



(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)



**2-0004404**

(51) **A61K 36/286; A61P 3/10; A61P 3/04**  
2022.01

(13) **Y**

---

(21) 2-2022-00503

(22) 18/11/2022

(45) 27/10/2025 451

(43) 27/05/2024 434

(73) Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội (VN)  
Nhà Y1, Số 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Vũ Đức Lợi (VN); Nguyễn Thúc Thu Hương (VN); Nguyễn Thị Mai (VN).

---

(54) **QUY TRÌNH CHIẾT HỖN HỢP HOẠT CHẤT CÓ TÁC DỤNG CHỐNG VIÊM  
LOÉT DẠ DÀY TỪ CÂY YẾN BẠCH (CHROMOLAENA ODORATA L)**

(21) 2-2022-00503

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày từ cây YẾN BẠCH (*Chromolaena odorata* L), quy trình theo giải pháp sử dụng kỹ thuật chiết chọn lọc cho phép chiết được bốn hoạt chất từ phân đoạn etyl axetat có tác dụng chống viêm loét dạ dày hiệu quả cho phép phát triển nguồn dược liệu từ thảo dược. Hỗn hợp hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày thu được từ cây YẾN BẠCH theo giải pháp hữu ích cho thấy có hiệu quả trong việc chống viêm loét dạ dày trên mẫu động vật thử nghiệm.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực hóa học và các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày từ cây Yền bạch (*Chromolaena odorata* L).

### Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đã có nhiều nghiên cứu, tìm kiếm các hoạt chất có tác dụng sinh học từ dược liệu để góp phần phát triển dược phẩm, đặc biệt là những dược phẩm có tác dụng chống viêm loét dạ dày giúp điều trị bệnh viêm loét dạ dày. Một trong những loài được nghiên cứu đó là cây *Commelina diffusa* (Yền bạch) có chứa các hợp chất thuộc nhóm alcaloit, flavonoit aglycon (flavon, flavonol và flavanol), teropen và terpenoit, tanin cũng như các hoạt chất thuộc nhóm sapoin.

Ngoài ra, Yền bạch được coi như là một loại cây có tác dụng chống viêm, cầm máu tiềm năng. Owoyele và các cộng sự đã chứng minh rằng chiết xuất nước của *C.odorata* có tác dụng chống viêm phụ thuộc vào liều sau khi so sánh tác dụng ức chế quá trình viêm giữa các dịch chiết có nồng độ khác nhau và indomethacin trên chuột Wistar. Các hoạt động chống viêm được quan sát thấy trong nghiên cứu này có thể là do một hoặc sự kết hợp của các thành phần, quan trọng nhất là tamarixetin và kaempferit, là 4-metyl ete của quercetin và kaempferol flavonol. Trong đó, quercetin và kaempferol được biết đến là những chất chống oxy hóa và chống viêm mạnh.

Một vài nghiên cứu khác lại chỉ ra cơ chế của tác dụng chống viêm này là ức chế các yếu tố gây viêm. Phiên mã COX-2 và iNOS được kích hoạt thông qua con đường NF- $\kappa$ B. Do đó, NF- $\kappa$ B là yếu tố phiên mã đa năng và đóng một vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh phản ứng miễn dịch đối với viêm và bệnh tự miễn. Chiết xuất methanol của bộ phận trên mặt đất của *C.odorata* được phân chia bằng các dung môi khác nhau, chỉ phần butanolic ức chế vừa phải COX-1 và COX-2, phần etyl axetat từ dịch chiết lá đã ức chế sản xuất nitric oxit (NO), và cũng ức chế hoạt động của NF- $\kappa$ B trong tế bào đại thực bào RAW 264.7. Chiết xuất lá etanolic thể hiện hoạt tính ức chế chống lại sự sản sinh yếu tố hoại tử khối u (TNF- $\alpha$ ) từ *Propionibacterium acnes*, một loại vi khuẩn tạo mủ gây ra mụn viêm (ức chế 470%). Chiết xuất diclorometan ức chế

TNF- $\alpha$  và interleukin IL-1 $\beta$  gây ra bởi nội độc tố của các dòng tế bào nguyên bào sợi nướu và monocyte của người. Hơn nữa, chiết xuất ethanol thể hiện sự ức chế mạnh mẽ trong mô hình phù tai do tetradecanoyl phorbol axetat gây ra. Pandith và cộng sự đã chứng minh rằng Scutellarein tetramethyl ete (SCU) và stigmasterol trong chiết xuất của *C.odorata* có hoạt tính sinh học đối với sự biểu hiện của COX-2 và protein iNOS / mRNA do nội độc tố vi khuẩn (LPS) gây ra trong đại thực bào RAW 264.7 (chuột); đồng thời ức chế sản xuất NO và PGE2 thông qua ngăn chặn sự phát triển của con đường NF- $\kappa$ B.

Rana dhar và cộng sự lại phân lập được 2',4-Dihydroxy-3',4',6'-trimethoxychalcon với hoạt tính kháng viêm nhờ vào giảm sản xuất NO và các cytokin tiền viêm, TNF- $\alpha$ , IL-1b, và IL-6 thông qua sự ức chế các con đường tín hiệu NF- $\kappa$ B và p38 MAPK. Trong khi đó, các chất chuyển hóa của axit linoleic hoặc axit linolenic đã được một nhóm nghiên cứu ở Việt Nam tìm ra cũng cho kết quả tương tự. Melatonin - một chất chống viêm tiêu chuẩn và các phân đoạn giàu flavonoid từ *Chromolaena odorata* đã được chỉ định cho những con chuột mắc viêm dạ dày do aflatoxin B1. Sau khi so sánh, nhận thấy tác dụng chống viêm dạ dày của các phân đoạn giàu flavonoid thông qua ức chế IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  và ngăn chặn sản xuất NO - các yếu tố gây ra viêm. Như vậy, có thể thấy tác dụng chống viêm tiềm năng của chiết xuất *C.odorata* qua các hợp chất có hoạt tính sinh học rõ ràng.

Một cơ chế của tác dụng này đã được nghiên cứu. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy rằng một trong những cơ chế có thể có để tăng cường khả năng chữa lành vết thương của *C.odorata* có thể là tác dụng chống oxy hóa của các chất chiết xuất do hỗn hợp các phenol chống oxy hóa đảm nhiệm: axit protocatechuic, axit p-hydroxybenzoic, axit p-coumaric, axit ferulic và axit vanillic, cũng là các hợp chất hoạt động chính của nhiều cây thuốc có khả năng chữa lành vết thương. Các tác giả đã khẳng định, những axit được phân lập từ chiết xuất của *C.odorata* này được chứng minh là chịu trách nhiệm bảo vệ các tế bào da được nuôi cấy chống lại tác hại của quá trình oxy hóa. Các flavonoid được xác định trong các phân đoạn khác nhau có khả năng có tác dụng hiệp đồng.

Người ta phát hiện ra rằng chiết xuất nước của *C.odorata* ức chế sự co lại của mạng lưới collagen bởi các nguyên bào sợi ở da bình thường. Mức độ ức chế phụ thuộc vào nồng độ của chiết xuất và của collagen. Ở liều cao nhất của chiết xuất

*C.odorata*, 200 đến 400/ $\mu\text{g/ml}$ , sự co lại của gel collagen đã bị ngăn chặn hoàn toàn. Ở nồng độ collagen cao (1 hoặc 1,3 mg / ml), collagen co lại chậm và 100  $\mu\text{g/ml}$  chiết xuất đã ức chế hoàn toàn sự co bóp cho đến ngày thứ 7 hoặc ngày thứ 9. Điều này gợi ý rằng chiết xuất có thể có ý nghĩa điều trị trong việc giảm thiểu sự co thắt và biến dạng sẹo sau bỏng.

Giúp cầm máu cũng là một khía cạnh trong tác dụng chữa lành vết thương của chiết xuất *C.odorata*. Sau khi so sánh thời gian chảy máu ở chuột, Pandith và cộng sự chỉ ra rằng tất cả các chất chiết xuất từ cùi, ngoại trừ chất chiết xuất từ 50% etanol, làm giảm đáng kể thời gian chảy máu tốt hơn so với chất chiết xuất dạng nước đông khô. Dịch chiết 70% etanol từ lá khô được tìm thấy là dịch chiết có hoạt tính cầm máu mạnh nhất. Ở nghiên cứu khác của mình, Pandith và cộng sự đã khẳng định được cơ chế cầm máu, góp phần chữa lành vết thương.

Trong cách sử dụng truyền thống, lá được nghiền thành bột nhão và được bôi tại chỗ trên những nơi bị ảnh hưởng để chữa lành vết thương. Ở Việt Nam, cây này được dùng làm thuốc trị vết cắn của tổ đũa, vết thương mô mềm, bỏng, nhiễm trùng da. Hơn nữa, dịch chiết từ nước lá được sử dụng rộng rãi như một loại thuốc trị tiêu chảy, sốt rét và tiểu đường.

Như vậy, cây Yên bạch đã cho thấy được ứng dụng rộng rãi trong điều trị nhiều loại bệnh, nhưng chưa có quy trình cho phép chiết các hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày. Hiện nay, với mục đích phát triển nguồn dược liệu thay thế cho hoạt chất hóa học tổng hợp, việc tìm ra, phát triển dược phẩm thay thế từ thảo dược đang được chú trọng. Với ưu thế về khả năng chống viêm loét dạ dày tiềm năng, cây Yên bạch là một ứng viên có thể phát triển nguồn dược liệu an toàn. Do đó, cần có quy trình chiết các hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày với hiệu suất và độ tinh sạch đủ để phát triển thành dược phẩm.

### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Giải pháp hữu ích nhằm khắc phục các nhược điểm nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày từ cây Yên bạch, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu gom phần trên mặt đất của cây Yên bạch (*Chromolaena odorata L*), sau khi loại bỏ tạp chất, sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ

50-60°C đến khô, sau đó xay nhỏ qua cỡ sàng 5mm thu được nguyên liệu là bột cây Yên bạch có độ ẩm khoảng 10%;

b) chiết nguyên liệu bằng cách ngâm chiết nguyên liệu bột cây Yên bạch trong dung môi etanol 70% trong 2 ngày ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25-35 °C, thu hồi phần dịch chiết;

c) chiết loại tạp chất bằng cách cô quay phần dịch chiết trong điều kiện áp suất giảm để loại dung môi thu được cao chiết tổng, tiếp đó hòa tan cao chiết tổng này trong nước và chiết phân lớp lần lượt với *n*-hexan và etyl axetat trong 30 phút, sau đó loại cất loại bỏ dung môi, thu cao chiết phân đoạn etyl axetat;

d) thu phân đoạn chứa hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày bằng cách nhồi cao chiết phân đoạn etyl axetat lên cột silica gel và rửa giải lần lượt bằng hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc với tỷ lệ *n*-hexan giảm dần từ 5/1 xuống 1/1 (theo thể tích) rồi tiếp tục rửa giải bằng hệ dung môi CHCl<sub>3</sub>/MeOH với tỷ lệ CHCl<sub>3</sub> giảm dần từ 10/1 đến 1/1 (theo thể tích), gom các phân đoạn xuất hiện màu trên cơ sở kiểm tra sắc ký bản mỏng;

e) phân lập hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày bằng cách phân tách phân đoạn thu được trên cột silica gel kích thước 45mmx350mm với hệ pha động EtOAc/MeOH tỷ lệ 5/1 (theo thể tích), thu bốn phân đoạn đầu, mỗi phân đoạn 500ml, ký hiệu là E1, E2, E3, E4, tương ứng:

+ phân đoạn E1 được nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/ethylaxetat tỷ lệ 4/1 (theo thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất 3-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl) propane-1,2-diol;

+ phân đoạn E2 được nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/ethylaxetat tỷ lệ 8/1 (theo thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất kaemferol -7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosit;

+ phân đoạn E3 được nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/ethylaxetat tỷ lệ 8/1 (theo thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất naringenin-5,7-di-O- $\beta$ -D-glucopyranosit;

+ phân đoạn E4 được nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha đảo với hệ dung môi rửa giải là MeOH/H<sub>2</sub>O tỷ lệ 3/1 (theo thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất rubrosteron; và

f) thu hỗn hợp hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày bằng cách gộp chung các thành phần bao gồm 3-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl) propane-1,2-diol, kaemferol -7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosit, naringenin-5,7-di-O- $\beta$ -D-glucopyranosit và rubrosteron thu được ở trên, sau khi phối trộn đều thu được hỗn hợp hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày dạng bột.

### **Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích**

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

Nguyên liệu được sử dụng để chiết hỗn hợp có tác dụng chống viêm loét dạ dày là cây Yến bạch. Cây Yến bạch có tên khoa học là *Chromolaena odorata* L, là một loài cây bụi lâu năm, có thân thẳng, to, dễ gãy, phân nhiều nhánh, lá hình tam giác hoặc hình trứng có ba gân, lá so le và có hệ thống rễ ngắn, xơ. Hoa có màu trắng đến xanh nhạt tùy theo từng vùng miền. Cây có thể đạt tới 10 m khi được trồng trong điều kiện thích hợp với thảm thực vật phong phú.

Bằng cách chiết chọn lọc từng thành phần hoạt chất có trong cây Yến bạch, các tác giả đã phát triển quy trình cho phép thu hồi các hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày cho phép phát triển nguồn dược liệu. Do đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết hỗn hợp hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày từ cây Yến bạch, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) chiết nguyên liệu; c) chiết loại tạp chất; d) thu phân đoạn chứa tạp chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày; e) phân lập hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày; và f) thu hỗn hợp hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, tiến hành thu gom phần trên mặt đất của cây Yến bạch (*Chromolaena odorata* L). Sau khi loại bỏ tạp chất, sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50-60°C đến khô, sau đó xay nhỏ qua cỡ sàng 5mm thu được nguyên liệu là bột cây Yến bạch có độ ẩm khoảng 10%.

Trong bước chiết nguyên liệu, tiến hành cách ngâm chiết nguyên liệu bột cây Yến bạch trong dung môi etanol 70% trong hai ngày trong điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25-35 °C, thu hồi phần dịch chiết.

Trong bước chiết loại tạp chất bằng cách cô quay phần dịch chiết trong điều kiện áp suất giảm để loại dung môi thu được cao chiết tổng. Tiếp đó, hòa tan phần cao chiết trong nước và chiết phân lớp lần lượt với *n*-hexan và etyl axetat, mỗi dung môi được chiết trong 30 phút. Sau đó cất loại bỏ dung môi, thu cao chiết phân đoạn etyl axetat. Cao chiết này được sắc ký để thu hoạt chất mong muốn. Các kỹ thuật sắc ký là đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Việc xác định phân đoạn chiết được thực hiện trên cơ sở phân tích sắc ký bản mỏng với thuốc thử đặc hiệu cho phân đoạn cần xác định cho phép xác định và thu được phân đoạn chiết mong muốn.

Trong bước thu phân đoạn chứa hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày, tiến hành nhồi cặn chiết phân đoạn etyl axetat lên cột silica gel và rửa giải lần lượt bằng hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc với tỷ lệ *n*-hexan giảm dần từ 5/1 xuống 1/1 (theo thể tích) rồi tiếp tục rửa giải bằng hệ dung môi CHCl<sub>3</sub>/MeOH với tỷ lệ CHCl<sub>3</sub> giảm dần từ 10/1 đến 1/1 (theo thể tích). Gom các phân đoạn xuất hiện màu trên cơ sở kiểm tra sắc ký bản mỏng.

Trong bước phân lập hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày, tiến hành phân tách phân đoạn thu được trên cột silica gel kích thước 45mmx350mm. Tiến hành rửa giải với hệ pha động EtOAc/MeOH tỷ lệ 5/1 (theo thể tích). Thu bốn phân đoạn đầu, mỗi phân đoạn 500ml, ký hiệu là E1, E2, E3, E4, tương ứng. Các phân đoạn này được tiến hành sắc ký độc lập để thu các hoạt chất tinh sạch mong muốn.

Phân đoạn E1, phân đoạn đầu tiên, được nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/ethylaxetat tỷ lệ 4/1 (theo thể tích). Sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất 3-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl) propane-1,2-diol dạng bột.

Phân đoạn E2, phân đoạn thứ hai, được nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/ethylaxetat tỷ lệ 8/1 (theo thể tích). Sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất kaemferol -7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosit dạng bột.

Phân đoạn E3, phân đoạn thứ ba, được nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/ethylaxetat tỷ lệ 8/1 (theo thể tích). Sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất naringenin-5,7-di-O- $\beta$ -D-glucopyranosit dạng bột.

Phân đoạn E4, phân đoạn thứ tư, được nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha đảo với hệ dung môi rửa giải là MeOH/H<sub>2</sub>O tỷ lệ 3/1 (theo thể tích). Sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất rubrosteron dạng bột.

Các hoạt chất này thu được bao gồm 3-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl) propane-1,2-diol, kaemferol -7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosit, naringenin-5,7-di-O- $\beta$ -D-glucopyranosit và rubrosteron dạng bột được phối trộn đều thu được hỗn hợp hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày dạng bột.

Theo một phương án ưu tiên, hỗn hợp có tác dụng chống viêm loét dạ dày thu được từ cây Yền bạch theo giải pháp hữu ích bao gồm 3-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl) propane-1,2-diol, kaemferol -7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosit, naringenin-5,7-di-O- $\beta$ -D-glucopyranosit và rubrosteron.

Hỗn hợp có tác dụng chống viêm loét dạ dày từ cây Yền bạch thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích thích hợp để phát triển thuốc chống viêm loét dạ dày.

#### **Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích**

##### ***Ví dụ 1. Chiết hỗn hợp có tác dụng chống viêm loét dạ dày từ cây Yền bạch***

Thu gom toàn phần cây Yền bạch (*Chromolaena odorata* L), rửa sạch, sấy ở nhiệt độ khoảng 55°C đến khô giòn, sau đó xay nhỏ qua cỡ sàng 5mm thu được nguyên liệu là bột cây Yền bạch có độ ẩm khoảng 10%.

Cân 1,5 kg nguyên liệu bột cây Yền bạch khô và ngâm chiết bằng 8L dung môi EtOH 70% ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày, rút lấy dịch chiết lần một. Bổ sung thêm dung môi ngập được liệu từ 2 đến 3cm (5 lít/lần) và tiếp tục chiết thêm hai lần, thu được dịch chiết lần hai và lần ba. Gộp dịch chiết 3 lần, lọc các dịch chiết etanol thu được qua giấy lọc đem cất thu hồi etanol dưới áp suất giảm thu được khoảng 110 g cao chiết tổng etanol.

Lấy 90g cao chiết tổng và hòa tan với một lượng nước vừa đủ và chiết phân bố lần lượt bằng n- hexan và etyl axetat (mỗi dung môi 3 lần, mỗi lần 500 ml trong 30 phút). Phân đoạn etyl axetat được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 39,8 g cao chiết etyl axetat.

Tiến hành nhồi cao chiết etyl axetat (30,0 g) trên cột sắc ký silicagel với hệ dung môi có độ phân cực tăng dần bao gồm n-hexan/ EtOAc với tỷ lệ n-hexan giảm dần từ 5/1 xuống 1/1 (theo thể tích). Thu mỗi phân đoạn 600 mL. Tiếp đó rửa giải bằng hệ

dung môi  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  với tỷ lệ  $\text{CHCl}_3$  giảm dần từ 10/1 đến 1/1 (theo thể tích). Mỗi phân đoạn 500mL, kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng, thu được phân đoạn E1 xuất hiện màu trên bản mỏng. Sau khi cô loại dung môi, thu được 9,3 g bột.

Tiến hành nhồi hỗn hợp bột này (9,3g), lên cột silicagel kích thước  $\Phi 45 \text{ mm} \times 350 \text{ mm}$  và rửa giải với hệ pha động  $\text{EtOAc}/\text{MeOH}$  tỷ lệ 5/1 (theo thể tích). Thu được năm phân đoạn, mỗi phân đoạn 500 ml, sau khi kiểm tra sắc ký bản mỏng, thu được bốn phân đoạn đầu ký hiệu là E1, E2, E3, E4, tương ứng.

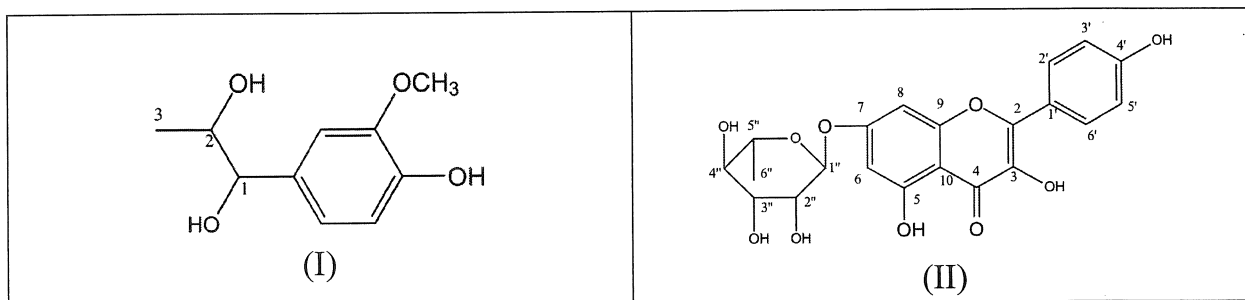
Phân đoạn E1 được loại bỏ dung môi và nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/ethylaxetat tỷ lệ 4/1 (theo thể tích). Sau khi cô loại dung môi thu được 21 mg hỗn hợp bột, ký hiệu YB1.

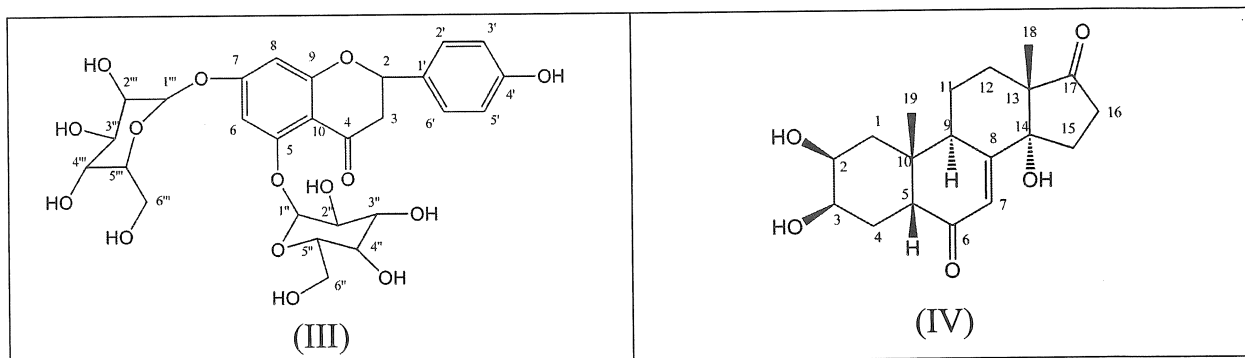
Phân đoạn E2 được loại bỏ dung môi và nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/ethylaxetat tỷ lệ 8/1 (theo thể tích). Sau khi cô loại dung môi thu được 15mg hỗn hợp bột, ký hiệu YB2.

Phân đoạn E3 được loại bỏ dung môi và nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/ethylaxetat tỷ lệ 8/1 (theo thể tích). Sau khi cô loại dung môi thu được 16 mg hỗn hợp bột, ký hiệu YB3.

Phân đoạn E4 được loại bỏ dung môi và nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha đảo với hệ dung môi rửa giải là  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  tỷ lệ 3/1 (theo thể tích). Sau khi cô loại dung môi thu được 10 mg hỗn hợp bột, ký hiệu YB4.

Các mẫu bột chiết YB1, YB2, YB3 và YB4 được gửi đi phân tích, kết quả cho thấy mẫu YB1 là 3-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl) propane-1,2-diol có công thức (I), mẫu YB2 là kaemferol -7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosit có công thức (II), mẫu YB3 là naringenin-5,7-di-O- $\beta$ -D-glucopyranosit có công thức (III) và YB4 là rubrosteron có công thức (IV).





Phôi trộn bốn phần bột thu được ở trên với nhau, thu được 62mg hỗn hợp bột chiết từ cây Yên bạch ở dạng bột mịn.

### Ví dụ 2. Thử nghiệm độc tính

Để đánh giá độc tính của hỗn hợp bột chiết tiến hành thử nghiệm độc tính trên động vật. Mẫu động vật thử nghiệm là chuột nhắt trắng, thử nghiệm được thực hiện theo phương pháp Litchfield-Wilcoxon theo quy định của Bộ Y tế và WHO. Mẫu thử nghiệm là hỗn hợp bột chiết thu được từ cây Yên bạch từ Ví dụ 1.

Chuột nhắt trắng trước khi tiến hành thử nghiệm được cho nhịn ăn qua đêm. Chia ngẫu nhiên chuột thành các lô khác nhau, mỗi lô 10 con chuột. Cho chuột uống mẫu nghiên cứu (bột chiết thu được từ Ví dụ 1) với liều tăng dần trong cùng một thể tích để xác định liều thấp nhất gây chết 100 % chuột và liều cao nhất không gây chết chuột (gây chết 0% chuột). Tiến hành theo dõi tình trạng chung của chuột, quá trình diễn biến bắt đầu có dấu hiệu nhiễm độc (như nôn, co giật, kích động...) và số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc. Tất cả chuột chết được mổ để đánh giá tổn thương đại thể để xác định LD<sub>50</sub> của mẫu thử. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc. Kết quả được thể hiện trên Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm độc tính cấp của mẫu hỗn hợp chiết từ cây Yên bạch

| STT | n  | Liều thử (g/kg) | Tỷ lệ chết ở mỗi lô (%) |
|-----|----|-----------------|-------------------------|
| 1   | 10 | 6               | 0                       |
| 2   | 10 | 7               | 0                       |
| 3   | 10 | 8               | 0                       |
| 4   | 10 | 9               | 0                       |
| 5   | 10 | 10              | 0                       |
| 6   | 10 | 12              | 0                       |

Kết quả cho thấy khi cho chuột nhắt trắng uống mẫu thử với liều từ 6 g đến 12 g mẫu thử/kg thể trọng chuột, một lần/ngày, theo dõi trong 3 ngày, chuột vẫn khỏe mạnh, ăn uống, bài tiết, vận động bình thường, không có chuột nào chết. Theo dõi chuột tiếp theo từ ngày thứ 4 đến ngày thứ 7 thấy chuột vẫn khỏe mạnh, ăn uống, vận động, bài tiết bình thường, không có chuột nào chết.

Liều 12 g mẫu thử/kg thể trọng chuột là liều tối đa có thể cho mỗi con chuột nhắt uống một lần trong một ngày mà chuột vẫn không có biểu hiện bất thường. Như vậy, ở mức liều của các mẫu thử là 12 g mẫu thử/kg thể trọng chuột chưa xác định được LD<sub>50</sub> và với mức liều này không ảnh hưởng tới chuột cho thấy dùng lá cây Yên Bạch là an toàn.

### ***Ví dụ 2. Thử nghiệm tác dụng chống viêm loét dạ dày***

Để đánh giá tác dụng chống viêm loét dạ dày từ phần hỗn hợp thu được từ cây Yên bạch. Mẫu thử nghiệm là mẫu bột thu được từ Ví dụ 1 ở dạng bột. Chuột cống trắng được gây loét dạ dày bằng indomethacin (INDO) uống liều 40 mg/kg được sử dụng làm mẫu thử nghiệm. Chuột được chia ngẫu nhiên thành 5 lô nghiên cứu, mỗi lô 11 con với tỉ lệ đực/cái như nhau ở mỗi lô. Thử nghiệm được thực hiện là thử nghiệm mù, ngẫu nhiên, chuột được mã hóa để tránh sai số do thực hành.

Lô 1 (Chứng sinh học): Uống nước cất 10 mL/kg

Lô 2 (Mô hình): Uống nước cất 10 mL/kg + uống INDO 40 mg/kg.

Lô 3 (Misoprostol): Uống misoprostol 50 µg/kg + uống INDO 40 mg/kg

Lô 4 (Mẫu A): Uống Cao chiết từ cây thuốc (liều tương đương liều dùng dự kiến trên người, tính theo hệ số 6) + uống INDO 40 mg/kg

Lô 5 (Mẫu B): Uống cao chiết từ bài thuốc gia giảm (liều tương đương liều dùng dự kiến trên người, tính theo hệ số 6) + uống INDO 40 mg/kg

Chuột ở các lô được uống thuốc thử hoặc nước cất liên tục trong thời gian 7 ngày. Tại ngày thứ 7 của nghiên cứu, sau 1 giờ uống thuốc, chuột ở các lô 2, 3, 4, 5 được uống INDO liều 40 mg/kg một lần duy nhất. Chuột được nhịn ăn 18 tiếng trước khi uống INDO. Sau 6 giờ kể từ khi được uống INDO, tất cả các chuột được gây mê bằng thiopental để đánh giá kết quả.

Chuột được mổ bụng, bộc lộ dạ dày. Phần ống tiêu hóa từ thực quản (sát tâm vị) đến ruột non (cách môn vị 3 cm) được cắt riêng rẽ, mở tá tràng và dạ dày bằng kéo

theo đường bờ cong lớn. Rửa sạch bằng nước muối sinh lý, thấm bề mặt vết loét bằng formaldehyd 5%, cố định dạ dày tá tràng trên tấm xốp bằng ghim.

Quan sát bằng kính lúp độ phóng đại 10 lần, đánh giá mức độ loét theo thang điểm của Reddy và cộng sự (2012):

Dạ dày bình thường (Normal colored stomach): 0 điểm.

Sung huyết (Red coloration): 0,5 điểm.

Chấm loét (Spot ulcer): 1 điểm.

Vết xuất huyết (Hemorrhagic streak): 1,5 điểm

Loét sâu (Deep ulcers): 2 điểm.

Thủng (Perforation): 3 điểm.

Các chỉ số đánh giá

Tỷ lệ chuột có loét dạ dày ở mỗi lô.

Chỉ số loét (Ulcer Index – UI) được tính bằng điểm mức độ loét trung bình của mỗi lô

Phần trăm ức chế loét được tính theo công thức:

$$\% \text{ Ức chế loét} = \frac{(\text{UI mô hình} - \text{UI thuốc thử}) \times 100}{\text{UI mô hình}}$$

Hình ảnh vi thể dạ dày của 30% số chuột cống trắng ở mỗi lô. Xét nghiệm giải phẫu bệnh được đánh giá tại Trung tâm Nghiên cứu và phát hiện sớm ung thư thuộc Liên hiệp các hội khoa học và kỹ thuật Việt Nam.

Kết quả thực nghiệm cho thấy tỷ lệ chuột bị loét ở lô mô hình là 100%. Misoprostol làm giảm rõ rệt tỷ lệ loét do INDO so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p (X > \chi^2) = 0,027 < \alpha = 0,05$ . Tỷ lệ chuột bị loét ở lô uống là 71,8%.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các mẫu thuốc thử đến chỉ số loét

| Lô nghiên cứu<br>(n = 11) | Chỉ số loét UI | % ức chế loét |
|---------------------------|----------------|---------------|
| Lô 1                      | 1,04± 0,13     | ---           |
| Lô 2                      | 0,79± 0,21     | 24,04         |
| Lô 3                      | 1,08± 0,24     |               |
| Lô 4                      | 0,86± 0,18     | 17,31         |
| Lô 5                      | 0,76± 0,29     | 26,92         |

Khác biệt so với lô mô hình với  $p < 0,05$  (t-test Student)

Kết quả cho thấy Misoprostol liều 50 mcg/kg làm giảm có ý nghĩa thống kê chỉ số loét so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ). Phần trăm ức chế loét của misoprostol là 24,04%. Mẫu thử nghiệm cho thấy giảm rõ rệt chỉ số loét so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

Như vậy, kết quả nghiên cứu tác dụng chống loét dạ dày trên mô hình thực nghiệm gây loét dạ dày bằng uống indomethacin liều duy nhất 40 mg/kg cho thấy cao toàn phần liều tương đương liều dự kiến dùng trên lâm sàng có xu hướng làm giảm tỷ lệ chuột bị loét so với lô mô hình, tuy nhiên chưa cải thiện được chỉ số loét. Mẫu nghiên cứu với liều tương đương liều dự kiến dùng trên lâm sàng có tác dụng cải thiện chỉ số loét, phần trăm ức chế loét và có xu hướng làm giảm tỷ lệ chuột bị loét so với lô mô hình.

#### **Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Quy trình chiết hỗn hợp hoạt chất chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày từ cây Yên bạch (*Chromolaena odorata* L) cho phép chiết hiệu quả thành phần hoạt chất để phát triển được liệu điều trị bệnh viêm loét dạ dày. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép chiết 04 hoạt chất tinh sạch có khả năng ứng dụng để phát triển được nguồn nguyên liệu từ hợp chất thiên nhiên với lượng đủ cho phép phát triển được phẩm hỗ trợ điều trị bệnh viêm loét dạ dày.

Hỗn hợp hoạt chất thu được từ cây Yên bạch cho thấy có hiệu quả trong việc chống viêm loét dạ dày trên mô hình chuột cho thấy không gây độc và cho thấy có xu hướng giảm tỷ lệ chuột bị loét. Đây là tiền đề để phát triển nguồn dược liệu có nguồn gốc từ thảo dược, giảm được các tác dụng phụ từ nguồn dược liệu tổng hợp hóa học.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chiết hỗn hợp hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày từ cây Yên bạch, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu gom phần trên mặt đất của cây Yên bạch (*Chromolaena odorata* L), sau khi loại bỏ tạp chất, sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50-60°C đến khô, sau đó xay nhỏ qua cỡ sàng 5mm thu được nguyên liệu là bột cây Yên bạch có độ ẩm khoảng 10%;
- b) chiết nguyên liệu bằng cách ngâm chiết nguyên liệu bột cây Yên bạch trong dung môi etanol 70% trong 2 ngày ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25-35°C, thu hồi phần dịch chiết;
- c) chiết loại tạp chất bằng cách cô quay phần dịch chiết trong điều kiện áp suất giảm để loại dung môi thu được cao chiết tổng, tiếp đó hòa tan cao chiết tổng này trong nước và chiết phân lớp lần lượt với *n*-hexan và etyl axetat trong 30 phút, sau đó loại cất loại bỏ dung môi, thu cao chiết phân đoạn etyl axetat;
- d) thu phân đoạn chứa hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày bằng cách nhồi cao chiết phân đoạn etyl axetat lên cột silica gel và rửa giải lần lượt bằng hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc với tỷ lệ *n*-hexan giảm dần từ 5/1 xuống 1/1 (theo thể tích) rồi tiếp tục rửa giải bằng hệ dung môi CHCl<sub>3</sub>/MeOH với tỷ lệ CHCl<sub>3</sub> giảm dần từ 10/1 đến 1/1 (theo thể tích), gom các phân đoạn xuất hiện màu trên cơ sở kiểm tra sắc ký bản mỏng;
- e) phân lập hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày bằng cách phân tách phân đoạn thu được trên cột silica gel kích thước 45mmx350mm với hệ pha động EtOAc/MeOH tỷ lệ 5/1 (theo thể tích), thu bốn phân đoạn đầu, mỗi phân đoạn 500ml, ký hiệu là E1, E2, E3, E4, tương ứng:

+ phân đoạn E1 được nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/ethylaxetat tỷ lệ 4/1 (theo thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất 3-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl) propane-1,2-diol;

+ phân đoạn E2 được nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/ethylaxetat tỷ lệ 8/1 (theo thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất kaemferol -7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosit;

+ phân đoạn E3 được nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan/ethylaxetat tỷ lệ 8/1 (theo thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất naringenin-5,7-di-O- $\beta$ -D-glucopyranosit;

+ phân đoạn E4 được nhồi lên cột silica gel, tiến hành sắc ký pha đảo với hệ dung môi rửa giải là MeOH/H<sub>2</sub>O tỷ lệ 3/1 (theo thể tích), sau khi cô loại dung môi thu được hoạt chất rubrosteron; và

f) thu hỗn hợp hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày bằng cách gộp chung các thành phần bao gồm 3-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl) propane-1,2-diol, kaemferol -7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosit, naringenin-5,7-di-O- $\beta$ -D-glucopyranosit và rubrosteron thu được ở trên, sau khi phối trộn đều thu được hỗn hợp hoạt chất có tác dụng chống viêm loét dạ dày dạng bột.