



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

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

(11)



2-0003927

(51) **A61K 36/60; A61K 36/61**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00076

(22) 24/03/2020

(67) 1-2020-01689

(45) 27/01/2025 442

(43) 25/08/2020 389

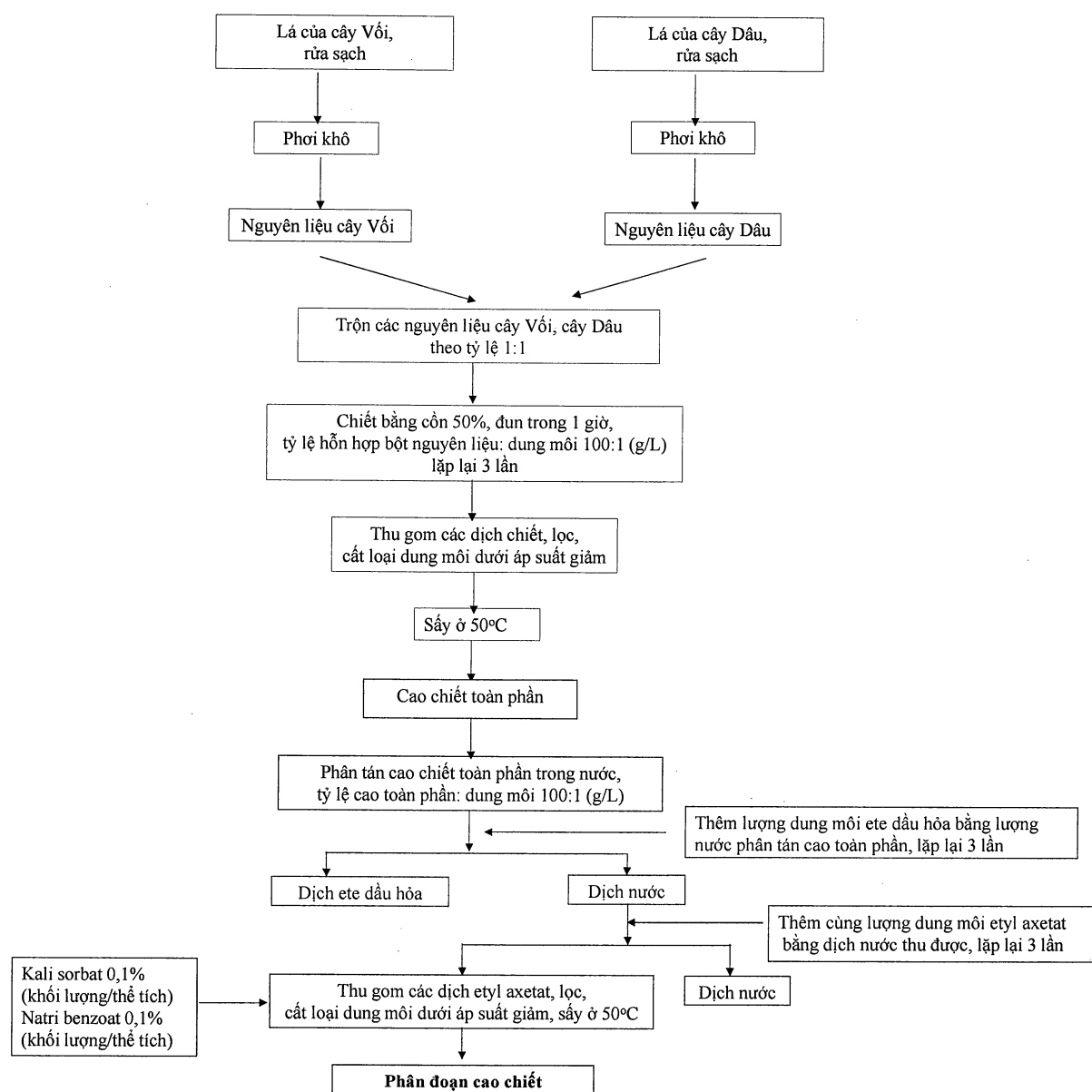
(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC, ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI (VN)**
Nhà Y1, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, TP. Hà Nội

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

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT PHÂN ĐOẠN CAO CHIẾT TỪ LÁ CÂY VỎI
(CLEISTOCALYX OPERCULATUS) VÀ LÁ CÂY DÂU (MORUS ALBA L.)
DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH VIÊM ĐẠI TRÀNG, VÀ PHÂN ĐOẠN CAO CHIẾT
THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY**

(21) 2-2022-00076

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phân đoạn cao chiết từ lá cây Vối và lá cây Dâu có tác dụng điều trị bệnh viêm đại tràng bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) thu cao chiết toàn phần và c) thu phân đoạn cao chiết. Phân đoạn cao chiết thu được từ quy trình này có tác dụng điều trị bệnh viêm đại tràng.



Hình 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực dược phẩm, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phân đoạn cao chiết từ lá cây Vối (*Cleistocalyx operculatus*) và lá cây Dâu (*Morus alba* L.) dùng để điều trị bệnh viêm đại tràng, và phân đoạn cao chiết thu được từ quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật giải pháp hữu ích

Viêm đại tràng là tình trạng niêm mạc đại tràng bị viêm nhiễm gây tổn thương khu trú hoặc lan toả với nhiều mức độ khác nhau. Viêm đại tràng có thể cấp tính hoặc mãn tính. Đây là tình trạng thường xuất hiện cùng với các bệnh tiêu hóa. Các triệu chứng có thể bao gồm đau bụng và đau nhẹ đến nặng (tùy thuộc vào giai đoạn của bệnh) tiêu chảy ra máu định kỳ có hoặc không có mủ trong phân, đại tiện mất chủ động, đầy hơi, mệt mỏi, chán ăn và giảm cân không rõ nguyên nhân. Trường hợp nhẹ có xuất hiện các vết viêm gây đau đớn. Giai đoạn nặng có thể xuất hiện các ổ loét, xuất huyết, hay có thể là những ổ áp xe ở đại tràng. Viêm đại tràng kéo dài dai dẳng, khó điều trị dứt điểm và ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe, sinh hoạt của người bệnh. Nguyên nhân gây viêm ở đại tràng chưa được xác định nhưng có thể kể ra một số nguyên nhân như do nhiễm khuẩn đường ruột, tình trạng táo bón kéo dài, một số bệnh lý về đường ruột như: thiếu máu cục bộ đại tràng, viêm ruột, tác dụng phụ của thuốc như thuốc kháng sinh, nhiễm độc asen, chì, thủy ngân, thuốc diệt cỏ, do tâm lý căng thẳng, bệnh Crohn, bệnh lao. Dược lý phân tử cho thấy ở bệnh viêm đại tràng có sự tăng cao nồng độ các bạch cầu trung tính, và tăng biểu hiện các yếu tố xytokin gây viêm như interleukin (IL)-1 β , interferon (INF) - γ , yếu tố hoại tử khối

u (TNF)- α ở đại tràng. Việc làm giảm sự xuất hiện bạch cầu trung tính và các yếu tố tiền viêm này góp phần làm giảm trình trạng bệnh đại tràng. Dược liệu có một số ưu điểm trong điều trị bệnh như có độ an toàn, không gây tác dụng phụ, làm giảm được các triệu chứng của bệnh đại tràng. Một số dược liệu có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm và kháng khuẩn để phòng và điều trị bệnh viêm đại tràng mãn tính ngày càng được sử dụng nhiều, mang lại hiệu quả lâu dài trong việc điều trị bệnh. Đặc biệt, khi kết hợp các dược liệu với nhau thì sẽ tăng tính hiệp đồng, phát huy được tác dụng tốt hơn từng thành phần dược liệu riêng biệt.

Bản chất của kỹ thuật giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là để giải quyết các vấn đề nêu trên. Để đạt được mục đích này, theo một phương án, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phân đoạn cao chiết từ lá cây Vối (*Cleistocalyx operculatus*) và lá cây Dâu (*Morus alba* L.) dùng để điều trị bệnh đại tràng bao gồm các bước:

- a) chuẩn bị nguyên liệu là lá cây Vối và lá cây Dâu, rửa sạch, phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, trộn lá cây Vối và lá của cây Dâu theo tỷ lệ đồng khối lượng, cụ thể là 1:1 thu được hỗn hợp nguyên liệu;
- b) thu cao chiết toàn phần bằng cách chiết hỗn hợp nguyên liệu bằng cồn 50% đun trong 1 giờ theo tỷ lệ hỗn hợp nguyên liệu:dung môi là 100:1 (g/L), chiết lặp lại 3 lần, gộp dịch chiết, lọc qua giấy lọc thu dịch lọc và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, sấy khô ở 50°C thu được cao chiết toàn phần; và
- c) thu phân đoạn cao chiết bằng cách phân tán cao chiết toàn phần thu được ở bước b) vào nước cất theo tỷ lệ cao chiết toàn phần: nước là 100:1 (g/L), sau đó thêm cùng một lượng thể tích dung môi ete dầu hỏa vào, để tách lớp và thu lấy phần nước, lặp lại 3 lần, tiếp theo thêm cùng một lượng thể tích dung môi etyl axetat vào phần nước, để tách lớp và thu lấy phần dung môi etyl axetat, công đoạn này lặp lại 3 lần, sau đó gộp các dịch etyl axetat thu được, lọc qua giấy lọc, và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, sấy khô ở 50°C thu được phân đoạn cao chiết.

Theo một phương án khác, giải pháp hữu ích đề cập đến phân đoạn cao chiết dùng để điều trị bệnh viêm đại tràng thu được từ quy trình nêu trên.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ quy trình sản xuất phân đoạn cao chiết từ lá cây vối (*Cleistocalyx operculatus*) và lá cây Dâu (*Morus alba* L.) dùng để điều trị bệnh viêm đại tràng.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

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

Cây Vối có tên khoa học là *Cleistocalyx operculatus*, thuộc họ Sim (Myrtaceae). Cây thuộc loại cây thân gỗ, có chiều cao từ 5-6m, vỏ thân cây có màu nâu xám, nứt dọc và phân cành. Cành non dẹt, sau thành hình trụ, có lớp vảy. Lá vối mọc đối, phiến lá có hình bầu dục, hai mặt lá đều có màu xanh lục nhạt, có đốm nâu, dài 9-18cm, rộng 4-8cm. Đầu lá nhọn, gốc lá thuôn, mép lá không có răng cưa, không có lông, có gân lá 8-10 đôi. Cuống lá dài 3-4mm, có cánh ở phía đỉnh. Hoa mọc thành cụm, cụm hoa có hình chùy thường mọc ở nách lá đã rụng. Hoa vối không có cuống, có màu trắng, lục nhạt. Quả vối nhỏ, có hình trứng hay hình bầu dục, nhẵn nhéo, có đường kính 7-12mm. Lá vối, nụ vối và cành non đều có mùi thơm dễ chịu. Thành phần hóa học của cây vối có chứa tanin, vitamin và một số chất khoáng, tinh dầu, các hoạt chất polyphenol, flavonoid. Lá vối có tác dụng giảm đầy hơi, trướng bụng, ăn không tiêu, viêm đại tràng mãn tính, đau bụng âm ỉ, chữa tiêu chảy, viêm da, ngứa, giảm mỡ máu, giảm cholesterol, bệnh tiểu đường, bệnh viêm gan.

Cây Dâu có tên khoa học là *Morus alba* L., họ Dâu tằm (Moraceae). Cây Dâu thuộc loại cây thân gỗ, cao từ 3-5m. Cành mềm, lúc non có lông tơ sau màu trắng xám, nhẵn. Phần lá mọc so le nhau, hình bầu dục, mũi nhọn và khía răng cưa. Hoa dâu tằm đơn tính, vô cánh, mùa hoa vào tháng 4-5. Quả dạng bế hình cầu, màu trắng, xanh lúc còn non và khi chín chuyển các màu hồng, đỏ đậm, tím đen, vị hơi chua, ngọt. Cây Dâu có thành phần hóa học gồm axit amin, morocetin, ecdysterone, inokosterone, umbelliferone, scopoletin, scopolin, trigonellin, moracin, scopoletin, skimmin, cyclomulberrin, morusin, atalantoflavon, astragalin, isoquercitrin, v.v.. Cây Dâu có rất nhiều công dụng khác nhau như dùng để trị đau mắt đỏ, chảy máu cam, ho, huyết áp cao, tóc bạc, tóc rụng, mất ngủ, bỏng, lợi tiểu và tăng cường sức đề kháng.

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất phân đoạn cao chiết từ lá cây Vối (*Cleistocalyx operculatus*) và lá cây Dâu (*Morus alba* L.) dùng để điều trị bệnh viêm đại tràng gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu

Lá cây Vối và lá cây Dâu rửa sạch, phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, trộn lá cây Vối và lá của cây Dâu theo tỷ lệ đồng khối lượng, cụ thể là 1:1 thu được hỗn hợp nguyên liệu.

b) thu cao chiết toàn phần

Chiết hỗn hợp nguyên liệu bằng cồn 50% đun trong 1 giờ theo tỷ lệ hỗn hợp nguyên liệu:dung môi là 100:1 (g/L), chiết lặp lại 3 lần, gộp dịch chiết, lọc qua giấy lọc thu dịch lọc và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, sấy khô ở 50°C thu được cao chiết toàn phần.

c) thu phân đoạn cao chiết

Phân tán cao chiết toàn phần thu được ở bước b) vào nước cất theo tỷ lệ cao chiết toàn phần: nước là 100:1 (g/L), sau đó thêm cùng một lượng thể tích dung môi ete dầu hỏa vào, để tách lớp và thu lấy phần nước, lặp lại 3 lần, tiếp theo thêm cùng

một lượng thể tích dung môi etyl axetat vào phần nước, để tách lớp và thu lấy phần dung môi etyl axetat, công đoạn này lặp lại 3 lần, sau đó gộp các dịch etyl axetat thu được, lọc qua giấy lọc, và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, sấy khô ở 50°C thu được phân đoạn cao chiết.

Giải pháp hữu ích cũng đề xuất phân đoạn cao chiết thu được từ quy trình nêu trên dùng để điều trị bệnh viêm đại tràng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Điều chế 35g phân đoạn cao chiết từ lá cây Vôi (*Cleistocalyx operculatus*) và lá cây Dâu (*Morus alba* L.).

Nguyên liệu thu hái để sử dụng theo giải pháp hữu ích được thu hái ở Hà Nội, Việt Nam. Thu hái lá cây Vôi (*Cleistocalyx operculatus*), phơi khô. Thu hái lá cây Dâu (*Morus alba* L.) phơi khô. Phối trộn lá cây Vôi và lá cây Dâu theo tỷ lệ 1:1, thu được 500 g hỗn hợp nguyên liệu. Chiết 500g hỗn hợp nguyên liệu này bằng etanol 50%, đun trong 1 giờ theo tỷ lệ hỗn hợp nguyên liệu:dung môi 100(g):1(L), lặp lại 3 lần. Thu dịch chiết, lọc và lấy phần dịch lọc; cất loại dung môi dưới áp suất giảm rồi sấy trong tủ sấy ở 50°C tới khối lượng không đổi, thu được 45 g cao chiết toàn phần. Cao chiết toàn phần được phân tán vào 450 ml nước cất. Sau đó, thêm 450 ml dung môi ete dầu hỏa vào để tách lớp và thu lấy phần nước, lặp lại 3 lần. Tiếp đó, thêm 450 ml dung môi etyl axetat vào phần nước, để tách lớp và thu lấy phần dung môi etyl axetat, lặp lại 3 lần. Tiến hành cô quay dưới áp suất giảm loại bỏ toàn bộ dung môi etyl axetat, rồi sấy trong tủ sấy ở 50°C tới khối lượng không đổi thu được 35 g phân đoạn cao chiết. Hiệu suất khoảng 7%.

Ví dụ 2. Tác dụng điều trị bệnh viêm đại tràng

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, cả 2 giống, khoẻ mạnh, trọng lượng $25,0 \pm 2,0$ g để nghiên cứu tác dụng điều trị bệnh viêm đại tràng do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp. Động vật được nuôi trong điều kiện đầy đủ thức ăn và nước

uống tại phòng thí nghiệm từ 3-5 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu.

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

Nhóm I là nhóm chứng sinh lý; được cho uống nước muối sinh lý.

Nhóm II: Nhóm chứng bệnh DSS; chuột được cho uống dung dịch 3% (w/v) dextran natri sulfat (DSS; trọng lượng phân tử 36-50kDa, MP Biomedicals, Việt Nam).

Nhóm III: DSS + phân đoạn cao chiết thu được từ ví dụ 1 (150mg/kg, thể trọng, đường uống) trong vòng 7 ngày;

Nhóm IV: DSS + phân đoạn cao chiết thu được từ ví dụ 1 (300mg/kg, thể trọng, đường uống) trong vòng 7 ngày;

Trong suốt quá trình thí nghiệm, chỉ số bệnh (DAI) được đo và đánh giá. Tại ngày cuối của thí nghiệm, chuột bị bỏ đói qua đêm, bị giết bằng cách sử dụng thuốc gây mê liều cao. Tiến hành mổ lấy mô ruột, cân và đồng nhất trong hệ đệm Nonidet-P40 (NP40) lạnh gồm natri clorua 150mM; 1,0% NP-40 và Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Sau đó, ly tâm ở điều kiện (12000g, 4°C) trong 15 phút rồi thu lấy phần dịch nổi phía trên để phân tích. Nồng độ protein được phân tích bằng phương pháp Bradford.

Chỉ số bệnh (DAI)

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

Kết quả về chỉ số bệnh DAI: Ở những con chuột ở nhóm chứng bệnh do DSS gây viêm đại tràng, sự gia tăng của chỉ số bệnh (DAI) từ ngày thứ 2 trở đi, so với những con chuột chứng ở nhóm chứng sinh lý, do quan sát thấy sự mất trọng lượng cơ thể và tiêu chảy nặng, phân có máu. Ở nhóm chuột III và IV, chuột được điều trị bằng phân đoạn cao chiết thì giá trị DAI đã giảm đáng kể so với nhóm DSS. Như vậy phân đoạn cao chiết có tác dụng làm giảm chỉ số bệnh DAI do DSS gây viêm đại tràng.

Hoạt tính enzym myeloperoxidaza

Đánh giá hoạt tính MPO là một chỉ số để đánh giá quá trình thâm nhập tế bào bạch cầu vào ruột. Dịch đồng nhất của ruột được đem định lượng MPO. Thí nghiệm gồm 100 μL dung dịch đệm kali phosphat (pH 6,0), 10 μL của phần dịch đồng nhất mô ruột và 90 μL hydrogen peroxit 0,05%. Đo sự thay đổi trong hấp thụ ở bước sóng 450 nm bằng máy đo quang mỗi lần 30 giây trong 3 phút. MPO được thể hiện trong đơn vị mỗi miligam protein, trong đó 1 đơn vị tương ứng với hoạt tính cần thiết để phân hủy 1 mmol H_2O_2 /phút /mg protein ở 37°C.

Kết quả:

Bạch cầu trung tính là nguyên nhân chính của tổn thương mô ở bệnh viêm đường ruột. Sau 7 ngày kể từ ngày bắt đầu điều trị DSS, bạch cầu trung tính niêm mạc thâm nhiễm vào ruột được xác định thông qua định lượng hoạt tính MPO. Nhóm chuột ở nhóm II cho thấy gia tăng đáng kể hoạt tính enzym MPO so với những con chuột khỏe mạnh ở nhóm chứng sinh lý. Chuột ở nhóm nhóm III và nhóm IV có sự giảm đáng kể hoạt tính enzym MPO có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh DSS (Bảng 1). Như vậy, phân đoạn cao chiết có tác dụng làm suy giảm quá trình thâm nhập tế bào bạch cầu vào ruột để gây bệnh viêm đại tràng.

Bảng 1. Kết quả đánh giá hoạt tính myeloperoxidaza

	MPO (đơn vị/mg protein)
Nhóm I (Nhóm sinh lý)	$0,6 \pm 0,08$
Nhóm II (chứng bệnh DSS)	$1,8 \pm 0,5^*$
Nhóm III	$1,3 \pm 0,4^\#$
Nhóm IV	$1,1 \pm 0,6^\#$

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

Đánh giá các xytokin tiền viêm

Tiến hành đo các xytokin tiền viêm IL-1 β , INF- γ và TNF- α trong dịch đồng chất mô đại tràng bằng kit ELISA thương mại có sẵn trên thị trường.

Kết quả:

Nhóm chuột chứng bệnh có biểu hiện tăng nồng độ TNF- α , IL-1 β , và INF- γ có ý nghĩa thống kê so với nhóm chuột chứng sinh lý. Chuột ở nhóm III và nhóm IV đã giảm đáng kể nồng độ TNF- α , IL-1 β và INF- γ có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh II trong dịch đồng nhất mô đại tràng ($p < 0,05$) (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả đánh giá các xytokin tiền viêm

	TNF- α (pg/mg protein)	IL-1 β (pg/mg protein)	INF- γ (pg/mg protein)
Nhóm I (Nhóm sinh lý)	$48,2 \pm 3,4$	$64,5 \pm 5,6$	$56,4 \pm 4,8$
Nhóm II (chứng bệnh DSS)	$162,5 \pm 7,8^*$	$219,7 \pm 8,7^*$	$189,4 \pm 7,2^*$
Nhóm III	$121,7 \pm 8,4^\#$	$157,4 \pm 5,7^\#$	$139,7 \pm 8,7^\#$

Nhóm IV	$97,2 \pm 7,5^{\#}$	$127,4 \pm 4,9^{\#}$	$114,7 \pm 6,5^{\#}$
---------	---------------------	----------------------	----------------------

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

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất phân đoạn cao chiết từ lá cây Vối và lá cây đơn giản, sử dụng ít hóa chất và phân đoạn cao chiết thu được từ quy trình này có hiệu quả điều trị bệnh viêm đại tràng cao trên mô hình do DSS gây tổn thương viêm đại tràng ở chuột nhắt trắng. Tác dụng ấy thể hiện thông qua làm giảm chỉ số bệnh DAI, giảm hoạt tính enzym MPO và giảm các chỉ số tiền viêm như TNF- α , IL-1 β , và INF- γ .

YÊU CẦU BẢO HỘ

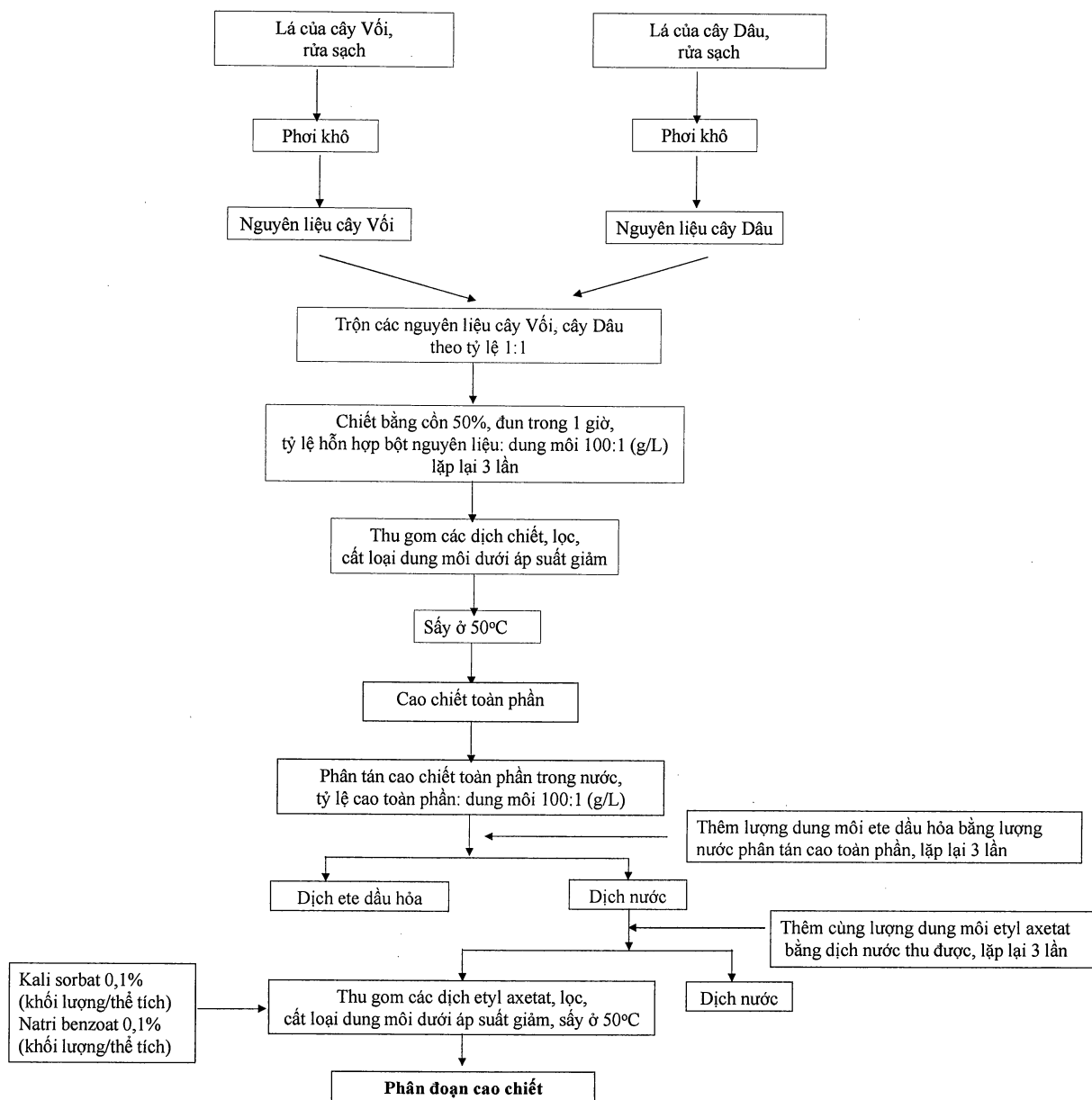
1. Quy trình sản xuất phân đoạn cao chiết từ lá cây Vối và lá cây Dâu dùng để điều trị bệnh viêm đại tràng bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu là lá cây Vối và lá cây Dâu, rửa sạch, phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, trộn lá cây Vối và lá của cây Dâu theo tỷ lệ đồng khối lượng, cụ thể là 1:1 thu được hỗn hợp nguyên liệu;

b) thu cao chiết toàn phần bằng cách chiết hỗn hợp nguyên liệu bằng cồn 50% đun trong 1 giờ theo tỷ lệ hỗn hợp nguyên liệu:dung môi là 100:1 (g/L), chiết lặp lại 3 lần, gộp dịch chiết, lọc qua giấy lọc thu dịch lọc và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, sấy khô ở 50°C thu được cao chiết toàn phần; và

c) thu phân đoạn cao chiết bằng cách phân tán cao chiết toàn phần thu được ở bước b) vào nước cất theo tỷ lệ cao chiết toàn phần: nước là 100:1 (g/L), sau đó thêm cùng một lượng thể tích dung môi ete dầu hỏa vào, để tách lớp và thu lấy phần nước, lặp lại 3 lần, tiếp theo thêm cùng một lượng thể tích dung môi etyl axetat vào phần nước, để tách lớp và thu lấy phần dung môi etyl axetat, công đoạn này lặp lại 3 lần, sau đó gộp các dịch etyl axetat thu được, lọc qua giấy lọc, và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, sấy khô ở 50°C thu được phân đoạn cao chiết.

2. Phân đoạn cao chiết dùng để điều trị bệnh viêm đại tràng thu được từ quy trình theo điểm 1.



Hình 1