



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

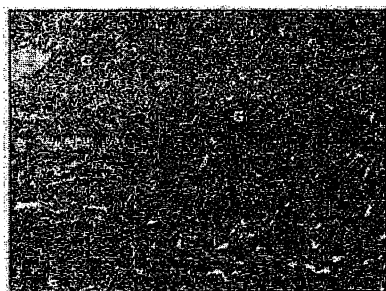
(11) 
1-0019557

(51)⁷ **A61K 36/73, A61P 13/12, A61K 36/54, (13) B**
A23L 1/30

- (21) 1-2011-03347 (22) 01.06.2010
(86) PCT/KR2010/003530 01.06.2010 (87) WO2010/140832 09.12.2010
(30) 10-2009-0049626 04.06.2009 KR
(45) 27.08.2018 365 (43) 26.11.2012 296
(73) AHN-GOOK PHARMACEUTICAL CO., LTD. (KR)
993-75, Daerim 2-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-072, Republic of Korea
(72) AUH, Jin (KR), KIM, Chang-Hwan (KR), HAN, Chang-Kyun (KR), YEON, Sung-Hum (KR), CHOE, Seung-In (KR), SHIN, Young-June (KR), HAN, Dong-Oh (KR), CHANG, Soo-Im (KR), LEE, Ji-Hye (KR), LEE, Jun-Seok (KR), KWAK, Ho-Young (KR), MOON, Hyo-Jin (KR), LEE, Jong-Wook (KR), KIM, Sung-Min (KR)
(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) **HỢP PHẦN VÀ THỰC PHẨM CHỨC NĂNG CHỨA CHẤT CHIẾT TỪ THẢO DƯỢC ĐỂ NGĂN NGỪA HOẶC ĐIỀU TRỊ BỆNH VIÊM THẬN**

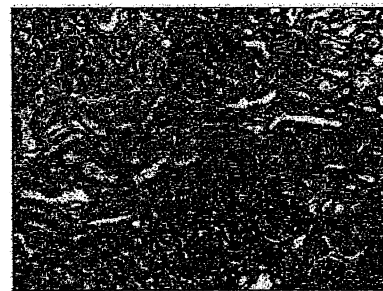
(57) Sáng chế đề cập đến việc sử dụng chất chiết từ thảo dược mới trong hợp phần để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm thận và cụ thể hơn là đề cập đến hợp phần và thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận chứa ít nhất một chất chiết từ thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba*, phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận bằng cách sử dụng chất chiết từ thảo dược này, và sử dụng chất chiết từ thảo dược này trong bào chế chế phẩm để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận. Chất chiết từ thảo dược này có hiệu quả trong điều trị bệnh viêm thận do thuốc như gentamixin, cisplatin, v.v., gây ra và có hiệu quả tốt trong việc ức chế sự sinh trưởng của tế bào màng nang cuộn mao mạch thận, vì thế rất hữu hiệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận.



(a) BÌNH THƯỜNG



(b) ĐÓI CHỨNG ẨM



(c) THỬ NGHIỆM

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến được phẩm và thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận, bao gồm ít nhất một chất chiết từ thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus* (Sơn tra), chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* (Quế nhục), chất chiết từ *Prunella Spica* (Hạ khô thảo), và chất chiết từ *Equiseti Herba* (Mộc tặc), phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận bằng cách sử dụng chất chiết từ thảo dược này, và việc sử dụng chất chiết từ thảo dược này để bào chế được phẩm để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thận là cơ quan thực hiện nhiều chức năng và là một trong số các cơ quan bài tiết quan trọng. Chúng không chỉ hoạt động như cơ quan bài tiết mà còn điều hòa thể tích dịch thể, bài tiết chất thải và điều chỉnh nồng độ các chất điện giải, mà còn đóng vai trò làm tuyến nội tiết tiết ra hormon như erythropoietin (để sản xuất tế bào hồng cầu) và rennin (điều hòa huyết áp) và kiểm soát cơ chế chuyển hóa của vitamin D3 để duy trì chức năng của tuyến cận giáp và cơ chế chuyển hóa canxi. Chúng cũng hoạt động như cơ quan trao đổi chất để phân hủy hormon peptit, tái hấp thu protein phân tử nhỏ, và điều hòa quá trình chuyển hóa glucoza/lipit. Các ví dụ về bệnh thận là viêm thận, suy thận, ung thư thận, v.v, và viêm thận là bệnh thận phổ biến nhất. Ở các bệnh nhân bị viêm thận tiến triển, suy thận mạn tính, huyết áp cao, hoặc các bệnh do mất chức năng thận sẽ gây ra các biến chứng như làm tổn hại đến các cơ quan khác, gây chuyển hóa bất thường, hoặc các bệnh tương tự. Việc chức năng của thận bị suy giảm thường không được chú ý đến khi chức năng của thận bị suy giảm đến 70% hoặc nhiều hơn. Nếu tình trạng suy thận vẫn bị bỏ qua và không được điều trị thích hợp thì lọc máu hoặc thay thận sẽ là phương pháp điều trị duy nhất cho các bệnh nhân này. Ở Hàn Quốc, số lượng các bệnh nhân phải lọc máu tăng từ 4.000 đến 5.000 trường hợp mỗi năm, và số lượng các bệnh nhân cần ghép thận cũng ngày một tăng. Trước khi được ghép thận, bệnh nhân phải lọc máu liên tục, khiến cho bệnh nhân cực kỳ đau đớn hoặc tốn kém hơn về kinh phí cho việc điều trị này. Đối với việc ghép thận, việc thiếu người hiến tặng thận khiến cho bệnh nhân phải

chờ đợi trong thời gian dài, thậm chí là kéo theo vấn đề xã hội liên quan tới việc buôn bán các bộ phận cơ thể người.

Đối với bệnh viêm thận được điều chỉnh thông qua phức hợp miễn dịch mà được phát hiện ở khoảng 70% bệnh nhân bị viêm thận, kháng nguyên có sẵn/do cơ thể tiết ra sẽ liên kết với các kháng thể được tạo ra trong cơ thể để tạo thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể, lắng đọng trong màng đáy cầu thận và tế bào màng nang cuộn mao mạch, gây viêm và gây tổn hại cho tiểu cầu thận. Viêm thận do kháng thể kháng màng đáy cầu thận gây ra bởi đáp ứng miễn dịch tương tự là một loại bệnh trong đó kháng thể kháng màng đáy cầu thận được tạo thành trong cơ thể lắng đọng trong màng đáy cầu thận gây viêm cấp tính, và được phát hiện thấy ở khoảng 5% bệnh nhân bị viêm thận. Tình trạng nhiễm trùng của các cơ quan tiết niệu như ống dẫn tiểu, bàng quang, v.v, do vi khuẩn hoặc virus gây bệnh khiến cho các tác nhân gây bệnh này xâm nhập vào thận và gây viêm thận.

Các dược phẩm để điều trị bệnh viêm thận bao gồm thuốc ức chế miễn dịch, thuốc kháng viêm, thuốc tăng huyết áp/hoạt mạch, thuốc kháng sinh, và các thuốc tương tự. Thuốc ức chế miễn dịch làm giảm việc hình thành kháng thể, là yếu tố gây viêm thận, để ức chế việc lắng đọng phức hợp kháng nguyên-kháng thể và thuốc kháng viêm ngăn chặn chứng viêm, vì thế cải thiện được các triệu chứng của bệnh viêm thận. Các chất đối kháng angiotensin II được sử dụng dưới dạng thuốc tăng huyết áp/hoạt mạch sẽ thúc đẩy sự tạo thành màng đáy mà là thành của tế bào mạch máu hoạt động như bộ lọc tiểu cầu thận, giúp chức năng thận hoạt động. Đối với bệnh viêm thận do lây nhiễm, thì thuốc kháng sinh quinolon được sử dụng để tiêu diệt vi khuẩn gây viêm thận.

Các bệnh nhân bị viêm thận hầu hết là mắc chứng viêm cuộn tiểu cầu thận tự miễn, được điều trị chủ yếu bằng thuốc ức chế miễn dịch, thuốc kháng viêm, và thuốc tăng huyết áp/hoạt mạch. Chứng viêm thận bể thận do lây nhiễm được điều trị bằng thuốc kháng sinh quinolon. Ví dụ về thuốc ức chế miễn dịch để điều trị bệnh viêm thận bao gồm tacrolimus, eculizumab, mycophenolat mofetil, cyclosporin A, v.v.. Ví dụ về thuốc kháng viêm bao gồm dexametason, prednisolon, v.v.. Thuốc tăng huyết áp/hoạt mạch đối với chứng viêm cầu thận là, ví dụ, candesartan, và rituximab và abatacept có hoạt tính kháng u. Các dược phẩm để điều trị chứng viêm thận bể thận là levofloxacin và gatifloxacin. Các bệnh nhân bị viêm thận ở các nước không phải Hàn Quốc hầu hết được điều trị bằng thuốc ức chế miễn dịch, như tacrolimus, mycophenolat mofetil, hoặc eculizumab. Ở Hàn Quốc, thuốc kháng sinh là các thuốc được sử dụng nhiều nhất để điều

trị bệnh viêm thận, và việc sử dụng thuốc ức chế miễn dịch để điều trị bệnh viêm thận đang gia tăng trong những năm gần đây.

Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc ức chế miễn dịch hoặc thuốc kháng sinh trong thời gian dài sẽ gây tác dụng phụ, bao gồm gây loét, phù, tăng lây nhiễm, huyết áp cao, nhiễm độc do hoạt động bất thường của gan, và các tác dụng phụ khác, vì thế thuốc ức chế miễn dịch và thuốc kháng sinh bị hạn chế sử dụng. Vì vậy, hiện nay trong lĩnh vực này vẫn cần có thuốc mới để điều trị bệnh viêm thận với tác dụng phụ ít hơn so với các thuốc hiện đang được dùng để điều trị bệnh viêm thận đồng thời đảm bảo an toàn.

Vì lý do này, các thuốc mới để điều trị bệnh viêm thận sử dụng các chất từ thiên nhiên gần đây đã được phát triển.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Với nỗ lực để tìm ra hợp phần để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm thận, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra ít nhất một chất chiết từ thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus* (Sơn tra), chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* (Quế nhục), chất chiết từ *Prunella Spica* (Hạ khô thảo), và chất chiết từ *Equiseti Herba* (Mộc tặc), có tác dụng ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm thận, vì thế đạt được mục đích của sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp phần để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận chứa ít nhất một chất chiết từ thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba*, làm thành phần hoạt tính.

Sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận bao gồm bước cho bệnh nhân có nhu cầu ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận dùng một lượng có hiệu quả điều trị bệnh của ít nhất một chất chiết từ thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba*.

Sáng chế đề xuất việc sử dụng ít nhất một chất chiết từ thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba* để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là biểu đồ thể hiện hoạt tính ức chế viêm thận của một chất chiết từ thảo dược trên mô hình viêm thận gây ra bởi gentamixin.

FIG. 2 là ảnh thể hiện kết quả kiểm tra mô bệnh học trên mô hình viêm thận gây ra bởi gentamixin.

FIG. 3 là biểu đồ thể hiện hoạt tính ức chế viêm thận của một chất chiết từ thảo dược lên mô hình viêm thận gây ra bởi cisplatin.

FIG. 4 là ảnh thể hiện kết quả kiểm tra mô bệnh học đối với mô hình viêm thận gây ra bởi cisplatin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra ít nhất một chất chiết từ thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba* có hiệu quả điều trị bệnh đối với mô hình viêm thận gây ra bởi gentamixin hoặc cisplastin và có tác dụng ức chế sự tăng sinh của tế bào màng nâng cuộn mao mạch của thận, vì thế đạt được mục đích của sáng chế.

Do vậy, sáng chế khác biệt bởi việc sử dụng hợp phần để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm thận, trong đó hợp phần này chứa ít nhất một chất chiết từ thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba*, làm thành phần có tác dụng điều trị bệnh.

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn trong phần mô tả dưới đây.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp phần để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận chứa một lượng có hiệu quả điều trị bệnh của ít nhất một chất chiết từ thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba*. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận bao gồm việc cho bệnh nhân có nhu cầu ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận dùng một lượng có hiệu quả điều trị bệnh của ít nhất một chất chiết từ thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi*

Cortex, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba*. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng ít nhất một chất chiết từ thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba* để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận, hoặc để bào chế hợp phần để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận.

Crataegi Fructus là quả của cây *Crataegus pinnatifida* và các cây cùng giống của nó thuộc họ hoa hồng, Rosaceae và tên tiếng Anh thường được gọi là “Hawthorn”. Cây này được tìm thấy ở các vùng đất cao, có vỏ màu xám và các nhánh có gai, có thể có chiều cao từ 3 đến 6m. Lá của nó được sắp xếp theo kiểu xen kẽ trên thân cây, có hình trứng, và dài từ 6 đến 8cm và rộng từ 5 đến 6cm. Mép lá được chia thành thùy như lông chim, được xẻ sâu hơn trên đế. Lá có lông trên gân giữa ở cả hai mặt với mép răng cưa không đều. Cuống lá dài từ 2 đến 6cm. *Crataegi Fructus* được biết là có tác dụng dược lý, như có tác dụng làm giãn mạch, hạ huyết áp, kháng khuẩn, chống oxy hóa, và các tác dụng khác.

Cinnamomi Cortex là vỏ thân của *Cinnamomum cassia* và các cây cùng giống của nó thuộc họ Lauraceae. Cây này là cây trang trí rụng lá, có thể cao ít nhất 8m với các nhánh màu xanh lá. Hoa của nó màu xanh nhạt, có đế hoa ngắn chia thành sáu đài hoa, được xếp thành hai hàng. Loại thảo dược này được biết là có tác dụng điều trị bệnh, như giãn mạch, thúc đẩy tuần hoàn máu, kích thích hoạt động của dạ dày, giảm đau, chống oxy hóa, và các tác dụng khác. Khi được dùng làm thảo dược, cây này được sử dụng để điều trị đau đầu, sốt, hội hộp, đau dữ dội, nhiễm lạnh, hoặc các bệnh khác. Đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc chưa xét nghiệm số 2006-0030535 (nộp ngày 11/4/2006) mô tả chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* có tác dụng giải lo âu và hợp phần chứa chất chiết này, trong đó chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* được sử dụng theo như thông báo dưới dạng sản phẩm thuốc hoặc thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe để ngăn ngừa và điều trị bệnh lo âu gây ra bởi rối loạn hệ thần kinh sợ.

Prunella Spica là thảo dược lâu năm thuộc loài *Prunella vulgaris* và các cây cùng giống của nó thuộc họ Labiatae. Loại thảo dược này, được phủ bằng lớp lông màu trắng, có chiều cao từ 20 đến 30cm với thân hình vuông. Sau khi hoa rụng, nó bắt đầu lộ ra các nhánh với lá mọc thẳng với chiều dài từ 2 đến 5cm. Mép lá trơn láng hoặc có ít răng nhỏ. Vào mùa hè, cây khô một phần được cắt nhỏ và phơi khô dưới ánh nắng mặt trời thành thảo dược không độc. Loại thảo dược này được biết là có tác dụng điều trị bệnh, như lợi

tiểu, kháng khuẩn, hạ huyết áp, chống khối u, chống oxy hóa, và các tác dụng khác. Khi được sử dụng làm thuốc thảo dược, nó được sử dụng để điều trị bệnh áp xe mạn tính, tróc vảy da, viêm vú cấp tính, lao hạch bạch huyết, và các bệnh khác. Nó cũng được sử dụng để làm tiêu các khối chất lỏng hoặc cục máu tích tụ trong ổ bụng dưới, tê phù, và điều trị bệnh tê cứng và đau nhói dây thần kinh.

Equiseti Herba là thảo dược lâu năm của *Equisetum hiemale* và các cây cùng giống của nó thuộc loại Equisetaceae. Loại thảo dược này có thể cao hơn 20 cm có thân rễ ngắn bò trên mặt đất. Mấu rễ mọc ra rễ dài màu nâu đậm. Thân cứng và tròn, có đường kính từ 4 đến 8cm, có từ 10 đến 20 vạch giữa các mấu, và thân mọc thẳng không có nhánh. Thảo dược này có vỏ ngoài màu xanh xám hoặc xanh vàng và từ 8 đến 30 đường rãnh thẳng đứng, và nhẹ với kết cấu mềm. Thảo dược này được biết là có tác dụng điều trị bệnh, như có tác dụng lợi tiểu, chống oxy hóa, và các tác dụng khác. Khi được sử dụng làm thảo dược, cây này được sử dụng để điều trị bệnh đau đầu, sốt, xuất huyết ruột, hoặc các bệnh xuất huyết khác.

Tuy nhiên, tác dụng ngăn ngừa và/hoặc điều trị của mỗi chất chiết từ *Crataegi Fructus*, *Cinnamomi Cortex*, *Prunella Spica*, và *Equiseti Herba* đối với bệnh viêm thận hiện nay vẫn chưa được phát hiện và vẫn cần nghiên cứu các chất chiết này.

Thuật ngữ “chất chiết” như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ chất chiết từ ít nhất một thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm *Crataegi Fructus*, *Cinnamomi Cortex*, *Prunella Spica*, và *Equiseti Herba*, và sản phẩm cô đặc và/hoặc sản phẩm khô thu được bằng cách cô và/hoặc làm khô chất chiết bằng phương pháp thông thường. Chất chiết, khi nó là chất chiết được từ ít nhất hai thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm *Crataegi Fructus*, *Cinnamomi Cortex*, *Prunella Spica*, và *Equiseti Herba*, có thể là “hỗn hợp của các chất chiết được từ các thảo dược” thu được bằng cách chiết ít nhất hai loại thảo dược bằng dung môi, giống hoặc khác nhau, và trộn các chất chiết này với nhau; hoặc “chất chiết của hỗn hợp thảo dược” thu được bằng cách trộn ít nhất hai thảo dược với nhau và chiết hỗn hợp thảo dược này. Như có thể được thấy trong ví dụ thử nghiệm 1, cả hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược và chất chiết của hỗn hợp các thảo dược đều có tác dụng ngăn ngừa và/hoặc điều trị hiệu quả bệnh viêm thận mà không có sự khác biệt đáng kể, và vì thế có thể được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Chất chiết như được xác định trong sáng chế tốt hơn là thu được bằng cách chiết với nước, rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh, hoặc dung

dịch rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh trong nước. Dung môi để chiết có thể là dung dịch rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh trong nước có nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 90% (theo thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10% đến 70% (theo thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50% đến 70% (theo thể tích). Tốt hơn là dung môi để chiết có thể là dung dịch etanol trong nước có nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 90% (theo thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10% đến 70% (theo thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50% đến 70% (theo thể tích).

Phần mô tả chi tiết dưới đây mô tả phương pháp tạo ra chất chiết theo sáng chế.

Các chất chiết từ *Crataegi Fructus*, *Cinnamomi Cortex*, *Prunella Spica* và *Equiseti Herba* theo sáng chế đều có thể thu được bằng cách cắt mỗi thảo dược khô; chiết các miếng thảo dược này bằng nước, rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh, hoặc dung dịch rượu trong nước (ví dụ dung dịch rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh trong nước có nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 90% (theo thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10% đến 70% (theo thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50% đến 70% (theo thể tích); tốt hơn là dung dịch etanol trong nước có nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 90% (theo thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10% đến 70% (theo thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50% đến 70% (theo thể tích)) với lượng bằng khoảng từ 3 đến 20 lần, tốt hơn là bằng từ 5 đến 15 lần khối lượng (g) của thảo dược khô bằng cách chiết ngâm, chiết bằng nước nóng, chiết siêu âm, hoặc chiết ngưng tụ hồi lưu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 110°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 55°C đến 90°C trong thời gian từ 0,5 đến 20 giờ, tốt hơn là từ 1 đến 10 giờ; và tiến hành lọc chất chiết thu được, cô dưới áp suất giảm và/hoặc làm khô.

Nếu dung môi chiết được sử dụng với lượng ít hơn 3 lần khối lượng của thảo dược khô thì sẽ rất khó khuấy vì thế sẽ làm giảm khả năng hòa tan của chất cần chiết và giảm hiệu quả chiết, nhưng nếu dung môi được sử dụng với lượng nhiều hơn 20 lần khối lượng thảo dược khô thì sẽ cần phải sử dụng lượng lớn rượu thấp trong bước tinh chế tiếp theo, gây ra các vấn đề về kinh tế và thao tác. Khi sử dụng dung dịch rượu làm dung môi để chiết, nếu nồng độ rượu nhỏ hơn 10% (theo thể tích) thì có thể gây dư thừa các chất phân cực như đường được chiết từ thảo dược, gây khó khăn cho bước lọc tiếp theo, còn nếu sử dụng rượu có nồng độ lớn hơn 90% (theo thể tích) thì có thể làm tăng tương đối độ không

phân cực của dung môi, làm giảm hiệu quả thu hồi các chất hoạt tính mong muốn. Nhiệt độ chiết dưới 40°C sẽ làm giảm hiệu quả chiết, và nhiệt độ chiết cao hơn 110°C sẽ tăng chi phí chiết mà lại không kinh tế do hiệu quả chiết bị hạn chế. Thời gian chiết ngắn hơn 30 phút sẽ làm giảm hiệu quả chiết, và thời gian chiết dài hơn 20 giờ sẽ tạo ra lượng tạp chất không mong muốn, làm giảm độ tinh khiết của chất chiết cuối cùng thu được.

Sau khi lọc chất chiết, phần dịch lọc được thu gom, và phần còn lại được ngâm ngập trong nước, rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh, hoặc dung dịch rượu trong nước (ví dụ dung dịch rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh trong nước với nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 90% (theo thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10% đến 70% (theo thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50% đến 70% (theo thể tích); tốt hơn là dung dịch etanol trong nước có nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 90% (theo thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10% đến 70% (theo thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50% đến 70% (theo thể tích)), với lượng bằng khoảng từ 4 đến 7 lần khối lượng thảo dược. Dung dịch thu được được làm nóng (ví dụ đến nhiệt độ từ 55°C đến 90°C) và được chiết lần nữa (chiết lần hai) trong thời gian từ 2 đến 5 giờ. Sau khi lọc lần hai, phần dịch lọc được thu gom và được trộn với phần dịch lọc trước đó để tăng cường hiệu quả chiết. Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước chiết lần một sau đó là chiết lần hai. Chiết lần hai để tránh làm giảm hiệu quả chiết mà có thể xảy ra do lượng nước cao trong thảo dược và sẽ bị thất thoát sau khi lọc khi chỉ tiến hành một lần chiết đối với quy trình sản xuất chất chiết từ thảo dược trên quy mô lớn. Tuy nhiên, bước chiết lần hai được thực hiện chỉ để tăng hiệu quả chiết chứ không làm tăng hiệu quả điều trị bệnh của chất chiết cuối cùng. Do vậy, nên hiểu rằng chất chiết từ thảo dược được sử dụng làm thành phần hoạt tính theo sáng chế không bị giới hạn bởi phương pháp sản xuất chất chiết này.

Việc đánh giá hiệu quả chiết cho từng bước chiết cho thấy rằng khoảng từ 80 đến 90% tổng hàm lượng chất chiết có thể thu được trong lần chiết thứ hai và lần chiết thứ ba có thể được tiến hành, nhưng không có lợi ích về mặt kinh tế. Dịch lọc kết hợp sau lần chiết thứ hai được cô trong điều kiện áp suất ở nhiệt độ từ 50°C đến 60°C để loại bỏ dung môi còn lại trong mẫu. Sản phẩm cô thu được sau khi cô hoàn toàn dưới áp suất giảm tiếp tục trải qua hai hoặc ba lần cô đồng sôi với nước, lượng nước bằng từ 25 đến 50 lần tổng khối lượng của sản phẩm cô này, và được trộn với lượng nước nữa giống như vậy để tạo

thành hỗn dịch đồng nhất. Sau đó, hỗn dịch này được làm khô lạnh thành chất chiết cuối cùng. Việc sử dụng nước để cô đồng sôi là để kiểm soát chặt chẽ hàm lượng rượu thấp còn lại trong các chất chiết từ thảo dược nhằm mục đích sử dụng chất chiết từ thảo dược làm nguyên liệu sản xuất các sản phẩm thuốc.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, chất chiết từ thảo dược bao gồm hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus* và chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* được trộn theo tỷ lệ khối lượng (tức là, khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus*: khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*) nằm trong khoảng từ 10:1 đến 1:5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5:1 đến 1:5, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:5.

Theo một phương án được ưu tiên khác của sáng chế, chất chiết từ thảo dược bao gồm hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus* và chất chiết từ *Prunella Spica* được trộn theo tỷ lệ khối lượng (tức là, khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica*) nằm trong khoảng từ 10:1 đến 1:5.

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa của sáng chế, chất chiết từ thảo dược bao gồm hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus* và chất chiết từ *Equiseti Herba* được trộn theo tỷ lệ khối lượng (tức là, khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*) nằm trong khoảng từ 10:1 đến 1:5.

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa của sáng chế, chất chiết từ thảo dược bao gồm hỗn hợp của chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* và chất chiết từ *Prunella Spica* được trộn theo tỷ lệ khối lượng (tức là, khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* : khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica*) nằm trong khoảng từ 10:1 đến 1:5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:3.

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa của sáng chế, chất chiết từ thảo dược bao gồm hỗn hợp của chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* và chất chiết từ *Equiseti Herba* được trộn theo tỷ lệ khối lượng (tức là, khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*) nằm trong khoảng từ 7:1 đến 1:7.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, chất chiết từ thảo dược bao gồm hỗn hợp của chất chiết từ *Prunella Spica* và chất chiết từ *Equiseti Herba* được trộn theo tỷ lệ khối lượng (tức là, khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*) nằm trong khoảng từ 10:1 đến 1:10.

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa của sáng chế, chất chiết từ thảo dược bao gồm hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, và chất chiết từ *Prunella Spica* được trộn theo tỷ lệ khối lượng (tức là, khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* : khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica*) nằm trong khoảng từ 10:1:1 đến 1:1:5.

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa của sáng chế, chất chiết từ thảo dược bao gồm hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, và chất chiết từ *Equiseti Herba* được trộn theo tỷ lệ khối lượng (tức là, khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*) nằm trong khoảng từ 10:1:1 đến 1:1:5.

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa của sáng chế, chất chiết từ thảo dược bao gồm hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba* được trộn theo tỷ lệ khối lượng (tức là, khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*) nằm trong khoảng từ 7:1:1 đến 1:1:5.

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa của sáng chế, chất chiết từ thảo dược bao gồm hỗn hợp của chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba* được trộn theo tỷ lệ khối lượng (tức là, khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* : khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*) nằm trong khoảng từ 7:1:1 đến 1:1:7.

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa của sáng chế, chất chiết từ thảo dược bao gồm hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba* được trộn theo tỷ lệ khối lượng (tức là, khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* : khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*) nằm trong khoảng từ 5:1:1:1 đến 1:1:1:5.

Tỷ lệ khối lượng của các chất chiết được dựa trên ‘khối lượng khô của chất chiết’, nghĩa là khối lượng của chất chiết khô thu được bằng cách loại bỏ dung môi khỏi chất chiết (sau đây, phần còn lại giống như ở trên).

Thuật ngữ “bệnh viêm thận” như được xác định trong bản mô tả này có thể gồm ít nhất một bệnh viêm thận được chọn từ nhóm bao gồm viêm cuộn tiểu cầu thận, viêm thận

bể thận, viêm kẽ thận, viêm thận lupus, viêm thận do đái tháo đường, nước tiểu có protein, chứng teo tiểu quản thận, xơ cứng tiểu cầu thận, suy thận, và các bệnh tương tự.

Hợp phần để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm thận theo sáng chế bao gồm chất chiết, tính theo tổng khối lượng của hợp phần, với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 99% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50% khối lượng. Lượng chất chiết không bị giới hạn cụ thể ở khoảng nêu trên và có thể được điều chỉnh thích hợp phụ thuộc vào loại và mức độ tiến triển của bệnh được điều trị, tình trạng bệnh của bệnh nhân, tác dụng mong muốn, và các yếu tố tương tự.

Hợp phần bao gồm chất chiết theo sáng chế có thể còn chứa chất mang, tá dược, hoặc chất pha loãng thích hợp, thường được sử dụng để bào chế dược phẩm.

Hợp phần bao gồm chất chiết theo sáng chế, theo một phương pháp truyền thống, có thể được bào chế thành dạng liều lượng dùng qua đường miệng (ví dụ bột, hạt, viên nén, viên nang, hỗn dịch, nhũ tương, xi-rô, sol khí, v.v.), chế phẩm thuốc dùng khu trú, chế phẩm dùng qua trực tràng, hoặc chế phẩm dùng để tiêm. Chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng mà có thể được bao gồm trong hợp phần gồm chất chiết có thể là lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, cao su acasia, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metyl xenluloza, xenluloza vô định hình, polyvinyl pyrrolidon, nước, metylhydroxybenzoat, propylhydroxybenzoat, bột talc, magie stearat, dầu khoáng, v.v.. Việc bào chế chế phẩm từ hợp phần có thể bao gồm việc sử dụng chất pha loãng hoặc tá dược thông thường như chất độn, chất làm đầy, chất liên kết, chất thấm ướt, chất làm phân rã, chất hoạt động bề mặt, v.v.. Chế phẩm rắn để sử dụng qua đường miệng có thể bao gồm viên nén, viên tròn, bột, hạt, viên nang, v.v.. Chế phẩm rắn có thể được bào chế bằng cách trộn chất chiết với ít nhất một tá dược, như, ví dụ, tinh bột, canxi cacbonat, sucroza, lactoza, gelatin, v.v.. Ngoài các tá dược thông thường, chất làm trơn như magie stearat hoặc bột talc cũng có thể được sử dụng. Chế phẩm lỏng để sử dụng qua đường miệng có thể gồm hỗn dịch, dung dịch, dầu, xi-rô, v.v.. Ngoài các chất pha loãng thông thường như nước và parafin lỏng, các tá dược khác cũng có thể được sử dụng, như, ví dụ, chất thấm ướt, chất tạo hương vị, hương liệu, chất bảo quản, v.v.. Chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể bao gồm dung dịch nước vô trùng, dung môi không chứa nước, hỗn dịch, dầu, chế phẩm được làm khô lạnh, hoặc chế phẩm dùng qua trực tràng. Dung dịch không chứa nước và hỗn dịch có thể bao gồm propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật (ví dụ, dầu ôliu), este tiêm được (ví dụ,

etyloleat), v.v.. Chất nền cho chế phẩm dùng qua trực tràng có thể gồm witepsol, macrogol, tween 61, bơ ca-cao, bơ laurin, glyxerogelatin, và các chất tương tự.

Để đạt được hiệu quả mong muốn, ví dụ, hợp phần này có thể được sử dụng với liều lượng hàng ngày, tính theo khối lượng khô của chất chiết, nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mg/kg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 500 mg/kg, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 150 đến 300 mg/kg. Việc sử dụng này có thể được thực hiện một lần hoặc vài lần mỗi ngày. Nhưng liều lượng hàng ngày có thể được kiểm soát một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này phụ thuộc vào tình trạng bệnh lý và cân nặng của bệnh nhân, mức độ nghiêm trọng của bệnh, dạng liều lượng, đường dùng và thời gian dùng. Do đó, liều lượng hàng ngày như được nêu cụ thể ở trên không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo khía cạnh bất kỳ.

Hợp phần theo sáng chế có thể được sử dụng cho tất cả các động vật có vú, tốt hơn là loài gặm nhấm, động vật nuôi trong nhà, người, hoặc các động vật tương tự, tốt hơn nữa là người. Đường dùng có thể gồm tất cả các loại đường dùng, bao gồm, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở, qua đường miệng, qua trực tràng, hoặc trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, qua màng cứng trong tử cung hoặc trong não thất.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe để ngăn ngừa và/hoặc cải thiện bệnh viêm thận, thực phẩm này chứa, làm thành phần hoạt tính, ít nhất một chất chiết từ thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba*.

Hợp phần bao gồm chất chiết theo sáng chế có thể được sử dụng trong nhiều ứng dụng khác nhau, như thuốc hoặc thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe để ngăn ngừa và cải thiện bệnh viêm thận. Thực phẩm mà trong đó chất chiết theo sáng chế có thể được thêm vào có thể bao gồm, ví dụ, bất kỳ trong số loại thực phẩm, đồ uống, kẹo gôm, trà, vitamin tổng hợp, thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe, và có thể được sử dụng dưới dạng bột, hạt, viên nén, viên nang, hoặc đồ uống.

Chất chiết theo sáng chế gần như không có độc tính cũng như không có tác dụng phụ và có thể được sử dụng làm dược chất an toàn để sử dụng trong thời gian dài nhằm mục đích ngăn ngừa bệnh.

Hàm lượng của chất chiết trong thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe có thể nằm trong khoảng từ 0,01 đến 15% khối lượng tính theo tổng khối lượng của thực phẩm làm thành phần cho thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe theo sáng chế; hoặc nằm trong khoảng từ 0,02 đến 10g, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,3 đến 1g tính theo 100 ml thực phẩm làm thành phần cho đồ uống chức năng có lợi cho sức khỏe.

Thành phần cho đồ uống chức năng có lợi cho sức khỏe trong số các thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe có thể bao gồm, để làm các thành phần thiết yếu, chất chiết và thành phần lỏng, mà không bị giới hạn cụ thể và có thể chứa thêm các chất tạo hương hoặc các hydrocacbon tự nhiên khác nhau như trong đồ uống truyền thống. Ví dụ về các hydrat cacbon tự nhiên có thể bao gồm đường thông thường như monosacarit (ví dụ, glucoza, fructoza, v.v.), đisacarit (ví dụ, maltoza, sucroza, v.v.), hoặc polysacarit (ví dụ, dextrin, xyclodextrin, v.v.); hoặc rượu đường như xylitol, sorbitol, erythritol, v.v.. Chất tạo hương vị như được sử dụng trong bản mô tả này tốt hơn là có thể bao gồm hương liệu tự nhiên (ví dụ, thaumatin, chất chiết Stevia, rebaudioxit A, glyxyrrhizin, v.v.), hoặc hương liệu tổng hợp (ví dụ, sacarin, aspartam, v.v.). Hydrat cacbon tự nhiên có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20g, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 12g cho mỗi 100ml hợp phần theo sáng chế.

Ngoài các thành phần nêu trên, hợp phần theo sáng chế có thể còn bao gồm các chất bổ sung dinh dưỡng khác, vitamin, chất khoáng (chất điện giải), chất tạo hương vị (ví dụ, hương liệu tổng hợp, hương liệu tự nhiên, v.v.), chất màu, chất độn (ví dụ, pho-mát, sô-cô-la, v.v.) axit pectic và muối của nó, axit alginic và muối của nó, axit hữu cơ, chất làm đặc dạng keo bảo vệ, chất điều chỉnh độ pH, chất làm ổn định, chất bảo quản, glyxerin, rượu, tác nhân bão hòa khí cacbonic được sử dụng cho đồ uống được bão hòa khí cacbonic, và v.v. Hợp phần theo sáng chế có thể còn gồm nước hoa quả tự nhiên, và thịt quả để sản xuất nước ép hoa quả hoặc nước ép rau củ. Các thành phần này có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp. Hàm lượng của các chất phụ gia không đáng kể nhưng có thể được chọn nằm trong khoảng từ 0 đến 20 phần theo khối lượng cho mỗi 100 phần theo khối lượng của hợp phần theo sáng chế.

Theo một phương án khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế hợp phần để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm thận, phương pháp này bao gồm bước:

tiến hành lần chiết lần thứ nhất để chiết ít nhất một thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm *Crataegi Fructus*, *Cinnamomi Cortex*, *Prunella Spica* và *Equiseti Herba* với nước, rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh, hoặc dung dịch rượu trong nước (ví dụ, dung dịch rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh trong nước có nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 90% (theo thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10% đến 70% (theo thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50% đến 70% (theo thể tích); tốt hơn là dung dịch etanol trong nước với nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 90% (theo thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10% đến 70% (theo thể tích), tốt hơn nữa là từ 50% đến 70% (theo thể tích)) với lượng bằng khoảng từ 3 đến 20 lần, tốt hơn là bằng khoảng từ 5 đến 15 lần khối lượng (g) thảo dược bằng cách chiết ngâm, chiết bằng nước nóng, chiết siêu âm, hoặc chiết ngưng tụ hồi lưu ở nhiệt độ chiết từ 40°C đến 110°C tốt hơn là từ 55°C đến 90°C trong thời gian từ 0,5 đến 20 giờ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 10 giờ để thu được chất chiết từ thảo dược.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, phương pháp này có thể còn bao gồm các bước, sau khi chiết lần thứ nhất:

lọc chất chiết thu được từ lần chiết thứ nhất để thu gom phần dịch lọc;

tiến hành chiết lần hai để chiết phần còn lại khác với phần dịch lọc với nước, rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh, hoặc dung dịch rượu trong nước (ví dụ dung dịch rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh trong nước có nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 90% (theo thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10% đến 70% (theo thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50% đến 70% (theo thể tích); tốt hơn là dung dịch etanol trong nước có nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 90% (theo thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10% đến 70% (theo thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50% đến 70% (theo thể tích)) với lượng nằm trong khoảng từ 4 đến 7 lần khối lượng của phần còn lại ở nhiệt độ cao (ví dụ từ 55°C đến 99°C) trong thời gian từ 2 đến 5 giờ; và

lọc chất chiết thu được từ lần chiết thứ hai và trộn phần dịch lọc thu được với phần dịch lọc thu được từ lần chiết lần thứ nhất.

Tiến hành chiết lần một và lần hai để tăng cường hiệu quả chiết, có lợi cho quy trình sản xuất chất chiết từ thảo dược trên quy mô lớn.

Khi chất chiết thu được từ ít nhất hai thảo dược được chọn từ nhóm bao gồm *Crataegi Fructus*, *Cinnamomi Cortex*, *Prunella Spica* và *Equiseti Herba*, thì chất chiết này có thể được điều chế bằng cách thu được các chất chiết từ thảo dược riêng biệt sau đó trộn các chất chiết này với nhau; hoặc trộn ít nhất hai thảo dược với nhau sau đó sản xuất chất chiết từ hỗn hợp này theo phương pháp nêu trên. Tỷ lệ trộn của các chất chiết từ thảo dược riêng biệt là như được xác định ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết bằng các ví dụ dưới đây, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Điều chế (A) chất chiết từ một thảo dược

1.1: Sản xuất chất chiết *Crataegi Fructus*

Lá và hoa của *Crataegi Fructus* (được mua ở chợ Kyung-dong, Hàn Quốc) được rửa bằng nước để loại bỏ tạp chất và được làm khô hoàn toàn. 2,0l dung dịch etanol trong nước nồng độ 60% (theo thể tích) được thêm vào 250g lá và hoa khô của *Crataegi Fructus*. Sau khi hồi lưu 3 giờ ở nhiệt độ 80°C hai lần, chất chiết dạng lỏng thu được được lọc và được cô dưới áp suất giảm. Khi hầu hết nước đã được bay hơi, 0,2l nước được thêm vào chất chiết đã cô, sau đó được gia nhiệt để cô đồng sôi. Quy trình này được lặp lại hai lần nữa. Một thể tích nước tương tự được thêm vào phần cô đồng sôi để tạo thành hỗn dịch đồng nhất, sau đó được làm khô lạnh để thu được 45,0g (hiệu suất 18,0% tính theo lượng thảo dược ban đầu) chất chiết từ *Crataegi Fructus* ở dạng bột.

1.2: Sản xuất chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*

Cinnamomi Cortex (được mua ở chợ Kyung-dong, Hàn Quốc) được rửa bằng nước để loại bỏ tạp chất và được làm khô hoàn toàn. 2,0l dung dịch etanol trong nước nồng độ 60% (theo thể tích) được thêm vào 250g *Cinnamomi Cortex* khô. Sau khi hồi lưu 3 giờ ở nhiệt độ 80°C trong hai lần, chất chiết dạng lỏng thu được được lọc và được cô dưới áp suất giảm. Khi hầu hết nước đã được bay hơi, tiếp tục bổ sung 0,2l nước vào chất chiết đã cô, sau đó được gia nhiệt để cô đồng sôi. Quy trình này được lặp lại hai lần nữa. Một thể tích nước tương tự được thêm vào phần cô đồng sôi để tạo thành hỗn dịch đồng nhất, sau đó được làm khô lạnh để thu được 28,5g (hiệu suất bằng 11,4% tính theo lượng thảo dược ban đầu) chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* ở dạng bột.

1.3: Sản xuất chất chiết từ *Prunella Spica*

Prunella Spica được rửa bằng nước để loại bỏ tạp chất và được làm khô hoàn toàn. Bổ sung 2,0l dung dịch etanol trong nước nồng độ 60% (theo thể tích) vào 250g *Prunella Spica* khô. Sau khi hồi lưu 3 giờ ở nhiệt độ 80°C trong hai lần, chất chiết dạng lỏng thu được được lọc và được cô dưới áp suất giảm. Khi hầu hết nước đã được bay hơi, 0,2l nước được thêm vào chất chiết đã cô, sau đó được gia nhiệt để cô đồng sôi. Quy trình này được lặp lại hai lần nữa. Một thể tích nước tương tự được thêm vào phần cô đồng sôi để tạo thành hỗn dịch đồng nhất, sau đó làm khô lạnh để thu được 27,3g (hiệu suất 10,9% tính theo lượng thảo dược ban đầu) chất chiết từ *Prunella Spica* ở dạng bột.

1.4. Sản xuất chất chiết từ *Equiseti Herba*

Equiseti Herba được rửa bằng nước để loại bỏ tạp chất và được làm khô hoàn toàn. 2,0l dung dịch etanol trong nước nồng độ 60% (theo thể tích) được thêm vào 250g *Equiseti Herba* khô. Sau khi hồi lưu 3 giờ ở nhiệt độ 80°C trong 2 lần, chất chiết dạng lỏng tạo thành được lọc và được cô dưới áp suất giảm. Khi hầu hết nước đã được bay hơi, 0,2l nước được thêm vào chất chiết đã cô, sau đó được gia nhiệt để cô đồng sôi. Quy trình này được lặp lại hai lần nữa. Một thể tích nước tương tự được thêm vào phần cô đồng sôi để tạo thành hỗn dịch đồng nhất, sau đó làm khô lạnh để thu được 52,0g (hiệu suất 20,8% tính theo lượng thảo dược ban đầu) chất chiết từ *Equiseti Herba* ở dạng bột.

Ví dụ 2: Sản xuất chất chiết từ hỗn hợp thảo dược

Crataegi Fructus, *Cinnamomi Cortex*, và *Prunella Spica* được rửa bằng nước để loại bỏ tạp chất và được làm khô hoàn toàn. 2,0l dung dịch etanol trong nước nồng độ 60% (theo thể tích) được thêm vào hỗn hợp của các thảo dược khô, *Crataegi Fructus* (97g) và *Cinnamomi Cortex* (153g); hoặc hỗn hợp của các thảo dược khô, *Cinnamomi Cortex* (92g) và *Prunella Spica* (96g). Sau khi hồi lưu 3 giờ ở nhiệt độ 80°C trong hai lần, chất chiết dạng lỏng thu được được lọc và được cô dưới áp suất giảm. Khi hầu hết nước đã được bay hơi, 0,2l nước được thêm vào chất chiết đã cô, sau đó được làm nóng để cô đồng sôi. Quy trình này được lặp lại hai lần nữa. Một thể tích nước tương tự được thêm vào phần cô đồng sôi để tạo thành hỗn dịch đồng nhất, sau đó được làm khô lạnh để thu được 35,2g (hiệu suất 14,1% so với các thảo dược ban đầu) hỗn hợp chất chiết từ *Crataegi Fructus* và *Cinnamomi Cortex*, và 22,0g (hiệu suất 11,7% so với các thảo dược ban đầu) hỗn hợp chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* và *Prunella Spica* ở dạng bột.

Ví dụ 3: Sản xuất hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược

Ví dụ 3.1: Sản xuất hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus* và chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*

Chất chiết từ *Crataegi Fructus* thu được trong Ví dụ 1.1 và chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* thu được trong Ví dụ 1.2 được trộn với nhau ở các tỷ lệ khối lượng bằng 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, và 1:5 (khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*). Để trộn đồng nhất, mỗi hỗn hợp của chất chiết từ thảo dược được thêm nước với thể tích bằng từ 2 đến 3 lần khối lượng hỗn hợp, và hỗn hợp này được cô dưới áp suất giảm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 60°C. Một thể tích nước tương tự được thêm vào phần cô để thu được hỗn dịch đồng nhất, sau đó được làm khô lạnh để thu được hỗn hợp bột.

Ví dụ 3.2: Sản xuất hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus* và chất chiết từ *Prunella Spica*

Chất chiết từ *Crataegi Fructus* thu được trong Ví dụ 1.1 và chất chiết từ *Prunella Spica* thu được trong Ví dụ 1.3 được trộn với nhau ở các tỷ lệ khối lượng bằng 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, và 1:5 (khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica*). Các quy trình được thực hiện tương tự như quy trình trong Ví dụ 3.1 để thu được hỗn hợp.

Ví dụ 3.3: Sản xuất hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus* và chất chiết từ *Equiseti Herba*

Chất chiết từ *Crataegi Fructus* thu được trong Ví dụ 1.1 và chất chiết từ *Equiseti Herba* thu được trong Ví dụ 1.4 được trộn với nhau ở các tỷ lệ khối lượng bằng 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, và 1:5 (khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*). Các quy trình được thực hiện tương tự như quy trình trong Ví dụ 3.1 để thu được hỗn hợp.

Ví dụ 3.4: Sản xuất hỗn hợp của chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* và chất chiết từ *Prunella Spica*

Chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* thu được trong Ví dụ 1.2 và chất chiết từ *Prunella Spica* thu được trong Ví dụ 1.3 được trộn với nhau ở các tỷ lệ khối lượng bằng 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 1:1, 1:3, và 1:5 (khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* : khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica*). Quy trình được thực hiện tương tự như quy trình trong Ví dụ 3.1 để thu được hỗn hợp.

Ví dụ 3.5: Sản xuất hỗn hợp của chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* và chất chiết từ *Equiseti Herba*

Chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* thu được trong Ví dụ 1.2 và chất chiết từ *Equiseti Herba* thu được trong Ví dụ 1.4 được trộn với nhau ở các tỷ lệ khối lượng bằng 7:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:3, 1:5, và 1:7 (khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*). Quy trình được thực hiện tương tự như quy trình trong Ví dụ 3.1 để thu được hỗn hợp.

Ví dụ 3.6: Sản xuất hỗn hợp của chất chiết từ *Prunella Spica* và chất chiết từ *Equiseti Herba*

Chất chiết từ *Prunella Spica* thu được trong Ví dụ 1.3 và chất chiết từ *Equiseti Herba* thu được trong Ví dụ 1.4 được trộn với nhau ở các tỷ lệ khối lượng bằng 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, và 1:10 (khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*). Các quy trình được thực hiện tương tự như quy trình trong Ví dụ 3.1 để thu được hỗn hợp.

Ví dụ 3.7: Sản xuất hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* và chất chiết từ *Prunella Spica*

Chất chiết từ *Crataegi Fructus* thu được trong Ví dụ 1.1, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* thu được trong Ví dụ 1.2, và chất chiết từ *Prunella Spica* thu được trong Ví dụ 1.3 được trộn với nhau ở các tỷ lệ khối lượng bằng 10:1:1, 2:2:3, và 1:1:5 (khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* : khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica*). Các quy trình được thực hiện tương tự như quy trình trong Ví dụ 3.1 để thu được hỗn hợp.

Ví dụ 3.8: Sản xuất hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* và chất chiết từ *Equiseti Herba*

Chất chiết từ *Crataegi Fructus* thu được trong Ví dụ 1.1, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* thu được trong Ví dụ 1.2, và chất chiết từ *Equiseti Herba* thu được trong Ví dụ 1.4 được trộn với nhau ở các tỷ lệ khối lượng bằng 10:1:1, 2:5:2, và 1:1:5 (khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*). Các quy trình được thực hiện tương tự như quy trình trong Ví dụ 3.1 để thu được hỗn hợp.

Ví dụ 3.9: Sản xuất hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Prunella Spica* và chất chiết từ *Equiseti Herba*

Chất chiết từ *Crataegi Fructus* thu được trong Ví dụ 1.1, chất chiết từ *Prunella Spica* thu được trong Ví dụ 1.3, và chất chiết từ *Equiseti Herba* thu được trong Ví dụ 1.4 được trộn với nhau ở các tỷ lệ khối lượng bằng 7:1:1, 3:2:4, và 1:1:5 (khối lượng Chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*). Các quy trình được thực hiện tương tự như quy trình trong Ví dụ 3.1 để thu được hỗn hợp.

Ví dụ 3.10: Sản xuất hỗn hợp của chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba*

Chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* thu được trong Ví dụ 1.2, chất chiết từ *Prunella Spica* thu được trong Ví dụ 1.3, và chất chiết từ *Equiseti Herba* thu được trong Ví dụ 1.4 được trộn với nhau ở các tỷ lệ khối lượng bằng 7:1:1, 3:2:5, và 1:1:7 (khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* : khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*). Các quy trình được thực hiện tương tự như quy trình trong Ví dụ 3.1 để thu được hỗn hợp.

Ví dụ 3.11: Sản xuất hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba*

Chất chiết từ *Crataegi Fructus* thu được trong Ví dụ 1.1, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* thu được trong Ví dụ 1.2, chất chiết từ *Prunella Spica* thu được trong Ví dụ 1.3, và chất chiết từ *Equiseti Herba* thu được trong Ví dụ 1.4 được trộn với nhau ở các tỷ lệ khối lượng bằng 5:1:1:1, 3:2:2:2, và 1:1:1:5 (khối lượng chất chiết từ *Crataegi Fructus* : khối lượng chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* : khối lượng chất chiết từ *Prunella Spica* : khối lượng chất chiết từ *Equiseti Herba*). Các quy trình được thực hiện tương tự như quy trình trong Ví dụ 3.1 để thu được hỗn hợp.

Ví dụ thực nghiệm: Đánh giá hoạt tính dược lý

Ví dụ thử nghiệm 1: So sánh hoạt tính của hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược và chất chiết của các hỗn hợp thảo dược

Các thử nghiệm được tiến hành theo một phương pháp đánh giá nêu trong tài liệu (Amin et al., *Environmental Health Perspectives* vol.112, No. 4, March, 2004, 465-479) để so sánh và đánh giá hiệu quả điều trị bệnh viêm thận của các chất chiết thu được từ

hỗn hợp thảo dược bao gồm *Crataegi Fructus* và *Cinnamomi Cortex* và hỗn hợp thảo dược gồm *Cinnamomi Cortex* và *Prunella Spica* thu được trong Ví dụ 2, và hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1 gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus* và chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* thu được trong Ví dụ 3.1 và hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1 gồm chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* và chất chiết từ *Prunella Spica* thu được trong Ví dụ 3.4. Kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Một nhóm bình thường được tiến hành thử nghiệm, trong đó yếu tố gây viêm thận, gentamixin (được mua từ Whail Pharma. Co., Ltd.) được tiêm qua màng bụng cho các con chuột SD cái (7 tuần tuổi, cân nặng từ 195g đến 205g, Orient) với liều lượng là 240mg/kg trong 6 ngày để gây viêm thận. Trong số các con chuột thử nghiệm bị gây viêm thận, ngoài nhóm đối chứng âm, các nhóm thử nghiệm khác được tiếp nhận qua đường miệng 2 loại thuốc thử nghiệm thu được trong Ví dụ 2 hoặc thuốc thử nghiệm thu được trong Ví dụ 3.1 hoặc 3.4 với liều hàng ngày là 400mg/kg. Các con chuột thử nghiệm được mổ xác vào ngày thứ 7 sau khi sử dụng thuốc qua đường miệng. Các mẫu máu được thu gom được phân tích để phát hiện nito ure máu (blood urea nitrogen B.U.N.) và creatinin. Kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

Nhóm	Liều lượng (mg/kg)	B.U.N. (mg/dl)	Creatinin (mg/dl)
Hỗn hợp của chất chiết từ <i>Crataegi Fructus</i> và chất chiết từ <i>Cinnamomi Cortex</i> (Ví dụ 3.1)	400	21,30	0,73
Chất chiết từ hỗn hợp thảo dược <i>Crataegi Fructus</i> và <i>Cinnamomi Cortex</i> (Ví dụ 2)	400	21,48	0,74
Hỗn hợp của chất chiết từ <i>Cinnamomi Cortex</i> và chất chiết từ <i>Prunella Spica</i> (Ví dụ 3.4)	400	20,81	0,68
Chất chiết của hỗn hợp thảo dược <i>Cinnamomi Cortex</i> và <i>Prunella Spica</i> (Ví dụ 2)	400	20,89	0,69
Nhóm đối chứng âm	-	91,16	1,80
Nhóm bình thường	-	20,41	0,66

Như có thể được thấy trong bảng 1, hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược thu được trong các Ví dụ 3.1 hoặc 3.4 và các chất chiết từ hỗn hợp thảo dược thu được trong

Ví dụ 2 có hiệu quả vượt trội trong việc điều trị bệnh viêm thận. Cụ thể, không có sự khác biệt đáng kể về hoạt tính bất kể phương pháp điều chế.

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm đánh giá hiệu quả điều trị bệnh trên mô hình viêm thận gây ra bởi gentamixin

Các thử nghiệm đánh giá được tiến hành theo một phương pháp đánh giá nêu trong tài liệu (Amin et al., *Environmental Health Perspectives* vol.112, No. 4, March, 2004, 465-479) để khảo sát hiệu quả điều trị bệnh viêm thận của chất chiết từ một thảo dược thu được trong Ví dụ 1 và hỗn hợp từ các chất chiết từ thảo dược thu được trong các Ví dụ từ 3.1 đến 3.11. Các kết quả đánh giá về chất chiết từ một thảo dược thu được trong Ví dụ 1 được thể hiện trong Bảng 1, và kết quả của các hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược được thể hiện trong Bảng 2.

Một nhóm bình thường khác với nhóm đối chứng dương được tiến hành thử nghiệm, trong đó yếu tố gây viêm thận, gentamixin (được mua từ Whail Pharma. Co., Ltd.) được tiêm vào trong màng bụng các con chuột SD cái (7 tuần tuổi, nặng từ 195 đến 205g, Orient) với liều lượng bằng 240 mg/kg để gây viêm thận. Trong số các con chuột thử nghiệm bị gây viêm thận, ngoài nhóm đối chứng âm, nhóm chuột thử nghiệm khác được tiếp nhận qua đường miệng 4 loại thuốc thử nghiệm thu được trong Ví dụ 1 và 11 loại thuốc thử nghiệm thu được trong Ví dụ 3 với liều hàng ngày bằng 400mg/kg. Các con chuột thử nghiệm được mổ xác vào ngày thứ 7 ngày sau khi dùng qua đường miệng. Các mẫu máu được thu gom được phân tích để xác định nồng độ nitơ ure máu (B.U.N.) và creatinin.

Bảng 2

Nhóm		Liều lượng (mg/kg)	B.U.N. (mg/dl)	Creatinin (mg/dl)
Ví dụ 1.1		400	30,55	0,78
Ví dụ 1.2		400	23,05	0,75
Ví dụ 1.3		400	45,06	0,98
Ví dụ 1.4		400	37,57	0,82
Ví dụ 3.1 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Cinnamomi Cortex</i>)	10:1	400	25,11	0,77
	5:1	400	21,43	0,73
	3:1	400	21,13	0,72
	1:1	400	20,81	0,68
	1:3	400	20,87	0,69
	1:5	400	20,51	0,68
Ví dụ 3.2	10:1	400	31,94	0,80

(Crataegi Fructus : Prunella Spica)	5:1	400	31,35	0,81
	3:1	400	31,17	0,80
	1:1	400	34,44	0,82
	1:3	400	36,61	0,82
	1:5	400	37,81	0,84
Ví dụ 3.3 (Crataegi Fructus : Equiseti Herba)	10:1	400	29,60	0,76
	5:1	400	30,63	0,78
	3:1	400	30,58	0,77
	1:1	400	31,13	0,79
	1:3	400	33,85	0,82
	1:5	400	33,90	0,82
Ví dụ 3.4 (Cinnamomi Cortex : Prunella Spica)	10:1	400	28,25	0,78
	5:1	400	21,80	0,70
	4:1	400	21,71	0,72
	3:1	400	21,55	0,69
	1:1	400	20,99	0,67
	1:3	400	21,02	0,68
	1:5	400	31,03	0,81
Ví dụ 3.5 (Cinnamomi Cortex : Equiseti Herba)	7:1	400	27,37	0,78
	5:1	400	26,77	0,77
	3:1	400	25,13	0,77
	2:1	400	24,74	0,75
	1:1	400	24,61	0,75
	1:3	400	28,11	0,79
	1:5	400	30,98	0,80
	1:7	400	31,09	0,80
Ví dụ 3.6 (Prunella Spica : Equiseti Herba)	10:1	400	40,46	0,89
	5:1	400	36,57	0,83
	3:1	400	35,93	0,82
	1:1	400	35,14	0,81
	1:3	400	36,14	0,83
	1:5	400	36,37	0,84
	1:10	400	36,10	0,82
Ví dụ 3.7 (Crataegi Fructus : Cinnamomi Cortex : Prunella Spica)	10:1:1	400	28,81	0,78
	2:2:3	400	22,34	0,74
	1:1:5	400	30,35	0,78
Ví dụ 3.8 (Crataegi Fructus : Cinnamomi Cortex : Equiseti Herba)	10:1:1	400	26,70	0,77
	2:5:2	400	20,07	0,68
	1:1:5	400	22,14	0,71
Ví dụ 3.9 (Crataegi Fructus : Prunella Spica : Equiseti Herba)	7:1:1	400	30,83	0,78
	3:2:4	400	31,41	0,82
	1:1:5	400	32,37	0,84
Ví dụ 3.10	7:1:1	400	21,12	0,71

(Cinnamomi Cortex : Prunella Spica : Equiseti Herba)	3:2:5	400	28,78	0,76
	1:1:7	400	32,34	0,82
Ví dụ 3.11 (Crataegi Fructus : Cinnamomi Cortex : Prunella Spica : Equiseti Herba)	5:1:1:1	400	23,14	0,73
	3:2:2:2	400	21,11	0,71
	1:1:1:5	400	28,17	0,77
Nhóm đối chứng âm		-	89,20	1,79
Nhóm bình thường		-	19,84	0,63

Như có thể được thấy trong Bảng 2, giống như chất chiết từ một thảo dược thu được trong các Ví dụ từ 1.1 đến 1.4, các hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược thu được trong các Ví dụ từ 3.1 đến 3.11 với các thành phần được xác định ở trên có hiệu quả vượt trội trong điều trị bệnh viêm thận. Cụ thể, đã xác định được hợp phần có hoạt tính tốt với tỷ lệ trộn của mỗi thành phần, và thuốc kết hợp chứa *Crataegi Fructus* hoặc *Cinnamomi Cortex* cho hiệu quả tổng thể tốt đối với mô hình viêm thận gây ra bởi gentamixin.

Ví dụ thử nghiệm 3: Đánh giá mô bệnh học trên mô hình viêm thận gây ra bởi gentamixin

Từ nhóm thử nghiệm được điều trị bằng hỗn hợp của chất chiết từ *Crataegi Fructus* và chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* ở tỷ lệ 5:1 thu được trong Ví dụ 3.1, mô thận được thu gom và được đánh giá mô bệnh học.

Mô thận thu được được cố định trong formalin và được cắt thành các lát theo quy trình xử lý mô thông thường. Các lát cắt mô thận được nhuộm bằng hematoxylin và eozin (được mua từ Sigma) và quan sát. Khi nhận thấy các dấu hiệu mô bệnh học bất thường, mức độ nghiêm trọng của thương tổn được chia thành bốn mức độ từ tối thiểu đến cực kỳ nghiêm trọng.

Các thay đổi bệnh học của mô thận được thể hiện trên FIG. 2. Trong nhóm bình thường ở FIG. 2(a), trong đó G là tiểu cầu thận và T là tiểu quản thận, không có tổn thương đáng kể liên quan đến bệnh viêm thận. Trong nhóm đối chứng âm trên FIG. 2(b) (tức là, nhóm thử nghiệm khi bệnh viêm thận không được điều trị bằng thuốc thử nghiệm), có mức độ tổn thương nghiêm trọng, như hoại tử ống thận 'N' (nghiêm trọng, mức 4+), tái tạo ống dẫn 'R' (vừa phải, mức độ 3+), và viêm kẽ thận '*' (vừa phải, mức độ 3+). Các thương tổn khác nhận biết được là trụ trong mờ "->" trong lòng ống dẫn,

giãn ống thận, giọt hyalin, xơ hóa tế bào kẽ, và các triệu chứng tương tự. Nhóm thử nghiệm trên FIG. 2(c) được điều trị bằng thuốc thử nghiệm thu được trong Ví dụ 3.1 có thương tổn, như hoại tử ống thận “N” (tối thiểu, mức độ 1+), tái tạo ống dẫn “R” (vừa phải, mức độ 3+), và viêm tế bào kẽ “*” (trung bình, mức độ 2+).

Từ kết quả trên FIG. 2 có thể thấy rằng so với nhóm đối chứng âm, nhóm thử nghiệm có hiệu quả điều trị bệnh viêm thận được cải thiện đáng kể dựa trên kết quả quan sát mô bệnh học.

Ví dụ thử nghiệm 4: Thử nghiệm đánh giá hiệu quả điều trị bệnh trên mô hình viêm thận gây ra bởi cisplatin

Các thử nghiệm đánh giá được tiến hành theo một phương pháp đánh giá nêu trong tài liệu (Shirwaikar et al., *Journal of Ethnopharmacology* 90, 2004, 81-86) để đánh giá hiệu quả điều trị bệnh viêm thận của các chất chiết từ một thảo dược thu được trong Ví dụ 1 và các hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược thu được trong các Ví dụ từ 3.1 đến 3.11. Các kết quả đánh giá hiệu quả của chất chiết từ một thảo dược thu được trong Ví dụ 1 được thể hiện trên FIG. 3 và bảng 3, và kết quả của các hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược được thể hiện trong bảng 3.

Một nhóm bình thường khác với nhóm đối chứng dương được tiến hành thử nghiệm, trong đó yếu tố gây viêm thận, cisplatin (được mua từ Sigma) được tiêm vào màng bụng của các con chuột SD cái (7 tuần tuổi, 195-205g, Orient) ở liều lượng là 3mg/kg trong 3 ngày để gây viêm thận. Trong số các con chuột thử nghiệm bị gây viêm thận, ngoài nhóm đối chứng âm, một nhóm chuột thử nghiệm khác được tiếp nhận qua đường miệng 4 loại thuốc thử nghiệm (chất chiết từ một thảo mộc) thu được trong Ví dụ 1 và 11 loại thuốc thử nghiệm (hỗn hợp các chất chiết thảo mộc) thu được trong các Ví dụ 3 với liều hàng ngày là 400mg/kg. Các con chuột thử nghiệm được mổ xác vào ngày thứ 7 sau khi được sử dụng qua đường miệng. Các mẫu máu được thu gom được phân tích để xác định nồng độ nitơ ure máu (B.U.N.) và creatinin.

Bảng 3

Nhóm	Liều lượng (mg/kg)	B.U.N. (mg/dl)	Creatinin (mg/dl)
Ví dụ 1.1	400	43,95	0,91
Ví dụ 1.2	400	70,75	1,09
Ví dụ 1.3	400	45,60	0,88
Ví dụ 1.4	400	36,84	0,82

Ví dụ 3.1 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Cinnamomi Cortex</i>)	10:1	400	48,42	0,90
	5:1	400	44,87	0,86
	3:1	400	45,11	0,88
	1:1	400	53,58	0,93
	1:3	400	60,09	0,95
	1:5	400	64,08	0,99
Ví dụ 3.2 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Prunella Spica</i>)	10:1	400	43,15	0,90
	5:1	400	41,47	0,83
	3:1	400	38,81	0,82
	1:1	400	40,94	0,83
	1:3	400	43,90	0,89
	1:5	400	45,14	0,90
Ví dụ 3.3 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	10:1	400	34,11	0,79
	5:1	400	31,07	0,73
	3:1	400	30,72	0,71
	1:1	400	28,99	0,69
	1:3	400	28,71	0,67
	1:5	400	27,43	0,65
Ví dụ 3.4 (<i>Cinnamomi Cortex</i> : <i>Prunella Spica</i>)	10:1	400	57,40	0,94
	5:1	400	46,34	0,88
	4:1	400	45,19	0,88
	3:1	400	38,46	0,84
	1:1	400	30,11	0,69
	1:3	400	23,11	0,66
	1:5	400	39,85	0,83
Ví dụ 3.5 (<i>Cinnamomi Cortex</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	7:1	400	40,71	0,87
	5:1	400	38,84	0,83
	3:1	400	33,97	0,73
	2:1	400	28,91	0,67
	1:1	400	30,75	0,71
	1:3	400	30,99	0,71
	1:5	400	32,59	0,75
	1:7	400	33,47	0,76
Ví dụ 3.6 (<i>Prunella Spica</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	10:1	400	39,31	0,85
	5:1	400	37,71	0,82
	3:1	400	33,36	0,74
	1:1	400	34,01	0,74
	1:3	400	33,61	0,74
	1:5	400	32,86	0,73
	1:10	400	32,19	0,73
Ví dụ 3.7 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Cinnamomi Cortex</i> : <i>Prunella Spica</i>)	10:1:1	400	35,12	0,74
	2:2:3	400	34,81	0,74
	1:1:5	400	33,98	0,73
Ví dụ 3.8 (<i>Crataegi Fructus</i> :	10:1:1	400	35,74	0,75
	2:5:2	400	36,14	0,76

<i>Cinnamomi Cortex</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	1:1:5	400	32,83	0,74
Ví dụ 3.9 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Prunella Spica</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	7:1:1	400	31,61	0,71
	3:2:4	400	26,42	0,63
	1:1:5	400	28,94	0,65
Ví dụ 3.10 (<i>Cinnamomi Cortex</i> : <i>Prunella Spica</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	7:1:1	400	42,79	0,83
	3:2:5	400	33,65	0,67
	1:1:7	400	32,57	0,65
Ví dụ 3.11 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Cinnamomi Cortex</i> : <i>Prunella Spica</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	5:1:1:1	400	37,82	0,82
	3:2:2:2	400	31,10	0,71
	1:1:1:5	400	32,88	0,72
Nhóm đối chứng âm	-	-	74,74	1,13
Nhóm bình thường	-	-	23,79	0,68

Như có thể được thấy trong Bảng 3, cũng như chất chiết từ một thảo dược thu được trong các Ví dụ 1.1 đến 1.4, các hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược thu được trong các Ví dụ từ 3.1 đến 3.11 theo thành phần đã xác định đều có hiệu quả vượt trội trong điều trị bệnh viêm thận. Cụ thể, hợp phần theo tỷ lệ trộn của mỗi thành phần tạo ra hoạt tính tốt được xác định, và thuốc kết hợp chứa *Crataegi Fructus* hoặc *Equiseti Herba* cho hiệu quả tổng thể tốt trên mô hình viêm thận gây ra bởi cisplatin, là mô hình viêm thận cấp tính.

Ví dụ thử nghiệm 5: Đánh giá mô bệnh học trên mô hình viêm thận gây ra bởi cisplatin

Từ nhóm thử nghiệm trong Ví dụ thử nghiệm 4 được điều trị bằng hỗn hợp chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* và chất chiết từ *Prunella Spica* ở tỷ lệ 3:1, 1:1, hoặc 1:3 trong Ví dụ 3.4, các mô thận được thu gom và được đánh giá mô bệnh học.

Các mô thận được thu gom được cố định trong formalin và được cắt thành các lát theo quy trình xử lý mô thông thường. Các lát cắt mô thận được nhuộm bằng hematoxylin và eosin và được quan sát. Khi phát hiện thấy dấu hiệu mô bệnh học, mức độ nghiêm trọng của thương tổn được ghi nhận ở bốn mức độ từ tối thiểu đến rất nghiêm trọng.

Sự thay đổi bệnh học của mô thận được thể hiện trên FIG. 4 và bảng 4.

Bảng 4

Số lát		Cơ quan: Thận		Dấu hiệu mô bệnh học
		Bên trái	Bên phải	
Nhóm bình thường		NM	NM	A) Hoại tử ống thận B) Tái tạo ống thận C) Giãn ống thận D) Trụ trong mờ E) Viêm tế bào kẽ F) Xơ hóa tế bào kẽ NM) Không thấy dấu hiệu trên kính hiển vi 1+: Tối thiểu 2+: Trung bình 3+: Vừa phải 4+: Nghiêm trọng
Đối chứng âm		A)1+, B)4+, C)2+, D)1+, E)2+, F)1+	A)1+, B)3+, C)2+, E)2+, F)1+	
Ví dụ 3.4	3:1	A)1+, B)4+, C)1+, E)1+	A)1+, B)3+, C)1+	
	1:1	A)1+, B)4+, C)1+	A)1+, B)3+	
	1:3	A)1+, B)1+, C)1+	A)1+, B)2+	

Trong nhóm bình thường trên FIG. 4, trong đó G là tiểu cầu thận và T là tiểu quản thận, không thấy có tổn thương đáng kể liên quan đến bệnh viêm thận. Trong nhóm đối chứng âm trên FIG. 4, mô thận có mức hoại tử ống thận tối thiểu và khả năng tái tạo ống thận mạnh mẽ. Các dấu hiệu khác là giãn ống thận, viêm tế bào kẽ, trụ trong mờ, và xơ hóa tế bào kẽ. Nhóm được điều trị bằng thuốc thử nghiệm có thương tổn nhẹ so với nhóm đối chứng âm, như hoại tử ống thận, tái tạo ống thận và giãn ống thận, không phát hiện thấy trụ trong mờ cũng như xơ hóa tế bào kẽ ở nhóm thử nghiệm.

Ngược lại với nhóm đối chứng âm, nhóm thử nghiệm chứng tỏ đã có hiệu quả điều trị bệnh viêm thận dựa vào quan sát mô bệnh học. Cụ thể, có thể được thấy trong bảng 4, các hỗn hợp có tỷ lệ 1:3 thu được trong Ví dụ 3.4 có hiệu quả vượt trội so với hỗn hợp có tỷ lệ 3:1 hoặc 1:1.

Ví dụ thử nghiệm 6: Thử nghiệm đánh giá hiệu quả điều trị bệnh trên mô hình viêm thận gây ra bởi cyclosporin A

Các thử nghiệm hoạt tính được tiến hành theo một phương pháp đánh giá nêu trong tài liệu (So Young Lee et al., *Experimental transplantation* 78, 2004, 1756-1764) để đánh giá hiệu quả điều trị bệnh viêm thận mạn tính của hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược thu được trong các Ví dụ 3.1, 3.3, 3.4, và 3.5 có tỷ lệ 3:1, 1:1 và 1:3.

Một nhóm bình thường khác với nhóm đối chứng dương được tiến hành thử nghiệm, trong đó yếu tố gây viêm thận, cyclosporin A (CsA, được mua từ công ty Chong Kun Dang Pharm. Corp.) được tiêm vào trong màng bụng cho các con chuột SD cái (7

tuần tuổi, nặng từ 195 đến 205g, Orient) với liều lượng là 50 mg/kg trong 8 tuần để gây viêm thận. Trong số các con chuột thử nghiệm bị gây viêm thận, ngoài nhóm đối chứng âm, một nhóm chuột thử nghiệm khác được dùng qua đường miệng hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược trong các Ví dụ 3.1, 3.3, 3.4, và 3.5 có tỷ lệ 3:1, 1:3 và 1:3 với liều hàng ngày là 400 mg/kg trong 3 ngày trước khi dùng cyclosporin A. Các con chuột thử nghiệm này được mổ xác 8 tuần sau khi bị kích ứng bệnh viêm thận, và các mẫu máu được thu gom được phân tích để xác định nồng độ nitơ ure máu (B.U.N.) và creatinin.

Bảng 5

Nhóm		Liều lượng (mg/kg)	B.U.N. (mg/dl)	Creatinin (mg/dl)
Ví dụ 3.1	3:1	400	42,1	0,73
	1:1	400	40,4	0,73
	1:3	400	37,8	0,73
Ví dụ 3.3	3:1	400	34,1	0,68
	1:1	400	39,4	0,75
	1:3	400	43,9	0,74
Ví dụ 3.4	3:1	400	37,0	0,73
	1:1	400	34,3	0,68
	1:3	400	30,5	0,62
Ví dụ 3.5	3:1	400	35,2	0,71
	1:1	400	39,1	0,72
	1:3	400	42,3	0,73
Nhóm đối chứng âm		-	61,6	1,02
Nhóm bình thường		-	21,5	0,54

Như có thể được thấy trong bảng 5, nhóm đối chứng âm và nhóm thử nghiệm được điều trị bằng cyclosporin A có nồng độ B.U.N. và creatinin tăng so với nhóm bình thường, nhưng tất cả các nhóm được điều trị có kết quả trái ngược với nhóm đối chứng âm, tức là có nồng độ B.U.N. và creatinin giảm đáng kể. Cụ thể, hỗn hợp của chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* và chất chiết từ *Prunella Spica* với tỷ lệ 1:3 thu được trong Ví dụ 3.4 có hiệu quả vượt trội đối với mô hình viêm thận gây ra bởi cyclosporin A, là mô hình viêm thận mạn tính.

Ví dụ thử nghiệm 7: Thử nghiệm đánh giá hiệu quả điều trị bệnh lên mô hình viêm thận gây ra bởi cisplatin

Để đánh giá hiệu quả điều trị bệnh viêm thận của các hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược có tỷ lệ 3:1, 1:1 và 1:3 thu được trong Ví dụ 3.4, mà đã thể hiện kết quả tốt trong đánh giá trên, trên mô hình viêm thận gây ra bởi cisplatin, các thử nghiệm đánh giá

được tiến hành theo một phương pháp đánh giá nêu trong tài liệu (Shirwaikar et al., *Journal of Ethnopharmacology* 90, 2004, 81-86).

Một nhóm bình thường khác với nhóm đối chứng dương được tiến hành thử nghiệm, trong đó yếu tố gây viêm thận, cisplatin được tiêm vào trong màng bụng của nhóm thử nghiệm với liều lượng là 3mg/kg trong 3 ngày (tham khảo Ví dụ thử nghiệm 4). Ngoài nhóm đối chứng âm, nhóm chuột thử nghiệm khác được tiếp nhận qua đường miệng hỗn hợp các chất chiết từ thảo dược với tỷ lệ 3:1, 1:1 và 1:3 thu được trong Ví dụ 3.4 với liều lượng hàng ngày là 100, 200 và 400mg/kg. Các con chuột thử nghiệm được mổ xác vào ngày thứ 7 sau khi được dùng qua đường miệng. Các mẫu máu được thu gom được phân tích để xác định nồng độ nitơ ure máu (B.U.N.) và creatinin. Kết quả được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

Nhóm		Liều lượng (mg/kg)	B.U.N. (mg/dl)	Creatinin (mg/dl)
Ví dụ 3.4	3:1	100	42,12	0,87
		200	40,79	0,85
		400	37,87	0,84
	1:1	100	34,65	0,75
		200	31,71	0,73
		400	29,77	0,70
	1:3	100	31,51	0,74
		200	25,14	0,67
		400	23,89	0,67
Nhóm đối chứng âm		-	79,51	1,14
Nhóm bình thường		-	22,46	0,65

Như có thể được thấy trong Bảng 6, tất cả các thuốc thử nghiệm với các tỷ lệ trộn khác nhau trong Ví dụ 3.4 đã thể hiện hiệu quả tốt trong điều trị bệnh viêm thận. Đặc biệt, hỗn hợp của chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* và chất chiết từ *Prunella Spica* với tỷ lệ 1:3 có hoạt tính vượt trội nhất.

Ví dụ thử nghiệm 8: Thử nghiệm đánh giá tính gây độc tế bào trên tế bào màng nâng cuộn mao mạch thận ở chuột

Để đánh giá 4 chất chiết từ một thảo dược thu được trong Ví dụ 1 và 11 hỗn hợp chất chiết từ các thảo dược thu được trong Ví dụ 3 về tính gây độc đối với tế bào màng nâng cuộn mao mạch thận, các thử nghiệm đánh giá được tiến hành theo một phương pháp đánh giá nêu trong tài liệu (R. Wang et al., *Life Sciences* 80, 2007, 2481-2488). Các

kết quả đánh giá chất chiết từ một thảo dược thu được trong Ví dụ 1 và các hỗn hợp của các chất chiết từ thảo dược thu được trong Ví dụ 3 được thể hiện trong bảng 7.

Đối với 4 chất chiết từ một thảo dược thu được trong Ví dụ 1 và 11 hỗn hợp thu được trong Ví dụ 3, mỗi 10mg chất chiết được hòa tan trong lượng DMSO thích hợp để pha chế mẫu với nồng độ cuối cùng là 40 mg/ml. Tế bào màng nâng cuộn mao mạch được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng (1×10^4 , 24 giờ) đã được xử lý với mẫu ở nồng độ tối đa là 400µg/ml với tỷ lệ chung bằng 2. Sau 24 giờ nuôi cấy, môi trường được thay bằng môi trường khác chứa 0,5mg/ml MTT. Sau hơn 4 giờ nữa, môi trường được loại bỏ, và 100µl DMSO được thêm vào mỗi tế bào. Trong 15 phút, đo mức độ hấp thụ ở bước sóng 540nm để xác định khả năng gây độc đối với tế bào màng nâng cuộn mao mạch.

Bảng 7

Nhóm		IC ₅₀ (µg/ml)
Ví dụ 1.1		338,8
Ví dụ 1.2		309,1
Ví dụ 1.3		288,4
Ví dụ 1.4		218,2
Ví dụ 3.1 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Cinnamomi Cortex</i>)	10:1	321,2
	5:1	308,3
	1:5	307,9
Ví dụ 3.2 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Prunella Spica</i>)	10:1	319,7
	3:1	296,5
	1:3	275,8
Ví dụ 3.3 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	10:1	305,7
	5:1	284,8
	1:5	258,8
Ví dụ 3.4 (<i>Cinnamomi Cortex</i> : <i>Prunella Spica</i>)	10:1	327,4
	4:1	300,1
	1:5	272,5
Ví dụ 3.5 (<i>Cinnamomi Cortex</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	7:1	273,6
	2:1	244,8
	1:7	218,1
Ví dụ 3.6 (<i>Prunella Spica</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	10:1	263,7
	3:1	224,3
	1:10	201,8
Ví dụ 3.7 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Cinnamomi Cortex</i> : <i>Prunella Spica</i>)	10:1:1	314,9
	2:2:3	305,4
	1:1:5	289,7
Ví dụ 3.8 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Cinnamomi Cortex</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	10:1:1	302,4
	2:5:2	283,1
	1:1:5	232,8

Ví dụ 3.9 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Prunella Spica</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	7:1:1	289,3
	3:2:4	258,9
	1:1:5	216,4
Ví dụ 3.10 (<i>Cinnamomi Cortex</i> : <i>Prunella Spica</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	7:1:1	274,9
	3:2:5	219,4
	1:1:7	204,3
Ví dụ 3.11 (<i>Crataegi Fructus</i> : <i>Cinnamomi Cortex</i> : <i>Prunella Spica</i> : <i>Equiseti Herba</i>)	5:1:1:1	301,9
	3:2:2:2	270,1
	1:1:1:5	218,9

Như có thể được thấy trong Bảng 7, cũng như 4 chất chiết từ một thảo dược thu được trong các Ví dụ 1, 11 hỗn hợp chất chiết từ các thảo dược với các thành phần khác nhau thu được trong Ví dụ 3 đều có hiệu quả vượt trội trong việc ức chế sự sinh trưởng của tế bào màng nang cuộn mao mạch thận. Đặc biệt, tỷ lệ trộn theo thành phần đạt hoạt tính tốt được xác định, và *Prunella Spica*, *Equiseti Herba*, hoặc thuốc kết hợp chứa *Prunella Spica* và *Equiseti Herba* có hiệu quả tổng thể tốt trong việc ức chế sự sinh trưởng của tế bào màng nang cuộn mao mạch thận.

Ví dụ 9: Xác định phân đoạn có hoạt tính và thành phần hoạt tính của chất chiết thảo mộc

Để nhận biết thành phần và phân đoạn hoạt tính của các chất chiết từ thảo dược, việc chia thành các phần nhỏ dựa vào hoạt tính được thực hiện bằng cách thử nghiệm ức chế chứng phù tại ở chuột.

Mỗi chất chiết từ thảo dược thu được trong Ví dụ 1 được tạo huyền phù bằng nước cất với thể tích bằng từ 2 đến 10 lần khối lượng chất chiết, sau đó đem cất phân đoạn dung môi tiên lập từ 2 đến 3 lần bằng cách sử dụng metylen clorua (MC), etylen axetat (EA) và butanol (BuOH) với thể tích (theo thể tích) gấp từ 2 đến 5 lần chất chiết được tạo huyền phù. Vì thế, phân đoạn có hoạt tính thu được được phân tích mẫu bằng HPLC. Để nhận biết các thành phần hoạt tính của phân đoạn này, phân đoạn MC của chất chiết thu được trong Ví dụ 1.2 được phân tích bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng hỗn hợp dung môi hexan và EA (10:1 đến 1:10, theo thể tích) và sắc ký cột Sephadex LH-20 sử dụng MeOH làm dung môi để tách hợp chất 1 và 2, phân đoạn BuOH của chất chiết thu được trong Ví dụ 1.3 được phân tích bằng sắc ký cột C18 sử dụng MeOH 60% làm dung môi và sắc ký cột Sephadex LH-20 sử dụng hỗn hợp dung môi gồm CH₂Cl₂ và MeOH (có tỷ lệ theo thể tích bằng 1:1) để tách hợp chất 3. Hợp chất sau khi tách được nhận biết bằng cách phân tích sử dụng thiết bị với quang phổ kế LC-MS/MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, UV, v.v. và tham khảo các tài liệu. Kết quả được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8

Phân loại	Thành phần
Hợp chất 1	Axit xinamic
Hợp chất 2	Coumarin
Hợp chất 3	Axit rosmarinic

Số liệu nhận biết như sau:

Axit xinamic: Bột màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 7,79 (1H, d, $J=16$ Hz, H-7), 7,56 (2H, m, H-2, 6), 7,40 (3H, m, H-3, 4, 5), 6,45 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3): δ 173,2 (C-9), 147,6 (C-7), 134,4 (C-1), 131,2 (C-4), 129,4 (C-3, 5), 128,8 (C-2, 6), 117,7 (C-8)

Coumarin: Bột màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD): δ 7,89 (1H, d, $J=9,6$ Hz, H-4), 7,51-7,58 (2H, m, H-5, 7), 7,25-7,31 (2H, m, H-6, 8), 6,46 (1H, d, $J=9,6$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CD_3OD): δ 162,7 (C-2), 155,2 (C-9), 145,6 (C-4), 133,1 (C-7), 129,4 (C-5), 125,8 (C-6), 120,3 (C-10), 117,5 (C-3), 117,1 (C-8)

Axit rosmarinic: Bột vô định hình màu hơi vàng.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): δ 7,46 (1H, d, $J=16,0$ Hz, H-7), 7,05 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-2), 7,00 (1H, dd, $J=8,0, 2,0$ Hz, H-6), 6,76 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H-5), 6,67 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-2'), 6,63 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H-5'), 6,52 (1H, dd, $J=8,0, 2,0$ Hz, H-6'), 6,23 (1H, d, $J=16,0$ Hz, H-8), 5,02 (1H, m, H-8'), 2,99 (1H, m, H-7'b), 2,90 (1H, m, H-7'a); $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, DMSO): δ 170,7 (C-9'), 165,8 (C-9), 148,5 (C-4), 145,8 (C-7), 145,5 (C-3), 144,8 (C-3'), 143,9 (C-4'), 127,2 (C-1'), 125,3 (C-1), 121,5 (C-6), 120,0 (C-6'), 116,6 (C-2'), 115,7 (C-5'), 115,3 (C-5), 114,8 (C-8), 113,2 (C-2), 72,7 (C-8'), 36,1 (C-7')

Để đánh giá tác dụng ức chế bệnh phù của các phân đoạn MC, EA và BuOH từ các chất chiết từ thảo dược thu được trong các Ví dụ 1.2 và 1.3 và ba hợp chất đã được xác định ở trên, thử nghiệm hoạt tính được tiến hành bằng phương pháp của Hee Kee Kim et al. [Hee Kee Kim et al., *Arch. Pharm. Res.* 16(1), 1993, 18-24].

Nhóm đối chứng dương được nhận Indometaxin (được mua từ Sigma) với liều lượng bằng 20mg/kg. Nhóm thử nghiệm được nhận 200mg/kg phân đoạn MC, EA hoặc BuOH, hoặc 20mg/kg hợp chất 1, 2 hoặc 3.

Sau một giờ được sử dụng qua đường miệng, dầu khổ sâm 2,5% (được mua từ Sigma) được tiêm vào một bên tai của các con chuột ICR đực (7 tuần tuổi, 28-32g, Orient) để gây viêm cấp tính. Trong 4 giờ, chỗ sưng phồng trên tai được đo độ dày. Kết quả được thể hiện trong Bảng 9.

Bảng 9

Phân loại		Liều lượng (mg/kg)	% ức chế
Ví dụ 1.2	Phân đoạn MC	200	31,54
	Phân đoạn EA	200	2,70
	Phân đoạn BuOH	200	4,64
Ví dụ 1.3	Phân đoạn MC	200	3,68
	Phân đoạn EA	200	30,64
	Phân đoạn BuOH	200	40,85
Hợp chất 1		20	42,40
Hợp chất 2		20	38,79
Hợp chất 3		20	28,90
Nhóm đối chứng dương		20	38,81

Như có thể được thấy trong Bảng 9, nhóm đối chứng dương thể hiện hiệu quả ức chế chứng viêm cấp tính gây ra bởi dầu khổ sâm là 39%, và phân đoạn MC thu được trong Ví dụ 1.2 và các phân đoạn EA và BuOH thu được trong Ví dụ 1.3 có tác dụng ức chế đáng kể là 30%. Ba hợp chất này cũng có hiệu quả ức chế chứng viêm cấp tính. Hợp chất 1 và 2, ví dụ, có hoạt tính ức chế cao lần lượt là 42% và 39%.

Ví dụ thử nghiệm 10: Thử nghiệm đánh giá hiệu quả điều trị bệnh trên mô hình viêm thận gây ra bởi gentamixin

Để đánh giá hiệu quả điều trị bệnh viêm thận của ba hợp chất thu được trong Ví dụ thử nghiệm 9, các quy trình được tiến hành theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 1 để xác định hàm lượng B.U.N và creatinin ở trường hợp viêm thận do gentamixin. Chất phản ứng là các hợp chất 1, 2 và 3, là các phân đoạn hoạt tính từ chất chiết từ thảo dược *Cinnamomi Cortex* và *Prunella Spica*. Kết quả được thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 10

Phân loại	Liều lượng (mg/kg)	B.U.N. (mg/dl)	Creatinin (mg/dl)
Hợp chất 1	20	47,7 ± 5,7***	0,81 ± 0,07*
Hợp chất 2	20	50,9 ± 4,7**	0,88 ± 0,06

Hợp chất 3	20	$63,1 \pm 7,2$	$0,97 \pm 0,06$
Nhóm đối chứng âm	-	$83,0 \pm 5,1$	$1,32 \pm 0,12$
Nhóm bình thường	-	$12,4 \pm 0,6$	$0,45 \pm 0,01$
* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 (so với nhóm đối chứng âm)			

Như được thể hiện trên Bảng 10, trong số các thành phần của hỗn hợp các chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* và chất chiết từ *Prunella Spica*, axit xinamic và coumarin có tác dụng làm giảm hàm lượng nitơ ure máu (B.U.N.) đối với mô hình viêm thận gây ra bởi gentamixin có ý nghĩa về mặt thống kê so với nhóm đối chứng âm. Axit xinamic cũng làm giảm hàm lượng creatinin và có hoạt tính cải thiện các triệu chứng viêm thận cao nhất.

Dưới đây là các chế phẩm được lấy làm ví dụ bao gồm hợp phần chứa chất chiết theo sáng chế, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Chế phẩm ví dụ 1: Bào chế chế phẩm dạng bột

Các chất chiết thu được trong các Ví dụ từ 1 đến 3	80 mg
Lactoza	100 mg
Bột talc	10 mg

Các thành phần trên được trộn với nhau và được đóng gói trong túi kín khí

Chế phẩm ví dụ 2: Bào chế chế phẩm dạng viên nén

Các chất chiết thu được trong các Ví dụ từ 1 đến 3	100mg
Tinh bột ngô	100mg
Lactoza	100mg
Magie stearat	2mg

Các thành phần trên được trộn với nhau và được tạo thành viên nén theo một phương pháp bào chế viên nén thông thường.

Chế phẩm ví dụ 3: Bào chế chế phẩm dạng viên nang

Các chất chiết thu được trong các Ví dụ từ 1 đến 3	100 mg
Xenluloza dạng tinh thể	3 mg

Lactoza	14,8 mg
Magie stearat	0,2 mg

Các thành phần trên được trộn với nhau và được đóng gói trong viên nang gelatin theo một phương pháp bào chế viên nang thông thường.

Chế phẩm ví dụ 4: Bào chế chế phẩm tiêm

Các chất chiết thu được trong các ví dụ từ 1 đến 3	10mg
Manitol	180mg
Nước cất vô trùng để tiêm	2974mg
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	100mg

Các thành phần được sử dụng trong hàm lượng trên trong mỗi ống (2ml) theo một phương pháp bào chế chế phẩm tiêm thông thường.

Chế phẩm ví dụ 5: Bào chế chế phẩm dạng dung dịch

Các chất chiết thu được trong các Ví dụ từ 1 đến 3	20 mg
Xi rô ngô chứa hàm lượng fructoza cao	10 g
Manitol	5 g
Nước tinh khiết	lượng thích hợp

Theo một phương pháp bào chế chế phẩm dạng dung dịch thông thường, các thành phần riêng biệt được hòa tan trong nước tinh khiết, sau đó bổ sung hương chanh, rồi trộn với nhau. Một lượng nước tinh khiết thích hợp được thêm vào hỗn hợp để tạo thành dung dịch có tổng thể tích là 100 ml. Dung dịch được đổ vào chai tối màu và được khử trùng để bào chế dung dịch.

Chế phẩm ví dụ 6: Bào chế thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe

Các chất chiết thu được trong các ví dụ từ 1 đến 3	1000 mg
Vitamin A axetat	70 μg
Vitamin E	1,0 mg
Vitamin B1	0,13 mg
Vitamin B2	0,15 mg

Vitamin B6	0,5 mg
Vitamin B12	0,2 mg
Vitamin C	10 mg
Biotin	10 µg
Amit của axit nicotinic	1,7 mg
Axit folic	50 µg
Axit canxi pantothenic	0,5 mg
Hỗn hợp chất khoáng	lượng thích hợp
Sắt sulfat	1,75 mg
Kẽm oxit	0,82 mg
Magie cacbonat	25,3 mg
Kali phosphat monobazơ	15 mg
Canxi phosphat đibazơ	55 mg
Kali xitrat	90 mg
Canxi cacbonat	100 mg
Magie clorua	24,8 mg

Hợp phần gồm vitamin-hỗn hợp khoáng như được nêu trong bản mô tả này được điều chế bằng cách trộn các thành phần tương đối thích hợp cho thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe ở tỷ lệ trộn theo ví dụ ưu tiên, nhưng tỷ lệ trộn của các thành phần có thể được thay đổi mà không bị giới hạn. Theo phương pháp sản xuất thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe thông thường, trong đó tất cả các thành phần được trộn với nhau và tạo thành dạng hạt, có thể được sử dụng để sản xuất thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe bằng phương pháp thông thường.

Chế phẩm ví dụ 7: Sản phẩm thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe dưới dạng đồ uống

Các chất chiết thu được trong các ví dụ từ 1 đến 3	1000 mg
Axit xitric	1000 mg

Oligosacarit	100 mg
Phần cô nước ép quả mơ	2 g
Taurin	1 g
Tổng thể tích với nước tinh khiết	900 ml

Theo phương pháp sản xuất đồ uống chức năng có lợi cho sức khỏe thông thường, tất cả các thành phần được trộn với nhau và được gia nhiệt trong khi khuấy ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 1 giờ. Vì thế, dung dịch thu được được lọc và được rót vào bình chứa dung tích 2l khử trùng, được khử trùng kín, được giữ trong tủ lạnh và được sử dụng để sản xuất đồ uống chức năng có lợi cho sức khỏe theo sáng chế.

Hợp phần như được nêu trong bản mô tả này được sản xuất bằng cách trộn các thành phần tương đối thích hợp cho đồ uống ở tỷ lệ trộn được nêu trong ví dụ ưu tiên, nhưng tỷ lệ trộn của các thành phần này có thể được thay đổi phù hợp với vùng địa lý và dân tộc, như đối tượng tiêu dùng, quốc gia, cách sử dụng, v.v..

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp phần để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh viêm thận, khác biệt ở chỗ chứa thành phần hoạt tính là ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm: hỗn hợp của chất chiết từ *Prunella Spica* (Hạ khô thảo) và chất chiết từ *Equiseti Herba* (Mộc tặc) với tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 3:1 đến 1:10; hỗn hợp bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus* (Sơn tra), chất chiết từ *Cinnamomi Cortex* (Quế nhục), và chất chiết từ *Equiseti Herba* với tỷ lệ khối lượng là 2:5:2 hoặc 1:1:5; và hỗn hợp bao gồm chất chiết từ *Crataegi Fructus*, chất chiết từ *Cinnamomi Cortex*, chất chiết từ *Prunella Spica*, và chất chiết từ *Equiseti Herba* với tỷ lệ khối lượng là 3:2:2:2, trong đó chất chiết này được tạo ra bằng cách chiết bằng rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon, dung dịch rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon trong nước hoặc hỗn hợp của nước, rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon, và dung dịch rượu có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon trong nước.
2. Hợp phần theo điểm 1, trong đó nồng độ của dung dịch rượu trong nước nằm trong khoảng từ 10% đến 90% thể tích.
3. Hợp phần theo điểm 1 hoặc 2, trong đó bệnh viêm thận được chọn từ nhóm bao gồm viêm cuộn tiểu cầu thận, viêm thận bể thận, viêm kẽ thận, viêm thận lupus, bệnh thận đái tháo đường, hội chứng protein niệu, chứng teo ống thận, chứng xơ cứng tiểu cầu thận, và suy thận.
4. Hợp phần theo điểm 1 hoặc 2, trong đó hợp phần này được dùng với liều hàng ngày nằm trong khoảng từ 0,7 đến 500 mg/kg tính theo lượng thành phần hoạt tính.
5. Thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe để ngăn ngừa và cải thiện bệnh viêm thận chứa hợp phần theo điểm 1 hoặc 2.

FIG. 1

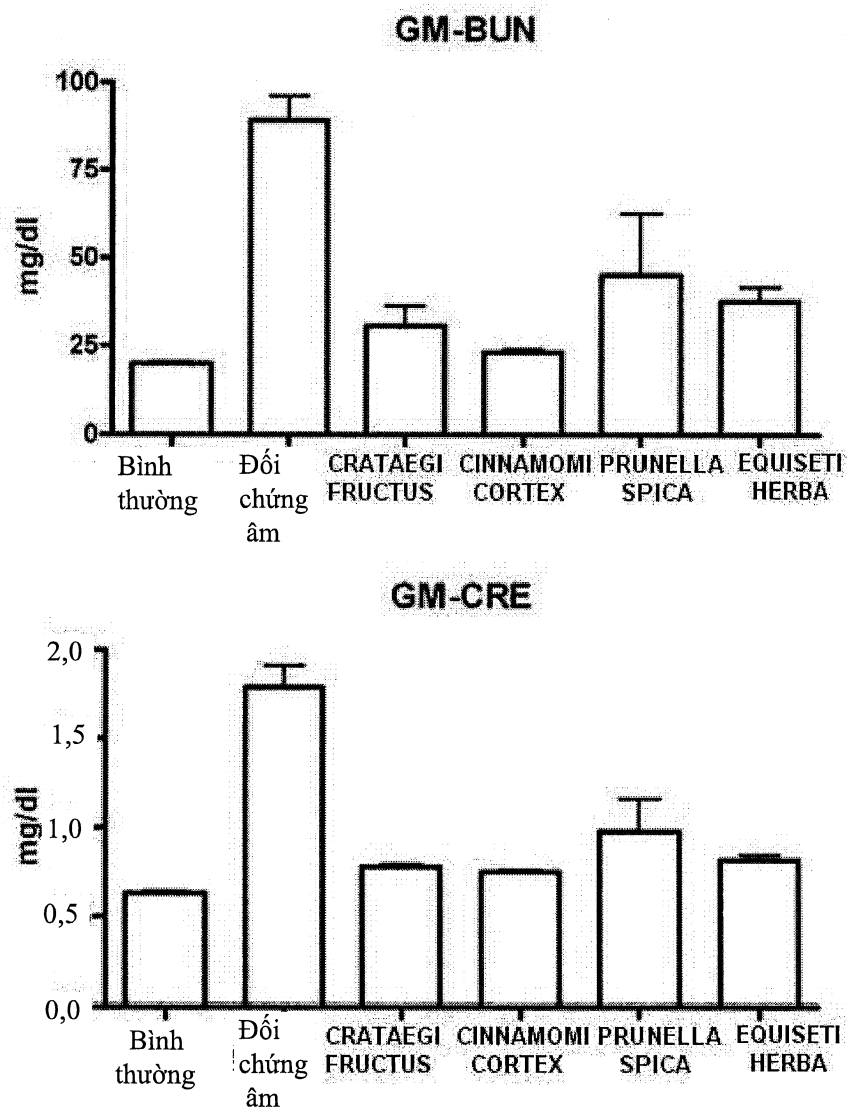
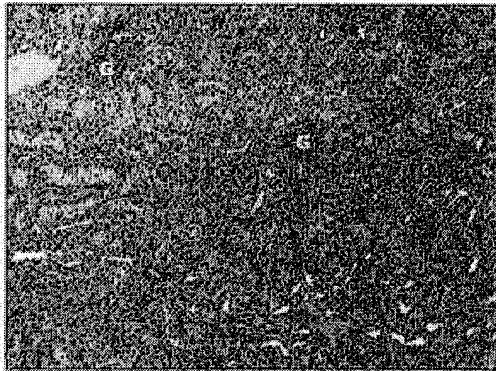
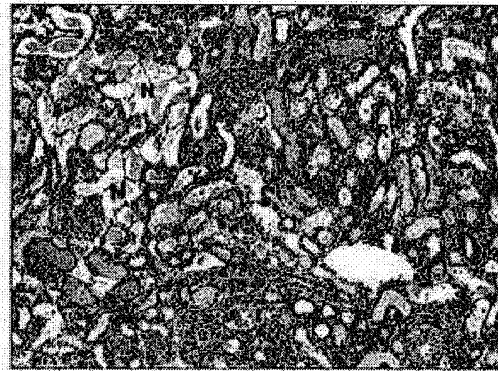


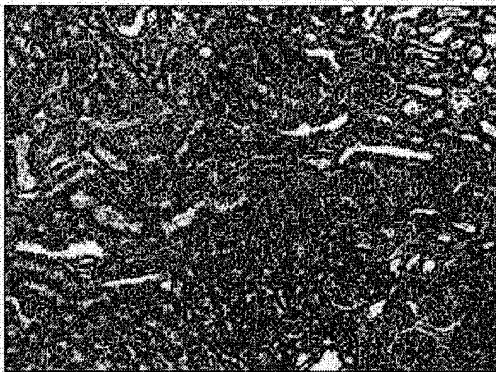
FIG. 2



(a) BÌNH THƯỜNG



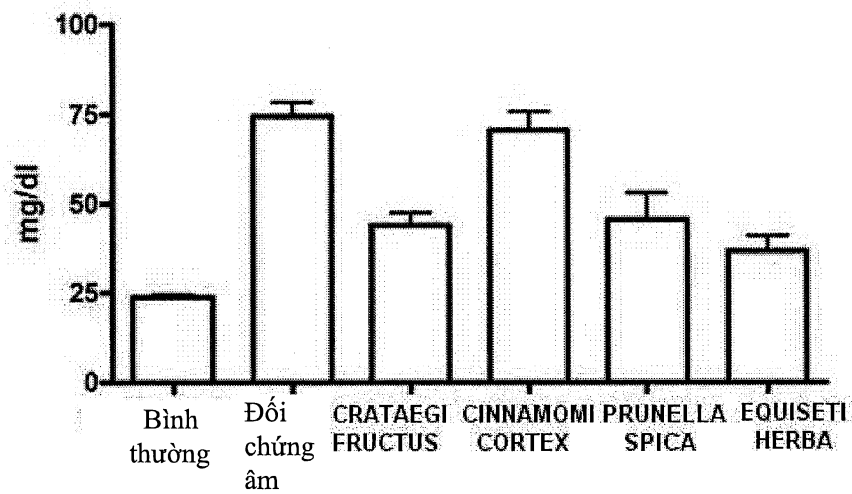
(b) ĐÔI CHỨNG ÂM



(c) THỬ NGHIỆM

FIG. 3

CDDP-BUN



CDDP-CRE

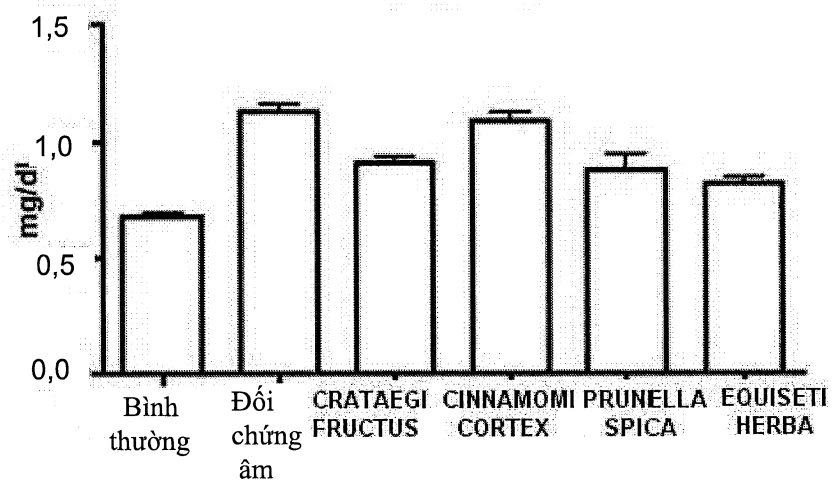


FIG. 4

