



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

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

(11)



1-0039130

(51)^{2019.01} A61K 36/185; A61P 37/08; A61K
31/7028

(13) B

(21) 1-2019-05901

(22) 24/10/2019

(30) 10-2019-0099398 14/08/2019 KR

(45) 25/03/2024 432

(43) 25/02/2021 395

(73) Dr. Oregonin Inc. (KR)

802, Bodeum Hall, 1 Kangwondaehak-gil, Chuncheon-si, Gangwon-do 24351,
Republic of Korea

(72) CHOI, Sun Eun (KR); Lee, Yong Jo (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHIẾT PHẨM GIÀU OREGONIN TỪ CÂY TỔNG
QUÁN SỬ

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chiết phẩm rượu và phân chiết dung môi của nó từ cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sử, giàu oregonin. Chiết phẩm và phân chiết được tạo ra từ cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sử bởi phương pháp theo sáng chế giàu oregonin và có hoạt tính chống dị ứng và chống oxy hóa rất mỹ mãn. Ngoài ra, chiết phẩm và phân chiết được tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế có thể được dùng làm hoạt chất trong các thuốc chống dị ứng và thực phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chiết phẩm giàu oregonin từ cây tổng quán sủ (danh pháp khoa học: *Alnus*).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã biết rằng loài cây tổng quán sủ thuộc họ Bạch dương (Betulaceae) được phân bố ở Bắc bán cầu, bao gồm Hàn Quốc, Mỹ, Nhật Bản, và Trung Quốc, và có 17 loài tổng quán sủ, kể cả *Alnus japonica* Steudel, mọc hoang ở Hàn Quốc (1, 2). Các hợp chất đặc trưng nhất có trong cây tổng quán sủ là các hợp chất nhóm diarylheptanoid, và nhiều nhà nghiên cứu đã phát hiện ra rằng các hợp chất này tồn tại trong cây tổng quán sủ. Ngoài ra, nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới đã công bố một số nghiên cứu được thực hiện bằng cách sử dụng oregonin làm chất chỉ thị sinh học, cho các nghiên cứu phân loại hoá học thực vật của cây tổng quán sủ, bao gồm một số công bố về việc xác định cấu trúc của oregonin mà là một diarylheptanoid glycoside phân lập được bằng cách theo dõi các chất chuyển sang màu nâu đỏ khi cây thuộc loài tổng quán sủ (*A. rubra*, *A. hirsuta*, or *A. japonica*) bị cắt (3-16).

Đồng thời, đã có công bố rằng các diarylheptanoid phân lập được từ cây tổng quán sủ có nhiều tác dụng khác nhau, bao gồm tác dụng chống oxy hoá, các tác dụng chống tiêu chảy và chống ung thư, tác dụng ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào u ác tính của chuột B16-F10, tác dụng ức chế sự sản sinh NO (Nitric Oxide), tác dụng ức chế xyclooxygenaza-2, tác dụng chống viêm da bởi tác động làm chất ức chế 5-lipoxygenaza, tác dụng ức chế kết tập tiểu cầu, chất

ức chế PKC alpha, hoạt tính ức chế hình thành khối u, hoạt tính ức chế các hoạt tính enzym khác nhau trong quá trình sinh tổng hợp prostaglandin, tác dụng kháng khuẩn, tác dụng bảo vệ gan, và các tác dụng tương tự. Trong những năm gần đây, liên quan đến tác dụng chống dị ứng, các nghiên cứu về các hoạt tính sinh lý *in vitro* và hoạt tính sinh lý được thực hiện trên chuột NC/Nga đã được công bố. Ngoài ra, tác dụng chống rụng tóc và các tác dụng tương tự đã được phát hiện bằng cách gây ra sự mất cân bằng oxy hoá ở người trong các tế bào nhú da của người và sau đó xác minh khả năng của oregonin trong việc điều hoà sự chết theo chương trình của tế bào. Do đó, là một hợp chất đại diện cho các chất hoạt tính hoặc các chất chỉ thị sinh học của cây tổng quán sủ, oregonin thuộc nhóm diarylheptanoid đã thu hút sự chú ý đặc biệt (17-27). Do đó, phương pháp chiết hàm lượng cao của oregonin, là diarylheptanoid glycoside, mà đã được chỉ ra là có nhiều tác dụng sinh lý khác nhau và được đánh giá là một hợp chất có hoạt tính hữu ích, có ý nghĩa lớn trong việc sử dụng tối đa các nguồn tài nguyên hữu ích.

Các tài liệu sáng chế và các tài liệu được trích dẫn nêu trong phần mô tả được kết hợp vào bản mô tả này ở cùng một mức độ cứ như là mỗi tài liệu này được chỉ rõ một cách riêng biệt và rõ ràng bằng cách viện.

Tài liệu sáng chế

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc No. 10-2009-0061128

Patent Hàn Quốc No. 10-1756020

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc No. 10-2018-0085636

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã cố gắng nghiên cứu để phát triển một phương pháp tạo ra một hoạt chất hữu ích từ cây tổng quán sủ bằng công nghệ chiết siêu tới hạn. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng chiết phẩm thu được bởi việc chiết tiếp bằng dung môi rượu cận chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ được tạo ra sau khi chiết siêu tới hạn cây tổng quán sủ, giàu oregonin, nhờ đó hoàn thành sáng chế này.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất chiết phẩm giàu oregonin từ cây tổng quán sủ.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất chiết phẩm rượu và phần chiết dung môi của nó từ cận chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ giàu oregonin.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm chống dị ứng chứa chiết phẩm hoặc phần chiết dung môi của nó nêu trên.

Các mục đích và các dấu hiệu khác của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn qua phần mô tả chi tiết sáng chế, các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo và các hình vẽ.

Để đạt được các mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chiết phẩm chứa oregonin, phương pháp này bao gồm các bước: (a) chiết siêu tới hạn cây tổng quán sủ để thu được cận chiết siêu tới hạn; và (b) tạo ra chiết phẩm rượu của cận chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ đã tạo ra.

Sáng chế cũng đề xuất chiết phẩm rượu hoặc phần chiết dung môi của nó từ cận chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ, nó được tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế và chứa oregonin.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm ngăn ngừa, làm thuyên giảm hoặc điều trị triệu chứng dị ứng, chứa chiết phẩm hoặc phần chiết dung môi.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện công thức cấu trúc hoá học của oregonin.

Fig.2 thể hiện sắc ký đồ HPLC (100 tới 1000 ppm) của oregonin.

Fig.3 thể hiện đường cong cân bằng và phương trình hồi quy tuyến tính của oregonin.

Fig.4 thể hiện sắc ký đồ HPLC của chiết phẩm nước nóng từ cành cây *Alnus sibirica*.

Fig.5 thể hiện sắc ký đồ HPLC của chiết phẩm ethanol 60% từ cành cây *Alnus sibirica*.

Fig.6A thể hiện sắc ký đồ HPLC chiết phẩm ethanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus sibirica*.

Fig.6B thể hiện sắc ký đồ HPLC của phần chiết etyl axetat của chiết phẩm ethanol 60% từ cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus sibirica*.

Fig.7 thể hiện các kết quả TLC của các chiết phẩm khác nhau từ cành cây *Alnus japonica*.

Fig.8 thể hiện các kết quả xác định hoạt tính tẩy gốc DPPH của chiết phẩm ethanol 60% (AJSCFR) và phần chiết dung môi etyl axetat của nó (AJSCFREA) của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus japonica*.

Fig.9 thể hiện các kết quả xác định hoạt tính tẩy gốc ABTS của chiết phẩm ethanol 60% (AJSCFR) và phần chiết dung môi etyl axetat của nó (AJSCFREA) của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus japonica*.

Fig.10 thể hiện các kết quả xác định khả năng tồn tại của tế bào của dòng tế bào đại thực bào thô 264.7 với sự có mặt của chiết phẩm ethanol 60% (ASCFR) của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây tổng quán sủi. Khả năng tồn tại của tế bào được xác định bằng thử nghiệm MTT. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện theo % hệ số hấp thụ đối chứng. Các trị số xác định được thể hiện theo trị số trung bình $\pm$ SD (độ lệch tiêu chuẩn) của ba thử nghiệm ($p < 0,05$).

Fig.11 thể hiện các kết quả xác định hoạt tính tẩy NO của chiết phẩm ethanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây tổng quán sủ (ASCFR) trong dòng tế bào đại thực bào thô 264.7.

Fig.12 thể hiện các kết quả xác định khả năng tồn tại của tế bào của các tế bào RBL-2H3 với sự có mặt của chiết phẩm ethanol 60% (ASCFR) của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây tổng quán sủ. Khả năng tồn tại của tế bào được xác định bằng thử nghiệm MTT. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện theo % hệ số hấp thụ đối chứng. Các trị số xác định được được thể hiện theo trị số trung bình $\pm$ SD của ba thử nghiệm ($p < 0,05$).

Fig.13 thể hiện các kết quả xác định hoạt tính ức chế sự tiết β -hexosaminidase của chiết phẩm ethanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây tổng quán sủ (ASCFR).

Mô tả chi tiết sáng chế

Tiếp theo, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết.

Theo một khía cạnh của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất chiết phẩm chứa oregonin, phương pháp này bao gồm các bước: (a) chiết siêu tới hạn cây tổng quán sủ để thu được cặn chiết siêu tới hạn; và (b) tạo ra chiết phẩm rượu của cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ đã tạo ra.

Bước (a): Bước chiết siêu tới hạn cây tổng quán sủ để thu được cặn chiết siêu tới hạn

Theo sáng chế này, cây tổng quán sủ đầu tiên được chiết siêu tới hạn để thu được cặn chiết siêu tới hạn.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “cây tổng quán sủ” được dùng để chỉ cây tổng quán sủ thuộc họ Bạch dương (Betulaceae).

Các ví dụ về cây tổng quán sử được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không nhằm giới hạn ở, *A. borealis* Koidz., *A. firma*, *A. firma* var. *hirtella* Franch. & Sav., *A. japonica*, *A. japonica* var. *arguta* Call, *A. japonica* var. *koreana* Callier, *A. japonica* var. *serrata* Nakai, *A. japonica* var. *reginosa* Nakai, *A. hirsuta* for. *glabra* T. Lee, *A. mandshurica* (Callier) Hand.-Mazz., *A. mandshurica* for. *barbinervis* (Nakai) W.T.Lee, *A. mandshurica* for. *pubescens* (Nakai) Kitag., *A. maximowiczii* Callier, *A. mayrii* Callier, *A. pendula*, và *A. sibirica* Fisch. ex Turcz.

Cây tổng quán sử được sử dụng để chiết siêu tới hạn theo sáng chế có thể là toàn bộ cây tổng quán sử, hoặc một bộ phận của cây tổng quán sử, được chọn được chọn từ nhóm bao gồm thân, rễ, lá, hoa, quả và hạt của cây tổng quán sử. Tốt hơn là, thân hoặc rễ của cây tổng quán sử có thể được sử dụng.

Theo sáng chế này, trước khi chiết siêu tới hạn, toàn bộ hoặc một bộ phận của cây tổng quán sử có thể được làm khô và/hoặc được nghiền.

Theo sáng chế này, phương pháp chiết siêu tới hạn để chỉ phương pháp mà trong đó hương liệu, chất màu, dầu hoặc chất mang chức có trong nguyên liệu tự nhiên được chiết tách bằng cách sử dụng một chất lỏng ở trạng thái siêu tới hạn mà không cần cải biến.

Chất lỏng ở trạng thái siêu tới hạn chỉ một chất lỏng ở nhiệt độ tới hạn và áp suất tới hạn, đạt đến điểm siêu tới hạn để các pha lỏng và khí của chất lỏng không thể phân được với nhau. Chất lỏng ở trạng thái siêu tới hạn này có thể là, ví dụ, cacbon đioxit siêu tới hạn. Cacbon đioxit siêu tới hạn là cacbon đioxit ở trạng thái phía trên nhiệt tới hạn (31°C) và áp suất tới hạn (7,5MPa) của nó, nó là một chất lỏng có cả tính chất của thể khí lẫn tính chất của thể lỏng.

Theo sáng chế này, phương pháp chiết siêu tới hạn có thể được thực hiện bởi, ví dụ, phương pháp thay đổi áp suất trong đó hỗn hợp gồm chất lỏng siêu

tới hạn và chất tan được giải phóng áp suất và giãn nở ở cùng nhiệt độ với nhiệt độ chiết, nhờ đó chất tan được tách trong khi khả năng hoà tan của chất lỏng siêu tới hạn giảm; hoặc phương pháp thay đổi nhiệt độ trong đó nhiệt độ của chất lỏng siêu tới hạn được làm tăng để làm giảm khả năng hoà tan của chất tan, nhờ đó chất tan được tách ra khỏi chất lỏng siêu tới hạn. Tuy nhiên, phương pháp chiết siêu tới hạn không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Theo sáng chế này, đồng dung môi có thể được sử dụng cùng với chất lỏng siêu tới hạn. Các ví dụ về đồng dung môi là các dung môi phân cực thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tốt hơn là, dung môi có thể sử dụng làm đồng dung môi được chọn từ nhóm bao gồm rượu, nước, etylen glycol, polyetylen glycol, propylen cacbonat, axit formic, axit axetic, axetonitril, clorodiflorometan, và hỗn hợp gồm hai hoặc nhiều dung môi này.

Bình chiết siêu tới hạn được sử dụng theo sáng chế này không bị giới hạn cụ thể miễn là bình mà nhiệt độ và áp suất của nó có thể kiểm soát được và được kết cấu sao cho nguyên liệu dùng để chiết và chất lỏng siêu tới hạn tiếp xúc với nhau.

Theo sáng chế này, áp suất trong quá trình chiết siêu tới hạn có thể nằm trong khoảng từ 100 đến 600 bar ($100 \cdot 10^5$ - $600 \cdot 10^5$ Pa) và nhiệt độ trong quá trình chiết siêu tới hạn có thể nằm trong khoảng từ 10 đến 100°C. Ngoài ra, lưu lượng của chất lỏng siêu tới hạn và lưu lượng của đồng dung môi trong quá trình chiết siêu tới hạn có thể nằm trong khoảng từ 10 đến 100 g/phút.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “cạn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ” được dùng để chỉ phần tồn dư còn lại sau khi chiết cây tổng quán sủ bởi phương pháp chiết siêu tới hạn.

Bước (b): Bước tạo ra chiết phẩm rượu của cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ đã tạo ra

Cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ thu được ở bước (a) được chiết bằng dung môi rượu, nhờ đó tạo ra chiết phẩm rượu.

Theo sáng chế này, quá trình chiết bằng rượu từ cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ có thể được thực hiện theo phương pháp thông thường để sản xuất một chiết phẩm từ nguyên tự nhiên như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tức là, quá trình chiết bằng rượu có thể được thực hiện bằng cách sử dụng dung môi rượu ở các điều kiện nhiệt độ và áp suất thông thường.

Tốt hơn là, quá trình chiết bằng rượu được thực hiện thông qua quy trình cho cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ tiếp xúc với dung môi chiết là rượu. Trước bước chiết bằng rượu, cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ có thể được làm khô và/hoặc được nghiền.

Theo sáng chế này, rượu có thể là rượu thấp ngậm nước hoặc khan có 1 tới 4 nguyên tử cacbon, ví dụ, metanol, etanol, propanol, butanol, n-propanol, iso-propanol, hoặc n-butanol.

Theo sáng chế này, quy trình chiết bằng rượu đạt được thông qua bước loại bỏ một phần hoặc hoàn toàn dung môi chiết là rượu. Thuật ngữ "loại bỏ một phần" khi được sử dụng trong bản mô tả để chỉ rằng việc cô đặc được thực hiện cho tới khi một lượng đáng kể của phân cô trong nước không dung môi hữu cơ được tạo ra. Việc loại bỏ hoàn toàn dung môi chiết có thể tạo ra cặn khô.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "chiết phẩm" có nghĩa thường được sử dụng như một chiết phẩm thô trong lĩnh vực kỹ thuật này như nêu trên, nhưng cũng bao gồm, theo nghĩa rộng, phần chiết được tạo ra bởi quá trình cất phân đoạn tiếp theo chiết phẩm thô này.

Phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm bước (c) để tạo ra phần chiết dung môi của chiết phẩm rượu từ cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sử.

Theo một phương án của sáng chế, phần chiết dung môi có thể là phần chiết thu được bằng cách chưng cất phần chiết bằng một hoặc nhiều dung môi được chọn từ nhóm bao gồm axeton, etyl axetat, clorofom, 1,3-butylen glycol, n-hexan, dietyl ete, butyl axetat, và điclorometan.

Quá trình cất phân đoạn bằng dung môi có thể được thực hiện bởi một quy trình chiết bổ sung bằng cách sử dụng dung môi.

Các dấu hiệu kỹ thuật và các ưu điểm của sáng chế đó là chiết phẩm được tạo ra bởi quá trình chiết bằng rượu cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sử hoặc phần chiết của chiết phẩm chứa một hàm lượng rất cao của hợp chất oregonin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chiết phẩm rượu hoặc phần chiết dung môi của nó từ cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sử, nó được tạo ra bởi phương pháp nêu trên và chứa oregonin.

Theo sáng chế này, rượu có thể là rượu thấp ngậm nước hoặc khan có 1 tới 4 nguyên tử cacbon, ví dụ, metanol, etanol, propanol, butanol, n-propanol, iso-propanol, or n-butanol.

Theo sáng chế này, phần chiết dung môi có thể là phần chiết thu được bằng cách chưng cất phần chiết bằng một hoặc nhiều dung môi được chọn từ nhóm bao gồm axeton, etyl axetat, clorofom, 1,3-butylen glycol, n-hexan, dietyl ete, butyl axetat, và điclorometan.

Các nội dung liên quan đến chiết phẩm hoặc phần chiết dung môi của nó theo sáng chế là giống như các nội dung đã nêu trên đối với phương pháp chiết theo sáng chế, và do vậy sẽ không được nhắc lại.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm ngăn ngừa, làm thuyên giảm hoặc điều trị triệu chứng dị ứng, chứa hoạt chất là chiết phẩm rượu hoặc phân chiết dung môi của nó từ cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sử theo sáng chế.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "dị ứng" được dùng để chỉ chung cho các triệu chứng dị ứng khác nhau bị gây ra bởi các phản ứng kháng nguyên-kháng thể quá mức xuất hiện khi hệ thống miễn dịch của cơ thể phản ứng quá mức với một chất gây dị ứng cụ thể.

Nói một cách tổng quát, các triệu chứng “dị ứng” đã biết là do các kháng thể IgE và các tế bào mast gây ra, và sự kích thích tế bào mast bởi một kháng nguyên cụ thể gây ra sự thoái hoá tế bào mast, và do đó các vật truyền tín hiệu, bao gồm histamin, leukotrien, prostaglandin và IL-4, bị giải phóng, gây ra các triệu chứng dị ứng.

Như được chứng tỏ trong một ví dụ cụ thể của sáng chế, chiết phẩm hoặc phân chiết theo sáng chế ức chế một cách có hiệu quả sự tiết β -hexosaminidase từ các tế bào RBL-2H3, và do đó có thể hữu ích cho mục đích chống dị ứng.

Theo sáng chế này, chế phẩm ngăn ngừa, làm thuyên giảm hoặc điều trị triệu chứng dị ứng có thể được tạo ra dưới dạng dược phẩm gồm: (i) lượng hữu hiệu trị liệu của chiết phẩm rượu hoặc phân chiết dung môi của nó từ cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sử; và (ii) chất mang dược dụng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “dị ứng” được dùng để chỉ một cách cụ thể tới các bệnh dị ứng. Các bệnh dị ứng này bao gồm, ví dụ, nhưng không nhằm giới hạn ở, viêm da dị ứng, viêm kết mạc dị ứng, viêm mũi dị ứng, và hen suyễn dị ứng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “điều trị” được dùng để chỉ việc loại bỏ các bệnh hoặc tình trạng bệnh lý dị ứng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “làm thuyên giảm” được dùng để chỉ việc làm giảm các bệnh hoặc tình trạng bệnh lý dị ứng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "phòng ngừa" được dùng để chỉ việc ức chế sự phát triển của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý dị ứng ở các động vật, kể cả người, mà chưa từng bị chẩn đoán là có bệnh hoặc tình trạng bệnh lý dị ứng, nhưng có xu hướng dễ bị mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh lý này.

Chất mang dược dụng có mặt trong dược phẩm theo sáng chế là loại thường được sử dụng trong việc bào chế. Các ví dụ về chất mang này bao gồm, nhưng không nhằm giới hạn ở, hợp chất carbohydrat (ví dụ, lactoza, amyloza, dextroza, sucroza, sorbitol, mannitol, tinh bột, xenluloza, v.v.), gồm acacia, canxi phosphat, alginat, gelatin, canxi silicat, xenluloza vi tinh thể, polyvinyl pyrrolidon, cenluloza, nước, xi rô, dung dịch muối, rượu, gồm arabic, dầu thực vật (ví dụ, dầu ngô, dầu hạt bông, dầu đậu nành, dầu ô liu, dầu dừa, v.v.), polyetylen glycol, metyl xenluloza, metylhydroxy benzoat, propylhydroxy benzoat, bột talc, magie stearat, và dầu khoáng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa, ngoài các thành phần nêu trên, chất bôi trơn, chất thấm ướt, chất làm ngọt, chất tạo hương vị, chất nhũ hoá, chất tạo lửng, chất bảo quản, v.v.. Các chất mang dược dụng thích hợp và các công thức đã được mô tả một cách chi tiết trong ấn phẩm: *Remington's Pharmaceutical Sciences* (tái bản lần thứ 19, 1995).

Liều dùng thích hợp của dược phẩm theo sáng chế có thể thay đổi phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như phương pháp bào chế, phác đồ dùng thuốc, độ tuổi bệnh nhân, thể trọng, giới tính, tình trạng bệnh lý, chế độ ăn uống, khoảng thời gian áp dụng, đường dùng thuốc, mức độ bài tiết, và khả năng đáp ứng thuốc. Đồng thời, liều uống của dược phẩm theo sáng chế được ưu tiên nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1000 mg/kg (thể trọng) mỗi ngày.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng hoặc đường tĩnh mạch. Khi dược phẩm này được dùng qua đường tĩnh mạch, thì nó có thể được dùng bằng cách tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, tiêm bắp, tiêm trong màng bụng, tiêm qua da, hoặc cách thức tiêm tương tự.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được trình bày dưới dạng liều dùng đơn vị hoặc trong vật đựng đa liều bởi việc bào chế bằng cách sử dụng chất mang dược dụng và/hoặc tá dược theo phương pháp mà có thể dễ dàng thực hiện được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đồng thời, chế phẩm này có thể là ở dạng dung dịch, hỗn dịch hoặc nhũ tương trong dầu hoặc môi trường hoà tan trong nước hoặc ở dạng chiết phẩm, bột, hạt, viên hoặc viên nang, và có thể bao gồm thêm chất làm phân tán hoặc chất làm ổn định.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra dưới dạng thành phần thực phẩm chức năng dùng để phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm triệu chứng dị ứng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “làm thuyên giảm” được dùng để chỉ việc làm giảm các triệu chứng của bệnh hoặc các triệu chứng do các biến chứng của bệnh gây ra.

Khi chế phẩm theo sáng chế là thành phần thực phẩm chức năng, thì chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm, ngoài hoạt chất, các thành phần thường được thêm vào trong việc sản xuất thực phẩm. Các ví dụ về các thành phần này bao gồm protein, hydrat cacbon, chất béo, chất dinh dưỡng, gia vị, và chất tạo ngọt. Các ví dụ về hydrat cacbon bao gồm đường thông thường như monosacarit, ví dụ, glucoza, fructoza, v.v., disacarit, ví dụ, maltoza, sucroza, oligosacarit, v.v., và polysacarit, ví dụ, dextrin, xyclodextrin, v.v., và rượu đường như xylitol, sorbitol, erytritol, v.v.. Chất tạo ngọt bao gồm chất tạo hương tự nhiên [thaumatin, chiết phẩm stevia (ví dụ, rebaudioside A, glycyrrhizin, v.v.)] và chất tạo hương tổng hợp (sacarin, aspartame, v.v.). Ví

dụ, khi thành phần thực phẩm chức năng theo sáng chế được tạo ra dưới dạng đồ uống, thì nó có thể bao gồm, ngoài hoạt chất theo sáng chế, axit xitric, fructoza lỏng, đường, glucoza, axit axetic, axit malic, nước ép trái cây, chiết phẩm bạch đàn, chiết phẩm táo tàu, chiết phẩm cam thảo, hoặc các thành phần tương tự.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ cụ thể được mô tả chỉ nhằm mục đích thể hiện các phương án điển hình hoặc các ví dụ của sáng chế, và phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn như vậy. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rõ rằng các biến thể và các ứng dụng khác của sáng chế không nằm ngoài sáng chế như được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo của sáng chế.

Các ví dụ

1. Vật liệu thử nghiệm và phương pháp

(1) Vật liệu thử nghiệm

A. sibirica Fisch. ex Turcz mua từ hãng Cheonjigayakcho (tên công ty; ở Seoul Yangnyeong Market) vào tháng 4/2019, và được sử dụng trong thử nghiệm này sau khi thẩm định thực vật bởi nhà nghiên cứu Jin Hye Young (National Arboretum) tại Korean National Arboretum ở Pocheon, Gyeonggi-do, Korea, và tiêu chuẩn của nó được lưu trữ trong phòng thí nghiệm chức năng tự nhiên của Gwangju Women's University (AS2019-05).

(2) Các thiết bị và các thuốc thử

Các phổ ^1H và ^{13}C -NMR được đo bởi JEOL-JNM-AL300 (300 MHz và 75 MHz). HPLC (sắc ký lỏng cao áp) được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống Waters 2695 System (USA) và máy dò độ hấp thụ kép rhamda 2487. Cụ

thể là, cột bảo vệ là cột bảo vệ Phenomenex KJ0-4282 được sử dụng, và cột SkyPak C18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm) được sử dụng. Nhiệt độ tủ sấy dạng cột được thiết lập ở 25°C, và pha động chứa 1% nước cất (D.W.) (A) và axetonitril (B). Hệ thống dữ liệu được sử dụng là phần mềm Empower 2 (Waters Co., USA). LC/MS được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống Shimadzu prominence UFLC-MS, bơm A: LC-30AD, bơm B: LC-30AD, bộ dò: SPD-20A, bộ lấy mẫu tự động: SIL-20A XR, tủ sấy dạng cột: CTO-20A, và mô đun truyền tín hiệu CBM-20A. MS được thực hiện bằng cách sử dụng ESI-IT-TOF MS, và LC được thực hiện trong các điều kiện sau đây. Cụ thể là, cột được sử dụng là cột Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 (2,1 x 150 mm, 1,7 μ m), nhiệt độ tủ sấy dạng cột được thiết lập ở 35°C, bộ dò UV được thiết lập ở 280 nm, thể tích phun được thiết lập ở 1 μ L, lưu lượng được thiết lập ở 0,21 ml/phút, dung môi A là nước trong 0,1% axit formic, và dung môi B là axetonitril. Trong các điều kiện MS, lưu lượng dòng khí phun được thiết lập ở 1,5 L/phút, nhiệt độ CDL được thiết lập ở 200°C, và nhiệt độ khối nhiệt được thiết lập ở 200°C. Trong các điều kiện đã được thiết lập này, thử nghiệm được thực hiện.

Đĩa TLC (sắc ký lớp mỏng) là đĩa silica gel 60 F254 đã phủ trước (Merck, Darmstadt, Germany) được sử dụng.

Các thuốc thử dùng để xác định hoạt tính chống oxy hoá gồm DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis (axit 3-ethylbenzothiazolin-6-sulphonic)) và axit L-ascorbic mua từ hãng Sigma Aldrich (Milw., WI, USA) được sử dụng. Ngoài ra, kali sulfat mua từ hãng Samchun (Korea) và etanol 99,5% mua từ hãng Merck (Darmstadt, Germany) được sử dụng. Hệ số hấp thụ được đo bằng cách sử dụng máy đo ELISA (TECAN, Salzburg, Austria).

Để làm các hệ thống chiết siêu tới hạn, hệ thống nghiên cứu chiết chất lỏng siêu tới hạn (ISA-SEFE-0500-0700-080, Ilsin Autoclave, Daejeon, Korea) và hệ thống sản xuất thử nghiệm chiết chất lỏng siêu tới hạn (SCFE-P400, Ilsin Autoclave, Daejeon, Korea) được sử dụng.

Cành cây *Alnus sibirica* được mua từ hãng Seoul Yangnyeong Market (Seoul, Korea), và chất ngoại lai được loại bỏ. Tiếp đó, các cành cây *Alnus sibirica* được rửa, và tiếp đó được hong khô trong bóng râm và được sử dụng trong thử nghiệm này. 100 kg mẫu khô được nghiền để lọt qua sàng rây cỡ 200, và nhiệt độ của mẫu cành *Alnus sibirica* đã được nghiền này được duy trì bằng cách kiểm soát nhiệt độ của thiết bị chiết ở 50°C. Khi nhiệt độ ổn định, mẫu cành cây *Alnus sibirica* được để trong thiết bị chiết, và khí CO₂ được duy trì với áp suất đẳng nhiệt, và sau đó được bơm qua đường ống nhờ bơm cao áp trong khi kiểm soát van kiểm soát cho tới khi điều kiện áp suất thử nghiệm (400 bar (400.10⁵ Pa)) đạt được. Sau khi áp suất thiết lập đã đạt được, quá trình chiết được thực hiện bằng cách đưa tổng cộng 180 mL ethanol (loại dùng cho HPLC) vào đáy của thiết bị chiết với tốc độ 3 mL/phút trong 60 phút. Quá trình chiết được hoàn thành trong khi sục CO₂ nhờ bơm cao áp ở nhiệt độ và áp suất thiết lập trong 30 phút để loại bỏ ethanol tồn dư nằm lại trong mẫu này.

79,97 kg mẫu cặn chiết siêu tới hạn của *Alnus sibirica* thu được sau khi chiết siêu tới hạn cành *Alnus sibirica* gồm cả vỏ như đã nêu trên được hong khô trong bóng râm, được chiết một lần bằng ethanol 60% ở nhiệt độ trong phòng, và được lọc. Chiết phẩm thu được được cô dưới áp suất giảm và được làm đông nhanh, nhờ đó cuối cùng tạo ra 1,84 kg chiết phẩm mà tiếp đó nó được sử dụng trong thử nghiệm (“AJSCFR”: chiết phẩm ethanol của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus sibirica*).

1 kg chiết phẩm etanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus sibirica* đã tạo ra được cân và được cất phân đoạn bằng dung môi etyl axetat phân bằng cách sử dụng phễu tách, nhờ đó tạo ra phần chiết dung môi etyl axetat. Phần chiết dung môi thu được này được sử dụng trong thử nghiệm (“AJSCFREA”: phần chiết etyl axetat của chiết phẩm etanol của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus sibirica*).

(3) Chiết và tách

1 kg cành cây *Alnus sibirica* gồm cả vỏ được cắt, và sau đó được chiết bằng etanol 60% ở nhiệt độ trong phòng và được lọc. Chiết phẩm này được cô dưới áp suất giảm và được làm đông nhanh, nhờ đó cuối cùng tạo ra 66,1 g chiết phẩm. Chiết phẩm đã tạo ra được định lượng để nạp vào HPLC và được sử dụng trong thử nghiệm (“AJ60E”: chiết phẩm etanol từ cành cây *Alnus sibirica*).

Ngoài ra, để tạo ra chiết phẩm nước nóng, các cành cây *Alnus sibirica* gồm cả vỏ được chiết một lần bằng cách đun nóng ở 100°C trong 4 giờ và được lọc. Chiết phẩm này được cô dưới áp suất giảm và được làm đông nhanh, nhờ đó cuối cùng tạo ra 36,6 g chiết phẩm. Chiết phẩm đã tạo ra được định lượng để nạp vào HPLC và được sử dụng trong thử nghiệm (“AJHWE”: chiết phẩm nước nóng của cành cây *Alnus sibirica*).

Chiết phẩm etanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn và chiết phẩm etanol 60% và chiết phẩm nước nóng theo phương pháp chiết thông thường được tạo ra cho các mục đích thử nghiệm và được sử dụng trong thử nghiệm dùng cho phép phân tích HPLC.

1 mg oregonin, là chuẩn đã được tách và được tinh chế từ vỏ cây *Alnus japonica* đã được lưu trữ trong phòng thí nghiệm, được cân chính xác, và MeOH 80% được thêm vào tới tổng thể tích 1 ml, nhờ đó tạo ra dung dịch

nguyên liệu (1000 ppm). Dung dịch nguyên liệu này được pha loãng, nhờ đó tạo ra các dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là 100, 250, 500 và 1000 ppm. 20 μ l của mỗi dung dịch chuẩn được lấy, nhờ đó thu được sắc ký đồ HPLC trong đó mỗi dung dịch chuẩn được tách biệt. Ngoài ra, đối với khả năng tái lập của thiết bị, sai số chuẩn trung bình của thời gian lưu (RT) của từng dung dịch chuẩn và mẫu chưa xác định chiết phẩm từ cành cây *Alnus japonica* được xác định thông qua các thử nghiệm được lặp lại. Sau khi các điều kiện phân tích mẫu chuẩn đã được thiết lập như được mô tả sau đây, pic thể hiện trị số RT giống như chuẩn oregonin được tập hợp thông qua việc tinh chế được lặp lại. Trên cơ sở pic đã được tập hợp, hợp chất đơn được đảm bảo, và các dữ liệu NMR và LC/MS của nó được xác định.

(4) Các điều kiện phân tích HPLC

Các điều kiện của pha động được thể hiện trong Bảng 1 sau đây, và việc phân tích HPLC được thực hiện trong các điều kiện sau đây: lưu lượng: 1 ml/phút; bước sóng: 280nm, thể tích phun: 20 μ l; tổng thời gian chạy: 40 phút; và nhiệt độ tủ sấy dạng cột: 25°C. Việc phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng cột Phenomenex KJ0-4282 Guard làm cột bảo vệ và SkyPak C18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm) làm cột phân tích.

Bảng 1

	0 phút	12 phút	24 phút	25 phút	40 phút
Dung môi A (H ₂ O)	90	75	60	90	90
Dung môi B (CH ₃ CN)	10	25	40	10	10

(5) Các điều kiện phân tích LC/MS

Việc phân tích LC được thực hiện trong các điều kiện sau đây. Cụ thể là, việc phân tích này được thực hiện bằng cách sử dụng cột Waters ACQUITY

UPLC® BEH C18 (2,1 x 150 mm, 1,7 μ m). Cho việc phân tích này, nhiệt độ tủ sấy dạng cột được thiết lập ở 35°C, bộ dò UV được thiết lập ở 254 nm, thể tích phun được thiết lập ở 1 μ l, và lưu lượng được thiết lập ở 0,21 ml/phút. Các điều kiện của pha động được thể hiện trong Bảng 2 sau đây.

Bảng 2

	0 phút	20 phút	24 phút	25 phút	30 phút
Dung môi A (0,1%, axit axetic-H ₂ O)	95	40	40	95	95
Dung môi B (axetonitril)	5	60	60	5	5

Đồng thời, việc phân tích MS được thực hiện trong các điều kiện sau đây. Cụ thể là, cho việc phân tích MS, lưu lượng khí phun được thiết lập ở 1,5 L/phút, nhiệt độ CDL được thiết lập ở 200°C, và nhiệt độ khối nhiệt được thiết lập ở 200°C.

Oregonin: bột vô định hình màu nâu

LC/MS đối chứng dương, m/z: 501 [M+Na]⁺, LC/MS đối chứng âm, m/z: 477 [M-H]⁻ ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆+D₂O): δ 6,61-6,53 (4H tổng cộng, H-2', 2'', 5', 5''), 6,42-6,37 (2H tổng cộng, H-6'', 6'), 4,25 (1H, brd, J=7,8Hz, xyl-1), 4,13 (1H, m, H-5), 3,72 (1H, dd, J=11,4, 6Hz xyl-5e), 3,27 (1H, m, xyl-4), 3,07-2,50 (8H tổng cộng, H-1,2,4,7), 1,66-1,59 (2H tổng cộng, m, H-6).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆+D₂O): δ 28,4 (C-1), 30,3 (C-7), 39,7 (C-6), 44,9 (C-2), 47,2 (C-4), 65,8 (xyl-5), 69,5 (xyl-4), 74,3 (xyl-2), 76,6 (C-5, xyl-3), 102,6 (xyl-1), 115,4 (C-2', C-2''), 115,6 (C-5'), 115,7 (C-5''), 118,8 (C-6', C-6''), 132,9 (C-1'), 133,0 (C-1''), 143,1 (C-4', C-4''), 145,8 (C-3''), 145,9 (C-3'), 209,0 (C-3).

(6) Xác định hoạt tính tẩy gốc tự do DPPH

Việc xác định hoạt tính tẩy gốc tự do DPPH được thực hiện theo phương pháp của Hatano và các đồng tác giả (28). Cụ thể là, 1,9 ml dung dịch 0,1 mM DPPH (99,5% etanol) được bổ sung vào 100 μ l dung dịch (đối chứng: 99,5% etanol) thu được bởi việc chuẩn bị mẫu ở mỗi nồng độ. Mỗi mẫu được tạo ra với năm nồng độ. Mỗi dung dịch mẫu được lắc bằng bộ trộn xoáy trong 10 giây, và sau đó được ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, hệ số hấp thụ ở 492 nm được đo bằng máy quang phổ. Để làm thuốc đối chứng dương, axit L-ascorbic được chuẩn bị với năm nồng độ, và hệ số hấp thụ của nó được đo. Hoạt tính chống oxy hóa của từng mẫu được thể hiện theo trị số IC_{50} (nồng độ cần thiết để ức chế sự hình thành gốc DPPH 50%).

(7) Xác định hoạt tính tẩy gốc tự do ABTS

Hoạt tính tẩy gốc tự do ABTS được xác định bằng cách cải biến phương pháp của Re và các đồng tác giả (29). Thuốc thử ABTS (Sigma Co. USA) được hòa tan trong nước cất, nhờ đó tạo ra dung dịch 7,0 mM của ABTS, và kali persulfat (Sigma Co. USA) được hòa tan trong nước cất, nhờ đó tạo ra dung dịch 2,45 mM của kali persulfat. hai dung dịch này được trộn với tỷ lệ 1:1 và được để trong tối trong 12 tới 16 giờ, nhờ đó tạo ra dung dịch nguyên liệu gốc. Dung dịch nguyên liệu đã chuẩn bị này được pha loãng bằng chất đệm PBS (độ pH = 7,4), và hệ số hấp thụ ở 750 nm được đo, nhờ đó tạo ra dung dịch loãng có trị số hệ số hấp thụ nằm trong khoảng từ 0,7 đến 1,0. Mẫu đã được chuẩn bị ở mỗi nồng độ, được bổ sung vào đĩa 96 lỗ, và được phản ứng với mẫu: tỷ lệ phản ứng ABTS là 1:9 trong 30 phút trong tối. Sau khi hoàn thành phản ứng, hệ số hấp thụ ở bước sóng 750 nm được đo.

(8) Nuôi cấy các tế bào đại thực bào của chuột RAW 264.7

Các tế bào đại thực bào của chuột RAW 264.7 được lấy ở trạng thái đông lạnh từ ngân hàng dòng tế bào Hàn Quốc. Ampun chứa các tế bào ngay lập tức được làm tan băng trong nước ấm (30 tới 40°C), và DMSO đã được thêm vào trong quy trình làm đông khô được loại bỏ bằng cách sử dụng môi trường DMEM chứa 10% FBS (huyết thanh thai bò), penixilin G (100 IU/mL) và streptomycin (100 µg/mL). 5 mL DMEM được bổ sung vào các tế bào RAW 264.7 đã loại bỏ DMSO mà sau đó được nuôi cấy trong tủ áp đồng thời duy trì nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Các tế bào này được nuôi cấy trong khoảng thời gian 1 tới 2 ngày tùy thuộc vào mức độ tăng trưởng của các tế bào.

(9) Nuôi cấy các tế bào RBL-2H3

Các tế bào RBL-2H3 được mua từ hãng American Type Culture Collection (ATCC, USA), và được nuôi cấy trong môi trường được tạo ra bởi việc thêm 2 mM L-glutamin (Gibco, USA) vào DMEM (môi trường Eagle đã được cải biến bởi Dulbecco; Gibco, USA) chứa 15% huyết thanh bào thai bò (FBS; Gibco, USA) và 100 đơn vị/ml của penixilin-streptomycin (Gibco, USA). Môi trường tăng trưởng được thay thế sau mỗi 2-3 ngày và được duy trì ở điều kiện 37°C và 5% CO₂.

(10) Thử nghiệm MTT

Trong thử nghiệm này, thử nghiệm MTT được thực hiện để xác định độc tính tế bào của chiết phẩm etanol của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây đối với các tế bào RAW 264.7 và các tế bào RBL-2H3 và nồng độ xử lý của chiết phẩm cần được sử dụng trong thử nghiệm (30).

(11) Xác định hoạt tính ức chế sự sản xuất nitric oxit (NO)

hoạt tính ức chế sự sản xuất nitric oxit (NO) được xác định bởi phương pháp của Griess (31, 32). Cụ thể là, thuốc thử Griess (1% sulfanilamin, 0,1% N-(1-naphtyl)-etylen diamine dihydroclorua, và 2,5% H_3PO_4) được sử dụng, NO được oxy hoá thành NO_2 , NO_2 đã tạo ra được xác định bằng cách đo hệ số hấp thụ ở 540 nm, và nồng độ của nó được xác định bằng cách sử dụng đường cong chuẩn của NaNO_2 . Cụ thể là, các tế bào RAW 264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM với mật độ 5×10^4 tế bào trên 1 mL môi trường, và tiếp đó được pha loãng tới nồng độ tế bào 1×10^4 tế bào trên 1 mL. 160 μL dịch pha loãng tế bào được thêm vào từng lỗ của đĩa 96 lỗ và được nuôi cấy trong 2 giờ để sao cho các tế bào được gắn vào. Tiếp đó, 20 μL mỗi mẫu chứa 10 μL LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) được thêm vào từng lỗ và được ủ trong 20 giờ, và sau đó lượng NO đã tạo ra trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng cách sử dụng thuốc thử Griess.

(12) Thử nghiệm β -hexosaminidaza

Để gieo hạt tế bào, các tế bào RBL-2H3 được treo trong DMEM chứa 10% FBS, và sau đó được phân vào đĩa 24 lỗ với mật độ tế bào 2×10^5 tế bào/mL. Để làm nhạy tế bào, các tế bào đã phân này được làm nhạy bằng 500 ng/mL IgE kháng DNP (đinitrophenol) và được nuôi cấy trong tủ áp ở 37°C trong 5% CO_2 trong 12 giờ. Để làm hoạt hóa tế bào, các tế bào của mỗi lỗ được rửa hai lần bằng chất đệm Siraganian (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,4 mM MgCl_2 , 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, độ pH = 7,2), và sau đó chiết phẩm này được bổ sung vào chất đệm Siraganian (chứa 5,6 mM glucoza, 1 mM CaCl_2 , 0.1% BSA) ở mỗi nồng độ cho mỗi lỗ. Tiếp đó, các tế bào được nuôi cấy trong tủ áp ở 37°C trong 5% CO_2 trong 30 phút, và được xử lý và cho phản ứng với 100 ng/mL albumin huyết thanh của người đã liên hợp đinitrophenol ((DNP-HSA)-IgE đặc thù) trong 10 phút, và tiếp đó được để yên trong bể đá trong 10

phút để dừng phản ứng. Dịch nổi bên trên thu được được ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 3 phút, và tiếp đó 30 μ L dịch nổi bên trên này được chuyển vào đĩa 96 lỗ, và tiếp đó một lượng tương đương của chất đệm nền (1 mM 4-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminat, 0,1 M chất đệm xitrat, độ pH = 4,5) được thêm vào và được cho phản ứng ở 37°C trong 1 giờ. Tiếp đó, phản ứng này được dừng bằng cách thêm vào 200 μ L chất đệm 0,1M cacbonat. Hệ số hấp thụ ở 405 nm được đo bằng máy đọc đĩa (TECAN, Salzburg, Austria) (33).

(13) Xử lý thống kê

Các kết quả thử nghiệm của nghiên cứu này được niều thị theo trị số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của ba phép đo được lặp lại. Phép phân tích phương sai được thực hiện để kiểm tra sự sai lệch chuẩn giữa các nồng độ thử nghiệm, và nếu thấy có sự sai lệch đáng kể, thì sự sai lệch này giữa các nồng độ sẽ được phân tích bởi thử nghiệm HSD 34 của Tukey. Phép xử lý thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng SPSS (gói thông kê dùng cho khoa học, phiên bản 24.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA), và mức ý nghĩa được thiết lập ở $\alpha = 0,05$.

2. Các kết quả thử nghiệm

(1) Nhận diện cấu trúc của oregonin

Oregonin cuối cùng được nhận diện bởi việc xác nhận sự hiện màu do dung dịch 10%-H₂SO₄ và FeCl₃ gây ra trên đĩa TLC và các dữ liệu phổ ¹H, ¹³C-NMR và MS phù hợp với các dữ liệu đã được công bố trong các ấn phẩm hiện có (35) (Fig.1).

(2) Phân tích hàm lượng của oregonin trong mỗi chiết phẩm

Việc phân tích định lượng về sự thay đổi hàm lượng của oregonin bởi phương pháp chiết được thực hiện bằng cách sử dụng HPLC như sau. Nhằm tìm ra các điều kiện dung môi phát triển tối ưu bằng cách sử dụng cột đảo pha C18, H₂O và axetonitril làm pha động được trộn với nhau với các tỷ lệ khác nhau và độ phân giải của từng hỗn hợp được đo và kiểm tra. Kết quả là, các điều kiện dung môi được phân tích kỹ với chế độ gradien từ H₂O : axetonitril = 90 : 10 tới H₂O : axetonitril = 60 : 40 sau 24 phút, và bước sóng hấp thụ cực đại xuất hiện ở 280 nm. Trong các điều kiện như vậy, điều đã được xác nhận là các mẫu dung dịch chuẩn chứa các nồng độ khác nhau (100 tới 1000 ppm) của oregonin có thời gian lưu đáng kể (RT). Trên cơ sở sắc ký đồ HPLC thu được (Fig.2), đường cong chuẩn được xây dựng theo mối liên quan giữa vùng pic thu được và nồng độ. Kết quả là, trong khoảng nồng độ từ 100 tới 1000 ppm, phương trình hồi quy tuyến tính có $y = 2485,5x - 19996$, và trị số R bình phương bằng 0,9987, tiệm cận 1,0, và do đó độ tuyến tính của đường cong chuẩn được ghi nhận (Fig.3). Ngoài ra, có thể xác nhận rằng thời gian lưu của oregonin chuẩn gần giống như thời gian lưu của mẫu phân tích đối với mỗi chiết phẩm (Bảng 3).

Bảng 3

Mẫu	Thời gian lưu (phút)
Oregonin	15,462±0,19
Chiết phẩm nước nóng từ <i>Alnus sibirica</i>	15,050±0,15
Chiết phẩm etanol 60% từ <i>Alnus sibirica</i>	15,129±0,14
Chiết phẩm etanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ <i>Alnus sibirica</i>	15,094±0,12
Phân chiết etyl axetat của chiết phẩm etanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ <i>Alnus sibirica</i>	15,020±0,16

Từ sắc ký đồ của mỗi chiết phẩm, thu được bởi phép phân tích HPLC, hàm lượng của oregonin trong mỗi chiết phẩm được xác định bằng đường cong chuẩn bằng dung dịch chuẩn của oregonin được tách từ cành cây *Alnus sibirica* gồm cả vỏ. Kết quả là, có thể thấy rằng hàm lượng của oregonin là 131,82±0,17

ppm trong chiết phẩm nước nóng và $280,27 \pm 0,14$ ppm trong chiết phẩm ethanol 60%. Đồng thời, hàm lượng của oregonin trong chiết phẩm ethanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn được phân tích, và kết quả đã xác nhận rằng hàm lượng của oregonin là $810,13 \pm 0,15$ ppm, tăng 614,57% so với chiết phẩm nước nóng và tăng 289,05% so với chiết phẩm ethanol 60% thông thường, và do đó phương pháp theo sáng chế là phương pháp chiết hàm lượng rất cao của oregonin so với phương pháp chiết thông thường (xem Fig.4, Fig.5, Fig.6A và Fig.6B và Bảng 4 sau đây).

Bảng 4

Mẫu	Hàm lượng (ppm)
Oregonin	
Chiết phẩm nước nóng từ <i>Alnus sibirica</i>	$131,82 \pm 0,17$
Chiết phẩm ethanol 60% từ <i>Alnus sibirica</i>	$280,27 \pm 0,14$
Chiết phẩm ethanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ <i>Alnus sibirica</i>	$810,13 \pm 0,15$
Phân chiết etyl axetat của chiết phẩm ethanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ <i>Alnus sibirica</i>	$986,51 \pm 0,16$

(3) Các kết quả TLC

Fig.7 thể hiện các kết quả TLC của các chiết phẩm khác nhau từ cành cây *Alnus japonica*.

(3) Các hoạt tính tẩy gốc tự do DPPH và ABTS

Nhằm kiểm tra hoạt tính chống oxy hóa của chiết phẩm ethanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn (AJSCFR) và của phân chiết etyl axetat của nó (AJSCFRETA) từ cành cây *Alnus sibirica* gồm cả vỏ, hoạt tính chống oxy hóa được xác định bởi hai phương pháp thử nghiệm (các phương pháp đánh giá hoạt tính tẩy gốc DPPH và hoạt tính tẩy gốc ABTS) (đối chứng dương: vitamin C). Trong các kết quả thử nghiệm, khi IC_{50} được so sánh giữa các mẫu, chiết phẩm ethanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus sibirica* (AJSCFR) được

đánh giá để có hoạt tính tẩy gốc DPPH là $28,62 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$ và hoạt tính tẩy gốc ABTS là $12,82 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$, và phần chiết dung môi etyl axetat (AJSCFREA) của chiết phẩm etanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus sibirica* được đánh giá để có hoạt tính tẩy gốc DPPH là $7,01 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ và hoạt tính tẩy gốc ABTS là $4,53 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$. Đối chứng dương vitamin C được đánh giá để có hoạt tính tẩy gốc DPPH là $15,87 \pm 0,25 \mu\text{g/ml}$ và hoạt tính tẩy gốc ABTS là $8,35 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$. Trong khoảng nồng độ được sử dụng trong mỗi thử nghiệm, điều đã được xác nhận là hoạt tính tẩy gốc DPPH về mặt thống kê không khác nhau đáng kể giữa nhóm đối chứng dương và nhóm thử nghiệm ở nồng độ cao nhất ($100 \mu\text{g/mL}$) được sử dụng trong thử nghiệm này, và hoạt tính tẩy gốc ABTS về mặt thống kê không khác nhau đáng kể giữa nhóm đối chứng dương và nhóm thử nghiệm ở hai nồng độ (50 và $100 \mu\text{g/mL}$) trong số các nồng độ được sử dụng trong thử nghiệm này. Do đó, có thể thấy rằng khi nồng độ của mỗi chiết phẩm hoặc phần chiết của nó tăng, thì mọi chiết phẩm hoặc phần chiết của nó đều có hoạt tính chống oxy hóa tương đương hoặc mạnh hơn nhiều so với hoạt tính chống oxy hóa của đối chứng dương (xem các Fig.8 và Fig.9).

(4) Hoạt tính tẩy nitric oxit (NO)

Việc NO được sản sinh quá mức trong cơ thể người sẽ có tác dụng bất lợi bởi vì nó làm trầm trọng thêm phản ứng viêm của các bệnh viêm khác nhau trong cơ thể người, đặc biệt là các bệnh miễn dịch khó chữa như viêm khớp dạng thấp và viêm da dị ứng. Việc ức chế sự sản sinh NO do phản ứng viêm gây ra đã được biết đến là một giải pháp quan trọng về phương pháp trị liệu đối với các bệnh viêm mãn tính (36). Nhằm xác nhận khả năng của chiết phẩm etanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus sibirica* như một loại nguyên

liệu tự nhiên mới để chữa các bệnh miễn dịch khó chữa, một thử nghiệm về hoạt tính ức chế sự sản sinh NO do LPS gây ra được thực hiện bằng cách sử dụng dòng tế bào đại thực bào Raw 264.7. Trước khi thử nghiệm về hoạt tính ức chế sự sản sinh NO, chiết phẩm etanol có thể được kiểm tra bằng thử nghiệm MTT trong một khoảng nồng độ (1 tới 50 $\mu\text{g/mL}$) để xem liệu có độc tính hay không để sử dụng trong thử nghiệm. Kết quả là, như được thấy trên Fig.10, về mặt thống kê không thấy có độc tính tế bào đáng kể trong tất cả các nhóm thử nghiệm. Tuy nhiên, thực tế là chiết phẩm etanol dường như có độc tính ở nồng độ thử nghiệm cao nhất (50 $\mu\text{g/mL}$), hoạt tính tẩy NO được xác định trong khoảng nồng độ từ 1 tới 20 $\mu\text{g/mL}$ trong thử nghiệm đo NO. Fig.11 thể hiện các kết quả xác định hoạt tính tẩy NO. Ở các nồng độ 10 và 20 $\mu\text{g/mL}$ nằm trong số các nồng độ được sử dụng trong thử nghiệm này, điều đã được xác nhận là hoạt tính tẩy NO của chiết phẩm etanol về mặt thống kê là đáng kể so với hoạt tính tẩy NO của nhóm do LPS gây ra là nhóm đối chứng âm, và hoạt tính tẩy NO của chiết phẩm etanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus sibirica* là mạnh hơn rất nhiều so với hoạt tính tẩy NO của nhóm đối chứng thông thường. Do đó, có thể thấy rằng chiết phẩm theo sáng chế có thể được phát triển thành một loại vật liệu mới có nguồn gốc từ sản phẩm tự nhiên có hoạt tính kháng viêm, và đặc biệt là có thể được sử dụng làm vật liệu chức năng có khả năng áp dụng được cho các bệnh miễn dịch viêm mãn tính.

(5) Đánh giá hiệu quả chống dị ứng bởi việc ức chế sự thoái hóa β -hexosaminidase

Để khẳng định tác dụng chống dị ứng của chiết phẩm etanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus sibirica*, độc tính tế bào của chiết phẩm etanol trong khoảng nồng độ từ 1 $\mu\text{g/mL}$ (nồng độ thấp nhất) tới 20 $\mu\text{g/mL}$

(nồng độ cao nhất) được xác định bằng thử nghiệm MTT bằng cách sử dụng các tế bào RBL-2H3. Từ các kết quả thử nghiệm, có thể xác nhận rằng, với mỗi nồng độ thử nghiệm được sử dụng trong phép phân tích β -hexosaminidaza, chiết phẩm etanol không có độc tính đối với các tế bào RBL-2H3 (Fig.12). Phép phân tích β -hexosaminidaza được thực hiện ở các nồng độ thử nghiệm không gây độc tính, và kết quả đã xác nhận rằng, ở hai nồng độ (10 và 20 $\mu\text{g/mL}$) không gây độc tính, chiết phẩm etanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus sibirica* về mặt thống kê đã ức chế một cách đáng kể sự tiết β -hexosaminidaza ở nồng độ 20 $\mu\text{g/mL}$ khi so với hai nhóm khác (đối chứng thông thường và đối chứng âm) (Fig.13). Từ các kết quả trên, điều đã được xác nhận là chiết phẩm etanol 60% của cặn chiết siêu tới hạn từ cành cây *Alnus sibirica* về mặt thống kê có hoạt tính đáng kể về khả năng ức chế sự tiết β -hexosaminidaza. Chiết phẩm này rất có khả năng để phát triển thành một loại nguyên liệu mới có nguồn gốc từ sản phẩm tự nhiên liên quan đến bệnh dị ứng trong tương lai.

Các dấu hiệu và các ưu điểm của sáng chế được tóm tắt như sau:

- (i) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chiết phẩm rượu và phần chiết dung môi của nó từ cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ, giàu oregonin.
- (ii) Chiết phẩm và phần chiết được tạo ra từ cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sủ bởi phương pháp theo sáng chế giàu oregonin, và có hoạt tính chống dị ứng và chống oxy hoá rất mỹ mãn.
- (iii) Chiết phẩm và phần chiết được tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế có thể được dùng làm hoạt chất trong các thuốc chống dị ứng và các thực phẩm.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả một cách chi tiết có viện dẫn tới các dấu hiệu cụ thể, song điều rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này phần mô tả chỉ liên quan đến phương án được ưu tiên, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi của sáng chế sẽ

được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo và các phương án tương đương của chúng.

Các tài liệu trích dẫn

1. Lee, Y. N.: Flora of Korea, Kyohak Publishing, Seoul (1997).
2. Lee, W. C. (1996) Lineamenta florae Koreae, Academy Publishing, Seoul, p154.
3. Karches. J. J. and Laever. A. M. L. (1974) Structure of oregonin, a natural diarylheptanoid xyloside. J. C. S. chem. 16: 649-650.
4. Choi, S.E. (2013) Chemotaxonomic significance of oregonin in *Alnus* species. Asian J. Chem. 25: 6989-6990.
5. Asakawa, Y. (1971) Chemical constituents of *Alnus sieboldiana*(Betulaceae) II. The isolation and structure of flavonoids and stilbenes. Bull. Chem. Soc. Jpn. 44: 2761-2766.
6. Lee, M. W., Tanaka, T., Nonakr, G. I. and Nishioka, I. (1992) Dimeric ellagitannins from *Alnus japonica*. Phytochemistry, 31, 2835-2839.
7. Lim, H. W., Kim, M. K., Kim, H. J., Shim, J. G., Kim, G. H., Choi, H. K. and Lee, M. W. (2004) Quantitative Determination of Diarylheptanoid Compounds from Korean *Alnus*, Kor. J. Pharmacogn. 35: 384-387.
8. Lee, K. K., Bahler, B. D., Hofmann, G. A., Mattern, M. R., Johnson, R. K. and Kingston, D. G. I. (1998) Isolation and structure elucidation of new PKC α inhibitor from *Pinus flexilis*. J. Nat. Prod. 61: 1407-1409.
9. Ohta, S., Aoki, T., Hirata, T. and Suga, T. (1984) The structures of four diarylheptanoid glycosides from the female flowers of *Alnus serrulatoides*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 8: 1635-1642.
10. Suga, T., Ohta, S., Hirata, T. and Aoki, T. (1982) The absolute

configuration of diarylheptanoid xyloside, oregonin, isolated from the female flowers of *Alnus serrulatoidea*. Chem. Lett. 11: 895-898.

11. Karchesy, J. J., Laver, M. L., Barofsky, D. F. and Barofsky, E. (1974) Structure of oregonin, a natural diarylheptanoid xyloside. Chem. Commun. 16: 649-650.

12. Guz, N. R., Lorenz, P. and Metraux, J. P. (2002) Oregonin from the bark of European *Alnus* species. Biochem. Syst. Ecol. 30: 471-474.

13. Aoki, T., Ohta, S. and Suga, T. (1990) Triterpenoids, diarylheptanoids and their glycosides in the flowers of *Alnus* species, Phytochemistry, 23: 3611-3614.

14. Choi, H. N., Joung, S. W., Jin, H. Y. and Choi, S. E. (2016) Oregonin from the barks and xylems of Chinese *Alnus* species. J. Chem. Pharm. Res. 8: 295-298.

15. Choi, S. E., Park K. H., Kim, M. H., Song, J. H., Jin, H. Y. and Lee, M. W. (2012) Diarylheptanoids from the Bark of *Alnus pendula* Matsumura. Nat. Prod. Sci. 18: 106-110.

16. Ko, E. K., Choi, H. N., Jin, H. Y. and Choi, S. E. (2015) Oregonin from the stems and leaves of Korean *Alnus* species (Betulaceae). J. Chem. Pharm. Res. 7: 234-238.

17. Sin, S. J. and Ahn, W. Y. (1991) Some Triterpenoids in Bark of Korean Water Alder, *Alnus Hirsuta* Ruprecht. J. Kor. For. En. 11: 36-44.

18. Sheth, K., Bianchi, E., Wiedhopf, R. and Cole, J. R. (1973) Antitumor agents from *Alnus oregona* (Betulaceae). J. Pharm. Sci. 62: 139-140.

19. Kawai, N., Ando, Y. U., Ando, Y. O. and Nishibe, Y. (1990) Extraction of antimutagenic tannins from *Alnus firma* plant. Patent-Japan Kokai Tokyo Koho-O2 117, 685.

20. Saxena, G., Farmer, S., Hancock, R. E. W. and Towers, G. H. N. (1995) Antimicrobial compounds from *Alnus rubra*. *Int. J. Pharmacogn.* 33: 33-36.
21. Lee, D. I., Chang, J. K., Lee, M. W. and Hong, S. G. (1998) Effects of oregonin, diarylheptanoid derivative from plant on antitumor. *Chung-Ang J. Pharm. Sci.* 12: 67-72.
22. Lee, M. W., Kim, N. Y., Park, M. S., Ahn, K. H., Toh, S. H., Hahn, D. R., Kim, Y. C. and Chung, H. T. (2000) Diarylheptanoids with in vitro inducible nitric oxide synthesis inhibitory activity from *Alnus hirsuta*. *Planta. Med.* 66: 551-553.
23. Lee, M. W., Kim, J. H., Jeong, D. W., Ahn, K. H., Toh, S. H. and Surh, Y. J. (2000) Cyclooxygenase-2 inhibitory effect of diarylheptanoids from the barks of *Alnus hirsuta* var. *sibirica*. *Bio. Pharm. Bull.* 23: 517-518.
24. Lee, Y. A., Jeong, D. W., Kim, K. H., Kim, J. S., Kim, S. W. and Lee, M. W. (2000) Antioxidant activity of diarylheptanoids from the leaves of *Alnus hirsuta*. *Yakhak Hoeji* 47: 193-196.
25. Yamazaki, R., Aiyama, R., Matsuzaki, T., Hashimoto, S. and Yokokura, T. (1998) Anti-inflammatory effect of YPE-01, a novel diarylheptanoid dervative, on dermal inflammation in mice. *Inflamm. Res.* 47: 182-186.
26. Choi, S. E., Jeong, M. S. Kang, M. J., Lee, D. I., Joo, S. S., Lee, C. S., Bang, H., Lee, M. K., Myung, S. C., Choi, Y. W., Lee, K., Seo, S. J. and Lee, M. W. (2010) Effect of topical application and intraperitoneal injection of oregonin on atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Exp. Dermatol.* 19: 37-43.
27. Lee, G. H., Park, K. H. and Choi, S. E. (2018) Modulative effect of human hair dermal papilla cell apoptosis by oregonin from the braches of *Alnus*

japonica. Korean J. Plant Res. 31: 322-329.

28. Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T., and Okuda, T. (1989) Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, Chem. Pharm. Bull. 37: 2016-2021.

29. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine, 26, 1231-1237.

30. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival. Journal of Immunological Methods, 65, 55-63.

31. Feelisch, M. and Stamler, J. (1996) Methods in nitric oxide research, United Kingdom : John Wiley & Sons, Chichester, 492-497.

32. Park, S. Y., Hong, S. S., Han, X. H., Ro, J. S. and Hwang, B. Y. (2005) Inhibitory constituents of LPS-induced nitric oxide production from *Arctium lappa*, Natural Product Sciences, 11, 85-88

33. Matsubara, M., Masaki, S., Ohmori, K., Karasawa, A. and Hasegawa, K. (2004) Differential regulation of IL-4 expression and degranulation by anti-allergic olopatadine in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. Biochemical Pharmacology, 67, 1315-1326.

34. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. (1980) Principle and procedures of statistics. 1st ed. Kogakusha, Tokyo, Japan : McGraw-Hill 187- 221.

35. Kim, H.J., K.H. Kim, S.H. Yeom, M.K. Kim, J.G. Shim, H.W. Lim and M.W. Lee. 2005. New diarylheptanoids from the barks of *Alnus japonica* Steudel, Chin. Chem. Lett. 16, 1337-1340.

36. Kharitonov, S. A., Yates, D., Robbins, R. A., Logan-Sinclair, R., Shinebourne, E. A. and Barnes, P. J. (1994) Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *The Lancet*, 343, 133-135.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp sản xuất chiết phẩm chứa oregonin bao gồm các bước:
 - (a) chiết siêu tới hạn cây tổng quán sử để thu được cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sử; và
 - (b) tạo ra chiết phẩm rượu của cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sử thu được.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó rượu là rượu thấp ngậm nước hoặc khan có 1 tới 4 nguyên tử cacbon.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó rượu là etanol.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước (c) tạo ra phần chiết dung môi của chiết phẩm rượu của cặn chiết siêu tới hạn từ cây tổng quán sử đã tạo ra.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó phần chiết dung môi là phần chiết thu được bằng cách chưng cất phần chiết bằng một hoặc nhiều dung môi được chọn từ nhóm bao gồm axeton, etyl axetat, clorofom, 1,3-butylen glycol, n-hexan, dietyl ete, butyl axetat, và điclorometan.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó phần chiết dung môi là phần chiết dung môi etyl axetat.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cây tổng quán sử là cành hoặc thân của cây tổng quán sử.

Fig.1

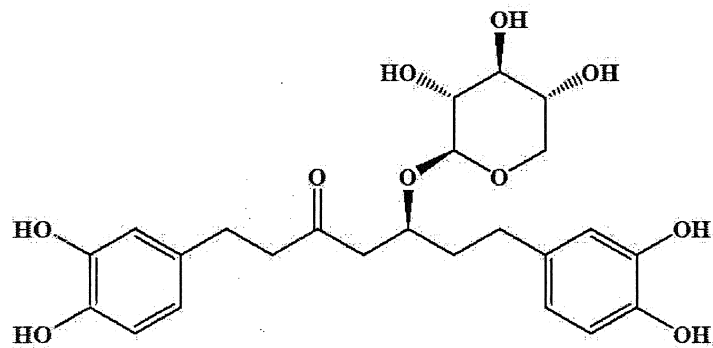
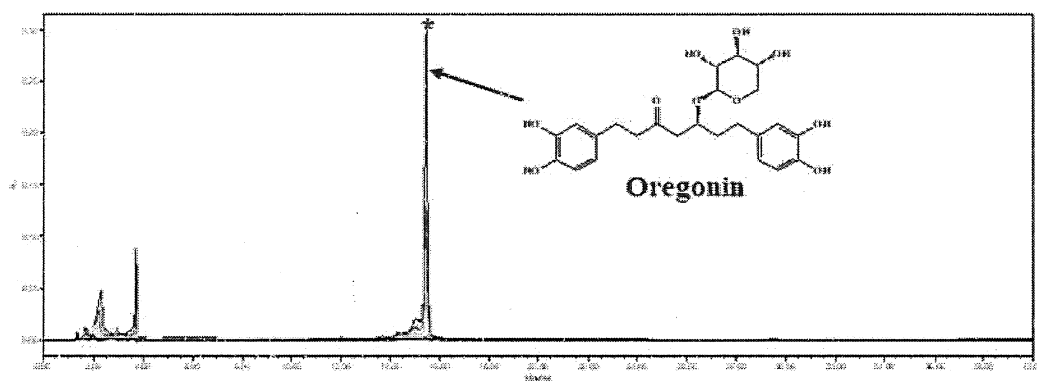


Fig.2



* Oregonin được phát hiện $15,462 \pm 0,19$ phút

Fig.3

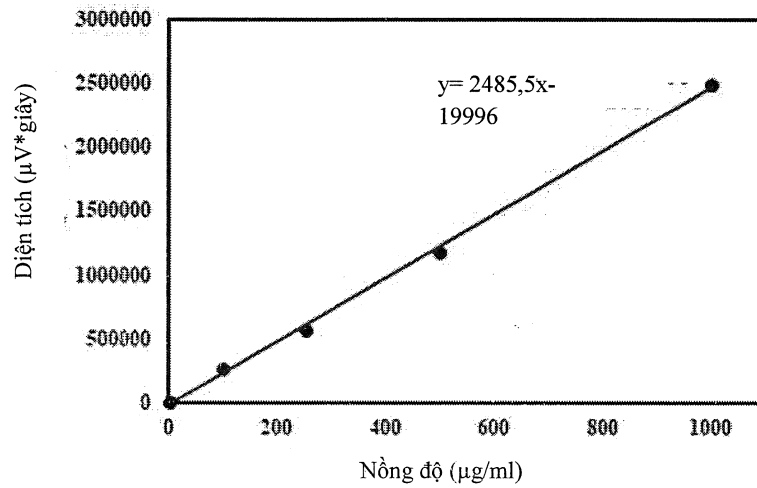


Fig.4

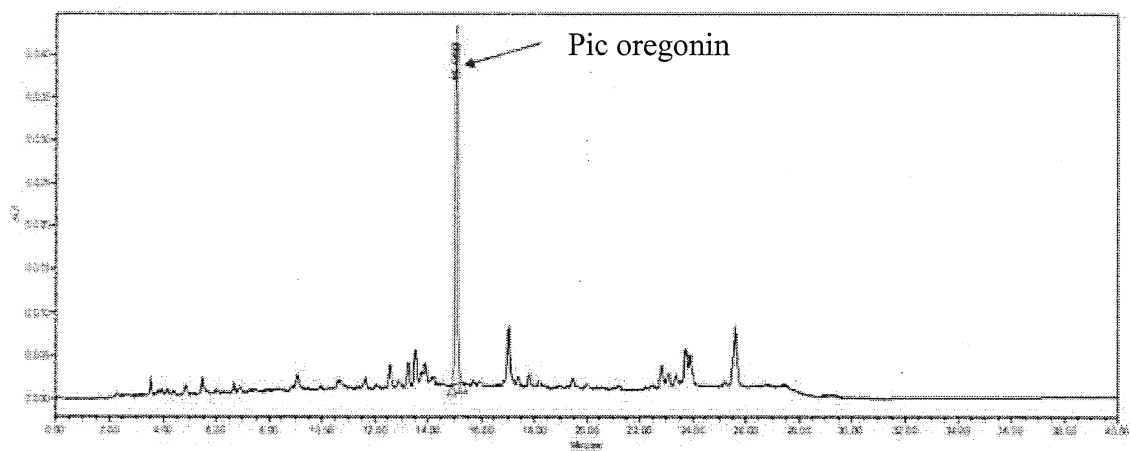


Fig.5

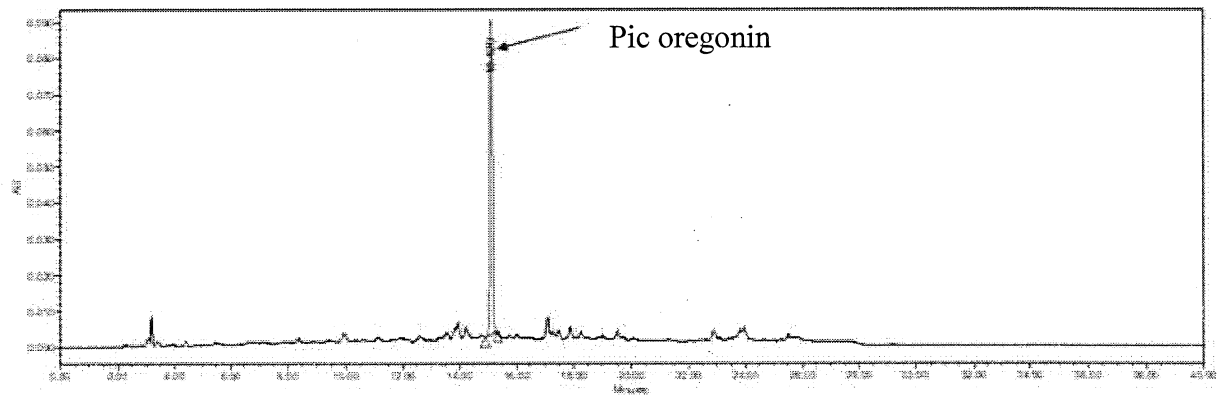


Fig.6A

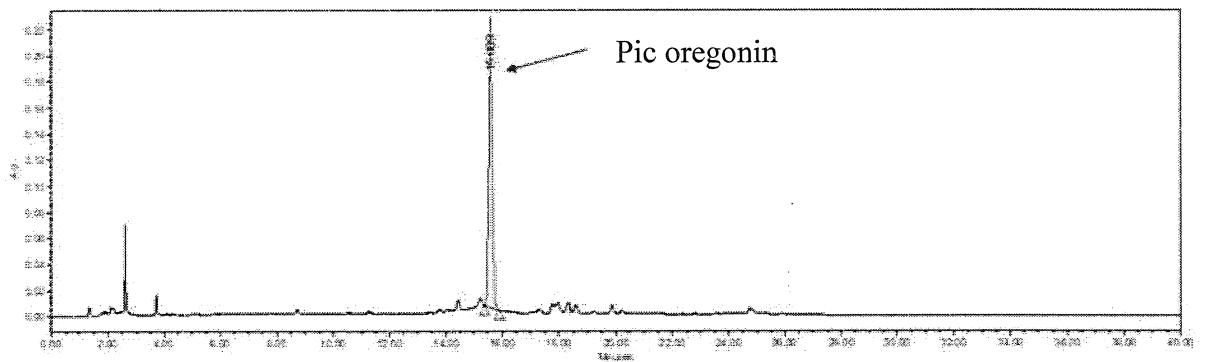


Fig.6B

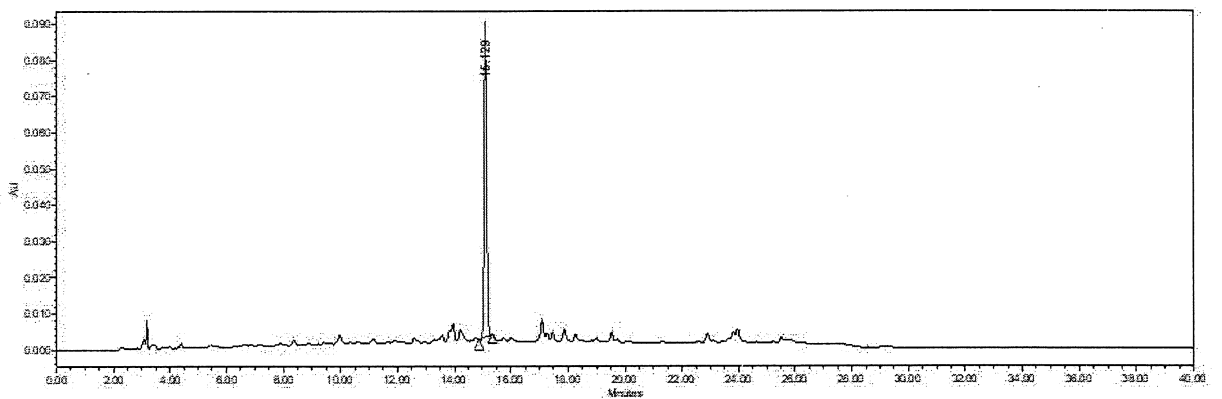


Fig.7

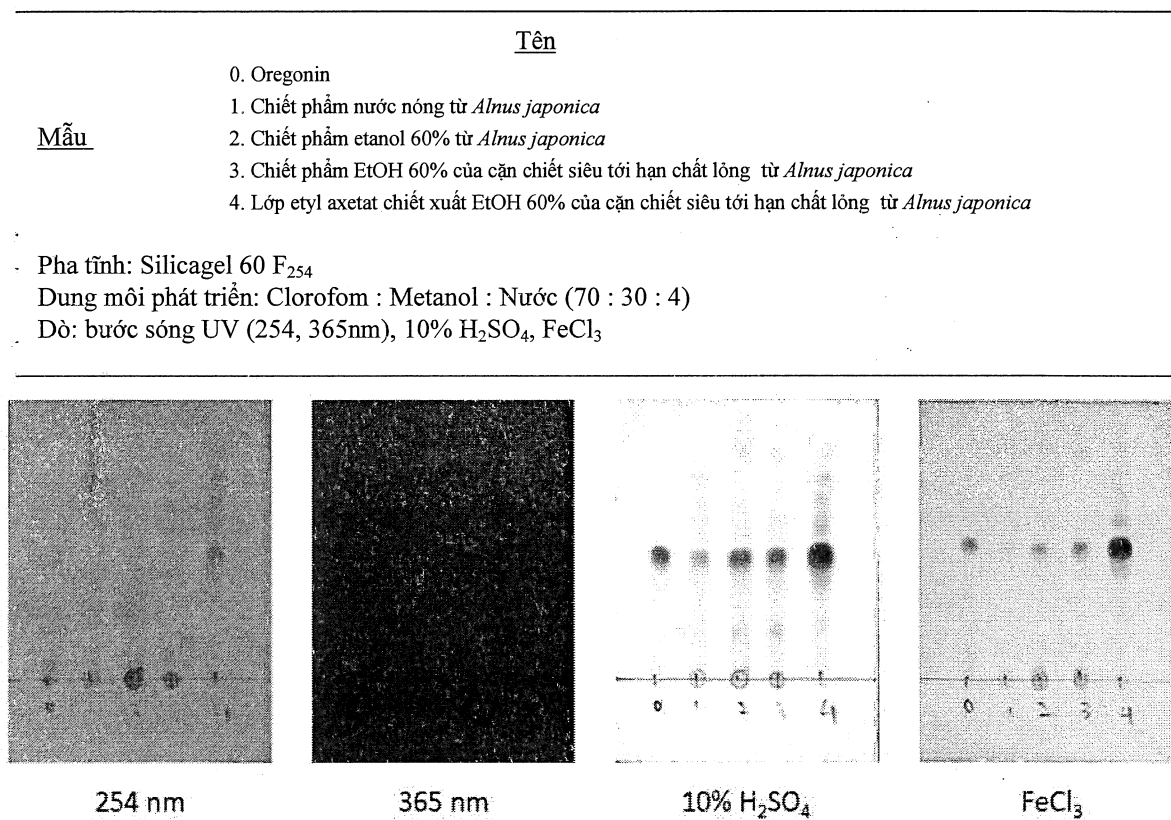
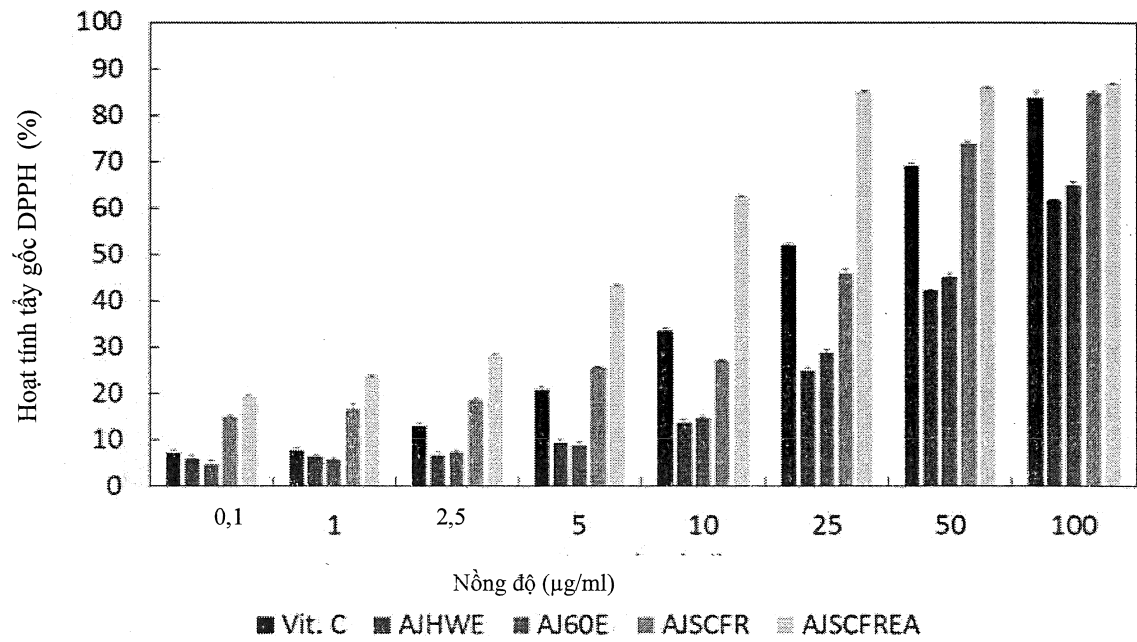
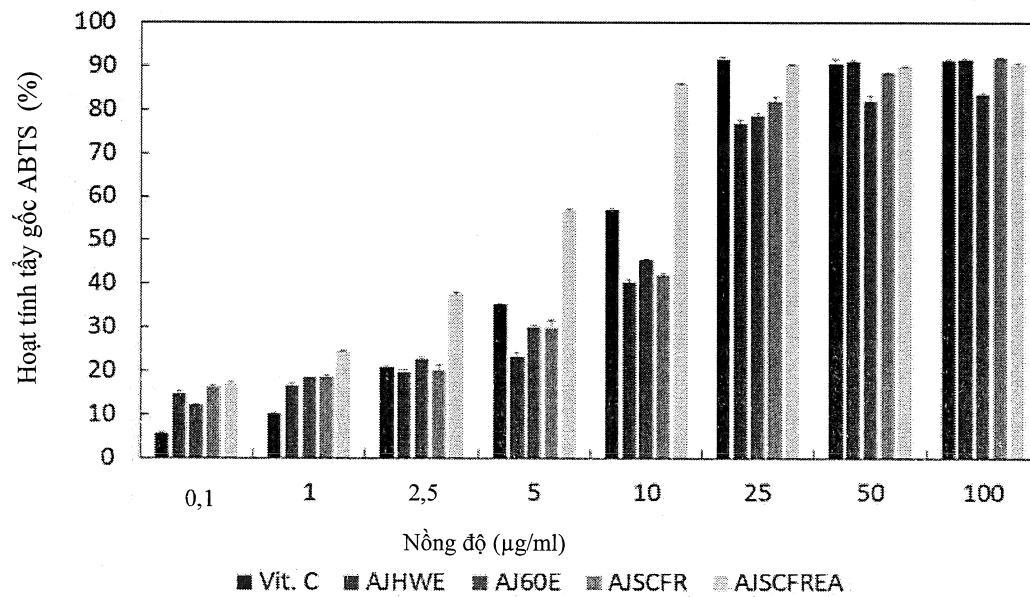


Fig.8

IC50:

Mẫu	VIT. C	AJHWE	AJ60E	AJSCFR	AJSCFREA
IC50 (µg/ml)	15,87±0,25	73,54±0,18	67,68±0,10	28,62±0,32	7,01±0,19

Fig.9

IC50

Mẫu	VIT. C	AJHWE	AJ60E	AJSCFR	AJSCFREA
IC50 (µg/ml)	8,35±0,15	14,39±0,04	13,18±0,11	12,82±0,17	4,53±0,11

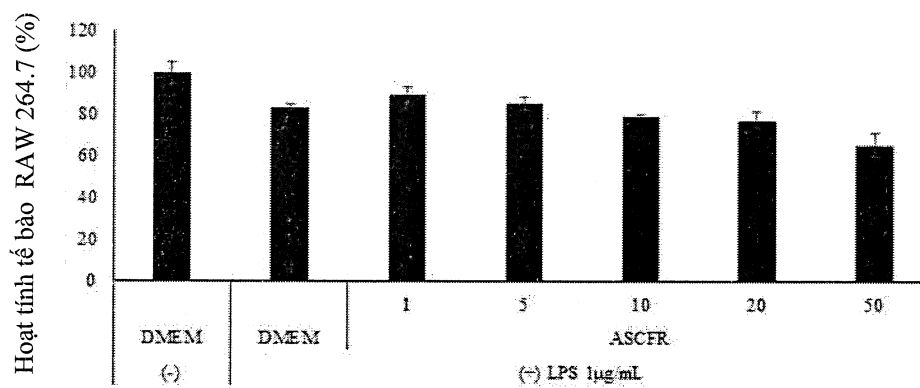
Fig.10

Fig.11

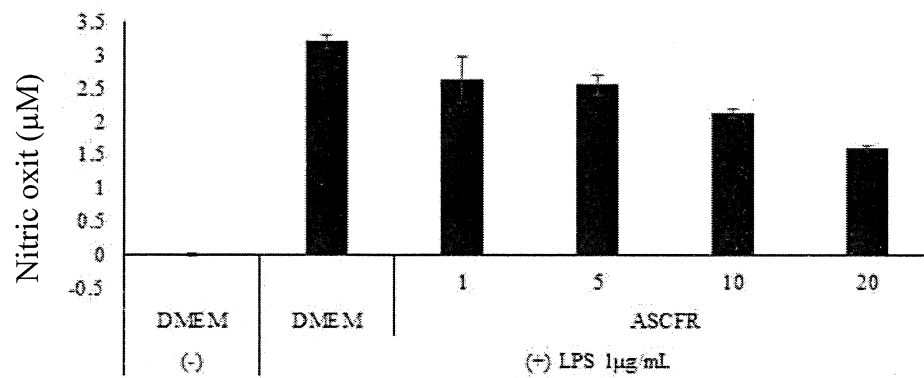


Fig.12

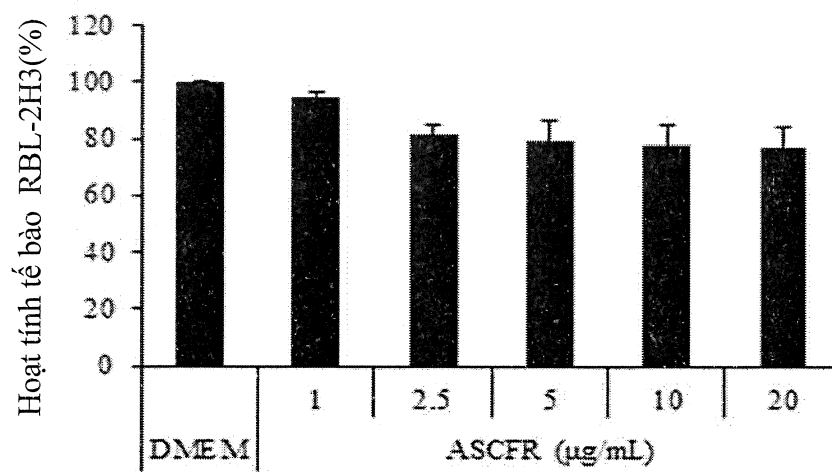


Fig.13