



(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)



2-0004184

(51) **A61K 36/185**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00495

(22) 06/09/2023

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/01/2024 430A

(73) Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Nhà A28, số 18 đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Lê Văn Nhân (VN); Nguyễn Quang Trung (VN); Bùi Quang Minh (VN); Nguyễn Tiến Đạt (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT HỖN HỢP CHIẾT PHÂN ĐOẠN CÁC CHẤT CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN TỪ CÂY MẬT GẤU (GYMNANTHEMUM AMYGDALINUM)

(21) 2-2023-00495

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp chiết phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*), trong đó bằng cách sử dụng lần lượt các dung môi chiết có độ phân cực khác nhau bao gồm metanol, etyl axetat, diclometan và *n*-hexan, trong điều kiện chiết siêu âm để rút ngắn thời gian chiết cho phép chiết các hoạt chất từ cây mật gấu để thu được hỗn hợp ức chế vi khuẩn gây bệnh. Các phân đoạn được xác định thành phần và thử nghiệm hoạt tính cho thấy có hiệu quả ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh cho tôm với đường kính kháng khuẩn đạt 17 ± 2 mm và có nồng độ diệt khuẩn tối thiểu đạt 62,5 mg/mL. Hỗn hợp chiết phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ cây mật gấu cho thấy có tiềm năng phát triển thành chế phẩm thay thế thuốc kháng sinh để ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh cho tôm nhằm tăng hiệu quả nuôi tôm, giảm sự phụ thuộc vào các chất kháng sinh tổng hợp giúp phát triển bền vững nghề nuôi tôm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa sinh và các hợp chất từ tự nhiên, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp chiết phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ cây mật gấu có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản, cụ thể là trong ngành nuôi tôm, hàng năm phải sử dụng một lượng thuốc kháng sinh lớn để ngăn ngừa bệnh hại. Điều này tiềm ẩn một nguy cơ tồn dư lượng kháng sinh trên tôm nên sản phẩm tôm nuôi khó tiếp cận được với các thị trường quốc tế. Do đó, đã và đang có nhiều hướng nghiên cứu cho phép tìm kiếm và sử dụng các hoạt chất từ tự nhiên nhằm thay thế các chất kháng sinh nhằm đảm bảo sức khỏe của tôm đồng thời không có dư lượng kháng sinh trong sản phẩm.

Trong số các nghiên cứu, cây mật gấu đã được quan tâm nghiên cứu, từ năm 2011, Eyong và cộng sự đã xác định các thành phần hóa học trong chiết xuất của rễ và thân cây mật gấu, trong đó các thành phần xác định được bao gồm các chất thuộc nhóm saponin, các flavonoid, alkaloid và axit hydrocyanic (Eyong U Eyong, MA Agiang, IJ Atangwho, IA Iwara, MO Odey and PE Ebong. Phytochemicals and micronutrients composition of root and stem bark extracts of *Vernonia amygdalina* Del. *Journal of Medicine and Medical Science*, 2(6), 900-903, 2011). Năm 2015, Usunobun và Okolie đã xác định được các thành phần hóa học thuộc nhóm saponin, alkaloid, flavonoid, tanin, axit ascorbic và beta-caroten trong lá cây mật gấu bằng phương pháp chuẩn độ (Usunobun U and Okolie NP, Phytochemical, trace and mineral composition of *vernonia amygdalina* leaves, *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 2015; 6(5): 393-399; Usunobun U and Okolie NP, Phytochemical analysis and proximate composition of *vernonia amygdalina*. *International Journal of Scientific World*, 4 (1) (2016) 11-14). Cùng thời gian này, Igwe và cộng sự (2015) đã sử dụng ethanol để tách chiết các thành phần hóa học trong lá cây mật gấu và xác định thành phần trên thiết bị sắc ký khí ghép nối với khối phổ

(GC-MS) và xác định được 11 hợp chất hóa học, gồm: 3, 5- bis 1, 1 dimethylethyl (phenol); axit tetradecanoic; 1, 2-epoxyhexadecane (oxirane); methylhexadecanoat (axit palmitic); axit hexadecanoic (axit eicosanoic); axit 9, 12-octadecadienoic (axit linoleic); 3, 7- dimethyldodecan-1-ol (phytol); axit 6-octadecenoic (axit oleic); axit octadecanoic (axit stearic); cholest-5, 3- ol, 5-acetat (cholestan) và axit 1,2 benzenedicarboxylic (di-n-octyl phthalat) (K.K. Igwe et al., GC-MS analysis of phytocomponents in *Vernonia amygdalina*. Del leaves and its contractile potential in mammary tissue in female albino Wistar rats. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 2015, 8(11), 25-30). Năm 2017, Mustapha và cộng sự đã sử dụng phương pháp Soxhlet, dung môi ethanol kết hợp với các dung môi có độ phân cực khác nhau như: chloroform, etyl axetat và n-butanol để tách chiết các thành phần hóa học trong lá cây mật gấu, trong đó có các hợp chất hóa học trong lá cây mật gấu đã được xác định bằng phương pháp này là các tanin, phlobatannin, saponin, carbohydrat, cardioactive glycosit, flavonoit, alkaloit, steroid và terpene (Mustapha A Tijjani et al., Phytochemical analysis, analgesic and antipyretic properties of ethanolic leaf extract of *Vernonia amygdalina* Del. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 2017; 6(3): 95-99). Trong một nghiên cứu khác, Longe và cộng sự (2017) cũng đã sử dụng hệ chiết Soxhlet và tách chiết các thành phần hóa học trong rễ, thân và lá của cây mật gấu bằng metanol ở điều kiện nhiệt độ 100°C. Kết quả phân tích trên thiết bị GC-MS đã xác định được 15 hợp chất có hoạt tính sinh học trong rễ cây mật gấu, 6 hợp chất được phát hiện trong thân và 5 hợp chất khác được tìm thấy trong lá cây mật gấu (Longe Adeteju Olufunmilayo, Momoh Johnson Oshiobugiel and Asoro Iroghama Iyobosa. Gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) analysis of phytocomponents in the root, stem barks and leaf of *vernonia amygdalina*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2017, 6(2), 35-49).

Năm 2019, Oluwaseun và cộng sự đã so sánh hiệu quả của kỹ thuật chiết Soxhlet với phương pháp chiết siêu âm sử dụng dung môi etanol để tách chiết các chất có hoạt tính sinh học trong mẫu lá cây mật gấu. Kết quả phân tích trên thiết bị GC-MS cho thấy, phương pháp tách chiết mẫu bằng sóng siêu âm đã thu được 23 hợp chất có hoạt tính sinh học trong khi phương pháp chiết Soxhlet chỉ xác định được có 5 hợp chất hữu cơ (Oluwaseun Ruth Alara et al., Extraction and characterization of bioactive compounds in *Vernonia amygdalina* leaf ethanolic extract comparing Soxhlet and microwave-assisted extraction techniques. *Journal of Taibah University for Science*,

2019, 13(1), 414-422). Năm 2020, Poppy và cộng sự đã phân tích chiết xuất etyl axetat từ lá cây mật gấu bằng thiết bị sắc ký lỏng ghép nối với khối phổ, kết quả phát hiện được các chất có hoạt tính sinh học, gồm: ingenol-3-angelate, axit chlorogenic, axit 4-methoxycinnamic, flavonoit (apigetrin, apigenin, luteolin, diosmetin, baicalin, rhoifolin và scutellarin), coumarines (7-hydroxycoumarine, 4-metylumbelliferon và 4-metylumbelliferyl glucuronid) (Poppy Anjelisa Zaitun Hasibuan et al., The anticancer activities of *Vernonia amygdalina* Delile. Leaves on 4T1 breast cancer cells through phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway. *Heliyon* 6 (2020) e04449).

Các chất chiết xuất và thành phần hoạt tính từ cây mật gấu đã được chứng minh có tác dụng kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm, chống ung thư, các chất này còn đóng vai trò như các chất chống oxy hóa, giải độc, bảo vệ gan và thận, điều hòa lipid huyết thanh, bảo vệ hệ thần kinh (Ifeoma II et al., Current perspectives on the medicinal potentials of *Vernonia amygdalina* Del. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, 5(7), 1051-1061; Eziuche AU et al., The Phytochemistry, Ethnobotanical, and Pharmacological Potentials of the Medicinal Plant *Vernonia amygdalina* L. (bitter Leaf). *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*, 2021, 1, 100006). Chiết xuất của lá mật gấu bổ sung vào thức ăn cho cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) ở sông Nile giúp cải thiện tốc độ tăng trưởng, nâng cao sức khỏe cá, tăng khả năng chống chịu với sự thay đổi của điều kiện môi trường và kháng vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* (Samuel Opoku Dandi et al, Bitter Leaf *Vernonia amygdalina* Extract Enhances Growth, Hematology, Heat Stress Response, and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Nile Tilapia. *North American Journal of Aquaculture*, 2022, 84(4), 432-441. Mặt khác, chiết xuất từ lá cây mật gấu đã được sử dụng để hạn chế sự phát triển và kiểm soát bệnh nấm thủy mi ở cá nước ngọt (Ebele M I et al., The use of aqueous extracts of *Vernonia amygdalina* in the control of saprolegniasis in *Clarias gariepinus*, a freshwater fish. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 8, 7130-7132).

Như vậy, các thành phần hóa học và các chất có hoạt tính sinh học trong chiết xuất cây mật gấu cho thấy tiềm năng ứng dụng kháng vi khuẩn gây bệnh ở động vật cũng như khả năng bảo vệ sức khỏe mà không liên quan đến các thành phần kháng sinh bị kiểm soát.

Trong nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là nuôi tôm, vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh ảnh hưởng rất lớn đến năng suất. Do đó việc kiểm soát vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm mà không phải sử dụng các chất kháng sinh bị kiểm soát là một hướng cho phép phát triển bền vững ngành nuôi trồng thủy sản nói chung. Tuy nhiên, cần có quy trình chiết nhằm thu được chế phẩm có hoạt tính kháng khuẩn mà không chứa thành phần kháng sinh cho phép sử dụng ức chế vi khuẩn gây bệnh trên tôm là cần thiết.

Do đó, vẫn có nhu cầu phát triển các chế phẩm có hoạt tính kháng khuẩn từ tự nhiên không sử dụng các chất kháng sinh bị cấm hoặc hạn chế sử dụng để thay thế các chế phẩm phòng bệnh cho thủy sản nói chung và nuôi tôm nói riêng. Cụ thể là với tiềm năng kháng khuẩn từ cây mật gấu, cần có quy trình chiết xuất thành phần hoạt tính từ cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*) để thu thành phần có hoạt tính kháng khuẩn không chứa chất kháng sinh bị cấm sử dụng, cho phép ứng dụng để ức chế vi khuẩn gây bệnh trên tôm như vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* góp phần bảo vệ môi trường sinh thái và phát triển bền vững nghề nuôi tôm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm khắc phục các tồn tại nêu trên, cụ thể là sáng chế nhằm đề xuất quy trình sản xuất các hoạt chất có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn từ nguyên liệu thực vật để phát triển các chế phẩm kháng khuẩn ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản. Theo đó, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp chiết phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*) để ứng dụng trong quá trình sản xuất sản phẩm kháng khuẩn an toàn.

Theo mục đích này, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp chiết phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ cây mật gấu, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu thập lá cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*) tươi, sau khi loại bỏ tạp chất, rửa sạch, để ráo và sấy khô ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C đến khi độ ẩm khoảng 10%, sau đó xay nhỏ qua lưới cỡ 100 mesh thành bột, phần bột này được làm ẩm bằng hỗn hợp dung môi metanol:diclometan tỷ lệ 1:1 (theo thể tích) và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 50°C, thu được nguyên liệu đã được xử lý;

b) chiết phân đoạn metanol bằng cách chuyển một lượng nguyên liệu đã được xử lý vào bình ngâm kiệt chứa metanol 75% theo tỷ lệ 1/10 (trọng lượng/thể tích) ngâm trong 48 giờ ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C, sau đó chiết siêu âm trong 60 phút ở tần số 20kHz rồi rút kiệt dung môi thu phần dịch chiết, làm nguội phần dịch chiết đến nhiệt độ phòng, sau đó lọc và cô loại dung môi rồi sấy khô thu được cao chiết phân đoạn metanol dạng bột;

c) chiết phân đoạn diclometan bằng cách bổ sung diclometan vào bình ngâm kiệt chứa bã chiết cây mật gấu sau khi chiết bằng metanol, lượng diclometan bổ sung theo tỷ lệ bã chiết/diclometan là 1/10 (trọng lượng/thể tích), tiến hành khuấy trộn trong 36 giờ ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C, sau đó chiết siêu âm trong 45 phút ở tần số 30kHz rồi rút kiệt dung môi thu phần dịch chiết, sau đó lọc và cô loại dung môi rồi sấy khô thu được cao chiết phân đoạn diclometan dạng bột;

d) chiết phân đoạn etyl axetat bằng cách bổ sung etyl axetat vào phần bã cây mật gấu sau khi chiết bằng diclometan, lượng etyl axetat bổ sung theo tỷ lệ bã chiết/etyl axetat là 1/10 (trọng lượng/thể tích), tiến hành khuấy trộn đều trong 24 giờ ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C, sau đó chiết siêu âm trong 30 phút ở tần số 40kHz rồi lọc thu phần dịch chiết, sau đó cô loại dung môi rồi sấy khô thu được cao chiết phân đoạn etyl axetat dạng bột;

e) chiết phân đoạn *n*-hexan bằng cách bổ sung *n*-hexan vào phần bã chiết etyl axetat, lượng *n*-hexan bổ sung theo tỷ lệ bã chiết/*n*-hexan là 1/10 (trọng lượng/thể tích), tiến hành khuấy trộn đều trong 12 giờ ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C, sau đó chiết siêu âm trong 20 phút ở tần số 45kHz rồi lọc thu phần dịch chiết, sau đó cô loại dung môi rồi sấy khô thu được cao chiết phân đoạn *n*-hexan dạng bột; và

f) thu hỗn hợp chiết phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn bằng cách nghiền mịn và phối trộn cao chiết phân đoạn metanol, cao chiết phân đoạn diclometan, cao chiết phân đoạn etyl axetat và cao chiết phân đoạn *n*-hexan theo tỷ lệ 3:2:2:1 (theo trọng lượng) thu được hỗn hợp chiết dạng bột mịn.

Theo các phương án ưu tiên, trong đó cao chiết phân đoạn metanol thu được bao gồm các thành phần: 2,3-pentanedione, 4-methyl-; 3-pentanone, 2,4-dimethyl-; axit axetic, fluoro-, ethyl este; axit propanoic, 2-oxo-, methyl este; z-11-tridecen-1-ol, acetat; 2-propanone, 1-methoxy-; $C_2H_5C(CH_3)_2COCH_3$; axit butanedioic, 2-hydroxy-2-methyl-, (S)-; butyrolacton; cyclohexanon; axit acetic, (2,4-dichlorophenoxy)-, 2-

butoxypropyl este; xylitol; diglycerol; glycerin; 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-; 2-buten-1-ol, acetat; 1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol; benzofuran, 2,3-dihydro-; hydroquinon; benzen, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-; 1,3-cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-; naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-; beta.-bisabolene; phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-; cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-; 6,8-dioxa-3-thiabicyclo(3,2,1)octane 3,3-dioxide; 4-amino-2,6-dihydroxypyrimidine; 1H-inden-1-one, 2,3-dihydro-5,6-dimethoxy-3-methyl-; bac butanoate; 4(1H)-pyrimidinone, 6-hydroxy-; l-gala-1-ido-octose; D-erythro-pentose, 2-deoxy-; 1,4,7,10-tetraoxacyclododecan-2-one; ethanone, 1-cyclododecyl-; axit d-ribonic, .gamma.-lactone, cyclic 2,3-(ethylboronate); bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-; 2-undecanone, 6,10-dimethyl-; caffein; 9-octadecen-1-ol, (Z)-; axit hexadecanoic, methyl este; axit palmitoleic; axit n-hexadecanoic; trehalose; axit heptadecanoic; axit pentadecanoic; phytol; axit 9,12,15-octadecatrienoic, (Z,Z,Z)-; methyl 8,11,14-heptadecatrienoat; benzyl .beta.-d-glucosit; gama.-sitosterol; axit eicosanoic; stigmastanol; axit 6-methoxy-2-methyl-quinoline-3-carboxylic 2-dimethylamino-ethyl este; axit hexadecanoic, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl este; 1-bromo-11-iodoundecan; 4'-phenyl-2-hydroxystilben; axit 9,12-octadecadienoic (Z,Z)-, 2,3-dihydroxypropyl este; axit linolenic, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl (Z,Z,Z)-; axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) este; squalen; axit hexadecanoic, 2-hydroxy-, methyl este; methyl 2-hydroxydodecanoat; axit thiocctic; estra-1,3,5,7,9-pentaen-17-one, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-; axit octadecanoic, 3-[(1-oxohexadecyl)oxy]-2-[(1-oxotetradecyl)oxy]propyl este; và vitamin E.

Theo các phương án ưu tiên, trong đó cao chiết phân đoạn diclometan thu được bao gồm các thành phần: methylene clorua; diallyl disulphua; 2-indolizinemethanol; 3-vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene; trisulfide, di-2-propenyl; axit 1-aminocyclopentanecarboxylic, n-propyloxycarbonyl-, undecyl este; 1,5-cyclodecadiene, 1,5-dimethyl-8-(1-methylethylidene)-, (E,E)-; 3-cyclohexene-1-methanol, .alpha.,4-dimethyl-.alpha.-(4-methyl-3-pentenyl)-, [R-(R*,R*)]-; benzen, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-; 1,3-cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-; gamma.-muurolen; beta.-bisabolen; (+)-epi-bicyclosesquiphellandren; cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-; 2(4H)-benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-; hexadecan;

1H-indene, 1-ethylideneoctahydro-7a-methyl-, (1E,3a.α.,7a.beta.)-; trans-chrysanthemal; geranyl vinyl ether; 4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol; axit tetradecanoic; 1-methyl-3-n-propyl-2-pyrazolin-5-one; spiro[4.5]dec-6-en-8-one, 1,7-dimethyl-4-(1-methylethyl)-; 9-octadecyn; 3-octadecyn; 1,13-tetradecadien; cyclohexan, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-(1-methylethylidene)-; axit hexadecanoic, methyl este; 1-diphenyl(tert-butyl)silyloxy-4-methoxybenzen; geranyl-p-cymen; axit n-hexadecanoic; ethanol, 2-(octadecyloxy)-; methyl 10-trans,12-cis-octadecadienoat; axit 9,12,15-octadecatrienoic, methyl ester, (Z,Z,Z)-; phytol; axit 9,12-octadecadienoic (Z,Z)-; axit 9,12,15-octadecatrienoic, (Z,Z,Z)-; 13-tetradec-11-yn-1-ol; oct-5-en-2-ol, 8-(1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-2, 5, 5, 8a-tetramethylnaphth-1-yl)-6-methyl-; methyl 6,9,12,15,18-heneicosapentaenoat; axit acetic, 1-methyl-3-(2,2,6-trimethyl-bicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-propenyl este; 17-(1,5-dimethylhexyl)-10,13-dimethyl-4-vinylhexadecahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-ol; gama.-sitosterol; ethanone, 1-(1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-2,4-cyclohexadien-1-yl)-; octadecane, 3-methyl-; axit hexadecanoic, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl este; 1,2-pentanediol, 5-(6-bromodecahydro-2-hydroxy-2,5,5a,8a-tetramethyl-1-naphthalenyl)-3-methylene-; 1H-indene, 1-ethylideneoctahydro-, trans-; 1-bromo-11-iodoundecan; 2-chloroethyl linoleat; axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) este; 9,19-cyclolanostan-3-ol, 24,24-epoxymethano-, acetat; 1,2-benzisothiazole, 3-(hexahydro-1H-azepin-1-yl)-, 1,1-dioxide; squalen; Ergost-25-ene-3,5,6,12-tetrol, (3.beta.,5.α.,6.beta.,12.beta.)-; 2-Dodecen-1-yl(-)succinic anhydrit; nonacosan; ethanol, 2-(3,3-dimethylcyclohexylidene)-, (Z)-; tetracosan; 1,8-dioxacyclohexadecane-2,10-dione, 5,6:12,13-diepoxy-8,16-dimethyl-; 1H-1,2,3,4-tetrazole-1,5-diamine, N(1)-[(2-ethoxy-3-methoxyphenyl)methyl]-; beta.-tocopherol; 3-aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexanol, cis-; hexacosan; i-propyl 11-octadecenoat; vitamin E; axit pregnan-18-oic, 20-hydroxy-, (5.α.)-; pyridine-3-carboxamit, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)-; và axit oleic, eicosyl este.

Theo các phương án ưu tiên, trong đó cao chiết phân đoạn etyl axetat thu được bao gồm các thành phần: n-propyl acetat; 2,3-hexanedion; isobutyl acetat; axit acetic, butyl este; benzen, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-; 1,3-cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-; alfa.-copaene; beta.-bisabolene; cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-; phenol, 2,4-di-*t*-butyl-6-nitro-; axit borinic, diethyl-, 3,3,5-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl este; 9-

octadecyn; caffen; phytol, acetat; axit hexadecanoic, methyl este; axit n-hexadecanoic; ethanol, 2-(octadecyloxy)-; phytol; axit 9,12-octadecadienoic (Z,Z)-; axit 9,12,15-octadecatrienoic, (Z,Z,Z)-; cyclohexane, 1-(1,5-dimethylhexyl)-4-(4-methylpentyl)-; gamma.-sitosterol; cobaltocene, 1,1'-dimethyl-; androst-5,15-dien-3ol acetate; glycerol 1-palmitate; 1H-indene, 1-ethylideneoctahydro-, trans-; axit terephthalic, 4-octyl octyl este; 1,3,12-nonadecatrien; axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) este; squalen; silan, diethylpentadecyloxy(1-phenylpropoxy)-; triacontane, 11,20-didecyl-; sắt, cyclopentadienyl-ethyl-1,2-diisopropylphosphinoethane; benzaldehyde, 2-hydroxy-5-nitro-, 2-iodophenylhydrazone; axit [5-[(Furan-2-carbonyl)amino]-3-methylpyrazol-1-yl]acetic, ethyl este; heptacosan; vitamin E; B(9a)-homo-19-norpregna-9(11),9a-dien-20-one, 3-(dimethylamino)-4,4,14-trimethyl-, (3.beta.,5.alpha.)-; và axit 2,3,9,11-tetrachlorobenz[c]acridine-7-carboxylic.

Theo các phương án ưu tiên, trong đó cao chiết phân đoạn *n*-hexan thu được bao gồm các thành phần: toluen; octan; geranyl acetat; cis-.beta.-farnesen; benzen, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-; 1,3-cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-; tricyclo[5.4.0.0(2,8)]undec-9-ene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (1R,2S,7R,8R)-; beta.-bisabolen; phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-; cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-; nerolidol 1; hexadecan; cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-; decane, 3,8-dimethyl-; phenol, 2,4-di-*t*-butyl-6-nitro-; docosane, 11-butyl-; pentadecane, 2,6,10-trimethyl-; octadecan; 2-pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-; oxirane, tetradecyl-; 1-pentadecyn; phytol, acetat; cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-(1-methylethylidene)-; 7,9-di-*tert*-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione; axit hexadecanoic, methyl este; axit n-hexadecanoic; axit 9,12,15-octadecatrienoic, methyl este, (Z,Z,Z)-; phytol; 3-eicosene, (E)-; axit 9,12-octadecadienoic (Z,Z)-; 9,17-octadecadienal, (Z)-; Z,Z-8,10-hexadecadien-1-ol; (R)-(-)-14-methyl-8-hexadecyn-1-ol; axit fumaric, 2-methylpent-3-yl tridecyl este; axit 9-octadecenoic, (E)-; axit eicosanoic, 2-[(1-oxohexadecyl)oxy]-1-[[[(1-oxohexadecyl)oxy]methyl]ethyl este; axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) este; squalen; B(9a)-homo-19-norpregna-9(11),9a-dien-20-one, 3-(dimethylamino)-4,4,14-trimethyl-, (3.beta.,5.alpha.)-; eicosan; axit hexadecanoic, 2-[(1-oxotetradecyl)oxy]-1,3-propanediyl este; benzenamin, 4-methoxy-N-(triphenylphosphoranylidene)-; 5.alpha.-cholest-8-en-3-one, 14-methyl-; tetracosan; 3-pyridinemethanamine, N-[[4-(dimethylamino)phenyl]methylidene]-; axit octadecanoic,

3-[(1-oxohexadecyl)oxy]-2-[(1-oxotetradecyl)oxy]propyl este; axit hexadecanoic, 2-hydroxy-1,3-propanediyl este; và tripalmitin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả sắc ký đồ cao chiết metanol từ lá cây mật gấu được phân tích trên thiết bị GC-MS.

Hình 2 là kết quả sắc ký đồ cao chiết etyl axetat từ lá cây mật gấu được phân tích trên thiết bị GC-MS.

Hình 3 là kết quả sắc ký đồ cao chiết diclometan từ lá cây mật gấu được phân tích trên thiết bị GC-MS.

Hình 4 là kết quả sắc ký đồ cao chiết *n*-hexan từ lá cây mật gấu được phân tích trên thiết bị GC-MS.

Hình 5 là kết quả sắc ký đồ cao chiết metanol từ lá cây mật gấu được phân tích trên thiết bị LC-MS.

Hình 6 là kết quả sắc ký đồ cao chiết etyl axetat từ lá cây mật gấu được phân tích trên thiết bị LC-MS.

Hình 7 là kết quả sắc ký đồ cao chiết diclometan từ lá cây mật gấu được phân tích trên thiết bị LC-MS.

Hình 8 là kết quả sắc ký đồ cao chiết *n*-hexan từ lá cây mật gấu được phân tích trên thiết bị LC-MS.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể có viện dẫn đến các hình vẽ kèm theo. Tuy nhiên, các phương án và các ví dụ thực hiện này chỉ nhằm mục đích làm rõ sáng chế chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ sáng chế.

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*). Hỗn hợp phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn thu được từ quy trình theo sáng chế cho thấy hiệu quả ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh cho tôm với đường kính kháng khuẩn đạt 17 ± 2 mm và có nồng độ diệt khuẩn tối thiểu đạt 62,5 mg/mL.

Cây mật gấu hay còn gọi là cây lá đắng, cây mật gấu nam, hoàn liên ô rô, mã hồ, có tên khoa học là *Gymnanthemum amygdalinum* hoặc *Vernonia amygdalina* Del.. Cây mật gấu có dạng cây bụi có chiều cao khoảng từ 2 đến 5 mét. Cây có vỏ màu xám nhạt hoặc nâu, cành cây giòn, lá cây có màu xanh, vị đắng, hình trái xoan với hai bên rìa là những mép răng cưa nhỏ. Trong y học cổ truyền, cây mật gấu được sử dụng như một vị thuốc chống giun sán, chống sốt rét, nhuận tràng, bỏ tiêu hóa, khai vị, hạ sốt và dùng để điều trị vết thương tại chỗ. Cây mật gấu được tìm thấy ở nhiều địa phương trên khắp cả nước, đặc biệt tập trung nhiều ở các tỉnh miền núi phía Bắc, rải rác ở các tỉnh miền Trung và miền Nam.

Quy trình sản xuất hỗn hợp chiết phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*) theo sáng chế bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết phân đoạn metanol; c) chiết phân đoạn diclometan; d) chiết phân đoạn etyl axetat; e) chiết phân đoạn *n*-hexan; và f) thu hỗn hợp chiết phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu thập lá cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*) tươi. Sau khi loại bỏ tạp chất, nguyên liệu được rửa sạch, để ráo và sấy khô ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C đến khi khô giòn, độ ẩm khoảng 10%. Sau đó xay nhỏ qua lưới cỡ 100 mesh thành bột. Để quá trình chiết thuận lợi và cho phép chiết triệt để các hoạt chất có từ lá cây mật gấu, phần bột này được làm ẩm bằng hỗn hợp dung môi metanol:diclometan tỷ lệ 1:1 (theo thể tích). Sau đó, ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 50°C, thu được nguyên liệu đã được xử lý. Quá trình làm ẩm và ủ này giúp các tế bào trương ở trong điều kiện vừa đủ cho phép dễ dàng trích ly các thành phần có trong nguyên liệu.

Sau khi chuẩn bị nguyên liệu và ủ, nguyên liệu được chiết phân đoạn lần lượt bằng các dung môi metanol, diclometan, etyl axetat, và *n*-hexan để thu các cao chiết của các phân đoạn tương ứng.

Trong bước chiết phân đoạn metanol, quá trình này sử dụng dung môi metanol để chiết bột lá cây mật gấu bằng cách chuyển một lượng nguyên liệu đã được xử lý vào bình ngâm kiệt chứa metanol 75% theo tỷ lệ 1/10 (trọng lượng/thể tích). Tiếp đó tiến hành ngâm trong 48 giờ ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C. Các tác giả đã nghiên cứu và kết luận rằng với dung môi metanol 75%, hiệu suất chiết cao nhất, cho phép thu được các hoạt chất hòa tan trong dung môi phân cực hiệu quả. Sau đó tiến hành chiết siêu âm

trong 60 phút ở tần số 20kHz. Quá trình này nhằm tăng hiệu quả chiết. Cuối cùng rút kiệt dung môi thu phần dịch chiết. Phần dịch chiết được làm nguội đến nhiệt độ phòng. Sau đó lọc lại phần dịch và cô loại dung môi. Phần cao chiết sau khi loại dung môi ở dạng cao đặc được sấy khô thu được cao chiết phân đoạn metanol dạng bột.

Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó cao chiết phân đoạn metanol chứa chủ yếu các thành phần hoạt chất bao gồm 3-pentanone, 2,4-dimethyl-, 2-propanone, 1-methoxy-, $C_2H_5C(CH_3)_2COCH_3$; benzen, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-, 1,3-cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-; 6,8-dioxa-3-thiabicyclo(3,2,1)octane 3,3-dioxide, 4(1H)-pyrimidinone, 6-hydroxy-, bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (1. α .,2. β .,5. α .)-; axit n-hexadecanoic; phytol; axit 9,12,15-octadecatrienoic, (Z,Z,Z)-; và gama.-sitosterol, axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) este.

Trong bước chiết phân đoạn diclometan, phần bã sau khi chiết bằng metanol được bổ sung diclometan để chiết. Tiến hành bổ sung vào bình ngâm kiệt chứa bã chiết cây mật gấu sau khi chiết bằng metanol một lượng diclometan. Lượng diclometan được bổ sung theo tỷ lệ bã chiết/diclometan là 1/10 (trọng lượng/thể tích). Sau đó tiến hành khuấy trộn để chiết phần bã trong 36 giờ ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C. Tiếp đó, tiến hành chiết siêu âm trong 45 phút ở tần số 30kHz. Quá trình này nhằm tăng hiệu quả chiết. Cuối cùng lọc thu phần dịch chiết và cô loại dung môi. Phần cao chiết sau khi loại dung môi ở dạng cao đặc được sấy khô thu được cao chiết phân đoạn diclometan dạng bột.

Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó cao chiết phân đoạn diclometan chứa chủ yếu các thành phần hoạt chất bao gồm benzen, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-, 1,3-cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-; cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-; 9-octadecyn; axit n-hexadecanoic; phytol; axit 9,12-octadecadienoic (Z,Z)-; axit 9,12,15-octadecatrienoic, (Z,Z,Z)-; gama.-sitosterol; 2-chloroethyl linoleat; axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) este; squalen; và hexacosan.

Trong bước chiết phân đoạn etyl axetat, phần bã sau khi chiết bằng diclometan được bổ sung etyl axetat để chiết. Tiến hành bổ sung vào bình ngâm kiệt chứa bã cây mật gấu sau khi chiết bằng diclometan một lượng etyl axetat. Lượng etyl axetat bổ sung theo tỷ lệ bã chiết/etyl axetat là 1/10 (trọng lượng/thể tích). Sau đó tiến hành

khuấy trộn đều để chiết phần bã trong 24 giờ ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C. Tiếp đó tiến hành chiết siêu âm trong 30 phút ở tần số 40kHz. Quá trình này nhằm rút ngắn thời gian, tăng hiệu quả chiết. Cuối cùng lọc thu phần dịch chiết và cô loại dung môi. Phần cao chiết sau khi loại dung môi ở dạng cao đặc được sấy khô thu được cao chiết phân đoạn etyl axetat dạng bột.

Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó cao chiết phân đoạn etyl axetat chứa chủ yếu các thành phần hoạt chất bao gồm axit acetic, butyl este; axit *n*-hexadecanoic; phytol; axit 9,12-octadecadienoic (Z,Z)-; axit 9,12,15-octadecatrienoic, (Z,Z,Z)-; gamma.-sitosterol; axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) este; sắt, cyclopentadienyl-ethyl-1,2-diisopropylphosphinoethane; axit 2,3,9,11-tetrachlorobenz[c]acridine-7-carboxylic; và axit 2,3,9,11-tetrachlorobenz[c]acridine-7-carboxylic.

Phần bã được chiết trong dung môi *n*-hexan, quá trình này được thực hiện bằng cách bổ sung bổ sung *n*-hexan vào phần bã chiết etyl axetat. Lượng *n*-hexan bổ sung theo tỷ lệ bã chiết/*n*-hexan là 1/10 (trọng lượng/thể tích). Tiến hành khuấy trộn đều trong 12 giờ ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C. Sau đó chiết siêu âm trong 20 phút ở tần số 45kHz rồi lọc thu phần dịch chiết. Cuối cùng lọc thu phần dịch chiết và cô loại dung môi. Phần cao chiết sau khi cô loại dung môi ở dạng cao đặc được sấy khô thu được cao chiết phân đoạn *n*-hexan dạng bột.

Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó cao chiết phân đoạn *n*-hexan chứa chủ yếu các thành phần hoạt chất bao gồm benzen, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-; 1,3-cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-; cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-; axit *n*-hexadecanoic; phytol; axit 9,12-octadecadienoic (Z,Z)-; axit eicosanoic, 2-[(1-oxohexadecyl)oxy]-1-[(1-oxohexadecyl)oxy]methyl]ethyl este; axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) este; benzenamin, 4-methoxy-N-(triphenylphosphoranylidene)-; axit octadecanoic, 3-[(1-oxohexadecyl)oxy]-2-[(1-oxotetradecyl)oxy]propyl este; axit hexadecanoic, 2-hydroxy-1,3-propanediyl este và tripalmitin.

Cần lưu ý, quá trình chiết lần lượt bằng các dung môi với độ phân cực thay đổi cho phép chiết được nhóm các hoạt chất, trong đó nhiều hoạt chất được trích ly trong các phân đoạn khác nhau. Hơn nữa, quá trình chiết này cho phép giải phóng các chất

tan lần lượt. Bằng cách này cho phép rút ngắn thời gian chiết. Tuy nhiên, với các bước chiết sau, cần tăng tần số siêu âm để phá vỡ tế bào thực vật, cho phép giải phóng triệt để các thành phần chất tan ra khỏi tế bào.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chiết phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ cây mật gấu

Lá cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*) tươi được thu thập. Sau khi loại bỏ tạp chất, nguyên liệu được rửa sạch, để ráo và sấy khô ở nhiệt độ khoảng 45°C đến khi khô giòn, độ ẩm khoảng 10%. Sau đó xay nhỏ qua lưới cỡ 100 mesh thành bột. Phần bột được làm ẩm bằng hỗn hợp dung môi metanol:diclometan tỷ lệ 1:1 (theo thể tích) với lượng khoảng 10% theo trọng lượng. Sau đó, ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 50°C để nguyên liệu trương nở, thu được nguyên liệu đã được xử lý.

Chuyển 10 kg bột lá cây mật gấu nguyên liệu đã được xử lý vào bình ngâm kiệt chứa 100 lít metanol 75%. Tiến hành ngâm trong 48 giờ ở nhiệt độ 45°C. Sau đó tiến hành chiết siêu âm trong 60 phút ở tần số 20kHz. Phần dịch chiết được thu hồi và làm nguội đến nhiệt độ phòng. Phần dịch được lọc qua giấy lọc để bỏ phần tạp chất và cô loại dung môi. Phần cao chiết sau khi loại dung môi ở dạng cao đặc được sấy khô thu được 2800 g cao chiết phân đoạn metanol dạng bột.

Tiếp tục bổ sung vào bình ngâm kiệt chứa 10kg bã chiết cây mật gấu sau khi chiết bằng metanol một lượng 100 lít diclometan. Sau đó tiến hành khuấy trộn để chiết phần bã trong 36 giờ ở nhiệt độ 45°C. Tiếp đó, tiến hành chiết siêu âm trong 45 phút ở tần số 30kHz. Lọc thu phần dịch chiết và cô loại dung môi. Phần cao chiết sau khi loại dung môi ở dạng cao đặc được sấy khô thu được 950 g cao chiết phân đoạn diclometan dạng bột.

Tiếp tục bổ sung vào bình ngâm kiệt chứa 10kg bã chiết cây mật gấu sau khi chiết bằng diclometan một lượng 100 lít etyl axetat. Sau đó tiến hành khuấy trộn để chiết phần bã trong 24 giờ ở nhiệt độ 45°C. Tiếp đó, tiến hành chiết siêu âm trong 30 phút ở tần số 40kHz. Lọc thu phần dịch chiết và cô loại dung môi. Phần cao chiết sau khi loại dung môi ở dạng cao đặc được sấy khô thu được 700 g cao chiết phân đoạn etyl axetat dạng bột.

Tiếp tục bổ sung vào bình ngâm kiệt chứa 10kg bã chiết cây mật gấu sau khi chiết bằng etyl axetat một lượng 100 lít *n*-hexan. Sau đó tiến hành khuấy trộn để chiết

phần bã trong 12 giờ ở nhiệt độ 45°C. Tiếp đó, tiến hành chiết siêu âm trong 20 phút ở tần số 45kHz. Lọc thu phần dịch chiết và cô loại dung môi. Phần cao chiết sau khi loại dung môi ở dạng cao đặc được sấy khô thu được 600 g cao chiết phân đoạn *n*-hexan dạng bột.

Các cao chiết phân đoạn metanol, cao chiết phân đoạn diclometan, cao chiết phân đoạn etyl axetat và cao chiết phân đoạn *n*-hexan được nghiền mịn và phối trộn theo tỷ lệ 3:2:2:1 (theo trọng lượng) thu được hỗn hợp sản phẩm chiết phân đoạn từ cây mật gấu.

Ví dụ 2. Xác định cấu trúc và thành phần các chất có trong các cao chiết từ cây mật gấu

Để xác định thành phần các hoạt chất thu được từ cây mật gấu, các phân đoạn cao chiết thu được từ ví dụ 1 bao gồm cao chiết phân đoạn metanol, cao chiết phân đoạn diclometan, cao chiết phân đoạn etyl axetat và cao chiết phân đoạn *n*-hexan thu được từ Ví dụ 1 được đưa đi phân tích bằng hệ thống phân tích sắc ký (Agilent technology 7890 GC) và sắc ký khí ghép nối với đầu dò khối phổ (MS, 5977), cột phân tích DB-5MS (Agilent), có chiều dài cột 30 m, đường kính trong của cột 250 μm , độ dày thành cột 0,25 μm .

Độc lập từng mẫu được phân tán trong nước cất và lọc qua giấy lọc Whatman No.1, rồi lọc qua đầu lọc mẫu có kích thước lỗ màng lọc 0,22 μm vào các ống đựng mẫu có thể tích 2 mL trước khi được tiêm vào máy phân tích GC-MS. Các điều kiện phân tích được thiết lập như sau:

Hệ thống sắc ký khí ghép nối với đầu dò khối phổ (MS, 5977), cột phân tích DB-5MS (Agilent), có chiều dài cột 30 m, đường kính trong của cột 250 μm , độ dày thành cột 0,25 μm . Thể tích mẫu sử dụng là 1 μL , chế độ bơm mẫu không chia dòng, thời gian bơm mẫu 1 phút, nhiệt độ kim bơm mẫu 250°C. Chương trình nhiệt độ của lò cột được thiết lập bắt đầu với 40°C, giữ trong 5 phút, sau đó tăng nhiệt độ của lò theo 2 chu kỳ tăng nhiệt, trong đó: chu kỳ 1 tăng nhiệt độ từ 40°C lên 100°C với tốc độ gia tăng 5°C/phút trong thời gian từ phút thứ 5 đến phút thứ 17, chu kỳ 2 tăng nhiệt độ từ 100°C lên 300°C với tốc độ gia tăng nhiệt độ 8°C/phút trong thời gian từ phút thứ 17 đến phút thứ 42, sau đó giữ 2 phút. Thiết bị khối phổ, nguồn ion hóa có nhiệt độ 230°C, nhiệt độ tiếp xúc 300°C, nhiệt độ tứ cực 150°C.

Chế độ phân tích: full scan. Pha động sử dụng khí helium (độ tinh khiết 99,99%), còn pha tĩnh là cột phân tích. Tổng thời gian phân tích là 44 phút/mẫu, thời gian cất dung môi 3 phút. Phần mềm Enhanced MassHunter được sử dụng để điều khiển thiết bị, còn phần mềm Xcalibur được sử dụng để xử lý kết quả phân tích mẫu. Kết quả, tổng số có 172 thành phần hóa học được phát hiện trong chiết xuất của lá cây mật gấu bằng thiết bị GC-MS. Trong đó, mẫu cao chiết diclometan bao gồm 69 hợp chất. Mẫu cao chiết metanol bao gồm 66 hợp chất. Mẫu cao chiết n-hexan bao gồm 48 hợp chất và mẫu cao chiết etyl axetat bao gồm 39 hợp chất.

Để xác định thành phần không bay hơi có trong mẫu, 10 μL mẫu phân tích sau lọc được tiêm vào thiết bị sắc ký lỏng (Ultimate 3000 HPLC system, Thermo Fisher Scientific, Germany), cột sắc ký: C18 Hypersil GOLD aQ (3 μm , 150 x 2,1 mm) và thiết bị phân tích khối phổ LCQ Fleet MS (Thermo Fisher Scientific, Germany). Pha động sử dụng nước (chứa 0,1% axit formic, A) và dung môi MeOH (100%, B) và, tốc độ dòng dung môi 0,3 mL/phút. Chu trình thay đổi tỷ lệ dung môi của pha động được thiết lập với 10% B từ phút thứ 0-5 phút, sau đó từ phút thứ 5 đến phút thứ 20 tăng lên 100% B, giữ 100% B trong thời gian 5 phút rồi đưa về điều kiện ban đầu 10% B trong 1,0 phút và duy trì cho hết chu trình gradient. Nhiệt độ cột sắc ký 40°C. Tổng thời gian phân tích là 30 phút/mẫu. Điều kiện phân tích khối phổ được thiết lập: nhiệt độ nguồn phun 200°C, tốc độ dòng khí mang 25 L.phút⁻¹, tốc độ dòng khí hỗ trợ 5 L.phút⁻¹, tốc độ dòng khí quét buồng ion hóa 0 L.phút⁻¹, điện thế nguồn phun của ion dương và ion âm lần lượt là 3,6 kV và -3,0 kV, nhiệt độ ống mao quản 200°C, điện thế ống mao quản của ion âm là -31 V và ion dương 4 V; và điện thế thấu kính hội tụ: ion âm là -125 V và ion dương là 70 V. Phần mềm Xcalibur 2.0 được sử dụng để điều chỉnh và tối ưu hóa các thông số trên máy gồm: nhiệt độ nguồn phun, tốc độ dòng khí mang, tốc độ dòng khí hỗ trợ, tốc độ dòng khí quét buồng ion hóa, điện thế nguồn phun, nhiệt độ ống mao quản, điện thế ống mao quản và điện thế thấu kính hội tụ của các ion.

Kết quả phân tích cho thấy xác định được 52 hợp chất hữu cơ không bay hơi, trong đó, có 27 hợp chất trong mẫu cao metanol, 22 hợp chất trong mẫu cao diclometan, 16 hợp chất trong cao etyl axetat và 8 hợp chất chiết trong cao chiết n-hexan.

Kết quả phân tích cho thấy phân đoạn metanol thu được bao gồm các thành phần: 2,3-pentanedione, 4-methyl-; 3-pentanone, 2,4-dimethyl-; axit axetic, fluoro-, ethyl

este; axit propanoic, 2-oxo-, methyl este; z-11-tridecen-1-ol, acetat; 2-propanone, 1-methoxy-; $\text{C}_2\text{H}_5\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COCH}_3$; axit butanedioic, 2-hydroxy-2-methyl-, (S)-; butyrolacton; cyclohexanon; axit acetic, (2,4-dichlorophenoxy)-, 2-butoxypropyl este; xylitol; diglycerol; glycerin; 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-; 2-buten-1-ol, acetat; 1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol; benzofuran, 2,3-dihydro-; hydroquinon; benzen, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-; 1,3-cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-; naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-; beta.-bisabolene; phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-; cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-; 6,8-dioxa-3-thiabicyclo(3,2,1)octane 3,3-dioxide; 4-amino-2,6-dihydroxypyrimidine; 1H-inden-1-one, 2,3-dihydro-5,6-dimethoxy-3-methyl-; bạc butanoate; 4(1H)-pyrimidinone, 6-hydroxy-; l-gala-l-ido-octose; D-erythro-pentose, 2-deoxy-; 1,4,7,10-tetraoxacyclododecan-2-one; ethanone, 1-cyclododecyl-; axit d-ribonic, .gamma.-lactone, cyclic 2,3-(ethylboronate); bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-; 2-undecanone, 6,10-dimethyl-; caffein; 9-octadecen-1-ol, (Z)-; axit hexadecanoic, methyl este; axit palmitoleic; axit n-hexadecanoic; trehalose; axit heptadecanoic; axit pentadecanoic; phytol; axit 9,12,15-octadecatrienoic, (Z,Z,Z)-; methyl 8,11,14-heptadecatrienoat; benzyl .beta.-d-glucosit; gama.-sitosterol; axit eicosanoic; stigmastanol; axit 6-methoxy-2-methyl-quinoline-3-carboxylic 2-dimethylamino-ethyl este; axit hexadecanoic, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl este; 1-bromo-11-iodoundecan; 4'-phenyl-2-hydroxystilben; axit 9,12-octadecadienoic (Z,Z)-, 2,3-dihydroxypropyl este; axit linolenic, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl (Z,Z,Z)-; axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) este; squalen; axit hexadecanoic, 2-hydroxy-, methyl este; methyl 2-hydroxydodecanoat; axit thioctic; estra-1,3,5,7,9-pentaen-17-one, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-; axit octadecanoic, 3-[(1-oxohexadecyl)oxy]-2-[(1-oxotetradecyl)oxy]propyl este; và vitamin E.

Phân đoạn diclometan thu được bao gồm các thành phần: methylene clorua; diallyl disulphua; 2-indolizinemethanol; 3-vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene; trisulfide, di-2-propenyl; axit 1-aminocyclopentanecarboxylic, n-propyloxycarbonyl-, undecyl este; 1,5-cyclodecadiene, 1,5-dimethyl-8-(1-methylethylidene)-, (E,E)-; 3-cyclohexene-1-methanol, .alpha.,4-dimethyl-.alpha.-(4-methyl-3-pentenyl)-, [R-(R*,R*)]-; benzen, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-; 1,3-cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-; gamma.-muurolen; beta.-bisabolen; (+)-epi-

bicyclosesquiphellandren; cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-; 2(4H)-benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-; hexadecan; 1H-indene, 1-ethylideneoctahydro-7a-methyl-, (1E,3a.α.,7a.beta.)-; trans-chrysanthemal; geranyl vinyl ether; 4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol; axit tetradecanoic; 1-methyl-3-n-propyl-2-pyrazolin-5-one; spiro[4.5]dec-6-en-8-one, 1,7-dimethyl-4-(1-methylethyl)-; 9-octadecyn; 3-octadecyn; 1,13-tetradecadien; cyclohexan, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-(1-methylethylidene)-; axit hexadecanoic, methyl este; 1-diphenyl(tert-butyl)silyloxy-4-methoxybenzen; geranyl-p-cymen; axit n-hexadecanoic; ethanol, 2-(octadecyloxy)-; methyl 10-trans,12-cis-octadecadienoat; axit 9,12,15-octadecatrienoic, methyl ester, (Z,Z,Z)-; phytol; axit 9,12-octadecadienoic (Z,Z)-; axit 9,12,15-octadecatrienoic, (Z,Z,Z)-; 13-tetradec-11-yn-1-ol; oct-5-en-2-ol, 8-(1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-2, 5, 5, 8a-tetramethylnaphth-1-yl)-6-methyl-; methyl 6,9,12,15,18-heneicosapentaenoat; axit acetic, 1-methyl-3-(2,2,6-trimethyl-bicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-propenyl este; 17-(1,5-dimethylhexyl)-10,13-dimethyl-4-vinylhexadecahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-ol; gama.-sitosterol; ethanone, 1-(1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-2,4-cyclohexadien-1-yl)-; octadecane, 3-methyl-; axit hexadecanoic, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl este; 1,2-pentanediol, 5-(6-bromodecahydro-2-hydroxy-2,5,5a,8a-tetramethyl-1-naphthalenyl)-3-methylene-; 1H-indene, 1-ethylideneoctahydro-, trans-; 1-bromo-11-iodoundecan; 2-chloroethyl linoleat; axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) este; 9,19-cyclolanostan-3-ol, 24,24-epoxymethano-, acetat; 1,2-benzisothiazole, 3-(hexahydro-1H-azepin-1-yl)-, 1,1-dioxide; squalen; Ergost-25-ene-3,5,6,12-tetrol, (3.beta.,5.α.,6.beta.,12.beta.)-; 2-Dodecen-1-yl(-)succinic anhydrit; nonacosan; ethanol, 2-(3,3-dimethylcyclohexylidene)-, (Z)-; tetracosan; 1,8-dioxacyclohexadecane-2,10-dione, 5,6:12,13-diepoxy-8,16-dimethyl-; 1H-1,2,3,4-tetrazole-1,5-diamine, N(1)-[(2-ethoxy-3-methoxyphenyl)methyl]-; beta.-tocopherol; 3-aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexanol, cis-; hexacosan; i-propyl 11-octadecenoat; vitamin E; axit pregnan-18-oic, 20-hydroxy-, (5.α.)-; pyridine-3-carboxamit, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)-; và axit oleic, eicosyl este.

Phân đoạn etyl axetat thu được bao gồm các thành phần: n-propyl acetat; 2,3-hexanedion; isobutyl acetat; axit acetic, butyl este; benzen, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-; 1,3-cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-; alfa.-copaene; beta.-bisabolene; cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-

6-methylene-, [S-(R*,S*)]-; phenol, 2,4-di-*t*-butyl-6-nitro-; axit borinic, diethyl-, 3,3,5-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl este; 9-octadecyn; caffein; phytol, acetat; axit hexadecanoic, methyl este; axit *n*-hexadecanoic; ethanol, 2-(octadecyloxy)-; phytol; axit 9,12-octadecadienoic (Z,Z)-; axit 9,12,15-octadecatrienoic, (Z,Z,Z)-; cyclohexane, 1-(1,5-dimethylhexyl)-4-(4-methylpentyl)-; gamma.-sitosterol; cobaltocene, 1,1'-dimethyl-; androst-5,15-dien-3ol acetate; glycerol 1-palmitate; 1H-indene, 1-ethylideneoctahydro-, trans-; axit terephthalic, 4-octyl octyl este; 1,3,12-nonadecatrien; axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) este; squalen; silan, diethylpentadecyloxy(1-phenylpropoxy)-; triacontane, 11,20-didecyl-; sắ, cyclopentadienyl-ethyl-1,2-diisopropylphosphinoethane; benzaldehyde, 2-hydroxy-5-nitro-, 2-iodophenylhydrazone; axit [5-[(Furan-2-carbonyl)amino]-3-methylpyrazol-1-yl]acetic, ethyl este; heptacosan; vitamin E; B(9a)-homo-19-norpregna-9(11),9a-dien-20-one, 3-(dimethylamino)-4,4,14-trimethyl-, (3.beta.,5.alpha.)-; và axit 2,3,9,11-tetrachlorobenz[c]acridine-7-carboxylic.

Phân đoạn *n*-hexan thu được bao gồm các thành phần: toluen; octan; geranyl acetat; cis-.beta.-farnesen; benzen, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-; 1,3-cyclohexadiene, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-; tricyclo[5.4.0.0(2,8)]undec-9-ene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (1R,2S,7R,8R)-; beta.-bisabolen; phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-; cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-; nerolidol 1; hexadecan; cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-; decane, 3,8-dimethyl-; phenol, 2,4-di-*t*-butyl-6-nitro-; docosane, 11-butyl-; pentadecane, 2,6,10-trimethyl-; octadecan; 2-pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-; oxirane, tetradecyl-; 1-pentadecyn; phytol, acetat; cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-(1-methylethylidene)-; 7,9-di-*tert*-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione; axit hexadecanoic, methyl este; axit *n*-hexadecanoic; axit 9,12,15-octadecatrienoic, methyl este, (Z,Z,Z)-; phytol; 3-eicosene, (E)-; axit 9,12-octadecadienoic (Z,Z)-; 9,17-octadecadienal, (Z)-; Z,Z-8,10-hexadecadien-1-ol; (R)-(-)-14-methyl-8-hexadecyn-1-ol; axit fumaric, 2-methylpent-3-yl tridecyl este; axit 9-octadecenoic, (E)-; axit eicosanoic, 2-[(1-oxohexadecyl)oxy]-1-[[[(1-oxohexadecyl)oxy]methyl]ethyl este; axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) este; squalen; B(9a)-homo-19-norpregna-9(11),9a-dien-20-one, 3-(dimethylamino)-4,4,14-trimethyl-, (3.beta.,5.alpha.)-; eicosan; axit hexadecanoic, 2-[(1-oxotetradecyl)oxy]-1,3-propanediyl este; benzenamin, 4-methoxy-N-(triphenylphosphoranylidene)-; 5.alpha.-

cholest-8-en-3-one, 14-methyl-; tetracosan; 3-pyridinemethanamine, N-[[4-(dimethylamino)phenyl]methylidene]-; axit octadecanoic, 3-[(1-oxohexadecyl)oxy]-2-[(1-oxotetradecyl)oxy]propyl este; axit hexadecanoic, 2-hydroxy-1,3-propanediyl este; và tripalmitin.

Kết quả phân tích cho thấy có 9 hợp chất được tách chiết bởi cả 4 loại dung môi chiết trên là: beta.-bisabolen; 1,3-cyclohexadien, 5-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, [S-(R*,S*)]-; axit 1,4-benzenedicarboxylic, bis(2-ethylhexyl) ester; benzen, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-; cyclohexen, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-; axit hexadecanoic, methyl este; axit n-hexadecanoic; phytol và squalen. Đặc biệt quá trình chiết này cho phép chiết triệt để các hoạt chất có trong cây mật gấu, cho phép tăng hiệu suất chiết, đồng thời trong toàn bộ các thành phần được xác định, không xuất hiện nhóm hoặc gốc là các chất kháng sinh nằm trong danh mục cấm hoặc hạn chế sử dụng trong chăn nuôi. Điều này đặc biệt hữu ích để phát triển các chế phẩm kháng khuẩn sử dụng trong chăn nuôi.

Ví dụ 3. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm

Mẫu hỗn hợp sản phẩm chiết phân đoạn từ cây mật gấu thu được từ Ví dụ 1 được sử dụng làm mẫu thử nghiệm. Các mẫu đối chứng song song có tỷ lệ phối trộn giữa các thành phần cao chiết với tỷ lệ khác nhau.

Thử nghiệm được thực hiện để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất cây mật gấu bao gồm: (i) Đường kính vòng kháng khuẩn của chiết xuất cây mật gấu; (ii) Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu của chiết xuất cây mật gấu; (iii) Giá trị nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của chiết xuất cây mật gấu.

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm mang plasmit mã hóa hai độc tố ToxA và ToxB được lấy từ bộ sưu tập của Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam được sử dụng làm mẫu đánh giá. Vi khuẩn này được cấy trên môi trường Tryptic Soy Broth Agar có bổ sung 1,5% NaCl và Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose TCBS, ủ ở nhiệt độ khoảng 30°C trong 24 giờ sau đó quan sát màu sắc, hình dạng khuẩn lạc và nhuộm Gram để xác định tính thuần của vi khuẩn. Vi khuẩn thuần được nuôi tăng sinh trong môi trường Brain Heart Infusion Broth có bổ sung 1,5% NaCl, trong 24 giờ, ly tâm ở 4.500

vòng/phút, rửa 2 lần bằng nước muối sinh lý tiệt trùng 0,85% và xác định mật độ bằng phương pháp so màu quang phổ ở bước sóng 580-610 nm ($OD = 1 \pm 0,02$) để đạt mật độ tương đương với 10^9 CFU/mL kết hợp với phương pháp đếm số khuẩn lạc trên môi trường TCBS. Dung dịch huyền phù vi khuẩn sau đó được pha loãng với NaCl 0,85% giảm dần theo tỉ lệ 1:9 để được dãy nồng độ sử dụng trong thí nghiệm cảm nhiễm. Dùng pipetman hút 100 μ L canh khuẩn nhỏ vào giữa đĩa thạch dùng que thủy tinh tráng đều cho đến khi mặt thạch khô. Sau 10-15 phút, trên đĩa thạch đục các lỗ rồi nhỏ 100 μ L dịch cao chiết có chứa 100 μ L dịch chiết xuất lá cây mật gấu được pha ở các nồng độ khác nhau ($1-500 \text{ mg.mL}^{-1}$), trong đó, mỗi nồng độ được bố trí lặp lại 3 lần. Kháng sinh Doxycycline $30 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ được sử dụng làm đối chứng dương và dung dịch DMSO là đối chứng âm trong thí nghiệm. Sau đó, các đĩa thạch thí nghiệm được đặt trong tủ ẩm có nhiệt độ khoảng 28°C trong 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn của chiết xuất lá mật gấu được xác định bằng cách đo đường kính vòng kháng khuẩn của các nồng độ chiết xuất từ lá cây mật gấu. So sánh đường kính vòng kháng khuẩn của các nồng độ này với đối chứng dương ($30 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ kháng sinh Doxycycline) và đối chứng âm (100% DMSO) đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm nuôi.

Mỗi mẫu thử nghiệm, 500 mg từng mẫu thử nghiệm được hòa tan vào 5 mL dung môi DMSO để thu được dịch cao chiết tổng có nồng độ 500 mg.mL^{-1} , sau đó pha loãng thành các nồng độ thấp hơn, gồm: 400 mg.mL^{-1} , 300 mg.mL^{-1} , 200 mg.mL^{-1} , 100 mg.mL^{-1} , 50 mg.mL^{-1} , 25 mg.mL^{-1} , 10 mg.mL^{-1} , 5 mg.mL^{-1} , 1 mg.mL^{-1} .

Đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu và diệt khuẩn tối thiểu của chiết xuất từ lá cây mật gấu. Trong đó: Nồng độ ức chế tối thiểu là nồng độ thấp nhất của chiết xuất lá cây mật gấu ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* ($>80\%$), còn nồng độ diệt khuẩn tối thiểu là nồng độ thấp nhất của chiết xuất lá cây mật gấu mà vi khuẩn bị tiêu diệt hoàn toàn 100%.

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất lá cây mật gấu đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm trong thời gian 72 giờ, cho thấy: chiết xuất của lá cây mật gấu ở các nồng độ cao ($> 100 \text{ mg.mL}^{-1}$) có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, trong khi các nồng độ thấp của chiết xuất lá cây mật gấu ($< 100 \text{ mg.mL}^{-1}$) không có tác dụng kiểm soát sự phát triển

của vi khuẩn. Đường kính vòng kháng khuẩn có sự gia tăng cùng với sự gia tăng nồng độ chiết xuất lá mật gấu từ 100 đến 500 (mg.mL^{-1}) đạt giá trị cao nhất là 17 ± 2 mm đối với mẫu chế phẩm thu được từ Ví dụ 1 với tỷ lệ phối trộn cao chiết phân đoạn metanol, cao chiết phân đoạn diclometan, cao chiết phân đoạn etyl axetat và cao chiết phân đoạn *n*-hexan theo tỷ lệ 3:2:2:1 (theo trọng lượng). Do đó tỷ lệ phối trộn 3:2:2:1 (theo trọng lượng) là tỷ lệ tối ưu cho hiệu quả mạnh nhất.

Đặc biệt, khả năng kháng khuẩn của các chiết xuất từ lá cây mật gấu có nồng độ từ 200 đến 500 mg.mL^{-1} không bị biến đổi bởi sự phát triển của vi khuẩn *vibrio parahaemolyticus* sau 48 giờ với giá trị đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng trong khoảng từ 12-17 mm. Sau 72 giờ thử nghiệm, đường kính vòng kháng khuẩn của các nồng độ chiết xuất lá cây mật gấu vẫn duy trì ở mức cao, dao động trong khoảng từ 10 đến 16 mm. Kết quả này cao hơn so với đối chứng âm (DMSO), nhưng lại thấp hơn so với đối chứng dương sử dụng 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ kháng sinh doxycycline (20 ± 1 mm). Tuy nhiên, những dữ liệu trên cho thấy, chiết xuất của lá cây mật gấu có khả năng kháng khuẩn *vibrio parahaemolyticus*, do đó, chiết xuất này tiếp tục được kiểm tra nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu.

Chuẩn bị các nồng độ chiết xuất của lá cây mật gấu (500 mg.mL^{-1}), nồng độ kháng sinh Doxycycline ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$), đối chứng âm DMSO, nước vô khuẩn, vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (10^6 CFU.mL^{-1}), môi trường nuôi cấy vi khuẩn TSB và dung dịch Resazurin. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) được xác định theo phương pháp pha loãng bậc 2 trên đĩa 96 giếng. Đầu tiên, dùng micropipet hút 100 μL môi trường nuôi cấy vi khuẩn được cho vào tất cả các giếng trên đĩa 96 giếng. Sau đó, bổ sung 100 μL chiết xuất lá cây mật gấu/ kháng sinh Doxycycline/ DMSO/ nước vô khuẩn vào các giếng ở cột thứ nhất của mỗi hàng. Thực hiện pha loãng bậc 2 các dung dịch ở các giếng vừa trộn đều bằng cách dùng micropipet hút 100 μL dung dịch này chuyển qua giếng bên cạnh. Quy trình pha loãng bậc 2 được lặp lại tương tự cho đến giếng thứ mười hai của mỗi hàng và 100 μL dung dịch sau khi trộn đều của giếng cuối cùng được loại bỏ. Tiếp đến, bổ sung 100 μL dịch vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (mật độ 10^6 CFU.mL^{-1}) vào các giếng rồi ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 28-30°C trong thời gian từ 16 đến 18 giờ. Sau đó, bổ sung 40 μL dung

dịch thuốc thử Resazurin 0,01% vào tất cả các giếng để đánh giá tỷ lệ sống của vi khuẩn trên từng giếng. Lưu ý: màu xanh chuyển sang màu hồng nghĩa là có sự tồn tại của vi khuẩn. Để xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu: sử dụng 100 μL mẫu ở các giếng không làm đổi màu thuốc thử trải đều trên đĩa thạch nuôi cấy vi khuẩn sau đó ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 28-30°C. Quan sát sự xuất hiện của vi khuẩn trên các đĩa thạch thí nghiệm để xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của các loại thảo dược nghiên cứu. Các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần trên mỗi nồng độ đánh giá của chiết xuất từ lá cây mật gấu. Các kết quả nghiên cứu ở trên cho phép xác định đường kính vòng kháng khuẩn, nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của chiết xuất từ lá cây mật gấu. Kiểm tra giá trị MIC cho thấy, kháng sinh doxycycline (30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) trên vi khuẩn *vibrio parahaemolyticus* cho kết quả MIC là 1,875 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, trong khi DMSO ức chế vi khuẩn *vibrio parahaemolyticus* ở tỷ lệ thể tích với vi khuẩn là 1:2, còn nước vô khuẩn không ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn. Chiết xuất của lá cây mật gấu thể hiện giá trị ức chế và diệt vi khuẩn *vibrio parahaemolyticus* ở nồng độ 62,5 mg.mL^{-1} .

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình sản xuất hỗn hợp chiết phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*) theo sáng chế cho phép chiết triệt để các thành phần hoạt chất có hiệu quả ức chế vi khuẩn gây bệnh mà không chứa các chất hoặc các gốc chất kháng sinh nằm trong danh mục cấm hoặc hạn chế sử dụng, điều này cho phép phát triển được sản phẩm hỗ trợ cho ngành nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là ngành nuôi tôm chống lại các bệnh do vi khuẩn gây bệnh trên tôm, giúp tôm phát triển khỏe mạnh mà không cần sử dụng chất kháng sinh tổng hợp.

Các thành phần hoạt chất được phân tích và xác định thành phần bằng thiết bị GC-MS, LC-MS và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất từ cây mật gấu đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm. Tổng số xác định được 224 hợp chất hữu cơ trong chiết xuất từ lá cây mật gấu, trong đó, có 172 hợp chất hữu cơ bay hơi được phát hiện bằng thiết bị GC-MS và 52 hợp chất hữu cơ không bay hơi được xác định bằng máy phân tích LC-MS. Hiệu quả ức chế vi khuẩn *Vibrio*

parahaemolyticus gây bệnh trên tôm với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 17 ± 2 mm, nồng độ ức chế vi khuẩn tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu là $62,5 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Sáng chế đặt tiền đề cho các nghiên cứu và ứng dụng chiết các thành phần tự nhiên có tác dụng kháng khuẩn mà không chứa gốc kháng sinh bị cấm hoặc hạn chế, đặc biệt là các chất có hoạt tính kháng khuẩn để tạo ra các sản phẩm chế phẩm thảo dược có tác dụng phòng và hỗ trợ điều trị các bệnh do vi khuẩn *vibrio* gây ra trên tôm nuôi, góp phần hạn chế việc sử dụng kháng sinh, hóa chất phòng trị bệnh trong nuôi tôm, nâng cao chất lượng tôm nuôi, bảo vệ môi trường sinh thái và phát triển bền vững nghề nuôi tôm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất hỗn hợp chiết phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn từ cây mật gấu, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu thập lá cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*) tươi, sau khi loại bỏ tạp chất, rửa sạch, để ráo và sấy khô ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C đến khi độ ẩm khoảng 10%, sau đó xay nhỏ qua lưới cỡ 100 mesh thành bột, phần bột này được làm ẩm bằng hỗn hợp dung môi metanol:diclometan tỷ lệ 1:1 (theo thể tích) và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 50°C, thu được nguyên liệu đã được xử lý;

b) chiết phân đoạn metanol bằng cách chuyển một lượng nguyên liệu đã được xử lý vào bình ngâm kiệt chứa metanol 75% theo tỷ lệ 1/10 (trọng lượng/thể tích) ngâm trong 48 giờ ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C, sau đó chiết siêu âm trong 60 phút ở tần số 20kHz rồi rút kiệt dung môi thu phần dịch chiết, làm nguội phần dịch chiết đến nhiệt độ phòng, sau đó lọc và cô loại dung môi rồi sấy khô thu được cao chiết phân đoạn metanol dạng bột;

c) chiết phân đoạn diclometan bằng cách bổ sung diclometan vào bình ngâm kiệt chứa bã chiết cây mật gấu sau khi chiết bằng metanol, lượng diclometan bổ sung theo tỷ lệ bã chiết/diclometan là 1/10 (trọng lượng/thể tích), tiến hành khuấy trộn trong 36 giờ ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C, sau đó chiết siêu âm trong 45 phút ở tần số 30kHz rồi rút kiệt dung môi thu phần dịch chiết, sau đó lọc và cô loại dung môi rồi sấy khô thu được cao chiết phân đoạn diclometan dạng bột;

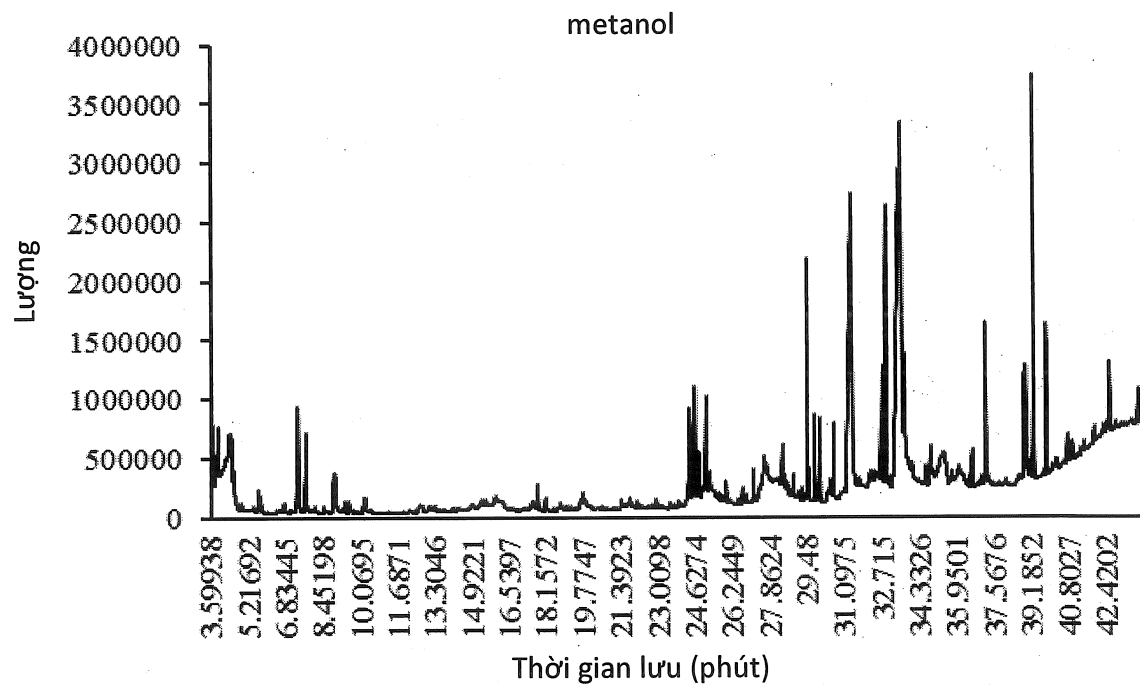
d) chiết phân đoạn etyl axetat bằng cách bổ sung etyl axetat vào phần bã cây mật gấu sau khi chiết bằng diclometan, lượng etyl axetat bổ sung theo tỷ lệ bã chiết/etyl axetat là 1/10 (trọng lượng/thể tích), tiến hành khuấy trộn đều trong 24 giờ ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C, sau đó chiết siêu âm trong 30 phút ở tần số 40kHz rồi lọc thu phần dịch chiết, sau đó cô loại dung môi rồi sấy khô thu được cao chiết phân đoạn etyl axetat dạng bột;

e) chiết phân đoạn *n*-hexan bằng cách bổ sung *n*-hexan vào phần bã chiết etyl axetat, lượng *n*-hexan bổ sung theo tỷ lệ bã chiết/*n*-hexan là 1/10 (trọng lượng/thể tích), tiến hành khuấy trộn đều trong 12 giờ ở nhiệt độ từ 40 đến 50°C, sau đó chiết siêu âm

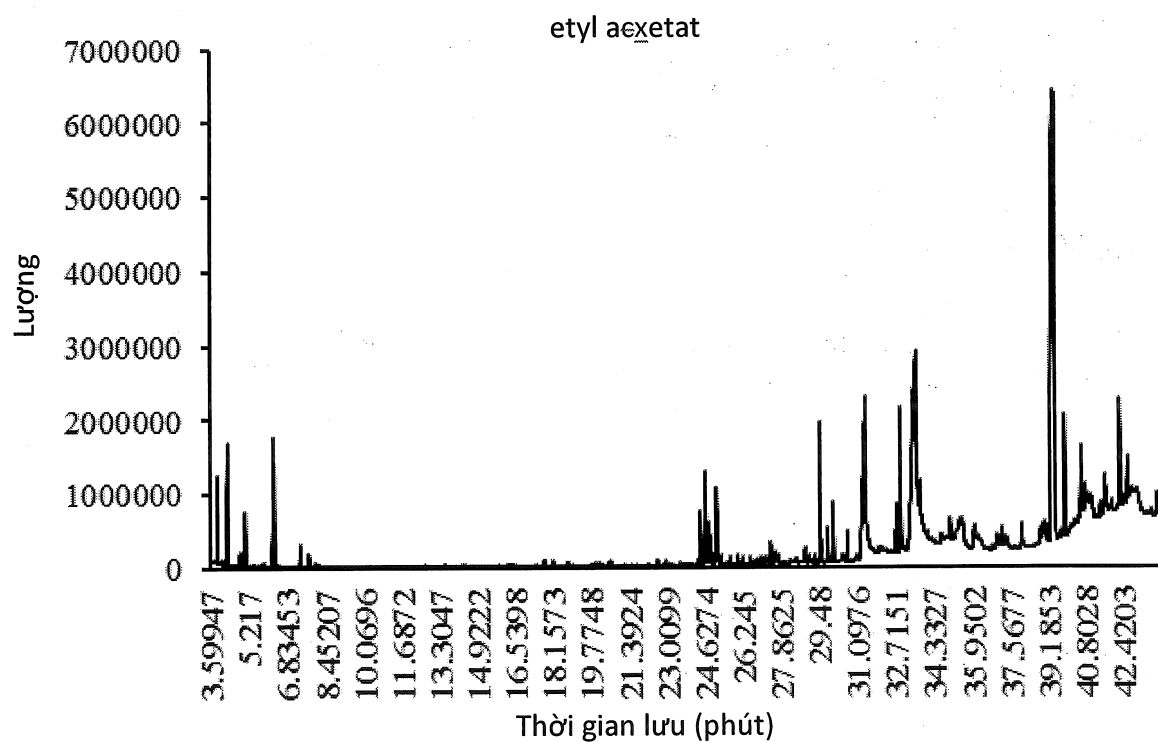
trong 20 phút ở tần số 45kHz rồi lọc thu phần dịch chiết, sau đó cô loại dung môi rồi sấy khô thu được cao chiết phân đoạn *n*-hexan dạng bột; và

f) thu hỗn hợp chiết phân đoạn các chất có hoạt tính kháng khuẩn bằng cách nghiền mịn và phối trộn cao chiết phân đoạn metanol, cao chiết phân đoạn diclometan, cao chiết phân đoạn etyl axetat và cao chiết phân đoạn *n*-hexan theo tỷ lệ 3:2:2:1 (theo trọng lượng) thu được hỗn hợp chiết dạng bột mịn.

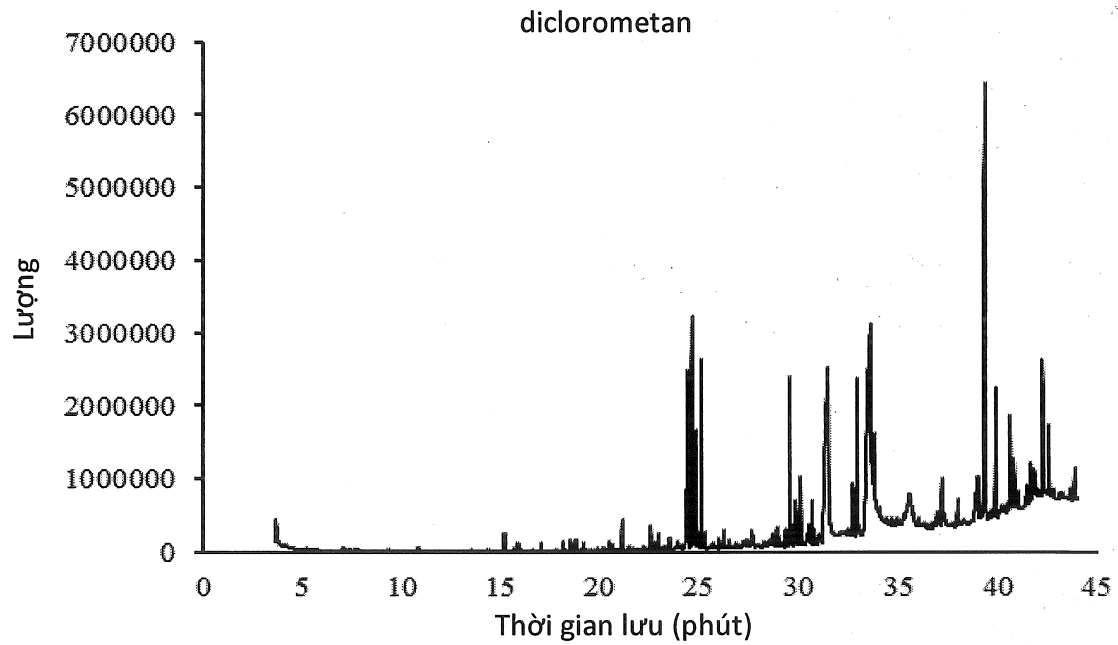
HÌNH 1



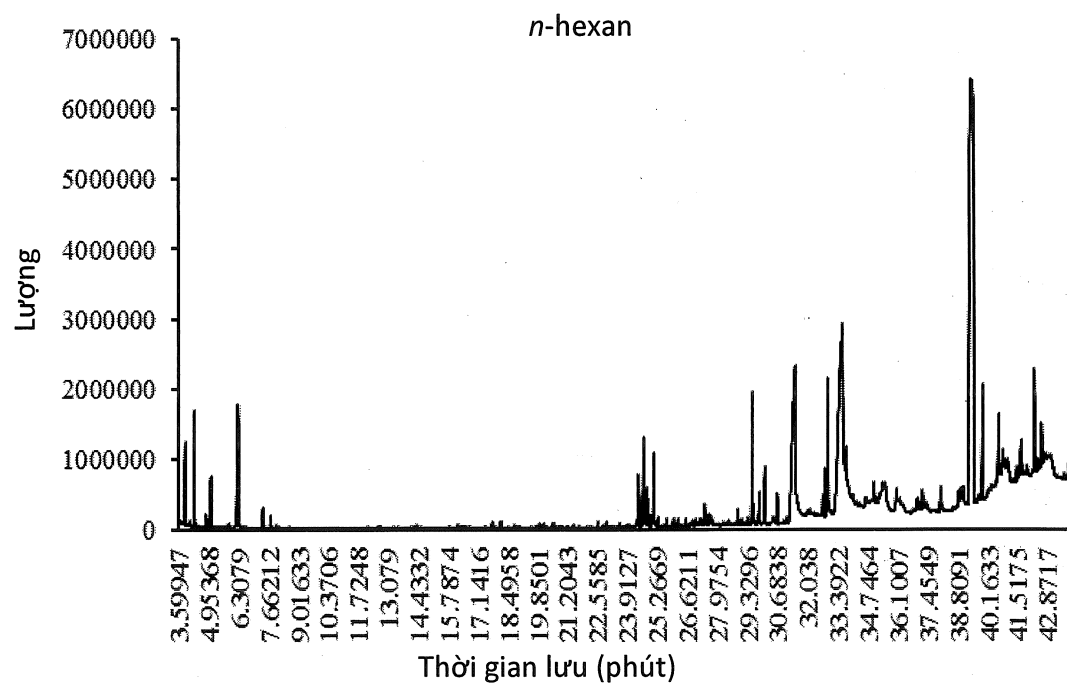
HÌNH 2



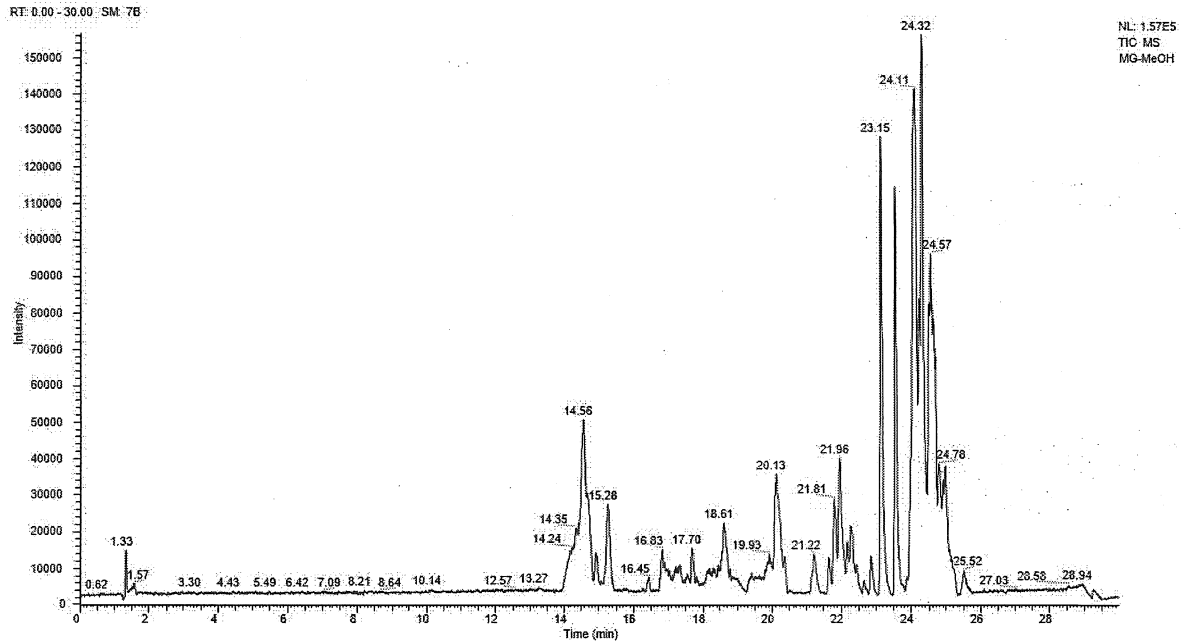
HÌNH 3



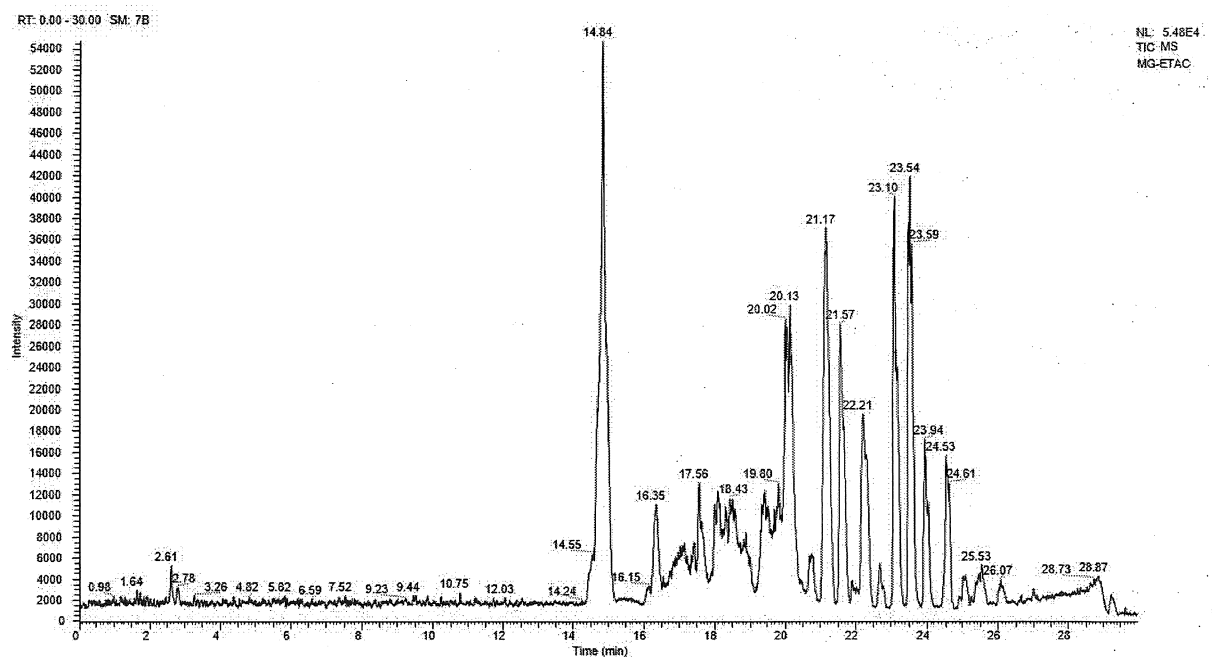
HÌNH 4



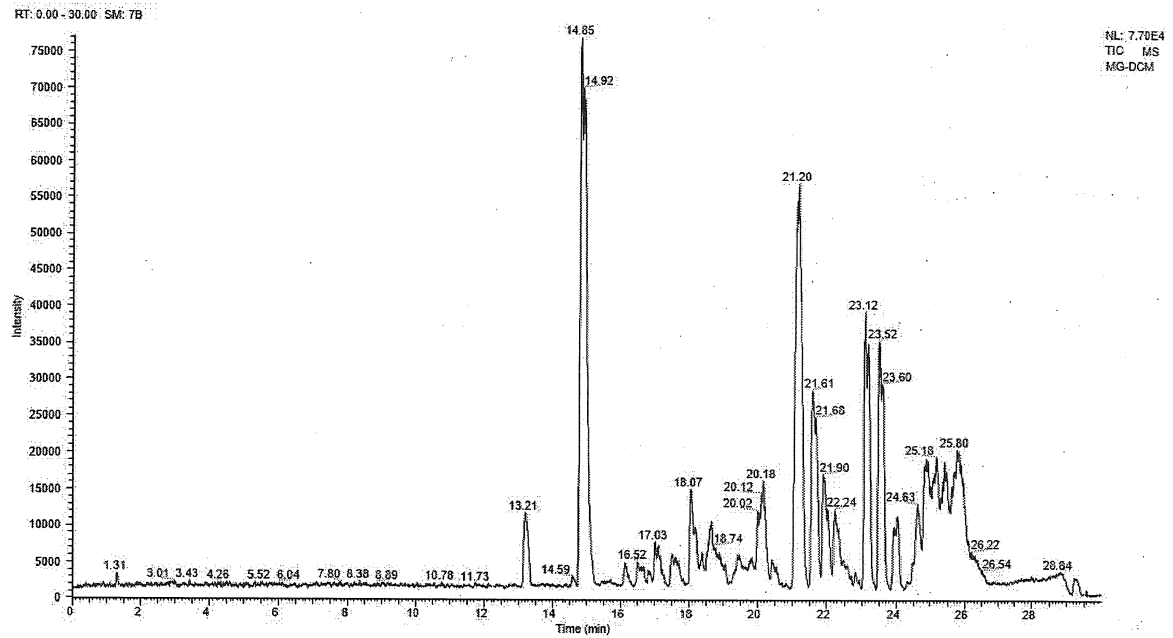
HÌNH 5



HÌNH 6



HÌNH 7



HÌNH 8

