng tích cực và tác dụng điều trị được quan sát thấy.

Các phân tử lớn liên quan đến các tác dụng có hại và các phân tử lớn liên quan đến các tác dụng tích cực hoặc tác dụng điều trị là khác nhau trong nhiều trường hợp. Trong phần lớn các trường hợp, chất hóa học khác về thành phần hóa học của chúng sẽ có các ái lực (hoặc hằng số liên kết) khác nhau với các phân tử lớn khác nhau tạo thành sinh vật.

Trong phần lớn các trường hợp, chất hóa học khác nhau sẽ có các ái lực (hoặc hằng số liên kết) khác nhau với phân tử lớn nhất định. Trong các trường hợp hiếm gặp, các chất hóa học khác nhau sẽ có các ái lực (hoặc hằng số liên kết) tương tự với cùng một phân tử lớn hoặc nhóm các phân tử lớn có tác dụng tích cực hoặc tác dụng điều trị. Trong các trường hợp này, sẽ là hiếm để các chất hóa học này sẽ có các ái lực (hoặc hằng số liên kết) tương đương với các phân tử lớn có tác dụng có hại nhất định.

Bởi vậy, các hỗn hợp của các chất hóa học khác nhau có thể có tác dụng tích cực hoặc tác dụng điều trị hiệp đồng mà không có tác dụng có hại tích lũy nhất định. Bởi vậy, đối với tác dụng tích cực hoặc tác dụng điều trị nhất định, liều lượng cần thiết cho mỗi chất hóa học khác nhau riêng biệt trong hỗn hợp sẽ thấp hơn liều lượng cần thiết cho mỗi chất hóa học xem xét riêng biệt để thu được tác dụng tích cực hoặc tác dụng điều trị nhất định. Trong các trường hợp trong đó tác dụng có hại gây ra bởi mỗi hợp chất hóa học khác nhau là khác nhau hoặc có bệnh căn học phân tử lớn khác nhau, mỗi tác dụng có hại của hỗn hợp sẽ thấp hơn so với tác dụng có hại của chất hóa học xem xét riêng biệt vì được sử dụng ở liều lượng thấp hơn trong hỗn hợp.

Lưu ý rằng trường hợp hiệp đồng của việc sử dụng đồng thời các liều lượng giảm của các chất hóa học khác nhau là khác với việc cùng sử dụng các thuốc (các chất hóa học) khác nhau có các tác dụng điều trị khác nhau được sử dụng ở các liều lượng tiêu chuẩn của chúng. Trong trường hợp sau này, các tác dụng phụ tăng do các tương tác thuốc là đã biết rõ. Một trong số nguyên nhân của tác dụng phụ là tương tác hóa học có thể có của các thuốc (các chất hóa học) khác nhau. Trong trường hợp hiệp đồng, mỗi chất hóa học có mặt ở nồng độ giảm và bởi vậy có tốc độ tương tác hóa học thấp hơn nhiều. Với mục đích minh họa, hỗn hợp hiệp đồng gồm 10 chất hóa học (thuốc) khác nhau sử dụng mỗi chất hóa học ở nồng độ 1/10 (liều lượng) cần thiết đối với chất hóa

học (thuốc) sử dụng riêng biệt, tốc độ các phản ứng hóa học giữa các thuốc sẽ bị giảm bởi hệ số bằng 100 như bao hàm bởi định luật chung về tác động của khối lượng.

Do đó có sự quan tâm về việc sử dụng các hỗn hợp hiệp đồng của các chất hóa học khác nhau để thu được tác dụng tích cực hoặc tác dụng điều trị nhất định với tác dụng có hại giảm, hoặc thu được tác dụng tích cực hoặc tác dụng điều trị tăng với mức nhất định của các tác dụng có hại khác nhau. Thực vậy, một số chiết xuất được biết có các hoạt tính hiệp đồng so với các chất hóa học tách biệt (ví dụ xem, Deharo E. et al, Malar. J. 2011 Mar 15;10 Suppl 1:S5).

Các chiết xuất tự nhiên tạo bởi hỗn hợp của các chất hóa học hiệp đồng có thể được phát hiện ví dụ bởi việc thử nghiệm hệ thống nhiều chiết xuất tự nhiên của một bột thực vật hoặc các chế phẩm thảo dược chứa ít nhất hai hoặc nhiều loại bột thực vật khác nhau.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Giờ đây đã thấy rằng chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm ít nhất hai loại thực vật khô được chọn từ *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* và *Arctostaphylos uva-ursi* là hữu dụng dưới dạng chất kháng vi sinh vật và/hoặc chất chống tạo màng sinh học trong việc điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm vi sinh vật gây ra bởi vi khuẩn, ví dụ như *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus* hoặc *Staphylococcus*, hoặc bởi nấm, ví dụ như *Candida*. Cũng đã thấy rằng trong các chiết xuất này, các thành phần hoạt tính tạo ra tác dụng sinh học của chúng theo kiểu hiệp đồng.

Do đó, một đối tượng của sáng chế là phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm vi sinh vật nêu trên bao gồm việc dùng lượng có hiệu quả của chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm ít nhất hai loại thực vật khô được chọn từ *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* và *Arctostaphylos uva-ursi*, chế phẩm đông khô của chiết xuất này, hoặc dược phẩm hoặc chế phẩm thú y chứa chiết xuất hoặc chế phẩm đông khô này, cho đối tượng cần điều trị.

Đối tượng khác của sáng chế là chiết xuất của chế phẩm thảo dược, bao gồm ít nhất hai loại thực vật khô được chọn từ *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* và *Arctostaphylos uva-ursi* và ít nhất một loại thực vật được chọn từ *Vitis vinifera* var.

tinctoria, *Eugenia caryophyllus* và *Desmodium adscendens*.

Chế phẩm thảo dược này có thể còn bao gồm một hoặc nhiều loại thực vật khô bổ sung được chọn từ:

Achillea millefolium, *Acorus calamus*, *Agrimonia eupatoria*, *Agropyrum repens*, *Agropyrum repens*, *Alchemilla vulgaris*, *Alkanna tinctoria*, *Althaea officinalis*, *Anethum graveolens*, *Angelica archangelica*, *Arbutus unedo*, *Arnica montana*, *Artemisia pontica*, *Artemisia vulgaris*, *Asparagus officinalis*, *Asparagus officinalis*, *Asperula odorata*, *Betula pendula*, *Borrigo officinalis*, *Buxus sempervirens*, *Calamintha officinalis*, *Calendula officinalis*, *Calluna vulgaris*, *Carum carvi*, *Cassia angustifolia*, *Centaurea cyanus*, *Centaureum erythraea*, *Centella asiatica*, *Cetraria islandica*, *Chamaemelum nobile*, *Chamomilla recutita*, *Chrysanthellum americanum*, *Cichorium endivia*, *Cichorium intybus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus aurantium*, *Combretum micranthum*, *Crataegus oxyacantha*, *Cuminum cyminum*, *Cupressus sempervirens*, *Curcuma zedoaria*, *Cynara scolymus*, *Cytisus scoparius*, *Elettaria cardamomum*, *Eleutherococcus senticosus*, *Epilobium parviflorum*, *Erysimum officinale*, *Eucalyptus globulus*, *Eupatorium cannabinum*, *Foeniculum vulgare*, *Fraxinus excelsior*, *Fucus vesiculosus*, *Fumaria officinalis*, *Galium odoratum*, *Gentiana lutea*, *Geranium robertianum*, *Ginkgo biloba*, *Glechoma hederacea*, *Glycyrrhiza glabra*, *Handroanthus impetiginosus*, *Harpagophytum procumbens*, *Hieracium pilosella*, *Humulus lupulus*, *Hypericum perforatum*, *Hyssopus officinalis*, *Illicium verum*, *Inula helenium*, *Juglans regia*, *Juniperus communis*, *Lamium album*, *Lavandula angustifolia*, *Levisticum officinale*, *Lippia citriodora*, *Lotus corniculatus*, *Lythrum salicaria*, *Malva sylvestris*, *Marrubium vulgare*, *Medicago sativa*, *Melissa officinalis*, *Mentha × piperita*, *Morus nigra*, *Myrtus communis*, *Olea europaea*, *Origanum majorana*, *Panax ginseng*, *Papaver rhoeas*, *Parietaria officinalis*, *Passiflora incarnata*, *Petroselinum crispum*, *Peumus boldus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pimpinella anisum*, *Plantago lanceolata*, *Plantago ovata*, *Potentilla anserina*, *Quercus robur*, *Rhamnus frangula*, *Rheum palmatum*, *Rosa centifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Rubia tinctorum*, *Rubus idaeus*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Sambucus nigra*, *Satureja montana*, *Silybum marianum*, *Solanum dulcamara*, *Tabebuia impetiginosa*, *Tanacetum vulgare*, *Taraxacum officinalis*, *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris*, *Tilia tomentosa*, *Tilia cordata*, *Trigonella foenum-graecum*, *Tussilago*

farfara, *Vaccinium myrtillus*, *Valeriana officinalis*, *Verbascum thapsus*, *Verbena officinalis*, *Viscum album*, *Zea mays* và *Zingiber officinale*.

Đối tượng khác của sáng chế là chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm từ ba đến bảy loại thực vật khô được chọn từ *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Desmodium adscendes*, *Eugenia caryophyllus* và *Eucalyptus globulus*, trong đó ít nhất hai trong số các loại thực vật này được chọn từ *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* và *Arctostaphylos uva-ursi* và ít nhất một trong số các loại thực vật này được chọn từ *Vitis vinifera tinctoria*, *Desmodium adscendes* và *Eugenia caryophyllus*.

Đối tượng khác của sáng chế là chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm các loại thực vật khô sau: *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria* và *Arctostaphylos uva-ursi*.

Đối tượng khác của sáng chế là chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm các loại thực vật khô sau: *Rheum palmatum*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria* và *Arctostaphylos uva-ursi*.

Đối tượng khác của sáng chế là chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm các loại thực vật khô sau: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Eugenia caryophyllus* và *Arctostaphylos uva-ursi*.

Đối tượng khác của sáng chế là chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm các loại thực vật khô sau: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Eucalyptus globulus*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Mentha spicata* và *Rubia tinctorium*.

Đối tượng khác của sáng chế là chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm ít nhất 14 hoặc 15 loại thực vật khô được chọn từ 16 loại thực vật sau: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Satureja montana*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Fucus vesiculosus*, *Foeniculum vulgare*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arbutus unedo*, *Eugenia caryophyllus*, *Juniperus communis*, *Combretum micranthum*, *Lippia citrodora* và *Tanacetum vulgare*.

Đối tượng khác của sáng chế là chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm các loại thực vật khô sau: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*,

Satureja montana, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Fucus vesiculosus*, *Foeniculum vulgare*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arbutus unedo*, *Eugenia caryophyllus*, *Juniperus communis*, *Combretum micranthum* và *Lippia citrodora*.

Đối tượng khác của sáng chế là chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm các loại thực vật khô sau: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Satureja montana*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Fucus vesiculosus*, *Foeniculum vulgare*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arbutus unedo*, *Eugenia caryophyllus*, *Juniperus communis*, *Combretum micranthum*, *Lippia citrodora* và *Tanacetum vulgare*.

Tất cả các chế phẩm thảo dược nêu trên cũng là đối tượng của sáng chế, dưới dạng các sản phẩm trung gian trong việc điều chế chiết xuất tương ứng.

Chiết xuất có thể tạo thành thành phần hoạt tính của thực phẩm bổ sung, dược thực phẩm, dược phẩm hoặc mỹ phẩm hoặc thực phẩm chức năng hoặc phụ gia thực phẩm.

Chiết xuất theo sáng chế có thể được sử dụng như vậy hoặc ở dạng khô hoặc dạng đông khô.

Thực phẩm bổ sung, dược thực phẩm, dược phẩm, chế phẩm thú y hoặc mỹ phẩm hoặc thực phẩm chức năng hoặc phụ gia thực phẩm chứa chiết xuất xác định ở trên cùng với các tá dược thích hợp là các đối tượng khác của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thực phẩm bổ sung, dược thực phẩm, dược phẩm, chế phẩm thú y hoặc mỹ phẩm hoặc thực phẩm chức năng hoặc phụ gia thực phẩm này có thể được bào chế ở dạng thích hợp bất kỳ, ví dụ, để dùng qua đường miệng, bao gồm các dạng rắn như bột, hạt, viên nang, viên tròn, viên nén (giải phóng thông thường hoặc giải phóng có kiểm soát), kẹo nhai, hoặc dạng lỏng như sirô, nhỏ giọt, cồn ngọt, dung dịch và huyền phù nói chung.

Ngoài ra, chiết xuất theo sáng chế có thể được kết hợp trong các chế phẩm khác, như kem, thuốc mỡ, gel, sữa, bột nhão, kem trên cơ sở nước, nhũ tương, tinh chất, mặt nạ, dạng sáp, dạng lỏng, dạng xịt, thuốc đạn, thuốc đạn đặt âm đạo, miếng dán da và

kem đánh răng, gel nha chu, nước súc miệng.

Theo sáng chế, thuật ngữ “chế phẩm thảo dược” dùng để chỉ bột chứa một hoặc nhiều loại thực vật khô đã nghiền khác nhau. Bột của một loại thực vật khô riêng lẻ có thể đã thu được từ toàn bộ cây hoặc tạo ra một phần cụ thể của nó, ví dụ, hoa, chồi, quả, thân, lá, hạt, rễ hoặc phần khác.

Theo sáng chế, chiết xuất có thể thu được bằng cách ủ đơn giản chế phẩm thảo dược với dung môi chiết (có hoặc không có sự bổ sung đường) ở nhiệt độ phòng.

Các dung môi chiết thích hợp theo sáng chế là nước và tất cả các dung môi không chứa nước được cho phép sử dụng trong việc sản xuất thực phẩm và các thành phần thực phẩm. Ví dụ, theo Hướng dẫn 2009/32/EC danh sách của các dung môi không chứa nước này bao gồm propan, butan, etyl axetat, etanol, cacbon dioxit, axeton, nitơ oxit. Theo các phương án cụ thể của sáng chế, dung môi chiết được chọn từ nước, etanol, etyl axetat và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo phương án khác, chiết xuất có thể thu được bằng cách ủ chế phẩm thảo dược với dung môi chiết (có hoặc không bổ sung đường) và sau đó gia nhiệt, có hoặc không có ly tâm và lọc.

Theo phương án khác, chiết xuất chứa nước có thể thu được bằng cách ủ chế phẩm thảo dược với nước (có hoặc không bổ sung đường) và sau đó gia nhiệt (ví dụ bằng cách gia nhiệt chế phẩm lỏng thu được ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 134°C, tốt hơn nếu từ 119° đến 121°C, trong thời gian nằm trong khoảng từ 5 đến 60 phút, tốt hơn là từ 20 đến 30 phút).

Thuật ngữ “đường” ở đây dự định có nghĩa là đường loại dược phẩm hoặc dinh dưỡng, ví dụ như dextroza, lactoza, lactoza khan, manitol, sorbitol, maltoza, galactoza hoặc sucroza.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, đường này là sucroza.

Đường này có thể được sử dụng ở nồng độ thay đổi từ 1 đến 100 g/l, tùy ý từ 50 đến 75 g/l.

Thuật ngữ "thực phẩm bổ sung" ở đây có nghĩa là thực phẩm dự định để bổ sung cho khẩu phần thông thường và mà là nguồn chất dinh dưỡng cô đặc, như vitamin và khoáng chất, hoặc các chất khác có tác dụng dinh dưỡng hoặc tác dụng sinh lý, ở dạng liều đơn vị (cũng xem Hướng dẫn 2002/46/EC ngày 10.06.2002).

Thuật ngữ "thực phẩm chức năng" có nghĩa là bao gồm các thực phẩm khác biệt bởi các tác dụng bổ sung do sự có mặt của các thành phần (thường không phải chất dinh dưỡng) có trong tự nhiên hoặc được bổ sung, mà tương tác theo cách lựa chọn ít hay nhiều với một hoặc nhiều chức năng sinh lý của sinh vật (điều biến sinh học) dẫn đến tác dụng tích cực lên sự duy trì sức khỏe và/hoặc ngăn ngừa bệnh. Thực phẩm có thể được xem là 'chức năng', nếu được chứng minh một cách đầy đủ tác động có lợi của nó lên một hoặc nhiều chức năng của cơ thể, ngoài các tác dụng dinh dưỡng đầy đủ, để liên quan đến trạng thái khỏe mạnh và sức khỏe, hoặc để giảm nguy cơ bị bệnh. Tác dụng có lợi có thể bao gồm cả trong việc duy trì thúc đẩy trạng thái khỏe mạnh hoặc sức khỏe và/hoặc giảm nguy cơ tiến triển bệnh hoặc bệnh (xem AT Diplock et al: Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document, British Journal of Nutrition 1999, 81 (Suppl. 1), S1-S27).

Theo sáng chế, thuật ngữ “dược thực phẩm” được dự định có nghĩa là sản phẩm, mà không chỉ bổ sung cho khẩu phần, mà còn cũng trợ giúp ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh và/hoặc rối loạn. Thuật ngữ này được ra đời vào năm 1989 bởi Stephen L. DeFelice (MD, nhà sáng lập và chủ tịch của Quỹ cải tiến thuốc (Foundation for Innovation in Medicine - FIM)) kết hợp khái niệm "dinh dưỡng" và "dược".

Thuật ngữ "tá dược" ở đây được dự định dùng để chỉ các tá dược thông thường, tức là các hợp chất trợ với thành phần hoạt tính của chế phẩm.

Tá dược có thể được chia thành các loại chức năng khác nhau, phụ thuộc vào vai trò của chúng trong chế phẩm thu được, ví dụ ở dạng bào chế rắn chúng có thể có tác dụng làm chất pha loãng (ví dụ lactoza, xenluloza vi tinh thể), chất làm phân rã (ví dụ natri tinh bột glycolat, croscarmellose natri), chất kết dính (ví dụ PVP, HPMC), chất bôi trơn (ví dụ magie stearat), chất chảy (ví dụ SiO₂ dạng keo) hoặc chất tạo mùi thơm (ví dụ bạc hà, dầu chanh). Ở dạng bào chế lỏng, chúng có thể được tác dụng như dung môi, đồng dung môi hoặc chất hòa tan (ví dụ propylen glycol, glyxerol, etanol, sorbitol, dextroza), chất tạo đệm (ví dụ natri phosphat), chất kháng vi sinh vật (ví dụ kali sorbat), chất làm ướt (ví dụ polysorbat hoặc Tween), chất chống tạo bọt (ví dụ polydimetylsiloxan-silic dioxit), chất làm đặc (ví dụ metylxenluloza hoặc hydroxyetylxenluloza) hoặc chất tạo ngọt (ví dụ sorbitol, axesulfam-K).

Như đã nêu, chiết xuất theo sáng chế là chất kháng vi sinh vật và/hoặc chất chống

tạo màng sinh học và có lợi nếu được sử dụng trong việc điều trị, phòng ngừa và/hoặc chẩn đoán nhiễm vi sinh vật ở người và động vật.

Do đó đối tượng khác của sáng chế là sử dụng chiết xuất theo sáng chế trong việc sản xuất dược phẩm để điều trị, phòng ngừa hoặc chẩn đoán nhiễm vi sinh vật. Dược phẩm này có thể được hữu dụng cho người hoặc động vật.

Theo sáng chế, thuật ngữ “điều trị” hoặc “việc điều trị” được dự định có nghĩa là các hoạt động dùng để chữa, làm giảm bớt các triệu chứng hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý.

Thuật ngữ “phòng ngừa” hoặc “việc phòng ngừa” được dự định dùng để chỉ các hoạt động dùng để giảm đến mức tối thiểu tác động hoặc ảnh hưởng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý. Ví dụ trong trường hợp nhiễm vi sinh vật, phòng ngừa cụ thể ở đây có nghĩa là ngăn ngừa sự bám dính và xâm chiếm của vi sinh vật gây bệnh vào tế bào, mô và cơ quan.

Thuật ngữ “chẩn đoán” hoặc “việc chẩn đoán” được dự định dùng để chỉ các hoạt động dùng để nhận biết một loạt các thông số sinh lý để đánh giá sự có mặt và mức độ của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý xác định.

Thuật ngữ “chất kháng vi sinh vật” như được sử dụng ở đây có nghĩa là chất có thể ức chế sự phát triển của các tế bào vi sinh vật. Nếu các tế bào vi sinh vật là các tế bào vi sinh vật gây bệnh, chất kháng vi sinh vật có thể được sử dụng làm thành phần hoạt tính của dược phẩm hoặc chế phẩm thú y để điều trị nhiễm vi sinh vật ở người hoặc động vật.

Thuật ngữ “chất chống tạo màng sinh học” được sử dụng ở đây có nghĩa là chất mà có thể ức chế sự tạo màng sinh học bởi các tế bào vi sinh vật và/hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho sự phân tán của màng sinh học tạo thành trước. Trái với chất kháng vi sinh vật thông thường, chất chống tạo màng sinh học không tác động trực tiếp đến sự sống của vi sinh vật và bởi vậy mong đợi rằng sự kháng các chất này sẽ không diễn ra một cách dễ dàng.

Theo sáng chế, thuật ngữ “hiệp đồng” được dự định dùng để chỉ tác dụng hoặc hoạt tính sinh học (ở đây là kháng vi sinh vật hoặc chống tạo màng sinh học), được tạo ra bởi chiết xuất của chế phẩm thảo dược theo sáng chế (tức là bao gồm ít nhất hai loại thực vật khô được chọn từ *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* và *Arctostaphylos*

uva-ursi), mà lớn hơn tổng các tác dụng hoặc hoạt tính của các chiết xuất của các thực vật khô riêng lẻ tương ứng.

Tác dụng hoặc hoạt tính sinh học lớn hơn này có thể được minh họa, ví dụ, đối với sự ức chế sự sinh trưởng của sinh vật phù du (hoạt tính kháng vi sinh vật), đối với sự ức chế tạo màng sinh học (hoạt tính chống tạo màng sinh học) hoặc đối với nhiều chủng, trong đó một hoặc cả hai hoạt tính này có thể được nhận biết.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, sự nhiễm vi sinh vật gây ra bởi vi khuẩn, ví dụ như *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Streptococcus pyogenes*, hoặc bởi nấm, ví dụ như *Candida albicans*.

Theo phương án cụ thể khác của sáng chế, nhiễm vi sinh vật được gây ra bởi *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* hoặc *Staphylococcus pseudintermedius*.

Staphylococcus aureus, vi khuẩn gram dương cộng sinh là tác nhân gây bệnh chính mà có thể gây ra nhiều bệnh khác nhau ở người trong phạm vi từ nhiễm khuẩn da và mô mềm đến nhiễm khuẩn máu nặng, sốc độc tố hoặc viêm phổi. *Staphylococcus aureus* là nguyên nhân quan trọng của nhiễm khuẩn liên quan đến bệnh viện, và nhiều chủng bệnh viện của *Staphylococcus aureus* đã có tính kháng chất kháng sinh, cụ thể nhất là với metixilin. Vẫn chưa có vắc xin, nhưng các nỗ lực quan trọng được thực hiện để phát triển liệu pháp miễn dịch chủ động và thụ động đối với các đích *Staphylococcus aureus* khác nhau.

Để đánh giá các hoạt tính sinh học này đối với chiết xuất của sáng chế và đối với các mẫu thử so sánh, nhiều chủng khác nhau đã được sử dụng và sẽ được đề cập trong phần ví dụ.

Cụ thể là, các chủng vi khuẩn sau đã được sử dụng để thử nghiệm cả hoạt tính kháng vi sinh vật lẫn hoạt tính chống tạo màng sinh học của chiết xuất theo sáng chế.

ATCC 25923, cũng được biết dưới dạng Seattle 1945, là chủng *Staphylococcus aureus* được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu lý thuyết (được trích dẫn trong 627 công bố trong tháng 10.2016 (xem NIH-NCBI-Pubmed)). Hoạt động kháng chất kháng sinh

của nó đã được nghiên cứu kỹ (ví dụ xem, Reimer L.G. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 1981 Jun;19(6):1050-5).

ATCC 29213 cũng là chủng *Staphylococcus aureus* được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu lý thuyết (được trích dẫn trong 327 công bố trong tháng 10.2016 (xem NIH-NCBI-Pubmed)). Nó đã được sử dụng trong nghiên cứu màng sinh học (xem, ví dụ, Ceri H. et al., *J. Clin. Microbiol.* 1999 Jun;37(6):1771-6).

ATCC 1228 là chủng *Staphylococcus epidermidis* (được trích dẫn trong 101 công bố trong tháng 10.2016 (xem NIH-NCBI-Pubmed)). Điều lệ của luật liên bang (Federal Regulation: FDA) liệt kê chủng này dưới dạng sinh vật thử nghiệm ưu tiên đối với neomycin (cũng xem Robertson J.H. et al., *Appl. Microbiol.* 1971 Dec;22(6):1164-5).

ATCC 43300 là chủng *Staphylococcus aureus* được phân lập từ nghiên cứu lâm sàng (được trích dẫn trong 81 công bố trong tháng 10.2016 (xem NIH-NCBI-Pubmed), bao gồm Lubenko et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2008 Nov;62(5):1065-9).

Chủng *Staphylococcus aureus* Newman được phân lập vào năm 1952 từ sự nhiễm khuẩn người và đã được sử dụng rộng rãi trong các mô hình động vật nhiễm *Staphylococcus* do kiểu hình độc lực mạnh của nó (xem Baba T. et al., *Journal of bacteriology*, 190 :300-310 (2008)). Trái với MRSA có được từ bệnh viện (*Staphylococcus aureus* kháng metixilin), *Staphylococcus aureus* Newman chỉ có một số lượng nhỏ trình tự chèn vào (insertion sequence - IS) và không có yếu tố xác định tính kháng kháng sinh đã biết.

Các chủng khác sử dụng trong các ví dụ này cũng thường được sử dụng trong nghiên cứu lý thuyết hoặc trong công nghiệp để kiểm soát chất lượng (quality control - QC). Phần lớn chúng cũng kháng metixilin.

Để tham khảo ATCC 33591, xem Reyes N. et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2006 Aug;58(2):462-5, Epub 30.05.2006. Để tham khảo ATCC 33592, xem Teka A. et al., *BMC Complement Altern Med.* 2015 Aug 18;15:286. Để tham khảo NCTC 12493, xem Carey B.E. et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2006 Aug;58(2):455-7, Epub 20.06.2006. Để tham khảo ATCC 700698, xem Kirker K.R. et al., *Int. J. Antimicrob Agents*, 2015 Oct;46(4):451-5, Epub 09.07.2015. Để tham khảo ATCC 700699, xem Sy C.L. et al., *J. Clin. Microbiol.* 2016 Mar;54(3):565-8, Epub 16.12.2015. Để tham khảo ATCC 9144, xem Carson C.F. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002

Jun;46(6):1914-20. Để tham khảo ATCC BAA-44, xem Monecke S. et al., PLoS One. 2011 Apr 6;6(4):e17936. Để tham khảo ATCC 14990, xem Bernardo T.H. et al., Scientific World Journal. 2015;751791, Epub 03.06.2015). Để tham khảo ATCC 49444, xem Ramsey KJ et al., J Food Prot. (2010). Để tham khảo ATCC 60193, xem Petrikaite V et al., Medicina (Kaunas). 2007;43(8):657-63. Để tham khảo ATCC 11775, xem Usman H et al., Afr J Tradit Complement Altern Med. 2007 Jun 10;4(4):488-94. Để tham khảo ATCC 13883, xem Supardy NA et al., J Microbiol Biotechnol. 2012 Jun;22(6):872-81. Để tham khảo ATCC 33090, xem Le Marc Y et al., Int J Food Microbiol. 2002 Mar;73(2-3):219-37. Để tham khảo ATCC 19115, xem Vodnar DC., Chem Cent J. 2012 Jul 28;6(1):74. doi: 10.1186/1752-153X-6-74. Để tham khảo ATCC 27853, xem Reimer LG et al., Antimicrob Agents Chemother. 1981 Jun;19(6):1050-5. Để tham khảo ATCC 13076, xem Fioretto F et al., Braz J Med Biol Res. 2005 Aug;38(8):1259-65. Epub 30.07.2005. Để tham khảo ATCC 13311, xem Leguérinel I et al., Int J Food Microbiol. 2007 May 1;116(1):88-95. Epub 13.01.2007. Để tham khảo ATCC 27336, xem Chen S et al., Appl Environ Microbiol. 2013 Jul;79(13):4015-23. doi: 10.1128/AEM.00704-13. Epub 19.04.2013 Apr 19. Để tham khảo ATCC 43079, xem Farrow JA và Collins MD., Syst. Appl. Microbiol. 5: 483-493, 1984. Để tham khảo ATCC BAA-1323, xem Svensson Mikael D et al., Microbiology 148: 3933-3945, 2002.

Thực phẩm bổ sung, dược thực phẩm, dược phẩm hoặc mỹ phẩm của sáng chế có thể được bào chế một cách thích hợp đối với các đường dùng khác nhau. Các đường dùng này bao gồm: tai, má, da, răng, mũi, mắt, miệng, miệng-hầu, trực tràng, hô hấp (hít vào), dưới lưỡi, cục bộ hoặc âm đạo.

Nói chung, các chế phẩm chứa chiết xuất theo sáng chế được sử dụng với "lượng có hiệu quả điều trị".

Đối với mục đích của phần mô tả này và yêu cầu bảo hộ sau, thuật ngữ "chứa" cũng bao gồm thuật ngữ "cơ bản gồm" hoặc "gồm".

Lượng chế phẩm dùng thực tế sẽ thường được xác định bởi bác sỹ, theo trường hợp có liên quan, bao gồm tình trạng cần được điều trị, đường dùng đã chọn, chế phẩm thực tế được dùng, tuổi, trọng lượng cơ thể và đáp ứng của từng đối tượng, mức nghiêm trọng của các triệu chứng của đối tượng và tương tự. Đối với chế phẩm bất kỳ, liệu có hiệu quả điều trị có thể được đánh giá ban đầu trong các thử nghiệm nuôi cấy tế bào

hoặc ở các mô hình động vật, thường là chuột nhắt, chuột, chuột lang, thỏ, chó, hoặc lợn.

Mô hình động vật cũng có thể được sử dụng để xác định khoảng nồng độ thích hợp và đường dùng. Tiếp đó, thông tin này có thể được sử dụng để xác định liều hữu dụng và đường dùng ở người. Trong việc tính liều tương đương ở người (Human Equivalent Dose - HED) đề xuất sử dụng bảng chuyển đổi có trong Sách hướng dẫn về công nghiệp và tài liệu người bình phẩm (2005, U.S. Food và Drug Administration, Rockville, Maryland, Hoa Kỳ).

Theo sáng chế, liều lượng chiết xuất để được dùng cho người có thể được điều chỉnh theo chế phẩm thảo dược dùng để điều chế nó và, do vậy lượng của thực vật khô riêng lẻ đã nghiền có trong chế phẩm thảo dược. Thông thường, từ 0,001 đến 500g của mỗi loại thực vật khô đã nghiền được dùng để bào chế chiết xuất cuối, tùy ý từ 0,01 đến 100 g. Chiết xuất này có thể được sử dụng như hoặc ở dạng đông khô, làm khô hoặc làm khô đông lạnh ở dạng chế phẩm cuối dùng để sử dụng cho người hoặc động vật hoặc có thể được pha loãng thêm.

Liều lượng có hiệu quả chính xác cho đối tượng người sẽ phụ thuộc vào mức nghiêm trọng của bệnh hoặc trạng thái, sức khỏe chung của đối tượng, tuổi, trọng lượng và giới tính của đối tượng, chế độ ăn kiêng, thời gian và tần suất sử dụng, các liệu pháp đồng thời khác, độ nhạy phản ứng và mức dung nạp/đáp ứng với liệu pháp. Lượng này có thể được xác định bằng thử nghiệm thông thường và trong sự đánh giá của bác sỹ lâm sàng.

Điều trị theo liều có thể là lịch biểu đơn liều hoặc lịch biểu đa liều.

Đối tượng khác của sáng chế là quy trình điều chế chiết xuất theo sáng chế. Quy trình này cơ bản bao gồm các bước sau:

- a) băm hoặc nghiền riêng biệt hoặc kết hợp ít nhất hai loại thực vật khô riêng lẻ để thu được bột thực vật tương ứng;
- b) trộn ít nhất hai loại bột thực vật khác nhau để thu được chế phẩm thảo dược;
- c) bổ sung dung môi chiết vào chế phẩm thảo dược này để thu được chế phẩm lỏng tương ứng (hoặc chiết xuất);
- d) ủ chế phẩm lỏng này ở nhiệt độ phòng trong thời gian nằm trong

khoảng từ 5 đến 15 phút; tùy ý,

e) gia nhiệt chế phẩm lỏng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 134°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 5 đến 60 phút; tùy ý,

f) ly tâm, thu gom phần dịch nổi và lọc phần dịch nổi đã thu gom; và, tùy ý,

g) cô đặc và/hoặc làm khô hoặc làm khô đông lạnh chế phẩm lỏng thu được từ bước e) hoặc f).

Theo sáng chế, thuật ngữ "chế phẩm đông khô" sẽ dùng để chỉ cả chiết xuất được làm khô đông lạnh (khử-khử nước) và chiết xuất được làm khô theo sáng chế.

Các loại thực vật khô riêng lẻ là các sản phẩm thương mại mà có thể được mua dưới dạng một phần của tập hợp thực vật khô của nhà thuốc hoặc cửa hàng thảo dược. Danh sách của tập hợp thực vật khô có sẵn ở mỗi nhà thuốc hoặc cửa hàng thảo dược lựa chọn và thực vật khô có trong tập hợp này có thể thay đổi từ nước này sang nước khác.

Ví dụ, Bỉ, Pháp và Ý, quyết định vào năm 2012 kết hợp bắt buộc để phát triển danh mục thực vật chung, sự sử dụng của chúng có thể được cho phép, với điều kiện là các nhà sản xuất đáp ứng các yêu cầu chất lượng theo luật châu Âu (EC Regulation 852/2004). Nhờ sự làm việc chăm chỉ của ba chuyên gia được công nhận (Robert Anton, Luke Delmulle và Mauro Serafini) dự án này dẫn đến việc thành lập danh sách gồm 1029 loại thực vật và 11 loại nấm (xem danh mục BelFrIt at

http://www.economie.gouv.fr/files/files/directions_services/dgccrf/imgs/breve/2014/documents/harmonized_list_Section_A.pdf)

Dưới đây sáng chế sẽ được mô tả đối với các ví dụ không giới hạn sau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Danh sách thực vật sử dụng trong các ví dụ

Các thực vật và các phần của các thực vật trong danh sách sau đã được sử dụng trong các ví dụ khác nhau. Vì lý do nhất quán, mỗi thực vật được xác định bằng một mã được sử dụng khắp các ví dụ. Khối lượng tương ứng với 200 µl (thể tích của thìa định lượng) của bột thực vật cũng được thể hiện (Bảng 0-1). Thực vật khô loại dược dụng PA00 đến PB12 thu được từ “Pharmacie Fontgiève” (Clermont-Ferrand, Pháp) và thực vật khô loại dược dụng PB13 đến PD08 thu được từ “Pharmacie St Herem” (Clermont-

Ferrand, Pháp). Khi được thể hiện trong ví dụ, các thực vật cũng thu được từ “Herboristerie Cailleau” (Chemillé, Pháp) hoặc từ Siccarapam (Aubiat, Pháp).

Bảng 0-1: Danh sách thực vật với các mã liên quan và khối lượng của bột cho một thìa định lượng

Mã thực vật	Tên thực vật học	Phần sử dụng	Khối lượng (g)	Mã thực vật	Tên thực vật học	Phần sử dụng	Khối lượng (g)
PA00	Sambucus nigra	hoa	0,0684	PB32	Tabebuia impetiginosa	vỏ cây	0,0775
PA01	Plantago afra	hạt	0,1357	PB33	Glechoma hederacea	phần trên không	0,0601
PA02	Equisetum arvense	phần trên không	0,0578	PB35	Cetraria islandica	phần trên không	0,0776
PA05	Aloysia citrodora	lá	0,0712	PB36	Rubus idaeus	lá	0,0553
PA06	Glycyrrhiza glabra	rễ	0,0774	PB38	Fraxinus excelsior	lá	0,1241
PA07	Camellia sinensis	lá	0,07	PB39	Lavandula angustifolia	hoa	0,0207
PA08	Solidago virg aurea	phần trên không	0,0394	PB41	Cassia angustifolia	quả	0,0568
PA10	Taraxacum officinale	rễ	0,0585	PB42	Fragaria vesca	lá	0,0692
PA11	Rheum palmatum	rễ và thân rễ	0,1016	PB45	Aspalathus linearis	lá	0,0684
PA12	Rosmarinus	lá	0,0545	PB46	Trigonella foenum-	hạt	0,1342

	officinalis				graecum		
PA13	Filipendula ulmaria	hoa	0,095	PB47	Foeniculum vulgare	quả	0,0818
PA14	Satureja montana	lá	0,0619	PB48	Alkanna tinctoria	rễ	0,0606
PA15	Calendula officinalis	cánh hoa	0,0383	PB49	Mentha spicata	lá	0,0694
PA16	Salvia officinalis	lá	0,0415	PB50	Eupatorium cannabinum	phần trên không	0,0529
PA17	Passiflora incarnata	phần trên không	0,0423	PB51	Echinacea purpurea	rễ	0,0915
PA18	Plantago lanceolata	lá	0,0626	PB55	Eucalyptus globulus	lá	0,0666
PA19	Tussilago farfara	cụm hoa	0,0494	PB57	Rosaxcentifolia	nụ	0,0819
PA20	Valeriana officinalis	rễ	0,1142	PB58	Solanum dulcamara	thân	0,0709
PA21	Camellia sinensis	lá	0,135	PB60	Arbutus unedo	lá	0,0891
PA22	Vitis vinifera var. tinctoria	lá	0,0762	PB61	Borrago officinalis	phần trên không	0,0754
PA23	Thymus vulgaris	lá	0,0373	PB76	Eleutherococcus senticosus	rễ	0,0571
PA24	Cassia angustifoli	lá non	0,0648	PB77	Cupressus semperviren	nhân	0,0862

	a				s		
PA25	Tilia cordata	dác gỗ	0,0391	PB78	Curcuma longa	rễ	0,0946
PA26	Thymus serpyllum	phần trên không	0,0442	PB79	Cuminum cyminum	quả	0,1109
PA27	Tilia tomentosa	lá bắc	0,0775	PB81	Salvia officinalis	lá	0,0536
PA28	Rubus idaeus	lá	0,0463	PB82	Salix alba	vỏ cây	0,0522
PA29	Fucus vesiculosus	màng mỏng	0,1702	PB83	Saponaria officinalis	phần trên không	0,0602
PA30	Lavandula angustifolia	hoa	0,0216	PB85	Lythrum salicaria	phần trên không	0,0581
PA31	Trigonella foenum-graecum	hạt	0,1043	PB86	Citrus limon (L) Burn.f.	vỏ quả	0,098
PA32	Lotus corniculatus	phần trên không	0,0497	PB88	Centella asiatica	phần trên không	0,0685
PA33	Handroanthus impetiginosus	vỏ cây	0,0814	PB92	Plantago ovata	hạt	0,1266
PA34	Viscum album	lá	0,0783	PB97	Agropyrum repens	thân rễ	0,0555
PA35	Fumaria officinalis	phần ngọn nở	0,0661	PB98	Cichorium intybus	lá	0,0715

		hoa					
PA36	Humulus lupulus	quả	0,0307	PB99	Potentilla anserina	lá	0,0298
PA37	Fraxinus excelsior	lá	0,0647	PC01	Quercus robur	vỏ cây	0,06
PA38	Cytisus scoparius	hoa	0,0253	PC02	Chelidonium majus	phần trên không	0,0608
PA39	Foeniculum vulgare	quả	0,081	PC04	Prunus cerasus	cuống	0,0199
PA40	Origanum majorana	lá	0,0345	PC06	Asparagus officinalis	rễ	0,0812
PA41	Citrus aurantium var. dulcis	lá	0,0574	PC08	Medicago sativa	hạt	0,113
PA44	Hyssopus officinalis	phần ngọn nở hoa	0,0677	PC11	Juglans regia	lá	0,0641
PA45	Mentha × piperita	lá	0,07	PC12	Olea europaea	lá	0,0561
PA46	Melissa officinalis	lá	0,0747	PC14	Myrtus communis	lá	0,0716
PA47	Fragaria vesca	toàn bộ cây	0,0692	PC15	Trifolium rubens	hoa	0,0484
PA48	Phaseolus vulgaris	quả	0,0608	PC17	Curcuma zedoaria	thân rễ	0,077
PA51	Marrubium vulgare	phần trên không	0,0457	PC19	Vitis vinifera var. tinctoria	lá	0,0695
PA52	Malva	hoa	0,0355	PC20	Eugenia	nhánh	0,0852

	sylvestris				caryophyllus		
PA53	Citrus aurantium var. dulcis	cánh hoa	0,0851	PC21	Althaea officinalis	rễ	0,0642
PA55	Ginkgo biloba	lá	0,0701	PC22	Alpinia officinarum	thân rễ	0,0658
PA57	Lamium album	hoa	0,0591	PC23	Ginkgo biloba	lá	0,0775
PA60	Olea europaea	lá	0,0572	PC24	Panax ginseng	rễ ngang	0,1782
PA61	Ilex paraguarie nsis	lá	0,0598	PC25	Zingiber officinale	thân rễ	0,078
PA62	Artemisia vulgaris	lá	0,0447	PC26	Juniperus communis	quả	0,0505
PA67	Epilobium parvifloru m	phần trên không	0,0549	PC27	Geranium robertianum	phần trên không	0,0639
PA69	Chamomil la recutita	cụm hoa	0,0399	PC28	Gentiana lutea	rễ	0,0992
PA70	Sisymbriu m officinale	phần trên không	0,0334	PC29	Rubia tinctorium	rễ	0,0868
PA72	Asparagus officinalis	rễ	0,0523	PC32	Jasminum officinale	hoa	0,0616
PA73	Pimpinella anisum	quả	0,0993	PC33	Combretum micranthum	lá	0,0769
PA74	Ribes nigrum	quả	0,0769	PC34	Satureja montana	lá	0,0715
PA75	Crataegus	phần	0,0656	PC35	Cassia	lá non	0,0881

	oxyacantha	ngọn nở hoa			angustifolia		
PA76	Chamaemelum nobile	cụm hoa	0,0193	PC36	Verbena officinalis	phần trên không	0,0603
PA79	Eucalyptus globulus	lá	0,0703	PC37	Lippia citrodora	lá	0,0813
PA80	Prunus cerasus	cuống	0,0141	PC38	Veronica officinalis	toàn bộ	0,0781
PA81	Acorus calamus	thân rễ	0,0631	PC41	Calendula officinalis	cánh hoa	0,0523
PA82	Calluna vulgaris	hoa	0,0493	PC42	Sambucus nigra	vỏ cây	0,0593
PA83	Papaver rhoeas	cánh hoa	0,0278	PC45	Solidago gigantea	phần trên không	0,0612
PA85	Cuminum cymimum	quả	0,102	PC49	Tanacetum vulgare	phần trên không	0,0577
PA86	Centaurea erythraea	phần trên không	0,0591	PC50	Galium odoratum	phần trên không	0,041
PA88	Vaccinium myrtillus	quả	0,0939	PC51	Rhamnus frangula	vỏ cây	0,0726
PA89	Vaccinium myrtillus	lá	0,0711	PC52	Betula alba	vỏ cây	0,0806
PA90	Angelica archangelica	quả	0,0388	PC53	Verbascum thapsus	vỏ cây	0,0435
PA92	Borago officinalis	hoa	0,067	PC54	Peumus boldus	lá	0,0695

PA93	Alchemilla vulgaris	phần trên không	0,0588	PC55	Centaurea cyanus	cánh hoa	0,0456
PA94	Artemisia pontica	phần ngọn nở hoa	0,431	PC57	Illicium verum	quả	0,1027
PA95	Illicium verum	quả	0,0793	PC58	Inula helenium	rễ	0,0904
PA96	Chrysanthellum americanum	phần trên không	0,0768	PC60	Cinnamomum zeylanicum	vỏ cây	0,1374
PA97	Harpagophytum procumbens	rễ	0,0853	PC61	Chamaemelum nobile	hoa	0,0316
PA98	Betula pendula	lá	0,0633	PC62	Calamintha officinalis	phần trên không	0,0726
PA99	Plantago lanceolata	phần trên không	0,0718	PC63	Arctostaphylosuva-ursi	lá	0,088
PB00	Agropyrum repens	thân rễ	0,0646	PC64	Ononis spinosa	rễ	0,0832
PB01	Carum carvi	quả	0,1089	PC65	Calluna vulgaris	hoa	0,0446
PB02	Buxus sempervirens	lá	0,0631	PC66	Morus nigra	lá	0,1032
PB03	Cichorium endivia	rễ	0,1513	PC67	Hypericum perforatum	phần ngọn nở	0,0829

						hoa	
PB04	Rosa canina	quả	0,1227	PC68	Achillea millefolium	phần ngọn nở hoa	0,0332
PB05	Silybum marianum	phần trên không	0,0502	PC70	Mentha × piperita	lá	0,071
PB06	Asperula odorata	phần trên không	0,062	PC71	Melissa officinalis	lá	0,0847
PB07	Desmodiu m adscenden s	lá	0,0493	PC72	Cochlearia officinalis	hoa	0,0497
PB08	Combretu m micranthu m	lá	0,0709	PC73	Malva sylvestris	hoa	0,0615
PB09	Peumus boldus	lá chết	0,0574	PC74	Cynara scolymus	lá	0,0458
PB10	Rhamnus frangula	vỏ cây	0,0682	PC75	Arnica montana	hoa	0,0254
PB11	Arctium lappa	rễ	0,1166	PC76	Artemisia vulgaris	phần trên không	0,0289
PB12	Arctostaph ylos uva -ursi	lá	0,122	PC78	Angelica archangelica	toàn bộ	0,0909
PB13	Cichorium	rễ	0,0924	PC79	Anethum	quả	0,1335

	intybus				graveolens		
PB14	Fragaria vesca	thân rễ	0,0529	PC82	Ballota nigra	phần trên không	0,0368
PB15	Citrus aurantium var. dulcis.	vỏ quả	0,0817	PC83	Origanum majorana	lá	0,0539
PB16	Elettaria cardamomum	quả	0,0606	PC84	Zea mays	đầu nhụy	0,0632
PB17	Althaea officinalis	lá	0,0302	PC86	Agrimonia eupatoria	phần trên không	0,0721
PB18	Malva sylvestris	lá	0,0809	PC88	Levisticum officinale	phần trên không	0,0848
PB19	Althaea officinalis	lá	0,0322	PC94	Phaseolus vulgaris	quả	0,0686
PB20	Tilia cordata	phần ngọn nở hoa	0,0596	PC97	Hieracium pilosella	phần trên không	0,0406
PB22	Betula pendula	lá	0,0609	PC98	Parietaria officinalis	phần trên không	0,0349
PB24	Tilia cordata	dác gỗ	0,0368	PC99	Passiflora incarnata	phần trên không	0,0817
PB25	Fucus vesiculosus	màng mỏng	0,1119	PD00	Rumex patientia	rễ	0,1208

PB26	Borago officinalis	hoa	0,0342	PD02	Petroselinum crispum	quả	0,1084
PB27	Vaccinium myrtillus	quả	0,1553	PD05	Urtica dioica	phần trên không	0,0584
PB28	Verbascum thapsus	hoa	0,045	PD06	Cola acuminata	nhân	0,1556
PB29	Citrus aurantium	cánh hoa	0,0477	PD07	Capsella bursa-pastoris	phần trên không	0,0535
PB31	Galega officinalis	phần trên không	0,0678	PD08	Centaurea erythraea	phần trên không	0,058

Phương pháp bào chế chế phẩm thảo dược (Phương pháp A)

Mỗi loại thực vật khô được nghiền bằng cách sử dụng máy nghiền hạt cà phê (Loại 8100, SEB, Pháp). Bột thu được (bột thực vật) được sàng bằng cách sử dụng sàng mắt lưới 2 mm và được bảo quản trong bình chứa dung tích 60 ml (Labbox, Pháp).

Hỗn hợp của các loại thực vật khô đã nghiền khác nhau (hoặc bột thực vật) được điều chế bằng cách thu gom thể tích cố định của bột thực vật bằng thìa định lượng cho phép thu gom 200 μ L bột. Khối lượng của thể tích đã thu gom phụ thuộc vào bột loại thực vật cụ thể (xem Bảng 0-1).

Các hỗn hợp trộn hoặc hỗn hợp này của các loại thực vật khô đã nghiền khác nhau (hoặc bột thực vật) cũng như các loại thực vật khô riêng lẻ ở đây sẽ được gọi là "chế phẩm thảo dược".

Phương pháp điều chế chiết xuất chứa nước (trong phần ví dụ này cũng được gọi là "mẫu thử đã xử lý", "chiết xuất" hoặc "chiết xuất hỗn hợp") (Phương pháp B)

Các chế phẩm thảo dược này được đưa vào ống falcon 50 ml (Falcon, Hoa Kỳ) và 20 ml hoặc 40 ml (như được thể hiện trong các ví dụ) dung dịch nước suối loại bổ dưỡng (Volvic, Pháp) chứa 100g/l sucroza loại bổ dưỡng (Daddy, Pháp) được bổ sung. Việc lựa chọn sucroza loại bổ dưỡng và nước chứ không phải thứ tương tự loại khoa

học của chúng được đặt ra bởi mục tiêu có được chế phẩm ăn được nằm trong nhóm “hương liệu” mà có thể được sử dụng trực tiếp theo Quy định (EC) số 1334/2008 ngày 16.12.2008 về hương liệu và các thành phần thực phẩm nhất định có tính tạo mùi thơm để sử dụng trong và trên thực phẩm.

Mỗi ống falcon chứa chế phẩm lỏng này được khuấy bằng cách sử dụng thiết bị trộn xoáy (ThermoFisher, Hoa Kỳ) trong 10 giây, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và được đưa vào nồi hấp (MED 12, JP Selecta, Tây Ban Nha) và được cho qua chu trình tiệt trùng 20 phút ở 119° hoặc 121°C, như được thể hiện. Sau khi làm nguội, chế phẩm đã tiệt trùng được giữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Khi thao tác, chế phẩm này được làm tan băng ở 37°C. Chế phẩm này được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút (Multifuge 35-R, Heraeus, Đức) hoặc ủ ở nhiệt độ phòng để lắng gạn (như được thể hiện trong các ví dụ). 2 mL phần dịch nổi được thu gom bằng bơm tiêm 10 mL và được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc 0,2µM (Minisart Syringe Filters, Sartorius, Đức) và được thu gom trên ống Eppendorf 2mL. Chế phẩm đã tiệt trùng còn lại được giữ ở -20°C để sử dụng thêm.

Các mẫu thử thu được này ở đây cũng sẽ được gọi là “mẫu thử đã xử lý” và sẽ được xác định bởi cùng một tên hoặc mã được đặt cho chế phẩm thảo dược tương ứng (ví dụ tên “Hỗn hợp[2P]-1” sẽ được sử dụng để xác định chế phẩm thảo dược và chiết xuất (hoặc mẫu thử đã xử lý) tương ứng, với đó hoạt tính sinh học được xác định). Phương pháp xác định hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học (phương pháp C)

Hoạt tính sinh học của mỗi mẫu thử đã xử lý được xác định bằng cách sử dụng các chủng được thể hiện trong mỗi thử nghiệm (hoặc ví dụ). Đối với mỗi phép đo, mỗi chủng vi khuẩn được bảo quản ở -80°C trên vòng hạt lạnh (Technical Service, Anh) được cấy trên đĩa aga TS (Tryptic Soy Broth, Sigma, Hoa Kỳ; Agar, Fisherbrand, Hoa Kỳ) và ủ ở 37°C qua đêm. Một số khuẩn lạc được thu gom bằng cách sử dụng vòng cấy và nằm lơ lửng trong dung dịch nước muối. Mật độ quang được đo và sự pha loãng được thực hiện trong canh TS để thu được nồng độ $2 \times 10^{5.5}$ vi khuẩn/mL đối với chủng *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus pseudintermedius*, 2×10^5 vi khuẩn/mL đối với *Staphylococcus epidermidis*.

Hoạt tính sinh học của mỗi mẫu thử đã xử lý được đo trên đĩa 96 giếng, bằng

cách sử dụng các chủng được thể hiện trong mỗi thử nghiệm (hoặc ví dụ) và mẫu đối chứng không có vi khuẩn. Mỗi giếng chứa 190 μ L canh TS được cấy với 10^{5.5} vi khuẩn/mL đối với chủng *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus pseudintermedius*, 10⁵ vi khuẩn/mL đối với *Staphylococcus epidermidis* (hoặc ở nồng độ được thể hiện trong các ví dụ đối với tất cả các loại khác) hoặc không có vi khuẩn đối với mẫu đối chứng và mẫu thử đã xử lý đã được pha loãng hoặc mẫu đối chứng âm (dung dịch sucroza ở 100g/l không có loại thực vật bất kỳ) ở nồng độ cuối 1:10, 1:20, 1:40 và 1:80 hoặc ở 1:20, 1:63 và 1:200 (như được thể hiện trong các ví dụ).

Mỗi đĩa được ủ trong 17 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ (HettCube 400, Hettich, Đức).

Việc đo được thực hiện trên cơ sở phân tích bằng phần mềm ImageJ (NIH, Hoa Kỳ) (nhưng phần mềm tương đương khác bất kỳ có thể được sử dụng) hình ảnh của các đĩa thu được bằng cách sử dụng máy quét tài liệu thương mại (V 220, Epson, Nhật Bản). Hình ảnh của các đĩa được bố trí vùng quét có được ở 600dpi bằng cách sử dụng phần mềm được cấp với máy quét. Đối với mỗi đĩa thì thu được 3 hình ảnh: hình ảnh thứ nhất, trước khi ủ (T0), hình ảnh thứ hai sau khi ủ 17 giờ (Tf), và hình ảnh thứ ba sau khi nhuộm màu tím tinh thể (Crystal Violet - CV) như được mô tả trong bài Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes (Agarwal, R.K. et al, International Food Research Journal 18(4):1493-1498, 2011).

Đối với mỗi giếng quan tâm, lần lượt từ hình ảnh thứ nhất, hình ảnh thứ hai và hình ảnh thứ ba, các vùng tròn của đường kính, lần lượt 14, 14 và 76 điểm ảnh, được định tâm so với giếng, khác biệt bởi việc sử dụng macro ImageJ để tính lần lượt giá trị trung bình M1 và M2 của các điểm ảnh cường độ nhỏ hơn 1% của vùng và giá trị trung bình M3 của tất cả các điểm ảnh của vùng. Độ đục của dung dịch vi khuẩn trong giếng được suy ra từ M1 và M2 bằng cách sử dụng đường cong tham chiếu thu được trong thử nghiệm độc lập trong đó giá trị trung bình của các điểm ảnh cường độ nhỏ hơn 1% của vùng đường kính 14 điểm ảnh được đo từ các giếng chứa các dung dịch vi khuẩn có độ đục đã biết. Mật độ quang của dung dịch tím tinh thể trong giếng được suy ra từ M3 bằng cách sử dụng đường cong tham chiếu thu được trong thử nghiệm độc lập trong đó giá trị trung bình của các điểm ảnh của vùng đường kính 76 điểm ảnh được đo từ các giếng chứa các dung dịch vi tím tinh thể có mật độ quang đã biết.

Đối với mỗi mẫu thử đã xử lý và vi khuẩn nhất định, MIC được xác định từ dung dịch pha loãng ức chế cao nhất (highest inhibitory dilution - HID) trong số 4 dung dịch được thử nghiệm (1:10, 1:20, 1:40, 1:80) của mẫu thử đã xử lý mà ngăn chặn sự xuất hiện phát triển nhìn thấy được trong 17 giờ. “0” là khi không một dung dịch thử nghiệm nào ngăn chặn sự phát triển vi khuẩn.

Đối với mỗi giếng chứa mẫu thử đã xử lý và vi khuẩn nhất định, tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du được thiết lập theo công thức dưới đây:

Ức chế sự phát triển của sinh vật phù du (%)

$$= \left(1 - \frac{Tf(\text{mẫu thử đã xử lý}) - T0(\text{mẫu thử đã xử lý})}{Tf(\text{mẫu đối chứng âm}) - T0(\text{mẫu đối chứng âm})} \right) * 100$$

trong đó Tf(mẫu thử đã xử lý) là độ đục từ hình ảnh thứ hai của giếng mẫu thử, T0(mẫu thử đã xử lý) là độ đục từ hình ảnh thứ nhất của giếng mẫu thử, Tf(mẫu đối chứng âm) là độ đục từ hình ảnh thứ hai của giếng chứa cùng một vi khuẩn mà không có mẫu thử đã xử lý, T0(mẫu đối chứng âm) là độ đục từ hình ảnh thứ nhất của cùng một giếng mẫu thử.

Đối với mỗi giếng chứa mẫu thử đã xử lý và vi khuẩn nhất định, tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học (inhibition of biofilm formation: IBF) được thiết lập theo công thức dưới đây:

Ức chế tạo màng sinh học (%)

$$= \left(1 - \frac{CV(\text{mẫu thử đã xử lý}) - CV(\text{mẫu thử đối chứng})}{CV(\text{đối chứng âm}) - CV(\text{mẫu thử đối chứng})} \right) * 100$$

trong đó CV(mẫu thử đã xử lý) là OD từ hình ảnh thứ ba của giếng mẫu thử, CV(mẫu đối chứng âm) là OD từ hình ảnh thứ ba của giếng chứa cùng một vi khuẩn không có mẫu thử đã xử lý, CV(mẫu thử đối chứng) là OD của hình ảnh thứ ba của giếng chứa cùng một mẫu thử hoặc mẫu đối chứng âm ở cùng một mức pha loãng không có vi khuẩn bất kỳ. Trị số âm của IBF nghĩa là hỗn hợp thử nghiệm thúc đẩy sự tạo màng sinh học.

Ví dụ 1

Ví dụ này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học đồng thời đối với *Staphylococcus aureus* của chế phẩm mô tả gồm 2 thực vật trong số 3 thực vật: *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Arctostaphylos uva-ursi*. Thực vật khô loại

được dụng thu được từ “Herboristerie Cailleau” (Chemillé, Pháp).

Bắt đầu từ ba loại bột thực vật khác nhau này thì sáu chế phẩm thảo dược được bào chế theo phương pháp A đã nêu ở trên, lượng của chúng được thể hiện trong Bảng 1-1.

Bảng 1-1: Các chế phẩm thảo dược của mẫu thử đã xử lý

Chế phẩm thảo dược	PA13 (số thìa)	PA21 (số thìa)	PB12 (số thìa)
PA13	1		
PA21		1	
PB12			1
Hỗn hợp[2P]-1	1	1	
Hỗn hợp[2P]-2		1	1
Hỗn hợp[2P]-3	1		1

Như được thể hiện trên bảng 1-1, ba chế phẩm thảo dược thứ nhất chỉ chứa bột gồm một loại thực vật, trong khi ba chế phẩm cuối chứa hai trong số các bột gồm ba loại thực vật khác nhau.

Bắt đầu từ mỗi chế phẩm thảo dược nêu trong bảng 1-1 mẫu thử đã xử lý tương ứng được bào chế theo phương pháp B nêu ở trên bằng cách sử dụng 20mL nước chứa 100g/l sucroza để chiết bằng nước và bao gồm bước ly tâm trước khi lọc.

Tỷ lệ phần trăm ức chế phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và ức chế tạo màng sinh học của mẫu thử đã xử lý của 2 hỗn hợp thực vật và các loại thực vật riêng biệt được kết hợp của ví dụ 1 này ở mức pha loãng 1:10 được xác định bằng cách sử dụng các chủng *Staphylococcus aureus* sau: ATCC 25923 và ATCC 29213, theo phương pháp C nêu ở trên và được nêu trong Bảng 1-2.

Bảng 1-2: Sự ức chế phát triển sinh vật phù du và tạo màng sinh học (IBF) của mẫu thử hỗn hợp 2 loại thực vật đã xử lý và mẫu thử đã xử lý của 1 loại thực vật ở mức pha loãng 1:10

		PA13	PA21	Hỗn hợp[2P]-1
ATCC 25923	Ức chế phát triển sinh vật phù du	20%	26%	82%
	Ức chế tạo màng sinh học	32%	44%	78%

ATCC 29213	Ức chế phát triển sinh vật phù du	16%	27%	100%
	Ức chế tạo màng sinh học	33%	17%	85%
		PA21	PB12	Hỗn hợp[2P]-2
ATCC 25923	Ức chế phát triển sinh vật phù du	26%	17%	104%
	Ức chế tạo màng sinh học	44%	51%	88%
ATCC 29213	Ức chế phát triển sinh vật phù du	27%	8%	100%
	Ức chế tạo màng sinh học	17%	28%	83%
		PA13	PB12	Hỗn hợp[2P]-3
ATCC 25923	Ức chế phát triển sinh vật phù du	20%	17%	82%
	Ức chế tạo màng sinh học	32%	51%	93%
ATCC 29213	Ức chế phát triển sinh vật phù du	16%	8%	66%
	Ức chế tạo màng sinh học	33%	28%	78%

PA13, PA21 và PB12 có tác dụng kháng sinh đã biết. Mức ức chế sự phát triển sinh vật phù du ($< 27\%$) và tạo màng sinh học ($< 51\%$) hạn chế được đo ở mức pha loãng 1:10, trong khi đó, 3 chế phẩm thơm gồm chiết xuất của hỗn hợp 2 loại thực vật thể hiện tác dụng kháng vi sinh vật ($> 66\%$) và tác dụng chống tạo màng sinh học ($> 78\%$) trên cả hai chủng thử nghiệm, ATCC 25923 và ATCC 29213.

Đối với tất cả các hỗn hợp (Hỗn hợp[2P]-1, Hỗn hợp[2P]-2, Hỗn hợp[2P]-3), tác dụng hiệp đồng của 2 loại thực vật được quan sát thấy đối với tác dụng kháng vi sinh vật trên 2 chủng thử nghiệm.

Ví dụ so sánh 1

Dưới dạng ví dụ so sánh, sáng chế thể hiện hoạt tính của một số mẫu thử đã xử lý, mà đã được thấy không có hoặc có hoạt tính kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học kém đối với *Staphylococcus aureus* và thu được từ các chế phẩm thảo dược tương ứng chứa 2 loại bột thực vật khác nhau.

Năm mẫu thử đã xử lý được lập lại bằng cách sử dụng 2 loại bột thực vật bổ sung: PA74 (bột quả *Ribes nigrum*) và PC72 (bột hoa *Cochlearia officinalis*).

Các loại bột thực vật khô riêng lẻ được xử lý như được mô tả trong ví dụ 1 và năm chế phẩm thảo dược được bào chế theo phương thức nêu trong phương pháp A được mô tả ở trên. Năm chế phẩm thảo dược này có hàm lượng nêu trong bảng 1-3.

Bảng 1-3: Chế phẩm thảo dược của mẫu thử đã xử lý

Chế phẩm thảo dược	PA74 (số thìa)	PC72 (số thìa)	PA13 (số thìa)	PA21 (số thìa)
PA74	1			
PC72		1		
Hỗn hợp 1	1	1		
Hỗn hợp 2	1		1	
Hỗn hợp 3		1		1

Mỗi chế phẩm thảo dược được xử lý theo phương thức nêu trong phương pháp B để đạt được mẫu thử đã xử lý tương ứng bằng cách sử dụng 20mL nước chứa 100g/l sucroza để chiết bằng nước và bao gồm bước ly tâm trước khi lọc.

Hoạt tính sinh học của mỗi mẫu thử đã xử lý được xác định bằng cách sử dụng các chủng *Staphylococcus aureus* sau: ATCC 25923 và ATCC 29213, theo phương pháp C được mô tả ở trên.

Tỷ lệ phần trăm ức chế phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và ức chế tạo màng sinh học của mẫu thử đã xử lý gồm 2 loại hỗn hợp thực vật và các loại thực vật riêng biệt được kết hợp ở mức pha loãng 1:10 được nêu trong bảng 1-4.

Bảng 1-4: Sự ức chế phát triển sinh vật phù du và tạo màng sinh học (IBF) của mẫu thử đã xử lý hỗn hợp 2 loại thực vật và mẫu thử đã xử lý một loại thực vật ở mức pha loãng 1:10

		PC72	PA74	Hỗn hợp 1
ATCC 25923	Ức chế phát triển sinh vật phù du	-9%	0%	-3%
	Ức chế tạo màng sinh học	12%	36%	24%
ATCC 29213	Ức chế phát triển sinh vật phù du	-10%	-7%	-6%
	Ức chế tạo màng sinh học	13%	5%	-2%

		PA13	PA74	Hỗn hợp 2
ATCC 25923	Ức chế phát triển sinh vật phù du	20%	0%	19%
	Ức chế tạo màng sinh học	32%	36%	48%
ATCC 29213	Ức chế phát triển sinh vật phù du	16%	-7%	13%
	Ức chế tạo màng sinh học	33%	5%	37%

		PA21	PC72	Hỗn hợp 3
ATCC 25923	Ức chế phát triển sinh vật phù du	26%	-9%	25%
	Ức chế tạo màng sinh học	44%	12%	51%
ATCC 29213	Ức chế phát triển sinh vật phù du	27%	-10%	18%
	Ức chế tạo màng sinh học	17%	13%	29%

PC72 và PA74 và hỗn hợp kết hợp 1 thể hiện không có hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học hạn chế trên cả hai chủng thử nghiệm ở mức pha loãng 1:10. Trong mỗi trường hợp, không thấy tác dụng hiệp đồng.

Đối với tất cả sự kết hợp chứa PA13 và PA21 (Hỗn hợp 2 và 3), không thấy tác dụng hiệp đồng đối với tác dụng kháng vi sinh vật trên 2 chủng thử nghiệm ở mức pha loãng 1:10, khi sự kết hợp này cũng chứa PC72 hoặc PA74.

Cần lưu ý rằng cả *Ribes nigrum* lẫn *Cochlearia officinalis* được biết có tác dụng kháng vi sinh vật.

Ví dụ so sánh này thể hiện rằng không có sự kết hợp ngẫu nhiên bất kỳ giữa các thực vật khô riêng lẻ có hoạt tính kháng vi sinh vật và/hoặc hoạt tính chống tạo màng sinh học đã biết cho phép thu được chiết xuất chứa nước, trong đó hoạt tính hiệp đồng được thấy.

Ví dụ 2

Ví dụ này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học đồng thời đối với *Staphylococcus aureus* của các chiết xuất chứa nước khác nhau thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 2 thực vật trong số 3 thực vật nêu trong ví dụ 1, khi các chiết xuất chứa nước này được điều chế theo các phương pháp khác nhau.

Thực vật khô loại được dụng thu được từ “Herboristerie Cailleau” (Chemillé, Pháp).

Hai mươi chế phẩm thảo dược, hàm lượng của chúng được nêu trong bảng 2-1

được bào chế theo phương pháp A nêu ở trên.

Bảng 2-1: Chế phẩm thảo dược của mẫu thử đã xử lý

Chế phẩm thảo dược	PA13 (số thìa)	PA21 (số thìa)	PB12 (số thìa)
Hỗn hợp 1		1	1
Hỗn hợp 2	1		1

Đối với mỗi chế phẩm thảo dược, 20 chế phẩm lỏng (nước) được điều chế như sau:

Bột đã thu gom được đưa vào hai mươi ống falcon 50 ml (Falcon, Hoa Kỳ). 20 ml dung dịch nước suối loại bổ dưỡng (Volvic, Pháp) chứa sucroza loại bổ dưỡng (Daddy, Pháp) với nồng độ 0, 25, 50, 75 hoặc 100g/l được bổ sung vào 4 ống flacon cho một nồng độ. Mỗi ống falcon chứa các chế phẩm lỏng này được khuấy bằng cách sử dụng thiết bị trộn xoáy (ThermoFisher, Hoa Kỳ) trong 10 giây, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, tiếp đó 4 sự xử lý nhiệt khác nhau được áp dụng với mỗi nồng độ:

- Pha lạnh (không gia nhiệt trước khi ly tâm và lọc):

sau khi ủ ở nhiệt độ phòng, chế phẩm được ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 10 phút (Multifuge 35-R, Heraeus, Đức), 2 mL phần dịch nổi được thu gom bằng bơm tiêm 10 mL và được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc 0,2 μ M (Minisart Syringe Filters, Sartorius, Đức) và được thu gom trên ống 2mL Eppendorf và được giữ ở -20°C cho đến khi sử dụng. Khi thao tác, chế phẩm được làm tan băng ở 37°C.

- Gia nhiệt ở 60°C trong 30 phút:

sau khi ủ ở nhiệt độ phòng, chế phẩm được đưa vào nồi hấp (VWR, Hoa Kỳ) và qua chu trình 20 phút ở 60°C. Sau khi làm nguội, chế phẩm đã xử lý được ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 10 phút (Multifuge 35-R, Heraeus, Đức), 2 mL phần dịch nổi được thu gom bằng bơm tiêm 10 mL và được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc 0,2 μ M (Minisart Syringe Filters, Sartorius, Đức) và được thu gom trên ống 2mL Eppendorf và được giữ ở -20°C cho đến khi sử dụng. Khi thao tác, chế phẩm được làm tan băng ở 37°C.

- Gia nhiệt ở 119°C trong 20 phút:

sau khi ủ ở nhiệt độ phòng, chế phẩm được đưa vào nồi hấp (VWR, Hoa Kỳ) và được cho qua chu trình tiệt trùng 20 phút ở 119°C. Sau khi làm nguội,

chế phẩm đã xử lý được giữ ở -20°C cho đến khi sử dụng. Khi thao tác, chế phẩm được làm tan băng ở 37°C , được ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 10 phút (Multifuge 35-R, Heraeus, Đức), 1 mL phần dịch nổi được thu gom bằng bơm tiêm 10 mL và được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc $0,2\mu\text{M}$ (Minisart Syringe Filters, Sartorius, Đức) và được thu gom trên ống 2mL Eppendorf.

Các mẫu thử này sẽ được gọi là “mẫu thử đã xử lý”.

Hoạt tính sinh học của mỗi mẫu thử đã xử lý được xác định bằng cách sử dụng chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, theo phương pháp C đã mô tả ở trên.

Tỷ lệ phần trăm phát triển vi khuẩn sinh vật phù du của 20 mẫu thử đã xử lý, được điều chế bắt đầu từ chế phẩm thảo dược sau mỗi sự xử lý nhiệt khác nhau nêu trên, ở mức pha loãng 1:10 được nêu trong bảng 2-2.

Bảng 2-2: Sự phát triển sinh vật phù du của ATCC 25923 với 20 mẫu thử đã xử lý ở mức pha loãng 1:10 được điều chế bắt đầu từ các chế phẩm thảo dược (Hỗn hợp 1 và Hỗn hợp 2 trên bảng 2-1)

Xử lý nhiệt	Nồng độ sucroza (g/l)	Hỗn hợp 1 Mẫu thử đã xử lý	Hỗn hợp 2 Mẫu thử đã xử lý
Pha lạnh	100	-4%	48%
	75	-3%	52%
	50	-4%	31%
	25	-4%	31%
	0	1%	0%
60°C 30 phút	100	0%	82%
	75	4%	83%
	50	1%	83%
	25	1%	86%
	0	-4%	16%
119°C 20 phút	100	103%	92%
	75	103%	91%
	50	70%	94%

	25	103%	99
	0	96%	99%

Tất cả mẫu thử đã xử lý được điều chế từ Hỗn hợp 1 thể hiện tác dụng kháng vi sinh vật trên ATCC 25923, chỉ sau khi xử lý nhiệt ở 119°, trong khi đó Hỗn hợp 2 thể hiện tác dụng kháng vi sinh vật hạn chế (ức chế từ 31 đến 52%) sau khi pha lạnh đối với tất cả các nồng độ của sucroza ngoại trừ trạng thái không có sucroza và sau khi tất cả các sự xử lý nhiệt độ đã thử nghiệm (ức chế > 82%) ngoại trừ trạng thái không có bổ sung sucroza được xử lý ở 60°C, với đó mẫu thử đã xử lý cho thấy mức ức chế phát triển sinh vật phù du chỉ 16%. Các sự xử lý nhiệt tăng cường tác dụng kháng vi sinh vật của Hỗn hợp 2. Sự xử lý nhiệt tối ưu trong số các sự xử lý được thử nghiệm đối với Hỗn hợp 1 và Hỗn hợp 2 là 119°C trong 20 phút.

Tác động của nồng độ sucroza lên tác dụng kháng vi sinh vật phụ thuộc vào sự xử lý nhiệt độ áp dụng. Đối với Hỗn hợp 1 được xử lý ở 119°C trong 20 phút, tác dụng kháng vi sinh vật tương tự thu được với nồng độ sucroza bằng 100, 75, 25 và 0 g/l, hoạt tính thấp hơn được thấy với 50 g/l. Đối với Hỗn hợp 2, tác dụng kháng vi sinh vật tương tự thu được bất kể nồng độ sucroza đối với sự xử lý ở 119°C.

Tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học (IBF) của 20 mẫu thử đã xử lý, được điều chế bắt đầu từ các chế phẩm thảo dược sau mỗi sự xử lý khác nhau thể hiện ở trên, ở mức pha loãng 1:10 được nêu trong bảng 2-3.

Bảng 2-3: Sự ức chế tạo màng sinh học (IBF) của ATCC 25923 với 20 mẫu thử đã xử lý ở mức pha loãng 1:10 được điều chế bắt đầu từ các chế phẩm thảo dược (Hỗn hợp 1 và Hỗn hợp 2 của Bảng 2-1)

Sự xử lý nhiệt	Nồng độ sucroza (g/l)	Hỗn hợp 1 Mẫu thử đã xử lý	Hỗn hợp 2 Mẫu thử đã xử lý	Sự xử lý nhiệt	Nồng độ sucroza (g/l)	Hỗn hợp 1 Mẫu thử đã xử lý	Hỗn hợp 2 Mẫu thử đã xử lý
Pha lạnh	100	34%	74%	119°C 20 phút	100	91%	89%
	75	29%	72%		75	91%	88%
	50	22%	60%		50	75%	89%
	25	30%	55%		25	92%	87%
	0	54%	50%		0	90%	89%

60°C 30 phút	100	48%	91%
	75	34%	94%
	50	26%	91%
	25	26%	88%
	0	48%	78%

Trong tất cả các trạng thái thử nghiệm, mẫu thử đã xử lý cho thấy tác dụng chống tạo màng sinh học nào đó.

Đối với Hỗn hợp 1, hoạt tính chống tạo màng sinh học hạn chế được quan sát thấy đối với tất cả các nồng độ của sucroza với sự pha lạnh và với sự xử lý nhiệt ở 60°C (ức chế từ 22 đến 55%). Hoạt tính chống tạo màng sinh học cao (ức chế > 90%) được quan sát thấy với sự xử lý nhiệt ở 119°C đối với tất cả nồng độ của sucroza ngoại trừ 50 g/l mà thể hiện ức chế 75%.

Đối với Hỗn hợp 2, hoạt tính chống tạo màng sinh học tương đương thu được bất kể nồng độ sucroza đối với các sự xử lý nhiệt ở 60°C và 119°C (ức chế > 77%). Sau khi pha lạnh, Hỗn hợp 2 cho thấy tác dụng chống tạo màng sinh học từ trung bình đến tốt (ức chế từ 50% đến 74%) phụ thuộc vào nồng độ sucroza: nồng độ sucroza càng cao thì chế phẩm có hoạt tính càng lớn.

Ví dụ 3

Ví dụ này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học đồng thời đối với *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus epidermidis* của 12 hỗn hợp chứa 2 đến 7 loại thực vật.

Thực vật khô loại được dụng thu được từ “Herboristerie Cailleau” (Chemillé, Pháp).

Các chế phẩm thảo dược chứa từ 2 đến 7 loại bột thực vật được bào chế bằng cách lấy thể tích cố định của bột thực vật bằng thìa định lượng cho phép lấy 200 µL bột.

12 chế phẩm thảo dược được bào chế như dưới đây (Bảng 3-1) theo phương pháp A đã được mô tả ở trên.

Bảng 3-1: Các chế phẩm thảo dược của mẫu thử đã xử lý

Các chế phẩm thảo dược	PA13 (số thìa)	PA21 (số thìa)	PB12 (số thìa)	PA11 (số thìa)	PA12 (số thìa)	PA22 (số thìa)	PA79 (số thìa)
------------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

Hỗn hợp[2P]-1	1	1					
Hỗn hợp[2P]-2		1	1				
Hỗn hợp[2P]-3	1		1				
Hỗn hợp[3P]-1	1	1	1				
Hỗn hợp[4P]-1	1	1	1	1			
Hỗn hợp[4P]-2	1	1	1		1		
Hỗn hợp[4P]-3	1	1	1			1	
Hỗn hợp[5P]-1	1	1	1		1	1	
Hỗn hợp[5P]-2	1	1	1	1		1	
Hỗn hợp[5P]-3	1	1	1	1	1		
Hỗn hợp[6P]-1	1	1	1	1	1	1	
Hỗn hợp[7P]-1	1	1	1	1	1	1	1

12 mẫu thử đã xử lý tương ứng được điều chế bắt đầu từ mỗi chế phẩm thảo dược theo phương pháp B đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng 20mL nước chứa sucroza với nồng độ 100g/l để chiết bằng nước và bao gồm bước ly tâm trước khi lọc.

Hoạt tính sinh học của mẫu thử đã xử lý được xác định bằng cách sử dụng các chủng *Staphylococcus aureus* sau: ATCC 25923, ATCC 29213, NCTC 12493, ATCC 33591, ATCC 33592, ATCC 43300, ATCC 700698, ATCC 700699, ATCC 9144 và ATCC BAA-44 và các chủng *Staphylococcus epidermidis* sau: ATCC 12228, ATCC 700296, ATCC 49461 và ATCC 14990, theo phương pháp C đã được mô tả ở trên.

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được thấy với 12 mẫu thử đã xử lý được thể hiện trên Bảng 3-2 ở dạng HID, cũng như hiệu quả trung bình trên tất cả các chủng của *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus epidermidis*.

Bảng 3-2: HID của 12 mẫu thử đã xử lý trên 10 chủng của *Staphylococcus aureus* và 4 chủng của *Staphylococcus epidermidis*

		Hỗn hợp[2P]-1	Hỗn hợp[2P]-2	Hỗn hợp[2P]-3	Hỗn hợp[3P]-1	Hỗn hợp[4P]-1	Hỗn hợp[4P]-2	Hỗn hợp[4P]-3	Hỗn hợp[5P]-1	Hỗn hợp[5P]-2	Hỗn hợp[5P]-3	Hỗn hợp[6P]-1	Hỗn hợp[7P]-1
S. aureus	ATCC 25923	10	10	10	10	10	10	10	10	10	20	10	20
	ATCC 29213	10	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	NCTC 12493	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	20	20
	ATCC 33591	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20
	ATCC 33592	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	10	20
	ATCC 43300	10	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	20
	ATCC 700698	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	10	20
	ATCC 700699	10	10	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	ATCC 9144	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	10	20
	ATCC BAA-44	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	20	20
	Mức trung bình	10,0	10,0	8,0	11,0	11,0	13,0	13,0	17,0	17,0	18,0	14,0	19,0
S.	ATCC 12228	10	10	10	20	20	20	20	20	20	20	20	40
	ATCC	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	40

700296													
ATCC 49461	10	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
ATCC 14990	10	20	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Mức trung bình	12,5	15	15	20	20	20	20	20	20	20	20	20	30
Mức trung bình tổng thể	10,7	11,4	10,0	13,6	13,6	15,0	15,0	17,9	17,9	18,6	15,7	22,1	

Vì trong ví dụ này trong phần lớn các trường hợp HID được thấy nằm trong khoảng từ 1:10 đến 1:20, mức pha loãng 1:20 được chọn là mức pha loãng tham chiếu để tính toán tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học. Tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du của 12 mẫu thử đã xử lý ở mức pha loãng 1:20 được thể hiện trên Bảng 3-3, cũng như hiệu quả trung bình trên toàn bộ các chủng của *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus epidermidis*.

Bảng 3-3: Ức chế sự phát triển sinh vật phù du của 12 mẫu thử đã xử lý trên 10 chủng của *Staphylococcus aureus* và 4 chủng của *Staphylococcus epidermidis* ở mức pha loãng 1:20

S.		Hỗn hợp[2P]-1	Hỗn hợp[2P]-2	Hỗn hợp[2P]-3	Hỗn hợp[3P]-1	Hỗn hợp[4P]-1	Hỗn hợp[4P]-2	Hỗn hợp[4P]-3	Hỗn hợp[5P]-1	Hỗn hợp[5P]-2	Hỗn hợp[5P]-3	Hỗn hợp[6P]-1	Hỗn hợp[7P]-1
	ATCC 25923	12%	12%	9%	11%	20%	11%	20%	34%	41%	35%	21%	96%
	ATCC	11%	11%	7%	11%	19%	11%	11%	33%	33%	33%	29%	45%

	29213												
	NCTC 12493	19%	8%	5%	25%	21%	101%	97%	98%	108%	108%	96%	100%
	ATCC 33591	12%	8%	8%	12%	19%	16%	34%	104%	107%	111%	83%	98%
	ATCC 33592	19%	15%	12%	18%	26%	23%	26%	86%	105%	98%	38%	100%
	ATCC 43300	18%	11%	11%	15%	18%	18%	18%	33%	34%	37%	16%	97%
	ATCC 700698	11%	8%	8%	11%	11%	11%	16%	107%	97%	73%	40%	98%
	ATCC 700699	43%	36%	38%	87%	98%	99%	99%	100%	108%	112%	116%	98%
	ATCC 9144	12%	7%	8%	12%	24%	17%	24%	80%	97%	73%	43%	94%
	ATCC BAA- 44	30%	11%	12%	32%	28%	83%	102%	100%	107%	110%	114%	103%
	Mức trung bình	19%	13%	12%	23%	28%	39%	45%	78%	84%	79%	60%	93%
S. epidermidis	ATCC 12228	49%	49%	66%	94%	99%	99%	98%	99%	99%	104%	114%	97%
	ATCC 700296	87%	83%	78%	94%	99%	99%	95%	101%	98%	102%	105%	92%
	ATCC 49461	68%	68%	70%	93%	101%	101%	97%	102%	102%	106%	112%	93%
	ATCC 14990	38%	71%	61%	92%	103%	100%	95%	102%	102%	106%	107%	93%
	Mức	61%	68%	69%	94%	100%	100%	96%	101%	100%	104%	109%	94%

trung bình													
Mức trung bình tổng thể	31%	28%	28%	43%	49%	56%	59%	84%	88%	86%	74%	93%	

Tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học (IBF) của 12 mẫu thử đã xử lý ở mức pha loãng 1:20 được thể hiện trên Bảng 3-4, cũng như hiệu quả trung bình trên toàn bộ các chủng của *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus epidermidis*. Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm là chỉ báo tốt về hiệu quả kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học trên các chủng vi khuẩn khác nhau.

Bảng 3-4: Sự ức chế tạo màng sinh học (IBF) của 12 mẫu thử đã xử lý trên 10 chủng của *Staphylococcus aureus* và 4 chủng của *Staphylococcus epidermidis* ở mức pha loãng 1:20

		Hỗn hợp[2P]-1	Hỗn hợp[2P]-2	Hỗn hợp[2P]-3	Hỗn hợp[3P]-1	Hỗn hợp[4P]-1	Hỗn hợp[4P]-2	Hỗn hợp[4P]-3	Hỗn hợp[5P]-1	Hỗn hợp[5P]-2	Hỗn hợp[5P]-3	Hỗn hợp[6P]-1	Hỗn hợp[7P]-1
S.aureus	ATCC 25923	37%	14%	22%	18%	29%	36%	35%	51%	41%	40%	38%	90%
	ATCC 29213	49%	12%	38%	27%	33%	38%	25%	35%	38%	34%	38%	41%
	NCTC 12493	49%	-6%	47%	36%	35%	88%	87%	92%	92%	89%	47%	93%
	ATCC 33591	38%	-21%	30%	16%	20%	25%	19%	92%	91%	89%	57%	93%

	ATCC 33592	51%	-10%	26%	25%	43%	47%	31%	60%	78%	70%	43%	91%
	ATCC 43300	33%	-19%	24%	2%	18%	26%	2%	-15%	-22%	-18%	-19%	68%
	ATCC 70069 8	27%	-8%	20%	10%	25%	23%	13%	62%	61%	39%	24%	88%
	ATCC 70069 9	61%	34%	63%	64%	79%	78%	86%	89%	87%	86%	87%	90%
	ATCC 9144	33%	-10%	22%	16%	21%	10%	16%	37%	59%	28%	0%	81%
	ATCC BAA- 44	50%	22%	47%	40%	39%	48%	89%	92%	90%	87%	91%	93%
	Mức trung bình	43%	1%	34%	25%	34%	42%	40%	59%	62%	54%	41%	83%
S. epidermidis	ATCC 12228	62%	-32%	78%	84%	95%	92%	92%	92%	91%	93%	96%	96%
	ATCC 70029 6	61%	39%	78%	73%	85%	86%	84%	80%	75%	76%	79%	87%
	ATCC 49461	18%	15%	72%	84%	90%	90%	90%	88%	88%	86%	90%	94%
	ATCC 14990	68%	39%	68%	88%	94%	91%	92%	90%	90%	89%	91%	90%
	Mức trung bình	52%	15%	74%	82%	91%	90%	89%	87%	86%	86%	89%	92%

Mức trung bình tổng thể	45%	5%	45%	42%	50%	56%	54%	67%	69%	63%	54%	85%
-------------------------------------	-----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Các chiết xuất hỗn hợp 2 loại thực vật cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật đầy đủ ở mức pha loãng 1:10 trên 10 chủng *Staphylococcus aureus* thử nghiệm ngoại trừ Hỗn hợp[2P]-3 không có hoạt tính kháng vi sinh vật ở mức pha loãng thử nghiệm trên 2 trong số 10 chủng *Staphylococcus aureus* thử nghiệm (ATCC 29213 và ATCC 43300) (xem Bảng 3-2).

Ba chiết xuất hỗn hợp 2 loại thực vật thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật khác nhau trên 4 chủng *Staphylococcus epidermidis* thử nghiệm. Hỗn hợp[2P]-1 có HID bằng 1:10 trên 3 chủng (ATCC 12228, ATCC 49461 và ATCC 14990) và HID bằng 1:20 trên chủng ATCC 700296. Hỗn hợp[2P]-2 có HID bằng 1:10 trên 2 chủng (ATCC 12228 và ATCC 49461) và HID bằng 1:20 trên 2 chủng khác (ATCC 700296 và ATCC 14990). Trong khi đó Hỗn hợp[2P]-3 có HID bằng 1:10 trên 2 chủng (ATCC 12228 và ATCC 14990) và HID bằng 1:20 trên 2 chủng khác (ATCC 700296 và ATCC 49461) (xem Bảng 3-2).

Hỗn hợp[3P]-1 thu được từ 3 loại thực vật mà được ủ trong Hỗn hợp[2P]-1, Hỗn hợp[2P]-2 và Hỗn hợp[2P]-3, cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật rộng hơn so với 3 hỗn hợp hai loại thực vật (HID bằng 1:10 trên 9 chủng *Staphylococcus aureus* và HID bằng 1:20 trên ATCC 700699, HID bằng 1:20 trên 4 chủng *Staphylococcus epidermidis* thử nghiệm) (xem Bảng 3-2). Sự tăng hoạt tính kháng vi sinh vật được xác nhận bằng cách tính tỷ lệ phần trăm ức chế phát triển sinh vật phù du của mỗi hỗn hợp thực vật (xem Bảng 3-3).

3 loại thực vật khác nhau, PA11, PA12 và PA22, được bổ sung vào Hỗn hợp[3P]-1 hỗn hợp 3 loại thực vật để thu được lần lượt ba chiết xuất hỗn hợp 4 loại thực vật, Hỗn hợp[4P]-1, Hỗn hợp[4P]-2 và Hỗn hợp[4P]-3. Các chiết xuất hỗn hợp 4 loại thực vật này cho thấy HID tương tự hoặc HID tốt hơn so với Hỗn hợp[3P]-1 chiết xuất hỗn hợp 3 loại thực vật (xem Bảng 3-2), và tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du cao hơn: mức trung bình từ 28% đến 45% thu được với các chiết xuất hỗn hợp 4 loại

thực vật trên 10 chủng *Staphylococcus aureus* so với 23% với chiết xuất hỗn hợp 3 loại thực vật (xem Bảng 3-3). Chúng cũng cho thấy tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học cao hơn: mức trung bình từ 34% đến 42% thu được với các chiết xuất hỗn hợp 4 loại thực vật trên 10 chủng *Staphylococcus aureus* so với 25% với chiết xuất hỗn hợp 3 loại thực vật (xem Bảng 3-4).

Các hỗn hợp 5 loại thực vật được điều chế bằng cách bổ sung 2 loại thực vật trong số 3 loại thực vật bổ sung được lựa chọn. Tất cả ba chiết xuất hỗn hợp 5 loại thực vật cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn so với các chiết xuất hỗn hợp 4 loại thực vật (xem Bảng 3-2, 3-3 và 3-4).

Hỗn hợp[6P]-1 bao gồm 6 loại thực vật mà được sử dụng để điều chế mẫu thử đã xử lý đã được thử nghiệm ở trên. Thú vị là, chiết xuất hỗn hợp 6 loại thực vật cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học kém hơn so với chiết xuất hỗn hợp 5 loại thực vật nhưng tác dụng kháng vi sinh vật cao hơn và tác dụng chống tạo màng sinh học từ cao hơn đến tương đương với các chiết xuất hỗn hợp 4 loại thực vật. Hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học được khôi phục và tăng cường bằng cách bổ sung thực vật mới (PA79) (xem Bảng 3-2, 3-3 và 3-4).

Việc tăng số loại thực vật trong các hỗn hợp cho phép điều chế chiết xuất chứa nước tương ứng có hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học tăng cường và tăng số chủng, trong đó một hoặc cả hai hoạt tính này có thể được xác định.

Ví dụ 4

Ví dụ này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học đồng thời đối với *Staphylococcus aureus* của 196 chiết xuất chứa nước thu được từ các chế phẩm thảo dược bao gồm ít nhất 2 loại thực vật trong số 3 loại thực vật được mô tả trong ví dụ 1 và các thực vật bổ sung để tạo ra sự kết hợp gồm 3 đến 10 loại thực vật.

Thực vật khô loại được dụng thu được từ “Pharmacie Fontgiève” (Clermont-Ferrand, Pháp, các loại thực vật PA00 đến PB12) và “Pharmacie St Herem” (Clermont-Ferrand, Pháp, các loại thực vật PB13 đến PD08).

4 chế phẩm thảo dược tham chiếu Hỗn hợp[2P]-1, Hỗn hợp[2P]-2, Hỗn hợp[2P]-3, Hỗn hợp[3P]-1 và 196 chế phẩm thảo dược mới được bào chế theo phương pháp A được mô tả ở trên và có hàm lượng được nêu trong danh mục 4-1.

Danh mục 4-1: Các chế phẩm thảo dược của mẫu thử đã xử lý

Hỗn hợp[2P]-1: PA13; PA21;

Hỗn hợp[2P]-2: PA21; PB12;

Hỗn hợp[2P]-3: PA13; PB12;

Hỗn hợp[3P]-1: PA13; PA21; PB12;

Hỗn hợp[3P]-2: PA11; PA13; PA21;

Hỗn hợp[3P]-3: PA21; PB12; PC63;

Hỗn hợp[3P]-4: PA13; PB12; PC63;

Hỗn hợp[3P]-5: PA13; PA21; PC63;

Hỗn hợp[3P]-6: PA13; PA21; PB12;

Hỗn hợp[3P]-7: PA21; PB12; PC29;

Hỗn hợp[3P]-8: PA13; PB12; PC29;

Hỗn hợp[3P]-9: PA13; PA21; PB12;

Hỗn hợp[4P]-1: PA11; PA13; PA21; PB12;

Hỗn hợp[4P]-2: PA12; PA13; PA21; PB12;

Hỗn hợp[4P]-3: PA13; PA21; PA22; PB12;

Hỗn hợp[4P]-4: PA11; PA13; PA21; PA22;

Hỗn hợp[4P]-5: PA13; PA21; PB12; PC63;

Hỗn hợp[4P]-6: PA11; PA12; PA21; PB12;

Hỗn hợp[4P]-7: PA11; PA12; PA13; PB12;

Hỗn hợp[4P]-8: PA11; PA13; PA21; PB12;

Hỗn hợp[4P]-9: PA12; PA13; PA21; PB12;

Hỗn hợp[4P]-10: PA13; PA21; PB12; PC29;

Hỗn hợp[5P]-1: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12;

Hỗn hợp[5P]-2: PA11; PA13; PA21; PA22; PB12;

Hỗn hợp[5P]-3: PA11; PA12; PA13; PA21; PB12;

Hỗn hợp[5P]-4: PA11; PA12; PA21; PA22; PB12;

Hỗn hợp[5P]-5: PA11; PA12; PA13; PA22; PB12;

Hỗn hợp[5P]-6: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22;

Hỗn hợp[5P]-7: PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;

Hỗn hợp[5P]-8: PA13; PA21; PB12; PC29; PC63;

Hỗn hợp[6P]-1: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12;

Hỗn hợp[6P]-2: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Hỗn hợp[6P]-3: PA11; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Hỗn hợp[6P]-4: PA11; PA12; PA13; PA21; PB12; PC63;
 Hỗn hợp[6P]-5: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Hỗn hợp[6P]-6: PA11; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Hỗn hợp[6P]-7: PA11; PA12; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Hỗn hợp[6P]-8: PA11; PA12; PA13; PA22; PB12; PC63;
 Hỗn hợp[6P]-9: PA11; PA12; PA13; PA21; PB12; PC63;
 Hỗn hợp[6P]-10: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PC63;
 Hỗn hợp[6P]-11: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12;
 Hỗn hợp[7P]-1: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PA79;
 M[7P]-2: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PB49;
 M[7P]-3: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PC29;
 M[7P]-4: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 M[9P]-11: PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-12: PA11; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-13: PA11; PA12; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-14: PA11; PA12; PA13; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-15: PA11; PA12; PA13; PA21; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-16: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-17: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-18: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PC29; PC63;
 M[9P]-19: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC63;
 M[9P]-20: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29;
 M[10P]-40: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
 M[10P]-44: PA13; PA40; PA41; PA62; PA75; PB18; PC22; PC63; PC64; PD05;
 M[10P]-71: PA21; PA85; PB14; PB18; PB85; PC19; PC61; PC63; PD05; PD08;
 M[10P]-75: PA02; PA10; PA12; PA13; PA18; PA21; PA27; PA79; PB86; PC26;
 M[10P]-84: PA10; PA21; PA27; PB12; PB15; PC26; PC68; PD05; PD06; PD08;
 M[10P]-98: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA21; PA27; PB16; PB18; PD06;
 M[10P]-102: PA12; PA13; PA19; PA21; PA41; PA79; PB10; PC26; PC61;
 PC64;

M[10P]-103: PA13; PA17; PA21; PA24; PB08; PB49; PB85; PC15; PC29;
 PD05;
 M[10P]-105: PA10; PA11; PA12; PA18; PA19; PA21; PA22; PB12; PC63;
 PD08;
 M[10P]-109: PA10; PA12; PA13; PA21; PA27; PA75; PB14; PB16; PC45;
 PC63;
 M[10P]-112: PA08; PA13; PA15; PA17; PA18; PA21; PA27; PB18; PB41;
 PB81;
 M[10P]-115: PA13; PA20; PA21; PA22; PA62; PA79; PB08; PB19; PC15;
 PC61;
 M[10P]-119: PA11; PA13; PA14; PA24; PB12; PB41; PB49; PC51; PD06;
 PD08;
 M[10P]-123: PA10; PA13; PA15; PA20; PA21; PA75; PB12; PB18; PB49;
 PC63;
 M[10P]-124: PA08; PA13; PA21; PA24; PA27; PB08; PB41; PB49; PC64;
 PD05;
 M[10P]-125: PA13; PA14; PA19; PA21; PA75; PB12; PC15; PC26; PC61;
 PC63;
 M[10P]-129: PA08; PA12; PA18; PA21; PA41; PB08; PB85; PC63; PC64;
 PD08;
 M[10P]-130: PA12; PA13; PA21; PA24; PA27; PB10; PB41; PB49; PC15;
 PC61;
 M[10P]-132: PA12; PA20; PA21; PA24; PC15; PC26; PC61; PC63; PC64;
 PD08;
 M[10P]-134: PA21; PA22; PA24; PA27; PB10; PB12; PB49; PC15; PC29;
 PD05;
 M[10P]-136: PA10; PA11; PA12; PA13; PA18; PA21; PB16; PB18; PC26;
 PC29;
 M[10P]-140: PA13; PA15; PA21; PA24; PA62; PA79; PB10; PB12; PC63;
 PC64;
 M[10P]-142: PA11; PA12; PA13; PA19; PA21; PB12; PB85; PC15; PC26;
 PC64;

M[10P]-144: PA13; PA15; PA21; PA24; PA75; PB49; PC51; PC61; PC64;
 PD05;
 M[10P]-145: PA12; PA13; PA17; PA20; PA21; PA79; PB08; PB16; PB85;
 PC63;
 M[10P]-148: PA10; PA13; PA20; PA24; PB08; PB12; PB49; PC26; PC51;
 PC64;
 M[10P]-149: PA13; PA14; PA15; PA19; PA21; PB08; PB10; PB41; PC15;
 PC61;
 M[10P]-150: PA10; PA12; PA13; PA14; PA21; PA62; PB10; PC26; PC64;
 PD06;
 M[10P]-151: PA10; PA13; PA21; PA22; PA24; PA41; PB49; PC15; PC61;
 PC63;
 M[10P]-152: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA27; PA75; PB12; PB49;
 PB85;
 M[10P]-154: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29;
 PC63;
 M[10P]-156: PA15; PA21; PA22; PB10; PB85; PC26; PC29; PC61; PC63;
 PC64;
 M[10P]-157: PA11; PA13; PA15; PA19; PA21; PB18; PB41; PC15; PC51;
 PD08;
 M[10P]-158: PA10; PA17; PA21; PA24; PA27; PA41; PB49; PC26; PC61;
 PC63;
 M[10P]-160: PA10; PA12; PA13; PA15; PA18; PA20; PA21; PA24; PB12;
 PC26;
 M[10P]-162: PA12; PA13; PA21; PA27; PA79; PB12; PB16; PB18; PC63;
 PC64;
 M[10P]-164: PA12; PA13; PA15; PA19; PA21; PA27; PB08; PB12; PB49;
 PD05;
 M[10P]-165: PA13; PA15; PA22; PA75; PA79; PB12; PB18; PC15; PC26;
 PC29;
 M[10P]-167: PA12; PA13; PA75; PB08; PB12; PB85; PC15; PC51; PC61;
 PC63;

M[10P]-168: PA11; PA13; PA17; PA21; PA27; PA62; PA79; PB16; PB49;
PC64;

M[10P]-169: PA12; PA17; PA21; PA24; PA75; PA79; PB10; PB12; PB85;
PC15;

M[10P]-170: PA11; PA13; PA15; PA20; PA21; PA22; PC26; PC29; PC63;
PC64;

M[10P]-172: PA13; PA20; PA21; PA75; PB10; PB12; PB18; PB49; PC29;
PC61;

M[10P]-173: PA10; PA12; PA13; PA14; PA19; PA20; PA21; PA79; PC15;
PC63;

M[10P]-174: PA11; PA12; PA13; PA27; PA62; PB12; PB16; PB49; PB85;
PC26;

M[10P]-175: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA75; PB10; PB49; PC15;
PC63;

M[10P]-176: PA11; PA13; PA21; PA24; PA62; PB12; PC15; PC26; PC61;
PC64;

M[10P]-178: PA11; PA14; PA15; PA18; PA19; PA21; PA22; PB16; PC15;
PC63;

M[10P]-180: PA08; PA11; PA12; PA13; PA15; PA17; PA21; PA62; PB12;
PC63;

M[10P]-181: PA13; PA19; PA21; PA22; PA79; PB08; PB10; PB18; PC15;
PC29;

M[10P]-182: PA11; PA15; PA20; PA21; PA22; PA75; PB12; PC29; PC63;
PC64;

M[10P]-183: PA11; PA12; PA13; PA27; PA79; PB16; PB18; PB49; PC15;
PC63;

M[10P]-184: PA11; PA13; PA15; PA20; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12;
PC29;

M[10P]-186: PA11; PA15; PA19; PA20; PA21; PA22; PA27; PB10; PB12;
PB85;

M[10P]-188: PA11; PA12; PA13; PA19; PA21; PA75; PA79; PB49; PC15;
PC63;

M[10P]-190: PA11; PA13; PA21; PA22; PA27; PA75; PB10; PB12; PB49;
PC63;

M[10P]-191: PA13; PA19; PA20; PA21; PA79; PB10; PB18; PB85; PC29;
PC61;

M[10P]-192: PA12; PA13; PA19; PA21; PA27; PA75; PB12; PB49; PC63;
PC64;

M[10P]-193: PA13; PA15; PA20; PA21; PA79; PB16; PC15; PC26; PC29;
PC61;

M[10P]-194: PA11; PA17; PA21; PA22; PA27; PB12; PB49; PC15; PC63;
PC64;

M[10P]-196: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA75; PB10; PB18; PC51;
PC63;

M[10P]-197: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA24; PA79; PB49; PC61;
PC64;

M[10P]-198: PA12; PA15; PA21; PA22; PB12; PB16; PB85; PC15; PC26;
PC29;

M[10P]-199: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA75; PB12; PC15; PC63;
PC64;

M[10P]-201: PA11; PA13; PA20; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PB49;
PC64;

M[10P]-202: PA11; PA21; PA75; PB10; PB12; PB61; PC26; PC29; PC42;
PC63;

M[10P]-205: PA11; PA13; PA19; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PB41;
PC63;

M[10P]-207: PA11; PA13; PA21; PA75; PB10; PB12; PB41; PB51; PC45;
PC63;

M[10P]-209: PA12; PA13; PA21; PA24; PA75; PB12; PB16; PB49; PB60;
PC15;

M[10P]-210: PA13; PA15; PA20; PA22; PA27; PB08; PB10; PB12; PB18;
PC63;

M[10P]-212: PA11; PA13; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PB16; PC15;
PC63;

M[10P]-214: PA11; PA12; PA15; PA21; PA22; PA75; PB12; PB49; PC15;
 PC61;
 M[10P]-215: PA11; PA12; PA13; PA21; PA25; PB12; PC02; PC29; PC51;
 PC64;
 M[10P]-216: PA11; PA12; PA13; PA21; PA27; PA75; PA85; PB18; PB49;
 PC49;
 M[10P]-217: PA18; PA20; PA21; PA22; PA75; PB10; PB12; PB16; PB85;
 PC64;
 M[10P]-218: PA10; PA13; PA15; PA20; PA22; PA27; PB18; PB49; PC51;
 PC63;
 M[10P]-219: PA12; PA13; PA15; PA19; PA21; PA22; PA75; PB10; PB12;
 PC26;
 M[10P]-220: PA11; PA12; PA13; PA19; PA21; PA22; PA27; PB12; PB49;
 PC63;
 M[10P]-221: PA13; PA15; PA19; PA20; PA21; PA41; PA75; PB12; PC15;
 PC60;
 M[10P]-222: PA05; PA13; PA21; PA22; PA75; PA79; PB49; PC26; PC29;
 PC63;
 M[10P]-223: PA11; PA12; PA13; PA22; PA25; PA75; PB12; PB49; PC61;
 PC64;
 M[10P]-225: PA12; PA13; PA21; PA27; PB10; PB12; PC29; PC63; PC64;
 PD08;
 M[10P]-226: PA11; PA12; PA21; PA39; PA79; PB18; PB49; PB85; PC61;
 PC63;
 M[10P]-227: PA11; PA12; PA15; PA20; PA21; PA22; PB12; PB42; PC15;
 PC26;
 M[10P]-229: PA13; PA20; PA62; PA79; PB12; PB46; PB85; PC29; PC64;
 PD08;
 M[10P]-230: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA75; PB10; PB12; PB58;
 PC61;
 M[10P]-232: PA12; PA13; PA15; PA22; PA27; PA83; PB12; PB49; PC26;
 PC63;

M[10P]-235: PA12; PA13; PA15; PA20; PA21; PA22; PC29; PC51; PC63;
 PC65;
 M[10P]-236: PA12; PA13; PA20; PA21; PA27; PA75; PB50; PB85; PC29;
 PC64;
 M[10P]-237: PA11; PA13; PA15; PA21; PA27; PA75; PB10; PB12; PC63;
 PC70;
 M[10P]-239: PA10; PA11; PA12; PA20; PA21; PB10; PB41; PB49; PC63;
 PD08;
 M[10P]-240: PA11; PA12; PA15; PA21; PA27; PA79; PB46; PC29; PC51;
 PC63;
 M[10P]-241: PA11; PA14; PA20; PA21; PA22; PA75; PB12; PB18; PC15;
 PC29;
 M[10P]-242: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB18; PB49; PC51;
 PC63;
 M[10P]-244: PA11; PA12; PA13; PA20; PA22; PA27; PB10; PB12; PC63;
 PC64;
 M[10P]-246: PA11; PA12; PA13; PA21; PA61; PA79; PB10; PB12; PB18;
 PB85;
 M[10P]-247: PA11; PA12; PA21; PA27; PB16; PB49; PC21; PC51; PC61;
 PC63;
 M[10P]-248: PA11; PA13; PA14; PA19; PA21; PA75; PA79; PB14; PB49;
 PC15;
 M[10P]-250: PA11; PA12; PA15; PA20; PA21; PA41; PA75; PB49; PC26;
 PC63;
 M[10P]-251: PA12; PA13; PA21; PA22; PA27; PA79; PB10; PB12; PB13;
 PB16;
 M[10P]-252: PA11; PA13; PA20; PA21; PA44; PB08; PB12; PB18; PB88;
 PD06;
 M[10P]-253: PA10; PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA22; PA27; PA79;
 PC63;
 M[10P]-255: PA11; PA13; PA21; PA75; PB12; PB18; PB49; PC15; PC26;
 PC63;

M[10P]-256: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA23; PA75; PA79; PC29;
 PC64;
 M[10P]-257: PA13; PA20; PA21; PA27; PB12; PB49; PB83; PC29; PC63;
 PD00;
 M[10P]-258: PA12; PA13; PA20; PA21; PA22; PA75; PB10; PB12; PC15;
 PC63;
 M[10P]-262: PA11; PA12; PA21; PA31; PA75; PB49; PB85; PC61; PC63;
 PC64;
 M[10P]-264: PA21; PA24; PA27; PA31; PA79; PB10; PB18; PB49; PC15;
 PC63;
 M[10P]-267: PA11; PA12; PA21; PA22; PA75; PC29; PC51; PC52; PC61;
 PC63;
 M[10P]-268: PA11; PA12; PA13; PA15; PA27; PA75; PB10; PB12; PB45;
 PC64;
 M[10P]-269: PA13; PA20; PA21; PA22; PA79; PB10; PB11; PB49; PC61;
 PC63;
 M[10P]-270: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA75; PB12; PB14; PB18;
 PC49;
 M[10P]-271: PA11; PA13; PA20; PA22; PA27; PA45; PB08; PB12; PB49;
 PC64;
 M[10P]-272: PA13; PA21; PA24; PA79; PB10; PB12; PB41; PC15; PC29;
 PC63;
 M[10P]-273: PA11; PA15; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PB14; PC64;
 PD00;
 M[10P]-274: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PB49; PC26; PC51; PC63;
 PC64;
 M[10P]-278: PA13; PA15; PA21; PA22; PA75; PA79; PB10; PB12; PB49;
 PC63;
 M[10P]-280: PA11; PA12; PA15; PA21; PB08; PB12; PB18; PB49; PB58;
 PC51;
 M[10P]-281: PA11; PA12; PA20; PA21; PA22; PA27; PA29; PA75; PB16;
 PC63;

M[10P]-282: PA10; PA13; PA21; PA22; PA27; PA79; PB12; PC15; PC29;
 PC61;
 M[10P]-284: PA11; PA13; PA20; PA21; PA22; PA27; PA95; PC15; PC29;
 PC63;
 M[10P]-285: PA11; PA13; PA14; PA21; PA79; PB10; PB12; PB18; PB49;
 PB82;
 M[10P]-286: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA21; PA79; PC51; PC64;
 PC82;
 M[10P]-287: PA12; PA13; PA19; PA20; PA75; PB10; PB12; PC26; PC63;
 PD08;
 M[10P]-289: PA12; PA13; PA15; PA19; PA20; PA21; PB10; PB12; PC29;
 PC51;
 M[10P]-290: PA11; PA12; PA13; PA22; PA27; PA75; PB85; PC29; PC63;
 PD07;
 M[10P]-292: PA12; PA13; PA15; PA75; PA79; PB10; PB12; PC29; PC45;
 PC63;
 M[10P]-293: PA00; PA11; PA12; PA13; PA21; PA27; PA75; PB18; PB85;
 PC26;
 M[10P]-294: PA12; PA13; PA15; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC51;
 PC63;
 M[10P]-296: PA11; PA13; PA15; PA17; PA21; PA62; PA79; PB10; PB12;
 PC63;
 M[10P]-300: PA12; PA13; PA17; PA48; PB10; PB12; PB16; PC26; PC29;
 PC63;
 M[10P]-301: PA11; PA12; PA13; PA20; PA21; PA75; PB08; PC15; PC35;
 PC51;
 M[10P]-302: PA11; PA12; PA13; PA21; PA70; PB12; PB16; PB18; PC26;
 PC63;
 M[10P]-303: PA11; PA12; PA15; PA21; PA75; PA79; PB10; PB12; PC29;
 PC64;
 M[10P]-307: PA12; PA13; PA21; PB10; PB12; PB18; PB78; PC51; PC63;
 PD08;

M[10P]-308: PA17; PA21; PA22; PA27; PB12; PB49; PB85; PC15; PC26;
PC29;

M[10P]-309: PA13; PA22; PA27; PA53; PA62; PA75; PB10; PC51; PC63;
PD06;

M[10P]-311: PA12; PA15; PA19; PA21; PA79; PB12; PB49; PC26; PC63;
PC83;

M[10P]-312: PA00; PA11; PA13; PA21; PA22; PA29; PA75; PB10; PB85;
PC29;

M[10P]-313: PA13; PA15; PA21; PA22; PA27; PA75; PB49; PC51; PC61;
PC63;

M[10P]-314: PA08; PA12; PA13; PA21; PB10; PB12; PB49; PC15; PC32;
PC64;

M[10P]-315: PA11; PA13; PA21; PA47; PA75; PB16; PB83; PC15; PC51;
PC63;

M[10P]-317: PA11; PA12; PA19; PA21; PA22; PA79; PB10; PB16; PC29;
PC63;

M[10P]-319: PA12; PA13; PA22; PA75; PA79; PA98; PB08; PB10; PB85;
PC63;

M[10P]-321: PA11; PA12; PA13; PA20; PA21; PA22; PB49; PB85; PC55;
PC63.

Chiết xuất chứa nước tương ứng (hoặc mẫu thử đã xử lý) của các chế phẩm thảo dược được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng 20mL nước chứa sucroza với nồng độ 100g/l để chiết bằng nước và bao gồm bước ly tâm trước khi lọc.

Hoạt tính sinh học của mẫu thử đã xử lý được xác định bằng cách sử dụng các chủng *Staphylococcus aureus* sau: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213 và ATCC 14775, với các mức pha loãng cuối sau của mẫu thử đã xử lý: 1:10, 1:20, 1:40 và 1:80 đối với mẫu thử đã xử lý chứa nhỏ hơn 10 thìa bột thực vật (M[2P] đến M[9P]) hoặc 1:20, 1:63 và 1:200 đối với mẫu thử đã xử lý chứa 10 thìa bột thực vật (M[10P]), theo phương pháp C đã được mô tả ở trên.

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng

thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý thu được từ 2 loại thực vật của Hỗn hợp[2P]-1 ở mức pha loãng 1:20 được thể hiện trên Bảng 4-1.

Bảng 4-1: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý dựa trên Hỗn hợp[2P]-1 ở mức pha loãng 1:20

(A)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-1	22%	36%
M[10P]-124	28%	47%
M[10P]-236	24%	50%
M[10P]-193	27%	54%
M[10P]-286	45%	38%
Hỗn hợp[5P]-6	39%	45%
M[10P]-197	32%	55%
M[10P]-112	40%	49%
M[10P]-157	41%	52%
M[10P]-136	39%	55%
M[10P]-144	45%	52%
M[10P]-191	39%	57%
M[10P]-168	44%	53%
M[10P]-115	44%	54%
M[10P]-98	48%	51%
M[10P]-102	51%	54%
M[10P]-150	49%	59%

(B)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-1	22%	36%
M[10P]-75	23%	40%
M[10P]-216	22%	41%
M[10P]-256	19%	47%
M[10P]-248	14%	48%

(C)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-1	22%	36%
Hỗn hợp[3P]-2	27%	26%
Hỗn hợp[4P]-4	27%	29%
M[10P]-293	28%	32%
M[10P]-301	28%	28%
M[10P]-312	40%	37%

M[10P]-103	51%	58%
M[10P]-130	57%	61%
M[10P]-149	56%	63%
M[10P]-181	65%	70%

20 mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 5 hoặc 10 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học và hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn so với chiết xuất hỗn hợp tham chiếu Hỗn hợp[2P]-1 (Bảng 4-1 A). Bốn chiết xuất hỗn hợp 10 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn và hoạt tính kháng vi sinh vật tương đương hoặc thấp hơn (Bảng 4-1 B). Năm mẫu thử đã xử lý chứa 3, 4 hoặc 10 loại thực vật được thấy có hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn và hoạt tính chống tạo màng sinh học tương đương hoặc thấp hơn (Bảng 4-1 C).

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 2 loại thực vật của Hỗn hợp[2P]-2 ở mức pha loãng 1:20 được thể hiện trên Bảng 4-2.

Bảng 4-2: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý dựa trên Hỗn hợp[2P]-2 ở mức pha loãng 1:20. (A) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn. (B) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính chống tạo màng sinh học và hoạt tính kháng vi sinh vật tương đương hoặc thấp hơn. (C) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học tương đương hoặc thấp hơn.

(A)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-2	12%	-3%
M[10P]-308	16%	13%
Hỗn hợp[3P]-7	23%	9%

(B)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-2	12%	-3%
M[10P]-84	9%	27%
M[10P]-158	12%	30%

M[10P]-264	15%	29%
M[10P]-317	36%	9%
M[10P]-217	17%	28%
M[10P]-280	21%	27%
Hỗn hợp[6P]-7	36%	16%
M[10P]-267	17%	36%
Hỗn hợp[3P]-3	27%	28%
M[10P]-247	16%	40%
M[10P]-214	23%	33%
M[10P]-303	35%	22%
M[10P]-281	17%	42%
M[10P]-273	19%	41%
Hỗn hợp[5P]-4	34%	27%
M[10P]-198	16%	46%
M[10P]-241	26%	38%
M[10P]-132	23%	41%
M[10P]-239	28%	44%
M[10P]-262	25%	48%
M[10P]-129	28%	46%
M[10P]-186	31%	44%
M[10P]-311	40%	38%
M[10P]-134	32%	48%
M[10P]-182	40%	44%
M[10P]-178	39%	45%
M[10P]-202	37%	50%
M[10P]-156	40%	48%
M[10P]-194	41%	49%

M[10P]-071	11%	35%
M[10P]-227	12%	42%
M[10P]-250	11%	44%
M[10P]-226	13%	51%

(C)

Ước chế phát triển sinh vật phù du	Ước chế tạo màng sinh học
12%	-3%
19%	-5%

M[10P]-105	47%	44%
M[10P]-240	42%	61%
M[10P]-169	53%	57%
M[9P]-13	100%	86%

33 mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 3, 5, 9 hoặc 10 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học và hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn so với chiết xuất hỗn hợp tham chiếu Hỗn hợp[2P]-2 (Bảng 4-2 A). Sáu chiết xuất hỗn hợp 10 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn và hoạt tính kháng vi sinh vật tương đương hoặc thấp hơn (Bảng 4-2 B). Một chiết xuất hỗn hợp 4 loại thực vật được thấy có hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn và hoạt tính chống tạo màng sinh học tương đương (Bảng 4-2 C).

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 2 loại thực vật của Hỗn hợp[2P]-3 ở mức pha loãng 1:20 được thể hiện trên Bảng 4-3.

Bảng 4-3: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý dựa trên Hỗn hợp[2P]-3 ở mức pha loãng 1:20. (A) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn. (B) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học tương đương hoặc thấp hơn.

(A)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-3	12%	28%
M[10P]-44	15%	35%
M[10P]-271	13%	47%
M[10P]-218	19%	42%

(B)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-3	12%	28%
Hỗn hợp[4P]-7	17%	5%
Hỗn hợp[3P]-8	19%	14%
M[10P]-300	20%	15%

M[10P]-268	16%	46%
Hỗn hợp[3P]-4	17%	47%
M[10P]-210	22%	42%
M[10P]-165	22%	42%
Hỗn hợp[5P]-5	29%	36%
M[10P]-287	34%	31%
M[10P]-148	28%	41%
M[10P]-290	31%	39%
M[10P]-229	15%	56%
M[6P]-8	34%	40%
M[10P]-319	38%	37%
M[10P]-244	21%	56%
M[10P]-223	23%	55%
M[10P]-232	25%	61%
M[10P]-119	42%	48%
M[10P]-183	39%	51%
M[10P]-292	47%	48%
M[10P]-174	47%	59%
M[10P]-167	80%	71%
M[9P]-14	90%	83%

M[10P]-309	33%	2%
------------	-----	----

23 mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 3, 5, 9 hoặc 10 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học và hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn so với chiết xuất hỗn hợp tham chiếu Hỗn hợp[2P]-3 (Bảng 4-3 A). Bốn mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 3, 4 hoặc 10 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn và hoạt tính kháng vi sinh vật tương đương hoặc thấp hơn (Bảng 4-3 B).

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 3 loại thực vật của Hỗn hợp[3P]-1 ở mức pha loãng 1:20 được thể hiện trên Bảng 4-4.

Bảng 4-4: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật

phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý dựa trên Hỗn hợp[3P]-1 ở mức pha loãng 1:20. (A) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn và hoạt tính chống tạo màng sinh học. (B) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính chống tạo màng sinh học và hoạt tính kháng vi sinh vật tương đương hoặc thấp hơn. (C) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học tương đương hoặc thấp hơn.

(A)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[3P]-1	31%	15%
Hỗn hợp[4P]-8	37%	20%
Hỗn hợp[6P]-10	33%	25%
M[10P]-314	34%	24%
Hỗn hợp[4P]-2	37%	22%
Hỗn hợp[6P]-11	35%	27%
Hỗn hợp[4P]-3	41%	24%
M[10P]-315	39%	27%
M[10P]-284	41%	31%
M[10P]-321	37%	39%
M[10P]-109	36%	43%
M[10P]-302	44%	35%
Hỗn hợp[5P]-8	43%	40%
M[6P]-9	51%	35%
M[10P]-160	35%	52%
M[10P]-212	43%	45%
M[10P]-274	38%	51%
M[10P]-246	34%	56%
M[10P]-205	42%	48%

(B)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[3P]-1	31%	15%
Hỗn hợp[3P]-6	16%	20%
Hỗn hợp[4P]-9	30%	21%
Hỗn hợp[3P]-9	19%	23%
M[10P]-282	24%	26%
Hỗn hợp[3P]-5	29%	36%
M[10P]-269	14%	37%
M[10P]-278	18%	40%
M[10P]-219	30%	42%
M[10P]-255	20%	43%
M[10P]-270	15%	43%
M[10P]-251	13%	44%
M[10P]-258	20%	44%
M[10P]-209	21%	45%
M[10P]-221	17%	49%
M[10P]-253	21%	49%
M[10P]-252	18%	50%
M[10P]-257	18%	51%
M[10P]-242	29%	54%

M[10P]-285	52%	39%
M[10P]-201	37%	54%
M[10P]-222	32%	59%
Hỗn hợp[4P]-10	52%	40%
M[10P]-230	38%	54%
M[10P]-220	43%	50%
Hỗn hợp[5P]-2	51%	42%
Hỗn hợp[5P]-1	50%	44%
M[10P]-215	38%	55%
Hỗn hợp[6P]-6	56%	38%
M[10P]-235	40%	54%
M[10P]-207	43%	53%
Hỗn hợp[5P]-3	51%	48%
M[10P]-307	58%	43%
M[10P]-289	60%	41%
M[10P]-272	40%	62%
M[10P]-184	48%	55%
M[10P]-151	48%	57%
M[10P]-123	51%	55%
M[6P]-1	60%	50%
M[6P]-5	61%	51%
M[7P]-3	61%	54%
M[10P]-192	57%	60%
M[10P]-164	58%	59%
M[7P]-1	62%	57%
M[10P]-296	63%	60%
M[6P]-4	73%	51%

(C)

	Ước chế phát triển sinh vật phù du	Ước chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[3P]-1	31%	15%
Hỗn hợp[4P]-1	37%	15%
M[10P]-313	38%	12%

Hỗn hợp[5P]-7	64%	60%
M[6P]-2	68%	57%
M[10P]-225	60%	66%
M[10P]-188	65%	61%
Hỗn hợp[4P]-5	61%	66%
M[10P]-125	66%	62%
M[10P]-173	65%	67%
M[10P]-237	69%	63%
M[7P]-3	71%	64%
M[10P]-294	71%	65%
M[10P]-199	70%	69%
M[10P]-142	71%	69%
Hỗn hợp[6P]-3	72%	68%
M[10P]-145	72%	69%
M[10P]-180	72%	70%
M[10P]-140	72%	71%
M[10P]-162	73%	70%
M[10P]-176	74%	70%
M[10P]-172	72%	73%
M[10P]-152	71%	74%
M[10P]-40	77%	68%
M[7P]-4	72%	76%
M[10P]-170	80%	74%
M[10P]-196	78%	77%
M[10P]-190	82%	76%
M[10P]-154	80%	79%
M[10P]-175	84%	77%
M[9P]-20	93%	81%
M[9P]-17	95%	84%
M[9P]-19	95%	86%
M[9P]-11	96%	91%

M[9P]-18	98%	89%
M[9P]-12	103%	91%
M[9P]-15	106%	88%
M[9P]-16	106%	91%

80 mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 4, 5, 6, 7, 9 hoặc 10 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học và hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn so với chiết xuất hỗn hợp tham chiếu Hỗn hợp[3P]-1 (Bảng 4-4 A). 18 mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 3, 4, hoặc 10 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn và hoạt tính kháng vi sinh vật tương đương hoặc thấp hơn (Bảng 4-4 B). 2 mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược có 4 và 10 loại thực vật được thấy có hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn và hoạt tính chống tạo màng sinh học tương đương (Bảng 4-4 C).

Ví dụ so sánh 2

Dưới dạng ví dụ so sánh, sáng chế thể hiện một số chiết xuất hỗn hợp có 3 hoặc 10 loại thực vật thu được từ các chế phẩm thảo dược chỉ chứa một loại thực vật trong số 3 loại thực vật của ví dụ 1 (PA13, PA21, PB12), mà đã được thấy không có hoặc có hoạt tính kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học kém đối với *Staphylococcus aureus*.

Mười chế phẩm thảo dược, hàm lượng của nó được nêu trong danh mục 4-8, được bào chế theo phương pháp A đã được mô tả ở trên.

Danh mục 4-8: Các chế phẩm thảo dược của mẫu thử đã xử lý

M[3P]-31: PA21; PA05; PB06;

M[3P]-35: PA21; PA76; PB50;

M[3P]-37: PA21; PB06; PB50;

M[3P]-43: PB12; PA05; PC34;

M[3P]-45: PB12; PA76; PB50;

M[10P]-65: PA01; PA08; PA25; PA29; PA37; PB12; PB50; PC15; PC37; PD05;

M[10P]-70: PA10; PA16; PA21; PA25; PA37; PA75; PB18; PB45; PC04; PC57;

M[10P]-72: PA08; PA21; PA62; PA70; PA85; PB19; PB31; PB45; PB49; PC26;

M[10P]-89: PA10; PA13; PA18; PA19; PA37; PA41; PA75; PB49; PC21; PC67;

M[10P]-306: PA15; PA21; PA22; PA62; PA75; PB18; PB49; PB85; PC49;

PC61;

Muối chiết xuất chứa nước (hoặc mẫu thử đã xử lý) được điều chế bắt đầu từ các chế phẩm thảo dược tương ứng.

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm đối với các mẫu thử đã xử lý này ở mức pha loãng 1:20 được xác định theo phương pháp C đã được mô tả ở trên và được nêu trong bảng 4-5.

Bảng 4-5: Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học hiệu quả trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý ở mức pha loãng 1:20.

	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-1	22%	36%
Hỗn hợp[2P]-2	12%	-3%
Hỗn hợp[2P]-3	12%	28%
M[3P]-45	-4%	-5%
M[3P]-35	0%	-8%
M[3P]-37	2%	-9%
M[3P]-31	2%	-9%
M[3P]-43	1%	-1%
M[10P]-72	3%	1%
M[10P]-70	1%	15%
M[10P]-306	10%	6%
M[10P]-65	3%	17%
M[10P]-89	10%	27%

Tất cả các mẫu thử đã xử lý đã được thử nghiệm, thu được từ các chế phẩm thảo dược bao gồm 3 hoặc 10 loại thực vật, mà bao gồm một thực vật trong số 3 loại thực vật của ví dụ 1 (PA13, PA21, PB12), cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật thấp hơn so với ba chiết xuất hỗn hợp 2 loại thực vật của Hỗn hợp[2P]-1 (thu được từ PA13 và PA21), Hỗn hợp[2P]-2 (thu được từ PA21 và PB12) và Hỗn hợp[2P]-3 (thu được từ PA13 và PB12) tham chiếu và hoạt tính chống tạo màng sinh học thấp hơn so với Hỗn hợp[2P]-

1 và Hỗn hợp[2P]-3.

Ví dụ 5

Ví dụ này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học đồng thời đối với *Staphylococcus aureus* của 390 chiết xuất hỗn hợp thu được từ các chế phẩm thảo dược bao gồm ít nhất 2 loại thực vật trong số 3 loại thực vật được mô tả trong ví dụ 1 (xem Bảng 1-1) và thực vật bổ sung để kết hợp sự kết hợp gồm 9 đến 20 loại thực vật.

Thực vật khô loại được dụng thu được từ “Pharmacie Fontgiève” (Clermont-Ferrand, Pháp, thực vật PA00 đến PB12) và “Pharmacie St Herem” (Clermont-Ferrand, Pháp, thực vật PB13 đến PD02).

Các chế phẩm thảo dược chứa từ 9 đến 20 loại bột thực vật được bào chế theo phương pháp A đã được mô tả ở trên.

4 chế phẩm thảo dược tham chiếu Hỗn hợp[2P]-1, Hỗn hợp[2P]-2, Hỗn hợp[2P]-3, Hỗn hợp[3P]-1 và 390 chế phẩm thảo dược mới được bào chế có hàm lượng thể hiện dưới đây (Danh mục 5-3).

Danh sách 5-3: Các chế phẩm thảo dược của mẫu thử đã xử lý

Hỗn hợp[2P]-1: PA13; PA21;

Hỗn hợp[2P]-2: PA21; PB12;

Hỗn hợp[2P]-3: PA13; PB12;

Hỗn hợp[3P]-1: PA13; PA21; PB12;

M[09P]-1: PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;

M[09P]-2: PA11; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;

M[09P]-3: PA11; PA13; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;

M[09P]-4: PA11; PA13; PA14; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;

M[09P]-6: PA11; PA13; PA14; PA20; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;

M[09P]-6: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA67; PB12; PC27; PC60;

M[09P]-7: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PB12; PC27; PC60;

M[09P]-8: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PC27; PC60;

M[09P]-9: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC60;

M[09P]-10: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27;

M[09P]-21: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12;

M[10P]-41: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;

M[10P]-303: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12;
 PC33;
 M[11P]-1: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;
 PA11;
 M[11P]-2: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;
 PA14;
 M[11P]-3: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;
 PA25;
 M[11P]-4: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;
 PA26;
 M[11P]-5: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;
 PA28;
 M[11P]-6: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;
 PA29;
 M[11P]-7: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;
 PA67;
 M[11P]-8: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;
 PA75;
 M[11P]-9: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;
 PC49;
 M[11P]-10: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;
 PC60;
 M[11P]-11: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33;
 PA39;
 M[11P]-12: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13;
 PA21;
 M[12P]-1: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33;
 PA39; PA22;
 M[12P]-2: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13;
 PA21; PA29;
 M[13P]-1: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33;
 PA39; PA22; PA20;

M[13P]-2: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13;
PA21; PA29; PC20;

M[14P]-1: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33;
PA39; PA22; PA20; PC26;

M[14P]-2: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13;
PA21; PA29; PC20; PC49;

M[15P]-1: PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA21; PA23; PA26; PA33; PB08;
PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[15P]-5: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33;
PA39; PA22; PA20; PC26; PC20;

M[16P]-1: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[16P]-2: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12;
PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[16P]-3: PA11; PA12; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12;
PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[16P]-5: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33;
PA39; PA22; PA20; PC26; PC20; PA12;

M[16P]-6: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13;
PA21; PA29; PC20; PC49; PA14; PA14;

M[17P]-1: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[17P]-2: PA11; PA12; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39;
PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[17P]-3: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39;
PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[17P]-5: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[17P]-4: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA33;
PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[17P]-6: PA10; PA11; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07;
PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[17P]-8: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13;
PA21; PA29; PC20; PC49; PA14; PA14; PA22;

M[17P]-9: PA13; PA13; PA13; PC49; PC37; PA11; PA20; PA22; PA12; PC26;
PB60; PA39; PC33; PC20; PA14; PA14; PA21;

M[18P]-1: PA10; PA11; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00;
PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[18P]-2: PA11; PA11; PA12; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29;
PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-3: PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29;
PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-4: PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29;
PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-5: PA11; PA12; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29;
PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-6: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29;
PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-7: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA21; PA22; PA29;
PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-9: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA22; PA29;
PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-9: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA29;
PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-10: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22;
PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-11: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22;
PA29; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-12: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22;
PA29; PA39; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-13: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22;
PA29; PA39; PB12; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-14: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22;
PA29; PA39; PB12; PB60; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[18P]-15: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22;
 PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC33; PC37; PC49;
 M[18P]-16: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22;
 PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC37; PC49;
 M[18P]-17: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22;
 PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC49;
 M[18P]-18: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22;
 PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37;
 M[18P]-23: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
 PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
 M[18P]-19: PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26;
 PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
 M[18P]-20: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26;
 PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
 M[18P]-21: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26;
 PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
 M[18P]-22: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26;
 PA26; PA26; PA33; PB08; PB60; PB88; PC12; PC20;
 M[18P]-24: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
 PB12; PB12; PB12; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
 M[18P]-25: PA10; PA11; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00;
 PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
 M[18P]-31: PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67;
 PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
 M[18P]-33: PA11; PA11; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67;
 PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
 M[18P]-34: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67;
 PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
 M[18P]-34: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA28; PA52; PA67;
 PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
 M[18P]-35: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33;
 PA39; PA22; PA20; PC26; PC20; PA12; PA14; PA14;

M[18P]-36: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13;
PA21; PA29; PC20; PC49; PA14; PA14; PA22; PA20;

M[18P]-37: PA13; PA13; PA13; PC49; PC37; PA11; PA20; PA22; PA12; PC26;
PB60; PA39; PC33; PC20; PA14; PA14; PA21; PA29;

M[19P]-1: PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75;
PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-2: PA11; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75;
PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-3: PA11; PA13; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75;
PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-4: PA11; PA13; PA14; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75;
PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-5: PA11; PA13; PA14; PA20; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75;
PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-6: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75;
PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-7: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA28; PA29; PA67; PA75;
PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-8: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA29; PA67; PA75;
PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-9: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA67; PA75;
PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-10: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA75;
PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-11: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67;
PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-12: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67;
PA75; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-13: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67;
PA75; PB02; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-14: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67;
PA75; PB02; PB12; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-15: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67;
PA75; PB02; PB12; PB27; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-16: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67;
PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-17: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67;
PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PC20; PC49; PC60;

M[19P]-18: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67;
PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC49; PC60;

M[19P]-19: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67;
PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC60;

M[19P]-20: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67;
PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49;

M[19P]-21: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
PB12; PB12; PB12; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-22: PA10; PA11; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67;
PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-23: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22;
PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[19P]-24: PA11; PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22;
PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[19P]-25: PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26;
PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[19P]-26: PA10; PA10; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26;
PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[19P]-27: PA10; PA10; PA11; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26;
PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[19P]-28: PA10; PA10; PA11; PA13; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26;
PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[19P]-29: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26;
PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[19P]-30: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA23; PA26; PA26;
PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[19P]-31: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA26; PA26;
PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[19P]-32: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26;
PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[19P]-33: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26;
PA26; PA26; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[19P]-34: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26;
PA26; PA26; PA33; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[19P]-35: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26;
PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[19P]-36: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26;
PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB88; PC12; PC20;

M[19P]-37: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26;
PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PC12; PC20;

M[19P]-38: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26;
PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC20;

M[19P]-39: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26;
PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12;

M[19P]-40: PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12;
PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-41: PA00; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12;
PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-42: PA00; PA10; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12;
PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-44: PA00; PA10; PA20; PA21; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12;
PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-45: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12;
PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-46: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA57; PB07; PB12; PB12;
PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-47: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PB07; PB12; PB12;
PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-48: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB12; PB12;
PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-49: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-50: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
PB12; PB12; PB12; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-51: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-52: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC51; PC55; PC67;

M[19P]-53: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC55; PC67;

M[19P]-54: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC67;

M[19P]-55: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12;
PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55;

M[19P]-56: PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67;
PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-57: PA10; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67;
PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-58: PA10; PA11; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67;
PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-59: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67;
PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-60: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA21; PA23; PA29; PA67;
PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-62: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA23; PA29; PA67;
PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-62: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA29; PA67;
PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-63: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA67;
PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-64: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29;
PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-65: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29;
PA67; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-66: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29;
PA67; PB00; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-67: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29;
PA67; PB00; PB07; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-68: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29;
PA67; PB00; PB07; PB12; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-69: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29;
PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-70: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29;
PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC52; PC60; PC71;

M[19P]-71: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29;
PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC60; PC71;

M[19P]-72: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29;
PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC71;

M[19P]-73: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29;
PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60;

M[19P]-89: PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52;
PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;

M[19P]-91: PA11; PA11; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52;
PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;

M[19P]-92: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52;
PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;

M[19P]-93: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA28; PA52;
PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;

M[19P]-93: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA52;
PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;

M[19P]-95: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28;
PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;

M[19P]-96: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28;
PA52; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;

M[19P]-96: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28;
PA52; PA67; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;

M[19P]-98: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28;
PA52; PA67; PB00; PB12; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;

M[19P]-100: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26;
PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB38; PB60; PC37; PC52;

M[19P]-100: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26;
PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB60; PC37; PC52;

M[19P]-101: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26;
PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PC37; PC52;

M[19P]-102: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26;
PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC52;

M[19P]-103: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26;
PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37;

M[19P]-104: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12;
PC33; PA39; PA22; PA20; PC26; PC20; PA12; PA14; PA14; PB60;

M[19P]-105: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13;
PA13; PA21; PA29; PC20; PC49; PA14; PA14; PA22; PA20; PA12;

M[19P]-106: PA13; PA13; PA13; PC49; PC37; PA11; PA20; PA22; PA12;
PC26; PB60; PA39; PC33; PC20; PA14; PA14; PA21; PA29; PB12;

M[20P]-29: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA15; PA16; PA17; PA18; PA19;
PA20; PA21; PA22; PA23; PA24; PA25; PA26; PA27; PA28; PA29;

M[20P]-240: PA21; PA24; PA26; PA33; PA37; PA39; PA67; PB00; PB10;
PB12; PB26; PB28; PB33; PB82; PB88; PC20; PC21; PC52; PC60; PC97;

M[20P]-296: PA00; PA11; PA13; PA15; PA21; PA22; PA24; PA26; PA28;
PA33; PA39; PA94; PB08; PB12; PB20; PB28; PB33; PB99; PC26; PC52;

M[20P]-297: PA10; PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA29;
PA33; PA57; PA67; PA69; PB07; PB12; PB60; PC20; PC37; PC49; PC98;

M[20P]-335: PA00; PA10; PA11; PA21; PA26; PA27; PA31; PA34; PA67;
PA69; PA81; PA89; PB01; PB10; PB12; PB25; PB58; PC11; PC86; PC97;

M[20P]-340: PA11; PA13; PA15; PA18; PA21; PA26; PA34; PA36; PA69; PA79; PA95; PB00; PB05; PB07; PB25; PB48; PB60; PC35; PC74; PC84;

M[20P]-349: PA10; PA11; PA13; PA16; PA20; PA33; PA69; PA94; PB07; PB08; PB12; PC01; PC27; PC28; PC49; PC50; PC53; PC55; PC60; PC67;

M[20P]-371: PA05; PA14; PA15; PA21; PA22; PA23; PA25; PA27; PA32; PA34; PA35; PA57; PA72; PA89; PB12; PB39; PB88; PC20; PC55; PC74;

M[20P]-374: PA06; PA13; PA21; PA24; PA25; PA26; PA27; PA57; PB12; PB24; PB28; PB29; PB35; PB38; PB61; PC11; PC37; PC54; PC74; PC86;

M[20P]-375: PA11; PA15; PA19; PA20; PA21; PA22; PA28; PA29; PA67; PA81; PB10; PB12; PB26; PB28; PC23; PC52; PC58; PC60; PC73; PC98;

M[20P]-377: PA07; PA10; PA11; PA13; PA14; PA21; PA22; PA24; PA29; PA32; PA33; PA35; PA57; PB10; PB28; PB36; PB82; PC49; PC52; PC94;

M[20P]-380: PA13; PA15; PA16; PA21; PA24; PA28; PA33; PA38; PA40; PA72; PB12; PB26; PB27; PB82; PC14; PC33; PC55; PC57; PC58; PC98;

M[20P]-382: PA00; PA12; PA13; PA16; PA21; PA24; PA25; PA26; PA28; PA29; PA35; PA57; PA75; PB33; PB88; PC14; PC24; PC36; PC58; PC66;

M[20P]-383: PA10; PA21; PA22; PA23; PA25; PA27; PA81; PA85; PB12; PB26; PB28; PB39; PB77; PB82; PC01; PC17; PC37; PC50; PC52; PC67;

M[20P]-386: PA13; PA14; PA28; PA29; PA33; PA35; PA40; PA57; PA67; PA79; PA88; PB00; PB01; PB07; PB12; PB33; PB77; PB85; PC50; PC66;

M[20P]-387: PA00; PA05; PA10; PA21; PA23; PA24; PA29; PA40; PA94; PA99; PB12; PB82; PB88; PB99; PC11; PC20; PC24; PC34; PC37; PC61;

M[20P]-388: PA12; PA13; PA14; PA15; PA20; PA21; PA26; PA29; PA35; PA40; PA67; PA89; PA98; PB12; PB33; PC01; PC14; PC58; PC68; PC88;

M[20P]-392: PA11; PA14; PA21; PA23; PA26; PA29; PA30; PA57; PA81; PA85; PA94; PB03; PB07; PB12; PB29; PC33; PC51; PC53; PC71; PC73;

M[20P]-396: PA05; PA14; PA15; PA17; PA21; PA28; PA29; PA35; PA37; PA39; PA40; PA69; PA72; PA89; PB10; PB12; PC34; PC67; PC71; PC97;

M[20P]-401: PA13; PA15; PA16; PA23; PA26; PA29; PA33; PA34; PA85; PB12; PB26; PB33; PC21; PC50; PC52; PC53; PC55; PC58; PC67; PC71;

M[20P]-403: PA13; PA14; PA20; PA22; PA24; PA26; PA33; PA35; PB08; PB12; PB26; PB33; PB50; PB61; PC21; PC27; PC37; PC52; PC54; PC58;

M[20P]-407: PA20; PA21; PA22; PA25; PA29; PA48; PA51; PA57; PA67; PA75; PA94; PB07; PB12; PC21; PC34; PC41; PC51; PC53; PC55; PC97;

M[20P]-408: PA11; PA12; PA13; PA15; PA16; PA20; PA21; PA22; PA25; PA26; PA27; PA28; PA29; PB10; PB26; PC20; PC21; PC24; PC25; PC58;

M[20P]-409: PA10; PA15; PA21; PA28; PA35; PA69; PA89; PA94; PA98; PB07; PB12; PB28; PB35; PB36; PC11; PC23; PC49; PC52; PC73; PC98;

M[20P]-416: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[20P]-418: PA10; PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA23; PA24; PA26; PA39; PB07; PB12; PB38; PC11; PC12; PC20; PC23; PC24; PC49; PC55;

M[20P]-420: PA10; PA14; PA21; PA22; PA23; PA29; PA30; PA33; PA37; PB01; PB12; PB26; PB33; PB99; PC20; PC21; PC36; PC37; PC73; PC98;

M[20P]-421: PA13; PA15; PA21; PA25; PA26; PA29; PA39; PA40; PA75; PA94; PB20; PB55; PB82; PC06; PC20; PC24; PC49; PC71; PC74; PC99;

M[20P]-422: PA10; PA11; PA13; PA18; PA21; PA23; PA25; PA29; PA33; PA57; PA70; PB01; PB07; PB12; PB88; PC11; PC27; PC33; PC55; PC97;

M[20P]-427: PA06; PA13; PA15; PA21; PA24; PA25; PA27; PA29; PA33; PA75; PA98; PB00; PB28; PB60; PC11; PC20; PC26; PC50; PC55; PC74;

M[20P]-429: PA11; PA19; PA21; PA23; PA26; PA33; PA40; PA75; PB00; PB03; PB12; PB60; PC11; PC21; PC24; PC26; PC36; PC37; PC68; PC98;

M[20P]-430: PA00; PA07; PA13; PA23; PA26; PA27; PA34; PA40; PA75; PB07; PB12; PB18; PB28; PB88; PC20; PC41; PC66; PC67; PC71; PC97;

M[20P]-431: PA00; PA06; PA11; PA12; PA13; PA15; PA18; PA21; PA22; PA25; PA28; PA33; PA81; PB09; PB32; PB33; PB38; PC11; PC33; PC52;

M[20P]-432: PA12; PA14; PA19; PA21; PA24; PA26; PA33; PA67; PB05; PB09; PB12; PB28; PB32; PB46; PB60; PC20; PC49; PC58; PC71; PC73;

M[20P]-435: PA10; PA13; PA14; PA15; PA21; PA28; PA33; PA40; PA55; PA57; PB07; PB12; PB58; PB88; PB99; PC12; PC21; PC29; PC66; PC67;

M[20P]-439: PA10; PA13; PA16; PA21; PA24; PA27; PA29; PA34; PA40; PA60; PA75; PB12; PB27; PB35; PB38; PC25; PC26; PC36; PC51; PC55;

M[20P]-443: PA00; PA10; PA13; PA15; PA17; PA20; PA29; PA33; PA35; PA40; PB07; PB12; PB26; PB27; PB82; PC12; PC24; PC50; PC60; PD02;

M[20P]-444: PA11; PA13; PA14; PA18; PA21; PA24; PA28; PA39; PA40;
PA57; PA60; PA67; PA88; PB20; PB85; PB88; PC06; PC52; PC57; PC58;

M[20P]-445: PA11; PA13; PA17; PA20; PA21; PA29; PA30; PA33; PA35;
PA40; PA57; PB00; PB12; PB28; PB60; PC11; PC20; PC35; PC50; PC51;

M[20P]-446: PA13; PA15; PA16; PA21; PA22; PA23; PA25; PA26; PA27;
PA29; PA39; PA67; PA75; PB12; PB26; PB27; PC36; PC49; PC60; PC98;

M[20P]-447: PA11; PA13; PA17; PA19; PA24; PA28; PA30; PA33; PA39;
PA40; PA57; PA92; PB07; PB08; PB12; PB33; PB61; PB85; PC58; PC94;

M[20P]-449: PA10; PA11; PA13; PA14; PA15; PA20; PA21; PA24; PA28;
PA40; PA67; PA75; PA95; PB12; PB20; PB35; PC14; PC20; PC52; PC60;

M[20P]-453: PA10; PA13; PA15; PA18; PA21; PA25; PA29; PA34; PA35;
PA67; PA93; PB06; PB07; PB09; PB12; PB20; PB26; PB35; PB99; PC55;

M[20P]-455: PA00; PA00; PA11; PA11; PA13; PA14; PA18; PA20; PA25;
PA28; PA33; PA70; PA75; PB00; PB12; PC20; PC23; PC26; PC67; PC67;

M[20P]-456: PA14; PA21; PA33; PA34; PA39; PB00; PB07; PB07; PB12;
PB27; PB28; PB38; PB88; PC20; PC23; PC26; PC49; PC58; PC67; PC71;

M[20P]-457: PA00; PA10; PA11; PA12; PA13; PA13; PA14; PA29; PA29;
PA57; PA67; PB02; PB07; PB09; PB12; PB38; PC11; PC60; PC97; PC98;

M[20P]-458: PA10; PA11; PA11; PA13; PA13; PA18; PA21; PA26; PA33;
PA57; PA75; PA98; PB12; PB33; PB33; PB38; PB82; PC20; PC55; PC73;

M[20P]-459: PA00; PA06; PA21; PA26; PA26; PA29; PA33; PA75; PB10;
PB10; PB12; PB18; PB32; PB85; PC20; PC24; PC49; PC55; PC66; PC98;

M[20P]-461: PA06; PA21; PA29; PA29; PA33; PA33; PA39; PA57; PA67;
PB07; PB07; PB12; PB26; PB32; PB32; PB85; PC20; PC27; PC52; PC58;

M[20P]-465: PA11; PA11; PA13; PA16; PA21; PA22; PA27; PA29; PA33;
PA69; PB07; PB26; PB28; PB32; PB77; PB88; PB88; PC23; PC60; PC73;

M[20P]-467: PA00; PA06; PA21; PA21; PA23; PA26; PA33; PA33; PA40;
PA67; PB12; PB38; PB88; PC11; PC23; PC23; PC27; PC55; PC71; PC97;

M[20P]-469: PA00; PA12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PA33; PA33;
PA34; PA57; PB07; PC11; PC11; PC20; PC23; PC23; PC55; PC74; PC97;

M[20P]-470: PA13; PA14; PA21; PA21; PA22; PA23; PA24; PA24; PA27;
PA29; PA33; PA67; PA75; PB07; PB07; PB33; PB33; PB77; PC37; PC52;

M[20P]-472: PA10; PA10; PA11; PA13; PA21; PA25; PA25; PA28; PA33;
PA39; PB07; PB12; PB88; PC12; PC12; PC20; PC20; PC24; PC55; PC71;

M[20P]-474: PA00; PA13; PA20; PA21; PA26; PA28; PA29; PA33; PA57;
PA67; PA81; PA81; PA98; PB02; PB12; PB38; PB60; PB88; PC11; PC20;

M[20P]-475: PA11; PA12; PA12; PA13; PA28; PA28; PA29; PA29; PA32;
PA52; PA52; PA75; PA81; PB12; PB20; PB33; PB60; PC21; PC49; PC51;

M[20P]-478: PA15; PA16; PA21; PA21; PA21; PA23; PA25; PA32; PA34;
PA39; PB12; PB77; PB85; PB88; PB88; PB88; PB88; PC11; PC33; PC37;

M[20P]-479: PA10; PA11; PA13; PA13; PA18; PA20; PA21; PA28; PA32;
PA40; PA67; PA69; PB07; PB07; PB10; PB12; PB20; PC55; PC60; PC98;

M[20P]-480: PA00; PA06; PA13; PA22; PA23; PA26; PA26; PA27; PA29;
PA40; PA81; PB07; PB10; PB10; PB12; PB12; PB18; PB32; PC49; PC71;

M[20P]-481: PA11; PA13; PA26; PA29; PA29; PA35; PA69; PA75; PA75;
PB02; PB12; PB33; PC20; PC23; PC23; PC37; PC41; PC50; PC52; PC98;

M[20P]-482: PA06; PA10; PA11; PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14;
PA14; PA20; PA25; PA26; PA28; PA39; PA67; PB12; PC11; PC24; PC74;

M[20P]-484: PA11; PA13; PA23; PA28; PA29; PA29; PA35; PA39; PA40;
PA60; PA75; PA98; PB02; PB12; PB38; PB38; PB82; PC20; PC35; PC50;

M[20P]-485: PA13; PA14; PA14; PA21; PA21; PA21; PA26; PA26; PA26;
PA26; PA29; PA29; PA52; PA57; PB00; PC11; PC11; PC21; PC51; PC67;

M[20P]-486: PA11; PA13; PA23; PA24; PA35; PA35; PA35; PA69; PA69;
PA75; PB07; PB12; PB27; PC20; PC20; PC21; PC23; PC50; PC55; PC73;

M[20P]-490: PA10; PA11; PA11; PA14; PA21; PA24; PA26; PA26; PA39;
PA40; PA69; PA75; PB00; PB01; PB12; PB12; PB18; PB28; PB60; PC20;

M[20P]-493: PA06; PA14; PA20; PA21; PA21; PA28; PA29; PA33; PA69;
PA81; PA98; PB12; PB38; PB60; PC11; PC12; PC49; PC55; PC71; PD02;

M[20P]-494: PA06; PA10; PA11; PA11; PA13; PA13; PA15; PA23; PA26;
PA35; PB01; PB12; PB60; PC12; PC20; PC37; PC41; PC49; PC49; PC52;

M[20P]-495: PA10; PA10; PA13; PA14; PA18; PA20; PA21; PA26; PA29;
PA29; PA57; PB02; PC11; PC11; PC20; PC20; PC24; PC33; PC49; PC49;

M[20P]-496: PA00; PA18; PA21; PA24; PA26; PA27; PA29; PA39; PA39;
PA52; PA69; PA70; PA98; PB00; PB02; PB12; PC12; PC24; PC55; PC67;

M[20P]-497: PA11; PA11; PA13; PA13; PA15; PA21; PA23; PA24; PA25;
PA26; PA28; PA39; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PC12; PC37;

M[20P]-499: PA13; PA21; PA21; PA21; PA29; PA30; PA69; PA75; PB07;
PB07; PB07; PB60; PC20; PC20; PC21; PC37; PC37; PC49; PC55; PD02;

M[20P]-503: PA06; PA06; PA10; PA10; PA13; PA13; PA20; PA21; PA25;
PA26; PA29; PA33; PA39; PA70; PB28; PC11; PC20; PC23; PC49; PC97;

M[20P]-506: PA11; PA16; PA21; PA23; PA29; PA39; PA57; PB12; PB27;
PB32; PB88; PB88; PB88; PC12; PC20; PC21; PC37; PC71; PD02; PD02;

M[20P]-510: PA13; PA21; PA25; PA26; PA27; PA33; PA39; PA40; PA69;
PA81; PB01; PB28; PB60; PB85; PB88; PC27; PC41; PC41; PC50; PC55;

M[20P]-514: PA11; PA12; PA13; PA13; PA21; PA21; PA28; PA29; PA33;
PA35; PA39; PA40; PA40; PA67; PA67; PB12; PC14; PC20; PC41; PC55;

M[20P]-516: PA07; PA10; PA13; PA14; PA17; PA21; PA28; PA29; PA39;
PA40; PA40; PA69; PB07; PB12; PC21; PC21; PC27; PC37; PD02; PD02;

M[20P]-520: PA11; PA11; PA12; PA13; PA14; PA15; PA29; PA33; PA33;
PA57; PA67; PA70; PA98; PB12; PC20; PC23; PC33; PC52; PC55; PD02;

M[20P]-523: PA10; PA11; PA18; PA20; PA21; PA33; PA39; PA67; PA67;
PA69; PB07; PB12; PB28; PB88; PB88; PC21; PC33; PC35; PC49; PC50;

M[20P]-524: PA00; PA11; PA11; PA12; PA13; PA20; PA29; PA40; PB07;
PB12; PB28; PB38; PB60; PB60; PB77; PC20; PC20; PC49; PC49; PC98;

M[20P]-525: PA11; PA11; PA13; PA15; PA21; PA26; PA26; PA27; PA28;
PA29; PA29; PA30; PA40; PA52; PA75; PB07; PB07; PC11; PC33; PC37;

M[20P]-527: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23;
PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;

M[20P]-532: PA14; PA20; PA20; PA21; PA22; PA25; PA26; PA27; PA28;
PA29; PA33; PA40; PA75; PB00; PB12; PB12; PB60; PB85; PC12; PC51;

M[20P]-533: PA13; PA21; PA26; PA27; PA27; PA28; PA32; PA60; PA70;
PA75; PB18; PB32; PB38; PC23; PC41; PC50; PC50; PC51; PC52; PC97;

M[20P]-535: PA11; PA21; PA26; PA28; PA29; PA29; PA29; PA34; PA57;
PB07; PB12; PB12; PB12; PB33; PB60; PC20; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[20P]-536: PA00; PA10; PA11; PA12; PA12; PA13; PA14; PA23; PA29;
PA29; PA35; PA40; PA81; PB07; PB07; PB12; PB27; PB33; PB60; PC20;

M[20P]-538: PA21; PA23; PA25; PA26; PA27; PA28; PA75; PB07; PB12; PB27; PB32; PB88; PC11; PC11; PC12; PC20; PC33; PC49; PC55; PC97;

M[20P]-541: PA10; PA11; PA13; PA20; PA24; PA28; PA29; PA67; PA70; PB10; PB12; PB77; PC20; PC20; PC23; PC41; PC51; PC52; PC52; PC97;

M[20P]-548: PA10; PA13; PA14; PA14; PA22; PA27; PA27; PA28; PA29; PA29; PA33; PA39; PB10; PB12; PB60; PB88; PC20; PC37; PC50; PC55;

M[20P]-551: PA12; PA13; PA13; PA20; PA22; PA23; PA24; PA24; PA26; PA33; PA33; PA39; PA67; PB07; PB07; PB12; PB33; PC20; PC55; PC98;

M[20P]-552: PA06; PA11; PA11; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA21; PA21; PA24; PA35; PB00; PB02; PB12; PB60; PB60; PC12; PC21; PC98;

M[20P]-555: PA00; PA10; PA11; PA18; PA20; PA20; PA21; PA25; PA26; PA26; PA39; PA39; PA39; PA89; PB12; PB12; PC20; PC20; PC49; PC74;

M[20P]-557: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[20P]-559: PA00; PA11; PA12; PA13; PA20; PA22; PA24; PA25; PA25; PA26; PA28; PA57; PA70; PA70; PB07; PB12; PB88; PB88; PC11; PC60;

M[20P]-560: PA10; PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA25; PA28; PA28; PA29; PA67; PB12; PB38; PB60; PC24; PC35; PC41; PC51; PC97;

M[20P]-563: PA12; PA13; PA20; PA20; PA21; PA24; PA25; PA25; PA29; PA29; PA33; PA81; PB33; PB60; PB60; PB88; PB88; PB88; PC11; PC41;

M[20P]-564: PA07; PA13; PA13; PA21; PA26; PA37; PA39; PA67; PA67; PB02; PB07; PB07; PB12; PB12; PB28; PC12; PC37; PC97; PC97; PC97;

M[20P]-565: PA07; PA11; PA13; PA20; PA29; PA29; PA32; PA75; PA95; PA98; PB02; PB12; PB32; PB33; PB60; PB85; PC20; PC24; PC35; PC41;

M[20P]-567: PA10; PA13; PA14; PA16; PA21; PA26; PA28; PA75; PA81; PB07; PB07; PB12; PB88; PC23; PC24; PC24; PC33; PC52; PC55; PC67;

M[20P]-569: PA13; PA14; PA21; PA26; PA27; PA39; PA57; PA67; PB02; PB07; PB12; PB28; PC12; PC21; PC49; PC55; PC55; PC67; PC67; PC98;

M[20P]-572: PA13; PA14; PA21; PA27; PA29; PA33; PA67; PA69; PA79; PB00; PB01; PB12; PB33; PB38; PC37; PC41; PC49; PC51; PC55; PD02;

M[20P]-573: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[20P]-574: PA13; PA21; PA22; PA23; PA25; PA29; PA35; PA67; PB01; PB12; PB12; PB35; PB88; PC24; PC37; PC37; PC51; PC52; PC52; PC66;

M[20P]-575: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;

M[20P]-576: PA11; PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[20P]-577: PA06; PA13; PA13; PA14; PA22; PA22; PA23; PA26; PA28; PA69; PA70; PB07; PB12; PB12; PB32; PC12; PC20; PC24; PC24; PC98;

M[20P]-579: PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA26; PA26; PA28; PA57; PA81; PB02; PB07; PB12; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PD02; PD02;

M[20P]-580: PA00; PA11; PA12; PA13; PA20; PA21; PA21; PA25; PA26; PA26; PA33; PA75; PA75; PA75; PB28; PB88; PC20; PC76; PC98; PC98;

M[20P]-581: PA10; PA11; PA13; PA21; PA22; PA25; PA29; PA67; PB07; PB60; PB88; PB88; PC20; PC21; PC24; PC37; PC41; PC55; PC66; PC98;

M[20P]-582: PA10; PA11; PA12; PA13; PA20; PA21; PA23; PA25; PA39; PA75; PB07; PB07; PB38; PB38; PB60; PB60; PC20; PC24; PC41; PC66;

M[20P]-583: PA11; PA13; PA14; PA23; PA25; PA25; PA26; PA26; PA28; PA67; PB12; PB18; PB88; PC24; PC24; PC37; PC41; PC49; PC55; PC60;

M[20P]-584: PA00; PA14; PA21; PA26; PA26; PA28; PA39; PA39; PA67; PA75; PB12; PB12; PB27; PB33; PB60; PC11; PC41; PC49; PC55; PC97;

M[20P]-588: PA07; PA13; PA14; PA21; PA26; PA26; PA26; PA26; PA32; PA67; PA67; PA75; PB12; PB27; PB33; PB60; PC20; PC20; PC23; PC24;

M[20P]-589: PA13; PA13; PA22; PA25; PA25; PA27; PA29; PA29; PA35; PA39; PA52; PA75; PB12; PB32; PB38; PB85; PB88; PC11; PC23; PC98;

M[20P]-590: PA11; PA13; PA13; PA14; PA25; PA29; PA33; PA35; PA35; PA35; PA39; PB02; PB12; PC11; PC20; PC20; PC21; PC27; PC55; PC55;

M[20P]-592: PA10; PA10; PA11; PA11; PA13; PA14; PA21; PA21; PA26; PA26; PA27; PA29; PA30; PA75; PB07; PB07; PB12; PB38; PC20; PC24;

M[20P]-594: PA13; PA21; PA21; PA21; PA23; PA27; PA28; PA39; PA60; PA69; PA70; PB02; PB09; PB12; PB12; PB88; PC24; PC49; PC97; PC98;

M[20P]-595: PA11; PA13; PA22; PA23; PA25; PA28; PA28; PA28; PA29; PA29; PA39; PA67; PA69; PB12; PB60; PC12; PC20; PC24; PC49; PC55;

M[20P]-596: PA11; PA11; PA13; PA13; PA14; PA21; PA22; PA23; PA26;
PA26; PA67; PB12; PB60; PC11; PC20; PC20; PC37; PC50; PC55; PC60;

M[20P]-599: PA13; PA13; PA14; PA16; PA26; PA29; PA75; PA75; PB07;
PB12; PB60; PB60; PB60; PB60; PC12; PC20; PC20; PC37; PC37; PC52;

M[20P]-601: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA23; PA26; PA29; PA29;
PA35; PB02; PB10; PB12; PB33; PC20; PC21; PC41; PC49; PC60; PC67;

M[20P]-602: PA00; PA10; PA10; PA14; PA14; PA14; PA21; PA25; PA26;
PA29; PA29; PB07; PB07; PB07; PB12; PB12; PC20; PC52; PC55; PD02;

M[20P]-603: PA11; PA13; PA16; PA20; PA21; PA23; PA23; PA26; PA26;
PA28; PA33; PA39; PA39; PA67; PB60; PB60; PC20; PC23; PC49; PC55;

M[20P]-604: PA10; PA13; PA14; PA14; PA18; PA21; PA22; PA23; PA26;
PA28; PA28; PA29; PB12; PB33; PC11; PC11; PC51; PC51; PC60; PC71;

M[20P]-605: PA11; PA11; PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA20; PA25;
PA29; PA39; PA39; PA69; PA81; PB07; PB12; PB88; PC20; PC41; PC55;

M[20P]-607: PA10; PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA22; PA22; PA26;
PA33; PA35; PA75; PA75; PA81; PB12; PB88; PC20; PC49; PC55; PC97;

M[20P]-608: PA00; PA13; PA13; PA13; PA18; PA26; PA27; PA29; PA35;
PA57; PA69; PA75; PA98; PB12; PB60; PC11; PC20; PC20; PC55; PC60;

M[20P]-609: PA11; PA14; PA21; PA22; PA23; PA26; PA34; PA52; PA67;
PA69; PA69; PB07; PB12; PB12; PB27; PB77; PC12; PC20; PC55; PC97;

M[20P]-612: PA11; PA13; PA14; PA14; PA14; PA21; PA22; PA23; PA52;
PA81; PB00; PB07; PB12; PB33; PB38; PB60; PC12; PC24; PC33; PC37;

M[20P]-613: PA10; PA13; PA13; PA14; PA21; PA21; PA22; PA23; PA26;
PA28; PA28; PA29; PB12; PB12; PB27; PB60; PC20; PC21; PC21; PC60;

M[20P]-616: PA13; PA26; PA28; PA29; PA39; PA57; PA67; PB07; PB12;
PB38; PB60; PB77; PB77; PB88; PC33; PC49; PC52; PC52; PC98; PC98;

M[20P]-618: PA11; PA12; PA13; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA23;
PA26; PA29; PA67; PA79; PB88; PC11; PC20; PC20; PC37; PC41; PC55;

M[20P]-620: PA12; PA13; PA20; PA22; PA22; PA23; PA26; PA26; PA28;
PA39; PA69; PA95; PB12; PB60; PB77; PC20; PC21; PC52; PC60; PC98;

M[20P]-621: PA10; PA13; PA14; PA24; PA24; PA26; PA27; PA29; PA32;
PA35; PA67; PB12; PB12; PB12; PB27; PB33; PB33; PB38; PB38; PB38;

M[20P]-622: PA10; PA12; PA14; PA14; PA15; PA20; PA21; PA26; PA27;
PA32; PA40; PB10; PB12; PB12; PB88; PC20; PC20; PC21; PC52; PC60;

M[20P]-623: PA10; PA11; PA13; PA14; PA20; PA24; PA25; PA26; PA26;
PA28; PA39; PA81; PB09; PB12; PB28; PB88; PC24; PC41; PC52; PC98;

M[20P]-626: PA11; PA11; PA13; PA13; PA20; PA21; PA21; PA25; PA27;
PA27; PA28; PA39; PA39; PA40; PA57; PB12; PB60; PC20; PC37; PC41;

M[20P]-631: PA10; PA13; PA20; PA21; PA21; PA23; PA23; PA26; PA29;
PA39; PA39; PA67; PB10; PB38; PB60; PC11; PC20; PC37; PC49; PC66;

M[20P]-632: PA10; PA11; PA18; PA21; PA22; PA23; PA28; PA29; PA33;
PA34; PA69; PB07; PB12; PB60; PC20; PC20; PC20; PC37; PC41; PC55;

M[20P]-633: PA10; PA11; PA11; PA13; PA20; PA34; PA39; PB00; PB07;
PB12; PB12; PB60; PB88; PB88; PC11; PC12; PC23; PC35; PC49; PC52;

M[20P]-634: PA13; PA13; PA13; PA21; PA22; PA22; PA25; PA25; PA28;
PA28; PA29; PA67; PA81; PB00; PB12; PB12; PB27; PB33; PC11; PC98;

M[20P]-635: PA00; PA14; PA17; PA20; PA21; PA23; PA26; PA27; PA75;
PA81; PB00; PB12; PB82; PC11; PC20; PC26; PC51; PC52; PC55; PC71;

M[20P]-638: PA00; PA14; PA17; PA21; PA22; PA24; PA28; PA33; PA52;
PA57; PA75; PB00; PB07; PB12; PB28; PB88; PC20; PC37; PC41; PC97;

M[20P]-649: PA06; PA10; PA11; PA12; PA13; PA15; PA16; PA20; PA24;
PA30; PA33; PA98; PB10; PB12; PB28; PB32; PB60; PC11; PC20; PC66;

M[20P]-654: PA00; PA11; PA15; PA20; PA21; PA26; PA32; PA34; PA35;
PA39; PA57; PB10; PB12; PB18; PC11; PC20; PC21; PC50; PC55; PC66;

M[20P]-655: PA11; PA13; PA14; PA20; PA22; PA26; PA28; PA30; PA40;
PA52; PA57; PA81; PB12; PB32; PB85; PC41; PC50; PC55; PC66; PC71;

M[20P]-658: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA15; PA17; PA20; PA21;
PA28; PA29; PA52; PA67; PB10; PB12; PB18; PB60; PC20; PC41; PC66;

M[20P]-659: PA00; PA11; PA21; PA22; PA24; PA26; PA27; PA28; PA29;
PA33; PA35; PA81; PB07; PB12; PB18; PB28; PB85; PC37; PC49; PC74;

M[20P]-663: PA06; PA13; PA20; PA25; PA26; PA27; PA28; PA40; PA67;
PA81; PB00; PB12; PB18; PB33; PB61; PC20; PC24; PC37; PC41; PC52;

M[20P]-666: PA06; PA13; PA21; PA23; PA27; PA28; PA30; PA40; PA75;
PB00; PB07; PB10; PB12; PB18; PB28; PB33; PC20; PC49; PC52; PC71;

M[20P]-668: PA10; PA16; PA17; PA21; PA24; PA27; PA28; PA33; PA40; PA57; PA75; PA79; PB07; PB08; PB12; PB33; PB88; PC20; PC35; PC97;

M[20P]-670: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA23; PA27; PA28; PA35; PA39; PA67; PA79; PA81; PA89; PB10; PB12; PB18; PC20; PC21; PC51;

M[20P]-678: PA06; PA11; PA12; PA13; PA21; PA23; PA29; PA35; PA39; PA40; PB00; PB07; PB10; PB12; PB33; PB60; PB77; PC11; PC67; PC76;

M[20P]-681: PA07; PA10; PA11; PA21; PA24; PA26; PA30; PA35; PA39; PA57; PA75; PB07; PB12; PB28; PB88; PC11; PC49; PC55; PC58; PC66;

M[20P]-686: PA00; PA10; PA13; PA22; PA24; PA27; PA28; PA33; PA39; PA40; PA69; PB12; PB32; PB38; PB85; PB88; PC20; PC55; PC60; PC66;

M[20P]-692: PA07; PA10; PA13; PA21; PA22; PA26; PA34; PA39; PA40; PA81; PB12; PB18; PB32; PB33; PB88; PC35; PC37; PC52; PC55; PC76;

M[20P]-694: PA07; PA11; PA13; PA14; PA15; PA16; PA21; PA27; PA28; PA29; PA35; PA39; PA40; PA75; PB12; PB33; PB88; PC50; PC51; PC52;

M[20P]-697: PA00; PA13; PA16; PA19; PA21; PA22; PA25; PA27; PA28; PA39; PA79; PA81; PB00; PB12; PB32; PB60; PB99; PC51; PC58; PC76;

M[20P]-703: PA00; PA13; PA14; PA15; PA24; PA26; PA33; PA35; PA52; PA75; PA81; PB07; PB12; PB28; PB85; PC20; PC21; PC35; PC41; PD02;

M[20P]-705: PA11; PA13; PA30; PA33; PA40; PA67; PA75; PB07; PB12; PB28; PB35; PB88; PC20; PC21; PC24; PC35; PC37; PC41; PC50; PC55;

M[20P]-708: PA07; PA13; PA23; PA25; PA27; PA29; PA30; PA33; PA52; PA57; PA75; PB00; PB08; PB12; PB38; PB60; PB77; PC50; PC76; PD02;

M[20P]-709: PA11; PA13; PA17; PA20; PA21; PA23; PA26; PA27; PA28; PA40; PA69; PA81; PA92; PB00; PB07; PB12; PC20; PC41; PC52; PC66;

M[20P]-712: PA12; PA13; PA15; PA20; PA22; PA26; PA27; PA29; PA35; PA52; PA81; PB07; PB10; PB12; PB33; PB88; PC11; PC20; PC41; PC52;

M[20P]-714: PA07; PA10; PA11; PA16; PA21; PA26; PA33; PA40; PA67; PA81; PA98; PB00; PB07; PB12; PB28; PC11; PC41; PC49; PC50; PC98;

M[20P]-716: PA11; PA13; PA15; PA19; PA22; PA26; PA33; PA37; PA39; PA57; PB07; PB12; PB28; PB33; PB88; PB99; PC14; PC23; PC35; PC67;

M[20P]-718: PA12; PA13; PA15; PA16; PA20; PA22; PA25; PA26; PA39; PA40; PA92; PB07; PB12; PB27; PB35; PB38; PB99; PC11; PC27; PC41;

M[20P]-721: PA19; PA20; PA21; PA24; PA25; PA27; PA29; PA30; PA55;
PA57; PB12; PB32; PB58; PB60; PB88; PB99; PC41; PC50; PC60; PC67;

M[20P]-723: PA12; PA13; PA16; PA17; PA21; PA28; PA29; PA33; PA34;
PA40; PA60; PA89; PB28; PB60; PB61; PC14; PC24; PC41; PC51; PC74;

M[20P]-724: PA13; PA23; PA25; PA35; PA57; PA67; PB07; PB12; PB32;
PB33; PB88; PB99; PC12; PC20; PC23; PC49; PC50; PC66; PC67; PC94;

M[20P]-725: PA00; PA13; PA14; PA20; PA22; PA25; PA26; PA28; PA33;
PA40; PA57; PA81; PB12; PB16; PB33; PB88; PC11; PC24; PC51; PC74;

M[20P]-733: PA11; PA13; PA15; PA21; PA28; PA30; PA33; PA40; PB12;
PB32; PB33; PB99; PC11; PC12; PC20; PC60; PC73; PC74; PC94; PD02;

M[20P]-737: PA00; PA11; PA13; PA15; PA17; PA21; PA24; PA28; PA29;
PA30; PA67; PB07; PB27; PB28; PB77; PC20; PC21; PC41; PC51; PC94;

M[20P]-740: PA11; PA13; PA14; PA15; PA22; PA23; PA28; PA33; PA39;
PA57; PA75; PA89; PB02; PB12; PB28; PB33; PC12; PC21; PC24; PC55;

M[20P]-745: PA11; PA21; PA22; PA24; PA26; PA27; PA28; PA29; PA57;
PA89; PB07; PB12; PB28; PB33; PC08; PC11; PC41; PC66; PC67; PC98;

M[20P]-746: PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA33; PA39; PA40; PA81;
PB06; PB07; PB12; PB32; PB60; PC20; PC21; PC24; PC37; PC50; PC55;

M[20P]-748: PA11; PA13; PA14; PA17; PA23; PA26; PA32; PA57; PA60;
PA81; PB07; PB12; PB28; PB32; PB33; PB85; PB99; PC20; PC21; PC35;

M[20P]-752: PA11; PA13; PA18; PA26; PA28; PA29; PA33; PA35; PA39;
PA67; PA75; PB07; PB12; PB32; PB88; PB99; PC12; PC50; PC54; PC62;

M[20P]-753: PA11; PA12; PA13; PA14; PA15; PA29; PA32; PA40; PA57;
PA81; PB00; PB12; PB33; PB60; PC20; PC21; PC49; PC52; PC66; PD02;

M[20P]-757: PA11; PA13; PA21; PA22; PA23; PA27; PA34; PA35; PA40;
PA57; PA67; PB10; PB12; PB22; PB58; PC11; PC14; PC23; PC55; PC98;

M[20P]-758: PA10; PA11; PA13; PA20; PA21; PA23; PA28; PA29; PA30;
PA40; PA69; PA75; PA81; PB12; PC06; PC20; PC41; PC52; PC57; PC74;

M[20P]-764: PA11; PA13; PA22; PA29; PA35; PA40; PA57; PA73; PA75;
PA81; PB08; PB12; PB33; PB82; PC11; PC20; PC21; PC29; PC41; PC52;

M[20P]-765: PA10; PA11; PA13; PA15; PA26; PA27; PA30; PA35; PA40;
PA89; PB12; PB22; PB58; PB60; PC34; PC37; PC55; PC58; PC67; PD02;

M[20P]-766: PA11; PA13; PA17; PA22; PA24; PA25; PA29; PA30; PA33;
PA34; PA35; PA81; PA92; PB00; PB12; PB82; PC24; PC50; PC74; PC97;

M[20P]-767: PA11; PA21; PA22; PA28; PA29; PA33; PA37; PB12; PB60;
PB85; PB88; PB99; PC14; PC20; PC21; PC41; PC51; PC55; PC57; PC98;

M[20P]-771: PA10; PA11; PA13; PA14; PA22; PA26; PA27; PA28; PA29;
PA35; PA86; PA89; PB07; PB12; PB28; PB88; PB99; PC12; PC21; PC50;

M[20P]-777: PA11; PA14; PA15; PA20; PA21; PA24; PA25; PA28; PA29;
PA33; PA75; PB12; PB85; PB99; PC21; PC51; PC55; PC62; PC67; PD02;

M[20P]-779: PA15; PA19; PA20; PA21; PA22; PA23; PA24; PA25; PA29;
PA30; PA57; PA67; PA75; PA89; PB07; PB12; PB32; PC20; PC51; PC74;

M[20P]-781: PA10; PA15; PA21; PA22; PA39; PA57; PA75; PB08; PB09;
PB12; PB28; PB35; PB58; PB60; PC12; PC33; PC37; PC66; PC67; PC74;

M[20P]-782: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA26; PA30; PA75;
PA89; PA92; PB05; PB07; PB12; PB32; PB82; PB99; PC51; PC58; PC73;

M[20P]-785: PA16; PA17; PA21; PA28; PA29; PA30; PA32; PA33; PA55;
PB07; PB12; PB77; PB85; PB88; PB99; PC12; PC20; PC35; PC67; PC98;

M[20P]-786: PA11; PA13; PA14; PA18; PA19; PA21; PA22; PA27; PA28;
PA29; PA33; PA40; PA52; PA57; PA81; PB28; PC11; PC20; PC21; PC50;

M[20P]-787: PA10; PA11; PA13; PA22; PA23; PA35; PB07; PB12; PB22;
PB85; PB99; PC11; PC20; PC41; PC49; PC52; PC53; PC55; PC73; PD02;

M[20P]-789: PA10; PA11; PA13; PA22; PA23; PA27; PA40; PA57; PA75;
PA81; PB07; PB12; PB27; PB60; PB88; PC11; PC20; PC23; PC35; PC41;

M[20P]-791: PA10; PA11; PA13; PA15; PA21; PA33; PA35; PA40; PA57;
PA69; PA85; PA98; PA99; PB07; PB12; PB20; PB99; PC12; PC20; PC58;

M[20P]-793: PA11; PA13; PA14; PA15; PA19; PA26; PA29; PA55; PA67;
PA89; PB12; PB33; PB88; PC14; PC20; PC21; PC34; PC37; PC67; PC97;

M[20P]-794: PA21; PA23; PA28; PA29; PA34; PA35; PA57; PA75; PA81;
PB07; PB12; PB18; PB32; PB58; PC11; PC14; PC41; PC55; PC62; PC74;

M[20P]-795: PA10; PA13; PA20; PA23; PA27; PA29; PA57; PA60; PA69;
PB00; PB07; PB12; PB18; PB32; PB85; PB88; PC20; PC66; PC74; PD02;

M[20P]-803: PA11; PA13; PA15; PA22; PA25; PA26; PA29; PA30; PA33;
PA40; PA75; PB07; PB12; PB28; PC21; PC23; PC34; PC55; PC71; PC73;

M[20P]-804: PA11; PA12; PA13; PA20; PA22; PA23; PA30; PA33; PA34;
PA79; PB12; PB18; PB58; PB60; PB85; PB88; PC20; PC50; PC67; PC68;

M[20P]-806: PA06; PA10; PA11; PA13; PA19; PA20; PA21; PA23; PA25;
PA28; PA52; PA73; PA75; PA98; PB12; PB33; PB82; PB85; PB88; PC11;

M[20P]-816: PA11; PA13; PA19; PA25; PA28; PA29; PA33; PA57; PA81;
PA89; PB00; PB10; PB12; PB26; PB28; PB99; PC11; PC12; PC76; PC97;

M[20P]-819: PA10; PA11; PA13; PA15; PA26; PA34; PA60; PA81; PA92;
PB07; PB12; PB38; PB85; PC01; PC14; PC20; PC52; PC58; PC66; PC67;

M[20P]-823: PA00; PA11; PA12; PA13; PA14; PA17; PA27; PA29; PA40;
PA60; PA75; PA79; PA89; PB07; PB12; PB99; PC20; PC52; PC66; PC71;

M[20P]-830: PA13; PA20; PA25; PA26; PA28; PA40; PA75; PA89; PB00;
PB07; PB12; PB32; PB88; PC06; PC12; PC20; PC41; PC52; PC76; PC98;

M[20P]-831: PA11; PA15; PA21; PA25; PA33; PB12; PB28; PB32; PB33;
PB38; PB60; PB77; PB88; PC20; PC23; PC35; PC37; PC49; PC58; PC66;

M[20P]-841: PA10; PA11; PA13; PA18; PA22; PA28; PA29; PA30; PA35;
PA40; PA55; PA75; PB07; PB12; PB28; PB32; PB33; PC41; PC49; PC60;

M[20P]-844: PA11; PA15; PA21; PA24; PA26; PA29; PA33; PA40; PA69;
PA81; PA98; PB12; PB28; PB61; PC49; PC67; PC71; PC73; PC74; PD02;

M[20P]-845: PA11; PA13; PA14; PA15; PA21; PA30; PA34; PA39; PA60;
PA79; PA81; PA89; PB07; PB18; PC14; PC20; PC21; PC34; PC68; PC97;

M[20P]-846: PA11; PA13; PA25; PA27; PA29; PA32; PA33; PA35; PA37;
PA39; PA40; PB08; PB12; PB33; PB88; PC24; PC41; PC52; PC58; PC62;

M[20P]-847: PA10; PA19; PA20; PA21; PA28; PA29; PA30; PA67; PA75;
PA89; PB00; PB12; PB28; PB33; PB60; PC12; PC55; PC73; PC74; PD02;

M[20P]-848: PA07; PA11; PA13; PA15; PA20; PA22; PA26; PA27; PA30;
PA40; PA69; PA75; PB12; PB32; PB85; PB88; PC34; PC37; PC66; PC68;

M[20P]-849: PA00; PA13; PA25; PA27; PA28; PA29; PA34; PA40; PA57;
PA81; PB00; PB12; PB18; PB77; PC20; PC24; PC35; PC41; PC50; PC51;

M[20P]-852: PA00; PA11; PA13; PA15; PA19; PA22; PA26; PA35; PA89;
PB00; PB12; PB58; PB77; PC12; PC20; PC29; PC62; PC71; PC94; PC98;

M[20P]-853: PA00; PA11; PA21; PA24; PA25; PA33; PA57; PA60; PB07;
PB12; PB28; PB32; PB60; PB82; PB88; PC24; PC41; PC50; PC51; PC58;

M[20P]-857: PA00; PA11; PA13; PA26; PA28; PA75; PA76; PA79; PB12; PB28; PB60; PB88; PC11; PC12; PC20; PC37; PC50; PC52; PC67; PD02;

M[20P]-873: PA10; PA13; PA26; PA27; PA30; PA34; PA85; PA98; PB05; PB07; PB12; PB28; PB29; PB32; PB60; PC14; PC20; PC26; PC41; PC76;

M[20P]-880: PA11; PA13; PA17; PA20; PA22; PA24; PA26; PA27; PA29; PA38; PA57; PB07; PB12; PB20; PB29; PB97; PC24; PC37; PC51; PC71;

M[20P]-888: PA10; PA12; PA15; PA16; PA21; PA27; PA28; PA33; PA44; PB00; PB12; PB13; PB27; PC11; PC20; PC51; PC58; PC73; PC75; PD02;

M[20P]-890: PA00; PA11; PA13; PA15; PA16; PA25; PA34; PA75; PA82; PA86; PB00; PB12; PB16; PB27; PB33; PC20; PC49; PC50; PC57; PC98;

M[20P]-894: PA12; PA18; PA21; PA24; PA26; PA27; PA34; PA57; PA67; PA82; PB01; PB12; PB33; PB76; PB98; PB99; PC11; PC24; PC33; PC83;

M[20P]-902: PA12; PA13; PA21; PA26; PA29; PA39; PA40; PA57; PA96; PB00; PB07; PB12; PB27; PC20; PC50; PC53; PC61; PC62; PC75; PC94;

M[20P]-904: PA06; PA13; PA20; PA23; PA25; PA27; PA35; PA46; PA52; PA60; PA81; PA90; PA97; PB03; PB12; PB57; PB99; PC20; PC52; PC73;

M[20P]-907: PA00; PA07; PA14; PA21; PA24; PA25; PA45; PA75; PA83; PA97; PB12; PB26; PB32; PB60; PB92; PC06; PC20; PC35; PC37; PD02;

M[20P]-909: PA12; PA14; PA20; PA21; PA29; PA39; PA72; PA93; PB12; PB22; PB28; PB32; PC21; PC23; PC24; PC41; PC52; PC73; PC79; PD02.

Lưu ý: nếu trong các danh mục trước và trong các danh mục tương tự sau, một mã thực vật xuất hiện nhiều hơn một lần trong cùng một chế phẩm thảo dược, có nghĩa là nhiều hơn một thìa định lượng của thực vật khô đã nghiền tương ứng được sử dụng.

Bắt đầu từ các chế phẩm thảo dược liệt kê trong danh mục 6-3 các chiết xuất chứa nước (hoặc mẫu thử đã xử lý) tương ứng được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng 40mL nước chứa sucroza với nồng độ 100g/l để chiết bằng nước và bao gồm bước lắng gạn trước khi lọc.

Hoạt tính sinh học của mỗi mẫu thử đã xử lý được xác định theo phương pháp C đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng các chủng *Staphylococcus aureus* sau: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213 và ATCC 14775, với các mức pha loãng cuối sau đây của mẫu thử đã xử lý: 1:20, 1:63 và 1:200.

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du

và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược bao gồm 2 loại thực vật của Hỗn hợp[2P]-1 ở mức pha loãng 1:20 được thể hiện trên Bảng 5-1.

Bảng 5-1: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế phát triển sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý dựa trên Hỗn hợp[2P]-1 ở mức pha loãng 1:20. (A) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn và hoạt tính chống tạo màng sinh học. (B) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính chống tạo màng sinh học và hoạt tính kháng vi sinh vật tương đương hoặc thấp hơn. (C) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học tương đương hoặc thấp hơn.

(A)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-1	22%	36%
M[20P]-563	26%	40%
M[20P]-495	25%	43%
M[20P]-631	27%	42%
M[20P]-465	24%	50%
M[20P]-408	26%	50%
M[09P]-8	31%	48%
M[19P]-13	31%	50%
M[18P]-12	40%	50%
M[20P]-581	40%	50%
M[20P]-469	40%	55%
M[20P]-485	43%	52%
M[20P]-427	37%	66%
M[20P]-582	51%	54%
M[20P]-431	44%	65%
M[20P]-618	54%	57%

(B)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-1	22%	36%
M[20P]-723	11%	40%
M[20P]-786	20%	40%
M[20P]-737	22%	40%
M[20P]-340	11%	40%
M[20P]-382	13%	41%
M[20P]-444	18%	42%
M[20P]-603	12%	42%
M[20P]-470	19%	42%
M[20P]-503	12%	46%
M[19P]-67	18%	49%
M[20P]-533	21%	50%
M[20P]-845	16%	51%
M[20P]-377	21%	51%
M[20P]-510	7%	55%

M[20P]-580	61%	59%
M[20P]-421	53%	70%
M[20P]-499	60%	67%
M[20P]-525	86%	77%
M[20P]-29	105%	93%

(C)

	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-1	22%	36%
M[17P]-9	27%	29%
M[18P]-37	29%	36%

20 mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 9, 18, 19 hoặc 20 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học và hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn so với chiết xuất hỗn hợp tham chiếu Hỗn hợp[2P]-1 (Bảng 5-1 A). Mười bốn chiết xuất hỗn hợp 20 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn và hoạt tính kháng vi sinh vật tương đương hoặc thấp hơn (Bảng 5-1 B). Hai mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 17 và 18 loại thực vật được thấy có hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn và hoạt tính chống tạo màng sinh học tương đương hoặc thấp hơn (Bảng 5-1 C).

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược bao gồm 2 loại thực vật của Hỗn hợp[2P]-2 ở mức pha loãng 1:20 được thể hiện trên Bảng 5-2.

Bảng 5-2: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học hiệu quả trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý dựa trên Hỗn hợp[2P]-2 ở mức pha loãng 1:20. (A) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn và hoạt tính chống tạo màng sinh học. (B) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học tương đương hoặc thấp hơn.

(A)

Ức chế phát triển sinh vật	Ức chế tạo màng sinh học
----------------------------------	--------------------------------

(B)

Ức chế phát triển sinh vật	Ức chế tạo màng sinh học
----------------------------------	--------------------------------

	phù du	
Hỗn hợp[2P]-2	12%	-3%
M[17P]-5	17%	17%
M[20P]-654	16%	20%
M[16P]-1	14%	22%
M[17P]-1	16%	22%
M[20P]-779	14%	29%
M[20P]-746	15%	28%
M[20P]-635	17%	26%
M[20P]-844	15%	29%
M[20P]-831	17%	31%
M[20P]-894	18%	30%
M[20P]-888	23%	25%
M[20P]-407	19%	31%
M[20P]-907	21%	31%
M[20P]-335	19%	33%
M[20P]-714	17%	35%
M[20P]-668	15%	38%
M[20P]-584	14%	39%
M[20P]-777	16%	37%
M[20P]-853	20%	34%
M[20P]-785	16%	39%
M[20P]-622	21%	34%
M[09P]-2	17%	39%
M[19P]-46	18%	37%
M[20P]-387	13%	43%
M[20P]-767	18%	39%
M[18P]-23	24%	33%
M[20P]-745	20%	37%
M[20P]-478	22%	36%

	phù du	
Hỗn hợp[2P]-2	12%	-3%
M[20P]-638	11%	13%
M[20P]-794	6%	16%
M[20P]-909	0%	19%
M[20P]-538	8%	22%
M[20P]-781	6%	24%
M[19P]-27	7%	26%
M[20P]-681	11%	24%
M[16P]-3	8%	28%
M[20P]-721	2%	28%
M[20P]-493	7%	28%
M[17P]-6	9%	29%
M[20P]-659	10%	30%
M[20P]-409	10%	30%
M[20P]-602	4%	31%
M[20P]-456	9%	31%
M[20P]-383	5%	32%
M[20P]-847	13%	33%
M[20P]-496	6%	34%
M[19P]-51	10%	34%
M[20P]-371	7%	36%
M[20P]-609	12%	36%
M[19P]-52	9%	36%
M[19P]-50	12%	36%
M[18P]-24	11%	36%
M[19P]-53	10%	40%

M[19P]-45	16%	42%
M[19P]-49	19%	40%
M[20P]-467	17%	42%
M[20P]-396	21%	38%
M[20P]-392	17%	42%
M[19P]-44	20%	42%
M[19P]-41	23%	40%
M[19P]-48	18%	46%
M[19P]-47	17%	46%
M[20P]-490	20%	44%
M[19P]-21	29%	35%
M[20P]-632	24%	40%
M[19P]-54	19%	45%
M[20P]-461	19%	46%
M[19P]-42	24%	41%
M[20P]-506	17%	49%
M[19P]-55	21%	46%
M[20P]-459	26%	42%
M[20P]-375	19%	52%
M[19P]-2	26%	49%
M[19P]-40	28%	48%
M[20P]-523	28%	51%
M[20P]-420	34%	56%
M[20P]-429	36%	59%
M[20P]-535	45%	55%
M[20P]-532	42%	60%
M[20P]-432	54%	72%
M[20P]-555	68%	65%
M[20P]-240	67%	78%
M[20P]-557	86%	78%

58 mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 9, 16, 17, 18, 19

hoặc 20 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học và hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn so với chiết xuất hỗn hợp tham chiếu Hỗn hợp[2P]-2 (Bảng 5-2 A). 25 mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 16, 17, 19 hoặc 20 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn và hoạt tính kháng vi sinh vật tương đương hoặc thấp hơn (Bảng 5-2 B).

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược bao gồm 2 loại thực vật của Hỗn hợp[2P]-3 ở mức pha loãng 1:20 được thể hiện trên Bảng 5-3.

Bảng 5-3: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học hiệu quả trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý dựa trên Hỗn hợp[2P]-3 ở mức pha loãng 1:20. (A) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn. (B) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học tương đương hoặc thấp hơn.

(A)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-3	12%	28%
M[20P]-649	16%	29%
M[20P]-857	15%	32%
M[20P]-703	13%	36%
M[20P]-486	15%	35%
M[20P]-766	13%	37%
M[20P]-789	14%	36%
M[20P]-725	14%	37%
M[20P]-536	20%	32%
M[20P]-753	14%	38%
M[20P]-401	14%	38%
M[20P]-765	14%	38%

(B)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-3	12%	28%
M[20P]-599	11%	32%
M[20P]-621	10%	32%
M[20P]-740	12%	33%
M[20P]-830	7%	33%
M[20P]-623	12%	34%
M[20P]-708	8%	35%
M[20P]-880	12%	35%
M[20P]-716	8%	35%
M[20P]-803	4%	36%
M[20P]-686	13%	36%
M[20P]-663	5%	36%

M[20P]-848	14%	39%
M[20P]-782	14%	40%
M[20P]-589	15%	39%
M[20P]-607	14%	40%
M[20P]-541	20%	34%
M[20P]-447	15%	39%
M[20P]-601	17%	38%
M[20P]-494	13%	43%
M[20P]-787	15%	40%
M[20P]-748	15%	41%
M[09P]-6	15%	41%
M[20P]-480	18%	38%
M[20P]-633	15%	41%
M[20P]-849	14%	42%
M[20P]-793	16%	42%
M[18P]-9	17%	41%
M[20P]-852	13%	45%
M[20P]-819	20%	39%
M[20P]-655	15%	44%
M[20P]-455	15%	44%
M[20P]-846	16%	44%
M[20P]-481	18%	41%
M[20P]-484	17%	42%
M[20P]-590	26%	34%
M[20P]-890	19%	42%
M[20P]-670	21%	40%
M[20P]-705	23%	39%
M[20P]-816	22%	39%
M[19P]-91	15%	48%
M[20P]-457	22%	43%
M[20P]-551	24%	41%

M[20P]-873	7%	36%
M[20P]-608	10%	37%
M[20P]-752	10%	37%
M[20P]-443	8%	37%
M[19P]-30	3%	37%
M[20P]-712	12%	37%
M[20P]-616	7%	38%
M[20P]-724	4%	38%
M[20P]-795	11%	38%
M[20P]-403	13%	38%
M[20P]-595	7%	38%
M[20P]-771	9%	39%
M[20P]-718	5%	39%
M[20P]-620	12%	39%
M[20P]-841	6%	40%
M[20P]-804	8%	40%
M[20P]-386	6%	41%
M[20P]-764	11%	42%
M[18P]-33	11%	42%
M[20P]-349	9%	43%
M[19P]-92	10%	46%
M[18P]-34	11%	47%
M[19P]-93	12%	50%
M[18P]-31	12%	51%
M[18P]-34	12%	51%
M[19P]-62	10%	56%

M[19P]-100	16%	50%
M[20P]-583	23%	43%
M[20P]-823	22%	44%
M[19P]-100	16%	50%
M[19P]-98	17%	50%
M[19P]-101	14%	54%
M[19P]-93	14%	53%
M[19P]-102	13%	54%
M[19P]-5	19%	49%
M[19P]-89	17%	51%
M[19P]-103	13%	55%
M[19P]-96	18%	52%
M[20P]-475	25%	45%
M[20P]-548	30%	42%
M[19P]-96	19%	53%
M[20P]-605	22%	50%
M[20P]-577	29%	44%
M[20P]-482	27%	46%
M[19P]-95	19%	55%
M[20P]-904	21%	55%
M[20P]-559	32%	47%
M[20P]-430	29%	71%
M[20P]-520	62%	67%
M[20P]-579	75%	66%
M[20P]-560	72%	70%
M[20P]-565	73%	73%
M[20P]-524	81%	79%
M[20P]-575	85%	76%

70 mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 9, 19 hoặc 20 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học và hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn so với chiết xuất hỗn hợp tham chiếu Hỗn hợp[2P]-3 (Bảng 5-3 A). 37 mẫu thử

đã xử lý chứa 18 đến 20 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn và hoạt tính kháng vi sinh vật tương đương hoặc thấp hơn (Bảng 5-3 B).

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược bao gồm 3 loại thực vật của Hỗn hợp[3P]-1 ở mức pha loãng 1:20 được thể hiện trên Bảng 5-4.

Bảng 5-4: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý dựa trên Hỗn hợp[3P]-1 ở mức pha loãng 1:20. (A) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn. (B) Các chiết xuất hỗn hợp cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật và hoạt tính chống tạo màng sinh học tương đương hoặc thấp hơn.

(A)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học	(B)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[3P]-1	31%	15%	Hỗn hợp[3P]-1	31%	15%
M[18P]-2	35%	42%	M[20P]-692	11%	22%
M[16P]-5	36%	41%	M[20P]-612	6%	25%
M[14P]-2	34%	44%	M[18P]-22	4%	27%
M[16P]-6	35%	44%	M[20P]-388	9%	27%
M[09P]-9	33%	47%	M[20P]-380	12%	28%
M[09P]-1	34%	45%	M[11P]-12	22%	29%
M[18P]-7	35%	45%	M[19P]-33	8%	30%
M[17P]-3	36%	44%	M[19P]-35	6%	30%
M[09P]-7	35%	49%	M[17P]-2	12%	30%
M[20P]-594	40%	46%	M[20P]-678	10%	31%
M[09P]-6	37%	51%	M[19P]-22	17%	31%
M[20P]-658	45%	43%	M[20P]-552	16%	32%
M[19P]-3	34%	54%	M[17P]-4	9%	32%
M[18P]-11	40%	49%	M[20P]-806	12%	32%

M[19P]-104	43%	46%
M[09P]-3	46%	44%
M[09P]-4	46%	45%
M[19P]-19	34%	57%
M[18P]-13	42%	50%
M[18P]-10	43%	49%
M[18P]-9	42%	51%
M[18P]-17	45%	51%
M[20P]-634	43%	56%
M[20P]-596	44%	55%
M[18P]-15	47%	52%
M[20P]-449	47%	56%
M[09P]-10	54%	50%
M[20P]-588	48%	56%
M[20P]-458	50%	56%
M[19P]-105	49%	56%
M[13P]-2	51%	56%
M[19P]-11	43%	67%
M[18P]-16	54%	59%
M[20P]-569	55%	60%
M[20P]-296	52%	62%
M[18P]-18	56%	61%
M[20P]-516	61%	68%
M[20P]-592	70%	71%
M[20P]-626	71%	71%
M[19P]-23	72%	72%
M[20P]-497	72%	77%
M[20P]-572	74%	78%
M[20P]-574	76%	79%
M[20P]-527	76%	80%
M[20P]-297	83%	81%

M[12P]-1	19%	33%
M[14P]-1	18%	33%
M[19P]-28	6%	33%
M[12P]-2	22%	34%
M[18P]-1	16%	34%
M[19P]-36	6%	34%
M[20P]-479	23%	34%
M[15P]-1	23%	34%
M[09P]-21	22%	34%
M[20P]-446	10%	34%
M[19P]-34	7%	34%
M[19P]-106	29%	35%
M[10P]-41	8%	35%
M[13P]-1	22%	35%
M[18P]-5	18%	35%
M[19P]-39	-1%	35%
M[11P]-3	12%	35%
M[20P]-439	19%	36%
M[11P]-2	13%	36%
M[18P]-20	6%	36%
M[20P]-757	18%	36%
M[10P]-303	25%	36%
M[11P]-11	29%	37%
M[11P]-6	9%	37%
M[19P]-37	5%	37%
M[18P]-19	10%	37%
M[18P]-4	29%	37%
M[18P]-35	27%	37%
M[18P]-25	11%	37%
M[11P]-5	10%	38%
M[20P]-694	20%	38%

M[20P]-422	81%	83%
M[20P]-564	86%	82%
M[20P]-418	98%	87%
M[20P]-416	99%	89%
M[20P]-576	104%	86%
M[20P]-573	104%	93%

M[11P]-8	10%	38%
M[11P]-9	11%	38%
M[20P]-733	12%	38%
M[11P]-7	10%	38%
M[19P]-31	6%	38%
M[19P]-32	4%	38%
M[19P]-29	6%	38%
M[18P]-6	22%	38%
M[20P]-374	2%	38%
M[11P]-4	12%	39%
M[20P]-791	13%	39%
M[20P]-758	15%	39%
M[19P]-26	6%	39%
M[20P]-697	17%	39%
M[19P]-38	4%	40%
M[19P]-24	28%	40%
M[16P]-2	24%	40%
M[18P]-21	9%	40%
M[15P]-5	29%	40%
M[17P]-8	30%	40%
M[20P]-613	8%	41%
M[18P]-14	27%	41%
M[20P]-604	14%	41%
M[11P]-1	17%	41%
M[18P]-36	29%	41%
M[18P]-3	23%	42%
M[20P]-453	5%	42%
M[19P]-25	9%	42%
M[20P]-709	18%	42%
M[20P]-474	16%	45%
M[20P]-666	22%	45%

M[20P]-902	21%	46%
M[20P]-435	15%	46%
M[20P]-567	30%	47%
M[19P]-4	24%	47%
M[19P]-16	18%	47%
M[19P]-59	10%	48%
M[19P]-17	23%	48%
M[19P]-58	20%	49%
M[19P]-60	13%	49%
M[19P]-15	27%	50%
M[11P]-10	31%	50%
M[19P]-14	27%	50%
M[19P]-6	32%	51%
M[20P]-445	21%	51%
M[19P]-8	30%	51%
M[19P]-18	21%	52%
M[19P]-9	29%	52%
M[19P]-7	30%	52%
M[19P]-10	29%	52%
M[19P]-68	23%	53%
M[19P]-63	16%	53%
M[19P]-69	22%	53%
M[19P]-1	26%	54%
M[19P]-66	24%	54%
M[19P]-12	26%	54%
M[20P]-472	27%	54%
M[19P]-20	31%	54%
M[19P]-70	19%	55%
M[19P]-62	17%	56%
M[19P]-57	21%	56%
M[19P]-65	27%	57%

M[19P]-73	18%	57%
M[20P]-514	30%	58%
M[19P]-56	24%	58%
M[19P]-64	27%	59%
M[19P]-72	20%	60%
M[19P]-71	19%	61%

51 mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 9, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học và hoạt tính kháng vi sinh vật cao hơn so với chiết xuất hỗn hợp tham chiếu Hỗn hợp[3P]-1 (Bảng 5-4 A). 113 mẫu thử đã xử lý chứa 9 đến 20 loại thực vật được thấy có hoạt tính chống tạo màng sinh học cao hơn và hoạt tính kháng vi sinh vật tương đương hoặc thấp hơn (Bảng 5-4 B).

Ví dụ so sánh 3

Dưới dạng ví dụ so sánh, sáng chế nêu một số chiết xuất hỗn hợp 20 loại thực vật chỉ chứa 1 trong số 3 loại thực vật của ví dụ 1 (PA13, PA21, PB12), mà đã được thấy không có hoặc có hoạt tính kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học kém đối với *Staphylococcus aureus*.

Muối chế phẩm thảo dược có hàm lượng được nêu trong danh mục 5-8 được bào chế theo phương pháp A đã được mô tả ở trên.

Danh mục 5-8: Các chế phẩm thảo dược của mẫu thử đã xử lý

M[20P]-39: PB00; PB01; PB02; PB03; PB04; PB05; PB06; PB07; PB08; PB09; PB10; PB11; PB12; PB13; PB14; PB15; PB16; PB17; PB18; PB19;

M[20P]-239: PA00; PA05; PA21; PA23; PA26; PA33; PA39; PA60; PA85; PB00; PB06; PB32; PB79; PC02; PC26; PC34; PC38; PC62; PC78; PC84;

M[20P]-337: PA00; PA10; PA11; PA15; PA18; PA21; PA22; PA24; PA26; PA28; PA52; PA94; PA98; PB10; PB20; PB26; PB29; PB82; PC67; PC97;

M[20P]-362: PA21; PA23; PA25; PA33; PA37; PA57; PA69; PA81; PA92; PB16; PB25; PB26; PB28; PB29; PB78; PC20; PC21; PC71; PC83; PD02;

M[20P]-364: PA15; PA21; PA25; PA28; PA39; PA75; PA80; PA85; PA89; PA98; PB01; PB06; PB24; PB28; PB35; PC24; PC25; PC57; PC75; PC82;

M[20P]-540: PA06; PA10; PA12; PA14; PA20; PA21; PA26; PA27; PA27;

PA57; PA57; PA57; PA69; PB07; PB82; PC11; PC20; PC23; PC55; PC98;

M[20P]-647: PA10; PA11; PA24; PA26; PA28; PA33; PA35; PA40; PA57; PA69; PB00; PB07; PB12; PB28; PB33; PB38; PB60; PC55; PC67; PC97;

M[20P]-652: PA00; PA07; PA13; PA15; PA16; PA23; PA26; PA28; PA33; PA39; PA57; PA92; PB28; PB38; PC20; PC21; PC52; PC55; PC74; PC97;

M[20P]-862: PA11; PA15; PA18; PA21; PA25; PA27; PA28; PA29; PA35; PA38; PA52; PA86; PA89; PA92; PB07; PB28; PB88; PC11; PC55; PC98;

M[20P]-872: PA13; PA14; PA16; PA28; PA29; PA30; PA33; PA35; PA39; PA81; PA90; PA92; PB00; PB32; PC12; PC34; PC37; PC67; PC97; PD02.

Mười chiết xuất chứa nước (hoặc mẫu thử đã xử lý) được điều chế từ các chế phẩm thảo dược tương ứng theo phương pháp B đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng 40mL nước chứa sucroza với nồng độ 100g/l để chiết bằng nước và bao gồm bước lắng gạn trước khi lọc.

Đối với mỗi mẫu thử đã xử lý hoạt tính sinh học được xác định theo phương pháp C đã được mô tả ở trên, với các mức pha loãng cuối sau đây của mẫu thử đã xử lý: 1:20, 1:63 và 1:200.

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý ở mức pha loãng 1:20 được thể hiện trên Bảng 5-5.

Bảng 5-5: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý ở mức pha loãng 1:20.

	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
Hỗn hợp[2P]-1	22%	36%
Hỗn hợp[2P]-2	12%	-3%
Hỗn hợp[2P]-3	12%	28%
M[20P]-362	-1%	-6%
M[20P]-364	-5%	6%
M[20P]-039	1%	6%

M[20P]-862	5%	2%
M[20P]-337	0%	9%
M[20P]-872	2%	11%
M[20P]-540	5%	10%
M[20P]-652	9%	7%
M[20P]-239	9%	7%
M[20P]-647	9%	9%

Tất cả các mẫu thử đã xử lý đã được thử nghiệm thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa 20 loại thực vật bao gồm chỉ 1 thực vật trong số 3 loại thực vật của ví dụ 1 (PA13, PA21, PB12) cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật thấp hơn so với ba chiết xuất hỗn hợp 2 loại thực vật của Hỗn hợp[2P]-1 (thu được từ PA13 và PA21), Hỗn hợp[2P]-2 (thu được từ PA21 và PB12) và Hỗn hợp[2P]-3 (thu được từ PA13 và PB12) đối chứng và hoạt tính chống tạo màng sinh học thấp hơn so với Hỗn hợp[2P]-1 và Hỗn hợp[2P]-3.

Ví dụ 6

Ví dụ này đề cập đến hoạt tính kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học đồng thời đối với *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* và *Staphylococcus pseudintermedius* của 2 mẫu thử đã xử lý được chọn trong số các hỗn hợp tốt nhất được mô tả trong ví dụ 4 và ví dụ 5.

Thực vật khô loại được dụng thu được từ “Pharmacie Fontgèrve” (Clermont-Ferrand, Pháp) và “Pharmacie St Herem” (Clermont-Ferrand, Pháp).

Hai chế phẩm thảo dược chứa bột thực vật khô nêu trong Bảng 6-1 dưới đây được theo phương pháp A đã được mô tả ở trên.

Bảng 6-1

Các chế phẩm thảo dược	M[20P]-576	M[10P]-154
Thực vật 1	2 thìa của PA11	1 thìa của PA11
Thực vật 2	1 thìa của PA12	1 thìa của PA12
Thực vật 3	3 thìa của PA13	1 thìa của PA13
Thực vật 4	2 thìa của PA14	1 thìa của PA21
Thực vật 5	1 thìa của PA20	1 thìa của PA22
Thực vật 6	1 thìa của PA21	1 thìa của PA79

Thực vật 7	1 thìa của PA22	1 thìa của PB12
Thực vật 8	1 thìa của PA29	1 thìa của PB49
Thực vật 9	1 thìa của PA39	1 thìa của PC29
Thực vật 10	1 thìa của PB12	1 thìa của PC63
Thực vật 11	1 thìa của PB60	
Thực vật 12	1 thìa của PC20	
Thực vật 13	1 thìa của PC26	
Thực vật 14	1 thìa của PC33	
Thực vật 15	1 thìa của PC37	
Thực vật 16	1 thìa của PC49	

Bắt đầu từ các chế phẩm thảo dược này thì 2 chiết xuất chứa nước (hoặc mẫu thử đã xử lý) tương ứng được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng 40mL cho M[20P]-576 và 20mL cho M[10P]-154 nước chứa sucroza với nồng độ 100g/l để chiết bằng nước và bao gồm bước ly tâm trước khi lọc.

Hoạt tính sinh học của mẫu thử đã xử lý được xác định theo phương pháp C đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng các chủng sau:

- Các chủng *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213, ATCC 14775, NCTC 12493, ATCC 33591, ATCC 33592, ATCC 43300, ATCC 700698, ATCC 700699, ATCC 9144 và ATCC BAA-44
- Các chủng *Staphylococcus epidermidis*: ATCC 14990, ATCC 12228, ATCC 700296, ATCC 49134 và ATCC 49461
- Chủng *Staphylococcus pseudintermedius*: ATCC 49444

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được thấy với 2 mẫu thử đã xử lý được thể hiện trên Bảng 6-2 ở dạng HID, cũng như hiệu quả trung bình trên toàn bộ các chủng của *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus epidermidis*.

Bảng 6-2: HID của 2 mẫu thử đã xử lý trên 14 chủng của *Staphylococcus aureus*, 5 chủng *Staphylococcus epidermidis* và 1 chủng *Staphylococcus pseudintermedius*

		M[10P]-154	M[20P]-576
S. aureus	ATCC 25923	20	20

	ATCC 49476	40	40
	ATCC 6538	10	10
	ATCC 51740	20	40
	ATCC 29213	20	20
	ATCC 14775	20	20
	NCTC 12493	40	40
	ATCC 33591	20	40
	ATCC 33592	20	40
	ATCC 43300	20	40
	ATCC 700698	20	20
	ATCC 700699	40	20
	ATCC 9144	20	20
	ATCC BAA-44	40	20
	Mức trung bình	25	28
S. epidermidis	ATCC 14990	40	20
	ATCC 12228	40	20
	ATCC 700296	40	20
	ATCC 49461	40	20
	ATCC 49134	80	80
	Mức trung bình	48	32
S. pseudintermedius	ATCC 49444	40	40
	Mức trung bình tổng thể	32	30

M[10P]-154 và M[20P]-576 cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật toàn bộ trên tất cả *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus epidermidis* thử nghiệm. M[10P]-154 cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật toàn bộ ở 1:80 trên 1 chủng *Staphylococcus epidermidis*, ở 1:40 trên 4 chủng *Staphylococcus aureus*, 4 chủng *Staphylococcus epidermidis* và chủng *Staphylococcus pseudintermedius* thử nghiệm, ở 1:20 trên 9 chủng *Staphylococcus aureus*, và ở 1:10 trên 1 chủng *Staphylococcus aureus*.

M[20P]-576 cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật toàn bộ ở 1:80 trên 1 chủng *Staphylococcus epidermidis*, ở 1:40 trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* và chủng

Staphylococcus pseudintermedius thử nghiệm, ở 1:20 trên 7 chủng *Staphylococcus aureus* và 4 chủng *Staphylococcus epidermidis* và ở 1:10 trên 1 chủng *Staphylococcus aureus*.

Tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học (IBF) của 2 mẫu thử đã xử lý ở mức pha loãng 1:20 được thể hiện trên Bảng 6-3, cũng như hiệu quả trung bình trên toàn bộ các chủng của *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus epidermidis*.

Bảng 6-3: Sự ức chế phát triển sinh vật phù du và sự ức chế tạo màng sinh học (IBF) của 2 mẫu thử đã xử lý trên 14 chủng của *Staphylococcus aureus*, 5 chủng *Staphylococcus epidermidis* và 1 chủng *Staphylococcus pseudintermedius* ở mức pha loãng 1:20

		Ức chế phát triển sinh vật phù du		Ức chế tạo màng sinh học (IBF)	
		M[10P]-154	M[20P]-576	M[10P]-154	M[20P]-576
S. aureus	ATCC 25923	96%	99%	90%	88%
	ATCC 49476	93%	109%	93%	95%
	ATCC 6538	49%	56%	45%	60%
	ATCC 51740	91%	106%	89%	96%
	ATCC 29213	94%	105%	91%	92%
	ATCC 14775	90%	105%	88%	90%
	NCTC 12493	99%	113%	93%	92%
	ATCC 33591	95%	113%	91%	93%

	ATCC 33592	97%	107%	91%	93%
	ATCC 43300	94%	110%	90%	92%
	ATCC 700698	92%	113%	89%	91%
	ATCC 700699	88%	95%	98%	96%
	ATCC 9144	82%	91%	88%	84%
	ATCC BAA-44	90%	101%	93%	94%
	Mức trung bình	89%	102%	88%	90%
S. epidermidis	ATCC 14990	90%	101%	91%	90%
	ATCC 12228	90%	101%	93%	91%
	ATCC 700296	86%	90%	81%	82%
	ATCC 49461	90%	99%	93%	85%
	ATCC 49134	89%	96%	96%	90%
	Mức trung bình	89%	98%	91%	88%
S. pseudintermedius	ATCC 49444	92%	103%	95%	93%
	Mức trung bình tổng thể	89%	101%	89%	89%

Ở mức pha loãng 1:20, M[10P]-154 thể hiện mức trung bình ức chế tạo màng sinh học 88% trên tất cả các chủng *Staphylococcus aureus* thử nghiệm trong khi đó M[20P]-576 cho thấy mức trung bình 90%. Hai hỗn hợp này cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật trên một chủng: ATCC 6538 (45% cho M[10P]-154, 60% cho M[20P]-576). M[10P]-154 cho thấy mức trung bình ức chế phát triển sinh vật phù du 91% trên tất cả các chủng *Staphylococcus epidermidis* thử nghiệm trong khi đó M[20P]-576 cho thấy mức trung bình 88%. (Bảng 6-3). Hai hỗn hợp cho thấy tỷ lệ phần trăm ức chế lần lượt hơn 95% (M[10P]-154) và 93% (M[20P]-576) trên *Staphylococcus pseudintermedius* thử nghiệm. Bởi vậy, M[10P]-154 và M[20P]-576 đã chứng tỏ hoạt tính chống tạo màng sinh học trên *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* và *Staphylococcus pseudintermedius* ở mức pha loãng 1:20.

Ví dụ 7

Dung dịch của Hỗn hợp[20C]-576 (được mô tả trong Ví dụ 6) được sử dụng cho các chế phẩm sau được điều chế theo phương pháp A đã được mô tả ở trên và B ngoại trừ bước lọc, mà trong ví dụ này được thực hiện bằng cách lọc hút bằng phễu Büchner được nạp một lớp bông hút nước dày 5 cm. Về độ trong, dung dịch được lọc qua bông này sẽ được quy là SK576 trong ví dụ sau.

Thuốc mỡ và hai loại kem để được sử dụng cho ứng dụng khu trú được bào chế bằng phương pháp nhũ hóa như sau:

- Pha A và Pha B được điều chế bằng cách trộn có lắc theo quỹ đạo trong hai cốc có mỏ riêng biệt:

	Pha A	Pha B
Thuốc mỡ	- 73,8g dầu hạnh nhân hữu cơ (Hyteck, “Aroma Zone™”, Pháp) - 18,5g sáp ong hữu cơ (Hyteck, “Aroma Zone™”, Pháp) - 9,7g bơ hạt mỡ (Hyteck, “Aroma Zone™”, Pháp) - 1,0 mL tocopherol tự	- 29,6g SK576, được điều chế như mô tả trong Ví dụ 6 - 13,5g glycerin hữu cơ (The Naissance Trading & Innovation, “Naissance™”, Anh) - 2,7g axit ascorbic (Hyteck “Aroma Zone™”, Pháp)

	nhiên(Hyteck, “Aroma Zone TM ”, Pháp)	
Kem 1	- 30,4g dầu hạnh nhân hữu cơ (Hyteck, “Aroma Zone”, Pháp): - 8,3g Olivem® 1000 hữu cơ (Hyteck, “Aroma ZoneTM”, Pháp) - 3,1g tinh dầu bạc hà (Hyteck “Aroma ZoneTM”, Pháp) - 1,0mL tocopherol tự nhiên (Hyteck, “Aroma ZoneTM”, Pháp)	- 51,5g SK576, được điều chế như mô tả trong Ví dụ 6 - 14,9g glycerin hữu cơ (The Naissance Trading & Innovation “NaissanceTM”, Anh)
Kem 2	- 14,9g dầu hạnh nhân hữu cơ (Hyteck “Aroma ZoneTM”, Pháp): - 11,8g Olivem® 1000 hữu cơ (Hyteck “Aroma ZoneTM”, Pháp) - 5,1g bơ hạt mỡ (Hyteck “Aroma ZoneTM”, Pháp) - 1,0mL tocopherol tự nhiên (Hyteck “Aroma ZoneTM”, Pháp)	- 160,0g SK576, được điều chế như mô tả trong Ví dụ 6 - 10g glycerin hữu cơ (The Naissance Trading & Innovation, “NaissanceTM”, Anh)

- Hai cốc có mỡ được gia nhiệt đến 70°C bằng cách sử dụng chậu nước nóng và được duy trì ở 70°C trong 10 phút để tránh kết tinh sáp ong.

- Tiếp đó, pha B được đổ dần vào Pha A, giữ cốc có mỡ trong chậu nước nóng và có khuấy không đổi bằng bộ phận khuấy trộn nhúng chìm cơ học (Moulinex”Infinyforce_hand blender”, Pháp).

- Tiếp đó, cốc có mỡ chứa hỗn hợp của Pha A và B được lấy ra khỏi chậu nước nóng và thuốc mỡ được tạo ra bằng cách sử dụng “bộ phận trộn xốt maione” nhúng chìm (Moulinex”Infinyforce_hand blender”, Pháp).

Gel để được sử dụng cho ứng dụng khu trú được bào chế bằng cách

- Lọc 20,6g SK576, trên bộ lọc dạng ống tiêm hút nước (0,22 µm).

- Bỏ sung 0,75 g bột xantan (Hyteck “Aroma Zone™”, Pháp) và 0,25g axit ascorbic (Hyteck “Aroma Zone™”, Pháp) vào dung dịch đã lọc và trộn bằng dao trộn trong 5-10 phút như để tạo hình.

Dung dịch phun để được dùng khu trú được bảo chế bằng cách:

- Trộn 5,5g SK576 với 11,9g etanol (Sigma-Aldrich, Pháp) tuyệt đối trong cốc có mỏ 20 mL mà được bảo quản trong tủ lạnh ở 5°C trong 3 giờ.

- Đặt cốc có mỏ với hỗn hợp lạnh vào chậu nước đá và bỏ sung dần 0,7 g Kolliphor® P-407 (Sigma-Aldrich, Pháp) trong sự khuấy bằng thanh từ và bộ phận khuấy.

- Sau 30 phút khuấy trong chậu nước đá, dung dịch được nạp vào bộ phận phun chất phản ứng (CAMAG, Thụy Sĩ) để sử dụng.

Phương thức của mỗi trong số năm chế phẩm này có thể được định cỡ dễ dàng với các thể tích chế phẩm khác nhau bằng cách duy trì cùng một lượng liên quan của mỗi thành phần.

Ví dụ 8

Hoạt tính sinh học của chiết xuất chứa nước theo sáng chế ở mô hình chuột nhiễm *Staphylococcus aureus* gây chết

Giới thiệu

Chủng *S. aureus* Newman được phân lập vào năm 1952 từ vật lây nhiễm người và đã được sử dụng rộng rãi ở các mô hình động vật nhiễm tụ cầu khuẩn do kiểu hình virus bền vững của nó.

Chuột cái OF1 đã được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu sự phát sinh bệnh gây ra bởi *Staphylococcus aureus*. Công trình nghiên cứu trước đây về sự phát sinh bệnh do nhiễm *Staphylococcus aureus* sử dụng đường thử nghiệm trong bụng để lây nhiễm và điều trị chuột do tính dễ dàng kỹ thuật của nó.

Mục đích của ví dụ này là đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của chiết xuất chứa nước theo sáng chế ở chuột cái OF1 bị nhiễm liều lượng *Staphylococcus aureus* Newman gây chết. Việc điều trị được sử dụng bằng đường miệng theo lịch biểu Q1Dx10, 2 ngày trước khi nhiễm đến 7 ngày sau khi nhiễm. Việc theo dõi tỷ lệ chết được thực hiện từ D0 đến D15.

Tá dược được sử dụng làm mẫu đối chứng âm.

Vật liệu và phương pháp

Chất thử nghiệm và đối chứng

Chất thử nghiệm: chiết xuất chứa nước M[20C] 576 (thu được bắt đầu từ chế phẩm thảo dược với nồng độ 120 g/l, được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 6). Chất này được bố trí trong 11 lọ chứa 1200 μ l mỗi chiết xuất chứa nước. Được bảo quản ở -20°C.

Tá dược: dung dịch nước sucroza 10%. Sẽ được bảo quản ở -20°C.

Chủng vi khuẩn: chủng *Staphylococcus Newman* (cung cấp bởi Dr T. Foster, Trinity College, Dublin, Ireland, lô số 14156, LST4).

Mua động vật và nhốt trong chuồng

Hai mươi (20) Crl:OF1 chuột cái (giao phối xa), 6 tuần tuổi được mua từ Charles River (L'Arbresle, Pháp).

Bộ phận chăm sóc động vật được cấp phép bởi bộ nông nghiệp và nghiên cứu Pháp (Hợp đồng số B35-288-1). Các thử nghiệm động vật được thực hiện theo Hướng dẫn đạo đức thử nghiệm động vật (*Principes d'éthique de l'expérimentation animale*, Directive n°86/609 CEE du 24 Nov. 1986, Décret n°87/848 du 19 Oct. 1987, Arrêté d'Application du 19 Avril 1988).

Động vật được duy trì trong phòng “A2” trong điều kiện được kiểm soát gồm nhiệt độ ($22 \pm 3^\circ\text{C}$), độ ẩm ($50 \pm 20\%$), chu kỳ sáng (12 giờ sáng/12 giờ tối), trao đổi không khí và áp suất thấp. Hệ thống điều khiển không khí được lập trình cho 14 sự thay đổi không khí một giờ, không có sự tuần hoàn.

Thực phẩm và nước được cấp tùy ý, được bố trí trong nắp kim loại trên đỉnh của chuồng.

Kiểu điều trị và thử nghiệm

Chuẩn bị vi khuẩn – Khuếch đại vi khuẩn để thử

Một lọ vi khuẩn được làm tan băng và 100 μ l chất cấy được nuôi cấy trong 50 ml môi trường cấy (Tryptic Soy Broth: TSB, Ref. 43592 hoặc 22902, Sigma). Vi khuẩn được ủ ở 37°C trong 20 giờ ở tốc độ khuấy 110 vòng/phút trên thiết bị lắc ngang. Huyền phù vi khuẩn sẽ được pha loãng ở 1/20 (100 μ l + 1,9 ml TSB) và mật độ quang sẽ được đọc ở 680 nm (mật độ quang 680 nm).

Tiếp đó, 10 ml vi khuẩn được ly tâm ở 5200 vòng/phút (3400 g) trong 10 phút ở 4°C . Dịch nổi lên trên được loại bỏ và vi khuẩn được hòa tan trong 10 ml DPBS (Ref. BE17-512F, Lonza, Pháp). Huyền phù vi khuẩn (C0) được pha loãng ở 1/20 (100 μ l +

1,9 ml DPBS) và mật độ quang 680 nm sẽ được đo.

Mật độ quang 680 nm đo được trước và sau khi ly tâm phải là tương tự.

Nồng độ CFU/ml của dung dịch vi khuẩn được tính như sau:

$$\text{CFU/ml} = (\text{mật độ quang 680 nm} \times 20 \text{ (hệ số pha loãng)}) \times 6.5.10^8 \text{ (CFU/U.D.O)}$$

Chuẩn bị muxin

Muxin (Sigma, Pháp) được chuẩn bị ở 20% 14-16 ngày trước khi xử lý như được mô tả dưới đây:

DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) được làm ấm trước ở 56°C và $\frac{3}{4}$ thể tích cuối được đưa vào thiết bị trộn, tiếp đó muxin lộn sẽ được bổ sung và trộn. Thiết bị trộn được rửa bằng thể tích DPBS còn lại. Tiếp đó, dung dịch muxin 20% được đưa vào Erlenmeyer Flask và được ủ ở 37°C trong sự khuấy trong 1 giờ và 30 phút. $\frac{3}{4}$ dung dịch muxin 20% được đưa vào chai vô trùng. $\frac{1}{4}$ dung dịch còn lại được lưu trữ riêng biệt. Tiếp đó $\frac{3}{4}$ và $\frac{1}{4}$ dung dịch được tiệt trùng bằng cách hấp. Dung dịch muxin lộn 20% được bảo quản ở +4°C.

Ngày trước khi lây nhiễm, độ pH của $\frac{3}{4}$ dung dịch muxin 20% được điều chỉnh ở 7,4 bằng cách bổ sung NaOH 30% đã lọc. Nếu cần, một phần của $\frac{1}{4}$ dung dịch còn lại được sử dụng để điều chỉnh độ pH.

Chuẩn bị vi khuẩn

Theo kết quả mật độ quang 680 nm, vi khuẩn (C0) được pha loãng trong DPBS để đạt đến nồng độ $6,8 \times 10^7$ CFU/ml. Tiếp đó, các huyền phù này được pha loãng ở $\frac{1}{2}$ trong muxin lộn 20% để có LD80 nồng độ bằng $3,4 \times 10^7$ CFU/ml trong PBS-muxin lộn 10%. Huyền phù dùng để xử lý được đặt trong ống chứa hạt thủy tinh vô trùng (4 mm, Ref. 068502, Dutscher, Pháp). Huyền phù không được tạo xoáy, nhưng được trộn bằng cách lộn ngược các ống. Vi khuẩn được để trên đá trước khi xử lý và giữ trên đá trong quá trình xử lý.

Xác định CFU

Để xác định nồng độ chính xác của huyền phù vi khuẩn trước và sau khi cấy vào động vật, huyền phù vi khuẩn được pha loãng trong dung dịch liên tiếp gấp 10 lần trong DPBS-0,5% Tween 20 (Sigma, Pháp) như được mô tả trong Bảng 8-1 trong các giếng sâu (50 μ l vi khuẩn + 450 μ l DPBS-0,5% Tween 20). Tiếp đó, 6 x 50 μ l dung dịch vi khuẩn 3, 4, 5 và 6 được cấy trên đĩa TSA (Tryptic Soy Agar, Sigma) và được để ở 37°C qua đêm. Khuẩn lạc được đếm để xác định đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU - Colony-

Forming Units) thực của chất để tiêm chủng.

Việc đếm được thực hiện trên giọt (50 μ l) chứa từ 20 đến 100 khuẩn lạc. Các ô sẫm tương ứng với mức pha loãng được cấy trên đĩa.

Bảng 8-1: Mức pha loãng của huyền phù vi khuẩn để xác định CFU thực (khả năng sống) của chất để tiêm chủng. Các ô sẫm tương ứng với các mức pha loãng được cấy trên các đĩa.

	Các mức pha loãng					
Huyền phù để qua đêm chứa vi khuẩn trong PBS	1	2	3	4	5	6
	1/10	1/100	1/103	1/104	1/105	1/106
Ví dụ, nồng độ ban đầu: 3,4x10 ⁷ CFU/ml	3,4x10 ⁶	3,4x10 ⁵	34000	3400	340	34
Số khuẩn lạc / 50 μ l (1 giọt)	1,7x10 ⁵	1,7x10 ⁴	1,7x10 ³	170	17	1,7

Ngẫu nhiên hóa

Trước khi thử nghiệm (D-2), 20 chuột cái OF1 khỏe mạnh được ngẫu nhiên hóa trong 2 nhóm gồm 10 chuột/nhóm theo tiêu chuẩn trọng lượng cơ thể, vì vậy trọng lượng cơ thể trung bình của các nhóm không khác nhau theo thống kê.

Điều trị

Việc điều trị được thực hiện từ D-2 đến D7 (D0: ngày cấy vi khuẩn) bằng cách dùng qua đường miệng (PO). Việc cấy vi khuẩn được thực hiện bằng cách tiêm màng bụng (intraperitoneal injection - IP).

Cấy

Ở D0, chuột được cấy bằng huyền phù vi khuẩn. Mỗi sự cấy bao gồm sự tiêm màng bụng 500 μ l huyền phù ở nồng độ 3,4 x 10⁷ CFU/ml (1,7 x 10⁷ CFU/chuột).

Kiểu thử nghiệm

Động vật được điều trị bằng cách sử dụng các chất thử nghiệm từ D-2 đến D7 qua đường miệng. Ở D0, các sự điều trị được thực hiện 1 giờ sau khi cấy vi khuẩn.

Các nhóm thử nghiệm sẽ được xác định như được mô tả dưới đây và được thể hiện tóm tắt trên Bảng 8-2.

- 10 chuột của nhóm 1 sẽ được điều trị từ D-2 đến D7 với tá dược bằng cách dùng qua đường miệng theo lịch biểu điều trị Q1DX10.

- 10 chuột của nhóm 2 sẽ được điều trị từ D-2 đến D7 với chất thử nghiệm bằng cách dùng qua đường miệng theo lịch biểu điều trị Q1DX10.

Bảng 8-2: Kiểu thử nghiệm

Các nhóm	Số chuột	Chất thử nghiệm	Đường dùng	Thể tích dùng	Lịch biểu điều trị	Mô hình vi khuẩn
1	10	Tá được	PO	10 mL/kg	Q1DX10 (từ D-2 đến D7)	Staphylococcus aureus
2		Chất thử nghiệm				Newman gây chết IP (3,4x10 ⁷ CFU/ml) 500 µl

Theo dõi động vật

Từ D0 đến D1, chuột được quan sát hai lần một ngày về tình trạng tử vong.

Từ D2 đến D15, chuột được quan sát một lần một ngày về tình trạng tử vong.

Trọng lượng cơ thể của chuột được ghi lại hai lần một tuần cho đến khi kết thúc thử nghiệm.

Quan sát lâm sàng chi tiết (thay đổi ở da, lông, mắt, màng nhầy niêm mạc, sự xuất hiện bài tiết và thải, chức năng hô hấp, sự thay đổi về dáng đi, tư thế) được theo dõi hai lần một tuần như được mô tả trong Bảng 8-3 bên dưới ví dụ. Phần mô tả danh mục này là không toàn diện và được bổ sung bởi các sự quan sát khác, nếu cần.

Bảng 8-3: Quan sát lâm sàng/thông số

Thông số	Mô tả	Thông số	Mô tả	Thông số	Mô tả
Vận động/dáng đi	Không chuyển động	Hành vi	Sợ hãi	Lông	Bình thường
	Giảm		Bình thường		Tăng vọt
	Bình thường		Hung hăng		Hao

Thông số	Mô tả	Thông số	Mô tả	Thông số	Mô tả
	Quá mức	Thở	Chậm		Nhuộm màu
Mang vác	Bình thường		Bình thường		Không thể áp dụng
	Kiệt sức		Tốc độ	Màng nhầy niêm mạc	Bình thường
Bại liệt	Không		Bất thường		Không bình thường (mũi)
	Bên phải phía trước	Mắt	Bình thường		Không bình thường
	Bên trái phía trước		Đảm lẹ		(miệng)
	Bên phải phía sau		Khép kín		Không bình thường
	Bên trái phía sau	Da	Bình thường		(mũi/miệng)
	Bên phải		Đỏ hoe	Bài tiết	Ít
	Bên trái		Vết đốm		Bình thường
	Phía trước		Vết thương		Quá mức
	Phía sau		Khối tụ máu		Khô

Giết chuột

Ở D15, chuột sống sót bị giết bằng cách hút hết máu, tiếp theo là dịch chuyển cổ tử cung, nếu cần. Không thực hiện việc mổ xác.

Kết quả

Việc phân tích chuột sống cho thấy các kết quả được nêu trong các Bảng 8-4 và bảng 8-5 dưới đây.

Bảng 8-4: Số chuột sống/ngày

Số chuột sống/ngày									
Các nhóm	N D0	N D1	N D2	N D3	N D4	N D5	N D6	N D7	N D8
Nhóm 1 (tá dược, PO, Q1Dx10, 10 ml/kg)	10	6	6	5	5	3	2	NA	0
Nhóm 2 (TS nguyên chất, PO, Q1Dx10, 10 ml/kg)	10	6	6	6	6	6	4	NA	3

Bảng 8-5: Tỷ lệ phần trăm chuột sống/ngày

Tỷ lệ phần trăm sống									
Nhóm	N D0	N D1	N D2	N D3	N D4	N D5	N D6	N D7	N D8
Nhóm 1 (Tá dược, PO, Q1Dx10, 10 ml/kg)	100%	60%	60%	50%	50%	30%	20%	NA	0%
Nhóm 2 (TS nguyên chất, PO, Q1Dx10, 10 ml/kg)	100%	60%	60%	60%	60%	60%	40%	NA	30%

NA= Không có

Sự điều trị cho phép giảm tỷ lệ chết chuột từ 100% xuống 70%. Bởi vậy, nghiên cứu động vật này cho thấy rằng hoạt tính kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học được thấy in-vitro được biến đổi thành tác dụng điều trị, khi chiết xuất chứa nước của sáng chế được dùng qua đường miệng với động vật.

Ví dụ 9

Ví dụ này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học đồng thời đối với *Staphylococcus aureus* của chế phẩm mô tả gồm 2 loại thực vật trong số 3 loại thực vật: *Filipendula ulmaria* PA13, *Camellia sinensis* PA21, *Arctostaphylos uva-ursi* PB12 và ít nhất 1 loại thực vật trong số 3 loại thực vật: *Eugenia caryophyllus* PC20, *Vitis vinifera* var. *tinctorial* PA22, *Desmodium adscendens* PB07. Thực vật khô loại được dùng thu được từ “Herboristerie Cailleau” (Chemillé, Pháp).

Bắt đầu từ ba loại bột thực vật khác nhau này thì sáu chế phẩm thảo dược được bào chế theo phương pháp A nêu ở trên.

Danh mục 9-1: Các chế phẩm thảo dược của mẫu thử đã xử lý

M[02P]-064: PA13; PA21;
 M[03P]-050: PA13; PA21; PC20;
 M[03P]-053: PA13; PA21; PB07;
 M[03P]-056: PA13; PA21; PA22;
 M[02P]-065: PA13; PB12;
 M[03P]-051: PA13; PB12; PC20;
 M[03P]-054: PA13; PB12; PB07;
 M[03P]-057: PA13; PB12; PA22;
 M[02P]-066: PA21; PB12;
 M[03P]-052: PA21; PB12; PC20;
 M[03P]-055: PA21; PB12; PB07;
 M[03P]-058: PA21; PB12; PA22;
 M[03P]-059: PA13; PB12; PA21;
 M[04P]-025: PA13; PB12; PA21; PC20;
 M[04P]-026: PA13; PB12; PA21; PB07;
 M[04P]-027: PA13; PB12; PA21; PA22.

Bắt đầu từ các chế phẩm thảo dược liệt kê trong danh mục 6-3 thì các chiết xuất chứa nước (hoặc mẫu thử đã xử lý) tương ứng được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng 40mL nước chứa sucroza với nồng độ 100g/l để chiết bằng nước và bao gồm bước lắng gạn trước khi lọc.

Hoạt tính sinh học của mỗi mẫu thử đã xử lý được xác định theo phương pháp C đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng các chủng *Staphylococcus aureus* sau: ATCC 6538, với các mức pha loãng cuối sau đây của mẫu thử đã xử lý: 1:5 đối với sự ức chế tạo màng sinh học và 1:10 đối với sự ức chế phát triển. Lưu ý rằng mức ức chế phát triển là gần 100% đối với mỗi hỗn hợp ở mức pha loãng 1:5, và mức ức chế tạo màng sinh học là gần 0% đối với tất cả các hỗn hợp ở mức pha loãng 1:10.

Tỷ lệ phần trăm ức chế phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên tất cả các chủng thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược khác nhau được nêu trong Bảng 9-1 sau.

Bảng 9-1: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên chủng *Staphylococcus aureus*

ATCC® 6538™ của mẫu thử đã xử lý dựa trên chế phẩm nêu trong danh mục 9-1. Mẫu thử đã xử lý được sử dụng ở mức pha loãng 1:10 đối với các thử nghiệm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và ở mức pha loãng 1:5 đối với sự ức chế tạo màng sinh học.

(A)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
M[02P]-064	47%	34%
M[03P]-050	70%	56%
M[03P]-053	55%	35%
M[03P]-056	56%	38%
(C)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
M[02P]-066	40%	23%
M[03P]-052	53%	28%
M[03P]-055	59%	27%
M[03P]-058	60%	33%

(B)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
M[02P]-065	42%	15%
M[03P]-051	59%	36%
M[03P]-054	54%	22%
M[03P]-057	54%	34%
(D)	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
M[03P]-059	59%	87%
M[04P]-025	69%	90%
M[04P]-026	64%	90%
M[04P]-027	64%	89%

(A) danh mục chiết xuất thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa PA13 và PA21, trong đó sự bổ sung một trong số PC20, PB07 và PA22 cải thiện hoạt tính; (B) danh mục chiết xuất thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa PA13 và PB12, trong đó sự bổ sung một trong số PC20, PB07 và PA22 cải thiện hoạt tính; (C) danh mục chiết xuất thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa PA13, PA21 và PB12, trong đó sự bổ sung một trong số PC20, PB07 và PA22 cải thiện hoạt tính; (D) danh mục chiết xuất thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa PA13 và PA21, trong đó sự bổ sung một trong số PC20, PB07 và PA22 cải thiện hoạt tính.

Ví dụ 10

Ví dụ này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật và chống tạo màng sinh học đồng thời đối với *Staphylococcus aureus* của 324 chiết xuất hỗn hợp thu được từ các chế phẩm

thảo dược mô tả bao gồm 2 loại thực vật trong số 3 loại thực vật: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21), *Arctostaphylos uva-ursi* (PB12) và ít nhất 1 loại thực vật trong số 3 loại thực vật: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tinctorial* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07).

Đối với các hỗn hợp từ M[20C]-2083 đến M[20C]-20798, thực vật khô loại được dụng thu được từ “Herboristerie Cailleau” (Chemillé, Pháp). Đối với các hỗn hợp từ M[20C]-2805 đến M[20C]-2957, thực vật khô loại được dụng thu được từ “Pharmacie Fontgiève” (Clermont-Ferrand, Pháp, thực vật PA00 đến PB12) và “Pharmacie St Herem” (Clermont-Ferrand, Pháp, thực vật PB13 đến PD02).

Các chế phẩm thảo dược chứa từ 3 đến 20 loại bột thực vật được bào chế theo phương pháp A đã được mô tả ở trên.

Bắt đầu từ các chế phẩm thảo dược, các chiết xuất chứa nước (hoặc mẫu thử đã xử lý) tương ứng được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng 40mL nước chứa sucroza với nồng độ 100g/l để chiết bằng nước và bao gồm bước lắng gạn trước khi lọc.

Hoạt tính sinh học của mỗi mẫu thử đã xử lý được xác định theo phương pháp C đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng các chủng *Staphylococcus aureus* sau: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213 và ATCC 14775, với các mức pha loãng cuối 1:20 của các mẫu thử đã xử lý.

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược sau lần lượt của danh mục 10-1, danh mục 10-2, danh mục 10-3 và danh mục 10-4 được nêu lần lượt trong Bảng 10-1, Bảng 10-2, Bảng 10-3 và Bảng 10-4. Trong mỗi nhóm, các chiết xuất thu được từ các chế phẩm thảo dược chứa lớn hơn 3 hoặc 4 loại thực vật được thấy có mức ức chế sự phát triển sinh vật phù du hoặc ức chế tạo màng sinh học (hoặc ức chế cả hai) lớn hơn một hỗn hợp bất kỳ chỉ chứa 3 hoặc 4 loại thực vật.

Danh mục 10-1: Chiết xuất từ các chế phẩm thảo dược chứa 2 loại thực vật trong số 3 loại thực vật: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21) và ít nhất một trong số 3 loại thực vật: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tinctorial* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07):

M[03P]-050: PA13; PA21; PC20;

M[03P]-053: PA13; PA21; PB07;
 M[03P]-056: PA13; PA21; PA22;
 M[20C]-2808: PA11; PA12; PA13; PA13; PA18; PA21; PA23; PA24; PA28;
 PA69; PB07; PB88; PC23; PC24; PC49; PC52; PC55 (2 thia); PC60; PC97;
 M[20C]-2820: PA10; PA11 (2 thia); PA12; PA13; PA14; PA18; PA20; PA21;
 PA25; PA29; PA33; PA35; PA67; PA75; PB07; PB60; PC33; PC35; PC55 ;
 M[20C]-2821: PA11; PA13(2 thia);PA19; PA20; PA21; PA22; PA25; PA29;
 PA33; PA35; PA75; PB07; PB36; PC20; PC33 (2 thia); PC49; PC55; PC97;
 M[20C]-2826: PA11; PA13 (2 thia);PA20; PA21; PA24; PA25; PA29; PA33;
 PA34; PA35; PA52; PA70; PA75; PB07; PC11; PC21; PC33; PC37; PC74;
 M[20C]-2827: PA10; PA11; PA13 (2 thia);PA20; PA21; PA25; PA26; PA29;
 PA33; PA35; PA57; PA75; PB02; PB07; PB28; PC11; PC23; PC33; PC49;
 M[20C]-2830: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA18; PA21; PA22; PA25;
 PA29; PA32; PA34; PA67; PB07; PB60; PB88; PC33; PC35; PC55; PC98;
 M[20C]-2831: PA13; PA13; PA19; PA21; PA22; PA22; PA25; PA29; PA32;
 PA34; PB07; PB36; PB88; PC20; PC33; PC33; PC49; PC55; PC97; PC98;
 M[20C]-2833: PA10; PA11; PA13; PA14; PA21; PA22; PA24; PA25; PA26;
 PA29; PA32; PA34; PB33; PB88; PB88; PC12; PC23; PC27; PC33; PC98;
 M[20C]-2836: PA13; PA13; PA21; PA22; PA24; PA25; PA29; PA32; PA34;
 PA34; PA52; PA70; PB07; PB88; PC11; PC21; PC33; PC37; PC74; PC98;
 M[20C]-2837: PA10; PA13 (2 thia); PA21; PA22; PA25; PA26; PA29; PA32;
 PA34; PA57; PB02; PB07; PB28; PB88; PC11; PC23; PC33; PC49; PC98;
 M[20C]-2838: PA12; PA13 (2 thia); PA18; PA21; PA21; PA22; PA24; PA25;
 PA29; PA32; PA34; PB88; PC23; PC33; PC49; PC52; PC55; PC97; PC98;
 M[20C]-2839: PA13 (2 thia);PA14; PA21; PA22; PA25; PA25; PA26; PA29;
 PA32; PA34; PA39; PA52; PA57; PB33; PB88; PC33; PC71; PC97; PC98;
 M[20C]-2858: PA12; PA13; PA18; PA20; PA21; PA23; PA24; PA24; PA67;
 PB07; PB28; PB33; PC12; PC20; PC21; PC23; PC49; PC52; PC55; PC97;
 M[20C]-2861: PA13; PA19; PA21; PA22 (2 thia);PB07; PB28; PB36; PB60;
 PC11; PC20; PC20; PC23; PC33; PC49; PC55 (2 thia); PC60; PC74; PC97;
 M[20C]-2866: PA13; PA21; PA22; PA24; PA34; PA52; PA70; PB07; PB28;
 PB60; PC11 (2 thia); PC20; PC21; PC23; PC37; PC55; PC60; PC74 (2 thia);

M[20C]-2867: PA10; PA13; PA21; PA22; PA26; PA57; PB02; PB07; PB28; PB28; PB60; PC11 (2 thìa); PC20; PC23; PC23; PC49; PC55; PC60; PC74;

M[20C]-2868: PA12; PA13; PA18; PA21; PA21; PA22; PA24; PB28; PB60; PC11; PC20; PC23 (2 thìa); PC49; PC52; PC55 (2 thìa); PC60; PC74; PC97;

M[20C]-2869: PA13; PA14; PA21; PA22; PA25; PA26; PA39; PA52; PA57; PB28; PB33; PB60; PC11; PC20; PC23; PC55; PC60; PC71; PC74; PC97;

M[20C]-2871: PA10; PA11; PA13; PA19; PA21; PA22; PA35; PA57; PB07; PB07; PB36; PB77; PC20 (2 thìa); PC23; PC33; PC49; PC55; PC71; PC97;

M[20C]-2876: PA10; PA11; PA13; PA21; PA24; PA34; PA35; PA52; PA57; PA70; PB07 (2 thìa); PB77; PC11; PC20; PC21; PC23; PC37; PC71; PC74;

M[20C]-2877: PA10; PA10; PA11; PA13; PA21; PA26; PA35; PA57; PA57; PB02; PB07; PB28; PB77; PC11; PC20; PC23 (2 thìa); PC49; PC71;

M[20C]-2878: PA10; PA11; PA12; PA13; PA18; PA21; PA21; PA24; PA35; PA57; PB07; PB77; PC20; PC23; PC23; PC49; PC52; PC55; PC71; PC97;

M[20C]-2879: PA10; PA11; PA13; PA14; PA21; PA25; PA26; PA35; PA39; PA52; PA57 (2 thìa); PB07; PB33; PB77; PC20; PC23; PC71 (2 thìa); PC97;

M[20C]-2889: PA10; PA12; PA13; PA14; PA18; PA21; PA26; PA26; PA28; PA29; PA33; PA39; PA75; PB36; PC20; PC52; PC55 (2 thìa); PC60;

M[20C]-2894: PA11 (2 thìa); PA13; PA21; PA28; PA39; PA39; PA70; PB02; PB02; PB07; PB99 (2 thìa); PC14; PC20; PC49; PC71; PC97; PC98;

M[20C]-2944: PA10; PA11 (2 thìa); PA13; PA14; PA21; PA28; PA39; PA70; PB02; PB07; PB27; PB99; PC11; PC20; PC23; PC67; PC71; PC97; PC98;

M[20C]-2954: PA11; PA12; PA13; PA14; PA21; PA23; PA28; PA33; PA39; PA70; PB01; PB02; PB07; PB99; PC20; PC27; PC52; PC71; PC97; PC98.

Bảng 10-1: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học hiệu quả trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý dựa trên chiết xuất của danh mục 10-1 ở mức pha loãng 1:20

Ức chế	Ức chế tạo
phát	màng sinh
triển	học

Ức chế	Ức chế tạo
phát triển	màng sinh
sinh vật	học

	sinh vật	
	phù du	
M[03C]-050	41%	31%
M[03C]-053	37%	23%
M[03C]-056	34%	21%
M[20C]-2808	66%	30%
M[20C]-2820	54%	27%
M[20C]-2821	53%	24%
M[20C]-2826	56%	25%
M[20C]-2827	51%	26%
M[20C]-2830	56%	37%
M[20C]-2831	64%	31%
M[20C]-2833	80%	39%
M[20C]-2836	59%	25%
M[20C]-2837	58%	25%
M[20C]-2838	70%	30%
M[20C]-2839	56%	30%

	phù du	
M[20C]-2858	58%	32%
M[20C]-2861	58%	31%
M[20C]-2866	57%	43%
M[20C]-2867	62%	32%
M[20C]-2868	74%	36%
M[20C]-2869	85%	45%
M[20C]-2871	63%	26%
M[20C]-2876	66%	28%
M[20C]-2877	81%	43%
M[20C]-2878	65%	28%
M[20C]-2879	58%	28%
M[20C]-2889	62%	41%
M[20C]-2894	55%	29%
M[20C]-2944	68%	16%
M[20C]-2954	75%	27%

Danh mục 10-2: Chiết xuất từ các chế phẩm thảo dược chứa *Filipendula ulmaria* (PA13), *Arctostaphylos uva-ursi* (PB12) và ít nhất một trong số 3 loại thực vật: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tinctoria* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07):

M[03C]-051: PA13; PB12; PC20;

M[03C]-054: PA13; PB12; PB07;

M[03C]-057: PA13; PB12; PA22;

M[20C]-2083:PA02; PA13; PA28 (2 thìa); PA31; PA36; PA40; PA79; PA93; PB01; PB12; PB17; PB18; PB31; PB51; PB77; PC20; PC58; PC64; PC66;

M[20C]-2084:PA13; PA28; PA31; PA36; PA61; PA76; PA76; PA79; PA82; PB01; PB10; PB12; PB17; PB31; PB57; PC20; PC36; PC41; PC64; PC66;

M[20C]-2085:PA12; PA13; PA14; PA28; PA30; PA31; PA36; PA79; PA94; PB00; PB01; PB08; PB12; PB17; PB31; PC02; PC14; PC20; PC64; PC66;

M[20C]-2090:PA08; PA13; PA20; PA23; PA26; PA32; PA46; PA52; PA57;

PA79; PA95; PB10; PB12; PB33; PB76; PB82; PC08; PC20; PC21; PD00;

M[20C]-2091:PA08; PA13; PA26; PA52; PA57; PA72; PA79; PA88; PA92;
PA95; PB12; PB60; PB76; PB83; PC08; PC11; PC20; PC26; PC68; PD00;

M[20C]-2092:PA08; PA13; PA17; PA26; PA52; PA53; PA57; PA79; PA95;
PB06; PB12; PB50; PB76; PC08; PC20; PC20; PC27; PC97; PD00; PD02;

M[20C]-2100:PA13; PA20; PA23; PA32; PA41; PA46; PA53; PA79; PA80;
PA90; PB08; PB10; PB12; PB33; PB82; PB85; PC20; PC21; PC28; PC75;

M[20C]-2102:PA13; PA17; PA41; PA53; PA53; PA79; PA80; PA90; PB06;
PB08; PB12; PB50; PB85; PC20; PC20; PC27; PC28; PC75; PC97; PD02;

M[20C]-2104:PA13; PA41; PA53; PA61; PA76; PA76; PA79; PA80; PA82;
PA90; PB08; PB10; PB12; PB57; PB85; PC20; PC28; PC36; PC41; PC75;

M[20C]-2105:PA12; PA13; PA14; PA30; PA41; PA53; PA79; PA80; PA90;
PA94; PB00; PB08; PB08; PB12; PB85; PC02; PC14; PC20; PC28; PC75;

M[20C]-2110:PA00; PA10; PA13; PA20; PA23; PA25; PA30; PA32; PA46;
PA52; PA79; PB05; PB10; PB12; PB33; PB82; PC01; PC20; PC21; PD07;

M[20C]-2111:PA00; PA10; PA13; PA25; PA30; PA52; PA72; PA79; PA88;
PA92; PB05; PB12; PB60; PB83; PC01; PC11; PC20; PC26; PC68; PD07;

M[20C]-2120:PA11; PA13; PA16; PA20; PA23; PA32; PA44; PA46; PA60;
PA67; PA73; PA79; PB10; PB12; PB33; PB48; PB82; PC17; PC20; PC21;

M[20C]-2122:PA11; PA13; PA16; PA17; PA44; PA53; PA60; PA67; PA73;
PA79; PB06; PB12; PB48; PB50; PC17; PC20; PC20; PC27; PC97; PD02;

M[20C]-2131:PA05; PA13; PA18; PA37; PA55; PA72; PA72; PA79; PA88;
PA92; PA97; PB04; PB12; PB60; PB83; PC11; PC20; PC26; PC35; PC68;

M[20C]-2135:PA05; PA12; PA13; PA14; PA18; PA30; PA37; PA55; PA72;
PA79; PA94; PA97; PB00; PB04; PB08; PB12; PC02; PC14; PC20; PC35;

M[20C]-2137:PA05; PA13; PA18; PA27; PA37; PA46; PA55; PA72; PA79;
PA82; PA97; PB00; PB04; PB11; PB12; PC20; PC35; PC45; PC52; PC67;

M[20C]-2140:PA13; PA14; PA20; PA23; PA32; PA37; PA46; PA79; PA85;
PB10; PB12; PB33; PB49; PB82; PB98; PC20; PC21; PC55; PC62; PC98;

M[20C]-2141:PA13; PA14; PA37; PA72; PA79; PA85; PA88; PA92; PB12;
PB49; PB60; PB83; PB98; PC11; PC20; PC26; PC55; PC62; PC68; PC98;

M[20C]-2142:PA13; PA14; PA17; PA37; PA53; PA79; PA85; PB06; PB12;

PB49; PB50; PB98; PC20; PC20; PC27; PC55; PC62; PC97; PC98; PD02;
 M[20C]-2143:PA02; PA13; PA14; PA28; PA37; PA40; PA79; PA85; PA93;
 PB12; PB18; PB49; PB51; PB77; PB98; PC20; PC55; PC58; PC62; PC98;
 M[20C]-2144:PA13; PA14; PA37; PA61; PA76; PA76; PA79; PA82; PA85;
 PB10; PB12; PB49; PB57; PB98; PC20; PC36; PC41; PC55; PC62; PC98;
 M[20C]-2150:PA13; PA20; PA23; PA31; PA32; PA46; PA60; PA74; PA79;
 PB03; PB10; PB12; PB33; PB82; PC20; PC21; PC29; PC37; PC60; PC86;
 M[20C]-2151:PA13; PA31; PA60; PA72; PA74; PA79; PA88; PA92; PB03;
 PB12; PB60; PB83; PC11; PC20; PC26; PC29; PC37; PC60; PC68; PC86;
 M[20C]-2152:PA13; PA17; PA31; PA53; PA60; PA74; PA79; PB03; PB06;
 PB12; PB50; PC20; PC20; PC27; PC29; PC37; PC60; PC86; PC97; PD02;
 M[20C]-2153:PA02; PA13; PA28; PA31; PA40; PA60; PA74; PA79; PA93;
 PB03; PB12; PB18; PB51; PB77; PC20; PC29; PC37; PC58; PC60; PC86;
 M[20C]-2154:PA13; PA31; PA60; PA61; PA74; PA76; PA76; PA79; PA82;
 PB03; PB10; PB12; PB57; PC20; PC29; PC36; PC37; PC41; PC60; PC86;
 M[20C]-2155:PA12; PA13; PA14; PA30; PA31; PA60; PA74; PA79; PA94;
 PB00; PB03; PB08; PB12; PC02; PC14; PC20; PC29; PC37; PC60; PC86;
 M[20C]-2163:PA06; PA13; PA17; PA20; PA23; PA72; PA79; PA80; PA92;
 PB01; PB03; PB10; PB12; PB33; PB57; PB82; PC20; PC62; PC86; PC97;
 M[20C]-2164:PA13; PA17; PA20; PA41; PA79; PA80; PA86; PA92; PB03;
 PB10; PB12; PC20; PC26; PC27; PC29; PC55; PC60; PC62; PC86; PC97;
 M[20C]-2214:PA13; PA37; PA41; PA79; PA86; PB00; PB10; PB12; PB49;
 PB82; PC20; PC26; PC27; PC29; PC55; PC60; PC62; PC66; PC86;
 M[20C]-2234:PA13; PA41; PA79; PA85; PA86; PB12; PB31; PB50; PB77;
 PC14; PC20; PC26; PC27; PC29; PC55; PC55; PC60; PC62; PC98;
 M[20C]-2241:PA10; PA13; PA14; PA23; PA36; PA37; PA46; PA79; PB00;
 PB10; PB11; PB12; PB17; PB57; PC20; PC27; PC29; PC37; PC64; PC68;
 M[20C]-2242:PA13; PA14; PA17; PA23; PA36; PA37; PA60; PA61; PA76;
 PA79; PA82; PB00; PB06; PB12; PB49; PC20; PC27; PC29; PC68; PC98;
 M[20C]-2243:PA13; PA14; PA23; PA36; PA37; PA52; PA53; PA73; PA79;
 PA92; PB00; PB01; PB12; PB18; PB60; PC20; PC20; PC27; PC29; PC68;
 M[20C]-2248:PA13; PA14 (2 thĩa); PA23; PA25; PA36; PA36; PA37; PA46;

PA79; PA85; PB00; PB12; PC02; PC20; PC27; PC29; PC29; PC55; PC68;
M[20C]-2249:PA10; PA13; PA14; PA23; PA36; PA37; PA53; PA74; PA79;
PA92; PB00; PB12; PC20; PC27; PC29; PC62; PC67; PC68; PC86; PC97;
M[20C]-2250:PA13; PA23; PA37; PA76; PA79; PB10; PB12; PB33; PB50;
PB82; PB82; PB85; PB98; PC01; PC11; PC20; PC45; PC55; PC60; PD02;
M[20C]-2253:PA13; PA37; PA52; PA53; PA73; PA79; PA92; PB01; PB10;
PB12; PB18; PB33; PB50; PB60; PB82; PB85; PC01; PC20; PC20; PC45;
M[20C]-2254:PA11; PA13; PA17; PA27; PA37; PA79; PB00; PB10; PB12;
PB33; PB50; PB82; PB83; PB85; PB92; PB98; PC01; PC20; PC27; PC45;
M[20C]-2255:PA13; PA36; PA37; PA53; PA72; PA79; PA80; PB03; PB10;
PB12; PB33; PB49; PB50; PB82; PB82; PB85; PC01; PC20; PC45; PC68;
M[20C]-2256:PA13; PA23; PA37; PA53; PA61; PA79; PA85; PB10; PB12;
PB33; PB50; PB60; PB82; PB85; PC01; PC11; PC20; PC29; PC45; PD02;
M[20C]-2257:PA13; PA37; PA37; PA60; PA72; PA79; PB10; PB12; PB33;
PB49; PB50; PB82; PB85; PC01; PC08; PC20; PC45; PC68; PC98; PD02;
M[20C]-2258:PA13; PA14; PA25; PA36; PA37; PA46; PA79; PA85; PB10;
PB12; PB33; PB50; PB82; PB85; PC01; PC02; PC20; PC29; PC45; PC55;
M[20C]-2259:PA10; PA13; PA37; PA53; PA74; PA79; PA92; PB10; PB12;
PB33; PB50; PB82; PB85; PC01; PC20; PC45; PC62; PC67; PC86; PC97;
M[20C]-2261:PA10; PA13; PA23; PA36; PA37; PA46; PA53; PA73; PA79;
PA97; PB10; PB11; PB12; PB17; PB57; PC20; PC26; PC29; PC37; PC64;
M[20C]-2278:PA10; PA13; PA14; PA25; PA28; PA30; PA36; PA37; PA41;
PA46; PA79; PA85; PB12; PB50; PB60; PC02; PC20; PC29; PC55; PC66;
M[20C]-2281:PA10; PA13; PA17; PA46; PA52; PA79; PA82; PA92; PA96;
PB10; PB11; PB12; PB17; PB57; PB98; PC20; PC36; PC37; PC64; PC86;
M[20C]-2321:PA13; PA46; PA53; PA79; PA82; PA92; PB03; PB10; PB11;
PB12; PB83; PB85; PC20; PC20; PC21; PC55; PC60; PC86; PC97; PD02;
M[20C]-2406:PA13; PA37; PA46; PA53; PA79; PA85; PB01; PB05; PB10;
PB11; PB12; PB17; PB49; PB98; PC20; PC36; PC37; PC45; PC58; PC67;
M[20C]-2420:PA10; PA13; PA14; PA36; PA46; PA79; PB10; PB10; PB11;
PB11; PB12; PB17; PB17; PB33; PB82; PC20; PC54; PC55; PC68; PC98;
M[20C]-2441:PA00; PA13; PA14; PA17; PA17; PA37; PA37; PA46; PA74;

PA79; PB00; PB03; PB10; PB12; PB49; PC08; PC20; PC35; PC62; PC86;

M[20C]-2443:PA00; PA13; PA14; PA14; PA17; PA36; PA37; PA79; PB00;
PB01; PB10; PB12; PC02; PC08; PC11; PC20; PC29; PC62; PC67; PC86;

M[20C]-2449:PA00; PA13; PA14; PA17; PA36; PA37; PA60; PA79; PA85;
PB00; PB10; PB12; PB82; PB98; PC08; PC20; PC29; PC62; PC86; PC98;

M[20C]-2451:PA10; PA13; PA17; PA23; PA37; PA46; PA74; PA76; PA79;
PB00; PB03; PB08; PB10; PB12; PB49; PB49; PC20; PC35; PC97; PC98;

M[20C]-2460:PA08; PA13; PA14; PA36; PA36; PA46; PA79; PB10; PB11;
PB12; PB17; PB17; PB98; PC20; PC36; PC54; PC62; PC68; PC68; PC86;

M[20C]-2488:PA10; PA13; PA37; PA46; PA53; PA74; PA79; PA82; PB00;
PB00; PB12; PB49; PC20; PC29; PC37; PC45; PC54; PC74; PC86; PC98;

M[20C]-2545:PA00; PA08; PA10; PA13; PA46; PA73; PA76; PA79; PA90;
PB01; PB08; PB10; PB12; PB17; PB33; PB33; PC20; PC55; PC68; PD02;

M[20C]-2551:PA13; PA14; PA16; PA27; PA36; PA79; PA82; PA92; PA95;
PB10; PB12; PB57; PB85; PC11; PC20; PC29; PC29; PC54; PC64; PC98;

M[20C]-2553:PA13; PA16; PA23; PA60; PA79; PA82; PA95; PB00; PB10;
PB10; PB12; PB33; PB49; PB50; PB85; PC02; PC11; PC20; PC29; PC98;

M[20C]-2555:PA00; PA10; PA13; PA16; PA79; PA82; PA90; PA95; PB08;
PB10; PB10; PB12; PB33; PB85; PC11; PC20; PC29; PC68; PC98; PD02;

M[20C]-2580:PA10; PA13; PA25; PA37; PA40; PA46; PA79; PB11; PB12;
PB33; PB49; PB82; PB85; PB98; PC20; PC29; PC29; PC36; PC45; PC97;

M[20C]-2589:PA13; PA14; PA17; PA40; PA46; PA79; PA80; PB11; PB12;
PB33; PB49; PB85; PB98; PC20; PC26; PC29; PC37; PC86; PC97; PD02;

M[20C]-2622:PA13; PA25; PA36; PA36; PA37; PA46; PA46; PA79; PA82;
PB12; PB49; PB82; PC20; PC20; PC54; PC55; PC64; PC68; PC86; PC98;

M[20C]-2627:PA13; PA14; PA36; PA46; PA76; PA79; PA80; PA96; PB12;
PB49; PB49; PC20; PC20; PC45; PC54; PC55; PC64; PC97; PC98; PC98;

M[20C]-2641:PA05; PA13; PA16; PA27; PA36; PA37; PA41; PA79; PA96;
PB05; PB10; PB12; PB82; PB85; PB98; PC11; PC20; PC54; PC68; PD02;

M[20C]-2651:PA13; PA36; PA41; PA46; PA79; PA92; PB00; PB01; PB05;
PB12; PB33; PB82; PB82; PB85; PB98; PC20; PC54; PC55; PC86; PD02;

M[20C]-2654:PA13; PA36; PA46; PA79; PA92; PB00; PB00; PB01; PB08;

PB11; PB12; PB33; PB82; PC01; PC20; PC55; PC55; PC64; PC86; PC86;
 M[20C]-2717:PA13; PA14; PA46; PA79; PB00; PB10; PB12; PB49; PB50;
 PB77; PB85; PB85; PC02; PC20; PC29; PC64; PC64; PC68; PC98; PD02;
 M[20C]-2728:PA05; PA13; PA16; PA30; PA46; PA60; PA61; PA79; PA85;
 PB04; PB10; PB12; PB49; PB82; PB82; PB85; PB98; PC11; PC20; PC37;
 M[20C]-2730:PA13; PA36; PA37; PA46; PA61; PA79; PA82; PA85; PB00;
 PB12; PB17; PB33; PB82; PB85; PC01; PC02; PC20; PC29; PC64; PC98;
 M[20C]-2738:PA05; PA13; PA37; PA46; PA61; PA61; PA79; PA85; PB10;
 PB12; PB82; PB82; PB85; PB85; PB98; PC02; PC20; PC29; PC37; PC64;
 M[20C]-2788:PA00; PA05; PA13; PA27; PA46; PA61; PA79; PA82; PB00;
 PB10; PB12; PB82; PB85; PB85; PB98; PC20; PC37; PC37; PC58; PC97;
 M[20C]-2805:PA11; PA13; PA13; PA14; PA22; PA23; PA28; PA33; PA35;
 PA69; PB07; PB12; PB38; PB88; PB88; PC20; PC24; PC55; PC55; PC60;
 M[20C]-2812:PA11; PA11; PA13; PA20; PA23; PA29; PA30; PA83; PA98;
 PB02; PB12; PB27; PB38; PC11; PC11; PC20; PC23; PC37; PC51; PC60;
 M[20C]-2815:PA11; PA13; PA14; PA22; PA23; PA29; PA33; PA35; PA98;
 PB02; PB12; PB27; PB38; PB38; PB88; PC11; PC20; PC23; PC37; PC55;
 M[20C]-2840:PA10; PA11; PA12 (2 thia); PA13; PA14; PA18; PA28; PA33;
 PA67; PA67; PB07 (2 thia); PB12; PB60; PC23; PC35; PC37; PC55; PC67;
 M[20C]-2841:PA12; PA13 (2 thia); PA19; PA22; PA28; PA33; PA67; PB07 (2
 thia); PB12; PB36; PC20; PC23; PC33; PC37; PC49; PC55; PC67; PC97;
 M[20C]-2842:PA11; PA12; PA13 (2 thia); PA20; PA28; PA30; PA33; PA67;
 PA83; PB07; PB12 (2 thia); PC11; PC20; PC23; PC37; PC51; PC60; PC67;
 M[20C]-2843:PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA24; PA26; PA28; PA33;
 PA67; PB07; PB12; PB33; PB88; PC12; PC23; PC23; PC27; PC37; PC67;
 M[20C]-2844:PA12; PA13; PA13; PA15; PA18; PA20; PA28; PA32; PA33;
 PA67 (2 thia); PB07; PB12; PB12; PC20; PC23; PC37; PC49; PC55; PC67;
 M[20C]-2845:PA12; PA13 (2 thia); PA14; PA22; PA28; PA33; PA33; PA35;
 PA67; PB07; PB12 (2 thia); PB38; PB88; PC20; PC23; PC37; PC55; PC67;
 M[20C]-2847:PA10; PA12; PA13 (2 thia); PA26; PA28; PA33; PA57; PA67;
 PB02; PB07; PB07; PB12; PB28; PC11; PC23; PC23; PC37; PC49; PC67;
 M[20C]-2849:PA12; PA13 (2 thia); PA14; PA25; PA26; PA28; PA33; PA39;

PA52; PA57; PA67; PB07; PB12; PB33; PC23; PC37; PC67; PC71; PC97;
M[20C]-2852:PA11; PA13; PA20 (2 thĩa); PA23; PA24; PA30; PA67; PA83;
PB07; PB12; PB28; PB33; PC11; PC12; PC20; PC20; PC21; PC51; PC60;
M[20C]-2854:PA13; PA15; PA18; PA20 (2 thĩa); PA23; PA24; PA32; PA67 (2
thĩa); PB07; PB12; PB28; PB33; PC12; PC20 (2 thĩa); PC21; PC49; PC55;
M[20C]-2855:PA13; PA14; PA20; PA22; PA23; PA24; PA33; PA35; PA67;
PB07; PB12; PB28; PB33; PB38; PB88; PC12; PC20; PC21; PC55;
M[20C]-2893:PA00; PA06; PA11; PA12; PA13; PA23; PA26; PA28; PA33;
PA39; PB02; PB07 (2 thĩa); PB12; PB99; PC14; PC20; PC49; PC98; PD02;
M[20C]-2897:PA11 (2 thĩa); PA13; PA14; PA24; PA29; PA39; PA83; PB02;
PB07; PB12; PB60; PB99; PC11; PC14; PC20; PC20; PC49; PC51; PC98;
M[20C]-2930:PA11; PA13; PA14; PA23; PA26; PA28; PA33; PA35; PA83;
PB12; PB28; PB33; PB38; PB77; PB88; PC20; PC23; PC37; PC60; PC60;
M[20C]-2933:PA00; PA06; PA11; PA12; PA13; PA14; PA23; PA26; PA28 (2
thĩa); PA33; PA33; PB07; PB12; PB12; PB28; PB38; PB77; PC60; PD02;
M[20C]-2935:PA10; PA11; PA13; PA14; PA28; PA29; PA33; PA57; PA67;
PB07; PB12; PB28 (2 thĩa); PB38; PB77; PB77; PC11; PC20; PC52; PC60;
M[20C]-2936:PA11 (2 thĩa); PA13; PA14; PA18; PA28; PA33; PA57; PA67;
PB02; PB12; PB28; PB38 (2 thĩa); PC11; PC20; PC27; PC52; PC60;
M[20C]-2937:PA11; PA11; PA13; PA14 (3 thĩa); PA28; PA29; PA33; PA83;
PB12 (2 thĩa); PB28; PB38; PB60; PB77; PC11; PC20; PC51; PC60;
M[20C]-2939:PA10; PA11; PA12; PA13 (2 thĩa); PA14; PA18; PA26; PA28;
PA33 (2 thĩa); PA39; PB12; PB28; PB38; PB77; PC20; PC52; PC55; PC60;
M[20C]-2943:PA00; PA06; PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA23; PA26;
PA28; PA33; PB07 (2 thĩa); PB12; PB27; PC11; PC20; PC23; PC67; PD02;
M[20C]-2947:PA10; PA11 (2 thĩa); PA13; PA14 (2 thĩa); PA24; PA29; PA83;
PB07; PB12; PB27; PB60; PC11 (2 thĩa); PC20 (2 thĩa); PC23; PC51; PC67;
M[20C]-2953:PA00; PA06; PA12 (2 thĩa); PA13; PA14; PA23 (2 thĩa); PA26;
PA28; PA33 (2 thĩa); PB01; PB07 (2 thĩa); PB12; PC20; PC27; PC52; PD02;
M[20C]-2957:PA11; PA12; PA13; PA14 (2 thĩa); PA23; PA24; PA29; PA33;
PA83; PB01; PB07; PB12; PB60; PC11; PC20 (2 thĩa); PC27; PC51; PC52.

Bảng 10-2: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du

và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý dựa trên sự kết hợp của danh mục 10-2 ở mức pha loãng 1:20

	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
M[03C]-051	37%	24%
M[03C]-054	30%	13%
M[03C]-057	27%	22%
M[20C]-2083	84%	55%
M[20C]-2084	72%	40%
M[20C]-2085	70%	45%
M[20C]-2090	57%	46%
M[20C]-2091	66%	35%
M[20C]-2092	71%	43%
M[20C]-2100	56%	40%
M[20C]-2102	53%	41%
M[20C]-2104	60%	43%
M[20C]-2105	81%	55%
M[20C]-2110	59%	43%
M[20C]-2111	63%	46%
M[20C]-2120	66%	28%
M[20C]-2122	72%	37%
M[20C]-2131	54%	37%
M[20C]-2135	59%	40%
M[20C]-2137	78%	50%
M[20C]-2140	60%	35%
M[20C]-2141	56%	40%
M[20C]-2142	61%	34%
M[20C]-2143	77%	37%

	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
M[20C]-2321	55%	30%
M[20C]-2406	58%	31%
M[20C]-2420	55%	34%
M[20C]-2441	52%	36%
M[20C]-2443	58%	33%
M[20C]-2449	55%	32%
M[20C]-2451	53%	28%
M[20C]-2460	54%	37%
M[20C]-2488	54%	27%
M[20C]-2545	52%	29%
M[20C]-2551	52%	29%
M[20C]-2553	52%	27%
M[20C]-2555	58%	39%
M[20C]-2580	58%	44%
M[20C]-2589	56%	35%
M[20C]-2622	57%	40%
M[20C]-2627	58%	39%
M[20C]-2641	53%	36%
M[20C]-2651	53%	33%
M[20C]-2654	53%	35%
M[20C]-2717	55%	30%
M[20C]-2728	56%	24%
M[20C]-2730	55%	27%
M[20C]-2738	52%	26%

M[20C]-2144	74%	39%
M[20C]-2150	65%	27%
M[20C]-2151	61%	34%
M[20C]-2152	66%	32%
M[20C]-2153	82%	50%
M[20C]-2154	67%	26%
M[20C]-2155	63%	32%
M[20C]-2163	61%	40%
M[20C]-2164	70%	35%
M[20C]-2214	76%	37%
M[20C]-2234	56%	31%
M[20C]-2241	60%	40%
M[20C]-2242	59%	33%
M[20C]-2243	63%	38%
M[20C]-2248	84%	49%
M[20C]-2249	63%	36%
M[20C]-2250	58%	36%
M[20C]-2253	76%	37%
M[20C]-2254	55%	25%
M[20C]-2255	60%	29%
M[20C]-2256	58%	30%
M[20C]-2257	59%	25%
M[20C]-2258	81%	39%
M[20C]-2259	60%	29%
M[20C]-2261	52%	25%
M[20C]-2278	53%	25%
M[20C]-2281	56%	26%

M[20C]-2788	56%	25%
M[20C]-2805	71%	25%
M[20C]-2812	54%	31%
M[20C]-2815	52%	29%
M[20C]-2840	55%	31%
M[20C]-2841	51%	31%
M[20C]-2842	53%	35%
M[20C]-2843	58%	34%
M[20C]-2844	76%	42%
M[20C]-2845	46%	33%
M[20C]-2847	61%	41%
M[20C]-2849	76%	32%
M[20C]-2852	77%	32%
M[20C]-2854	57%	27%
M[20C]-2855	66%	35%
M[20C]-2893	61%	37%
M[20C]-2897	66%	36%
M[20C]-2930	81%	52%
M[20C]-2933	60%	32%
M[20C]-2935	65%	34%
M[20C]-2936	68%	41%
M[20C]-2937	78%	41%
M[20C]-2939	77%	44%
M[20C]-2943	67%	29%
M[20C]-2947	71%	40%
M[20C]-2953	66%	38%
M[20C]-2957	71%	45%

Danh mục 10-3: Các chế phẩm thảo dược của mẫu thử đã xử lý chứa: *Camellia sinensis* (PA21), *Arctostaphylos uva-ursi* (PB12) và ít nhất một trong số 3 loại thực vật: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tinctorial* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07):

M[03C]-052: PA21; PB12; PC20;
 M[03C]-055: PA21; PB12; PB07;
 M[03C]-058: PA21; PB12; PA22;
 M[20C]-2888: PA14; PA15; PA18; PA21; PA21; PA23; PA26; PA28; PA28;
 PA29; PA39; PA57; PA75; PB07; PB12; PB36; PC11; PC55; PC55; PC60;
 M[20C]-2913: PA00; PA06; PA12; PA21; PA23; PA26; PA26; PA27; PA28;
 PA33; PB07; PB07; PB12 (2 thĩa); PB33; PC20; PC24; PC41; PC71; PD02;
 M[20C]-2918: PA15; PA18; PA21 (2 thĩa); PA23; PA26; PA27; PA28; PA57;
 PB07 (2 thĩa); PB12 (2 thĩa); PB33; PC11; PC20; PC24; PC41; PC55; PC71;
 M[20C]-2920: PA20; PA21; PA23; PA26; PA28; PA35; PA35; PA67; PA83;
 PB12; PB33; PB88; PC12; PC20; PC23; PC37; PC37; PC60 (2 thĩa); PC74;
 M[20C]-2923: PA00; PA06; PA12; PA20; PA21; PA23; PA26; PA28 (2 thĩa);
 PA33; PA35; PA67; PB07; PB12 (2 thĩa); PC12; PC37; PC60; PC74; PD02;
 M[20C]-2928: PA15; PA18; PA20; PA21 (2 thĩa); PA23; PA28 (2 thĩa); PA35;
 PA57; PA67; PB07; PB12 (2 thĩa); PC11; PC12; PC37; PC55; PC60; PC74;
 M[20C]-2887: PA11; PA14; PA14; PA21; PA24; PA26; PA28; PA29 (2 thĩa);
 PA39; PA75; PA83; PB12; PB36; PB60; PC11; PC20; PC51; PC55; PC60;
 M[20C]-2914: PA11; PA21 (2 thĩa); PA26; PA27; PA28; PA39; PA70; PB02;
 PB07; PB12; PB33; PB99; PC20; PC24; PC41; PC71 (2 thĩa); PC97; PC98;
 M[20C]-2915: PA10; PA21; PA26; PA27; PA29; PA57; PA67; PB07 (2 thĩa);
 PB12; PB28; PB33; PB77; PC11; PC20 (2 thĩa); PC24; PC41; PC52; PC71;
 M[20C]-2916: PA11; PA18; PA21; PA26; PA27; PA57; PA67; PB02; PB07;
 PB12; PB33; PB38; PC11; PC20; PC20; PC24; PC27; PC41; PC52; PC71;
 M[20C]-2917: PA11; PA14; PA21; PA24; PA26; PA27; PA29; PA83; PB07;
 PB12 (2 thĩa); PB33; PB60; PC11; PC20 (2 thĩa); PC24; PC41; PC51; PC71;
 M[20C]-2925: PA10; PA20; PA21; PA28; PA29; PA35; PA57; PA67 (2 thĩa);
 PB07; PB12; PB28; PB77; PC11; PC12; PC20; PC37; PC52; PC60; PC74;
 M[20C]-2926: PA11; PA18; PA20; PA21; PA28; PA35; PA57; PA67 (2 thĩa);
 PB02; PB12; PB38; PC11; PC12; PC20; PC27; PC37; PC52; PC60; PC74;
 M[20C]-2927: PA11; PA14; PA20; PA21; PA24; PA28; PA29; PA35; PA67;
 PA83; PB12; PB12; PB60; PC11; PC12; PC20; PC37; PC51; PC60; PC74;
 M[20C]-2910: PA21; PA23; PA26 (2 thĩa); PA27; PA35; PA83; PB07; PB12;

PB33 (2 thìa); PB88; PC20 (2 thìa); PC23; PC24; PC37; PC41; PC60; PC71.

Bảng 10-3: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý dựa trên sự kết hợp của danh mục 10-2 ở mức pha loãng 1:20.

	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học		Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
M[03C]-052	31%	13%	M[20C]-2887	46%	8%
M[03C]-055	29%	10%	M[20C]-2914	29%	38%
M[03C]-058	31%	18%	M[20C]-2915	30%	35%
M[20C]-2888	48%	27%	M[20C]-2916	39%	40%
M[20C]-2913	46%	37%	M[20C]-2917	40%	41%
M[20C]-2918	46%	32%	M[20C]-2925	41%	36%
M[20C]-2920	54%	30%	M[20C]-2926	47%	36%
M[20C]-2923	51%	28%	M[20C]-2927	41%	41%
M[20C]-2928	46%	32%	M[20C]-2910	46%	39%

Danh mục 10-4: Chiết xuất từ các chế phẩm thảo dược chứa: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21), *Arctostaphylos uva-ursi* (PB12) và ít nhất 1 trong số 3 loại thực vật: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tinctorial* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07):

M[04C]-025:PA13; PA21; PB12; PC20;

M[04C]-026:PA13; PA21;PB12; PB07;

M[04C]-027:PA13; PA21; PB12; PA22;

M[20C]-2898:PA11; PA13; PA15; PA18; PA21; PA23; PA28; PA39; PA57; PB02; PB07 (2 thìa); PB07; PB12; PB99; PC11; PC14; PC20; PC49; PC55; PC98;

M[20C]-2900:PA10; PA11; PA13; PA21; PA23; PA25; PA26; PA35; PA69; PA83; PB12; PB32; PB33; PB88; PC20 (2 thìa); PC23; PC37; PC55; PC60;

M[20C]-2903:PA00; PA06; PA10; PA11; PA12; PA13; PA21; PA23; PA25; PA26; PA28; PA33; PA69; PB07; PB12 (2 thìa); PB32; PC20; PC55; PD02;

M[20C]-2908:PA10; PA11; PA13; PA15; PA18; PA21 (2 thìa); PA23; PA25;

PA28; PA57; PA69; PB07; PB12 (2 thìa); PB32; PC11; PC20; PC55 (2 thìa);
M[20C]-2938:PA11; PA13; PA14; PA15; PA18; PA21; PA23; PA28 (2 thìa);
PA33; PA57; PB07; PB12 (2 thìa); PB28; PB38; PB77; PC11; PC55; PC60;
M[20C]-2948:PA10; PA11; PA13; PA14; PA15; PA18; PA21; PA23; PA28;
PA57; PB07 (2 thìa); PB12; PB27; PC11 (2 thìa); PC20; PC23; PC55; PC67;
M[20C]-2951:PA12; PA13 (2 thìa); PA14; PA21; PA23; PA24; PA33; PA39;
PA67; PB01; PB07; PB12; PB77; PC20; PC27; PC33; PC49; PC52; PC60;
M[20C]-2952:PA12; PA13 (2 thìa); PA14; PA21; PA23; PA25; PA26; PA33;
PA37; PA67; PB01; PB07 (2 thìa); PB12; PC20; PC27; PC49; PC52; PC71;
M[20C]-2958:PA12; PA13; PA14; PA15; PA18; PA21; PA23 (2 thìa); PA28;
PA33; PA57; PB01; PB07 (2 thìa); PB12; PC11; PC20; PC27; PC52; PC55;
M[20C]-2822:PA11 (2 thìa); PA13 (2 thìa); PA20 (2 thìa); PA21; PA25; PA29;
PA30; PA33; PA35; PA75; PA83; PB12; PC11; PC20; PC33; PC51; PC60;
M[20C]-2824:PA11; PA13 (2 thìa); PA15; PA18; PA20 (2 thìa); PA21; PA25;
PA29; PA32; PA33; PA35; PA67; PA75; PB12; PC20; PC33; PC49; PC55;
M[20C]-2825:PA11; PA13 (2 thìa); PA14; PA20; PA21; PA22; PA25; PA29;
PA33 (2 thìa); PA35 (2 thìa); PA75; PB12; PB38; PB88; PC20; PC33; PC55;
M[20C]-2834:PA13 (2 thìa); PA15; PA18; PA20; PA21; PA22; PA25; PA29;
PA32 (2 thìa); PA34; PA67; PB12; PB88; PC20; PC33; PC49; PC55; PC98;
M[20C]-2835:PA13 (2 thìa); PA14; PA21; PA22 (2 thìa); PA25; PA29; PA32;
PA33; PA34; PA35; PB12; PB38; PB88 (2 thìa); PC20; PC33; PC55; PC98;
M[20C]-2848:PA12 (2 thìa); PA13 (2 thìa); PA18; PA21; PA24; PA28; PA33;
PA67; PB07; PB12; PC23 (2 thìa); PC37; PC49; PC52; PC55; PC67; PC97;
M[20C]-2862:PA11; PA13; PA20; PA21; PA22; PA30; PA83; PB12; PB28;
PB60; PC11 (2 thìa); PC20 (2 thìa); PC23; PC51; PC55; PC60 (2 thìa); PC74;
M[20C]-2864:PA13; PA15; PA18; PA20; PA21; PA22; PA32; PA67; PB12;
PB28; PB60; PC11; PC20 (2 thìa); PC23; PC49; PC55 (2 thìa); PC60; PC74;
M[20C]-2865:PA13; PA14; PA21; PA22 (2 thìa); PA33; PA35; PB12; PB28;
PB38; PB60; PB88; PC11; PC20 (2 thìa); PC23; PC55 (2 thìa); PC60; PC74;
M[20C]-2872:PA10; PA11 (2 thìa); PA13; PA20; PA21; PA30; PA35; PA57;
PA83; PB07; PB12; PB77; PC11; PC20 (2 thìa); PC23; PC51; PC60; PC71;
M[20C]-2874:PA10; PA11; PA13; PA15; PA18; PA20; PA21; PA32; PA35;

PA57; PA67; PB07; PB12; PB77; PC20 (2 thĩa); PC23; PC49; PC55; PC71;

M[20C]-2875:A10; A11; A13; A14; A21; A22; A33; A35; A35; A57; B07; B12; B38; B77; B88; C20 (2 thĩa); C23; C55; C71;

M[20C]-2882:PA13; PA14; PA21 (2 thĩa); PA25; PA26 (2 thĩa); PA28; PA29; PA37; PA39; PA67; PA75; PB07; PB12; PB36; PC49; PC55; PC60; PC71;

M[20C]-2891:PA11; PA13 (2 thĩa); PA21; PA24; PA39; PA39; PA67; PB02; PB07; PB12; PB77; PB99; PC14; PC20; PC33; PC49 (2 thĩa); PC60; PC98;

M[20C]-2892:PA11; PA13 (2 thĩa); PA21; PA25; PA26; PA37; PA39; PA67; PB02; PB07 (2 thĩa); PB12; PB99; PC14; PC20; PC49 (2 thĩa); PC71; PC98;

M[20C]-2901:PA10; PA11; PA13 (2 thĩa); PA21 (2 thĩa); PA24; PA25; PA39; PA67; PA69; PB12 (2 thĩa); PB32; PB77; PC20; PC33; PC49; PC55; PC60;

M[20C]-2902:PA10; PA11; PA13 (2 thĩa); PA21 (2 thĩa); PA25 (2 thĩa); PA26; PA37; PA67; PA69; PB07; PB12 (2 thĩa); PB32; PC20; PC49; PC55; PC71;

M[20C]-2904:PA10; PA11 (2 thĩa); PA13; PA21 (2 thĩa); PA25; PA28; PA39; PA69; PA70; PB02; PB12; PB32; PB99; PC20; PC55; PC71; PC97; PC98;

M[20C]-2905:PA10 (2 thĩa); PA11; PA13; PA21; PA25; PA29; PA57; PA67; PA69; PB07; PB12; PB28; PB32; PB77; PC11; PC20 (2 thĩa); PC52; PC55;

M[20C]-2906:PA10; PA11 (2 thĩa); PA13; PA18; PA21; PA25; PA57; PA67; PA69; PB02; PB12; PB32; PB38; PC11; PC20 (2 thĩa); PC27; PC52; PC55;

M[20C]-2907:PA10; PA11 (2 thĩa); PA13; PA14; PA21; PA24; PA25; PA29; PA69; PA83; PB12 (2 thĩa); PB32; PB60; PC11; PC20 (2 thĩa); PC51; PC55;

M[20C]-2909:A10 (2 thĩa); A11; A12; A13 (2 thĩa); A18; A21; A25; A26; A33; A39; A69; B12; B32; C20 (2 thĩa); C52; C55 (2 thĩa);

M[20C]-2911:PA13; PA21 (2 thĩa); PA24; PA26; PA27; PA39; PA67; PB07; PB12 (2 thĩa); PB33; PB77; PC20; PC24; PC33; PC41; PC49; PC60; PC71;

M[20C]-2912:PA13; A21 (2 thĩa); PA25; PA26 (2 thĩa); PA27; PA37; PA67; PB07 (2 thĩa); PB12 (2 thĩa); PB33; PC20; PC24; PC41; PC49; PC71 (2 thĩa);

M[20C]-2919:PA10; PA12; PA13; PA18; PA21; PA26 (2 thĩa); PA27; PA33; PA39; PB07; PB12; PB33; PC20 (2 thĩa); PC24; PC41; PC52; PC55; PC71;

M[20C]-2922:PA13; PA20; PA21 (2 thĩa); PA25; PA26; PA28; PA35; PA37; PA67 (2 thĩa); PB07; PB12 (2 thĩa); PC12; PC37; PC49; PC60; PC71; PC74;

M[20C]-2929:PA10; PA12; PA13; PA18; PA20; PA21; PA26; PA28; PA33;

PA35; PA39; PA67; PB12; PC12; PC20; PC37; PC52; PC55; PC60; PC74;

M[20C]-2932:PA11; PA13 (2 thìa); PA14; PA21; PA25; PA26; PA28; PA33;
PA37; PA67; PB07; PB12 (2 thìa); PB28; PB38; PB77; PC49; PC60; PC71;

M[20C]-2941:PA10; PA11; PA13 (2 thìa); PA14; PA21; PA24; PA39; PA67;
PB07; PB12; PB27; PB77; PC11; PC20; PC23; PC33; PC49; PC60; PC67;

M[20C]-2942:PA10; PA11; PA13 (2 thìa); PA14; PA21; PA25; PA26; PA37;
PA67; PB07 (2 thìa); PB12; PB27; PC11; PC20; PC23; PC49; PC67; PC71;

Bảng 10-4: Hiệu quả trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du và tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên 6 chủng *Staphylococcus aureus* đã thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý dựa trên sự kết hợp của danh mục 10-4 ở mức pha loãng 1:20.

	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
M[04C]-025	57%	18%
M[04C]-026	48%	16%
M[04C]-027	49%	18%
M[20C]-2898	60%	21%
M[20C]-2900	78%	32%
M[20C]-2903	48%	28%
M[20C]-2908	54%	15%
M[20C]-2938	70%	26%
M[20C]-2948	56%	22%
M[20C]-2951	47%	17%
M[20C]-2952	60%	19%
M[20C]-2958	53%	31%
M[20C]-2822	46%	38%
M[20C]-2824	60%	32%
M[20C]-2825	76%	38%
M[20C]-2834	55%	27%

	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
M[20C]-2872	59%	36%
M[20C]-2874	78%	39%
M[20C]-2875	83%	47%
M[20C]-2882	61%	28%
M[20C]-2891	70%	27%
M[20C]-2892	76%	39%
M[20C]-2901	59%	29%
M[20C]-2902	51%	30%
M[20C]-2904	62%	24%
M[20C]-2905	55%	37%
M[20C]-2906	59%	37%
M[20C]-2907	75%	41%
M[20C]-2909	82%	49%
M[20C]-2911	55%	30%
M[20C]-2912	59%	29%
M[20C]-2919	75%	48%

M[20C]-2835	64%	29%
M[20C]-2848	52%	29%
M[20C]-2862	46%	31%
M[20C]-2864	51%	29%
M[20C]-2865	56%	43%

M[20C]-2922	63%	32%
M[20C]-2929	54%	30%
M[20C]-2932	73%	39%
M[20C]-2941	63%	48%
M[20C]-2942	56%	34%

Ví dụ so sánh 4

Dưới dạng ví dụ so sánh, sáng chế nêu một số chiết xuất của các chế phẩm thảo dược chỉ chứa 1 loại thực vật trong số 3 loại thực vật: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21), *Arctostaphylos uva-ursi* (PB12) và chỉ 1 loại thực vật trong số 3 loại thực vật: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tinctoria* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07).

5 chế phẩm thảo dược có hàm lượng được nêu trong danh mục 10-5 được bào chế theo phương pháp 1 đã mô tả ở trên.

Danh mục 10-5 chiết xuất từ các chế phẩm thảo dược chứa các thực vật sau

M[20P]-318: PA15; PA21; PA34; PA35; PA82; PA83; PA85; PA92; PA96; PB03; PB07; PB26; PB30; PB36; PB79; PC11; PC49; PC91; PC92; PD10;

M[20P]-329: PA10; PA28; PA34; PA36; PA55; PA72; PA83; PA85; PA91; PB03; PB12; PB16; PB28; PB35; PB49; PB92; PC20; PC23; PC64; PC85;

M[20P]-333: PA04; PA05; PA13; PA16; PA22; PA39; PA51; PA55; PA57; PA72; PA82; PA92; PA98; PB05; PB20; PB36; PB43; PB74; PB77; PC37;

M[20P]-362: PA21; PA23; PA25; PA33; PA37; PA57; PA69; PA81; PA92; PB16; PB25; PB26; PB28; PB29; PB78; PC20; PC21; PC71; PC83; PD02;

M[20P]-513: PA12; PA14; PA14; PA20; PA20; PA21; PA22; PA33; PA35; PA52; PA57; PA69; PB00; PB32; PB38; PC24; PC37; PC52; PC55; PC67;

Các chế phẩm thảo dược chứa 20 loại bột thực vật được bào chế theo phương pháp A đã được mô tả ở trên.

Bắt đầu từ các chế phẩm thảo dược, các chiết xuất chứa nước (hoặc mẫu thử đã xử lý) tương ứng được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng 40mL nước chứa sucroza với nồng độ 100g/l để chiết bằng nước và bao gồm bước lắng gạn trước khi lọc.

Hoạt tính sinh học của mỗi mẫu thử đã xử lý được xác định theo phương pháp C

đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng các chủng *Staphylococcus aureus* sau: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213 và ATCC 14775, với mức pha loãng cuối 1:20 của mẫu thử đã xử lý.

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược của danh mục 10-4 được thể hiện trên Bảng 10-5. Mỗi tỷ lệ phần trăm là giá trị trung bình của 2 phép đo của cùng điều kiện trong hai giếng khác nhau. Tỷ lệ phần trăm âm tính phản ánh sự thúc đẩy phát triển và sự thúc đẩy màng sinh học, thay vì sự ức chế mong muốn. Đã nhận thấy rằng các chiết xuất này tạo ra sự ức chế rất kém, nếu có sự ức chế bất kỳ khi so sánh với chiết xuất của ví dụ 10.

Bảng 10-5: Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du và mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế tạo màng sinh học trên toàn bộ các chủng thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý thu được từ các chế phẩm thảo dược của danh mục 10-4.

	Ức chế phát triển sinh vật phù du	Ức chế tạo màng sinh học
M[20C]-318	-10%	0%
M[20C]-329	12%	9%
M[20C]-333	3%	18%
M[20C]-362	22%	3%
M[20C]-513	-21%	21%

Ví dụ 11

Ví dụ này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật đối với 14 loại vi khuẩn khác nhau được mô tả trong Bảng 11-1 của 10 chiết xuất hỗn hợp thu được từ các chế phẩm thảo dược được mô tả trong danh mục 11-1 bao gồm ít nhất 2 loại thực vật trong số 3 loại thực vật: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21), *Arctostaphylos uva-ursi* (PB12) và ít nhất 1 loại thực vật trong số 3 loại thực vật: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tinctorial* (PA22), và *Desmodium adscendens* (PB07).

Bảng 11-1: Các loại vi khuẩn và chủng được sử dụng trong Ví dụ 11

Tên đầy đủ của chủng	Mã	Nồng độ
----------------------	----	---------

	chủng	cấy (vi khuẩn/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (MRSA) ATCC® 33592™	B-A49	2,10 ^{5,5}
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 14990™	B-A08	2,10 ⁵
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> ATCC® 49444™	B-A09	2,10 ⁵
<i>Candida albicans</i> ATCC® 60193™	B-A61	2,10 ^{6,5}
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 11775™	B-A67	2,10 ^{5,5}
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 13883™	B-A68	2,10 ^{5,5}
<i>Listeria innocua</i> ATCC® 33090™	B-A69	2,10 ^{5,5}
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19115™	B-A70	2,10 ^{5,5}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853™	B-A71	2,10 ^{5,5}
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis ATCC® 13076™	B-A72	2,10 ^{5,5}
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC® 13311™	B-A73	2,10 ^{5,5}
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 27336™	B-A75	2,10 ^{5,5}
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC® 43079™	B-A77	2,10 ^{5,5}
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC® BAA-1323™	B-B26	2,10 ^{6,5}

Danh mục 11-1: Chiết xuất từ các chế phẩm thảo dược chứa: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21) và ít nhất 1 trong số 3 loại thực vật: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tinctoria* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07) sử dụng trong Ví dụ-11:

M[20P]-297: PA10; PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA29; PA33; PA57; PA67; PA69; PB07; PB12; PB60; PC20; PC37; PC49; PC98;

M[20P]-416: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;

M[20P]-418: PA10; PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA23; PA24; PA26; PA39; PB07; PB12; PB38; PC11; PC12; PC20; PC23; PC24; PC49; PC55;

M[20P]-527: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23;

PA26 (3 thìa); PA33; PB08; PB12 (2 thìa); PB60; PB88; PC12; PC20;

M[20P]-557: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12 (4 thìa); PC11 (2 thìa); PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;

M[20P]-573: PA10; PA11; PA13 (3 thìa); PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;

M[20P]-576: PA11 (2 thìa); PA12; PA13 (3 thìa); PA14 (2 thìa); PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;

M[19P]-576: PA11 (2 thìa); PA12; PA13 (3 thìa); PA14 (2 thìa); PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37 ;

M[5P]-1: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12;

M[5P]-2: PA11; PA13; PA21; PA22; PB12;

Đối với các hỗn hợp M[5P]-1, M[5P]-2 và M[19P]-576, thực vật khô loại được dụng thu được từ “Herboristerie Cailleau” (Chemillé, Pháp). Đối với các hỗn hợp khác, thực vật khô loại được dụng thu được từ “Pharmacie Fontgiève” (Clermont-Ferrand, Pháp, thực vật PA00 đến PB12) và “Pharmacie St Herem” (Clermont-Ferrand, Pháp, thực vật PB13 đến PD02).

Tất cả các chế phẩm thảo dược gồm 20 loại thực vật được bào chế theo phương pháp A đã được mô tả ở trên.

Bắt đầu từ các chế phẩm thảo dược, các chiết xuất chứa nước (hoặc mẫu thử đã xử lý) tương ứng được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên sử dụng 40mL nước chứa sucroza với nồng độ 100g/l để chiết bằng nước và bao gồm bước lắng gạn trước khi lọc.

Các chế phẩm thảo dược M[19P]-576, M[5P]-1 và M[5P]-2 được bào chế bằng cách cân mỗi thảo dược khô như được thể hiện trên Bảng 11-2

Bảng 11-2: Khối lượng của thực vật khô (mg) sử dụng trong các chế phẩm thảo dược của M[19P]-576, M[5P]-1 và M[5P]-2 được sử dụng trong Ví dụ-11

	PA11	PA12	PA13	PA14	PA20	PA21	PA22	PA29	PA39	PB12	PB60	PC20	PC26	PC33	PC37
M[19P]-576	409	145	573	316	277	271	207	380	207	247	206	236	198	187	154
M[5P]-1		903	1574			2237	1263			2022					
M[5P]-2	756		720			1027	577			925					

Bắt đầu từ các chế phẩm thảo dược, các chiết xuất chứa nước (hoặc mẫu thử đã

xử lý) tương ứng được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng lần lượt 30mL, 40mL và 40mL nước không có sucroza lần lượt với M[19P]-576, M[5P]-1 và M[5P]2, để chiết bằng nước và bao gồm bước lắng gạn trước khi lọc.

Hoạt tính sinh học của mỗi mẫu thử đã xử lý được xác định theo phương pháp C đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng các chủng sau ở các mức pha loãng cuối đã thể hiện của mẫu thử đã xử lý được thể hiện trên Bảng 11-3.

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển vi khuẩn sinh vật phù du được thể hiện trên Bảng 11-3.

Bảng 11-3: Tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển sinh vật phù du trên 14 chủng vi khuẩn thử nghiệm của mẫu thử đã xử lý của chế phẩm được mô tả trong danh mục 11-1

	M[20C]	M[20C]	M[20C]	M[20C]	M[20C]	M[20C]	M[20C]	M[19C]	M[5P]	M[5P]
	-297	-416	-418	-527	-557	-573	-576	-576	-1	-2
Mức pha loãng	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:20	1:20	1:20
B-A49	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B-A08	100%	99%	100%	100%	100%	98%	98%	100%	100%	100%
B-A09	89%	97%	98%	99%	99%	100%	100%	100%	100%	100%
B-A61	25%	69%	36%	45%	51%	55%	90%	ND	ND	ND
B-A67	45%	52%	59%	66%	62%	52%	39%	34%	55%	38%
B-A68	100%	97%	100%	100%	100%	94%	92%	100%	100%	100%
B-A69	-1%	21%	21%	38%	30%	30%	-1%	38%	100%	38%
B-A70	39%	52%	53%	74%	54%	57%	32%	34%	100%	40%
B-A71	63%	71%	69%	75%	75%	82%	71%	42%	100%	55%
B-A72	47%	53%	59%	63%	58%	58%	32%	39%	62%	42%
B-A73	59%	59%	59%	71%	72%	58%	32%	42%	100%	45%
B-A75	51%	52%	63%	71%	63%	57%	31%	ND	ND	ND
B-A77	40%	47%	64%	68%	59%	58%	40%	100%	100%	100%
B-B26	58%	64%	72%	70%	74%	42%	93%	ND	ND	ND

Lưu ý: "ND" là "không xác định"

Ví dụ 12

Ví dụ này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật của hỗn hợp thực vật trong đó bước chiết được thực hiện bằng dung môi không chứa nước như axeton, etyl-axetat, etanol, được sử dụng một mình hoặc dưới dạng hỗn hợp hai thành phần như được thể hiện trên Bảng 12-1. Sự so sánh với nước được thực hiện.

Bảng 12-1: Chế phẩm của hỗn hợp hai thành phần sử dụng trong Ví dụ 12 để chiết không chứa nước

A)	Tên dung môi hai thành phần	Tỷ lệ axeton với etanol	B)	Tên dung môi hai thành phần	Tỷ lệ etyl-axetat với etanol	C)	Tên dung môi hai thành phần	Tỷ lệ etyl-axetat với axeton
	AC9ET1	90/10		EA9ET1	90/10		EA9AC1	90/10
	AC8ET2	80/20		EA8ET2	80/20		EA8AC2	80/20
	AC7ET3	70/30		EA7ET3	70/30		EA7AC3	70/30
	AC6ET4	60/40		EA6ET4	60/40		EA6AC4	60/40
	AC5ET5	50/50		EA5ET5	50/50		EA5AC5	50/50
	AC4ET6	40/60		EA4ET6	40/60		EA4AC6	40/60
	AC3ET7	30/70		EA3ET7	30/70		EA3AC7	30/70
	AC2ET8	20/80		EA2ET8	20/80		EA2AC8	20/80
	AC1ET9	10/90		EA1ET9	10/90		EA1AC9	10/90

Hỗn hợp thực vật khô M[20P]-576 được tạo theo Bảng 12-2 sau và được đưa vào lọ 500mL và được trộn kỹ bằng cách búng và lắc bằng tay. Thảo dược khô thu được từ “Herboristerie Cailleau” (Chemillé, Pháp), ngoại trừ PC49 thu được từ Siccarapam (Aubiat, Pháp).

Bảng 12-2: Danh mục thực vật khô tạo ra M[20P]-576 được sử dụng trong Ví dụ 12

Thực vật khô	PA1 1	PA1 2	PA1 3	PA1 4	PA2 0	PA2 1	PA2 2	PA2 9	PA3 9	PB1 2	PB6 0	PC2 0	PC2 6	PC3 3	PC3 7	PC4 9
Khối lượng (g)	29,7	10,5	41,5	22,9	19,8	19,9	15,0	27,5	15,0	17,8	15,0	17,1	14,4	13,6	11,3	9,3

[illegible]

Đối với mỗi dung môi thử nghiệm, 5g hỗn hợp thực vật khô được đưa vào lọ màu 100ml (Schott, Đức) có thanh từ và 50ml dung môi được bổ sung. Huyền phù lỏng được khuấy bằng bộ phận khuấy từ (RO 15P IKA, Đức) ở tốc độ tối đa trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng. Mỗi huyền phù/dung dịch được lọc bởi trọng lực bằng cách sử dụng bộ lọc gấp 250mm (J025106, Prats Dumas, Pháp) được bố trí trên phễu thủy tinh (Schott, Đức) được bố trí bản thân nó trong bình bay hơi. Bình chứa chất lỏng mà đi qua bộ lọc được bố trí trên thiết bị làm bay hơi ở chân không dạng quay (Rotavapor® R205 + V800 bộ điều khiển chân không, Büchi, Thụy Sĩ) và sự bay hơi được thực hiện ở 35°C với chân không được điều chỉnh để thấp hơn điểm sôi của dung môi, cho đến khi tất cả dung môi đã bay hơi. Vật liệu còn lại được cân và được hòa tan trong DMSO (Acros organic, Hoa Kỳ) ở mức 10g/L để tạo ra hỗn hợp được chiết.

Hai chiết xuất chứa nước được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên, trong đó các thìa thực vật khô được thay thế bằng 2g M[20P]-576 hỗn hợp thực vật khô của ví dụ 12, bằng cách sử dụng 40mL nước để chiết bằng nước và bao gồm bước lắng gạn trước khi lọc. Lượng cặn khô của một trong số các chiết xuất hỗn hợp thực vật đã được xác định bằng cách cân cặn đông khô thu được bằng thiết bị đông khô (FreeZone™ 2,5, Labconco Hoa Kỳ, với RZ6 Vacuubrand, Đức) của chiết xuất đóng băng.

Lượng cặn khô còn lại này được sử dụng để suy ra các hoạt tính cụ thể của các chiết xuất khác nhau.

Hoạt tính sinh học của mỗi hỗn hợp chiết được xác định theo phương pháp C đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng các chủng thể hiện trên Bảng 12-3, trong đó mức pha loãng của hỗn hợp được chiết là: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được nhận thấy bằng cách quan sát bằng mắt các giếng khi nồng độ thấp nhất trong đó không quan sát thấy sự phát triển.

Bảng 12-3: Danh mục của các chủng vi khuẩn được sử dụng trong Ví dụ 12

Staphylococcus aureus		Staphylococcus epidermidis	
NCTC 12493™	B-A47	ATCC® 12228™	B-A22
ATCC® 33591™	B-A48	ATCC® 700296™	B-A23

ATCC® 33592™	B-A49	ATCC® 49461™	B-A24
NCTC 43300™	B-A51	ATCC® 14990™	B-A08

Các kết quả thể hiện trên các bảng 12-4 đối với các dung môi khác nhau.

Bảng 12-4: CMI theo mg/L hỗn hợp được chiết bằng cách sử dụng, A) axeton, etanol-axetat, etanol và nước làm dung môi, B), các tỷ lệ khác nhau của axeton và etanol dưới dạng dung môi hai thành phần như được thể hiện trên Bảng 12-2-A, C) các tỷ lệ khác nhau của etanol-axetat và etanol dưới dạng dung môi hai thành phần như được thể hiện trên Bảng 12-2-B, và D) sử dụng các tỷ lệ khác nhau của etanol-axetat và axeton làm dung môi hai thành phần như được thể hiện trên Bảng 12-2-C.

A)	Axeton	Etanol-Axetat	Etanol	Nước					
B-A47	500	500	500	725					
B-A48	500	500	500	725					
B-A49	500	500	500	725					
B-A51	500	500	500	725					
B-A22	250	250	250	363					
B-A23	250	250	250	363					
B-A24	250	250	250	363					
B-A08	250	250	250	725					

B)	AC9E T1	AC8E T2	AC7E T3	AC6E T4	AC5E T5	AC4E T6	AC3E T7	AC2E T8	AC1E T9
B-A47	500	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A48	250	250	250	250	250	500	500	500	500
B-A49	250	250	250	250	250	500	500	500	500
B-A51	500	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A22	250	250	250	250	250	250	250	250	250

B-A23	250	125	125	125	125	250	250	250	250
B-A24	250	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A08	250	250	250	250	250	250	250	250	250

C)	EA9E T1	EA8E T2	EA7E T3	EA6E T4	EA5E T5	EA4E T6	EA3E T7	EA2E T8	EA1E T9
B-A47	500	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A48	250	250	250	250	250	500	500	500	500
B-A49	250	250	250	250	250	500	500	500	500
B-A51	250	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A22	250	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A23	250	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A24	250	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A08	250	250	250	250	250	250	250	250	250

D)	EA9A C1	EA8A C2	EA7A C3	EA6A C4	EA5A C5	EA4A C6	EA3A C7	EA2A C8	EA1A C9
B-A47	500	500	500	500	500	500	500	500	500
B-	500	500	500	500	500	500	500	500	500

A48									
B-A49	500	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A51	500	500	500	500	500	500	500	500	500
B-A22	500	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A23	500	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A24	500	250	250	250	250	250	250	250	250
B-A08	500	500	250	250	250	250	250	250	250

Ví dụ 13

Ví dụ này thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật của hỗn hợp thực vật được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên, trong đó cacbohydrat bổ sung được chọn trong số sucroza, dextroza, maltoza và galactoza.

Hỗn hợp thực vật khô M[19P]-576, M[5P]-1 và M[5P]-2 được tạo ra theo Bảng 13-1 và được đưa vào lọ 500mL và được trộn kỹ bằng cách búng và lắc bằng tay. Thảo dược khô có được từ “Herboristerie Cailleau” (Chemillé, Pháp), ngoại trừ PC49 mà có được từ Siccarapam (Aubiat, Pháp).

Bảng 13-1: Danh mục thực vật khô tạo ra: A) hỗn hợp M[20P]-576, B) M[5P]-1 hỗn hợp và C), M[5P]-2 hỗn hợp sử dụng trong Ví dụ 13

A)

Thực vật khô	PA1 1	PA1 2	PA1 3	PA1 4	PA2 0	PA2 1	PA2 2	PA2 9	PA3 9	PB1 2	PB6 0	PC2 0	PC2 6	PC3 3	PC3 7	PC4 9
Khối lượng g (g)	29,7	10,5	41,5	22,9	19,8	19,9	15,0	27,5	15,0	17,8	15,0	17,1	14,4	13,6	11,3	9,3

B)						C)					
Thực vật khô	PA12	PA13	PA21	PA22	PB12	Thực vật khô	PA11	PA13	PA21	PA22	PB12
Khối lượng (g)	34,1	59,2	84,1	47,5	75,8	Khối lượng (g)	56,9	54	76,9	43,4	69,4

Đối với mỗi hỗn hợp thực vật khô, các chiết xuất được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên, trong đó các thìa thực vật khô được thay thế bằng 2g hỗn hợp thực vật của ví dụ 13, bằng cách sử dụng 40mL nước và lượng cacbohydrat thể hiện trên Bảng 13-3 để chiết bằng nước và bao gồm bước lắng gạn trước khi lọc.

Lượng cặn khô của các hỗn hợp thực vật không có cacbohydrat được xác định riêng biệt, bằng cách cân cặn đông khô thu được bằng thiết bị đông khô (FreeZone™ 2,5, Labconco Hoa Kỳ, với RZ6 Vacuubrand, Đức) của 40mL chiết xuất đóng băng được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên, trong đó các thìa thực vật khô được thay thế bằng 2g hỗn hợp thực vật của ví dụ 13, sử dụng 40mL nước để chiết bằng nước và bao gồm bước lắng gạn trước khi lọc. Các lượng cặn khô này được sử dụng để suy ra các hoạt tính cụ thể của các chiết xuất khác nhau, trong đó cacbohydrat được xem là chất phụ trợ và không được tính đến dưới dạng một phần của thành phần hoạt tính.

Hoạt tính sinh học của mỗi hỗn hợp chiết được xác định theo phương pháp C đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng các chủng nêu trong Bảng 13-2, trong đó mức pha loãng của hỗn hợp được chiết là: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được lưu ý bằng cách quan sát bằng mắt các giếng dưới dạng nồng độ thấp nhất trong đó không quan sát thấy sự phát triển.

Bảng 13-2: Danh mục của các chủng vi khuẩn sử dụng trong Ví dụ 13

Staphylococcus aureus		Staphylococcus epidermidis	
NCTC 12493™	B-A47	ATCC® 12228™	B-A22
ATCC® 33591™	B-A48	ATCC® 700296™	B-A23
ATCC® 33592™	B-A49	ATCC® 49461™	B-A24
NCTC 43300™	B-A51	ATCC® 14990™	B-A08

Các kết quả được thể hiện trên Bảng 13-4.

Bảng 13-3: MIC theo mg/L của hỗn hợp được chiết sử dụng sucroza, lactoza, dextroza, maltoza hoặc galactoza cho: A) hỗn hợp M[20P]-576, B) hỗn hợp M[5P]-1 và C), hỗn hợp M[5P]-2

A)	Sucroza	Lactoza			Dextroza			Maltoza			Galactoza		
M[20P]-576	100g/ L	100g/ L	50g/ L	25g/ L	100g/ L	50g/ L	25g/ L	100g/ L	50g/ L	25g/ L	100g/ L	50g/ L	25g/ L
B-A47	725	>725	>725	725	>725	>725	>725	>725	725	725	725	725	725
B-A48	725	>725	>725	725	>725	>725	>725	725	725	725	725	725	725
B-A49	725	>725	>725	725	>725	>725	>725	725	725	725	725	725	725
B-A51	725	>725	>725	725	>725	>725	>725	725	725	725	725	725	725
B-A22	363	725	725	725	725	725	363	363	363	363	363	363	363
B-A23	363	725	725	363	725	725	363	363	363	363	363	363	363
B-A24	363	725	725	725	725	725	363	363	363	363	363	363	363
B-A08	725	725	725	725	725	725	725	363	363	363	363	363	363

B)	Sucroza	Lactoza			Dextroza			Maltoza			Galactoza		
M[5P]-1	100g/ L	100g/ L	50g/ L	25g/ L	100g/ L	50g/ L	25g/ L	100g/ L	50g/ L	25g/ L	100g/ L	50g/ L	25g/ L
B-A47	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327
B-A48	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327
B-A49	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	653
B-A47	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327
B-A22	327	327	327	327	327	327	327	163	163	163	163	327	327
B-A23	163	163	327	163	163	163	327	163	163	163	163	327	163
B-A24	327	327	327	327	327	327	327	163	163	163	163	327	163
B-A08	327	327	327	327	327	327	327	163	327	327	163	327	327

C)	Sucroza	Lactoza			Dextroza			Maltoza			Galactoza		
M[5P]-2	100g/ L	100g/ L	50g/ L	25g/ L	100g/ L	50g/ L	25g/ L	100g/ L	50g/ L	25g/ L	100g/ L	50g/ L	25g/ L
B-A47	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	688
B-A48	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344
B-A49	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	688
B-A51	344	344	344	344	344	344	344	688	344	688	344	344	688
B-A22	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344
B-A23	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344
B-A24	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344
B-A08	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344

Ví dụ 14

Ví dụ này thể hiện sự tăng cường hoạt tính kháng vi sinh vật của M[20P]-576 chiết xuất hỗn hợp thảo dược đối với các chất kháng sinh được sử dụng thông thường.

Bảng 14-1: Các loại và chủng vi khuẩn được sử dụng trong Ví dụ 14

Tên đầy đủ của chủng		Mã chủng
Staphylococcus aureus subsp. aureus	ATCC® 25923™	B-A17
Staphylococcus aureus subsp. aureus	ATCC® 29213™	B-A21

Danh mục 14-1: Các chế phẩm thảo dược của mẫu thử đã xử lý được sử dụng trong Ví dụ 14:

M[19P]-576: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37.

Thực vật khô loại được dụng thu được từ “Herboristerie Cailleau” (Chemillé, Pháp).

Các chế phẩm thảo dược M[19P]-576 được bào chế bằng cách cân mỗi thảo dược khô như được thể hiện trên Bảng 14-2

Bảng 14-2: Khối lượng của thực vật khô (mg) sử dụng trong các chế phẩm thảo dược của M[19P]-576

	PA11	PA12	PA13	PA14	PA20	PA21	PA22	PA29	PA39	PB12	PB60	PC20	PC26	PC33	PC37
M[19P]-576	409	145	573	316	277	271	207	380	207	247	206	236	198	187	154

Bắt đầu từ chế phẩm thảo dược, chiết xuất chứa nước (hoặc mẫu thử đã xử lý) tương ứng được điều chế theo phương pháp B đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng 2,06g chế phẩm thảo dược nêu trên với 40mL nước với 100g/L sucroza để chiết bằng nước và bao gồm bước lắng gạn trước khi lọc. Trong sản phẩm chiết xuất chứa nước độc lập không có sucroza, đã đo được là 2,06g/40mL chế phẩm thảo dược tương ứng với 14,5g/L khi được suy ra từ khối lượng của chiết xuất thảo dược khô đã làm đông khô.

Hoạt tính sinh học của mỗi mẫu thử đã xử lý được xác định theo phương pháp C đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng các chủng sau đây ở các mức pha loãng cuối đã thể hiện của mẫu thử đã xử lý được thể hiện trên Bảng 14-3. Ví dụ 14 tính mức phát triển của vi khuẩn với sự có mặt của chất kháng sinh và/hoặc hỗn hợp thảo dược so với sự phát triển khi không có cả chất kháng sinh và chiết xuất hỗn hợp thảo dược.

Mức trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế phát triển vi khuẩn sinh vật phù du được thể hiện trên Bảng 14-3.

Phải lưu ý rằng sự có mặt của chiết xuất thảo dược M[19P]-576 có ba tác dụng ở nồng độ sử dụng: 1) làm giảm sự phát triển của vi khuẩn ở nồng độ thấp và không có chất kháng sinh, 2) giảm sự tăng mức phát triển vi khuẩn gây ra bởi nồng độ chất kháng sinh thấp so với phát triển khi không có các chất kháng sinh, và 3) giảm nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), lần lượt của, vancomyxin đối với B-A17 và ampicillin và penixilin đối với B-A21, ở M[20C]-576 nồng độ bắt đầu ở lần lượt ở 90,6µg/mL, 181,3µg/mL, và 90,6µg/mL.

Bảng 14-3: Sự phát triển sinh vật phù du với sự có mặt của các nồng độ chiết xuất khác nhau và nồng độ chất kháng sinh khác nhau đối với phát triển của vi khuẩn khi không có cả chiết xuất lẫn chất kháng sinh, trên hai chủng khác nhau

Chủng	M[20C]-576	Nồng độ chất kháng sinh (µg/mL)
-------	------------	---------------------------------

		(µg/mL)	0	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50	125	250	500	1000	2000	4000
Ampixilin	B-A17	0	100%	176%	176%	148%	131%	112%	2%	0%	0%	0%	0%	-1%
		90,6	57%	64%	76%	75%	58%	18%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
		181,3	54%	52%	53%	52%	31%	7%	-4%	-4%	-4%	-4%	-5%	-1%
	B-A21	0	100%	153%	132%	131%	132%	116%	150%	113%	112%	106%	-1%	0%
		90,6	64%	108%	83%	82%	82%	74%	83%	75%	83%	0%	0%	0%
		181,3	42%	44%	63%	70%	69%	70%	62%	62%	61%	-2%	-3%	-2%
Penixilin	B-A17	0	100%	137%	138%	3%	1%	0%	-1%	0%	0%	0%	0%	0%
		90,6	53%	39%	25%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
		181,3	51%	23%	5%	-3%	-3%	-3%	-3%	-2%	-3%	-4%	-4%	-2%
	B-A21	0	100%	135%	116%	115%	113%	108%	106%	101%	0%	0%	0%	0%
		90,6	65%	104%	83%	83%	84%	80%	74%	26%	0%	0%	0%	0%
		181,3	44%	62%	43%	70%	61%	60%	45%	-3%	-3%	-3%	-3%	-3%
Vancomyxin	B-A17	0	100%	135%	118%	114%	117%	115%	116%	118%	128%	117%	0%	0%
		90,6	62%	65%	66%	65%	74%	70%	67%	66%	63%	0%	0%	0%
		181,3	42%	40%	41%	53%	55%	55%	54%	46%	47%	-3%	-3%	-2%
	B-A21	0	100%	118%	117%	113%	117%	110%	102%	102%	102%	0%	0%	0%
		90,6	45%	102%	82%	88%	77%	76%	77%	74%	67%	0%	0%	0%
		181,3	58%	48%	63%	57%	60%	57%	41%	57%	32%	-2%	-3%	0%

Ví dụ 15

Ví dụ này thể hiện cách làm thích ứng nhiệt độ trong phương pháp B để giải quyết sức ép công nghiệp.

Thực vật khô loại hữu cơ thu được từ “Herboristerie Cailleau” (Chemillé, Pháp).

Các chế phẩm thảo dược M[5P]-1 được bào chế bằng cách cân mỗi loại thảo dược khô như được thể hiện trên Bảng 15-1

Bảng 15-1: Cân thực vật khô (mg) sử dụng trong các chế phẩm thảo dược của M[5P]-1

	PA12	PA13	PA21	PA22	PB12
M[5P]-1	395,2	688,8	978,9	552,5	884,6

Chiết xuất thứ nhất M[5P]-1-A được điều chế bằng cách kết hợp 120g chế phẩm thảo dược trong 600 mL nước chứa trong cốc có mỏ 2L (Schott, Đức). Chiết xuất thứ hai M[5P]-1-B được điều chế bằng cách cho 120g chế phẩm thảo dược vào túi sợi bông loại hữu cơ kích cỡ 25x30cm (Ecobags, Hoa Kỳ), và túi đã nạp được cho vào 600mL nước chứa trong cốc có mỏ 2L (Schott, Đức). Chiết xuất thứ ba M[5P]-1-C được điều chế bằng cách cho 60g chế phẩm thảo dược vào túi sợi bông loại hữu cơ kích cỡ 25x30cm (Ecobags, Hoa Kỳ), và hai túi đã nạp được cho vào 600mL nước chứa trong một cốc có mỏ 2L (Schott, Đức). Lần lượt mỗi chế phẩm M[5P]-1-A, M[5P]-1-B và M[5P]-1-C, được để ngâm trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng và tiếp đó được đưa trong cốc có mỏ của nó vào tủ hấp (VWR Vapour Line Eco 25, Hoa Kỳ) trong 30 phút lần lượt ở 121°C, 121°C và 134°C. Đối với mỗi trong số M[5P]-1-B và M[5P]-1-C, các túi sợi bông được ép bằng cách sử dụng máy ép hoa quả 5 L vận hành thủ công (Brouwland, Bỉ) và chất lỏng thu hồi được đưa trở lại trong cốc có mỏ 2L. Mỗi cốc có mỏ được để lắng gạn và lượng cần thiết của chất lỏng nổi lên trên được sử dụng để đo hoạt tính sinh học của nó.

Bảng 15-2: Các loại và chủng vi khuẩn được sử dụng trong Ví dụ 15

Tên đầy đủ của chủng		Mã chủng
Staphylococcus aureus subsp. aureus	ATCC® 25923™	B-A17
Staphylococcus aureus subsp. aureus	ATCC® 29213™	B-A21
Staphylococcus aureus subsp. aureus	ATCC® 33592™	B-A49

Hoạt tính sinh học của mỗi mẫu thử đã xử lý được xác định theo phương pháp C đã được mô tả ở trên bằng cách sử dụng các chủng liệt kê trên Bảng 15-2 ở các mức pha loãng cuối gồm 1:40, 1:80, 1:160 và 1:320. Mức pha loãng tương ứng với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được nhận thấy bằng cách quan sát bằng mắt các giếng dưới dạng nồng độ thấp nhất trong đó không thấy sự phát triển và được nêu trong Bảng 15-3.

Bảng 15-3: Mức pha loãng tương ứng với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các chiết xuất được thực hiện với các chi tiết công nghiệp và nhiệt độ khác nhau

	M[5P]-1-A ở 121°	M[5P]-1-B ở 121°	M[5P]-1-C ở 134°C
B-A17	1/80	1/40	1/80
B-A21	1/80	1/40	1/80
B-A49	1/80	1/40	1/160

Lưu ý rằng việc đưa túi sợi bông vào để làm dễ dàng cho quy trình công nghiệp làm giảm nhẹ một chút hoạt tính của chiết xuất khi so sánh với quy trình không thỏa mãn không có túi. Việc tăng nhiệt độ của nồi hấp trong quá trình giai đoạn chiết nóng cho phép khôi phục hoạt tính đầy đủ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chiết xuất của chế phẩm thảo dược, bao gồm ít nhất hai loại thực vật khô được chọn từ *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* và *Arctostaphylos uva-ursi* và ít nhất một loại thực vật được chọn từ *Vitis vinifera* var. *tinctoria*, *Eugenia caryophyllus* và *Desmodium adscendens*.

2. Chiết xuất theo điểm 1, trong đó chế phẩm thảo dược còn bao gồm một hoặc nhiều loại thực vật khô bổ sung được chọn từ: *Achillea millefolium*, *Acorus calamus*, *Agrimonia eupatoria*, *Agropyrum repens*, *Agropyrum repens*, *Alchemilla vulgaris*, *Alkanna tinctoria*, *Althaea officinalis*, *Anethum graveolens*, *Angelica archangelica*, *Arbutus unedo*, *Arnica montana*, *Artemisia pontica*, *Artemisia vulgaris*, *Asparagus officinalis*, *Asparagus officinalis*, *Asperula odorata*, *Betula pendula*, *Borrago officinalis*, *Buxus sempervirens*, *Calamintha officinalis*, *Calendula officinalis*, *Calluna vulgaris*, *Carum carvi*, *Cassia angustifolia*, *Centaurea cyanus*, *Centaureum erythraea*, *Centella asiatica*, *Cetraria islandica*, *Chamaemelum nobile*, *Chamomilla recutita*, *Chrysanthellum americanum*, *Cichorium endivia*, *Cichorium intybus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus aurantium*, *Combretum micranthum*, *Crataegus oxyacantha*, *Cuminum cyminum*, *Cupressus sempervirens*, *Curcuma zedoaria*, *Cynara scolymus*, *Cytisus scoparius*, *Desmodium adscendens*, *Elettaria cardamomum*, *Eleutherococcus senticosus*, *Epilobium parviflorum*, *Erysimum officinale*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Eupatorium cannabinum*, *Foeniculum vulgare*, *Fraxinus excelsior*, *Fucus vesiculosus*, *Fumaria officinalis*, *Galium odoratum*, *Gentiana lutea*, *Geranium robertianum*, *Ginkgo biloba*, *Glechoma hederacea*, *Glycyrrhiza glabra*, *Handroanthus impetiginosus*, *Harpagophytum procumbens*, *Hieracium pilosella*, *Humulus lupulus*, *Hypericum perforatum*, *Hyssopus officinalis*, *Illicium verum*, *Inula helenium*, *Juglans regia*, *Juniperus communis*, *Lamium album*, *Lavandula angustifolia*, *Levisticum officinale*, *Lippia citriodora*, *Lotus corniculatus*, *Lythrum salicaria*, *Malva sylvestris*, *Marrubium vulgare*, *Medicago sativa*, *Melissa officinalis*, *Mentha × piperita*, *Morus nigra*, *Myrtus communis*, *Olea europaea*, *Origanum majorana*, *Panax ginseng*, *Papaver rhoeas*, *Parietaria officinalis*, *Passiflora incarnata*, *Petroselinum crispum*, *Peumus boldus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pimpinella anisum*, *Plantago lanceolata*, *Plantago ovata*,

Potentilla anserina, *Quercus robur*, *Rhamnus frangula*, *Rheum palmatum*, *Rosa centifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Rubia tinctorum*, *Rubus idaeus*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Sambucus nigra*, *Satureja montana*, *Silybum marianum*, *Solanum dulcamara*, *Tabebuia impetiginosa*, *Tanacetum vulgare*, *Taraxacum officinalis*, *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris*, *Tilia tomentosa*, *Tilia cordata*, *Trigonella foenum-graecum*, *Tussilago farfara*, *Vaccinium myrtillus*, *Valeriana officinalis*, *Verbascum thapsus*, *Verbena officinalis*, *Viscum album*, *Zea mays* và *Zingiber officinale*.

3. Chiết xuất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm thảo dược bao gồm từ ba đến bảy loại thực vật khô được chọn từ *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Desmodium adscendes*, *Eugenia caryophyllus* và *Eucalyptus globulus*, trong đó ít nhất hai trong số các loại thực vật này được chọn từ *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* và *Arctostaphylos uva-ursi* và ít nhất một trong số các loại thực vật này được chọn từ *Vitis vinifera tinctoria*, *Desmodium adscendes* và *Eugenia caryophyllus*.

4. Chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm thảo dược bao gồm các loại thực vật khô sau: *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria* và *Arctostaphylos uva-ursi*.

5. Chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó chế phẩm thảo dược bao gồm các loại thực vật khô sau: *Rheum palmatum*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria* và *Arctostaphylos uva-ursi*.

6. Chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó chế phẩm thảo dược bao gồm các loại thực vật khô sau: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Eugenia caryophyllus* và *Arctostaphylos uva-ursi*.

7. Chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chế phẩm thảo dược bao gồm các loại thực vật khô sau: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Eucalyptus globulus*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Mentha spicata* và *Rubia tinctorium*.

8. Chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó chế phẩm

thảo dược bao gồm ít nhất mười bốn hoặc mười lăm loại thực vật khô được chọn từ mười sáu loại thực vật sau: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Satureja montana*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Fucus vesiculosus*, *Foeniculum vulgare*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arbutus unedo*, *Eugenia caryophyllus*, *Juniperus communis*, *Combretum micranthum*, *Lippia citrodora* và *Tanacetum vulgare*.

9. Chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó chế phẩm thảo dược bao gồm các loại thực vật khô sau: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Satureja montana*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Fucus vesiculosus*, *Foeniculum vulgare*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arbutus unedo*, *Eugenia caryophyllus*, *Juniperus communis*, *Combretum micranthum* và *Lippia citrodora*.

10. Chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó chế phẩm thảo dược bao gồm các loại thực vật khô sau: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Satureja montana*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Fucus vesiculosus*, *Foeniculum vulgare*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arbutus unedo*, *Eugenia caryophyllus*, *Juniperus communis*, *Combretum micranthum*, *Lippia citrodora* và *Tanacetum vulgare*.

11. Chế phẩm đông khô của chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.

12. Thực phẩm bổ sung chứa chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, dưới dạng thành phần hoạt tính, cùng với ít nhất một tá dược.

13. Dược thực phẩm chứa chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, dưới dạng thành phần hoạt tính, cùng với ít nhất một tá dược.

14. Dược phẩm chứa chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, dưới dạng thành phần hoạt tính, cùng với ít nhất một tá dược.

15. Chế phẩm thú y chứa chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, dưới dạng thành phần hoạt tính, cùng với ít nhất một tá dược.

16. Mỹ phẩm chứa chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, dưới dạng thành phần hoạt tính, cùng với ít nhất một tá dược.

17. Thực phẩm chức năng chứa chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, dưới dạng thành phần hoạt tính, cùng với ít nhất một tá dược.

18. Phụ gia thực phẩm chứa chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, dưới dạng thành phần hoạt tính, cùng với ít nhất một tá dược.

19. Thực phẩm bổ sung theo điểm 12, được bào chế để dùng qua đường miệng hoặc dùng khu trú.

20. Dược thực phẩm theo điểm 13, được bào chế để dùng qua đường miệng hoặc dùng khu trú.

21. Dược phẩm theo điểm 14, được bào chế để dùng qua đường miệng hoặc dùng khu trú.

22. Chế phẩm thú y theo điểm 15, được bào chế để dùng qua đường miệng hoặc dùng khu trú.

23. Mỹ phẩm theo điểm 16, được bào chế để dùng qua đường miệng hoặc dùng khu trú.

24. Thực phẩm chức năng theo điểm 17, được bào chế để dùng qua đường miệng hoặc dùng khu trú.

25. Phụ gia thực phẩm theo điểm 18, được bào chế để dùng qua đường miệng hoặc dùng khu trú.

26. Chiết xuất của chế phẩm thảo dược bao gồm ít nhất hai loại thực vật khô được chọn từ *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* và *Arctostaphylos uva-ursi*, chế phẩm đông khô của chiết xuất này hoặc dược phẩm hoặc chế phẩm thú y chứa chiết xuất này, để sử dụng làm chất kháng vi sinh vật và/hoặc chất chống tạo màng sinh học trong việc điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm vi sinh vật gây ra bởi *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Candida* hoặc *Staphylococcus*.

27. Quy trình điều chế chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, bao gồm bước: a) băm hoặc nghiền riêng biệt hoặc kết hợp ít nhất hai loại thực vật khô riêng lẻ để thu được các loại bột thực vật tương ứng; b) trộn ít nhất hai loại bột thực vật khác nhau để thu được chế phẩm thảo dược; c) bổ sung dung môi chiết vào chế phẩm thảo dược này để thu được chế phẩm lỏng (hoặc chiết xuất) tương ứng; d) ủ chế phẩm lỏng này ở nhiệt độ phòng trong thời gian nằm trong khoảng từ 5 đến 15 phút; tùy ý, e) gia nhiệt chế phẩm lỏng này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 134°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 5 đến 60 phút; tùy ý f) ly tâm, thu gom phần dịch nổi và lọc phần dịch nổi đã thu gom; và, tùy ý, g) cô đặc và/hoặc làm khô hoặc làm khô đông lạnh chế phẩm lỏng thu được từ bước e) hoặc f).

28. Quy trình theo điểm 27, trong đó dung môi chiết là nước.

29. Quy trình theo điểm 28, trong đó nước được bổ sung ở bước (c) bao gồm đường hòa tan trong nước ở nồng độ thay đổi từ 1 đến 100 g/l, tùy ý từ 50 đến 75 g/l.

30. Chế phẩm thảo dược bao gồm ít nhất hai loại thực vật khô được chọn từ *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* và *Arctostaphylos uva-ursi* và ít nhất một loại thực vật được chọn từ *Vitis vinifera* var. *tinctoria*, *Eugenia caryophyllus* và *Desmodium adscendens*.

31. Chế phẩm thảo dược theo điểm 30, còn bao gồm một hoặc nhiều loại thực vật khô bổ sung được chọn từ: *Achillea millefolium*, *Acorus calamus*, *Agrimonia eupatoria*, *Agropyrum repens*, *Alchemilla vulgaris*, *Alkanna tinctoria*, *Althaea officinalis*, *Anethum graveolens*, *Angelica archangelica*, *Arbutus unedo*, *Arnica montana*, *Artemisia pontica*, *Artemisia vulgaris*, *Asparagus officinalis*, *Asperula odorata*, *Betula pendula*, *Borrigo officinalis*, *Buxus sempervirens*,

Calamintha officinalis, Calendula officinalis, Calluna vulgaris, Carum carvi, Cassia angustifolia, Centaurea cyanus, Centaurium erythraea, Centella asiatica, Cetraria islandica, Chamaemelum nobile, Chamomilla recutita, Chrysanthellum americanum, Cichorium endivia, Cichorium intybus, Cinnamomum zeylanicum, Citrus aurantium, Combretum micranthum, Crataegus oxyacantha, Cuminum cyminum, Cupressus sempervirens, Curcuma zedoaria, Cynara scolymus, Cytisus scoparius, Desmodium adscendens, Elettaria cardamomum, Eleutherococcus senticosus, Epilobium parviflorum, Erysimum officinale, Eucalyptus globulus, Eugenia caryophyllus, Eupatorium cannabinum, Foeniculum vulgare, Fraxinus excelsior, Fucus vesiculosus, Fumaria officinalis, Galium odoratum, Gentiana lutea, Geranium robertianum, Ginkgo biloba, Glechoma hederacea, Glycyrrhiza glabra, Handroanthus impetiginosus, Harpagophytum procumbens, Hieracium pilosella, Humulus lupulus, Hypericum perforatum, Hyssopus officinalis, Illicium verum, Inula helenium, Juglans regia, Juniperus communis, Lamium album, Lavandula angustifolia, Levisticum officinale, Lippia citriodora, Lotus corniculatus, Lythrum salicaria, Malva sylvestris, Marrubium vulgare, Medicago sativa, Melissa officinalis, Mentha × piperita, Morus nigra, Myrtus communis, Olea europaea, Origanum majorana, Panax ginseng, Papaver rhoeas, Parietaria officinalis, Passiflora incarnata, Petroselinum crispum, Peumus boldus, Phaseolus vulgaris, Pimpinella anisum, Plantago lanceolata, Plantago ovata, Potentilla anserina, Quercus robur, Rhamnus frangula, Rheum palmatum, Rosa centifolia, Rosmarinus officinalis, Rubia tinctorum, Rubus idaeus, Salix alba, Salvia officinalis, Sambucus nigra, Satureja montana, Silybum marianum, Solanum dulcamara, Tabebuia impetiginosa, Tanacetum vulgare, Taraxacum officinalis, Thymus serpyllum, Thymus vulgaris, Tilia tomentosa, Tilia cordata, Trigonella foenum-graecum, Tussilago farfara, Vaccinium myrtillus, Valeriana officinalis, Verbascum thapsus, Verbena officinalis, Viscum album, Vitis vinifera var. tinctoria, Zea mays và Zingiber officinale.

32. Quy trình bào chế thực phẩm bổ sung theo điểm 12 hoặc 19, bao gồm bước trộn chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, với ít nhất một tá dược.

33. Quy trình bào chế dược thực phẩm theo điểm 13 hoặc 20, bao gồm bước trộn chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo

điểm 11, với ít nhất một tá được.

34. Quy trình bào chế dược phẩm theo điểm 14 hoặc 21, bao gồm bước trộn chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, với ít nhất một tá được.

35. Quy trình bào chế chế phẩm thú y theo điểm 15 hoặc 22, bao gồm bước trộn chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, với ít nhất một tá được.

36. Quy trình bào chế mỹ phẩm theo điểm 16 hoặc 23, bao gồm bước trộn chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, với ít nhất một tá được.

37. Quy trình bào chế thực phẩm chức năng theo điểm 17 hoặc 24, bao gồm bước trộn chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, với ít nhất một tá được.

38. Quy trình bào chế phụ gia thực phẩm theo điểm 18 hoặc 25, bao gồm bước trộn chiết xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc chế phẩm đông khô theo điểm 11, với ít nhất một tá được.