



(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) 
2-0002089

(51)⁷ **A61K 36/00**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00169

(22) 11.03.2014

(67) 1-2014-00774

(45) 26.08.2019 377

(43) 25.08.2014 317

(76) 1. **TRẦN KIM QUI (VN)**

55D Trần Phú, phường 4, quận 5, thành phố Hồ Chí Minh

2. **TRẦN LÊ QUÂN (VN)**

55D Trần Phú, phường 4, quận 5, thành phố Hồ Chí Minh

3. **TRẦN LÊ QUAN (VN)**

55D Trần Phú, phường 4, quận 5, thành phố Hồ Chí Minh

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyển (INVENCO.,LTD)

(54) **QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT CHIẾT PHẨM CHỨA LIMONOIT TỪ CÀNH VÀ LÁ
CÂY SẦU ĐẬU (AZADIRACHTA INDICA)**

(57) Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình chiết xuất chiết phẩm chứa limonoit từ cành và lá cây sầu đâu (*Azadirachta indica*) và thực phẩm chức năng chứa chiết phẩm chứa limonoit thu được từ quy trình này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực hóa học, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất chiết phẩm chứa limonoit từ cành và lá cây sầu đâu (*Azadirachta indica*) để sản xuất thực phẩm chức năng.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây sầu đâu có tên khoa học là *Azadirachta indica*, thuộc họ Meliaceae. Cây sầu đâu còn có tên gọi khác là cây sầu đông, nim, xoan sầu đâu, xoan ăn gỏi, xoan trắng, xoan chịu hạn, xoan Ấn Độ. Cây sầu đâu là cây to, thân gỗ cao từ 8-15m, lá kép lông chim lẻ, cụm hoa mọc ở lá thành xim phân đôi, hoa có màu trắng hoặc tím nhạt. Thành phần hóa học có trong cây sầu đâu chủ yếu là nhóm hợp chất isoprenoit (ví dụ, protolimonoit, limonoit, v.v.) và non-isoprenoit. Trước đây, lá cây sầu đâu được người Ấn Độ dùng làm thuốc hạ đường huyết, chống viêm, chống ung thư, kháng khuẩn, kháng nấm và điều trị sốt rét.

Trên thế giới đã có những nghiên cứu về việc chiết xuất và phân lập hợp chất từ cây sầu đâu bằng cách sử dụng dung môi metanol, ví dụ, xem tài liệu “Mohammad A. Hossain et al., Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of Omani neem, Journal of Taibah University for Science 7 (2013) 181-188”.

Ở Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu về thành phần hóa học của cây sầu đâu bằng cách sử dụng dung môi metanol để chiết xuất và sắc ký để phân lập hợp chất từ lá cây neem, ví dụ, xem “Nguyễn Thị Ý Nhi, Nghiên cứu thành phần limonoid của lá cây neem *Azadirachta indica* A. Juss trồng ở Ninh Thuận, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 2012”. Ngoài ra, ở Việt Nam cũng đã có một số đơn vị trong nước đã dùng cành và lá cây sầu đâu

(*Azadirachta indica*) nghiền nhuyễn, phơi khô và đóng gói làm trà bán ngoài thị trường.

Tuy nhiên, ở Việt Nam và trên thế giới chưa có công trình nghiên cứu nào đề cập đến việc chiết xuất ra chiết phẩm chứa limonoit từ cành và lá cây sấu đầu bằng cách dùng dung môi etanol và chiết ở nhiệt độ 50°C để thu được chiết phẩm có chứa hàm lượng limonoit cao.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để đạt được mục đích nêu trên, theo một phương án, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình chiết xuất chiết phẩm chứa limonoit từ cành và lá cây sấu đầu (*Azadirachta indica*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- a) chuẩn bị nguyên liệu chiết bằng cách rửa sạch cành và lá cây sấu đầu (*Azadirachta indica*), để ráo nước và phơi khô đến độ ẩm khoảng 15%, sau đó đem sấy ở nhiệt độ thấp hơn 50°C cho đến khi trọng lượng không đổi, tiếp theo cắt nhỏ thành từng mảnh $\leq 5\text{mm}$ bằng máy cắt và nghiền thu được bột mịn;
- b) chiết chiết phẩm chứa limonoit bằng cách trộn bột thu được ở bước a) với etanol theo tỷ lệ khối lượng bột/etanol là 1/3 trong bồn chiết có hai lớp, chiết ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ, sau đó ly tâm bằng máy ly tâm để tách dung dịch chiết, chưng cất dung dịch chiết trong bình chưng cất áp suất thấp có hai lớp dưới áp suất $\leq 50\text{mmHg}$ và nhiệt độ $\leq 50^\circ\text{C}$ để tách etanol thu chiết phẩm chứa limonoit thô;
- c) tinh chế chiết phẩm chứa limonoit bằng cách cho chiết phẩm chứa limonoit thô thu được ở bước b) vào bồn tinh chế, tiếp theo bổ sung nước và etyl axetat theo tỷ lệ khối lượng chiết phẩm chứa limonoit thô/nước/etyl axetat là 1/2/2, sau đó khuấy trộn với tốc độ 100 vòng/phút, đun đến nhiệt độ 45°C trong thời gian 90 phút, tiếp theo đưa toàn bộ dung dịch vào bình lắng để tách lớp, thu hồi lớp trên có chứa hoạt chất limonoit và đuổi dung môi etyl axetat thu chiết phẩm chứa limonoit.

Theo một phương án khác, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nêu trên còn bao gồm thêm bước phối trộn chiết phẩm chứa limonoit thu được ở bước c) với sesamin và tinh bột hòa tan theo tỷ lệ khối lượng chiết phẩm chứa limonoit /sesamin/tinh bột hòa tan là 46/4/50 thu được thực phẩm chức năng dạng viên nén có tác dụng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp và *Vibrio cholerae*.

Theo một phương án khác nữa, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nêu trên còn bao gồm thêm bước phối trộn chiết phẩm chứa limonoit thu được ở bước c) với dầu sàu đầu, sesamin và etanol theo tỷ lệ khối lượng chiết phẩm chứa limonoit/dầu sàu đầu/sesamin/etanol là 31/20/4/45 thu được thực phẩm chức năng dạng phun sương có tác dụng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn *Candida albicans*, *Trichomonas* sp và *Giardinella* sp.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Sơ đồ quy trình chiết xuất chiết phẩm chứa limonoit từ cành và lá cây sàu đầu (*Azadirachta indica*).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết giải pháp hữu ích để làm rõ các phương án thực hiện chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Cây sàu đầu có tên khoa học là *Azadirachta indica*, thuộc họ Meliaceae. Cây sàu đầu còn có tên gọi khác là cây sàu đông, nim, xoan sàu đầu, xoan ăn gỏi, xoan trắng, xoan chịu hạn, xoan Ấn Độ. Cây sàu đầu là cây to, thân gỗ cao từ 8-15m, lá kép lông chim lẻ, cụm hoa mọc ở lá thành xim phân đôi, hoa có màu trắng hoặc tím nhạt. Cây sàu đầu có tác dụng giải nhiệt, trị sưng đau, chống viêm, trị phong thấp.

Theo một khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất chiết phẩm chứa limonoit từ cành và lá cây sầu đâu (*Azadirachta indica*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Chuẩn bị nguyên liệu

Lựa chọn cành và lá cây sầu đâu (*Azadirachta indica*) còn tươi, nguyên vẹn, không bị sâu bệnh, không bị héo úa, sau đó đem rửa sạch, để ráo nước và phơi khô đến độ ẩm khoảng 15%. Tiếp theo đem sấy ở nhiệt độ thấp hơn 50°C cho đến khi trọng lượng không đổi, tiếp đó đem đi cắt nhỏ thành từng mảnh vụn $\leq 5\text{mm}$ bằng máy cắt quay với vận tốc quay 1.500 vòng/phút có cấu tạo như máy nghiền búa có đường kính 0,6m bên trong có 8 dao cắt loại cánh động hình chữ nhật dài 25cm bằng thép không rỉ, bén nhọn gắn so le trên một tang trống.

Tiếp đến, các mảnh vụn đã cắt được đem nghiền nhỏ thành bột mịn bằng hệ thống máy nghiền gồm máy nghiền búa và máy nghiền răng đặt nối liền nhau. Phía trên là máy nghiền búa có đường kính 40cm, bên trong có nhiều cánh búa hình chữ nhật dày 4mm làm bằng thép không rỉ; trên bề mặt phía trong của vỏ máy có bố trí nhiều chốt xen kẽ nhau làm bằng thép không rỉ có tiết diện tròn, kích thước 10x10mm; phía dưới là máy nghiền răng có đường kính 60cm, gồm có một mặt quay và một mặt đứng yên; mặt đứng yên có 6 vòng răng, mặt quay có 5 vòng răng, những vòng răng này được bố trí trên các vòng tròn có đường kính 12- 45cm, răng giữa các vòng được bố trí xen kẽ nhau; phễu nhập liệu của máy nghiền răng được nối thông với cửa thoát bột của máy nghiền búa. Phía trong toàn bộ thiết bị được bọc một lớp thép không rỉ dày 1mm.

Hệ thống máy nghiền mịn được quay với vận tốc 1500 vòng/phút. Trước hết các mảnh vụn cành lá sầu đâu đi vào máy nghiền búa; dưới tác dụng của lực va đập của các cánh búa, các mảnh vụn to nhỏ ra, sau đó đi vào máy nghiền răng. Ở máy nghiền răng, bột đi vào trung tâm của máy, dưới tác dụng của lực ly tâm, bột chuyển động từ trong ra ngoài. Trên đường đi, bột bị va đập do nhiều vòng răng và khi thoát ra ngoài, bột đã được nghiền mịn đến cỡ 1-2mm.

b) Chiết xuất chiết phẩm chứa limonoit

Cành và lá cây sấu đầu (*Azadirachta indica*) sau khi nghiền thành bột mịn được trộn với etanol theo tỷ lệ khối lượng bột/etanol là 1/3, sau đó cho vào bồn chiết hai lớp, khuấy trong vòng 24 giờ, giữa 2 lớp có chứa nước và được đun nóng đến khoảng 50°C bằng một thanh điện trở ($V = 700l$; $H \times D = 0,9m \times 1m$) và cho máy khuấy hoạt động 100 vòng/phút trong thời gian 24 giờ. Sau đó dùng máy ly tâm để tách dung dịch chiết rồi cho vào chưng cất áp suất thấp trong bình chưng cất có 2 lớp (lớp trong bằng inox dày 2,5mm, lớp ngoài bằng sắt 4mm). Dung dịch trích qua máy lọc ly tâm được đưa vào bồn chưng cất áp suất thấp để chưng cất thu hồi etanol dưới áp suất $\leq 50mmHg$ ở nhiệt độ $\leq 50^\circ C$. Etanol bốc hơi qua ống sinh hàn được hóa lỏng và đưa vào bình hứng. Cặn còn lại trong nồi chưng cất là chiết phẩm chứa limonoit thô.

c) Tinh chế chiết phẩm chứa limonoit thô

Cho chiết phẩm chứa limonoit thô vào bồn tinh chế, tiếp theo cho nước và etyl axetat (EtOAc) vào theo tỷ lệ khối lượng chiết phẩm chứa limonoit thô/nước/etyl axetat là 1/2/2, sau đó khởi động máy khuấy trộn ở tốc độ 100 vòng/phút, mở công tắc đun đến $t^\circ = 45^\circ C$; đậy nắp bồn khuấy và khuấy trong thời gian 90 phút. Sau thời gian khuấy trộn, đưa toàn bộ dung dịch vào bình để tách lớp rồi thu hồi lớp trên có chứa chiết phẩm limonoit tan trong etyl axetat.

Chưng cất thu hồi etyl axetat thu được chiết phẩm chứa limonoit (NLL) có các chỉ tiêu kỹ thuật như sau:

TT	Tên chỉ tiêu	Phương pháp thử	Kết quả
1	Tỷ trọng d_4^{20}	TCVN 8444:2010	1,124 – 1,138
2	Hàm lượng limonoit (NLL) %	Salkowski, UV ($\lambda = 577mm$)	6,53 – 6,68
3	Hàm lượng Sulfur S trong chiết phẩm %	10 TCN 363:99	1,54 – 1,72
4	Độ ẩm %	10TCN 302-97	11,5-11,8

Với chiết phẩm chứa limonoit có các chỉ tiêu kỹ thuật như trên, có thể sử dụng để sản xuất thực phẩm chức năng.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nêu trên còn bao gồm thêm bước phối trộn chiết phẩm chứa limonoit thu được ở bước c) với sesamin và tinh bột hòa tan theo tỷ lệ khối lượng chiết phẩm chứa limonoit /sesamin/tinh bột hòa tan là 46/4/50 thu được thực phẩm chức năng dạng viên nén có tác dụng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp và *Vibrio cholerae*.

Thực phẩm chức năng thu được từ quy trình này ở dạng viên nén chứa các thành phần sau (tính theo % khối lượng):

Chiết phẩm chứa limonoit :	46,0
Sesamin :	4,0
Tinh bột hòa tan :	50,0

Sesamin được sử dụng là một chất rắn, điểm nóng chảy 125°C được điều chế bằng cách chưng cất lôi cuốn hơi nước dầu mè ở áp suất 3kg/cm². Sesamin được hơi nước lôi cuốn qua bình hứng sau đó được làm lạnh để kết tinh lại trong nước và lọc để thu chất rắn sesamin. Sesamin được dùng rất rộng rãi để làm bền các loại thuốc có nguồn gốc hợp chất tự nhiên như limonoit. Tinh bột hòa tan là một loại tá dược dùng rất phổ biến cho các loại thuốc viên nén. Thủy phân nhẹ tinh bột bắp với enzym α -amylaza trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng cho ra tinh bột hòa tan có DE=35-40 (Dextrose Equivalent) sau đó kết tinh lại trong etanol loãng 40% cho ra tinh bột hòa tan đạt tiêu chuẩn tinh bột tá dược của Bộ Y Tế số 52TCN 317-87.

Thực phẩm chức năng ở dạng viên nén này được bào chế bằng cách dùng máy khuấy trộn, phối trộn chiết phẩm chứa limonoit, sesamin và tinh bột hòa tan theo tỷ lệ khối lượng chiết phẩm chứa limonoit/sesamin/tinh bột hòa tan là

46/4/50, sau đó dùng máy ép viên để ép thành viên nén, mỗi viên có trọng lượng 300mg và chứa 9mg limonoit dùng để uống.

Viên nén thu được này có tính kháng khuẩn mạnh đối với các chủng vi khuẩn thường gây bệnh cho người và gia súc gia cầm như là: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Vibrio cholerae* và các nấm bệnh như *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Candida*, *Trichophyton*, *Microsporum* và *Epidermophyton*.

Viên nén này được dùng như sau:

Người lớn: Mỗi ngày uống 2 lần, mỗi lần 1 viên

Trẻ em: Mỗi ngày uống 2 lần, mỗi lần ½ viên

Uống liên tục mỗi đợt trong 1 tháng.

Theo khía cạnh thứ ba, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nêu trên còn bao gồm thêm bước phối trộn chiết phẩm chứa limonoit thu được ở bước c) với dầu sàu đầu, sesamin và etanol theo tỷ lệ khối lượng chiết phẩm chứa limonoit/dầu sàu đầu/sesamin/etanol là 31/20/4/45 thu được thực phẩm chức năng dạng phun sương có tác dụng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn *Candida albicans*, *Trichomonas sp* và *Giardinella sp*.

Thực phẩm chức năng thu được từ quy trình này ở dạng chế phẩm phun sương chứa các thành phần sau (tính theo % khối lượng):

Chiết phẩm chứa limonoit:	31
Dầu sàu đầu:	20
Sesamin:	4
Etanol:	45

Thực phẩm chức năng ở dạng chế phẩm phun sương này được bào chế bằng cách phối trộn chiết phẩm chứa limonoit với dầu sàu đầu, sesamin và etanol theo tỷ lệ khối lượng chiết phẩm chứa limonoit/dầu sàu

đầu/sesamin/etanol là 31/20/4/45 bằng máy trộn chất lỏng, khuấy trộn với vận tốc quay 300 vòng/phút trong 1 giờ. Thực phẩm chức năng là dung dịch chứa 2% limonoit dùng để phun trực tiếp vào các nơi bị nhiễm bệnh, các vết thương ngoài da, hoặc các ổ dịch bệnh. Trong chế phẩm phun sương theo giải pháp hữu ích, dầu sần đầu được sử dụng là một loại dầu béo thực vật được trích ra bằng cách ép dầu hạt sần đầu với lực ép 150kg/cm^2 , hiệu suất ép dầu 18,2% (w/w). Dầu sần đầu thu được có các chỉ số như sau:

STT	Các chỉ số	ĐVT	Kết quả	Tiêu chuẩn Lâm nghiệp Ấn Độ 4765:1975
1	Tỷ trọng d_{20}^{20}	-	0,9098	0,9087-0,9189
2	Chiết xuất n_D^{20}	-	1,4643	1,4617-1,4647
3	Thành phần không xà phòng hóa UM	%	1,2	0,8-2,4
4	Hàm lượng limonoit	%	0,19	$\geq 0,1$

Chế phẩm phun sương theo giải pháp hữu ích được dùng để điều trị các bệnh do vi khuẩn và nấm bệnh gây ra ở ngoài da như bệnh phong, ghẻ ngứa, mụn nhọt, các vết sần viêm nhiễm gây lở loét. Chế phẩm này có tính kháng khuẩn mạnh diệt được các ổ bệnh truyền nhiễm như bệnh sốt xuất huyết, bệnh thủy đậu, dịch bệnh gia súc gia cầm và các loại ký sinh trùng hút máu.

Chế phẩm phun sương này được dùng bằng cách phun thẳng vào vết thương do vi khuẩn gây ra, mỗi ngày 3 lần đến khi vết thương lành hẳn.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Quy trình chiết xuất chiết phẩm chứa limonoit

1.1 Chiết xuất chiết phẩm chứa limonoit

Cành và lá cây sần đầu (*Azadirachta indica*) dùng làm nguyên liệu để chiết xuất chiết phẩm chứa limonoit phải được kiểm tra kỹ chất lượng, hong khô

đến độ ẩm khoảng 15%, cắt nhỏ và nghiền mịn thành bột cỡ 1-2mm, có màu xanh lơ và mùi tỏi nhẹ đặc trưng của lá sầu đâu.

Cân 50kg bột cành lá sầu đâu (*Azadirachta indica*) trộn với 150kg etanol (EtOH) cho vào bồn trích 2 lớp, lớp trong bằng inox dày 2,3mm, lớp ngoài bằng sắt dày 3,5mm có thể tích $V=700\text{l}$ ($H \times D=0,9\text{m} \times 1\text{m}$); giữa 2 lớp có chứa nước, được đun nóng bằng 1 thanh điện trở và có trang bị một máy khuấy đứng. Cho bồn trích hoạt động ở nhiệt độ 50°C với vận tốc khuấy 100 vòng/phút, trong thời gian 24 giờ. Sau đó để nguội, đưa toàn bộ dung dịch trích qua máy ly tâm quay với tốc độ 1500 vòng/phút để tách lấy dung dịch chiết; bã chiết còn lại trong máy ly tâm cân nặng 42kg được dùng để sản xuất phân bón sầu đâu. Dung dịch chiết thu được được đưa vào bồn chưng cất áp suất thấp để chưng cất ở áp suất $p \leq 50\text{mmHg}$ và nhiệt độ dưới 50°C , thu hồi etanol, lượng etanol thu hồi được 135kg, chất cặn còn lại trong bồn chưng cất có màu nâu, mùi tỏi cân được 2,18kg là chiết phẩm chứa limonoit (NLL) thô.

1.2 Tinh chế chiết phẩm chứa limonoit (NLL) thô

Cho 2,18kg chiết phẩm chứa limonoit (NLL) thô vào bồn tinh chế, tiếp theo bổ sung 4,36kg dung môi etyl axetat và 4,36kg nước vào bồn. Mở máy khuấy trộn với tốc độ 100 vòng/phút và đun ấm đến nhiệt độ 45°C trong thời gian 90 phút. Sau đó đưa toàn bộ dung dịch vào bình lóng để tách lớp rồi xả bỏ lớp nước chứa tạp chất phía dưới, thu lấy lớp trên có chứa chiết phẩm limonoit (NLL) tan trong etyl axetat. Chưng cất thu hồi etyl axetat dưới áp suất thấp $p \leq 50\text{mmHg}$, thu được 4,15kg etyl axetat và 1,96kg chiết phẩm chứa limonoit.

Đo hàm lượng limonoit trong chiết phẩm chứa limonoit theo phương pháp so màu Salkowski với máy UV ở $\lambda=577\text{nm}$ và đo hàm lượng sulfua S trong chiết phẩm theo phương pháp 10 TCN 363:99 cho các kết quả như sau:

Hàm lượng limonoit trong chiết phẩm là : 6,60%

Hàm lượng sulfua S trong chiết phẩm là : 1,63%

Ví dụ 2: Sản xuất thực phẩm chức năng ở dạng viên nén (Neemtab) chứa chiết phẩm chứa limonoit

Cho vào máy khuấy trộn 0,92kg chiết phẩm chứa limonoit, 0,08kg sesamin và 1kg tinh bột hòa tan thu được hỗn hợp bột. Cho hỗn hợp này qua máy ép viên thu được viên nén, mỗi viên nén thu được có hàm lượng 300mg và chứa 9mg limonoit dùng để uống.

Ví dụ 3: Sản xuất thực phẩm chức năng dạng chế phẩm phun sương (Neemgel)

Cho vào máy khuấy trộn chất lỏng, trộn thật đều trong 1 giờ 0,62kg chiết phẩm chứa limonoit, 0,4kg dầu sàu đầu, 0,08kg sesamin và 0,9kg etanol. Sau đó đóng chai 100ml có gắn bộ phận phun sương trên miệng chai dùng để phun trực tiếp dung dịch vào nơi cần điều trị.

Ví dụ 4: Thử nghiệm tác dụng của viên nén chứa chiết phẩm chứa limonoit (Neemtab)

4.1. Ví dụ thử nghiệm tác dụng của Neemtab đối với vi khuẩn gây bệnh

- Đối tượng thử nghiệm: 5 chủng vi khuẩn thường gây bệnh nhiều nhất cho người và gia súc gia cầm:

+ *Bacillus subtilis*, Gram (+) gây nhiễm đường huyết, viêm nhiễm màng não, hệ thần kinh, v.v..

+ *Staphylococcus aureus*, Gram (+) gây viêm nhiễm đường hô hấp, viêm phổi, tai, mũi, họng và viêm xoang.

+ *Escherichia coli*, Gram (-) gây viêm nhiễm đường tiêu hóa, đường ruột, viêm loét dạ dày, viêm gan và túi mật.

+ *Salmonella sp*, Gram (-) gây sốt thương hàn, tiêu chảy, ói mửa cấp tính dẫn đến tử vong.

+ *Vibrio cholerae*, Gram (-) gây bệnh dịch tả, tiêu chảy, kiết lị và ngộ độc thực phẩm.

- Phương pháp thử nghiệm: phương pháp kháng sinh đồ

Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường thạch dinh dưỡng (Nutrient agar). Làm kháng sinh đồ theo phương pháp khuếch tán trên thạch bằng cách dùng kẹp vô khuẩn kẹp đĩa giấy đường kính 6mm đã tẩm mẫu dung dịch Neemtab nồng độ 1mg/1ml đặt trên mặt thạch thử nghiệm, ủ ở nhiệt độ 37⁰C trong thời gian 20 giờ đọc kết quả đường kính vòng vô khuẩn tức là vòng không có vi khuẩn mọc chung quanh đĩa giấy có tẩm dung dịch Neemtab. Kết quả đường kính vòng vô khuẩn (mm) của dung dịch huyền phù Neemtab đối với các vi khuẩn thí nghiệm được trình bày trong bảng sau đây:

TT	Chủng vi khuẩn	Dung dịch huyền phù Neemtab nồng độ (%)			
		30	25	20	15
1	<i>Bacillus subtilis</i>	16	16	15	14
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	14	14	13	12
3	<i>Escherichia coli</i>	12	12	11	11
4	<i>Salmonella sp</i>	16	15	15	14
5	<i>Vibrio cholerae</i>	10	9	9	8

Nhận xét: Những kết quả thực nghiệm trên cho thấy các dung dịch huyền phù Neemtab có tính kháng khuẩn mạnh đối với các vi khuẩn thí nghiệm.

4.2 Ví dụ thử nghiệm tác dụng của Neemtab đối với nấm bệnh

- Đối tượng thử nghiệm: 6 chủng nấm bệnh sau đây thường gây bệnh nhiều nhất cho người và gia súc gia cầm.

- + *Trichosporon* (TCS): gây viêm loét đường ruột.
- + *Geotrichum* (GTC): gây viêm loét đường hô hấp.
- + *Candida* (CDD): gây viêm loét màng nhầy trong cơ thể.
- + *Trichophyton* (TCP): gây viêm loét tai, mũi, họng.

+ *Epidermophyton* (EDP): gây viêm da, lở cuống họng.

+ *Microsporum* (MCP): gây viêm da đầu, làm rụng tóc.

- Phương pháp thử nghiệm: phương pháp pha loãng thạch (Agar dilution)

Hòa đều dung dịch huyền phù 30% Neemtab trong nước vào môi trường thạch dinh dưỡng trong đĩa Petri. Sau đó cấy các hạch nấm của 6 loại nấm trên, mỗi loại trong 1 đĩa và theo dõi sự phát triển của nấm trên môi trường thử.

Chỉ tiêu theo dõi: Theo dõi sự phát triển của khuẩn ty nấm, tính tỷ lệ ức chế khuẩn

Tỷ lệ I% (ức chế)

$$I\% = \left(1 - \frac{D_1}{D_0}\right) \times 100$$

trong đó: D_1 là đường kính khuẩn lạc thí nghiệm

D_0 là đường kính khuẩn lạc đối chứng tức khuẩn lạc cấy vào môi trường không có Neemtab

Phân tích thống kê đánh giá mức độ tin cậy của thí nghiệm bằng chương trình MSTATC

Kết quả tác dụng của dung dịch Neemtab 30% đối với 6 chủng nấm bệnh thí nghiệm được trình bày trong bảng sau đây:

Các loại nấm	Đường kính trung bình của khuẩn lạc (mm)				I% Sau 4 ngày
	Sau 1 ngày	Sau 2 ngày	Sau 3 ngày	Sau 4 ngày	
TCS	3	13	28,25	39,25	51,24
GTC	1	5,5	15,75	28,75	64,28
CDD	1	4	16,75	23,25	71,12
TCP	0	1	5,25	14,25	82,29
EDP	0	-	1	5,00	93,79
MCP	0	0	0	0,00	100
Đối chứng	5	32,75	57	80,50	

$$CV\% = 6,56\%$$

$$\text{LSD}_{0,01} = 17,52$$

Nhận xét: Theo dõi sự phát triển khuẩn ty của 6 loại nấm bệnh trong 4 ngày cho thấy, ở các thử nghiệm có xử lý dung dịch huyền phù Neemtab 30% đều có sự ức chế khuẩn ty, trong đó 2 loại nấm MCP và EDP bị ức chế mạnh nhất là 100% và 93,79%.

Ví dụ 5: Thử nghiệm tác dụng của chế phẩm phun sương Neemgel

5.1. Ví dụ thử nghiệm tác dụng của Neemgel đối với vi khuẩn gây bệnh

- Đối tượng thử nghiệm: 5 chủng vi khuẩn gây bệnh *Pseudomonas aerous*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* được nuôi cấy trong môi trường thạch Mueller Hinton có nồng độ $1,0 \times 10^4$ CFU/ml.
- Vật liệu và phương pháp: Pha dung dịch huyền phù 1% Neemgel trong nước và gửi mẫu đến Viện Pasteur Tp Hồ Chí Minh để thử nghiệm khả năng diệt khuẩn.

Phun dung dịch huyền phù 1% Neemgel vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn, sau đó đếm lại các vi khuẩn còn sống sót theo phương pháp thử nghiệm chuyên ngành.

Kết quả thử nghiệm tác dụng của Neemgel do Viện Pasteur Tp Hồ Chí Minh cung cấp được thể hiện trong bảng sau:

STT	YÊU CẦU THỬ NGHIỆM	KẾT QUẢ	ĐƠN VỊ	P/P THỬ NGHIỆM	GIỚI HẠN
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 10	CFU/g	Số 3347/QĐ-BYT	
2	<i>Vibrio cholerae</i>	âm tính	/25g	IP HCM V02:2006	
3	<i>Escherichia coli</i>	< 0,3	MPN/g	NF VO8-020:1994	

4	<i>Staphylococcus aureus</i>	< 10	CFU/g	NF V08-057-1:1994	
5	<i>Bacillus subtilis</i>	< 10	CFU/g		

Ghi chú:

<0,3; <10: Không phát hiện

Kết luận: Chế phẩm Neemgel có tác dụng diệt được các chủng vi khuẩn *P.aeruginosa*, *V.cholerae*, *E. coli*, *S. aureus* và *B. subtilis*.

5.2 Ví dụ thử nghiệm tác dụng của Neemgel đối với nấm bệnh

Pha dung dịch huyền phù 1% Neemgel trong nước và gửi mẫu đến Viện Pasteur Tp Hồ Chí Minh để kiểm nghiệm khả năng diệt nấm bệnh.

- Đối tượng thử nghiệm: 3 chủng nấm bệnh *Candida albicans*, *Trichomonas sp*, *Giardinella sp* được nuôi cấy 24 giờ trong môi trường Mueller Hinton agar có nồng độ $1,0 \times 10^4$ CFU/ml.

- Phương pháp và vật liệu thử nghiệm: Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và đo đường kính vòng ức chế. Đục lỗ trên thạch MH có đường kính 1mm

+ Nồng độ thử nghiệm: Pha loãng mẫu thử (C_0 , C_1 , C_2 , C_3 , C_4)

- Kết quả: Bảng kết quả đo đường kính vòng vô khuẩn (mm) của Neemgel đối với các chủng thử nghiệm do Viện Pasteur Tp Hồ Chí Minh cung cấp được thể hiện trong bảng sau:

Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)				
<i>Candida albicans</i>	09	08	07	06	06
<i>Trichomonas sp</i>	10	09	08	07	06
<i>Giardinella sp</i>	08	07	07	06	06
Nồng độ C	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4

Ghi chú: Đường kính vòng vô khuẩn 01mm chứng tỏ không có khả năng diệt khuẩn

Kết luận: Chế phẩm Neemgel có tác dụng diệt nấm đối với các nấm bệnh *Candida albicans*, *Trichomonas sp* và *Giardinella sp*.

Hiệu quả có thể đạt được của sáng chế

Quy trình chiết xuất chiết phẩm chứa limonoit từ cành và lá cây sầu đâu được thực hiện ở nhiệt độ 50°C nên limonoit trong chiết phẩm không bị phân hủy và nhờ đó thu được chiết phẩm có hàm lượng limonoit cao (6,6%). Chiết phẩm chứa limonoit thu được từ quy trình này được dùng để sản xuất thực phẩm chức năng ở dạng viên nén và chế phẩm phun sương. Thực phẩm chức năng ở dạng viên nén có tác dụng kháng khuẩn và kháng nấm, và chế phẩm phun sương được dùng để diệt côn trùng như diệt ruồi, muỗi, v.v..

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chiết xuất chiết phẩm chứa limonoit từ cành và lá cây sấu đầu (*Azadirachta indica*), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

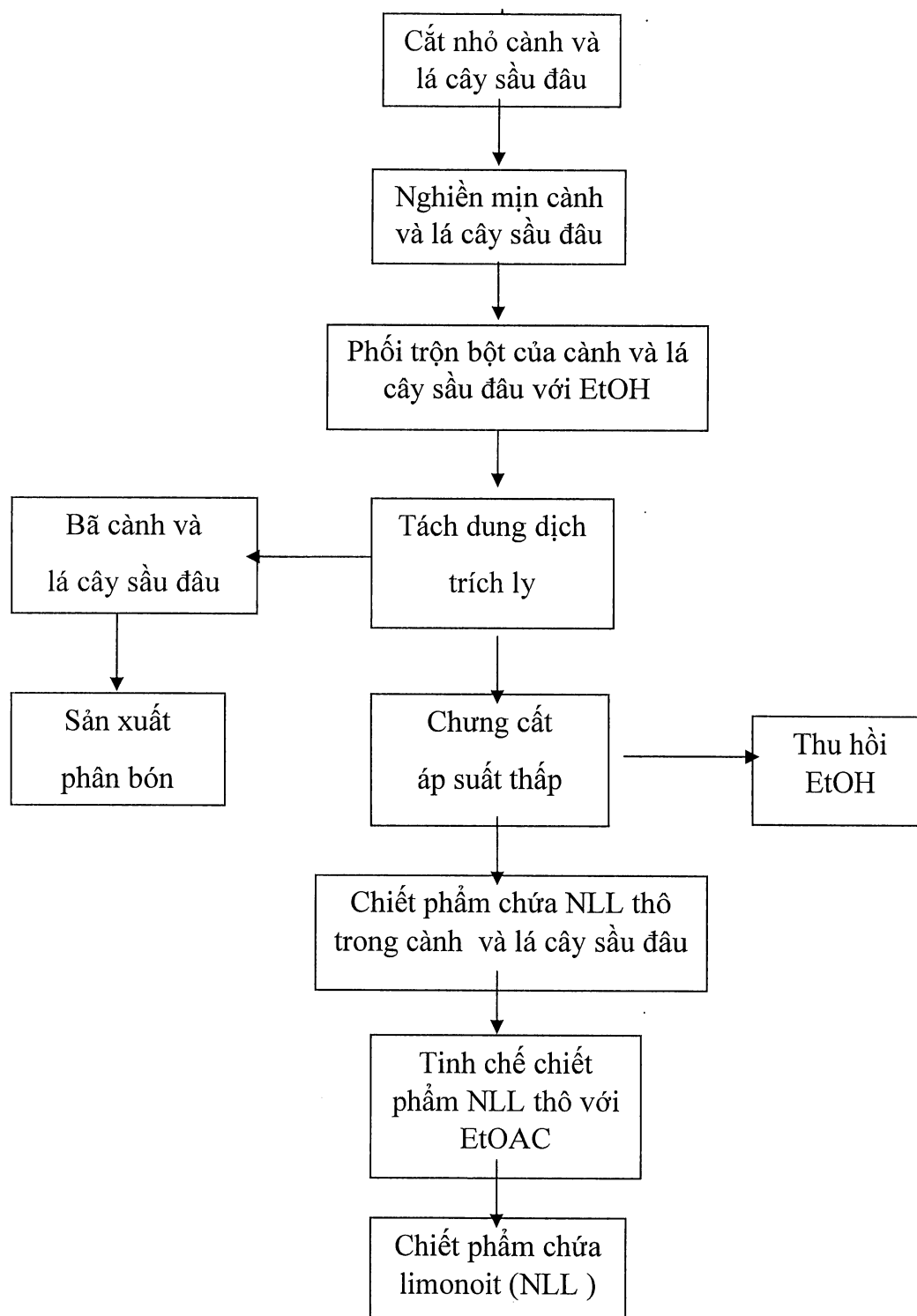
a) chuẩn bị nguyên liệu chiết bằng cách rửa sạch cành và lá cây sấu đầu (*Azadirachta indica*), để ráo nước và phơi khô đến độ ẩm khoảng 15%, sau đó đem sấy ở nhiệt độ thấp hơn 50°C cho đến khi trọng lượng không đổi, tiếp theo cắt nhỏ thành từng mảnh $\leq 5\text{mm}$ bằng máy cắt và nghiền thu được bột mịn;

b) chiết chiết phẩm chứa limonoit bằng cách trộn bột thu được ở bước a) với etanol theo tỷ lệ khối lượng bột/etanol là 1/3 trong bồn chiết có hai lớp, chiết ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ, sau đó ly tâm bằng máy ly tâm để tách dung dịch chiết, chưng cất dung dịch chiết trong bình chưng cất áp suất thấp có hai lớp dưới áp suất $\leq 50\text{mmHg}$ và nhiệt độ $\leq 50^\circ\text{C}$ để tách etanol thu chiết phẩm chứa limonoit thô;

c) tinh chế chiết phẩm chứa limonoit bằng cách cho chiết phẩm chứa limonoit thô thu được ở bước b) vào bồn tinh chế, tiếp theo bổ sung nước và etyl axetat theo tỷ lệ khối lượng chiết phẩm chứa limonoit thô/nước/etyl axetat là 1/2/2, sau đó khuấy trộn với tốc độ 100 vòng/phút, đun đến nhiệt độ 45°C trong thời gian 90 phút, tiếp theo đưa toàn bộ dung dịch vào bình lắng để tách lớp, thu hồi lớp trên có chứa hoạt chất limonoit và đuổi dung môi etyl axetat thu chiết phẩm chứa limonoit.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm thêm bước phối trộn chiết phẩm chứa limonoit thu được ở bước c) với sesamin và tinh bột hòa tan theo tỷ lệ khối lượng chiết phẩm chứa limonoit/sesamin/tinh bột hòa tan là 46/4/50 thu được thực phẩm chức năng dạng viên nén có tác dụng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Samonella* sp và *Vibrio cholerae*.

3. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm thêm bước phối trộn chiết phẩm chứa limonoit thu được ở bước c) với dầu sàu đậu, sesamin và etanol theo tỷ lệ khối lượng chiết phẩm chứa limonoit/dầu sàu đậu/sesamin/etanol là 31/20/4/45 thu được thực phẩm chức năng dạng phun sương có tác dụng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn *Candida albicans*, *Trichomonas* sp và *Giardinella* sp.

**Hình 1**