



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0039572

(51)^{2020.01} A61K 36/00

(13) B

(21) 1-2022-01432

(22) 08/03/2022

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/05/2022 410

(73) Trường Đại học Quốc tế - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (VN)
Khu phố 6, phường Linh Trung, thành phố Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Phạm Văn Hùng (VN); Nguyễn Thị Lan Phi (VN); Hoàng Văn Thành (VN); Nguyễn Vũ Hồng Hà (VN); Lê Ngọc Liễu (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT BỘT CAO CHIẾT CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY
HÓA VÀ TẾ BÀO UNG THƯ TỪ VỎ LỤA HẠT ĐIỀU

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất bột cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa và tế bào ung thư từ vỏ lụa hạt điều, bằng cách sử dụng hỗn hợp enzym bao gồm xylanaza, cellulaza và hemicellulaza để phá vỡ vỏ cứng tế bào trong điều kiện pH=4,5 kết hợp với chiết siêu âm, quy trình cho phép chiết hiệu quả các hoạt chất từ vỏ lụa của hạt điều. Quy trình theo sáng chế sử dụng enzym kết hợp với chiết siêu âm không những loại bỏ được hoàn toàn việc sử dụng các loại dung môi chiết mà còn cho phép chiết một cách triệt để lượng catechin và EGCG để thu được bột cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa và tế bào ung thư cho phép phát triển nguồn dược chất từ vỏ lụa hạt điều.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ hóa hữu cơ và các hợp chất thiên nhiên, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất bột cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa và tế bào ung thư từ vỏ lụa hạt điều. Quy trình theo sáng chế ứng dụng kỹ thuật chiết bằng enzym và chiết bằng siêu âm để tăng hiệu suất đồng thời loại bỏ việc sử dụng các dung môi chiết để thu được sản phẩm an toàn, hữu ích để phát triển thành dược phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vỏ lụa hạt điều là phần vỏ bao ngoài của hạt cây điều có tên khoa học là *Anacardium occidentale* L., đây là một lớp màng mỏng bao quanh phần hạt và thường được loại bỏ khi chế biến hạt điều. Một số nghiên cứu cho thấy trong vỏ lụa hạt điều có chứa các hoạt chất có hoạt tính kháng oxy hóa và tế bào ung thư như khả năng ức chế enzym tyrosinaza và ức chế sự sản sinh enzym melanin như catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate (EGCG), alkyl phenol, cardol, axit ascorbic và tannic và đã được sử dụng để sản xuất các sản phẩm như các sản phẩm chăm sóc da, sản phẩm kháng khuẩn và kháng ung thư có lợi cho sức khỏe con người.

Có nhiều phương pháp sản xuất nhằm chiết tách các hoạt chất có lợi từ vỏ lụa hạt điều. Ví dụ, tài liệu US 20200069755 A1 đã đề cập đến khả năng kháng viêm của cao chiết trích ly từ vỏ lụa hạt điều và sản phẩm từ cao chiết này. Tài liệu US 20200069759 A1 đã cho thấy sản phẩm cao chiết từ vỏ lụa hạt điều có khả năng kháng oxy hóa. Tài liệu US 20200069754 A1 đề cập đến cao chiết từ vỏ lụa hạt điều có khả năng ức chế enzym tyrosinaza và có khả năng sản xuất sản phẩm chăm sóc da từ cao chiết này. Tài liệu này đã sử dụng dung môi bao gồm 70% etanol và 30% nước để trích ly hoạt chất từ vỏ lụa hạt điều. Trong cao chiết thu được này cho thấy chứa catechin với hàm lượng catechin tổng ít nhất 15% (w/w) bao gồm hai thành phần chính là catechin là 9,40% và hàm lượng epicatechin là 6,12%. Cao chiết thu được từ vỏ lụa hạt điều cho thấy có khả năng kháng oxy hóa, chữa lành vết thương, kháng viêm và đặc biệt là khả năng ức chế enzym tyrosinaza và khả năng ức chế sự sản sinh melanin.

Tài liệu WO2011138608 A2 mô tả kỹ thuật chiết các thành phần hoạt chất có trong vỏ lụa hạt điều bằng kỹ thuật chiết dung môi-dung môi (solven-solven extraction), trong

đó tài liệu này mô tả việc sử dụng kết hợp dung môi phân cực và dung môi không phân cực để thu được dịch chiết có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinaza và kháng khuẩn. Tài liệu JP 0500979 cũng đã đề cập kỹ thuật chiết các hoạt chất có trong vỏ lụa hạt điều bằng dung môi để thu được các hoạt chất cardanol và cardol có hoạt tính sinh học.

Tuy nhiên, đối với kỹ thuật đã biết, việc chiết các hoạt chất có trong vỏ lụa hạt điều đều sử dụng các dung môi hữu cơ như metanol, etanol, butanol, etylen, axeton, hexan, etc, cloroform, etyl axetat, butyl axetat, metylen clorit, N-dimetylformamit, dimetyl sulfoxit, 1,3-butanediol, propylen glycol. Việc chiết bằng các dung môi này không chỉ tốn kém mà còn có khả năng gây ô nhiễm môi trường trong quá trình sản xuất. Hơn nữa, các dung môi này có khả năng tương tác với các hoạt chất làm ảnh hưởng đến hoạt tính đồng thời chúng luôn xuất hiện trong sản phẩm cuối và có nguy cơ gây dị ứng khi sử dụng làm thuốc.

Một yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất chiết các hoạt chất có trong vỏ lụa hạt điều đó là đặc tính liên kết của các hoạt chất này. Do phần lớn các hoạt chất tồn tại ở dạng liên kết nên việc sử dụng nước là khó chiết xuất. Một bất lợi nữa đó là các thành phần trong vỏ lụa hạt điều dễ bị biến tính ở nhiệt độ cao, cụ thể là với nhiệt độ chiết trên 80°C sẽ gây biến tính một số hoạt chất, nên thành phần chiết thu được không có hoạt tính mong muốn.

Đã có những cải tiến nhằm loại bỏ việc sử dụng dung môi chiết hoặc điều chỉnh kỹ thuật chiết, ví dụ tài liệu JP 0500979 đã đề cập đến phương pháp chiết siêu tới hạn để chiết xuất các hoạt chất có trong vỏ lụa hạt điều. Mặc dù kỹ thuật này cho hiệu suất chiết tốt, nhưng lại cần thiết bị phức tạp nên có giá thành cao hơn so với phương pháp chiết bằng dung môi. Hơn nữa, trong kết quả phân tích cho thấy, trong cao chiết sử dụng kỹ thuật chiết siêu tới hạn này chủ yếu chứa catechin và epicatechin, nhưng thành phần phenolic tổng cũng như lượng hợp chất epigallocatechin gallate (EGCG) mong muốn, vốn đã được chứng minh về khả năng tiêu diệt tế bào ung thư, lại thấp.

Ngoài ra, mặc dù đã có một số tài liệu đề cập đến việc sử dụng enzyme để chiết polyphenol tổng số từ thực vật hay việc ứng dụng kỹ thuật siêu âm kết hợp với dung môi để chiết alkaloid, ví dụ Sukanya và cộng sự (Sukanya Nag, optimization of ultrasound assisted enzymatic extraction of polyphenols from pomegranate peels based on phytochemical content and antioxidant property, Journal of Food Measurement and

Characterization, 2018) đã đề cập đến kỹ thuật chiết polyphenol từ vỏ quả lựu kết hợp giữa siêu âm và enzym và cho hiệu quả chiết tốt. Tuy nhiên, bằng cách siêu âm phá vỡ vỏ cứng tế bào, sau đó sử dụng enzym cho phép tăng được hiệu suất chiết, nhưng quá trình này có bất lợi bởi quá trình xử lý bằng enzym được tiến hành sau khi xử lý bằng siêu âm khiến tế bào bị phá vỡ trực tiếp bởi enzym nên có những tác động nhất định đến các hoạt chất thu được, đồng thời khó có cách bất hoạt enzym, đặc biệt đối với trường hợp chiết những hoạt chất dễ bị biến tính bởi nhiệt độ cao. Ngoài ra, có một vấn đề đó là đối với vỏ lụa hạt điều khi trương nở trong nước sẽ kết hợp với các thành phần khác tạo ra cấu trúc nhớt và do đó cản trở sự hoạt động cũng như khả năng hoạt động của enzym trong việc phá vỡ tế bào và sản phẩm thu được khó tinh chế vì khó loại tạp chất. Hơn nữa, với những nhóm chất chứa chủ yếu catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate (EGCG), alkyl phenol, cardol, axit ascorbic và tannic từ vỏ hạt điều, nếu tiến hành việc phá vỡ bằng enzym ở nồng độ lớn và bất hoạt ở nhiệt độ cao sẽ ảnh hưởng đến hoạt tính kháng oxy hóa và tế bào ung thư.

Do đó, vẫn cần có quy trình nhằm chiết các hoạt chất có trong vỏ lụa hạt điều với kỹ thuật thân thiện với môi trường và con người, cụ thể là cho phép giảm tối đa lượng hóa chất, dung môi sử dụng để tránh những tồn dư hóa chất gây dị ứng hoặc phá hủy cấu trúc hoạt chất mong muốn, nhưng vẫn đảm bảo được hiệu suất chiết để có thể phát triển được nguồn dược chất có khả năng cạnh tranh và thay thế nguồn dược liệu tổng hợp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể sáng chế đề xuất quy trình sản xuất bột cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa và tế bào ung thư từ vỏ lụa hạt điều. Quy trình theo sáng chế sử dụng hỗn hợp enzym hỗn hợp enzym bao gồm xylanaza, cellulaza và hemicellulaza để phá vỡ vỏ cứng tế bào, và chiết trong điều kiện siêu âm để thu được các hoạt chất sinh học gồm catechin và EGCG có khả năng kháng oxy hóa và kháng ung thư. Quy trình theo sáng chế loại bỏ hoàn toàn việc sử dụng dung môi chiết, thân thiện hơn với môi trường và cho phép thu được sản phẩm an toàn cho người.

Theo đó, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất bột cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa và tế bào ung thư từ vỏ lụa hạt điều, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu nhận vỏ lụa hạt điều (*Anacardium occidentale* L.), sấy khô đến hàm ẩm dưới 10% và xay nhuyễn qua rây kích thước từ 250 μm đến 500 μm thu được nguyên liệu ở dạng bột;

b) xử lý sơ bộ nguyên liệu bằng cách phối trộn nguyên liệu với nước có pH=4,5 theo tỷ lệ nguyên liệu/nước là từ 1/10 đến 1/40 (trọng lượng/thể tích), sau đó bổ sung enzym pectinaza với lượng từ 0,5 đến 2% (trọng lượng/thể tích) và ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 70°C trong khoảng thời gian từ 30 đến 120 phút để phân giải pectin và giảm độ nhớt của nguyên liệu thu được hỗn hợp nguyên liệu được xử lý sơ bộ;

c) phá vỡ vỏ cứng tế bào bằng cách bổ sung một lượng hỗn hợp enzym bao gồm xylanaza, cellulaza và hemicellulaza vào nguyên liệu đã được xử lý sơ bộ với lượng từ 1 đến 4% (trọng lượng/thể tích) và tiếp tục ủ nguyên liệu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 60°C trong khoảng thời gian từ 30 đến 120 phút để phá vỡ vỏ cứng tế bào thu được hỗn hợp chiết;

d) bất hoạt enzym và chiết siêu âm bằng cách gia nhiệt hỗn hợp chiết đến 90°C trong 10 phút để bất hoạt enzym, tiếp đó để nguội và chuyển hỗn hợp chiết vào thiết bị siêu âm và chiết trong điều kiện siêu âm với công suất 40W ở khoảng nhiệt độ từ 30 đến 60°C trong khoảng từ 30 đến 60 phút, sau đó lọc qua màng với cỡ lỗ từ 0,45 đến 2 μm , loại bỏ phần cặn, thu phần dịch chiết; và

e) thu bột cao chiết bằng cách cô phần dịch chiết đến dạng cao đặc, tiếp đó sấy đông khô và nghiền mịn để thu được cao chiết từ vỏ lụa hạt điều dạng bột mịn.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó nước để phối trộn nguyên liệu được điều chỉnh đến pH=4,5 bằng axit clohydric và hỗn hợp enzym được sử dụng trong bước phá vỡ vỏ cứng tế bào bao gồm xylanaza, cellulaza và hemicellulaza có hoạt độ khoảng 100UI và được phối trộn theo tỷ lệ 1:1:1 theo trọng lượng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ thể hiện quy trình sản xuất bột cao chiết từ vỏ lụa hạt điều sử dụng kỹ thuật chiết bằng enzym kết hợp sóng siêu âm.

Hình 2 là biểu đồ thể hiện hiệu suất chiết catechin tổng trong mẫu cao chiết bằng nước (ĐC1), cao chiết bằng enzym (ĐC2) và cao chiết bằng enzym kết hợp sóng siêu âm (TN).

Hình 3 là biểu đồ thể hiện hiệu suất chiết nhóm hợp chất phenolic tổng số từ vỏ lụa hạt điều khi chiết bằng nước (ĐC1), cao chiết bằng enzym (ĐC 2), và cao chiết bằng enzym kết hợp sóng siêu âm (TN).

Hình 4 là biểu đồ thể hiện hiệu suất chiết nhóm hợp chất flavonoit tổng số từ vỏ lụa hạt điều khi chiết bằng nước (ĐC1), chiết bằng enzym (ĐC 2), và chiết bằng enzym kết hợp sóng siêu âm (TN).

Hình 5 là biểu đồ thể hiện hiệu suất chiết hợp chất EGCG từ vỏ lụa hạt điều khi chiết bằng nước (ĐC1), cao chiết bằng enzym (ĐC 2), và cao chiết bằng enzym kết hợp sóng siêu âm (TN).

Hình 6 là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm khả năng kháng oxy hóa thu được từ các mẫu cao chiết khi chiết bằng nước (ĐC1), cao chiết bằng enzym (ĐC2) và cao chiết bằng enzym kết hợp sóng siêu âm (TN).

Hình 7 là biểu đồ thể hiện khả năng kháng tế bào ung thư của mẫu cao chiết từ vỏ lụa hạt điều bằng enzym kết hợp sóng siêu âm được thử nghiệm trên tế bào ung thư MCF-7.

Hình 8 là biểu đồ thể hiện tác động của mẫu cao chiết từ vỏ lụa hạt điều bằng enzym kết hợp sóng siêu âm được thử nghiệm trên tế bào lành tính.

Hình 9: Biểu đồ theo dõi trọng lượng chuột trong thử nghiệm đánh giá độc tính cấp của bột vỏ lụa hạt điều.

Hình 10: Biểu đồ theo dõi trọng lượng chuột trong thử nghiệm đánh giá độc tính bán trường diễn của bột vỏ lụa hạt điều

Hình 11. Biểu đồ các chỉ số xét nghiệm công thức máu của các lô chuột thử nghiệm với các chỉ số WBC (số lượng bạch cầu); RBC (số lượng hồng cầu); HGB (lượng huyết sắc tố); HCT (thể tích khối hồng cầu); MCV (thể tích trung bình hồng cầu); MCH (lượng huyết sắc tố trung bình trong hồng cầu); MCHC (nồng độ huyết sắc tố trung bình trong hồng cầu); RDW (dải phân bố kích thước hồng cầu); PLT (lượng tiểu cầu); MPV (thể tích trung bình tiểu cầu); PDW (dải phân bố kích thước tiểu cầu) và PCT (thể tích khối tiểu cầu)

Hình 12. Ảnh chụp hình ảnh vi thể gan ở độ phóng đại 40X của các lô thử nghiệm độc tính bán trường diễn.

Hình 13. Ảnh chụp hình ảnh vi thể thận ở độ phóng đại 40X của các lô thử nghiệm độc tính bán trường diễn.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất bột cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa và tế bào ung thư từ vỏ lụa hạt điều, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) xử lý sơ bộ nguyên liệu; c) phá vỡ vỏ cứng tế bào bằng enzym; d) bất hoạt enzym và chiết siêu âm; và e) thu bột cao chiết.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, nguyên liệu được sử dụng theo sáng chế là vỏ lụa hạt điều. Vỏ lụa hạt điều thu được từ phần bao ngoài của hạt của cây điều, có tên khoa học là *Anacardium occidentale* L.. Lớp vỏ này bao xung quanh phần hạt, có màu nâu và dễ bong tróc trong quá trình chế biến hạt điều. Thông thường, phần vỏ lụa hạt điều này được tách ra sau khi rang chín hạt điều trong quá trình chế biến. Phần vỏ lụa hạt điều này được sấy khô đến hàm ẩm dưới 10% và xay nhuyễn qua rây với kích thước từ 250 μm đến 500 μm . Quá trình này nhằm thu được nguyên liệu dạng bột để thuận lợi cho quá trình chiết xuất về sau.

Trong bước xử lý sơ bộ nguyên liệu, tiến hành phối trộn nguyên liệu thu được ở trên với nước có pH=4,5. Nước được điều chỉnh bằng axit clohydric đến pH thích hợp. Tiếp đó, bổ sung nguyên liệu theo tỷ lệ nguyên liệu/nước là từ 1/10 đến 1/40 (trọng lượng/thể tích). Sau khi để ổn định, tiến hành bổ sung enzym pectinaza với lượng từ 0,5 đến 2% (trọng lượng/thể tích) và ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 70°C trong khoảng thời gian từ 30 đến 120 phút. Quá trình này nhằm mục đích phân giải pectin và giảm độ nhớt của nguyên liệu. Sau khi xử lý, thu được hỗn hợp nguyên liệu được xử lý sơ bộ.

Trong bước phá vỡ vỏ cứng tế bào bằng enzym, enzym được sử dụng theo sáng chế là hỗn hợp enzym bao gồm xylanaza, cellulaza và hemicellulaza. Các loại enzym được sử dụng nhằm phá vỡ cấu trúc khung xylan và xenlulo của nguyên liệu thực vật trong môi trường nước.

Sau khi xử lý nguyên liệu để phân giải pectin, giảm độ nhớt của nguyên liệu để cho phép enzym được tiếp cận với tế bào nhằm phá vỡ vỏ cứng tế bào thuận lợi. Theo

đó, tiến hành bổ sung hỗn hợp enzym phân giải cấu trúc mô thực vật. Enzym được sử dụng theo sáng chế bao gồm xylanaza cellulaza và hemicellulaza nhằm phá vỡ cấu trúc bên ngoài của tế bào thực vật. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, hỗn hợp enzym được sử dụng trong bước phá vỡ vỏ cứng tế bào bao gồm xylanaza, cellulaza và hemicellulaza có hoạt độ khoảng 100UI và được phối trộn theo tỷ lệ 1:1:1 theo trọng lượng. Tỷ lệ này cho phép quá trình phá vỡ vỏ cứng tế bào được thuận lợi.

Lượng hỗn hợp enzym bao gồm xylanaza, cellulaza và hemicellulaza này được bổ sung từ 1 đến 4% (trọng lượng/thể tích) hỗn hợp nguyên liệu và ủ ở 30 đến 60°C trong khoảng thời gian từ 30 đến 120 phút để phá vỡ vỏ cứng tế bào thu hỗn hợp chiết. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, nhiệt độ ủ tối ưu để thủy phân enzym là từ 40 đến 50°C, theo một phương án ưu tiên cụ thể, nhiệt độ ủ là 45°C. Thời gian ủ tốt nhất nằm trong khoảng từ 60 đến 120 phút, theo các phương án cụ thể, thời gian ủ tốt nhất là từ 90 đến 120 phút để enzym có thể phá vỡ cấu trúc vỏ của tế bào thực vật thu được hỗn hợp chiết. Cần lưu ý rằng, mặc dù quá trình xử lý nguyên liệu nhằm mục đích phá vỡ tế bào, nhưng việc sử dụng hỗn hợp enzym bao gồm xylanaza, cellulaza và hemicellulaza chỉ cho phép phá vỡ lớp vỏ bảo vệ bên ngoài tế bào thực vật chứ chưa phá vỡ cấu trúc tế bào nên quá trình này không cần khuấy hoặc tác động cơ học mạnh.

Sau khi quá trình phá vỡ cấu trúc vỏ tế bào bằng enzym kết thúc, tiến hành bất hoạt enzym bằng cách gia nhiệt hỗn hợp chiết đến 90°C trong 10 phút để bất hoạt enzym. Quá trình này được thực hiện nhanh, tốt nhất là từ 3 đến 5 phút và sau đó được để nguội nhằm hạn chế thấp nhất sự biến tính của các hoạt chất có trong tế bào. Tiếp đó chuyển hỗn hợp chiết vào thiết bị siêu âm và chiết trong điều kiện siêu âm với công suất 40W ở khoảng nhiệt độ từ 30 đến 60°C trong khoảng từ 30 đến 60 phút. Quá trình này cho phép phá vỡ lớp màng bao ngoài của tế bào thực vật sau khi đã được phá vỡ lớp màng cứng bảo vệ để giải phóng các hợp chất nội sinh. Sau đó tiến hành đó lọc qua màng với cỡ lỗ từ 0,45 đến 2µm, loại bỏ phần cặn, thu phần dịch chiết. Bằng cách xử lý kết hợp enzym hai giai đoạn, hỗn hợp thu được cho phép lọc dễ dàng qua màng lọc mà không cần sử dụng các thiết bị chiết tách phức tạp.

Trong bước thu bột cao chiết, tiến hành cô phần dịch chiết đến dạng cao đặc, tốt nhất quá trình này được thực hiện trong điều kiện giảm áp ở nhiệt độ không quá 80°C. Tiếp đó tiến hành sấy đông khô và nghiền mịn để thu được cao chiết từ vỏ lụa hạt điều dạng bột mịn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất cao chiết từ vỏ lụa hạt điều

Để sản xuất cao chiết từ vỏ lụa hạt điều, tiến hành thu gom nguyên liệu là vỏ lụa hạt điều (*Anacardium occidentale* L.), từ quá trình chế biến hạt điều. Tiến hành sấy khô giòn đến hàm ẩm khoảng 10%. Tiếp đó xay nhuyễn và sàng qua rây kích thước lỗ 500 µm thu được nguyên liệu ở dạng bột mịn.

Chuyển 50 lít nước cất vào thiết bị phản ứng, điều chỉnh đến pH=4,5 với bằng axit clohydric. Tiếp đó bổ sung 5 kg nguyên liệu bột vỏ lụa hạt điều, khuấy đều rồi bổ sung 100g enzyme pectinaza hoạt lực 100UI. Tiếp đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong 90 phút để phân giải pectin, giảm độ nhớt của nguyên liệu thu được hỗn hợp lỏng.

Tiếp đó bổ sung 1,1 lít chế phẩm enzyme bao gồm xylanaza, cellulaza và hemicell với mỗi loại có hoạt độ khoảng 100 UI được phối trộn theo tỷ lệ 1:1:1 và ủ trong 120 phút ở 60°C để phá vỡ vỏ cứng tế bào thu hỗn hợp chiết.

Tiếp đó gia nhiệt hỗn hợp chiết đến 90°C trong 10 phút để bất hoạt enzyme. Sau khi để nguội, tiến hành chuyển nhanh hỗn hợp chiết vào thiết bị chiết siêu âm và chiết trong điều kiện siêu âm với công suất 40W ở 50°C trong khoảng 60 phút. Dịch chiết được lọc qua màng với cỡ lỗ 1µm, loại bỏ phần cặn thu phần dịch chiết.

Phần dịch chiết này được cô trong thiết bị cô chân không giảm áp đến dạng cao đặc, tiếp đó sấy đông khô và nghiền mịn thu được cao chiết từ vỏ lụa hạt điều dạng bột mịn.

Để so sánh hiệu suất của phương pháp chiết theo sáng chế (TN), tiến hành chiết với nước (ĐC1) và tiến hành chiết bằng enzyme (ĐC2) trong cùng điều kiện nhiệt độ, thời gian để đánh giá hiệu quả. Kết quả đánh giá được thể hiện trên các biểu đồ từ Hình 2 đến Hình 5.

Kết quả thể hiện trên Hình 2 cho thấy, hàm lượng catechin tổng có trong cao chiết vỏ lụa hạt điều thu nhận từ phương pháp sử dụng enzyme thủy phân kết hợp với siêu âm theo sáng chế (TN) là 19,7 g/100 g bột vỏ. Kết quả này cho thấy quy trình chiết theo sáng chế cho hiệu suất chiết catechin cao hơn so với khi sử dụng enzyme (15,7 g/100g bột vỏ) và cao hơn nhiều so với phương pháp chiết tách bằng nước (9,3 g/100 g bột vỏ). Kết quả này so với các công bố khác cũng cao hơn đáng kể, cụ thể theo US 20200069755

A1, khi chiết tách bằng dung môi etanol 70%, hiệu suất chiết cũng chỉ đạt 15%. Như vậy, hiệu suất chiết catechin bằng phương pháp theo sáng chế (TN) so với phương pháp chiết bằng nước (ĐC1) tăng tới 211,8%, ngay khi so với phương pháp chiết bằng dung môi thông thường cũng tăng tới 131% hoặc bằng enzym (ĐC2) là 125%.

Tương tự, khi so sánh hàm lượng phenolic tổng số từ phương pháp sử dụng enzym thủy phân kết hợp với siêu âm theo sáng chế (TN) là 26,3 g/100 g bột vỏ trong khi mẫu tách bằng nước (ĐC1) chỉ đạt 11,9 g/100 g bột vỏ và mẫu ĐC2 đạt 21,3% (Hình 3). Kết quả này cho thấy quy trình chiết theo sáng chế cho hiệu suất chiết polyphenol tổng số cao hơn tới 221,0% và 110,8% so với phương pháp chiết bằng nước và phương pháp chiết bằng enzym, tương ứng.

Đối với lượng flavonoid tổng số, kết quả được thể hiện trên Hình 4, theo đó phương pháp sử dụng enzym thủy phân kết hợp với siêu âm theo sáng chế (TN) là 24,0 g/100 g bột vỏ trong khi mẫu tách bằng nước (ĐC1) chỉ đạt 10,0 g/100 g bột vỏ và mẫu ĐC2 đạt 18,2%. Kết quả này cho thấy quy trình chiết theo sáng chế cho hiệu suất chiết flavonoid tổng số cao hơn tới 240,0% và 131,8% so với phương pháp chiết bằng nước và phương pháp chiết bằng siêu âm, tương ứng.

Ngoài ra, đối với hàm lượng EGCG có trong cao chiết thu nhận bằng phương pháp sử dụng enzym thủy phân kết hợp sóng siêu âm (TN) vượt trội, đạt tới 9,5 g/100 g bột vỏ (TN), trong khi phương pháp sử dụng riêng enzym (ĐC1) là 3,7 g/100 g bột vỏ còn phương pháp chiết bằng nước (ĐC2) chỉ đạt 1,0 g/100 g bột vỏ. Cùng với catechin, EGCG cũng được chứng minh là chất kháng các loại ung thư một cách hiệu quả và đây là một thành phần quan tâm đáng lưu ý.

Như vậy, kết quả thu được cho thấy quy trình theo sáng chế không chỉ cho phép chiết lượng catechin tổng số vượt trội mà còn thể hiện qua lượng flavonoid, alkaloid và lượng EGCG quan tâm thu được có hiệu suất vượt trội, điều này cho thấy hiệu quả của quy trình chiết kết hợp enzym và siêu âm theo sáng chế.

Ví dụ 2. Thử nghiệm đánh giá độc tính cấp

Chế phẩm thử nghiệm:

Chế phẩm thử nghiệm là mẫu bột cao chiết thu được từ Ví dụ 1 (mẫu TN). Liều thử nghiệm dự kiến được áp dụng cho chuột với lượng 17,6 g/kg thể trọng.

Động vật thử nghiệm:

Động vật được dùng để đánh giá là chuột nhắt trắng chủng *Wiss* khỏe mạnh, trong lượng $25,0 \pm 0,5$ g do Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh cung cấp. Chuột thử nghiệm đạt tiêu chuẩn thử nghiệm được nuôi nhốt riêng từ 3-4 ngày trước khi nghiên cứu và được chia ngẫu nhiên thành các lô, không phân biệt giống. Mỗi con được nhốt riêng một chuồng, sử dụng thức ăn dành riêng cho động vật thử nghiệm. Chuột được cung cấp nước uống đầy đủ. Hàng ngày theo dõi ghi chép diễn biến kết quả thử nghiệm.

Phương pháp thử nghiệm:

Các thử nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT năm 2015 của Bộ Y tế.

Bột vỏ lụa hạt điều được pha trong nước cất với nồng độ đậm đặc tối đa có thể bơm được qua kim cho chuột uống. Qua thăm dò độ hòa tan của bột vỏ lụa hạt điều trong nước và khả năng pha thành dung dịch đậm đặc nhất có thể bơm được qua kim cho chuột uống cho thấy nồng độ tối đa có thể bơm qua kim cho uống là 0,88 g bột/mL. Ở nồng độ này, bột vỏ lụa hạt điều tạo dung dịch dạng gel đặc sệt, nhưng có thể bơm chậm qua kim đầu tù để cho chuột uống.

Chuột được cho nhịn đói qua đêm nhưng cho uống nước đầy đủ trong đêm trước khi tiến hành thí nghiệm. Dùng kim đầu tù cho chuột uống dịch bột vỏ lụa điều hay nước cất theo nhóm chuột như sau:

Nhóm ĐC: cho uống nước cất 20 ml/kg thể trọng chuột;

Nhóm TN: uống dịch bột vỏ lụa điều có nồng độ 0,88 g/mL, thể tích cho uống 20 ml/kg thể trọng chuột (tương ứng với liều 17,6 g bột/kg thể trọng chuột).

Ghi nhận các triệu chứng bất thường (gãi mồm liên tục, chạy hoảng loạn, ngã xiêu vẹo, co giật, run rẩy, tím tái (tai, chân, đuôi), hay nằm co ro, di chuyển chậm chạp, hiện tượng tiêu chảy, màu sắc của phân) và tỉ lệ chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống bột vỏ lụa điều.

Nếu có chuột chết sẽ tiến hành thử nghiệm xác định LD₅₀ (là liều gây chết 50% động vật thử nghiệm) bằng cách thử nghiệm trên nhiều lô chuột khác nhau với dãy liều của bột vỏ lụa điều khảo sát. Dựa trên số thú chết ở các liều khác nhau, tính LD₅₀ theo phương pháp Karber và Behrens.

Nếu không có chuột chết, tiếp tục theo dõi cho đến đủ 14 ngày. Mở quan sát đại thể những chuột chết trong lúc thử nghiệm và sau khi kết thúc đợt thử nghiệm. Nếu có bất thường trên đại thể sẽ tiến hành phân tích hình ảnh vi thể bằng cách tách mẫu mô

bất thường, thực hiện phương pháp nhuộm Hematoxylin – Eosin và phân tích hình thái và biến đổi của các tế bào vùng mô bất thường. Số liệu được xử lý bằng ANOVA với hậu kiểm Bonferroni, các nhóm dữ liệu được coi là khác biệt khi $p < 0,05$.

Kết quả thu được cho thấy sau khi cho chuột uống dịch đậm đặc pha từ bột vỏ lụa hạt điều tương ứng với liều 17,6 g bột/kg thể trọng, tất cả chuột thử nghiệm đều hoạt động bình thường và không khác biệt so với lô chứng uống nước cất. Chuột di chuyển linh hoạt, ăn uống tốt, không có hiện tượng tiêu chảy cũng như không có bất kỳ biểu hiện gì khác thường. Sau 72 giờ theo dõi, chuột hoạt động bình thường và không ghi nhận có chuột chết.

Tiếp tục theo dõi chuột trong vòng 14 ngày cho thấy thể trạng và hoạt động của chuột ở lô bột vỏ lụa hạt điều và lô chứng không khác biệt. Chuột ăn uống tốt, tiêu tiêu bình thường và tăng cân đều trong suốt 2 tuần theo dõi (Hình 9). Ngoài ra, về tổng thể, sau thử nghiệm không thấy có sự bất thường về hình dạng cũng như màu sắc nội tạng và không có sự khác biệt giữa lô uống bột vỏ lụa hạt điều và lô chứng.

Như vậy, mẫu bột vỏ lụa hạt điều an toàn đối với chuột thử nghiệm ở liều tối đa cho chuột uống được là 17,6 g bột/kg/ngày; không nhận thấy bất kỳ triệu chứng độc tính cấp nào, không thấy có chuột bị chết, chưa xác định được liều LD50 nên mẫu thử nghiệm. Như vậy có thể thấy rằng mẫu bột cao chiết thu được từ vỏ lụa hạt điều an toàn, không gây độc cho động vật thử nghiệm.

Ví dụ 3. Thử nghiệm đánh giá độc tính bán trường diễn

Để đánh giá độc tính bán trường diễn, tiến hành đánh giá độc tính đối mẫu bột chiết thu được từ Ví dụ 1 (mẫu TN). Thử nghiệm được tiến hành với chuột như ở Ví dụ 2. Các phương pháp phân tích, xử lý số liệu được xử lý bằng ANOVA với hậu kiểm Bonferroni, các nhóm dữ liệu được coi là khác biệt khi $p < 0,05$.

Bột vỏ lụa hạt điều pha trong nước cất và được pha mới mỗi ngày thành các dung dịch có nồng độ 88 mg/mL, 17,6 mg/mL và 8,8 mg/mL.

Chuột thử nghiệm được chia ngẫu nhiên thành các lô, mỗi lô 20 con, lô đối chứng 10 con như sau:

+ TN880: Liều dùng 880 mg/kg, chuột uống dung dịch 88 mg/mL, thể tích 10 mL/kg; tương ứng với liều 880 mg/kg.

+ TN176: Liều dùng 176 mg/kg, chuột uống dung dịch 17,6 mg/mL, thể tích 10 mL/kg; tương ứng với liều 176 mg/kg.

+ TN88: Liều dùng 88 mg/kg, chuột uống dung dịch 8,8 mg/mL, thể tích 10 mL/kg; tương ứng với liều 88 mg/kg.

+ ĐC: Chuột được cho uống nước cất, thể tích 10 mL/kg.

Chuột tham gia thử nghiệm được sử dụng dung dịch bột vỏ lụa điều hay nước cất mỗi ngày, 1 lần/ngày trong vòng 28 ngày.

Sau khi kết thúc 28 ngày thử nghiệm, chuột được gây mê bằng đá CO₂ và chuột được mổ để bộc lộ tim và nhanh chóng lấy máu tim để phân tích công thức máu và đánh giá một số thông số sinh hóa gan, thận (ALT, AST, billirubin, creatinin, urea) do Phòng khám Tao Đàn thực hiện. Quan sát đại thể gan, thận và tiến hành tách gan, thận ngâm trong dung dịch formalin 10 % để xử lý, cắt lát (độ dày 5 μ m) và nhuộm Hematoxylin – Eosin và thực hiện phân tích hình thái và bất thường của các mẫu mô qua quan sát dưới kính hiển vi ở các độ phóng đại khác nhau (40x, 100x) tại khoa giải phẫu bệnh – Bệnh viện Chợ Rẫy.

Trong vòng 28 ngày cho uống bột vỏ lụa hạt điều và theo dõi cho thấy thể trạng và hoạt động của chuột ở các lô uống bột vỏ lụa hạt điều không khác biệt so với lô chứng. Chuột ở các lô đều có lông mượt, vận động nhanh nhẹn; lượng thức ăn tiêu thụ và tình trạng tiêu tiêu của các lô uống bột vỏ lụa hạt điều không khác lô chứng. Kết quả được thể hiện trên Hình 10.

Theo kết quả thu được, nhìn chung, trọng lượng của chuột lô chứng tăng đều trong 28 ngày theo dõi (hình 2); so với thời điểm ban đầu, cân nặng chuột ở ngày 28 tăng 18,42 %. Trong khi đó, trọng lượng các lô chuột uống bột vỏ lụa hạt điều tăng ít hơn.

Tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ tăng cân của nhóm chuột uống bột vỏ lụa điều liều 88 mg/kg và 176 mg/kg vào cuối thử nghiệm so với nhóm chứng; riêng cân nặng của nhóm chuột uống liều 880 mg/kg chỉ tăng 2,75 % so với ban đầu và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng từ ngày 7 cho đến hết thử nghiệm. Kết quả đánh giá được tổng hợp trên Bảng 1.

Bảng 1: Trọng lượng chuột của các lô chuột thử nghiệm

Lô thử nghiệm	Ngày 1	Ngày 28	Tăng cân so với ban đầu (%)
ĐC	27,36 \pm 1,00	32,40 \pm 1,51	18,42
TN88	25,64 \pm 0,40	29,60 \pm 0,82	15,44
TN176	26,02 \pm 0,49	29,40 \pm 1,29	12,99
TN880	25,50 \pm 0,50	26,20 \pm 0,75	2,75

Các chỉ số xét nghiệm công thức máu của các nhóm thử nghiệm đánh giá độc tính bán trường diễn được trình bày ở hình 11. Kết quả các chỉ số xét nghiệm được trình bày trong Bảng 2 và Bảng 3. Trong đó $p < 0,05$ so với lô chứng. Các thông số xét nghiệm bao gồm: WBC (White Blood Cells - số lượng bạch cầu); RBC (Red Blood Cells - số lượng hồng cầu); HGB (Hemoglobin - lượng huyết sắc tố); HCT (Hematocrit - thể tích khối hồng cầu); MCV (Mean Corpuscular Volume - thể tích trung bình hồng cầu); MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin - lượng huyết sắc tố trung bình trong hồng cầu); MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration - nồng độ huyết sắc tố trung bình trong hồng cầu); RDW (Red Distribution Width - dải phân bố kích thước hồng cầu); PLT (Platelet - số lượng tiểu cầu); MPV (Mean Platelet Volume - thể tích trung bình tiểu cầu); PDW (Platelet Distribution Width - dải phân bố kích thước tiểu cầu); PCT (Plateletcrit - thể tích khối tiểu cầu).

Bảng 2. Các chỉ số về công thức máu của lô chuột thử nghiệm

Lô thử nghiệm	WBC ($10^9/L$)	HGB (g/L)	RBC ($10^{12}/L$)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	PCT (%)
ĐC	$12,78 \pm 2,19$	$14,52 \pm 0,24$	$8,82 \pm 0,19$	$45,08 \pm 0,82$	$51,24 \pm 1,13$	$16,44 \pm 0,37$	$0,46 \pm 0,03$
TN88	$7,35^* \pm 0,77$	$13,78 \pm 0,17$	$8,30 \pm 0,11$	$42,95 \pm 0,61$	$51,83 \pm 0,51$	$16,56 \pm 0,18$	$0,53 \pm 0,03$
TN176	$8,10 \pm 1,21$	$13,66 \pm 0,27$	$8,32 \pm 0,17$	$42,61 \pm 1,00$	$51,29 \pm 0,60$	$16,38 \pm 0,13$	$0,38 \pm 0,05$
TN880	$8,90 \pm 0,88$	$13,18 \pm 0,40$	$8,14 \pm 0,20$	$40,61 \pm 1,17$	$49,94 \pm 0,68$	$16,13 \pm 0,24$	$0,33 \pm 0,06$

Bảng 3. Các chỉ số về công thức máu của lô chuột thử nghiệm

Lô thử nghiệm	MCHC (g/L)	RDW (%)	PLT ($10^9/L$)	MPV (fL)	PDW (%)	PCT (%)
ĐC	$32,16 \pm 0,20$	$16,62 \pm 0,29$	$697,60 \pm 46,22$	$6,68 \pm 0,33$	$15,72 \pm 0,33$	$0,46 \pm 0,03$
TN88	$32,03 \pm 0,23$	$16,74 \pm 0,23$	$788,75 \pm 52,99$	$6,76 \pm 0,25$	$16,31 \pm 0,32$	$0,53 \pm 0,03$
TN176	$32,04 \pm 0,31$	$17,04 \pm 0,28$	$579,00 \pm 72,51$	$6,58 \pm 0,33$	$15,84 \pm 0,45$	$0,38 \pm 0,05$
TN880	$32,39 \pm 0,34$	$18,05 \pm 0,62$	$505,38 \pm 100,01$	$6,41 \pm 0,20$	$15,26 \pm 0,22$	$0,33 \pm 0,06$

Kết quả đánh giá chức năng gan của chuột được trình bày trong Bảng 4. Theo đó cho thấy so với nhóm ĐC, hoạt độ các enzym gan (AST, ALT) của các nhóm TN88,

TN176 và TB888 có xu hướng tăng theo liều thử nghiệm tăng dần trong khi hàm lượng bilirubin giảm dần. Tuy nhiên, những thay đổi này chưa đạt ý nghĩa lâm sàng về tình trạng viêm gan trên động vật thử nghiệm cũng như không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm ĐC.

Bảng 4: Kết quả đánh giá chức năng gan

Lô thử nghiệm	Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)			AST (U/L)	ALT (U/L)
	Toàn phần	Trực tiếp	Gián tiếp		
ĐC	5,18 \pm 0,48	1,28 \pm 0,07	3,90 \pm 0,44	126,32 \pm 11,21	41,08 \pm 8,20
TN880	4,75 \pm 0,23	1,29 \pm 0,02	3,46 \pm 0,23	163,73 \pm 18,40	64,95 \pm 10,19
TN176	4,89 \pm 0,28	1,28 \pm 0,04	3,61 \pm 0,27	163,68 \pm 8,72	51,61 \pm 6,33
TN88	4,34 \pm 0,30	1,25 \pm 0,03	3,09 \pm 0,28	157,45 \pm 5,08	46,74 \pm 4,41

Các chỉ số sinh hóa đánh giá chức năng thận của chuột được trình bày ở Bảng 5. Nhìn chung, hàm lượng creatinin và urea của các lô uống bột vỏ lụa hạt điều không thay đổi đáng kể và không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng.

Bảng 5: Kết quả đánh giá chức năng thận

Lô thử nghiệm	Creatinin (mmol/L)	Urea ($\mu\text{mol/L}$)
ĐC	43,92 \pm 2,44	7,91 \pm 0,82
TN880	47,79 \pm 1,04	8,43 \pm 0,63
TN176	51,41 \pm 2,45	8,72 \pm 0,24
TN88	47,7 \pm 0,56	10,35 \pm 0,85

Kết quả vi phẫu quan sát mẫu gan chuột ở cả 3 lô uống bột vỏ lụa hạt điều so với lô chứng cho thấy mẫu gan ở các lô đều có màu đỏ tươi, bề mặt láng mịn, đồng đều về màu sắc, không sung huyết hay phù nề; dịch mật vàng trong, túi mật bình thường.

Quan sát trên tiêu bản vi thể gan cho thấy tế bào gan có kích thước tương đối đồng đều, tĩnh mạch trung tâm không xung huyết, bào tương tế bào bắt màu hồng mịn, nhân tế bào tròn, rõ (Hình 12, trong đó (1) Tế bào gan bình thường; (2) Tế bào gan thoái hóa mỡ; (3) Viêm quanh tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy). Đa số các tiêu bản đều rải rác có các tế bào gan thoái hóa mỡ ở mức độ nhẹ. Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy gan và vùng

khoảng cửa không bị xơ hóa, một số tiêu bản có sự xâm nhập tế bào viêm (bạch cầu đơn nhân và đa nhân) dẫn đến tình trạng viêm khoảng cửa và tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy nhẹ. Các hiện tượng này xuất hiện ở cả 4 lô và không có sự khác biệt giữa các lô thử nghiệm.

Kết quả đánh giá tổng thể mức độ viêm gan trên tiêu bản vi thể gan chuột cho thấy chuột ở các lô uống vỏ lụa hạt điều và chuột chứng có mức độ viêm gan từ nhẹ đến rất nhẹ và không khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các lô thử nghiệm. Kết quả được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Đánh giá vi thể gan chuột của các lô thử nghiệm

Lô	Tỷ lệ viêm gan mạn	
	Rất nhẹ (%)	Nhẹ (%)
ĐC	40	60
TN880	25	75
TN176	37,5	62,5
TN88	37,5	62,5

Kết quả vi phẫu thận được thể hiện trên Hình 13, trong đó (1) Cầu thận; (2) Ống thận. Kết quả hình ảnh vi thể thận của chuột lô sinh lý đều bình thường, không có thay đổi về cấu trúc, hình thái tế bào thận. Các tế bào ống thận không hoại tử, mô đệm không xâm nhập viêm và không xơ hóa. Cầu thận có cấu trúc bình thường, khoang Bowman rõ. Các tế bào ống thận đều nhau, cấu trúc rõ, các tế bào biểu mô ống thận bình thường. Hình ảnh vi thể thận của các nhóm TN880, TN176 và TN88 và lô ĐC đều bình thường và không có sự khác biệt giữa các lô.

Như vậy, với kết quả thử nghiệm độc tính bán trường diễn cho thấy, mẫu bột vỏ lụa điều được cho uống mỗi ngày liên tục trong vòng 28 ngày ở 3 mức liều 880 mg/kg, 176 mg/kg và 88 mg/kg. Trọng lượng chuột ở các lô uống bột vỏ lụa điều tăng cân chậm hơn so với lô chứng, trong đó, những chuột uống liều 880 mg/kg gần như không thay đổi trọng lượng trong suốt quá trình thử nghiệm và khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ tăng cân so với lô chứng. Điều này gợi ý tác dụng giảm cân của bột vỏ lụa điều ở mức liều 880 mg/kg. Các thông số sinh hóa gan – mật của nhóm uống bột vỏ lụa điều tuy có thay đổi nhưng chưa đạt ý nghĩa trên lâm sàng. Bên cạnh đó, vi phẫu gan chuột ở các lô có tình trạng viêm gan mạn nhẹ - rất nhẹ và không khác biệt giữa các lô uống bột vỏ lụa điều so với lô chứng. Chức năng thận của chuột phản ánh qua xét nghiệm

creatinine và urea cũng như vi thể thận cho thấy chức năng thận của các lô chuột đều bình thường và không khác biệt giữa các lô uống bột vỏ lụa điều và lô chứng. Đối với ảnh hưởng của bột vỏ lụa điều trên chức năng tạo máu phản ánh qua các chỉ số trong công thức máu, kết quả cho thấy công thức máu của các lô chuột uống bột vỏ lụa điều và lô chứng không khác biệt có ý nghĩa thống kê, ngoại trừ chỉ số số lượng bạch cầu. Cả 3 lô uống bột vỏ lụa điều đều bị giảm số lượng bạch cầu và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 3 lô thử nghiệm. Hiện tượng này có thể liên quan đến tác dụng giảm cân, ức chế lipase làm giảm hấp thu chất béo và giảm tổng hợp mô mỡ của bột vỏ lụa điều. Một số nghiên cứu cho thấy mô mỡ là một trong những thành phần quan trọng tham gia vào quá trình viêm và điều hòa miễn dịch. Mô mỡ tổng hợp và phóng thích các yếu tố tiền viêm và kháng viêm (leptin, adiponectin, resistin) và các cytokin và chemokin (TNF- α , IL-6, MCP 1), thu hút các đại thực bào và bạch cầu; điều này dẫn đến số lượng bạch cầu và các yếu tố gây viêm giảm ở những đối tượng suy dinh dưỡng, nhưng lại tăng ở người béo phì. Tuy nhiên, tình trạng giảm số lượng bạch cầu cũng có thể do bột vỏ lụa điều làm tổn thương tủy xương, từ đó làm giảm sản xuất các tế bào máu, trong đó có bạch cầu. Do đó, cần theo dõi và đánh giá ảnh hưởng của bột vỏ lụa điều trên chức năng tạo máu với thời gian thử nghiệm dài hơn và cỡ mẫu lớn hơn. Ngoài ra, giảm bạch cầu cũng là một trong những tác dụng không mong muốn thường gặp đối với các thuốc kháng ung thư, thuốc kháng sinh, thuốc kháng giáp. Do đó, cần thận trọng khi đánh giá các tác dụng điều trị này nên tiến hành song song đánh giá tác dụng phụ của mẫu thử.

Như vậy, nhìn chung, bột vỏ lụa điều tương đối an toàn, trong thử nghiệm độc tính tính bán trường diễn cho thấy bột vỏ lụa điều có xu hướng làm giảm cân và làm giảm số lượng bạch cầu sau 28 ngày sử dụng.

Ví dụ 4. Thử nghiệm đánh giá khả năng kháng oxy hóa

Để đánh giá hiệu quả kháng oxy hóa, mẫu bột thu được từ Ví dụ 1 được đưa đi thử nghiệm khả năng kháng oxy hóa theo quy trình thử nghiệm chuẩn. Thử nghiệm được tiến hành bởi bên thứ 3, Kết quả được thể hiện như nêu trong Hình 6.

Kết quả được thể hiện trên Hình 6, trong đó cho thấy cao chiết vỏ lụa hạt điều thu nhận bằng phương pháp sử dụng enzym thủy phân kết hợp sóng siêu âm (TN) có khả năng kháng oxy hóa cao hơn so với mẫu cao chiết thu nhận bằng phương pháp sử dụng enzym thủy phân (ĐC2) và mẫu cao chiết thu được bằng phương pháp chiết bằng nước (ĐC1).

Ví dụ 5. Thử nghiệm đánh giá khả năng kháng tế bào ung thư

Để đánh giá tác động của mẫu bột thu được từ vỏ lụa hạt điều thu được từ Ví dụ 1 lên tế bào ung thư, tiến hành thử nghiệm với các nồng độ khác nhau, từ 0 đến 100 μ m/mL với dòng tế bào ung thư vú MCF-7. Cụ thể các thử nghiệm được tiến hành với các nồng độ pha loãng được khảo sát từ 0 đến 100 μ g/mL.

Hoạt chất đối chứng sử dụng sản phẩm thương mại Doxorubicin (DOX) với nồng độ pha loãng được khảo sát từ 0 đến 100 μ g/mL, tương ứng.

Tế bào đối chứng được sử dụng là tế bào vú lành tính. Các thử nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần, ngẫu nhiên.

Tế bào ung thư vú và tế bào lành tính được nuôi trong môi trường MEM bổ sung 10% FBS ở 37 $^{\circ}$ C trong tủ ấm CO₂ (5% CO₂). Tế bào phát triển trong bình nuôi cấy 1 lớp, đạt đến pha log. Tế bào được tách khỏi bình và tách rời nhau bằng tripsin. Tiếp đó đếm và cấy lại vào môi trường thạch loãng (0,35 % với thạch mặt và 0,5% với thạch nền) với nồng độ tế bào 1 x 10⁴ tế bào/mL.

Các hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ tăng dần từ 0 đến 100 μ g/ml. Tế bào được nhân, nuôi cấy trong điều kiện chuẩn theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Sau 15 ngày nuôi cấy, tế bào được lấy ra và nhuộm bằng tím kết tinh 0,005%, đọc kết quả dưới kính hiển vi đảo pha có gắn camera và nối ra máy tính. Hoạt tính ức chế hình thành khối u trên thạch được tính lặp lại 3 lần so sánh % số lượng tế bào sống so với tổng số tế bào được nuôi cấy. Kết quả được thể hiện trên Hình 7 và Hình 8.

Theo kết quả trên Hình 7 cho thấy khả năng kháng ung thư vú MCF-7 của cao chiết thu được từ Ví dụ 1 bằng enzym thủy phân kết hợp sóng siêu âm so với sản phẩm thương mại dùng để trị ung thư. Kết quả ở Hình 7 cho thấy cao chiết vỏ lụa điều có khả năng kháng ung thư vú MCF-7 ở hàm lượng từ 50 μ g/ml trở lên. Khi sử dụng cao chiết ở hàm lượng 100 μ g/ml có khả năng tiêu diệt gần 80% tế bào ung thư, tương đương với khi sử dụng sản phẩm thương mại Doxorubicin (DOX) ở hàm lượng 60 μ g/ml. Tuy nhiên kết quả trong Hình 8 cho thấy rằng mức độ an toàn của cao chiết vỏ lụa hạt điều đối với tế bào lành tính cao hơn nhiều so với sản phẩm thương mại DOX. Khi sử dụng cao chiết ở hàm lượng 100 μ g/ml thì tỷ lệ tế bào lành tính còn sống là gần 90% so với chỉ có 30% tế bào lành tính sống sót khi sử dụng sản phẩm chữa ung thư thương mại DOX.

Điều này cho thấy khả năng ứng dụng của cao chiết từ vỏ lụa hạt điều trong việc tiêu diệt tế bào ung thư, mở ra hướng sản xuất thuốc điều trị ung thư an toàn so với chế phẩm điều trị ung thư hiện có trên thị trường.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình sản xuất bột cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa và tế bào ung thư từ vỏ lụa hạt điều theo sáng chế áp dụng kỹ thuật chiết bằng enzym và kỹ thuật chiết siêu âm cho phép loại bỏ hoàn toàn việc sử dụng các loại dung môi mạnh, chỉ sử dụng nước nên đảm bảo an toàn về mặt sinh học và không gây ô nhiễm môi trường trong quá trình sản xuất. Kỹ thuật này không cần các thiết bị phức tạp, đắt tiền như kỹ thuật chiết siêu tới hạn, mở ra một hướng tiếp cận mới, cho phép sản xuất bột cao chiết làm nguồn dược liệu an toàn cho người.

Quy trình theo sáng chế cho phép giảm chi phí sản xuất cũng như giảm giá thành, tận dụng được nguồn nguyên liệu rẻ tiền, là phế thải của quá trình sản xuất hạt điều, tăng giá trị cho cây điều đồng thời giảm chi phí xử lý ô nhiễm rác thải. Quy trình cho phép chiết triệt để các hoạt chất trong vỏ lụa hạt điều với hiệu suất cao, đủ sức cạnh tranh với nguồn nguyên liệu khác, kể cả từ tự nhiên hoặc tổng hợp.

Sản phẩm thu được từ quy trình chiết theo sáng chế không chứa dư lượng hóa chất từ dung môi chiết nên loại bỏ hoàn toàn những dị ứng do dung môi gây ra. Sản phẩm thu được từ quy trình theo sáng chế chứa hàm lượng catechin và hàm lượng EGCG cao, có khả năng kháng oxy hóa và đặc biệt có khả năng kháng ung thư và an toàn cho động vật thử nghiệm. Hiện nay Việt Nam là một trong những nước sản xuất và xuất khẩu điều lớn nhất thế giới, do đó một lượng lớn phụ phẩm vỏ hạt điều cũng bị thải ra gây ô nhiễm môi trường trong khi đó đây là nguồn nguyên liệu rẻ tiền để sản xuất sản phẩm có chứa hàm lượng catechin và EGCG có khả năng kháng ung thư so với sử dụng nguyên liệu trà xanh. Do đó phương pháp của sáng chế này góp phần tạo ra các sản phẩm có lợi cho sức khỏe con người và làm tăng giá trị kinh tế của nguồn phụ phẩm của ngành công nghiệp chế biến điều.

Quy trình theo sáng chế có thể áp dụng để chiết xuất nhóm phenol và alkaloit từ nguồn nguyên liệu thực vật khác cho phép phát triển, ứng dụng để phát triển nguyên liệu dược, thực phẩm và mỹ phẩm từ thực vật theo tiêu chí xanh, sạch và an toàn, giảm thiểu các tác động đến cấu trúc và hoạt tính của chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất bột cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa và tế bào ung thư từ vỏ lụa hạt điều, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu nhận vỏ lụa hạt điều (*Anacardium occidentale* L.), sấy khô đến hàm ẩm dưới 10% và xay nhuyễn qua rây kích thước từ 250 μm đến 500 μm thu được nguyên liệu ở dạng bột;

b) xử lý sơ bộ nguyên liệu bằng cách phối trộn nguyên liệu với nước có pH=4,5 theo tỷ lệ nguyên liệu/nước là từ 1/10 đến 1/40 (trọng lượng/thể tích), sau đó bổ sung enzym pectinaza với lượng từ 0,5 đến 2% (trọng lượng/thể tích) và ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 70°C trong khoảng thời gian từ 30 đến 120 phút để phân giải pectin và giảm độ nhớt của nguyên liệu thu được hỗn hợp nguyên liệu được xử lý sơ bộ;

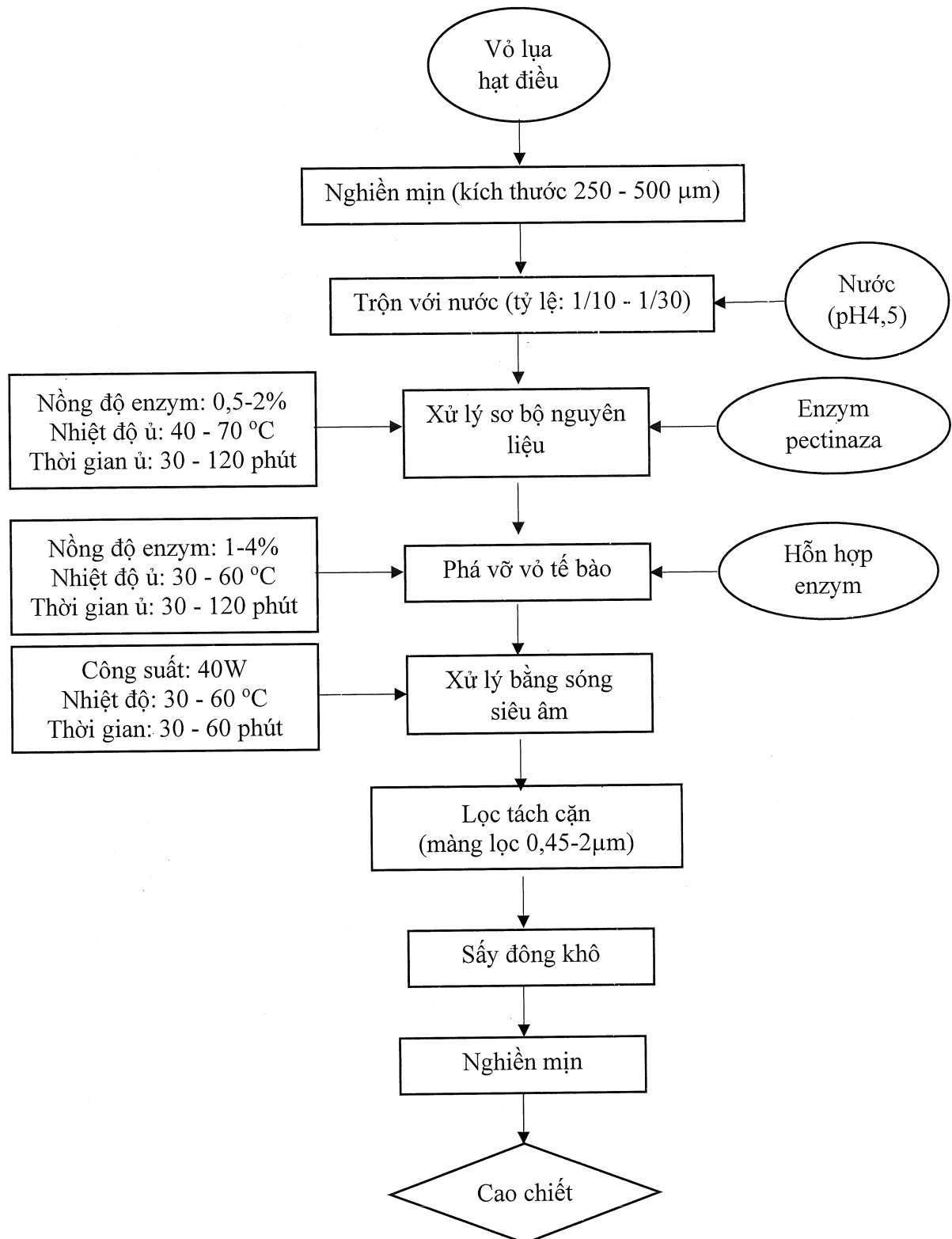
c) phá vỡ vỏ cứng tế bào bằng cách bổ sung một lượng hỗn hợp enzym bao gồm xylanaza, cellulaza và hemicellulaza vào nguyên liệu đã được xử lý sơ bộ với lượng từ 1 đến 4% (trọng lượng/thể tích) và tiếp tục ủ nguyên liệu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 60°C trong khoảng thời gian từ 30 đến 120 phút để phá vỡ vỏ cứng tế bào thu được hỗn hợp chiết;

d) bất hoạt enzym và chiết siêu âm bằng cách gia nhiệt hỗn hợp chiết đến 90°C trong 10 phút để bất hoạt enzym, tiếp đó để nguội và chuyển hỗn hợp chiết vào thiết bị siêu âm và chiết trong điều kiện siêu âm với công suất 40W ở khoảng nhiệt độ từ 30 đến 60°C trong khoảng từ 30 đến 60 phút, sau đó lọc qua màng với cỡ lỗ từ 0,45 đến 2 μm , loại bỏ phần cặn, thu phần dịch chiết; và

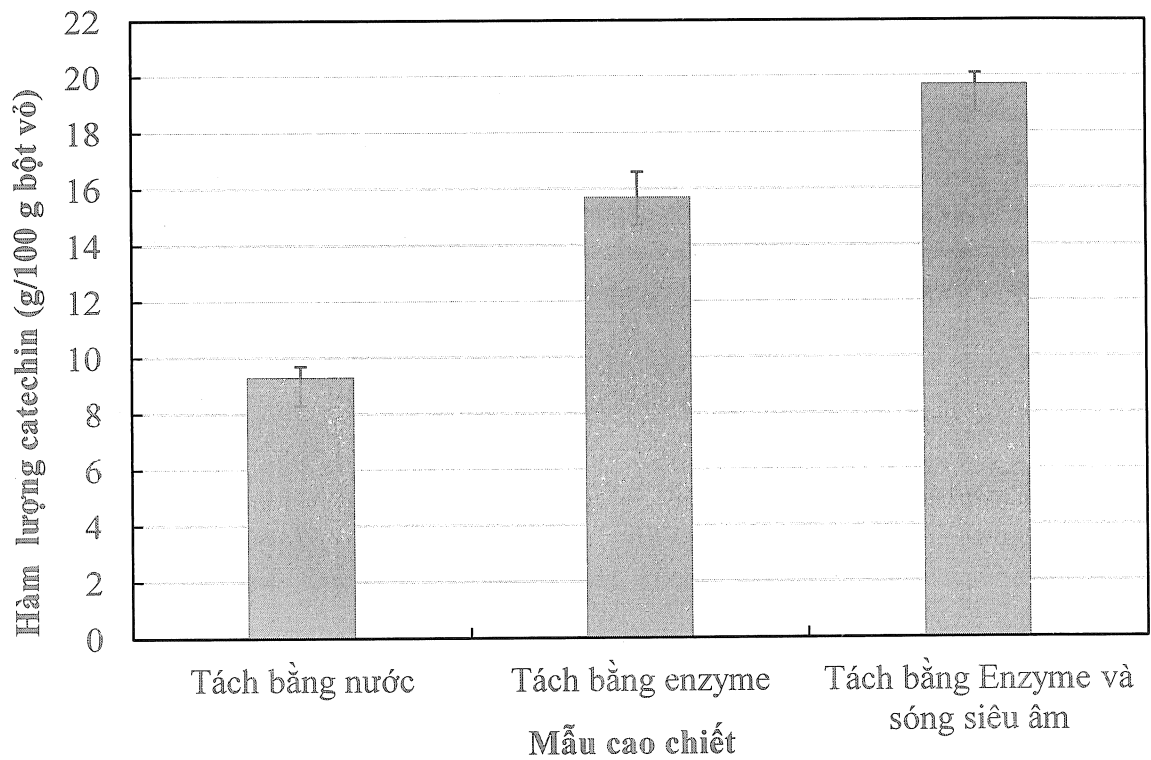
e) thu bột cao chiết bằng cách cô phần dịch chiết đến dạng cao đặc, tiếp đó sấy đông khô và nghiền mịn để thu được cao chiết từ vỏ lụa hạt điều dạng bột mịn.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó nước để phối trộn nguyên liệu được điều chỉnh đến pH=4,5 bằng axit clohydric và hỗn hợp enzym được sử dụng trong bước phá vỡ vỏ cứng tế bào bao gồm xylanaza, cellulaza và hemicellulaza có hoạt độ khoảng 100UI và được phối trộn theo tỷ lệ 1:1:1 theo trọng lượng.

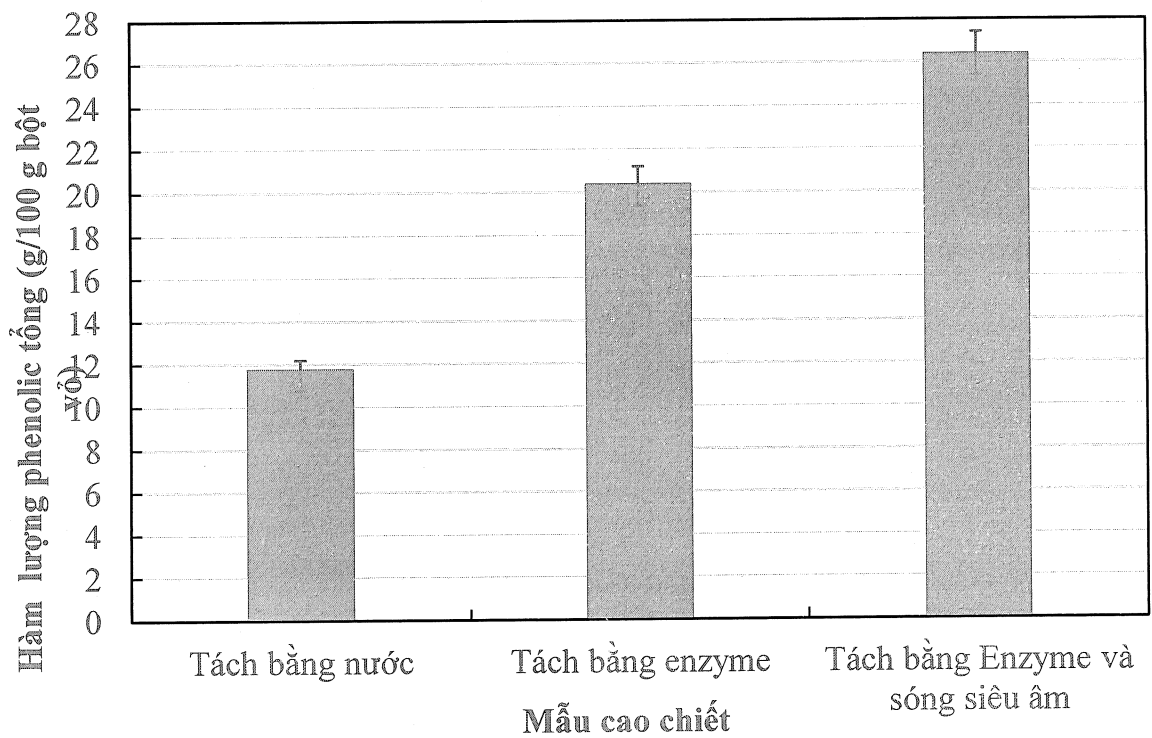
HÌNH 1



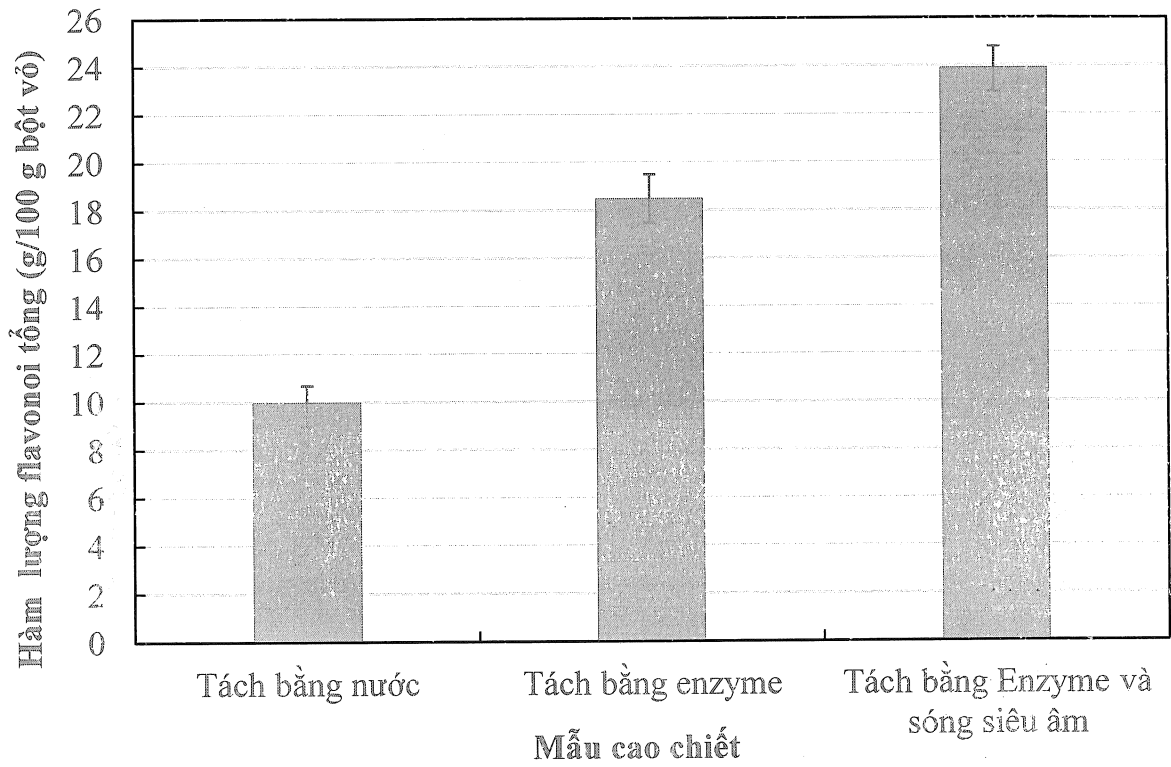
HÌNH 2



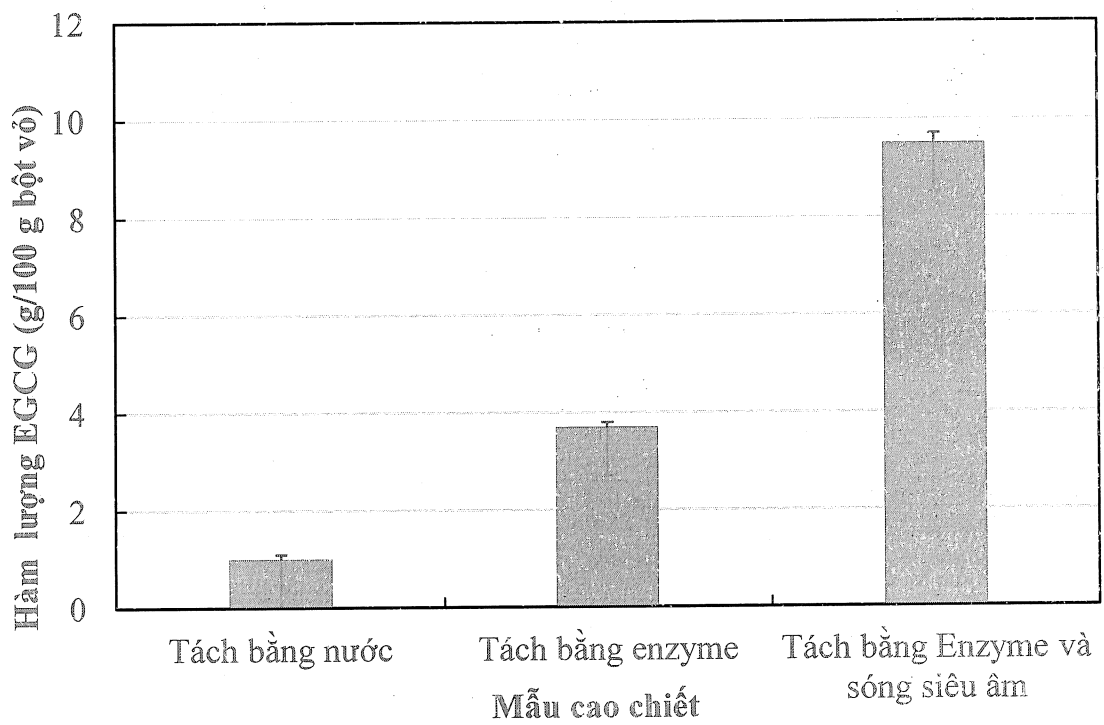
HÌNH 3



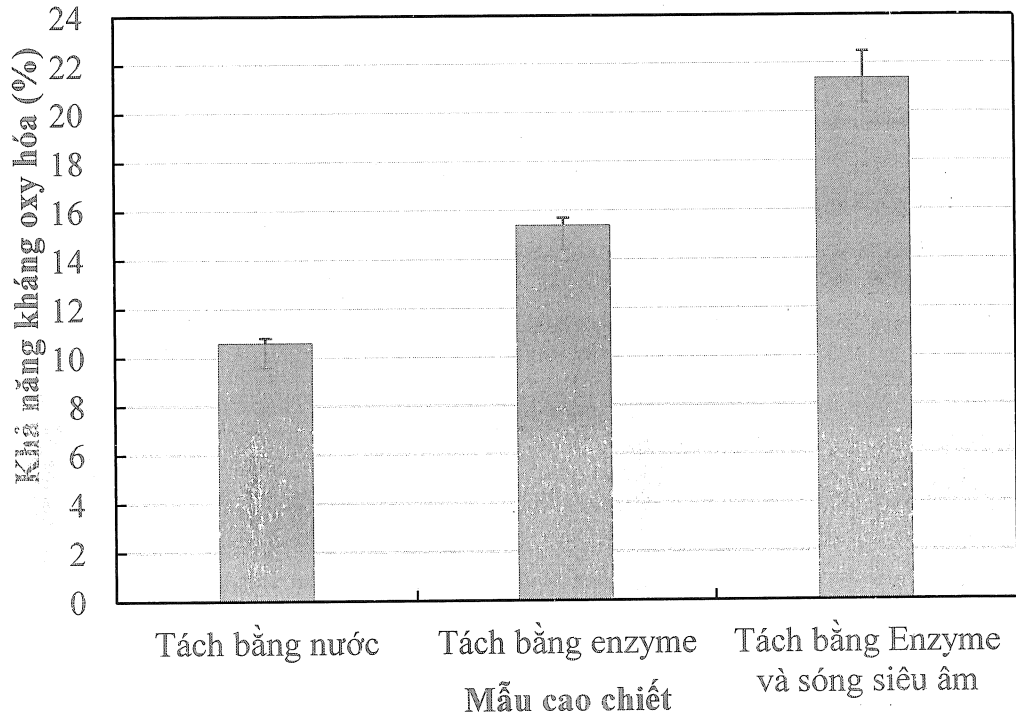
HÌNH 4



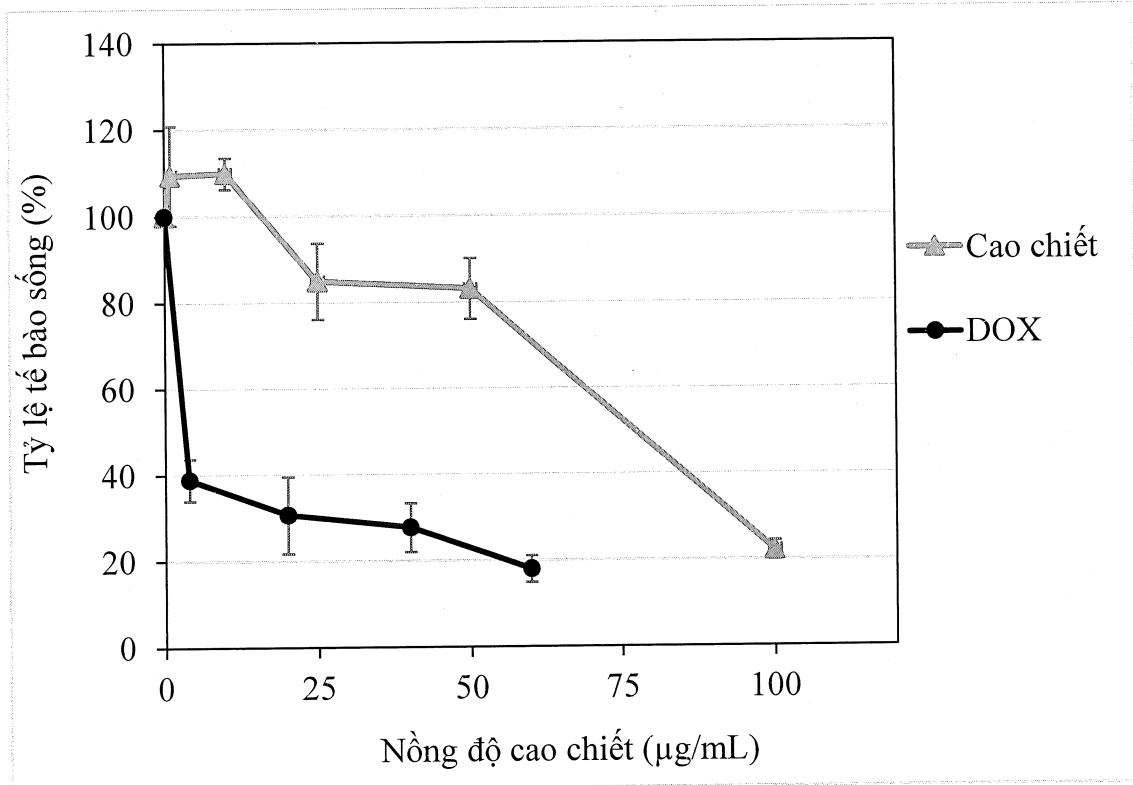
HÌNH 5



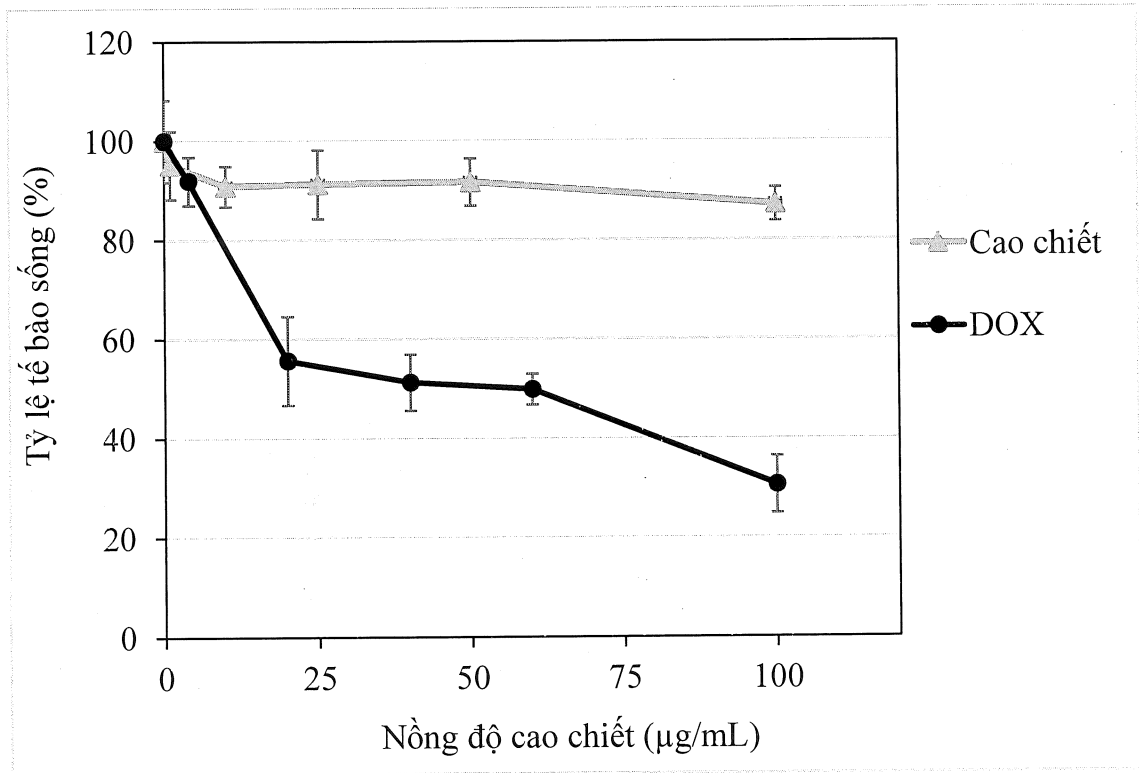
HÌNH 6



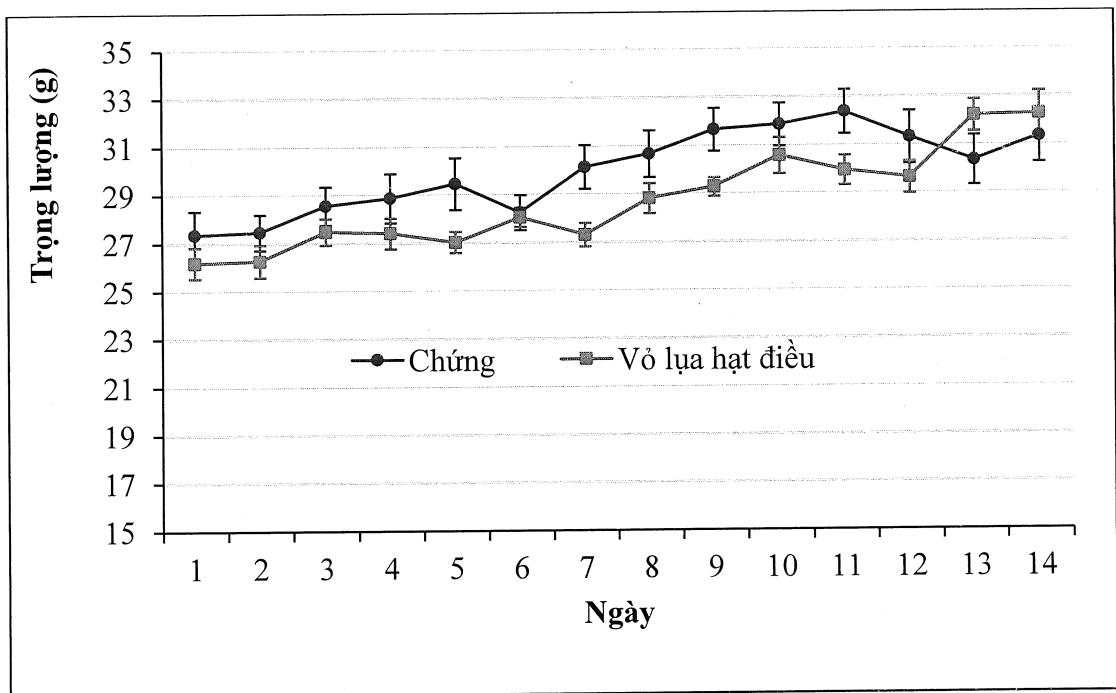
HÌNH 7



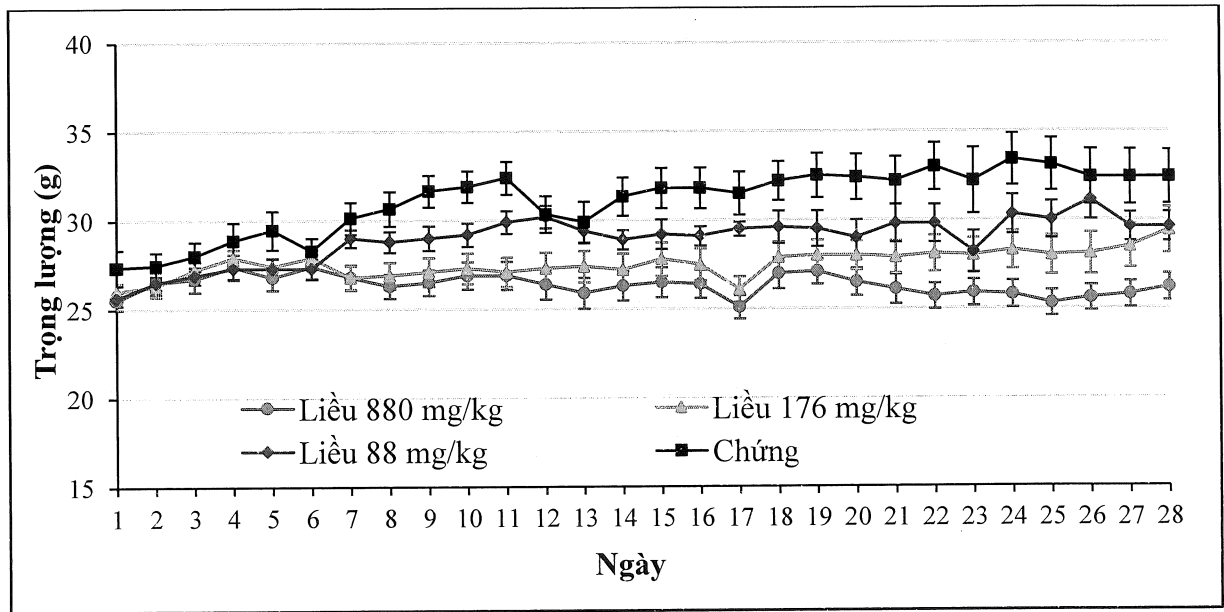
HÌNH 8



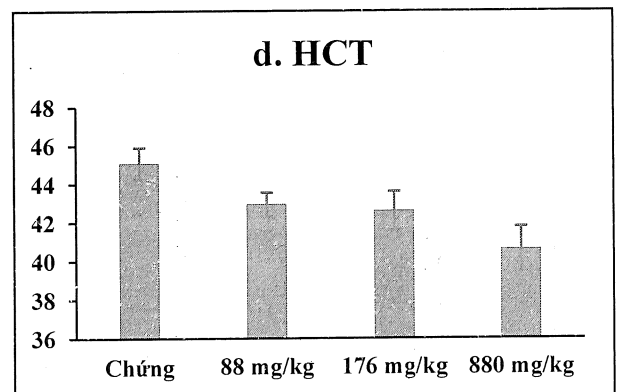
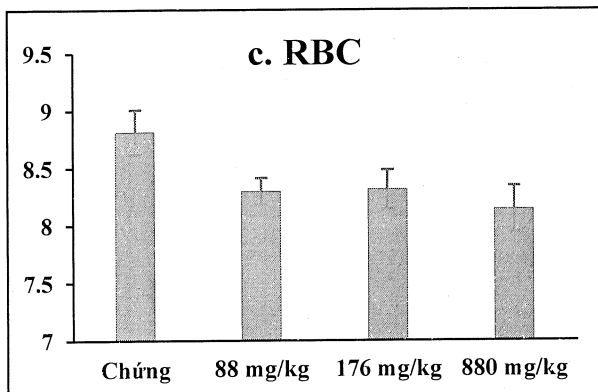
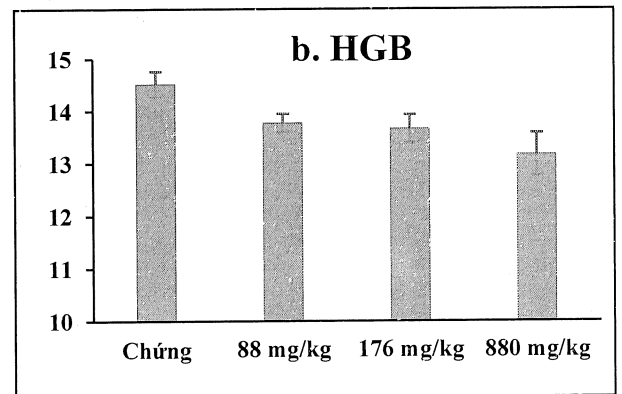
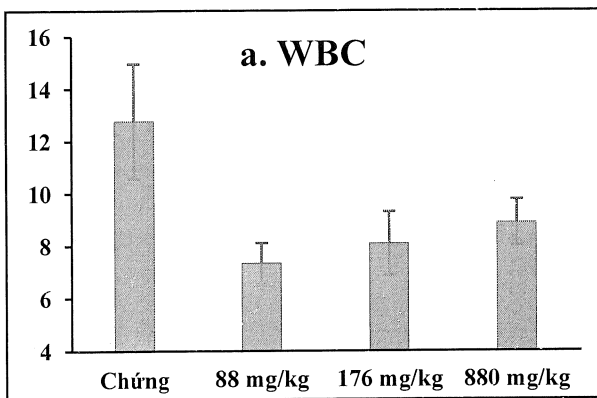
HÌNH 9



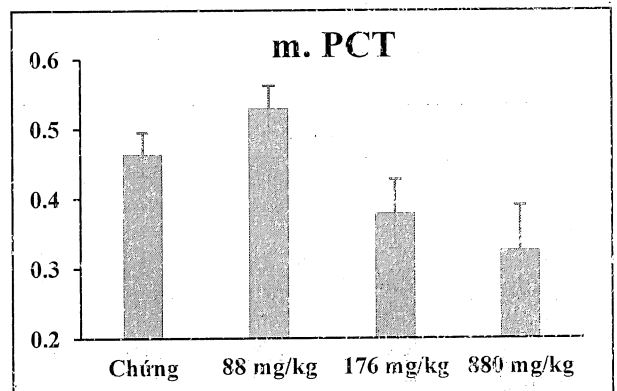
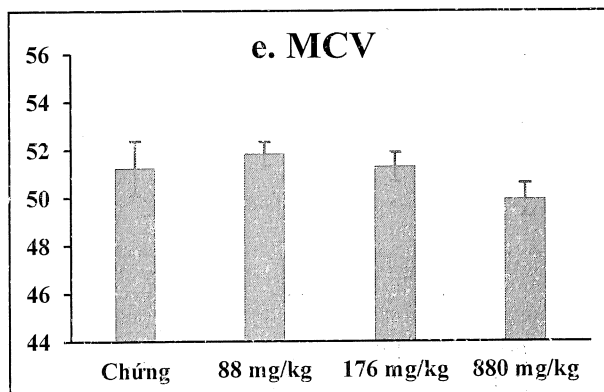
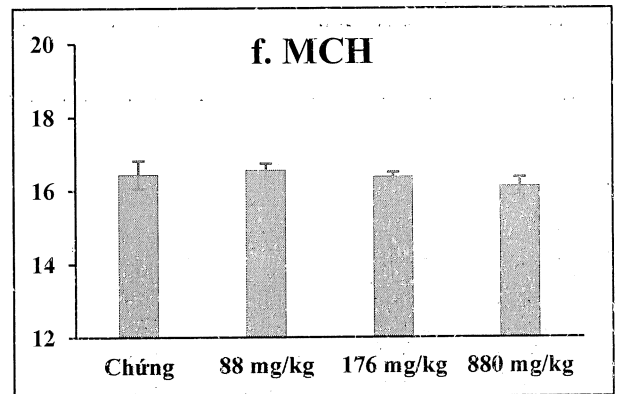
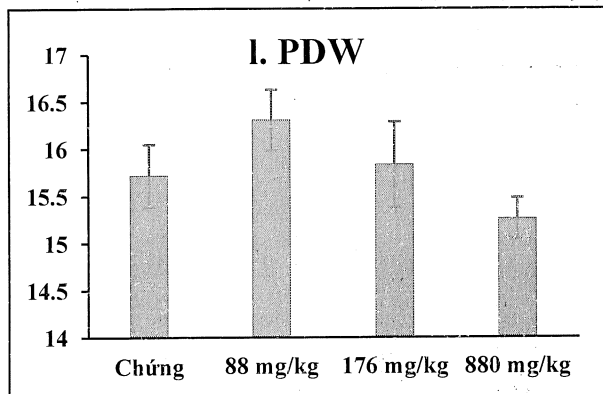
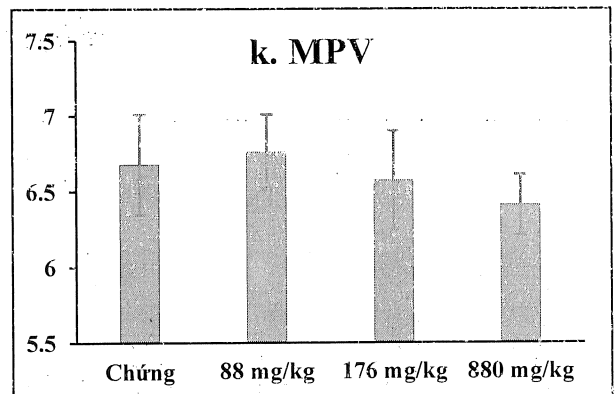
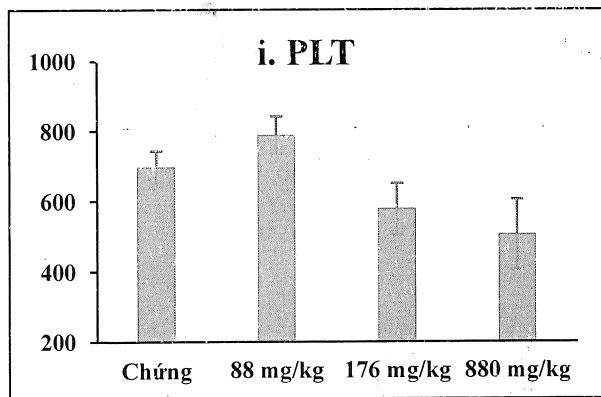
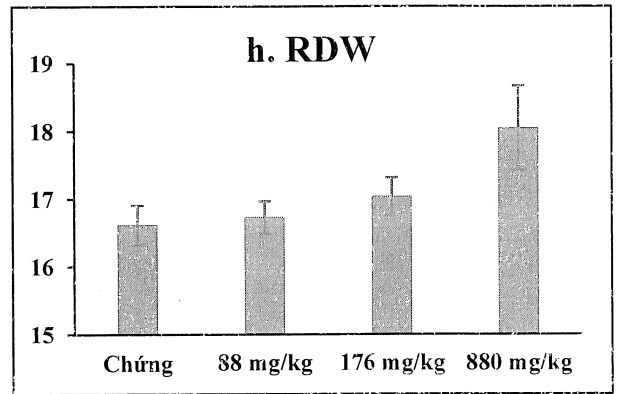
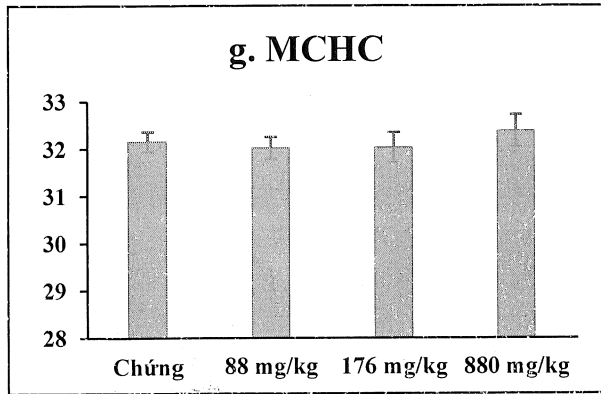
HÌNH 10



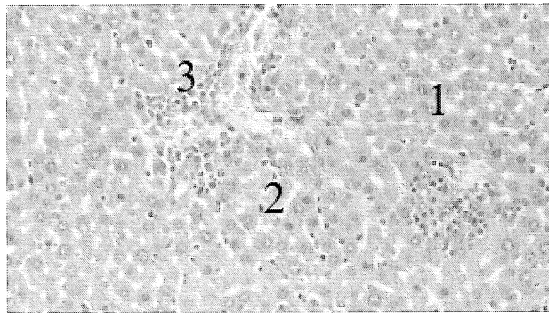
HÌNH 11



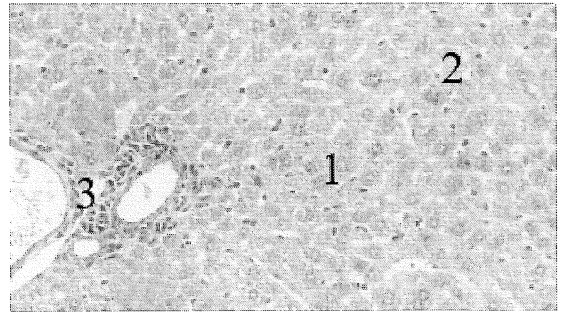
HÌNH 11 (tiếp)



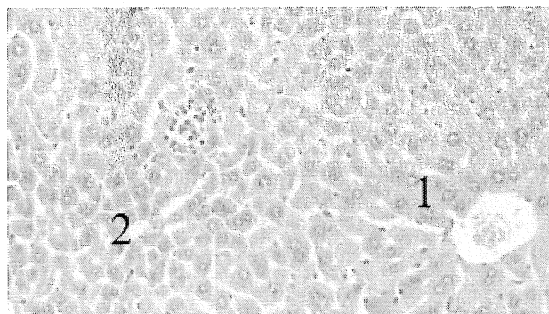
HÌNH 12



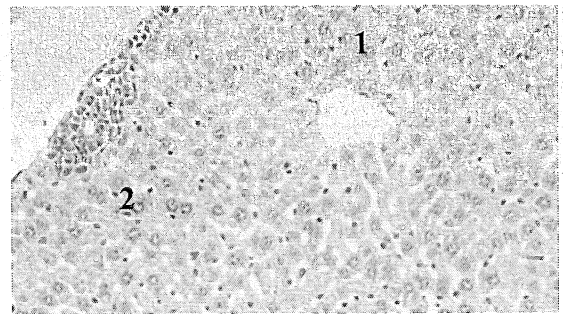
TN880



TN176

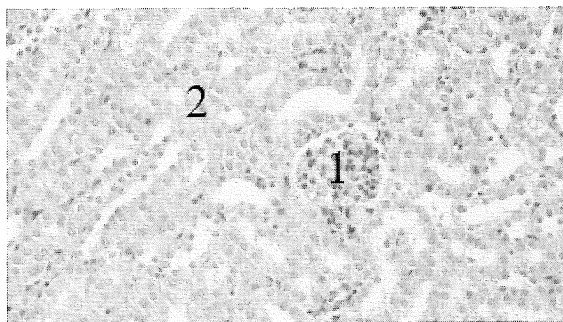


TN88

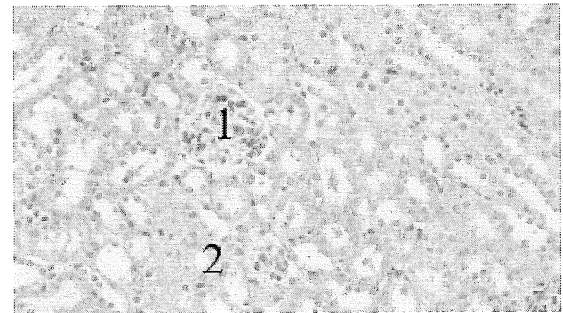


ĐC

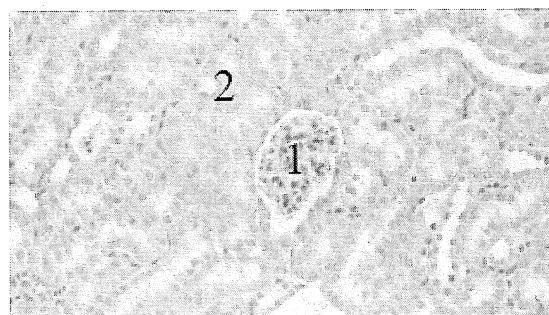
HÌNH 13



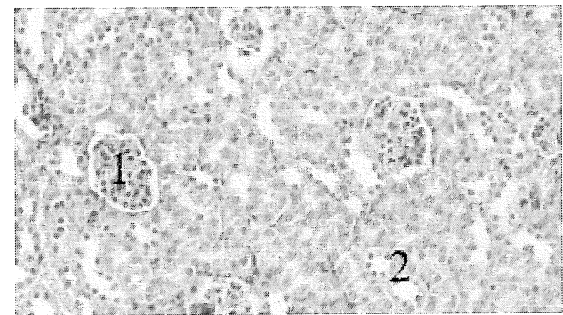
TN880



TN176



TN88



ĐC