



(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)



2-0004370

(51) **A61K 36/28; A61K 36/00**
2024.01

(13) **Y**

(21) 2-2025-00516

(22) 11/05/2023

(67) 1-2023-03061

(45) 27/10/2025 451

(43) 27/11/2023 428A

(73) Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam - Hàn Quốc (VN)

Khu công nghệ cao Hòa Lạc, Km29 Đại lộ Thăng Long, huyện Thạch Thất, thành phố Hà Nội

(72) Phương Thiện Thương (VN); Nguyễn Đức Hùng (VN); Lương Thùy Nhung (VN);
Nguyễn Thị Phương Thảo (VN).

(74) CÔNG TY TNHH BUD & PRAIRIE (BUD & PRAIRIE LLC.)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CAO TIÊU CHUẨN HY THIÊM TỪ DƯỢC LIỆU HY
THIÊM HERBA SIEGESBECKIA

(21) 2-2025-00516

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất cao tiêu chuẩn từ dược liệu Hy thiêm có chứa các hoạt chất kirenol và/ hoặc darutoside. Quy trình này bao gồm các bước (i) sơ chế dược liệu; (ii) chiết xuất; (iii) lọc dịch chiết; (iv) cô dịch chiết; (v) loại bỏ tạp chất; (vi) sấy cao; (vii) xay cao; (viii) kiểm nghiệm; và (ix) đóng gói, bảo quản. Sản phẩm cao tiêu chuẩn được sản xuất bằng quy trình này đạt tiêu chuẩn cơ sở, trong đó có chỉ tiêu định tính, định lượng các thành phần hoạt chất (có tác dụng chống viêm) kirenol và darutoside với hàm lượng $\geq 2,0\%$.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực dược liệu và cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất cao tiêu chuẩn Hy thiêm từ dược liệu Hy thiêm *Herba Siegesbeckia*. Dược liệu Hy thiêm *Herba Siegesbeckia* được đề cập trong sáng chế là phần trên mặt đất của loài *Siegesbeckia orientalis* L., thuộc họ Cúc (Asteraceae).

Cao tiêu chuẩn Hy thiêm sản xuất từ quy trình này chứa các diterpenoid, trong đó có kirenol và darutoside, là các chất có tác dụng dược lý chống viêm, làm chậm quá trình viêm. Tác dụng này đem lại tác dụng của dược liệu Hy thiêm theo sáng chế có thể được dùng để hỗ trợ điều trị viêm khớp và viêm da cấp, mạn tính.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

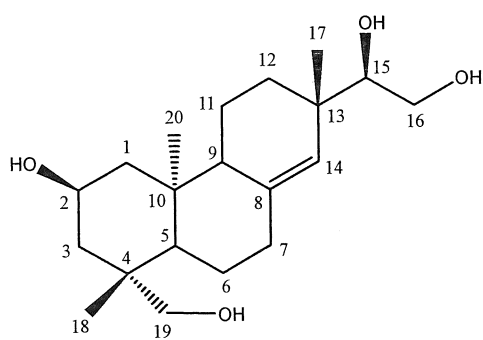
Đã biết cây Hy thiêm là loài thực vật thuộc họ Cúc (Asteraceae), được trồng hoặc mọc hoang ở nhiều tỉnh Việt Nam; có được trồng và mọc hoang tại Trung Quốc. Theo y học cổ truyền, Hy thiêm có vị đắng, tính hàn, có tác dụng tán phong thấp, lợi gân cốt, chữa viêm khớp, chân tay tê dại, lưng mỏi, đau nhức xương khớp, viêm da. Theo nhiều nghiên cứu, tác dụng chống viêm từ dịch chiết của Hy thiêm thể hiện qua việc làm giảm đáng kể sản phẩm NO, IL-6, TNF- α , PGE2, MCP-1, MIP-1 α , RANTES và giảm hàm lượng iNOS, COX-2, mPEGS-1 khi kích thích bằng LPS và giảm phù chân chuột khi gây viêm bằng λ -carrageenan. Hợp chất kirenol từ Hy thiêm đã được chứng minh có tác dụng chống viêm tốt cả *in vitro* và *in vivo*. Theo Dược điển Trung Quốc và Hồng Kông, kirenol được sử dụng làm chất đánh dấu của dược liệu Hy thiêm để xác định tính đúng và đánh giá chất lượng của dược liệu. Nghiên cứu đã cho thấy kirenol có tác dụng chống viêm tương tự như piroxicam trong 4 giờ sau khi tiêm carrageenan và tác dụng giảm đau, ức chế sưng khớp khi gây viêm bởi tá chất Freund hoàn chỉnh. Tuy nhiên, các nghiên cứu cho thấy có rất nhiều mẫu Hy thiêm được trồng và thu hái tại Việt Nam (là loài *Siegesbeckia orientalis* L.) không tìm thấy kirenol, hoặc có hàm lượng rất thấp, mặc dù theo y học cổ truyền và theo kinh nghiệm y học dân gian, Hy thiêm Việt Nam cũng có tác dụng chống viêm, giảm đau tốt.

Hiện nay, trên thị trường thế giới và Việt Nam, dược liệu Hy thiêm được các hãng dược phẩm sử dụng rộng rãi trong các công thức thuốc khác nhau để điều trị nhiều bệnh liên quan đến viêm, gồm viêm khớp và viêm da cấp, mạn tính. Rất nhiều sản phẩm có thành phần cao chiết từ Hy thiêm nhưng chưa chuẩn hóa và làm giàu theo thành phần hoạt tính. Thậm chí, chưa có chất đánh dấu nào được sử dụng để xác định chất lượng cao chiết Hy thiêm nên chất lượng sản phẩm có thể không ổn định, dẫn đến hiệu quả điều trị của các sản phẩm cũng không ổn định giữa các lô sản xuất khác nhau. Nếu không có chất đánh dấu sẽ rất khó kiểm soát chất lượng của các lô sản phẩm. Vì vậy, cần thiết phải nghiên cứu xây dựng quy trình chiết xuất cao tiêu chuẩn Hy thiêm để có thể sử dụng dược liệu Hy thiêm Việt Nam hiệu quả hơn trong hỗ trợ điều trị viêm khớp và viêm da cấp, mạn tính.

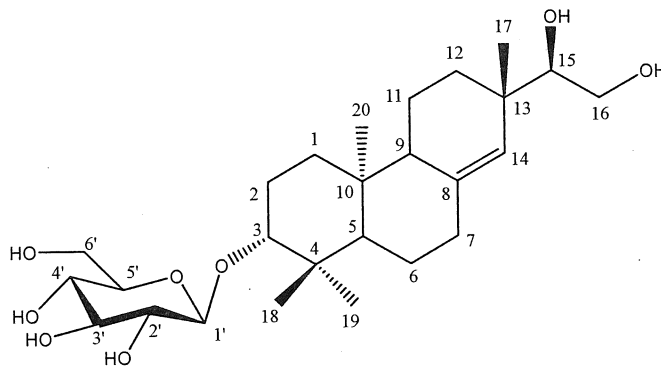
Theo đó, sau thời gian nghiên cứu kỹ lưỡng, thử nghiệm trên nhiều mẫu dược liệu Hy thiêm Việt Nam; tác giả sáng chế đã sáng tạo ra quy trình sản xuất cao tiêu chuẩn từ dược liệu Hy thiêm có thể khắc phục những nhược điểm của giải pháp kỹ thuật đã biết và đáp ứng được nhu cầu cấp thiết nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình sản xuất cao tiêu chuẩn từ dược liệu Hy thiêm, có tổng hàm lượng kirenol (I) và darutoside (II) tối thiểu là 2,0%, tính theo chế phẩm (cao) khô kiệt.



I: Kirenol



II: Darutoside

Cao tiêu chuẩn Hy thiêm có các ưu điểm như: đạt yêu cầu chất lượng theo tiêu chuẩn đề ra, trong đó có chỉ tiêu định lượng các thành phần có hoạt tính (kirenol và

darutoside); chất lượng ổn định trong 6 tháng bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc (nhiệt độ 40°C, độ ẩm 75%), 24 tháng ở điều kiện dài hạn (nhiệt độ 30°C, độ ẩm 75%).

Quy trình sản xuất cao tiêu chuẩn Hy thêm theo sáng chế bao gồm các bước sau:

(i) sơ chế dược liệu: rửa sạch; phơi khô hoặc sấy khô và xay nhỏ dược liệu;

(ii) chiết xuất dược liệu bằng phương pháp hồi lưu, ngâm, ngâm kiệt hoặc siêu âm; ở nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ cao; theo chế độ gián đoạn, liên tục hoặc bán liên tục; ở áp suất khí quyển, áp suất giảm hoặc áp suất cao; với dung môi nước, ethanol, hoặc hỗn hợp của các dung môi này;

(iii) loại tạp cơ học (đất cát, vụn dược liệu...) bằng cách lọc dịch chiết qua vải lọc hoặc màng lọc; hoặc bằng cách ly tâm dịch chiết bằng máy ly tâm;

(iv) cô dịch chiết dưới áp suất giảm hoặc áp suất khí quyển;

(v) loại bỏ tạp chất bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ ethanol, butanol hoặc ethyl axetat;

(vi) sấy cao trong thiết bị cô dưới áp suất giảm hoặc áp suất khí quyển, sau đó sấy trong tủ sấy chân không hoặc tủ sấy tĩnh cho tới khi được cao khô (độ ẩm < 5,0%); hoặc sấy cao bằng phương pháp phun sấy với thiết bị phun sấy;

(vii) xay cao bằng cách trộn cao Hy thêm với tá dược tron aerosol, talc hoặc magnesium/canxi stearat theo tỷ lệ 0,0-0,5% (kl/kl) tá dược tron; rồi xay qua rây 0,1-2,0 mm thu được bột cao tiêu chuẩn Hy thêm;

(viii) kiểm nghiệm bột cao tiêu chuẩn Hy thêm theo tiêu chuẩn cơ sở. Trong đó, tổng hàm lượng kirenol và darutoside phải đạt tối thiểu 2,0%, tính theo chế phẩm khô kiệt;

(ix) đóng gói, bảo quản.

Quy trình sản xuất cao tiêu chuẩn Hy thêm theo sáng chế có nhiều ưu điểm. Thứ nhất, quy trình sử dụng các dung môi phổ biến, giá thành hợp lý; có thể nâng cấp lên quy mô công nghiệp. Thứ hai, sản phẩm trước khi đóng gói được kiểm nghiệm theo tiêu chuẩn cơ sở có bao gồm chỉ tiêu định tính, định lượng các thành phần có hoạt tính chống viêm gồm kirenol và darutoside. Thứ ba, quy trình có thể áp dụng với các nguồn dược liệu Hy thêm xuất xứ từ Việt Nam, là các nguyên liệu không đáp ứng được tiêu chuẩn trong Dược điển Trung Quốc và Dược điển Hồng Kông do không có hoặc có hàm lượng thành phần kirenol rất thấp. Tóm lại, quy trình theo sáng chế có thể áp dụng cho các nguồn nguyên liệu Hy thêm trồng trong nước, cũng áp dụng được cho Hy thêm nhập

từ Trung Quốc. Mục tiêu của sáng chế là đề xuất quy trình chiết xuất và tiêu chuẩn để kiểm soát chất lượng áp dụng được cho sản xuất sản phẩm có thành phần Hy thiêm có nguồn gốc trong nước và nhập khẩu (từ Trung Quốc). Quy trình và tiêu chuẩn đề xuất góp phần nâng cao hiệu quả sản xuất và kiểm soát được chất lượng sản phẩm cao Hy thiêm mà vẫn đảm bảo được chi phí sản xuất hợp lý. Quy trình có thể áp dụng vào thực tiễn đối với các doanh nghiệp sản xuất Việt Nam phục vụ người sử dụng thuốc, thực phẩm chức năng từ dược liệu Hy thiêm.

Sáng chế cũng đề xuất cao tiêu chuẩn Hy thiêm được sản xuất bằng quy trình nêu trên. Cao tiêu chuẩn Hy thiêm có các đặc điểm chủ yếu sau:

- (i) cảm quan: màu vàng đến nâu;
- (ii) định tính: phải thể hiện được phép thử định tính của dược liệu Hy thiêm;
- (iii) định lượng: chứa ít nhất 2,0% tổng hàm lượng kirenol và darutoside (tính theo chế phẩm khô kiệt);
- (iv) kim loại nặng: không quá 20 ppm;
- (v) Độ nhiễm khuẩn:
 - Tổng số vi khuẩn hiếu khí: Không quá 10^4 CFU/g
 - Tổng số nấm: Không quá 10^2 CFU/g
 - Vi sinh vật gây bệnh: Không quá 10^2 CFU vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1 g chế phẩm.
 - Không có *Salmonella* trong 10 g chế phẩm.
 - Không có *Escheria coli*, *Staphylococcus aureus* trong 1 g chế phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được giải thích chi tiết hơn thông qua các phương án cụ thể kết hợp với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Hình 1 là hình vẽ dạng sơ đồ thể hiện quy trình sản xuất cao tiêu chuẩn Hy thiêm.

Hình 2 thể hiện độ phát quang sinh học được tạo ra trong quá trình thử nghiệm tác dụng chống viêm của các diterpenoid trong dược liệu Hy thiêm, được đọc bằng máy Glomax Luminometer.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, để làm cho các mục đích, đặc điểm kỹ thuật và ưu điểm của sáng chế trở nên rõ ràng và dễ hiểu hơn, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết thông qua các phương án cụ thể được ưu tiên kết hợp với các hình vẽ chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế. Do đó, sáng chế không bị giới hạn chỉ ở các phương án cụ thể này.

Như được thể hiện trên Hình 1, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất cao tiêu chuẩn Hy thiêm, có tác dụng hỗ trợ điều trị viêm khớp và viêm da cấp, mạn tính. Quy trình này bao gồm các công đoạn sau đây:

- (i) sơ chế dược liệu;
- (ii) chiết xuất dược liệu;
- (iii) lọc dịch chiết;
- (iv) cô dịch chiết;
- (v) loại bỏ tạp chất;
- (vi) sấy cao;
- (vii) xay cao;
- (viii) kiểm nghiệm bột cao tiêu chuẩn Hy thiêm;
- (ix) đóng gói, bảo quản.

Ở công đoạn (i) là sơ chế dược liệu, dược liệu Hy thiêm được rửa sạch bằng nước sinh hoạt để loại bỏ tạp chất, sau đó được sấy ở 50°C-80°C trong tủ sấy tĩnh đến khi hàm ẩm < 10%. Tiếp theo, dược liệu Hy thiêm được xay nhỏ đến khi được các mảnh dược liệu dài không quá 5 cm.

Ở công đoạn (ii), việc chiết xuất dược liệu bằng dung môi nước hoặc ethanol-nước được thực hiện như sau:

- Cho dược liệu đã xay vào hệ thống chiết nóng, hồi lưu dung môi;
- Cho dung môi chiết vào dược liệu theo tỷ lệ 50-100 lít dung môi/10 kg dược liệu sao cho dung môi thấm ẩm hết dược liệu, để yên trong 1-3 giờ;
- Chiết lần 1 bằng cách đun sôi dược liệu đã thấm ẩm, thời gian chiết là 3 giờ (kể từ thời điểm sôi). Sau đó, rút dịch chiết, thu được dịch chiết lần 1;
- Tiếp tục chiết lần 2 và lần 3 bằng cách thêm dung môi chiết với tỷ lệ 50-100 lít dung môi/10 kg dược liệu, đun sôi trong 3 giờ (kể từ thời điểm sôi). Rút dịch chiết, thu được dịch chiết lần 2 và dịch chiết lần 3;

Ở công đoạn (iii) là lọc dịch chiết, dịch chiết được gạn và lọc qua vải lọc hoặc màng lọc, nhờ đó thu được dịch chiết trong.

Ở công đoạn (iv) là cô dịch chiết, dịch chiết được chuyển sang nồi cô tuần hoàn áp suất giảm, cô ở nhiệt độ 50°C-60°C, cho tới khi thu được cao lỏng Hy thiêm. Thông thường, cứ với mỗi kg dược liệu thì thu được 500-2000 ml cao lỏng.

Ở công đoạn (v) là loại tạp chất, được thực hiện bằng một trong các cách sau:

- Cách thứ nhất, dung môi ethanol 96% được sử dụng để loại tạp chất ra khỏi cao. Cao lỏng Hy thiêm được thêm ethanol cao độ (70%-96%) theo tỷ lệ 1 lít cao lỏng/1-10 lít ethanol cao độ. Sau đó, khuấy trộn, lọc qua vải lọc để loại-tủa, thu được cao ethanol.

- Cách thứ hai, dung môi ethyl axetat được sử dụng để loại tạp chất ra khỏi cao. Cao lỏng Hy thiêm được thêm etyl axetat theo tỷ lệ 1 lít cao lỏng/1-10 lít ethyl axetat. Sau đó khuấy trộn, để yên từ 1-3 giờ cho phân lớp, bỏ lớp nước ở dưới, thu lấy lớp ethyl axetat ở trên. Có thể lặp lại quá trình chiết lỏng-lỏng trên từ 1-3 lần. Gộp dịch ethyl axetat, thu được cao ethyl axetat.

Ở công đoạn (vi), quy trình sấy cao được thực hiện như sau:

- Cô cao ethanol hoặc cao ethyl axetat: Tiến hành cô trong nồi cô áp suất giảm, ở nhiệt độ 40°C-60°C, áp suất giảm tới khi độ ẩm < 20% thì lấy cao mềm ra.

- Sấy khô cao mềm: Cho cao mềm vào khay sấy, dàn mỏng trong tủ sấy chân không, nhiệt độ sấy 50°C-70°C cho tới khi cao đạt độ ẩm < 5,0%.

Ở công đoạn (vii) là xay cao, trộn cao Hy thiêm với aerosil theo tỷ lệ 0,0%-0,5% aerosil (kl/kl), rồi xay qua rây 0,2-0,5 mm thu được bột cao tiêu chuẩn Hy thiêm.

Ở công đoạn (viii) là kiểm nghiệm, bột cao tiêu chuẩn Hy thiêm được kiểm nghiệm theo tiêu chuẩn cơ sở. Trong đó, tổng hàm lượng kirenol và darutoside phải đạt tối thiểu 2,0%, tính theo chế phẩm khô kiệt.

Ở công đoạn (ix) là đóng gói, bảo quản, bột cao tiêu chuẩn Hy thiêm đạt tiêu chuẩn cơ sở được đóng gói trong 2 lần túi polyethylen kín, để nơi khô, thoáng mát, tránh ẩm mốc.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, giải pháp theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn nữa thông qua các ví dụ chỉ với mục đích minh họa cho giải pháp. Cần lưu ý rằng, các bước, thành phần và điều kiện thực hiện tốt hơn là, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bước, thành phần và điều kiện như được mô tả một cách cụ thể trên đây và dưới đây.

Ví dụ 1: Sản xuất cao tiêu chuẩn Hy thêm quy mô 10 kg nguyên liệu/mẻ

- Sơ chế: Dược liệu Hy thêm được rửa sạch, sấy trong tủ sấy tĩnh ở 50°C-70°C đến khi hàm ẩm < 10%. Sau đó, được xay nhỏ bằng máy nghiền dược liệu thành các mảnh dược liệu dài không quá 5 cm.

- Chiết xuất: Cho dược liệu đã xay vào hệ thống chiết nóng, hồi lưu dung môi. Thêm nước tinh khiết theo tỷ lệ 80 lít nước tinh khiết/10 kg dược liệu sao cho dung môi thấm ẩm hết dược liệu, để yên trong 2 giờ. Chiết lần 1 bằng cách đun hồi lưu ở nhiệt độ 100°C trong 3 giờ (kể từ thời điểm sôi), và rút dịch chiết, thu được dịch chiết lần 1. Tiếp tục chiết lần 2 và lần 3 bằng cách thêm nước tinh khiết với tỷ lệ 80 lít nước tinh khiết/10 kg dược liệu, đun hồi lưu ở nhiệt độ 100°C trong 3 giờ (kể từ thời điểm sôi), và rút dịch chiết thu được dịch chiết lần 2 và dịch chiết lần 3. Dịch chiết lần 3 thu được, dùng cho lần chiết thứ 2 của mẻ tiếp theo.

- Lọc dịch chiết: Gom dịch chiết lần 1 và lần 2, gạn, rồi lọc qua vải lọc thu được dịch trong.

- Cô dịch chiết: Dịch chiết được cô bằng nồi cô tuần hoàn áp suất giảm, ở nhiệt độ 50°C-60°C, cho tới khi thu được khoảng 8 lít cao lỏng.

- Loại tạp chất: Thêm 16 lít dung môi ethanol 96% vào 8 lít cao lỏng, khuấy trộn, lọc qua vải lọc để loại tủa, thu được cao ethanol.

- Sấy cao: Cao ethanol được cô trong nồi cô tuần hoàn áp suất giảm ở 50°C-60°C cho đến khi thu được cao mềm (độ ẩm < 20%). Cao mềm được cho vào khay sấy, dàn mỏng, sấy ở 50°C-60°C trong tủ sấy chân không đến khi thu được cao khô (độ ẩm < 5,0%).

- Xay cao: Trộn cao với aerosil theo tỷ lệ 0,2% aerosil (kl/kl), rồi xay qua rây 0,3 mm thu được bột cao tiêu chuẩn Hy thêm (bán thành phẩm).

- Kiểm nghiệm: Lấy mẫu kiểm nghiệm bán thành phẩm theo tiêu chuẩn cơ sở, trong đó tổng hàm lượng kirenol và darutoside phải đạt tối thiểu 2,0% (tính theo chế phẩm khô kiệt). Đến khi có kết quả kiểm nghiệm đạt mới được đưa vào giai đoạn đóng gói.

- Đóng gói, bảo quản: Cao tiêu chuẩn Hy thêm được đóng gói trong 2 lần túi polyethylen hàn kín, để nơi khô, thoáng mát, tránh ẩm mốc.

Ví dụ 2: Tiêu chuẩn cơ sở của Cao tiêu chuẩn Hy thêm

Các chỉ tiêu chất lượng của Cao tiêu chuẩn Hy thêm như sau:

- Tính chất: Bột cao có màu nâu, có mùi đặc trưng dược liệu.
- Mất khối lượng do làm khô: Không quá 10%.
- Định tính: Chế phẩm phải thể hiện phép thử định tính của Hy thêm.
- Tro toàn phần: Không quá 30,0%, tính theo chế phẩm khô kiệt.
- Kim loại nặng: Không quá 20 ppm.
- Cặn không tan trong nước: Không quá 5,0%, tính theo chế phẩm khô kiệt.
- Định lượng: Cao tiêu chuẩn chứa ít nhất 2,0% tổng hàm lượng kirenol và darutoside, tính theo chế phẩm khô kiệt.
- Độ nhiễm khuẩn:
 - + Tổng số vi khuẩn hiếu khí: Không quá 10^4 CFU/g
 - + Tổng số nấm: Không quá 10^2 CFU/g
 - + Vi sinh vật gây bệnh: Không quá 10^2 CFU vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1 g chế phẩm.
 - + Không có *Salmonella* trong 10 g chế phẩm.
 - + Không có *Escheria coli*, *Staphylococcus aureus* trong 1 g chế phẩm.

Ví dụ 3: Thử nghiệm tác dụng chống viêm của các diterpenoid trong dược liệu Hy thêm

Tế bào NF-kB reporter (Luc)-Hek293 là tế bào dùng để nghiên cứu con đường truyền tín hiệu của NF-kB bằng cách sử dụng sự phản ứng của NF-kB để cảm ứng quá trình phiên mã gen phát quang sinh học luciferaza (firefly luciferase gene). Con đường dẫn truyền qua NF-kB được hoạt hóa bởi các cytokin tiền viêm như là TNF- α , kích thích phản ứng gây viêm. Khi được kích hoạt bởi TNF- α , NF-kB điều hành phiên mã các gen phát quang sinh học (luciferaza). Khi cho thuốc thử ONE-Glo vào tế bào, 5'-Fluoroluciferin trong thuốc thử sẽ phản ứng với luciferaza được biểu hiện để tạo ra Oxyfluoroluciferin và ánh sáng. Lượng ánh sáng tạo ra (độ phát quang sinh học) có thể đo được bằng máy đo phát quang sinh học (luminometer).

Độ phát quang sinh học càng cao, lượng luciferaza biểu hiện càng nhiều, tức là con đường gây viêm bằng NF-kB được kích hoạt bằng TNF- α càng nhiều. Mẫu nghiên cứu ức chế được TNF- α được coi như có tác dụng chống viêm *in vitro*.

Tiến hành:

- Tế bào NF-kB reporter (Luc)-Hek293 được nuôi cấy trong môi trường MEM-EBBS hoàn chỉnh (môi trường MEM-EBBS bổ sung 10% FBS, 1% Penixilin-Streptomycin, 1% muối pyruvat, 1% axit amin không thiết yếu ở 37°C, 5% CO₂).

- Tế bào NF-kB reporter (Luc)-Hek293 được đưa vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 30.000 tế bào/giếng và nuôi trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂ trong 24 giờ.

- Ủ tế bào với mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2 giờ.

- Thêm TNF- α 5 ng/ml (pha trong môi trường không huyết thanh) vào mỗi giếng, ủ trong 24 giờ.

- Thêm 50 μ L thuốc thử ONE-Glo (được pha loãng 5 lần trong nước cất) vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.

- Độ phát quang sinh học được đọc bằng máy Glomax Luminometer được thể hiện trên Hình 2.

Kết quả đo độ phát quang sinh học cho thấy, trên mô hình này cả 2 diterpenoid (kirenol, darutoside) đều thể hiện tác dụng ức chế TNF- α tốt. Chất chứng dương dexamethason cũng thể hiện tác dụng ức chế TNF- α tốt trên mô hình. Cả 2 diterpenoid này ở liều 100 μ g/ml đều thể hiện tác dụng ức chế mạnh, dường như không kém đối chứng dương là dexamethason.

TNF- α được biết đến với vai trò chính trong việc điều hòa chức năng viêm và miễn dịch, điều hòa sự phát triển và biệt hóa nhiều loại tế bào. Nó đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của các bệnh viêm như viêm khớp dạng thấp, viêm ruột, viêm cột sống dính khớp, bệnh vẩy nến. Do đó, liệu pháp kháng TNF- α đã trở thành một trong những phương pháp điều trị cho các bệnh tự miễn dịch. Do vậy, tác dụng ức chế TNF- α của các diterpenoid này phần nào giải thích cho việc sử dụng cao Hy thiêm trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp trong y học cổ truyền.

Hiệu quả đạt được của sáng chế:

- Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất cao tiêu chuẩn Hy thiêm, có tiêu chuẩn cơ sở rõ ràng, đặc biệt có chỉ tiêu định tính, định lượng các thành phần có hoạt tính chống viêm gồm kirenol và darutoside. Việc đề xuất được Tiêu chuẩn rõ ràng góp phần nâng cao tiêu chuẩn cao Hy thiêm (nguyên liệu), từ đó nâng cao chất lượng các sản phẩm chống viêm từ dược liệu Hy thiêm.

- Việc sử dụng hai hoạt chất làm chất đánh dấu là giải pháp có thể áp dụng được cho đa dạng các nguồn dược liệu Hy thiêm trồng tại Việt Nam và nhập khẩu từ Trung Quốc. Vì vậy, cao hy thiêm không cần nhất thiết phải tuân theo Dược điển Trung Quốc.

- Quy trình sản xuất cao Hy thiêm sử dụng các dung môi phổ biến, giá thành hợp lý; có thể nâng cấp lên quy mô công nghiệp mà vẫn đảm bảo được chi phí sản xuất hợp lý.

Vì vậy, sáng chế có ý nghĩa thực tiễn đối với các doanh nghiệp sản xuất Việt Nam, với doanh nghiệp trồng Hy thiêm tại Việt Nam và người sử dụng thuốc, thực phẩm chức năng từ dược liệu Hy thiêm.

Nội dung mô tả trên đây chỉ là các phương án cụ thể của sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Bất kỳ thay đổi, cải biến hoặc thay thế nào hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật trong phạm vi kỹ thuật được bộc lộ bởi các phương án của sáng chế sẽ nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế như được thể hiện trong yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình sản xuất cao tiêu chuẩn Hy thiêm từ dược liệu Hy thiêm *Herba Siegesbeckia*, là phần trên mặt đất của loài *Siegesbeckia orientalis* L., thuộc họ Cúc (Asteraceae) bao gồm các bước sau:

(i) sơ chế dược liệu: rửa sạch; phơi khô hoặc sấy khô và xay nhỏ dược liệu;

(ii) chiết xuất:

cho dược liệu hệ thống chiết nóng, hồi lưu dung môi, bổ sung nước tinh khiết theo tỷ lệ thể tích nước : khối lượng dược liệu là 8/1 để nước thấm ẩm hết dược liệu, để yên trong 2 giờ; chiết lần 1 bằng cách đun hồi lưu ở nhiệt độ 100°C trong 3 giờ (kể từ thời điểm sôi), và rút dịch chiết, thu được dịch chiết lần 1; tiếp tục chiết lần 2 và lần 3 bằng cách thêm nước tinh khiết với tỷ lệ 8/1 như trên, đun hồi lưu ở nhiệt độ 100°C trong 3 giờ (kể từ thời điểm sôi), và rút dịch chiết thu được dịch chiết lần 2 và dịch chiết lần 3; trong đó, dịch chiết lần 3 thu được, dùng cho lần chiết thứ 2 của mẻ tiếp theo;

(iii) lọc dịch chiết: gom dịch chiết lần 1 và lần 2, gạn, rồi lọc qua vải lọc thu được dịch trong;

(iv) cô dịch chiết: dịch chiết được cô bằng nồi cô tuần hoàn áp suất giảm, ở nhiệt độ 50°C-60°C, cho tới khi thu được cao lỏng;

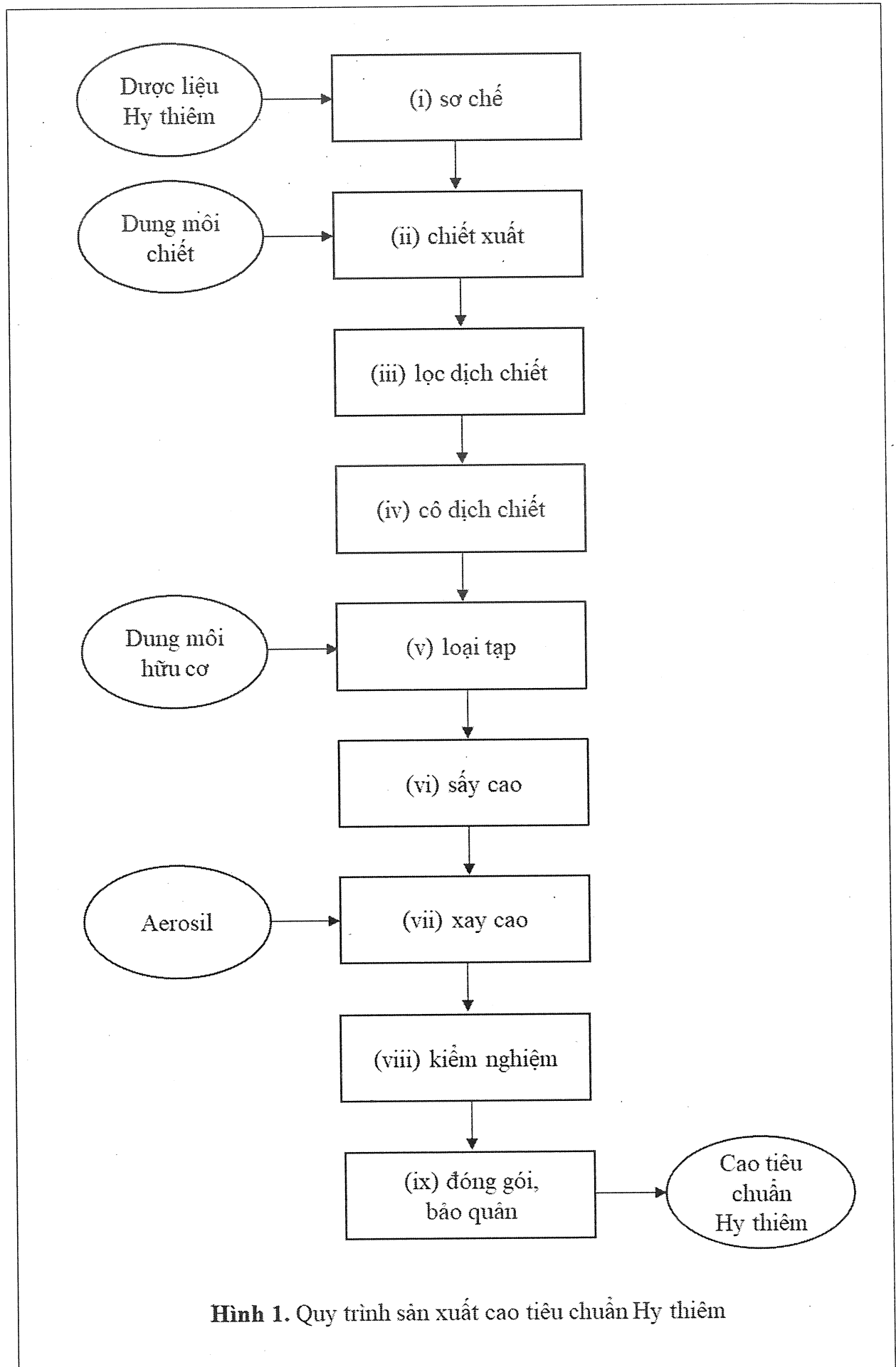
(v) loại bỏ tạp chất: thêm dung môi ethanol 96% vào cao lỏng theo tỷ lệ ethanol/cao lỏng bằng 2/1 (thể tích), khuấy trộn, lọc qua vải lọc để loại tủa, thu được cao ethanol;

(vi) sấy cao: cao ethanol được cô trong nồi cô tuần hoàn áp suất giảm ở 50°C-60°C cho đến khi thu được cao mềm có độ ẩm < 20%; cao mềm này được cho vào khay sấy, dàn mỏng, sấy ở nhiệt độ 50°C-60°C trong tủ sấy chân không đến khi thu được cao khô có độ ẩm < 5,0%;

(vii) xay cao: cao Hy thiêm thu được ở bước (vi) được bổ sung tá dược tron aerosol, talc hoặc magnesium/canxi stearat theo tỷ lệ 0,2% (khối lượng); rồi xay qua rây 0,1-2,0 mm thu được bột cao tiêu chuẩn Hy thiêm;

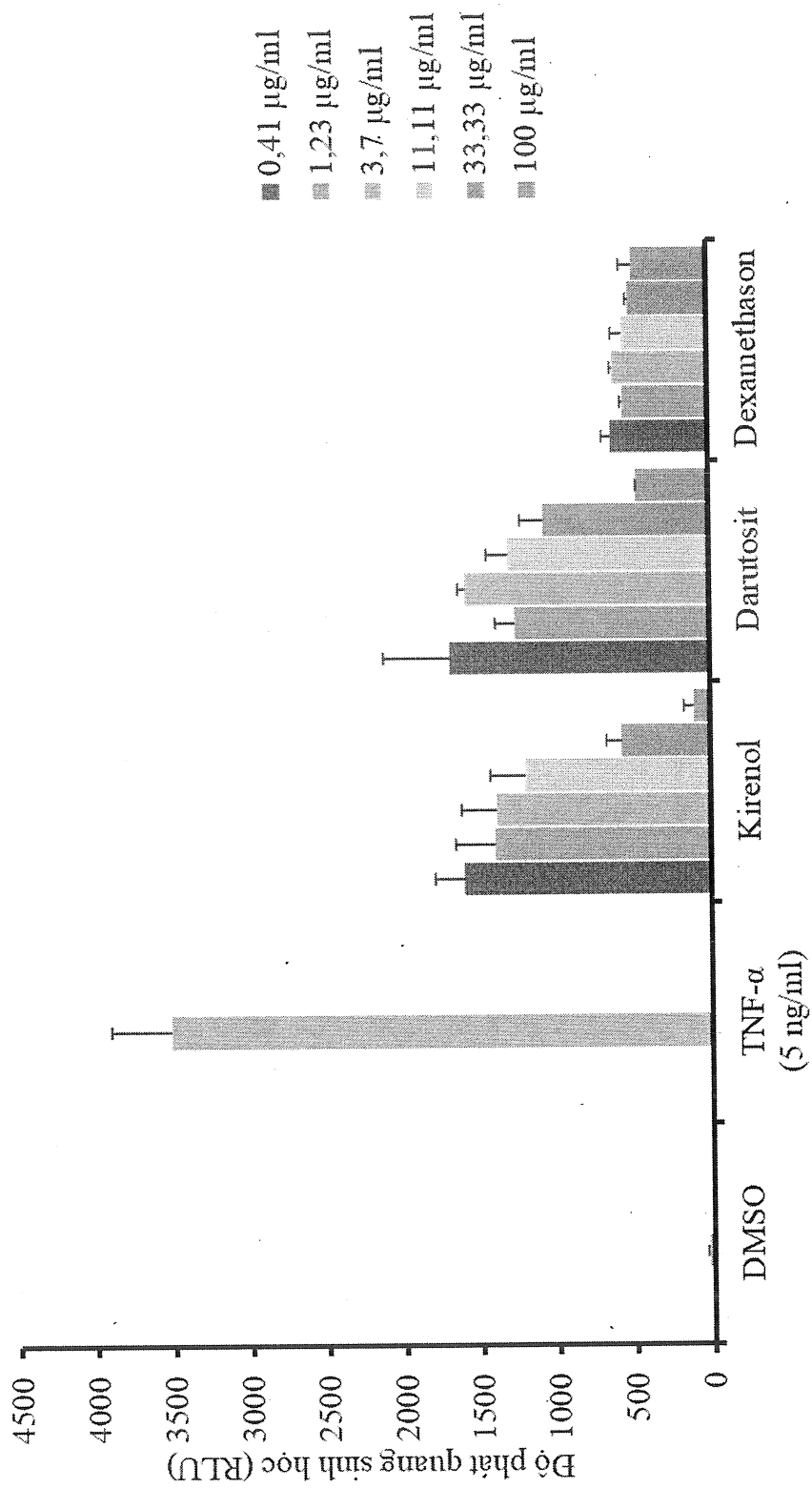
(viii) kiểm nghiệm: lấy mẫu kiểm nghiệm bán thành phẩm theo tiêu chuẩn cơ sở, trong đó tổng hàm lượng kirenol và darutoside phải đạt tối thiểu 2,0% (tính theo chế phẩm khô kiệt); và

(ix) đóng gói, bảo quản.



Hình 1. Quy trình sản xuất cao tiêu chuẩn Hy thiên

2



Hình 2. Độ phát quang sinh học được tạo ra trong quá trình thử nghiệm tác dụng chống viêm của các diterpenoid trong được liệu Hy thêm, được đọc bằng máy Glomax Luminometer