



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

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

(11)



2-0003548

(51) **A61K 36/48; C12P 1/02; A61P 17/02; A61K** (13) **Y**
2022.01 36/06

(21) 2-2022-00556

(22) 27/08/2018

(67) 1-2018-03785

(30) 106129466 30/08/2017 TW

(45) 25/03/2024 432

(43) 25/03/2019 372A

(73) KING'S GROUND BIOTECH CO., LTD. (TW)

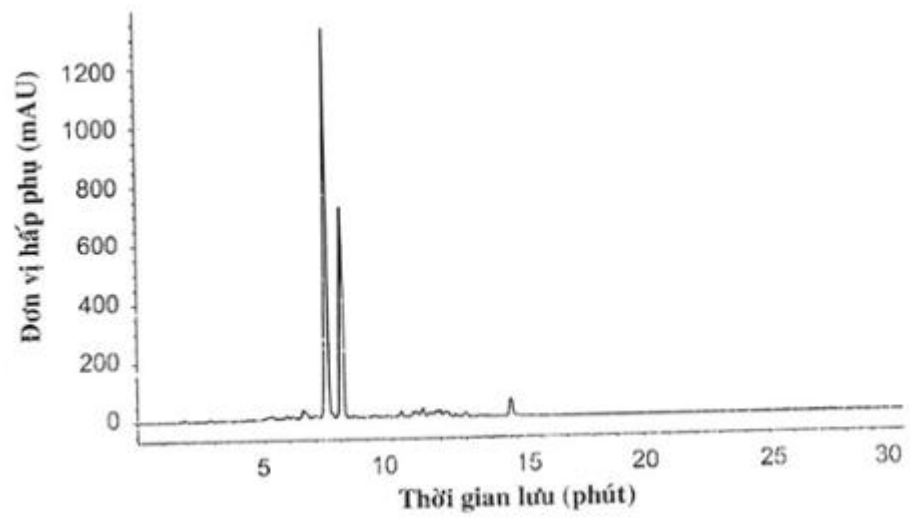
No. 3, Jianbang Rd., Neipu Township, Pingtung County, Taiwan

(72) HUANG, Chi-Tien (TW); YU, Feng-Ling (TW); HUANG, Hsin-Lun (TW); PI, Chia-Chen (TW); SUWANMANON, Kanintra (TH).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) **CHIẾT PHẨM TỪ ĐẬU XANH LÊN MEN, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA CHIẾT PHẨM NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp điều chế chiết phẩm từ đậu xanh lên men (*Vigna radiata*) bao gồm: cấy nấm *Aspergillus* vào môi trường nuôi cấy lỏng rồi nuôi *Aspergillus*, tiết trùng đậu xanh để tạo môi trường nuôi cấy rắn, cấy *Aspergillus* đã nuôi ở trên vào môi trường nuôi cấy rắn, và bổ sung nước vào môi trường nuôi cấy rắn và khuấy để thực hiện lên men; sấy khô và nghiền môi trường nuôi cấy rắn đã lên men để thu đậu xanh lên men; chiết xuất đậu xanh lên men bằng cách bổ sung etanol với thể tích gấp 5 đến 15 lần đậu xanh lên men để thu được chiết phẩm thô; thực hiện sắc ký bằng cách nạp chiết phẩm thô lên cột sắc ký, rửa giải với hỗn hợp dung môi gồm có nước và etanol ở tỷ lệ thể tích 4:1, sau đó rửa giải với hỗn hợp dung môi gồm có nước và etanol ở tỷ lệ thể tích 1:1 để thu được dịch rửa giải, và sau đó loại bỏ hỗn hợp dung môi ra khỏi dịch rửa giải để thu được chiết phẩm từ đậu xanh lên men. Ngoài ra giải pháp hữu ích còn đề cập đến chiết phẩm từ đậu xanh lên men được sản xuất theo phương pháp nêu trên và dược phẩm chứa chiết phẩm này có hiệu quả thúc đẩy sự liền lành vết thương.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp sản xuất, cụ thể là phương pháp sản xuất chiết phẩm từ đậu xanh lên men. Giải pháp hữu ích còn đề cập đến chiết phẩm từ đậu xanh lên men, cụ thể là chiết phẩm của đậu xanh (*Vigna radiata*) lên men được sản xuất bằng phương pháp nêu trên. Giải pháp hữu ích còn đề cập đến việc sử dụng chiết phẩm từ đậu xanh lên men để sản xuất dược phẩm thúc đẩy liền lành vết thương và dược phẩm thúc đẩy liền lành vết thương chứa chiết phẩm từ đậu xanh lên men này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Quá trình liền lành vết thương khá phức tạp bao gồm viêm, tăng sản mô xơ, hình thành mạch, lắng đọng collagen, biểu bì hóa và co miệng vết thương. Trong quá trình này, nhiều yếu tố tăng trưởng được tiết ra để thúc đẩy việc liền lành vết thương. Vì vậy, hiệu quả liền lành vết thương tốt là rút ngắn thời gian lên da non, và chất lượng da tốt sau khi liền cho thấy quá trình liền lành vết thương thành công.

Tại Đài Loan, số lượng bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường lên đến hơn một triệu người, và bệnh đái tháo đường xếp thứ tư trong mười nguyên nhân chính gây tử vong ở Đài Loan. Các vấn đề của bệnh đái tháo đường thường phức tạp với nhiều biến chứng mạn tính. Trong số đó, 6% bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường tuýp 2 gặp tình trạng máu kém lưu thông máu ở chân, dẫn đến tỷ lệ phải cắt bỏ là 1%, và bệnh đái tháo đường tuýp 2 chiếm khoảng 90% trong tổng số các bệnh nhân bị đái tháo đường, kèm theo các triệu chứng trao đổi chất kém, chẳng hạn như kháng insulin, không dung nạp glucoza, tăng insulin máu, tăng lipit máu, huyết áp cao, v.v.. Các bệnh nhân mắc đái tháo đường lâu năm thường mất cảm giác ở ngón chân do bị viêm dây thần kinh, dẫn đến không nhận thức được các tổn thương và chảy máu ở các ngón chân. Những vết thương ở ngón chân hoặc chi dưới, kết hợp với tổn thương mạch máu ngoại biên và collagen bất thường, rất khó liền lại và thường gây loét mãn tính. Ngoài ra, một khi vết thương không được điều trị đúng lúc, có thể cần phải được thực hiện cắt cụt trên đầu gối. Do đó, việc chăm sóc vết thương ở bệnh nhân đái tháo đường luôn là vấn đề cấp bách cần được giải quyết.

Với lý do này, cần cải thiện các giải pháp kỹ thuật hiện có để phát triển chất có tác

dụng thúc đẩy việc liên lành vết thương.

Để khắc phục hạn chế ở các giải pháp kỹ thuật hiện có, mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất phương pháp sản xuất chiết phẩm từ đậu xanh lên men để thúc đẩy liên lành vết thương.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để đạt được mục đích nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp sản xuất chiết phẩm từ đậu xanh lên men. Phương pháp bao gồm các bước: cấy nấm *Aspergillus* vào môi trường nuôi cấy lỏng rồi nuôi *Aspergillus*; tiệt trùng đậu xanh để tạo môi trường nuôi cấy rắn, cấy *Aspergillus* đã nuôi trong môi trường lỏng vào môi trường nuôi cấy rắn, và bổ sung nước vào môi trường nuôi cấy rắn và khuấy đều để lên men; sấy khô và nghiền nhỏ môi trường nuôi cấy rắn đã lên men để thu được đậu xanh lên men; chiết xuất đậu xanh lên men bằng cách bổ sung etanol với thể tích gấp từ 5 đến 15 lần lượng đậu xanh lên men (thể tích/trọng lượng) để thu được chiết phẩm thô; thực hiện sắc ký bằng cách nạp chiết phẩm thô lên cột sắc ký, rửa giải cột sắc ký với hỗn hợp dung môi chứa nước và etanol ở tỷ lệ thể tích 4:1 để thu được dịch rửa giải thứ nhất, rửa giải cột sắc ký với hỗn hợp dung môi chứa nước và etanol ở tỷ lệ thể tích 1:1 để thu được dịch rửa giải thứ hai, và loại bỏ hỗn hợp dung môi ra khỏi dịch rửa giải thứ hai để thu được chiết phẩm từ đậu xanh lên men.

Thuật ngữ “nhiệt độ phòng” theo giải pháp hữu ích là nhiệt độ có thể được hiểu là $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, đối với người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Tốt hơn là, ở bước cấy nấm *Aspergillus* vào môi trường nuôi cấy lỏng rồi nuôi *Aspergillus*, môi trường nuôi cấy lỏng bao gồm ít nhất nước và glucose. Tốt hơn là, môi trường nuôi cấy lỏng còn bao gồm fructoza, sucroza, pepton, cao nấm men hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng.

Tốt hơn là, ở bước cấy nấm *Aspergillus* vào môi trường nuôi cấy lỏng rồi nuôi *Aspergillus*, *Aspergillus* bao gồm *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus candidus*, và *Aspergillus sojae*.

Tốt hơn là, ở bước cấy *Aspergillus* vào môi trường nuôi cấy lỏng rồi nuôi *Aspergillus*, *Aspergillus* được cấy vào môi trường nuôi cấy lỏng ở tỷ lệ 5-10% thể tích, và được nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ $20-30^{\circ}\text{C}$, ở tốc độ quay 100-150 vòng/phút trong

thời gian 1-5 ngày.

Tốt hơn là, ở các bước cấy *Aspergillus* đã nuôi vào môi trường nuôi cấy rắn, bổ sung nước và khuấy đều để lên men, tỷ lệ môi trường nuôi cấy rắn:nước:*Aspergillus* là 1:1-3:0,05-0,12 (trọng lượng:thể tích:thể tích).

Tốt hơn là, ở các bước cấy *Aspergillus* đã nuôi vào môi trường nuôi cấy rắn, bổ sung nước và khuấy đều để lên men, các điều kiện lên men của môi trường nuôi cấy rắn đã cấy *Aspergillus* trong bể lên men rắn là: tốc độ quay 5-15 vòng/phút, tần số quay 10 phút/12 giờ, độ thông khí 20-80 L/phút, nhiệt độ 25-40°C, áp suất 0,2-0,6 kg/cm², trong thời gian ít nhất là 3-7 ngày.

Tốt hơn là, ở bước sấy khô và nghiền nhỏ môi trường nuôi cấy rắn đã lên men để thu được đậu xanh lên men, môi trường nuôi cấy rắn đã lên men được sấy khô dưới điều kiện nhiệt độ 50-70°C và áp suất từ -0,4-0,9 kg/cm².

Tốt hơn là, ở bước thực hiện sắc ký bằng cách nạp chiết phẩm thô lên cột sắc ký, cột sắc ký được nạp nén từ nhựa, tốt hơn là nhựa hấp phụ hợp chất thơm đa vòng (ví dụ, nhựa hấp phụ hợp chất thơm đa vòng phù hợp cho các hợp chất kỵ nước), có thể tích mao quản là từ 1,0 mL/g đến 1,5 mL/g, tốt hơn là 1,3 mL/g.

Giải pháp hữu ích còn đề xuất chiết phẩm từ đậu xanh lên men được sản xuất bằng phương pháp nêu trên.

Tốt hơn là, chiết phẩm từ đậu xanh lên men bao gồm vitexin và isovitexin.

Giải pháp hữu ích còn đề xuất việc sử dụng chiết phẩm từ đậu xanh lên men để sản xuất được phẩm thúc đẩy quá trình liền lành vết thương, trong đó dược phẩm chứa lượng chiết phẩm từ đậu xanh lên men có hiệu quả dược lý và chất mang được dụng.

Giải pháp hữu ích cũng đề xuất được phẩm thúc đẩy quá trình liền lành vết thương chứa lượng chiết phẩm từ đậu xanh lên men có hiệu quả dược lý và chất mang được dụng.

Dược phẩm theo giải pháp hữu ích được sản xuất với chiết phẩm từ đậu xanh lên men nêu trên và chất mang được dụng bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực dược phẩm và có thể được đưa ra ở các dạng liều dùng khác nhau. Thuật ngữ “chất mang được dụng” ở đây bao gồm nhưng không giới hạn ở nước, rượu, các glycol, các hydrocacbon (chẳng hạn như sáp

dầu mỡ và dầu trắng), sáp (chẳng hạn như paraffin và sáp vàng), các chất bảo quản, các chất chống oxy hóa, các dung môi, các chất nhũ hóa, các chất tạo huyền phù, các chất phân rã, các tác nhân gắn dính, các tá dược, các tác nhân ổn định, các chất tạo cang chelat, các chất pha loãng, các chất gel hóa, các chất kem nền, chất bảo quản, chất bôi trơn, chất tăng hấp thụ, thành phần hoạt động, chất giữ ẩm, chất hấp phụ mùi, chất thơm, chất điều chỉnh độ pH, chất khóa ẩm, chất làm mềm, các chất làm dày, các chất hòa tan, các chất tăng tính thấm, các chất chống kích ứng, các chất màu, các chất đẩy, các chất hoạt động bề mặt, và các chất mang tương tự hoặc thích hợp khác theo giải pháp hữu ích.

Tốt hơn là, các tác nhân gel hóa bao gồm nhưng không giới hạn ở gelatin, caragenan, gom xanthan, natri alginat, bột konjac (bột khoai sọ), thạch và các sự kết hợp của chúng.

Tốt hơn là, các chất kem nền bao gồm nhưng không giới hạn ở chất nền ưa nước chứa glyxerol. Chất nền ưa nước chứa glyxerol bao gồm pha dầu và pha nước. Chất nền ưa nước chứa glyxerol được điều chế bằng cách bổ sung pha nước vào pha dầu, khuấy đều đến đồng nhất, và làm lạnh.

Tốt hơn là, vết thương bao gồm vết thương do chiếu xạ, loét do tỳ đè và vết thương ở người mắc bệnh đái tháo đường.

Tốt hơn nữa là, vết thương ở người mắc bệnh đái tháo đường bao gồm nhưng không giới hạn ở viêm loét ở chân do đái tháo đường.

Tốt hơn là, dược phẩm bao gồm lượng có tác dụng của chiết phẩm từ đậu xanh lên men tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 mg/kg/ngày đến 350 mg/kg/ngày, và tốt hơn nữa là từ 130 mg/kg/ngày đến 165 mg/kg/ngày. Theo nguyên tắc, việc tính toán dựa trên trọng lượng chuột là 20 g và trọng lượng người trưởng thành là 60 kg theo hướng dẫn ở tài liệu “Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers” (Ước tính liều khởi đầu an toàn tối đa trong các thử nghiệm lâm sàng ban đầu để điều trị ở các tình nguyện viên trưởng thành khỏe mạnh) được công bố bởi Cơ quan quản lý Thuốc và Thực phẩm (Food and Drug Administration), Hoa Kỳ và mô hình tính toán được cung cấp bởi công ty Trophic Animal Feed High-tech Co., Ltd, Trung Quốc (<http://www.trophic.cn>).

Thuật ngữ “tương tự bột nhão” chỉ trạng thái của sản phẩm được làm từ mô thực

vật (chẳng hạn như hoa, lá, cành, thân, vỏ, rễ, quả, vỏ hạt, màng hạt, v.v.) mà không phải là dịch chiết được sản xuất bằng cách chiết dung môi, trong đó sản phẩm nêu trên không bao gồm dung môi và nước được sử dụng trong quá trình chiết tách.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Lợi thế của giải pháp hữu ích là để thu được chiết phẩm từ đậu xanh lên men có hiệu quả thúc đẩy liền lành vết thương bằng cách cấy nấm *Aspergillus* vào môi trường nuôi cấy rắn chứa đậu xanh để tiến hành lên men; chiết tách với etanol, rửa giải với hỗn hợp dung môi chứa nước và etanol với tỷ lệ thể tích là 4:1; và tiếp tục rửa giải với hỗn hợp dung môi chứa nước và etanol ở tỷ lệ thể tích là 1:1. Hơn nữa, chiết phẩm từ đậu xanh lên men theo giải pháp hữu ích có hiệu quả thúc đẩy liền lành vết thương, trong đó vết thương bao gồm vết thương do chiếu xạ, vết loét do tỳ đè và vết thương ở người mắc bệnh đái tháo đường.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình ảnh phổ sắc ký lỏng hiệu năng cao (High performance liquid chromatography: HPLC) của chiết phẩm thô E theo giải pháp hữu ích ở bước sóng 337 nm;

Fig.2 là hình ảnh phổ HPLC của chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 theo giải pháp hữu ích so với các chất chuẩn ở bước sóng 337 nm, trong đó lần lượt từ trên xuống dưới, hàng trên cùng là chất chuẩn vitexin; hàng thứ hai là chất chuẩn isovitexin; hàng thứ ba là chất chuẩn apigenin; và hàng thứ tư là chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2;

Fig.3 là hình ảnh phổ HPLC của chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H3 theo giải pháp hữu ích so với các chất chuẩn ở bước sóng 337 nm, trong đó lần lượt từ trên xuống dưới, hàng trên cùng là chất chuẩn vitexin; hàng thứ hai là chất chuẩn isovitexin; hàng thứ ba là chất chuẩn apigenin; và hàng thứ tư là chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H3;

Fig.4 là hình ảnh phổ HPLC của chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2H3 theo giải pháp hữu ích so với các chất chuẩn ở bước sóng 337 nm, trong đó lần lượt từ trên xuống dưới, hàng trên cùng là chất chuẩn vitexin; hàng thứ hai là chất chuẩn isovitexin; hàng thứ ba là chất chuẩn apigenin; và hàng thứ tư là chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2H3;

Fig.5 là sơ đồ cột thể hiện mức độ hiệu quả liền lành vết thương của chiết phẩm

thô và các chiết phẩm từ đậu xanh lên men theo giải pháp hữu ích, trong đó dữ liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn (standard error of the mean: SEM), giá trị P được tính toán từ kiểm định t, ký hiệu ** cho thấy sự khác biệt rất đáng kể;

Fig.6A là hình ảnh vết thương do chiếu xạ sau khi được xử lý với chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 theo giải pháp hữu ích trong thời gian 1 tuần;

Fig.6B là hình ảnh vết thương do chiếu xạ sau khi được xử lý với chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 theo giải pháp hữu ích trong thời gian 1 tháng;

Fig.6C là hình ảnh vết thương do chiếu xạ sau khi được xử lý với chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 theo giải pháp hữu ích trong thời gian 3 tháng;

Fig. 7A là hình ảnh vết loét do tỳ đè trên mông trước khi được dùng chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 theo giải pháp hữu ích; và

Fig.7B là hình ảnh vết loét do tỳ đè trên mông sau khi được dùng chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 theo giải pháp hữu ích trong thời gian 1 tháng.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Các đặc điểm kỹ thuật được sử dụng theo giải pháp hữu ích để đạt được mục đích nêu trên sẽ được mô tả rõ ràng hơn thông qua các phương án ưu tiên dưới đây dựa trên các hình vẽ kèm theo.

Ví dụ điều chế 1

Dựa trên patent Đài Loan số I434646, quy trình sản xuất đậu xanh lên men bao gồm (1) chuẩn bị môi trường nuôi cấy lỏng, tiệt trùng và để nguội môi trường nuôi cấy lỏng; (2) cấy và nuôi vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy lỏng; (3) chuẩn bị môi trường nuôi cấy rắn, tiệt trùng và để nguội môi trường nuôi cấy rắn; và (4) cấy vi sinh vật và lên men môi trường nuôi cấy rắn. Các bước cụ thể như sau:

(1) Ở bước chuẩn bị môi trường nuôi cấy lỏng, tiệt trùng và để nguội môi trường nuôi cấy lỏng: môi trường nuôi cấy lỏng bao gồm ít nhất nước và glucoza. Môi trường nuôi cấy lỏng đã chuẩn bị được hấp ở nhiệt độ 120°C trong thời gian 30 phút và sau đó được để nguội xuống nhiệt độ phòng để nuôi cấy *Aspergillus*.

(2) Ở giai đoạn cấy và nuôi vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy lỏng: bổ sung môi trường nuôi cấy lỏng được đề cập ở bước (1) dùng để nuôi cấy *Aspergillus* vào bình

thót cổ, cấy *Aspergillus oryzae* (nguồn cung cấp: Viện nghiên cứu và phát triển công nghệ thực phẩm Đài Loan (Taiwan Food Industry Research and Development Institute)) vào môi trường nuôi cấy lỏng ở tỷ lệ 10% thể tích, và nuôi *Aspergillus* trong tủ ấm ở nhiệt độ 25°C, với tốc độ lắc là 100-150 vòng/phút trong thời gian 1-5 ngày, để làm tăng nồng độ *Aspergillus*.

(3) Ở giai đoạn chuẩn bị môi trường nuôi cấy rắn, tiệt trùng và để nguội môi trường nuôi cấy rắn: mục đích chính là để tạo ra môi trường nuôi cấy rắn vô trùng và tránh nhiễm bẩn chủng vi sinh (*Aspergillus*) trong khi cấy chủng vi sinh (*Aspergillus*). Nguyên liệu của môi trường nuôi cấy rắn được sử dụng trong các ví dụ theo giải pháp hữu ích là đậu xanh, có thể giảm chi phí một cách hiệu quả và có thể dễ dàng thu được đồng thời. Đậu xanh bao gồm hạt và vỏ hạt, hoặc kết hợp của chúng, và tốt hơn là nguyên liệu là vỏ hạt. Ở bước này, nguyên liệu đậu xanh được hấp dưới các điều kiện nhiệt độ là 120°C, ít nhất trong thời gian khoảng 30 phút, và sau đó được để nguội đến nhiệt độ trong khoảng 25-40°C, nhờ đó thu được đậu xanh của môi trường nuôi cấy rắn ở trạng thái vô trùng.

(4) Ở giai đoạn cấy và lên men môi trường nuôi cấy rắn: *Aspergillus* được nuôi ở giai đoạn (2) được cấy vào môi trường nuôi cấy rắn đã tiệt trùng và làm nguội, sau đó được đặt trong thùng lên men trạng thái rắn để lên men. Sau đó, môi trường nuôi cấy rắn được trộn với nước và *Aspergillus*. Tỷ lệ môi trường nuôi cấy rắn:nước:*Aspergillus* là 1:3:0,1, nghĩa là, trong khi môi trường nuôi cấy rắn là 10 kg, lượng nước được thêm vào là 30 L, và lượng *Aspergillus* được cấy vào là 1 kg. Sau khi môi trường nuôi cấy rắn được cấy ở tỷ lệ nêu trên, môi trường nuôi cấy rắn với nước và *Aspergillus* phải được khuấy đều. Các điều kiện lên men của môi trường nuôi cấy rắn đã cấy nằm trong thùng lên men trạng thái rắn là: tốc độ quay 6 vòng/phút, tần số quay 10 phút/12 giờ, độ thông hơi 50 L/phút, nhiệt độ 25°C, áp suất 0,2-0,6 kg/cm², trong thời gian 4 ngày.

(5) Ở giai đoạn sấy khô môi trường nuôi cấy rắn và nghiền nhỏ môi trường nuôi cấy rắn sau khi lên men: môi trường nuôi cấy rắn đã lên men được sấy khô dưới điều kiện nhiệt độ 60°C và áp suất là -0,4-0,9 kg/cm², và môi trường nuôi cấy rắn đã lên men khô được nghiền nhỏ thành bột để thu được sản phẩm đậu xanh lên men.

Đậu xanh lên men được chiết xuất và tinh sạch thông qua các bước sau đây để thu được các chiết phẩm từ đậu xanh lên men:

(1) Bổ sung 20 L etanol 95% vào 2 kg bột đậu xanh lên men để tiến hành chiết xuất qua đêm, loại bỏ các hạt không tan khỏi dịch chiết bằng cách lọc, và cô đặc dịch chiết dưới áp suất giảm đến trạng thái tương tự bột nhão để thu được chiết phẩm thô E.

(2) Hòa tan chiết phẩm thô vào hỗn hợp dung môi chứa nước và etanol 95% ở tỷ lệ 4:1 theo thể tích, và nạp chiết phẩm thô lên cột sắc ký để thực hiện sắc ký cột. Cột được nạp nén từ nhựa (nhựa hấp phụ mao quản lớn, DIAION® HP-20, thể tích mao quản của nhựa ở khoảng 1,3 mL/g). Trước tiên, sử dụng (a) hỗn hợp dung môi chứa nước và etanol 95% ở tỷ lệ 4:1 theo thể tích làm dịch rửa để rửa và thu được dịch rửa giải thứ nhất. Sau đó, sử dụng (b) hỗn hợp dung môi từ nước và etanol 95% ở tỷ lệ 1:1 theo thể tích để rửa giải, thu được dịch rửa giải thứ hai. Cuối cùng, sử dụng (c) hỗn hợp dung môi từ nước và etanol 95% ở tỷ lệ 3:7 theo thể tích để rửa giải, thu được dịch rửa giải thứ ba. Các hỗn hợp dung môi được loại bỏ khỏi các dịch rửa giải thứ nhất, thứ hai và thứ ba riêng biệt để thu được lần lượt các chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H1, E-H2, E-H3. Ngoài ra, E-H2 và E-H3 được trộn lẫn với nhau ở tỷ lệ 4,6:1 theo trọng lượng để thu được chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2H3.

Phân tích các thành phần của chiết phẩm thô E (Fig.1) và các chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 (Fig.2), E-H3 (Fig.3) và E-H2H3 (Fig.4) bằng cách sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Các hợp chất chính trong chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 là 53,12% vitexin, và 17,82% isovitexin; trong E-H3 là 55,80% vitexin, và 14,13% apigenin; trong E-H2H3 là 59,96% vitexin, 14,32% isovitexin, và 2,98% apigenin.

Ví dụ thử nghiệm 1. Hiệu quả liền lành vết thương của đậu xanh lên men

Do sự phát triển và di trú của các tế bào quanh vết thương thông qua bộ kit thử nghiệm liền lành vết thương (Wound Healing Assay Kit, Cell Biolabs, CytoSelect™) sau khi xử lý vết thương với các mẫu thử nghiệm khác nhau, trong đó các tế bào là dòng tế bào sừng ở người HaCaT (2×10^5 tế bào/giếng). Thử nghiệm tế bào được chia thành 5 nhóm được gọi là nhóm đối chứng (xử lý với nước muối), nhóm E (xử lý với chiết phẩm thô E từ ví dụ điều chế 1 được hòa tan trong dimetyl sulfoxit, DMSO), nhóm E-H2 (xử lý với chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 từ ví dụ điều chế 1 được hòa tan trong DMSO), E-H2H3 (xử lý với chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2H3 từ ví dụ điều chế 1 được hòa tan trong DMSO), E-H3 (xử lý với chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H3 từ ví dụ điều chế 1 được hòa tan trong DMSO). Trong mỗi nhóm, các tế bào được

xử lý với mẫu (20 µg/ml) trong thời gian 18 giờ.

Kết quả của thử nghiệm liền lành vết thương (Fig.5) thể hiện vùng liền lành vết thương của nhóm E-H2 được cải thiện đáng kể khi so sánh với nhóm đối chứng ($p < 0,01$). Ngược lại, các vùng liền lành vết thương của nhóm E-H2H3 và nhóm E-H3 xấp xỉ bằng nhóm đối chứng. Do đó, có thể thấy rằng nhóm E-H2 thể hiện hiệu quả liền lành vết thương tốt nhất.

Ví dụ thử nghiệm 2. Sử dụng chiết phẩm từ đậu xanh lên men trong chữa trị vết thương ở người mắc bệnh đái tháo đường

Gây ra bệnh đái tháo đường ở chuột dựa trên phương pháp được mô tả trong các tài liệu sau: Gheibi, S., Kashfi, K., & Ghasemi, A. (2017), Hướng dẫn thực hành gây bệnh đái tháo đường tuýp 2 ở chuột: Kết hợp chế độ ăn nhiều chất béo và streptozotocin (A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin.), tạp chí Biomedicine & Pharmacotherapy, 95, 605-613; và Skovsø, S. (2014). Mô hình hóa bệnh đái tháo đường tuýp 2 ở chuột sử dụng chế độ ăn nhiều chất béo và streptozotocin (Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin.) Tạp chí điều tra bệnh đái tháo đường (Journal of diabetes investigation), 5(4), 349-358. Sau khi chuột đạt cân nặng 20 g, gây tăng đường huyết ở chuột bằng cách dùng Nicotinamid-Streptozotocin (NA-STZ) theo đường tiêm phúc mạc. Mức độ glucoza huyết khi đói của chuột được đo sau 1 tuần và theo dõi trong thời gian từ 1 đến 2 tuần. Các động vật được gây tăng đường huyết thành công (mức độ glucoza huyết cao hơn 300 mg/DL) được lựa chọn làm động vật đái tháo đường để tiến hành thử nghiệm chữa lành vết thương sau khi biểu hiện các triệu chứng tăng đường huyết trong thời gian hai tháng.

(1) Sau khi gây mê với isofluran, ba vết thương được tạo ra bằng cách loại bỏ toàn bộ lớp biểu bì ở vùng lưng của chuột. Các phương pháp điều trị khác nhau được áp dụng cho các cá thể động vật tương ứng ở nhóm đối chứng và các nhóm thí nghiệm. Chuột được xử lý với kem nền, Suile, và các mẫu chiết phẩm, được bôi trực tiếp lên vị trí vết thương hai lần mỗi ngày, mỗi sáng và tối, mỗi lần khoảng 0,036 g, trong thời gian 12 ngày. Mức độ liền lành vết thương vào các thời điểm ngày 0, ngày thứ 4, ngày thứ 8 và ngày thứ 12 được so sánh. Mức độ liền lành vết thương được ghi lại bằng ảnh chụp và tính toán bằng cách sử dụng thang đo làm cơ sở định lượng với phần mềm ImageJ. Bảng

cách sử dụng vùng vết thương vào thời điểm ban đầu (ngày 0) làm vùng vết thương ban đầu, vùng vết thương còn lại (%) được tính toán như sau:

$$\text{Vùng vết thương còn lại (\%)} = \frac{\text{vùng vết thương tại mỗi thời điểm}}{\text{vùng vết thương ban đầu}} \times 100\%$$

Các cá thể động vật thử nghiệm được chia thành 6 nhóm như sau:

Nhóm NI (đối chứng thường): chuột không bị gây tăng đường huyết, các nhóm sau đây đều là chuột bị gây tăng đường huyết;

Nhóm BC (kem nền): chỉ được xử lý với kem nền;

Nhóm PC: dùng thuốc Suile® thương phẩm (Hedonist Biochemical Technologies Co. Ltd) làm đối chứng dương;

Nhóm E: dùng hỗn hợp chiết phẩm thô E thu được từ ví dụ điều chế 1 với kem nền ở tỷ lệ trọng lượng là 1:9;

Nhóm E-H2: dùng hỗn hợp chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 thu được từ ví dụ điều chế 1 với kem nền ở tỷ lệ trọng lượng là 1:9;

Nhóm E-H2H3: dùng hỗn hợp chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 và E-H3 (tỷ lệ trọng lượng là 4,6:1) thu được từ ví dụ điều chế 1 với kem nền ở tỷ lệ trọng lượng là 1:9.

Bảng 1: Mức độ liền lành vết thương của các chiết phẩm khác nhau

Nhóm	Vùng vết thương (%)			
	Ngày 0	Ngày thứ 4	Ngày thứ 8	Ngày thứ 12
NI	100,00±16,42	67,60±27,72	48,68±36,17	6,85±7,30*
BC	100,00±13,56	69,88±39,89	71,20±28,41	26,03±12,44
PC	100,00±20,12	71,62±21,02	50,73±18,43	8,93±7,96*
E	100,00±17,32	75,53±19,09	68,84±6,54	23,41±5,34
E-H2	100,00±7,06	68,47±31,17	53,24±33,97	10,22±8,00*
E-H2H3	100,00±15,18	81,70±35,39	57,12±31,05	23,59±13,70

* p < 0,05 giữa nhóm BC và các nhóm khác

Như được thể hiện trong bảng 1, vùng vết thương của nhóm E-H2 giảm đáng kể khi so sánh với nhóm BC và vùng vết thương xấp xỉ bằng nhóm PC vào ngày thứ 12. Ngược lại, không có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm E hoặc nhóm E-H2H3 với nhóm BC. Do đó, nhóm E-H2 thể hiện hiệu quả thúc đẩy sự liền lành vết thương đáng kể ở

chuột mắc đái tháo đường, và hiệu quả đạt được xấp xỉ bằng thuốc Suile®.

(2) Ba vết thương được tạo ra ở vùng lưng của chuột. Các biện pháp điều trị khác nhau được áp dụng cho các cá thể động vật tương ứng trong nhóm đối chứng và các nhóm thí nghiệm. Chuột được điều trị với kem nền, Suile, và các mẫu chiết phẩm, được bôi trực tiếp lên vị trí vết thương hai lần mỗi ngày, mỗi sáng và tối, mỗi lần khoảng 0,036 g, trong thời gian 8 ngày. Các mức độ liền lành vết thương vào các thời điểm ban đầu (ngày 0), ngày thứ 4 và ngày thứ 8 được so sánh.

Các cá thể động vật được chia thành 6 nhóm như sau:

Nhóm NI (đối chứng thông thường): không bị gây tăng đường huyết, các nhóm sau đây đều là chuột bị gây tăng đường huyết;

Nhóm BC (kem nền): chỉ được xử lý với kem nền;

Nhóm PC: dùng thuốc Suile® thương phẩm (Hedonist Biochemical Technologies Co. Ltd) làm đối chứng dương;

Nhóm E-H2 2,5%: dùng hỗn hợp chiết phẩm thô E-H2 thu được từ ví dụ điều chế 1 với kem nền ở tỷ lệ trọng lượng là 0,25:9,75;

Nhóm E-H2 5%: dùng hỗn hợp chiết phẩm thô E-H2 thu được từ ví dụ điều chế 1 với kem nền ở tỷ lệ trọng lượng là 0,5:9,5;

Nhóm E-H2 10%: dùng hỗn hợp chiết phẩm thô E-H2 thu được từ ví dụ điều chế 1 với kem nền ở tỷ lệ trọng lượng là 1:9;

Bảng 2: Mức độ liền lành vết thương của các chiết phẩm từ đậu xanh lên men ở các nồng độ khác nhau

Nhóm	Vùng vết thương (%)		
	Ngày 0	Ngày thứ 4	Ngày thứ 8
NI	100,00±14,18	52,57±23,25	30,91±23,30*
BC	100,00±12,51	76,34±33,67	60,90±22,41
PC	100,00±16,41	75,13±22,21	35,89±13,02*
E-H2 2,5%	100,00±11,48	74,82±38,77	42,99±11,75
E-H2 5%	100,00±16,80	64,40±29,08	41,18±24,62*
E-H2 10%	100,00±12,51	61,81±7,67	39,42±12,12*

* $p < 0,05$ giữa nhóm BC và các nhóm khác.

Như được thể hiện trong bảng 2, mức độ giảm vùng vết thương trong nhóm E-H2 2,5%, nhóm E-H2 5% hoặc nhóm E-H2 10% vào ngày thứ 8 là cao hơn nhóm BC khoảng 20%. Và vùng vết thương xấp xỉ bằng nhóm PC. Do đó, các tỷ lệ khác nhau của các nhóm E-H2 thể hiện hiệu quả đáng kể trong thúc đẩy liền lành vết thương trong chuột mắc đái tháo đường, và hiệu quả đạt được xấp xỉ bằng thuốc Suile®.

Ví dụ thử nghiệm 3. Sử dụng chiết phẩm từ đậu xanh lên men trong chữa lành vết thương sau khi xạ trị

Vết thương gây ra do xạ trị được bôi hỗn hợp chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 thu được từ ví dụ điều chế 1 và tác nhân gel hóa ở tỷ lệ trọng lượng 1:9, hai lần mỗi ngày, mỗi lần khoảng 1-10 g, tốt hơn là 5 g. Ghi lại tình trạng khôi phục sau một tuần, một tháng và ba tháng.

Sau một tuần, vùng vết thương xấp xỉ 20 cm², có sẹo tạo ra, bệnh nhân bị đau mồm, đau miệng và đau cổ, làm cho việc nuốt khó khăn, vết thương đã lên da non và được cải thiện rõ rệt (Fig.6A). Sau một tháng, vùng vết thương khoảng 5 cm², vết thương không được liền lành hoàn toàn, nhưng vết thương ở cổ được liền lại tốt (Fig.6B), giảm cảm giác đau trong quá trình xạ trị. Sau ba tháng, vết thương liền lành hoàn toàn và được khôi phục tốt (Fig.6C). Do đó, có thể kết luận rằng việc áp dụng chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 trên vết thương ở người thể hiện hiệu quả thúc đẩy liền lành vết thương.

Ví dụ thử nghiệm 4. Sử dụng chiết phẩm từ đậu xanh lên men trong chữa lành vết loét do tỳ đè

Vết loét do tỳ đè được xử lý với hỗn hợp chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 thu được từ ví dụ điều chế 1 và tác nhân gel hóa ở tỷ lệ trọng lượng 1:9, hai lần mỗi ngày, mỗi lần khoảng 5 - 40 g, tốt hơn là 25 g. Ghi lại tình trạng hồi phục sau một tháng.

Trước khi điều trị, vùng vết thương khoảng xấp xỉ 100 cm². Loét do tỳ đè là tổn thương lớn và sâu liên quan đến xương (Fig.7A). Sau khi dùng hỗn hợp nêu trên trong thời gian 1 tháng, vùng loét chỉ còn xấp xỉ 9 cm², có thể thấy rõ sự hình thành mô và không còn nhìn thấy xương (Fig.7B). Do đó, có thể kết luận rằng việc áp dụng chiết phẩm từ đậu xanh lên men E-H2 trên vết thương ở người thể hiện hiệu quả thúc đẩy liền lành vết thương.

Tóm lại, các chiết phẩm từ đậu xanh lên men có các hiệu quả thúc đẩy sự liền lành

vết thương, và vết thương có thể được chữa lành bao gồm vết thương gây ra do xạ trị, vết loét do tỳ đè, và vết thương ở người đi bộ đường.

Rõ ràng là đối với người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể thực hiện các sửa đổi và điều chỉnh khác nhau mà không tách khỏi phạm vi bảo hộ và nguyên lý kỹ thuật của giải pháp hữu ích. Mặc dù giải pháp hữu ích đã được mô tả dưới dạng các phương án ưu tiên cụ thể, cần hiểu rằng giải pháp hữu ích không bị giới hạn hoàn toàn ở các phương án cụ thể này. Trên thực tế, các sửa đổi khác nhau là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật đều thuộc phạm vi bảo hộ của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất chiết phẩm từ đậu xanh lên men bao gồm:

cấy nấm *Aspergillus* vào môi trường nuôi cấy lỏng rồi nuôi *Aspergillus*;

tiệt trùng đậu xanh để thu được môi trường nuôi cấy rắn, cấy *Aspergillus* đã nuôi ở bước trên vào môi trường nuôi cấy rắn, và bổ sung nước vào môi trường nuôi cấy rắn và khuấy môi trường nuôi cấy rắn để thực hiện lên men;

sấy khô và nghiền nhỏ môi trường nuôi cấy rắn đã lên men để thu được đậu xanh lên men;

chiết xuất đậu xanh lên men bằng cách bổ sung etanol với thể tích gấp từ 5 đến 15 lần (thể tích/trọng lượng) để thu được chiết phẩm thô;

thực hiện sắc ký bằng cách nạp chiết phẩm thô lên cột sắc ký, rửa giải cột sắc ký với hỗn hợp dung môi gồm có nước và etanol ở tỷ lệ thể tích là 4:1 để thu được dịch rửa giải thứ nhất, sau đó rửa giải cột sắc ký với hỗn hợp dung môi gồm có nước và etanol ở tỷ lệ thể tích 1:1 để thu được dịch rửa giải thứ hai, và sau đó loại bỏ hỗn hợp dung môi ra khỏi dịch rửa giải thứ hai để thu được chiết phẩm từ đậu xanh lên men.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước cấy *Aspergillus* vào môi trường nuôi cấy lỏng rồi nuôi *Aspergillus*, môi trường nuôi cấy lỏng bao gồm ít nhất nước và glucoza.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước cấy *Aspergillus* vào môi trường nuôi cấy lỏng rồi nuôi *Aspergillus*, *Aspergillus* được cấy vào môi trường nuôi cấy lỏng ở tỷ lệ thể tích 5-10%, và được nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 20-30°C, ở tốc độ lắc 100-150 vòng/phút trong thời gian 1-5 ngày.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở các bước cấy *Aspergillus* đã nuôi vào môi trường nuôi cấy rắn, bổ sung nước và khuấy để thực hiện lên men, tỷ lệ môi trường nuôi cấy rắn:nước:*Aspergillus* là 1:1-3:0,05-0,12 (trọng lượng:thể tích:thể tích).

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ từ 1 đến 4, trong đó ở bước thực hiện sắc ký bằng cách nạp chiết phẩm thô lên cột sắc ký, cột sắc ký được nạp nén từ nhựa có thể tích mao quản nằm trong khoảng từ 1,0 mL/g đến 1,5 mL/g.

6. Chiết phẩm từ đậu xanh lên men thu được bằng phương pháp điều chế theo điểm bất kỳ từ 1 đến 5.

7. Chiết phẩm từ đậu xanh lên men theo điểm 6, trong đó chiết phẩm này bao gồm vitexin và isovitexin.
8. Dược phẩm dùng để thúc đẩy sự liền lành vết thương, trong đó dược phẩm này bao gồm lượng chiết phẩm đậu xanh lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm 6 và 7 có hiệu quả dược lý và chất mang dược dụng.

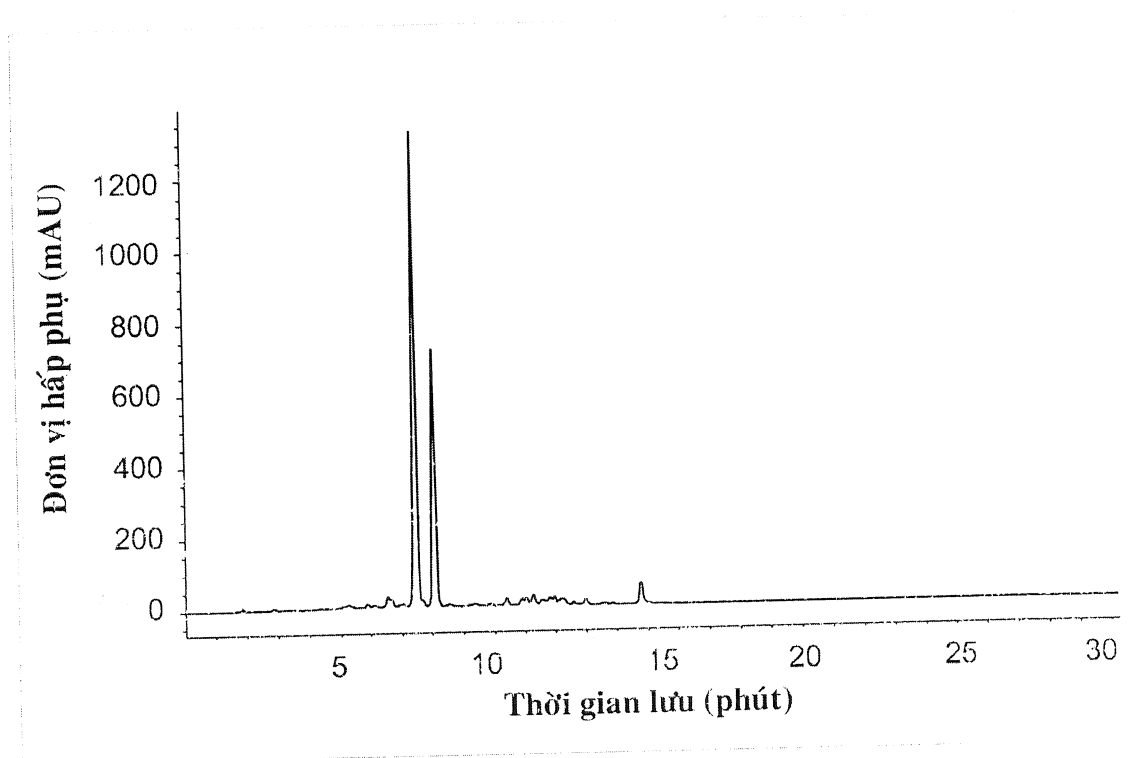


Fig.1

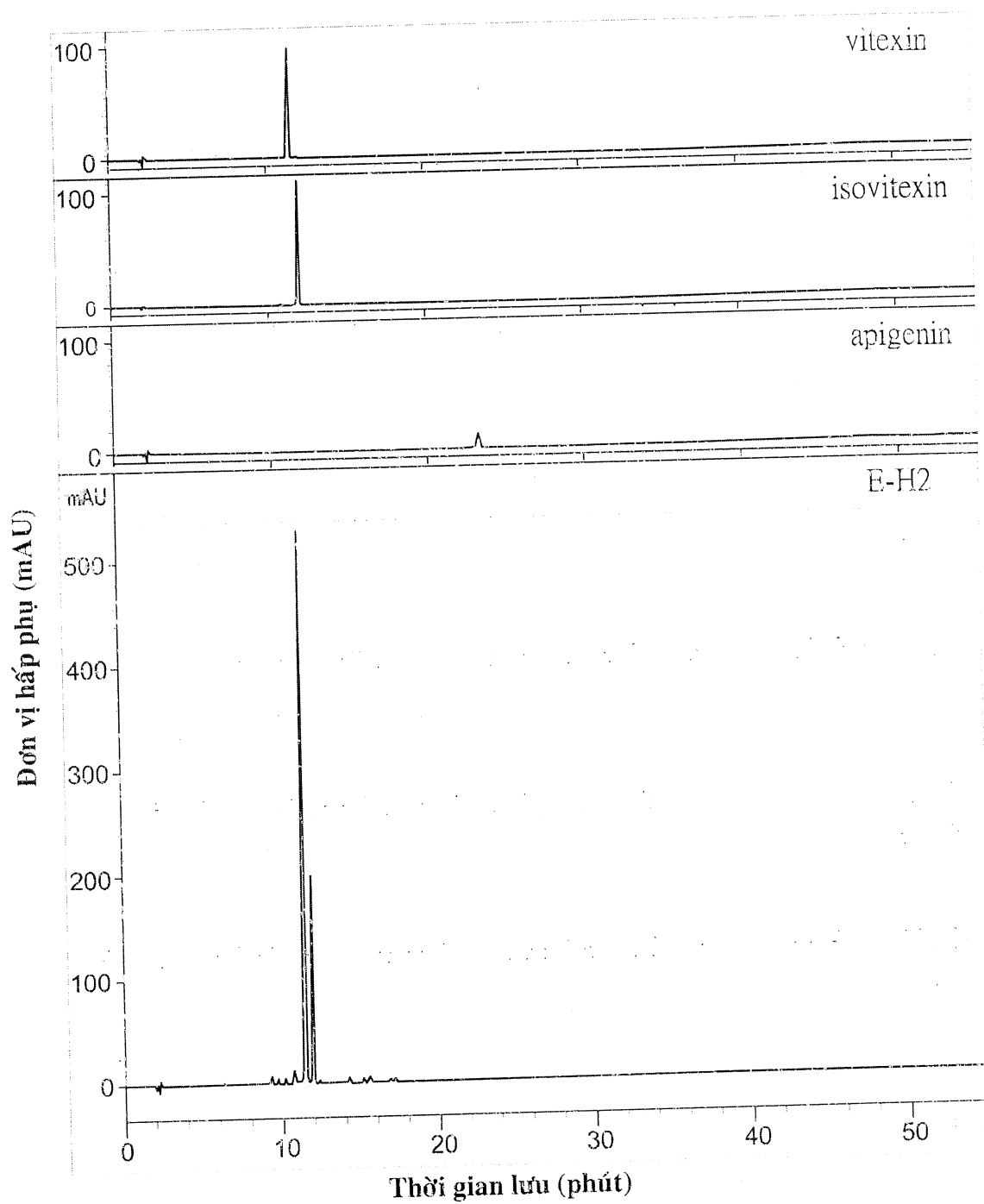


Fig.2

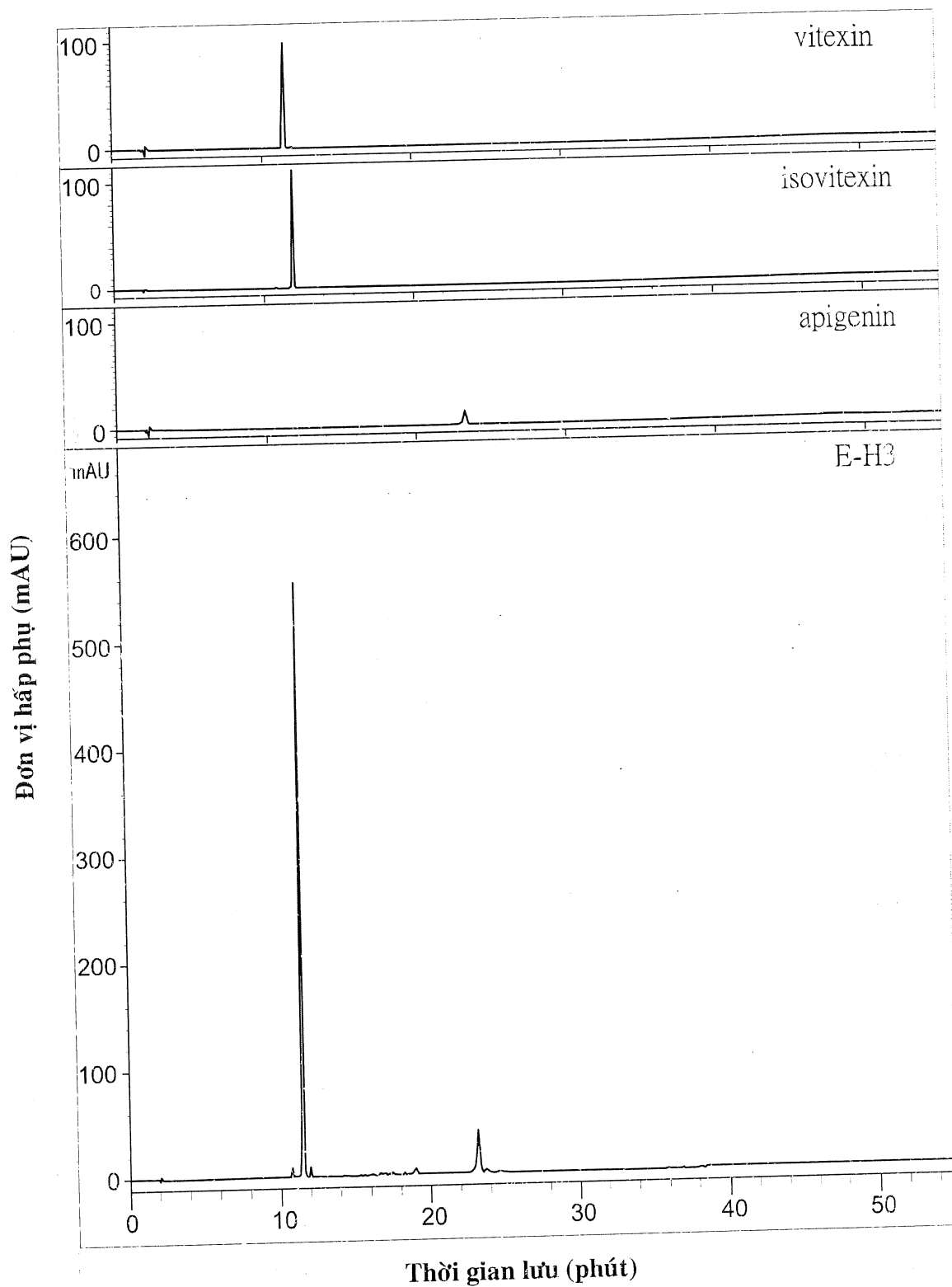


Fig.3

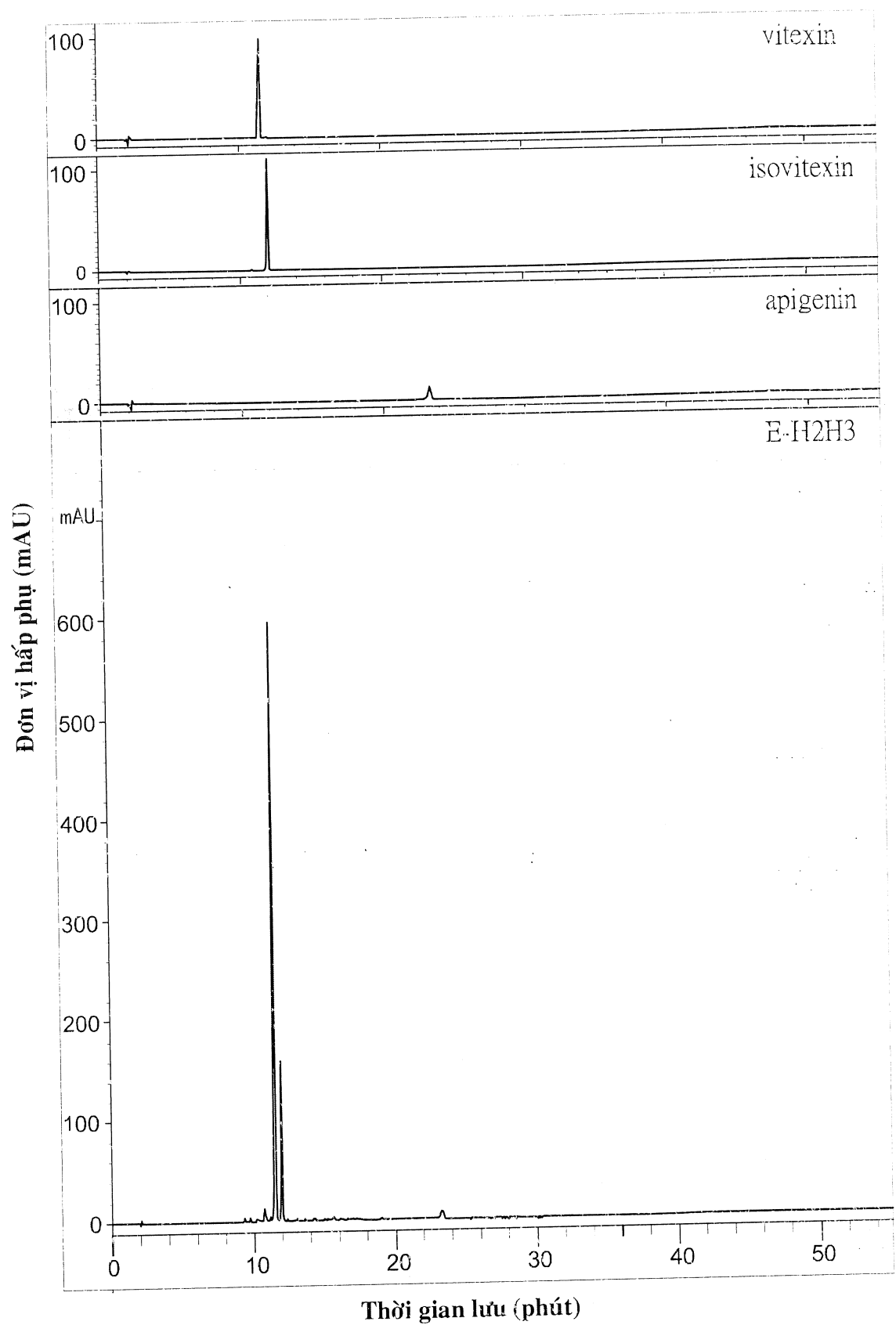


Fig.4

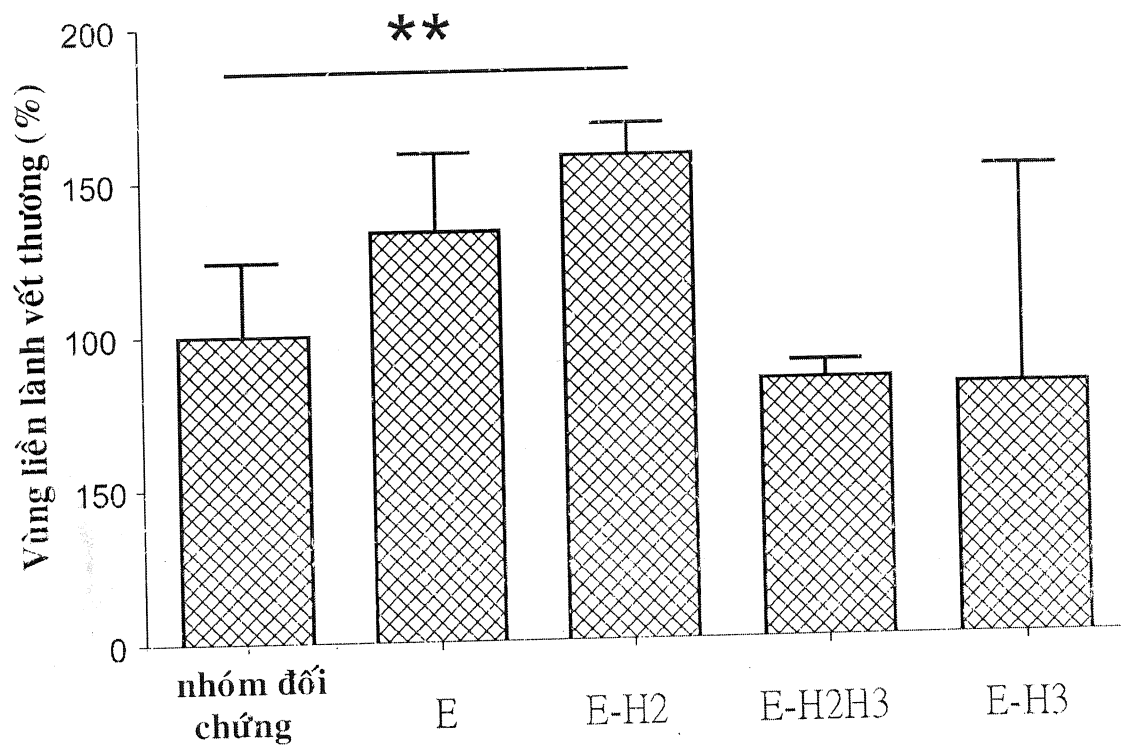


Fig.5



Fig. 6C



Fig. 6B



Fig. 6C

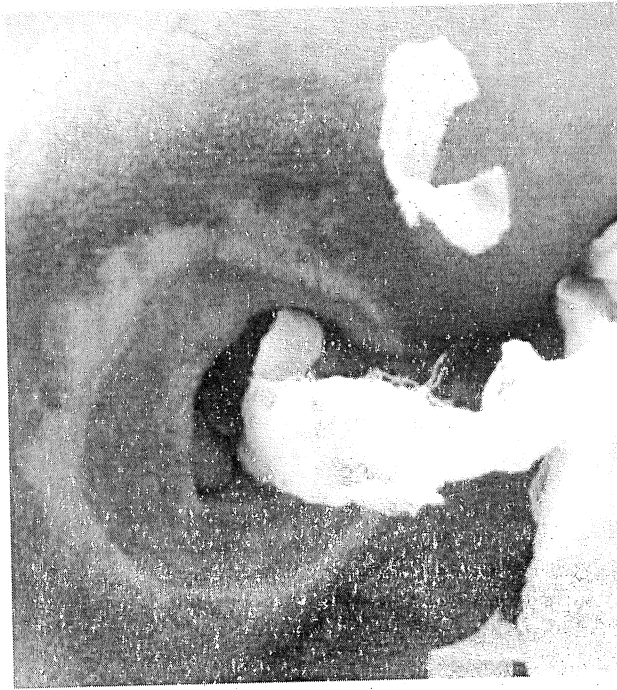


Fig. 7A



Fig. 7B