



(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) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**



2-0003335

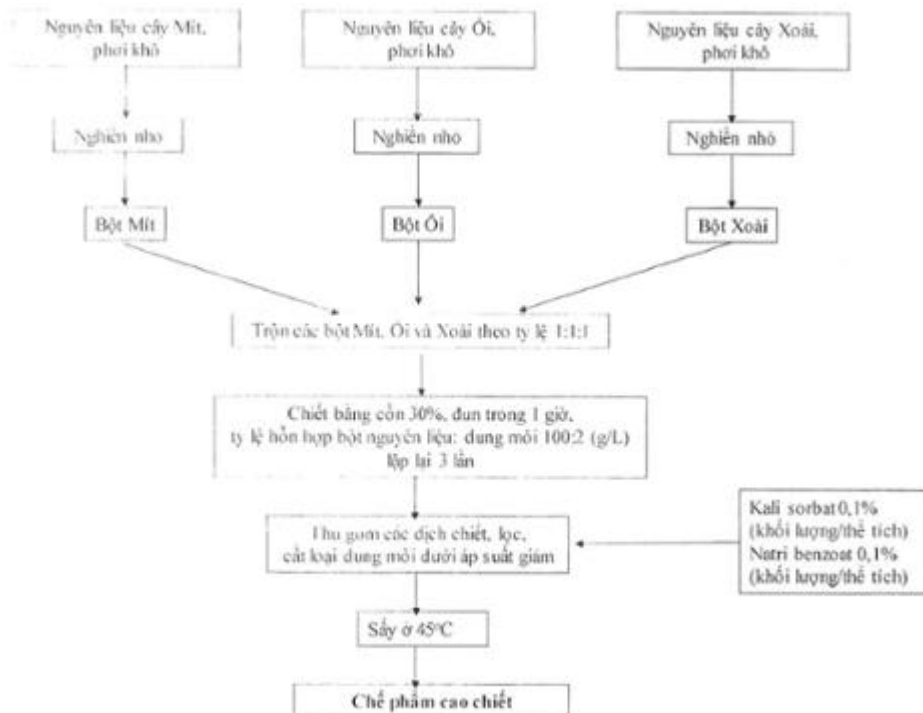
(51) **A61K 36/537**
2021.01

(13) **Y**

- (21) 2-2022-00356 (22) 13/06/2019
(67) 1-2019-03145
(45) 25/09/2023 426 (43) 25/12/2020 393
(73) Bùi Thanh Tùng (VN)
908B, chung cư 79 Thanh Đàm, Thanh Trì, Hoàng Mai, Hà Nội
(72) Bùi Thanh Tùng (VN); Lê Anh Tuấn (VN); Phan Quốc Nguyên (VN); Trần Đức Trọng (VN); Đỗ Khánh Linh (VN); Nguyễn Đức Hiển (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM CAO CHIẾT DÙNG LÀM NGUYÊN LIỆU BẢO CHẾ THUỐC RỐI LOẠN LIPIT MÁU VÀ BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG, VÀ CAO CHIẾT THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm cao chiết dùng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipit máu và bệnh đái tháo đường, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) tạo hỗn hợp bột nguyên liệu; c) chiết hỗn hợp bột nguyên liệu; và d) thu cao chiết. Bằng cách sử dụng nguyên liệu từ lá mít (*Artocarpus heterophyllus*), lá ổi (*Psidium guajava*) và lá xoài (*Mangifera indica*) theo tỷ lệ khối lượng 1:1:1, quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép chiết và thu được cao chiết cho thấy hiệu quả và có tiềm năng dùng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipit máu và bệnh đái tháo đường.



Lĩnh vực kỹ thuật dược đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực hóa dược, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất cao chiết dùng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường từ lá mít (*Artocarpus heterophyllus*), lá ổi (*Psidium guajava*) và lá xoài (*Mangifera indica*) và cao chiết thu được từ quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật giải pháp hữu ích

Rối loạn lipid máu là hiện tượng khi có một hoặc nhiều các rối loạn bao gồm tăng cholesterol huyết tương, tăng triglycerit trong máu, giảm cholesterol lipoprotein mật độ cao (HDL-C), tăng cholesterol mật độ thấp (LDL-C). Rối loạn lipid máu là nguyên nhân gây ra các bệnh nguy hiểm như: nhồi máu cơ tim, huyết áp cao, đột quỵ, đau tim. Đây là bệnh khá phổ biến tại Việt Nam, tỷ lệ lên tới 29%. Bệnh đái tháo đường có biểu hiện là các rối loạn chuyển hóa, điển hình là tăng glucoza huyết do thiếu hụt insulin tuyệt đối hoặc tương đối hay do không đáp ứng với insulin. Bệnh thường kèm theo các biến chứng cấp gây tử vong hoặc các biến chứng lâu dài như các bệnh lý về tim mạch, mắt, thận, thần kinh. Bệnh đái tháo đường typ 2 là dạng đái tháo đường thường gặp nhất, chiếm khoảng 80-90% số bệnh nhân bị đái tháo đường. Để điều trị bệnh đái tháo đường typ 2, có thể sử dụng các thuốc điều trị hóa dược nhưng các thuốc này gây nhiều tác dụng phụ. Trong khi đó, dược liệu từ thảo dược được coi là một biện pháp thay thế hữu hiệu trong việc phòng ngừa và điều trị bệnh đái tháo đường. Việc kết hợp các dược liệu trong một hỗn hợp sẽ phát huy được tác dụng tốt hơn từng thành phần dược liệu riêng biệt. Mặc dù đã có nhiều bài thuốc dân gian có tác dụng điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường, nhưng vẫn

cần có những nghiên cứu nhằm phát triển các dược liệu từ thảo dược nhằm cung cấp dược chất để phát triển thuốc điều trị lipid máu và bệnh tiểu đường.

Đã có một số tài liệu, ví dụ (Pathirage Kamal Perera et al., Functional herbal food ingredients used in type 2 diabetes mellitus, Pharmacognosy Reviews, January-June, 2012, Vol6, Issue 11, public online) đã đề cập đến quy trình chiết các thành phần chiết từ dược liệu, cụ thể là quy trình chiết các thành phần hoạt tính từ lá mít (*Artocarpus heterophyllus*), lá ổi (*Psidium guajava*), lá xoài (*Mangifera indica*), trong đó tài liệu này đã cho thấy, bằng cách phơi sấy khô nguyên liệu và chiết bằng dung môi để thu phần chiết. Trong đó, phần chiết từ cây ổi chứa thành phần hoạt tính strictinin, pedunculagin có tác dụng hạ đường huyết, trong phần chiết từ lá mít chứa cycloartenone, β -sistosterol có tác dụng điều trị tiểu đường, và trong phần chiết từ lá xoài chứa mangiferin có tác dụng chống tăng đường huyết, các thành phần này đều có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường. Tuy nhiên, tài liệu này không đề cập đến quy trình cho phép chiết hỗn hợp thành phần hoạt tính từ lá mít, lá ổi và lá xoài đồng thời để thu được hỗn hợp chiết có tác dụng điều trị lipid máu và bệnh tiểu đường.

Tài liệu (Rema M.Y.Morsi et al., Effect of aqueous extract mangifera indica leaves, as functional foods, Journal of Applied Sciences research: 6(6) 712-721, 2010) đề cập đến phương pháp chiết thành phần có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường từ lá cây xoài, trong đó lá xoài được rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ phòng, sau đó nghiền thành bột và chiết với nước cất trong 24 giờ theo tỷ lệ 100g/L, sau khi lọc bỏ bã, sấy khô thu được phần chiết từ lá xoài có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường.

Tài liệu (Muhammad Yanis Musdja, Anti-hyperglycemic effect and glucose tolerance of guajava (*Psidium guajava* L.) leaf ethanol extract in diabetic rats, IOP conf. Series: Earth and Environmental Science 101 (2017) 012006) đã mô tả phương pháp chiết lá cây ổi, trong đó lá ổi tươi được xay nhuyễn với etanol 70% và

chiết ngập trong etanol 3 giờ. Sau khi lọc, cô loại dung môi thu được phần chiết từ lá ổi, phần chiết này đã được chứng minh có tác dụng hạ đường huyết của chuột bị tiểu đường.

Tài liệu (Nguyễn Xuân Hải, Thành phần hóa học của lá cây mít, Tạp chí phân tích hóa lý và sinh học, tập 20, số 3/2015) đề cập đến phương pháp chiết phân chiết từ lá cây mít, trong đó lá mít được phơi sấy và xay nhỏ và trích ly trong môi trường dung môi metanol thu được cao metanol thô, tài liệu này cũng cho thấy dịch chiết từ lá mít có tác dụng làm giảm đường huyết.

Do đó, vẫn cần có quy trình nhằm phát triển nguyên liệu để bào chế thuốc hữu dụng trong việc điều trị đồng thời cả rối loạn lipid máu, bệnh đái tháo đường có khả năng ứng dụng để phát triển nguồn nguyên liệu để bào chế thuốc từ nguyên liệu thực vật.

Bản chất của kỹ thuật giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là để giải quyết vấn đề nêu trên, bằng cách phối hợp các thành phần nguyên liệu bao gồm lá cây mít (*Artocarpus heterophyllus*), lá cây ổi (*Psidium guajava*) và lá cây xoài (*Mangifera indica*) theo tỷ lệ khối lượng 1:1:1 để chiết và thu được cao chiết có hoạt tính điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường hiệu quả. Cao chiết thu được theo giải pháp hữu ích thích hợp làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường. Do đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất cao chiết dùng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường, và cao chiết thu được từ quy trình này để làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất cao chiết dùng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách độc lập thu hái nguyên liệu lá mít (*Artocarpus heterophyllus*), lá ổi (*Psidium guajava*) và lá xoài (*Mangifera indica*) tươi, sau khi rửa sạch, phơi khô đến độ ẩm dưới 13% và nghiền nhỏ đến kích cỡ nhỏ hơn 0,6mm thu được nguyên liệu bột lá mít, bột lá ổi và bột lá xoài, tương ứng;

b) tạo hỗn hợp bột nguyên liệu bằng cách phối trộn nguyên liệu bột lá mít, bột lá ổi và bột lá xoài theo tỷ lệ khối lượng là 1:1:1, sau khi trộn đều thu được hỗn hợp bột nguyên liệu;

c) chiết hỗn hợp bột nguyên liệu bằng cách tiến hành bổ sung hỗn hợp bột nguyên liệu vào dung môi là cồn 30% theo tỷ lệ 100:2 (g/l), sau đó đun sôi hoàn lưu trong 1 giờ thu phần dịch chiết, lặp lại quá trình chiết 3 lần; và

d) thu cao chiết bằng cách thu gom phần dịch chiết, lọc bỏ tạp chất và bổ sung 0,1% kali sorbat, 0,1% natri benzoat (khối lượng/thể tích), sau khi hòa tan thu được hỗn hợp đồng nhất, tiến hành cất loại dung môi dưới áp suất giảm rồi sấy trong tủ sấy ở 45°C tới khối lượng không đổi, thu được cao chiết dạng bột.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến cao chiết dùng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó cao chiết này được chiết từ nguyên liệu bột lá mít, lá ổi và lá xoài khô theo tỷ lệ khối lượng là 1:1:1.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1. Là sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm cao chiết từ lá mít (*Artocarpus heterophyllus*), lá ổi (*Psidium guajava*) và lá xoài (*Mangifera indica*).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

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

Nguyên liệu được sử dụng theo giải pháp hữu ích là lá mít (*Artocarpus heterophyllus*), lá ổi (*Psidium guajava*) và lá xoài (*Mangifera indica*). Các nguyên liệu này là nguyên liệu tươi thu hái từ cây mít (*Artocarpus heterophyllus*), cây ổi (*Psidium guajava*) và cây xoài (*Mangifera indica*).

Nguyên liệu lá mít được thu hái từ cây mít. Cây mít có tên khoa học là *Artocarpus heterophyllus*, thuộc họ Dâu tằm (Moraceae) là loài thực vật ăn quả. Cây mít là cây gỗ to, có thể cao 15-20 m. Cành non có lông mềm, cành già nhẵn, màu nâu đen. Lá mọc so le, phiến dày, hình trái xoan hoặc hình trứng ngược, dài 10-15cm, rộng 6-8cm, gốc tròn, đầu tù hay nhọn, mép nguyên, hai mặt nhẵn, mặt trên màu lục sẫm bóng, mặt dưới nhạt, có gân nổi rõ thành mạng lưới. Các bộ phận dùng của cây mít có thể là quả, lá, hạt, rễ, nhựa hoặc gỗ thân. Trong y học dân gian, lá mít được sử dụng để chữa tiêu chảy, táo bón, ăn không tiêu, hỗ trợ điều trị đái tháo đường, dùng làm thuốc an thần, có khi được dùng để chữa huyết áp cao hay những trường hợp co quắp. Lá mít giã nát đắp cũng làm mụn nhọt bớt sưng đau.

Nguyên liệu lá ổi được thu hái từ cây ổi. Cây ổi có tên khoa học *Psidium guajava* L., thuộc họ Sim Myrtaceae, là một cây nhỏ, cao chừng 3-5m. Cành nhỏ thì vuông cạnh. Lá mọc đối có cuống ngắn, hình bầu dục, nhẵn hoặc hơi có lông ở mặt trên; mặt dưới có lông mịn, phiến nguyên, khi soi lên có thấy túi tinh dầu trong. Trong y học cổ truyền, tất cả các bộ phận của cây, bao gồm quả, lá, thân và rễ đã được dùng để điều trị nhiều bệnh như đau dạ dày, rối loạn đường hô hấp, tiêu hóa, có tác dụng chống co thắt, chống viêm, giảm ho, chống tiêu chảy, kiểm soát huyết áp, béo phì, đái tháo đường và ung thư. Trong lá và búp non chứa từ 7 đến 10%

thành phần tanin pyrogalic, axit psiditanic, triterpenoit, và tinh dầu (0,36%). Lá non và búp ổi non là một vị thuốc chữa đau bụng đi ngoài, thường dùng dưới dạng thuốc sắc hay thuốc pha.

Nguyên liệu lá xoài được thu hái từ cây xoài. Cây xoài tên khoa học *Mangifera indica*, họ Đào lộn hột Anacardiaceae. Cây xoài to, cao từ 8 đến 10m, có thể đến 20m. Thân cành nhẵn, vỏ của cây già màu xám nâu, chứa một chất nhựa trong. Lá mọc so le, hình bầu dục hoặc mũi mác thuôn, dài từ 15 đến 30cm, rộng từ 5 đến 7cm, gốc tròn, đầu có mũi nhọn, mép nguyên, hai mặt nhẵn, mặt trên sẫm bóng. Gân lá kết thành mạng rõ, lá non màu hồng, cuống lá dài. Trong y học cổ truyền, bộ phận dùng làm thuốc của cây xoài có thể từ vỏ thân, quả, hạt, lá. Quả thu hái vào mùa hè, các bộ phận khác thu hái quanh năm. Thành phần hoạt chất có trong vỏ thân, lá, và quả là polyphenolic, flavonoit và các triterpenoit, có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, chống ung thư, điều hòa miễn dịch, chống dị ứng, chống tiểu đường, chống tái hấp thu xương, ức chế mono-amine oxydaza, chống virus, nấm, vi khuẩn, chống co thắt, chống nhiễm trùng, chống sốt rét, chống ký sinh trùng.

Các thành phần kali sorbat và natri benzoat đóng vai trò là chất bảo quản có tác dụng chống nấm mốc, lượng kali sorbat và natri benzoat tương ứng được sử dụng là 0,1% khối lượng tính theo phần dịch chiết nguyên liệu.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất cao chiết dùng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh tiểu đường, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) tạo hỗn hợp bột nguyên liệu; c) chiết hỗn hợp bột nguyên liệu; và d) thu cao chiết.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, tiến hành độc lập thu hái nguyên liệu lá mít (*Artocarpus heterophyllus*), lá ổi (*Psidium guajava*) và lá xoài (*Mangifera indica*) tươi. Sau khi rửa sạch, phơi khô lá mít, lá ổi và lá xoài đến độ ẩm dưới 13% và

nghiền nhỏ đến kích cỡ nhỏ hơn 0,6mm, thu được nguyên liệu bột lá mít, bột lá ổi và bột lá xoài, tương ứng.

Trong bước tạo hỗn hợp bột nguyên liệu, tiến hành phối trộn nguyên liệu bột lá mít, bột lá ổi và bột lá xoài theo tỷ lệ khối lượng là 1:1:1. Hỗn hợp nguyên liệu thu được ở dạng bột lá màu nâu, có mùi thơm được sử dụng làm nguyên liệu để chiết cao theo giải pháp hữu ích.

Trong bước chiết hỗn hợp bột nguyên liệu, tiến hành chiết hỗn hợp nguyên liệu trong dung môi cồn. Theo đó, tiến hành bổ sung hỗn hợp bột nguyên liệu vào dung môi là cồn 30% theo tỷ lệ 100:2 (g/l). Quá trình chiết được thực hiện bằng cách đun sôi hoàn lưu trong 1 giờ thu phần dịch chiết. Tiến hành lặp lại quá trình chiết 3 lần.

Trong bước thu cao chiết, tiến hành thu gom phần dịch chiết. Sau khi lọc bỏ tạp chất và bổ sung 0,1% kali sorbat, 0,1% natri benzoat (khối lượng/thể tích) để ngăn ngừa nấm mốc nhằm bảo quản nguyên liệu cao chiết thu được. Sau khi hòa tan chất chống nấm mốc, thu được hỗn hợp đồng nhất. Tiến hành cất loại dung môi dưới áp suất giảm rồi sấy trong tủ sấy ở 45°C tới khối lượng không đổi, thu được cao chiết dạng bột màu nâu, mùi thơm.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến cao chiết dùng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó cao chiết này được chiết từ nguyên liệu bột lá mít, lá ổi và lá xoài khô theo tỷ lệ khối lượng là 1:1:1.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Sản xuất cao chiết từ nguyên liệu lá mít, lá ổi và lá xoài

Lá cây mít (*Artocarpus heterophyllus*) tươi được thu hái, làm sạch và phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, nghiền nhỏ qua sàng cỡ lỗ 0,6mm thu được bột lá mít.

Lá cây ổi (*Psidium guajava*) tươi được thu hái, làm sạch và phơi khô phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, nghiền nhỏ qua sàng cỡ lỗ 0,6mm thu được bột lá ổi.

Lá cây xoài (*Mangifera indica*) tươi được thu hái, làm sạch và phơi khô đến độ ẩm dưới 13%, nghiền nhỏ qua sàng cỡ lỗ 0,6mm thu được bột lá xoài.

Phối trộn 100g bột lá mít, 100g bột lá ổi và 100g bột lá xoài, thu được 300g hỗn hợp bột nguyên liệu.

Chiết 300g hỗn hợp nguyên liệu này bằng 6 lít cồn 30%, đun hồi lưu trong 1 giờ. Lặp lại quá trình chiết này 3 lần. Phần dịch chiết được gom các dịch chiết, lọc bỏ phần tạp chất, thu phần dịch lọc, bổ sung kali sorbat 0,1% (khối lượng/thể tích) và natri benzoat 0,1% (khối lượng/thể tích); cất loại dung môi dưới áp suất giảm rồi sấy trong tủ sấy ở 45°C tới khối lượng không đổi, thu được 18g chế phẩm cao chiết. Hiệu suất chiết đạt khoảng 6%.

Ví dụ 2. Thử nghiệm tác dụng điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường của cao chiết

Để đánh giá hiệu quả điều trị rối loạn lipid máu và điều trị bệnh tiểu đường của cao chiết thu được từ Ví dụ 1, tiến hành thử nghiệm trên động vật là chuột nhắt trắng chủng Swiss không phân biệt giới tính, khoẻ mạnh, trọng lượng $25,0 \pm 2,0$ g do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp. Động vật được nuôi trong điều kiện đầy đủ thức ăn và nước uống tại phòng thí nghiệm từ 3-5 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu tại Khoa Y Dược, Đại Học Quốc Gia Hà Nội.

Hóa chất: Enzym nấm men α -glucosidaza; p-nitrophenyl- α -D-glucopyranosit (pNPG), 4-Nitrophenol (Sigma), p-nitrophenyl phosphat (pNPP) (Sigma, Singapore), enzym PTP 1B (Sigma, Singapore), Glibenclamit (Việt Nam), Streptozotocin (Sigma, Singapore). Thành phần thử nghiệm: Cao chiết thu được từ Ví dụ 1, ở dạng bột.

a) Tác dụng điều trị bệnh tiểu đường *in vivo*

Gây tiểu đường

Chuột bị gây tiểu đường bằng cách tiêm màng bụng STZ (120 mg/kg thể trọng). STZ được hòa tan trong dung dịch đệm 10 mM natri citrate (pH 4.0), nhóm chứng sinh lý được tiêm dung dịch đệm. Tình trạng bệnh tiểu đường được xác định bằng nồng độ glucoza huyết.

Quá trình thử nghiệm

Chuột nhắt được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm, mỗi nhóm 10 con, được điều trị theo chương trình như sau:

Nhóm I là nhóm chứng sinh lý;

Nhóm II: Nhóm chứng STZ (120 mg/kg thể trọng, tiêm màng bụng).

Nhóm III: STZ (120 mg/kg thể trọng, tiêm màng bụng) + Glibenclamid (5 mg/kg, p.o) trong vòng 21 ngày.

Nhóm IV: STZ (150 mg/kg thể trọng, tiêm màng bụng) + cao chiết thu được theo ví dụ I (150mg/kg, thể trọng, đường uống) trong vòng 21 ngày.

Trong quá trình thử nghiệm, trọng lượng chuột và nồng độ glucoza được đo trong các khoảng thời gian xác định. Tại ngày cuối của thí nghiệm, chuột bị bỏ đói qua đêm, gây mê và giết bằng cách bẻ cổ. Máu được thu thập vào ống tube chứa sẵn heparin. Máu đem ly tâm với tốc độ vòng 3000 vòng/phút tại 25°C trong vòng 15 min và đem phân tích các chỉ số sinh hóa. Cholesterol toàn phần, LDL-Cholesterol, HDL-Cholesterol, Triglycerit được đo bằng cách sử dụng các kit của hãng Biosino Biotechnology Company Ltd. (Beijing, PR China).

b) Tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza

Tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza của cao chiết thu được theo ví dụ 1 được thực hiện. Cao chiết thu được theo ví dụ 1 được hòa tan trong DMSO và pha loãng trong đệm phosphat 10 mM (pH 6.8) và 50 μ l được đưa vào các giếng của khay 96 giếng đê có nồng độ 50 μ g/ml; 25 μ g/ml; 12,5 μ g/ml; 6,25 μ g/ml; 3,125 μ g/ml; 1,5625 μ g/ml.

20 μ l α - glucosidaza (0,5U/ml) và 130 μ l đệm phosphat 100 mM (pH 6,8) được thêm vào mỗi giếng, trộn đều và ủ ở 37°C trong 15 phút.

Cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucopyranosit (pNPG) được đưa tiếp vào từng giếng thử nghiệm rồi ủ tiếp ở 37°C trong 60 phút.

Đĩa thử nghiệm chỉ có mẫu thử, đệm phosphat và pNPG được sử dụng làm đối chứng trắng (blank). Giếng thử nghiệm chỉ có DMSO 10%, đệm phosphat, enzym và pNPG được sử dụng làm đối chứng. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần để đảm bảo sự chính xác.

Dừng thử nghiệm bằng cách thêm vào 80 μ l Na_2CO_3 0,2M và đo OD ở bước sóng 405nm bằng máy đo ELISA Plate Reader (Bio-Rad).

Khả năng ức chế enzym α - glucosidaza của mẫu thử được xác định theo công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = 100 - (A_{\text{mẫu thử}} / A_{\text{đối chứng}} * 100)$$

Trong đó: $A_{\text{đối chứng}} = \text{OD}_{\text{đối chứng}} - \text{OD}_{\text{blank}}$

$$A_{\text{mẫu thử}} = \text{OD}_{\text{mẫu thử}} - \text{OD}_{\text{blank mauthu}}$$

- Tính giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50%)

c) Tác dụng ức chế enzym protein tyrosin phosphataza 1B (PTP1B)

Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế enzym PTP1B được tiến hành như sau. Cơ chất là p-nitrophenyl phosphat (pNPP) được sử dụng trong thử nghiệm. Dung dịch đệm gồm có 1 mM dithiothreitol (DTT), 0,1 M NaCl, 1 mM axit

ethylenediaminetetraacetic (EDTA) và 50 mM citrat (pH 6,0). Thử nghiệm được tiến hành bằng cách thêm 10 μ L dung dịch cao chiết thu được từ Ví dụ 1 vào 20 μ L dung dịch enzym PTP 1B (1 μ g/ml), và trộn đều với 40 μ L pNPP 4 mM trong 130 μ L dung dịch đệm trong đĩa 96 giếng. Ủ ở 37°C trong vòng 30 phút, sau đó thêm 10 μ L NaOH 1M để dừng phản ứng. Đo lượng p-nitrophenol sinh ra bằng cách đo độ hấp thụ quang tại bước sóng 405 nm. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Phần trăm ức chế hoạt độ enzym PTP 1B (% I) được tính theo công thức:

$$\% I = \frac{A_c - A_t}{A_c - A_o} \times 100$$

Trong đó: I% phần trăm hoạt tính PTP 1B bị ức chế

A_c : độ hấp thụ của mẫu chứng

A_t : độ hấp thụ của cao chiết thu được theo ví dụ 1

A_o : độ hấp thụ của mẫu trắng

Giá trị ức chế enzym PTP 1B IC_{50} của các mẫu thử được tính dựa vào đồ thị liều dùng vs. % ức chế.

d) Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình \pm SEM (Standard Error of the Mean: Sai số chuẩn của giá trị trung bình) và được xử lý thống kê bằng phần mềm SigmaPlot 10.0 theo phép kiểm One-way ANOVA và Tukey test với độ tin cậy lớn hơn 95% ($p < 0,05$).

e) Kết quả thu được

Bảng 1 trình bày tác dụng của cao chiết thu được theo Ví dụ 1 lên trọng lượng cơ thể chuột. Trọng lượng cuối cùng khi kết thúc thí nghiệm của các nhóm chuột đều tăng so với khi bắt đầu thí nghiệm. Nhóm chứng sinh lý tăng 10,82% trọng lượng cơ thể. Nhóm chứng bệnh tăng 18,67 % trọng lượng cơ thể. Nhóm chuột tiểu đường

điều trị bằng glibenclamid tăng 11,26% trọng lượng cơ thể. Nhóm chuột tiểu đường được điều trị bằng cao chiết thu được theo ví dụ 1 liều 150 mg/kg chỉ tăng 11,97%. Kết quả này cho thấy cao chiết thu được theo ví dụ 1 có tác dụng chống tăng trọng lượng cơ thể ở chuột bị tiểu đường béo phì.

Bảng 1. Tác dụng của cao chiết thu được theo ví dụ 1 lên trọng lượng cơ thể (g) trên chuột bị tiểu đường do streptozotocin

	Ngày 0	Ngày 21	% thay đổi
Nhóm I	33,8 ± 2,3	37,9 ± 2,7	10,82
Nhóm II	40,5 ± 3,4	49,8 ± 2,3 [#]	18,67
Nhóm III	40,2 ± 2,6	45,3 ± 2,1 [*]	11,26
Nhóm IV	41,2 ± 3,7	46,8 ± 0,3 [*]	11,97

Khác biệt có ý nghĩa thống kê. [#]p < 0,05 so sánh với nhóm I; ^{}p < 0,05 so sánh với nhóm II.*

Bảng 2 tóm tắt nồng độ glucoza trong các nhóm chuột nghiên cứu. Nhóm chuột tiểu đường tăng đáng kể nồng độ glucose huyết khi so sánh với nhóm chứng sinh lý. Nhóm chuột tiểu đường điều trị bằng glibenclamide giảm 30,9% nồng độ glucoza so với trước khi điều trị (17,8%) và giảm đáng kể so với nhóm chứng bệnh tiểu đường. Nhóm chuột được điều trị bằng cao chiết thu được theo ví dụ 1 liều 150 mg/kg làm giảm đáng kể nồng độ glucoza so với trước khi điều trị (17,8%) và so với nhóm chứng bệnh tiểu đường (p < 0,05).

Bảng 2. Tác dụng của cao chiết thu được theo ví dụ 1 lên nồng độ glucoza huyết (mmol/l.) trên chuột bị tiểu đường do streptozotocin

	Ngày 0	Ngày 21
Nhóm I	6,7 ± 1,2	6,8 ± 1,3
Nhóm II	16,7 ± 3,2	17,2 ± 2,3 [#]
Nhóm III	16,5 ± 2,6	12,6 ± 3,4 [*]
Nhóm IV	15,9 ± 2,4	13,5 ± 3,1 [*]

Khác biệt có ý nghĩa thống kê. [#]p < 0,05 so sánh với nhóm I; ^{}p < 0,05 so sánh với nhóm II.*

Bảng 3 trình bày tác dụng của cao chiết thu được theo ví dụ 1 lên nồng độ lipit máu của các nhóm chuột nghiên cứu. Nhóm chuột được điều trị bằng cao chiết thu được theo ví dụ 1 liều 150 mg/kg có khả năng làm hạ nồng độ cholesterol toàn phần, triglycerit và LDL-cholesterol đáng kể so với nhóm chứng bệnh ($p < 0,05$). Hơn nữa, cao chiết thu được theo ví dụ 1 liều 150 mg/kg còn có tác dụng làm tăng đáng kể nồng độ HDL-cholesterol so với nhóm chứng bệnh ($p < 0,05$).

Bảng 3. Tác dụng của cao chiết thu được theo ví dụ 1 lên lipit máu (mg/ml) trên chuột bị tiểu đường do streptozotocin

Nhóm	Cholesterol toàn phần (mg/ml)	Triglycerit (mg/ml)	HDL cholesterol (mg/ml)	LDL cholesterol (mg/ml)
Nhóm I	45,7 ± 6,5	565,3 ± 4,3	34,4 ± 2,3	12,3 ± 2,1
Nhóm II	77,6 ± 5,3 [#]	96,3 ± 5,1 [#]	18,2 ± 3,8 [#]	34,2 ± 1,5 [#]
Nhóm III	39,4 ± 5,7 [*]	48,4 ± 8,3 [*]	28,3 ± 2,5 [*]	18,3 ± 2,3 [*]
Nhóm IV	58,8 ± 6,3 [*]	65,14 ± 8,3 [*]	27,2 ± 2,8 [*]	25,4 ± 1,7 [*]

Khác biệt có ý nghĩa thống kê. [#] $p < 0,05$ so sánh với nhóm I; ^{} $p < 0,05$ so sánh với nhóm II.*

f) Kết quả tác dụng ức chế enzyme α -glucosidaza

Kết quả cao chiết thu được theo ví dụ 1 ức chế enzyme α -glucosidaza được trình bày trong bảng 4. Giá trị IC_{50} của cao chiết thu được theo ví dụ 1 là 10,68 μ g/mL.

Bảng 4. Tác động ức chế α -glucosidaza của cao chiết thu được theo ví dụ 1

Nồng độ (μ g/mL)	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	IC_{50}
Phần trăm ức chế (I %)	97,36 ± 2,34	82,34 ± 3,15	52,14 ± 3,61	32,27 ± 3,38	21,25 ± 2,277	11,29 ± 1,21	10,68

g) Kết quả tác dụng ức chế enzyme PTP 1B

Bảng 5 tóm tắt giá trị IC_{50} của cao chiết thu được theo ví dụ 1. Tác dụng ức chế PTP 1B của cao chiết thu được theo ví dụ 1 tăng dần theo nồng độ. Giá trị IC_{50} của cao chiết thu được theo ví dụ 1 là 19,28 μ g/mL.

Bảng 5. Tác dụng ức chế PTP 1B *in vitro* của cao chiết thu được theo ví dụ 1

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	100	50	25	12,5	6,25	3,125	IC ₅₀
Phần trăm ức chế (1%)	98,36 $\pm 3,19$	79,68 $\pm 3,61$	56,38 $\pm 2,38$	36,57 $\pm 2,75$	25,36 $\pm 3,17$	12,34 $\pm 2,31$	19,28

Kết quả thử nghiệm cho thấy cao chiết thu được từ Ví dụ 1 có hiệu quả trong việc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường trên mẫu thử nghiệm.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất cao chiết từ hỗn hợp nguyên liệu lá mít (*Artocarpus heterophyllus*), lá ổi (*Psidium guajava*) và lá xoài (*Mangifera indica*) cho phép thu được cao chiết có hiệu quả trong việc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường. Thử nghiệm với liều 150 mg/kg cho thấy cao chiết thu được theo giải pháp hữu ích có tác dụng điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường do STZ với liều 80 mg/kg gây ra ở chuột nhất trắng. Tác dụng điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường thể hiện thông qua tác dụng ức chế tăng trọng lượng cơ thể trên chuột béo phì, giảm nồng độ glucoza huyết, triglycerit máu, LDL-cholesterol, làm tăng HDL-cholesterol và tác dụng ức chế enzym α -glucosidaza và PTP 1B. Cao chiết theo giải pháp hữu ích cho thấy tiềm năng sử dụng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất cao chiết dùng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách độc lập thu hái nguyên liệu lá mít (*Artocarpus heterophyllus*), lá ổi (*Psidium guajava*) và lá xoài (*Mangifera indica*) tươi, sau khi rửa sạch, phơi khô đến độ ẩm dưới 13% và nghiền nhỏ đến kích cỡ nhỏ hơn 0,6mm thu được nguyên liệu bột lá mít, bột lá ổi và bột lá xoài, tương ứng;

b) tạo hỗn hợp bột nguyên liệu bằng cách phối trộn nguyên liệu bột lá mít, bột lá ổi và bột lá xoài theo tỷ lệ khối lượng là 1:1:1, sau khi trộn đều thu được hỗn hợp bột nguyên liệu;

c) chiết hỗn hợp bột nguyên liệu bằng cách tiến hành bổ sung hỗn hợp bột nguyên liệu vào dung môi là cồn 30% theo tỷ lệ 100:2 (g/l), sau đó đun sôi hoàn lưu trong 1 giờ thu phần dịch chiết, lặp lại quá trình chiết 3 lần; và

d) thu cao chiết bằng cách thu gom phần dịch chiết, lọc bỏ tạp chất và bổ sung 0,1% kali sorbat, 0,1% natri benzoat (khối lượng/thể tích), sau khi hòa tan thu được hỗn hợp đồng nhất, tiến hành cất loại dung môi dưới áp suất giảm rồi sấy trong tủ sấy ở 45°C tới khối lượng không đổi, thu được cao chiết dạng bột.

2. Cao chiết dùng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị rối loạn lipid máu và bệnh đái tháo đường thu được từ quy trình theo điểm 1, trong đó cao chiết này được chiết từ nguyên liệu bột lá mít, lá ổi và lá xoài khô theo tỷ lệ khối lượng là 1:1:1.

Hình 1

