1. Tên nhiệm vụ: Nghiên cứu trồng thử nghiệm và sản xuất thực phẩm chức năng từ cây Dành dành (*Gardenia jasminoides Ellis*) tại Đắk Lắk.

2. Tổ chức chủ trì nhiệm vụ: Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng

Địa chỉ: 01A đường TL29, phường Thạnh Lộc, quận 12, Tp.Hồ Chí Minh

Điện thoại: 028.389.1992; Fax: 028.389.1993

3. Chủ nhiệm nhiệm vụ: Tiến sĩ HOÀNG NGỌC ANH

4. Mục tiêu nghiên cứu

**** Mục tiêu chung:*** Đánh giá thành phần hóa học, tác dụng dược lý và hiệu quả điều trị của dược liệu Dành dành trên mô hình động vật.

**** Mục tiêu cụ thể:***

- Xác định phân bố và trữ lượng cây Dành dành tại Đắk Lắk.
- Xây dựng mô hình trồng thử nghiệm cây Dành dành tại Đắk Lắk quy mô 1000 m2.
- Xây dựng quy trình chiết xuất, bào chế cao định chuẩn Dành dành
- Xây dựng bộ tiêu chuẩn cơ sở cho cao định chuẩn
- Phân lập geniposid từ cao định chuẩn Dành dành
- Xây dựng quy trình bào chế chế phẩm từ cao định chuẩn
- Đánh giá tác dụng dược lý và độc tính cấp của sản phẩm trên mô hình động vật.

5. Nội dung nghiên cứu chính:

Nội dung 1: Khảo sát phân bố, trữ lượng và xây dựng mô hình trồng thử nghiệm cây dành dành tại Đắk Lắk.

- Hoạt động 1: Khảo sát sự phân bố, trữ lượng cây Dành dành tại Đắk Lắk.
- Hoạt động 2: Trồng, chăm sóc, thu hoạch và chế biến dược liệu Dành dành trên địa bàn Đắk Lắk.
- Hoạt động 3: Thu thập lượng lớn nguyên liệu cho nghiên cứu hóa học, dược lý và bào chế chế phẩm (100kg quả khô).
- Hoạt động 4: Xây dựng bộ tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu dành dành tại Đắk Lắk.

Nội dung 2: Xây dựng quy trình chiết xuất cao định chuẩn dành dành.

- Hoạt động 1: Xác định độc tính cấp của cao chiếtvà tác dụng kháng viêm khớp in vitro/in vivo.
- Hoạt động 2: Nghiên cứu, xây dựng qui trình chiết xuất cao định chuẩn trong phòng thí nghiệm: Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ rắn/lỏng, nhiệt độ và thời gian chiết xuất.
- Hoạt động 3: Xây dựng qui trình chiết xuất ở qui mô pilot 5 -10kg nguyên liệu/mẻ.
- Hoạt động 4: Tiêu chuẩn hóa cao chiết dành dành.

Nội dung 3: Phân lập chất chỉ thị từ cao định chuẩn dành dành.

- Hoạt động 1: Tạo các dịch chiết phân đoạn từ cao định chuẩn dành dành.
- Hoạt động 2: Phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật trong các dịch chiết phân đoạn làm cơ sở xác định phân đoạn có tiềm năng.
- Hoạt động 3: Phân lập, xác định cấu trúc chất chỉ thị từ phân đoạn tiềm năng.
- Hoạt động 4: Xây dựng quy trình phân lập chất chỉ thị từ cao định chuẩn dành dành.
- Hoạt động 5: Xây dựng bộ tiêu chuẩn cơ sở cho chất chỉ thị.

Nội dung 4: Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cao dược liệu định chuẩn.

- Hoạt động 1: Xây dựng quy trình xác định hàm lượng chất chỉ thị trong cao định chuẩn dành dành bằng phương pháp HPLC.

- Hoạt động 2: Xây dựng phương pháp định tính, định lượng và xây dựng tiêu chuẩn bán thành phẩm (cao định chuẩn dành dành).

- Hoạt động 3: Đề xuất bộ tiêu chuẩn cơ sở cho cao định chuẩn dành dành.

Nội dung 5:Thiết kế công thức và xây dựng quy trình bào chế viên nang từ cao định chuẩn dành dành.

- Hoạt động 1: Khảo sát tá dược và xây dựng công thức bào chế cơ bản viên nang dành dành.

- Hoạt động 2: Xây dựng quy trình bào chế viên nang.

- Hoạt động 3: Xây dựng quy trình định lượng hợp chất đánh dấu trong chế phẩm.

Nội dung 6: Kiểm nghiệm thành phẩm và dự thảo tiêu chuẩn kiểm nghiệm sản xuất viên nang.

- Hoạt động 1: Kiểm nghiệm thành phẩm viên nang dành dành dựa theo các tiêu chuẩn dược điển dành cho sản phẩm có nguồn gốc dược liệu.

- Hoạt động 2: Dự thảo tiêu chuẩn kiểm nghiệm cho viên nang.

Nội dung 7: Thử nghiệm và đánh giá hiệu quả của sản phẩm.

- Hoạt động 1: Xác định độc tính cấp của viên nang dành dành.

- Hoạt động 2: Xác định hoạt tính chống viêm khớp của chế phẩm viên nang ở mô hình in vivo.

- Hoạt động 3: Xác định liều sử dụng cho chế phẩm viên nang cứng.

6. Lĩnh vực nghiên cứu

Mã cấp 1: 1 - Khoa học tự nhiên

Mã cấp 2: 104

7. Phương pháp nghiên cứu:

Phương pháp nghiên cứu cho nội dung 1: Khảo sát phân bố, trữ lượng và xây dựng mô hình trồng thử nghiệm cây dành dành tại Đắk Lắk

+ Phương pháp khảo sát phân bố và xây dựng bản đồ phân bố

+ Phân tích thành phần hoá lý đất trước và sau 6 tháng trồng các chỉ tiêu (4 mẫu đất)

+ Đánh giá sinh trưởng cây Dành dành khi trồng

+ Đánh giá khả năng cho năng suất thông qua các chỉ tiêu

+ Phương pháp thu mẫu và giám định tên khoa học

+ Phương pháp định loại hình thái

+ Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho dành dành

Phương pháp nghiên cứu cho nội dung 2: xây dựng quy trình chiết xuất cao định chuẩn Dành dành

Nếu sử dụng phương pháp chiết xuất là đun hồi lưu: Dự kiến biến độc lập x và biến phụ thuộc y như sau:

* Điều kiện nhiệt độ chiết: x1 dự kiến 3 mức nhiệt độ: 50, 70, 90 độ C

* Tỷ lệ dung môi và dược liệu: x2 dự kiến 3 tỷ lệ: 30, 50, 70g/ml

* Thời gian chiết: x3 dự kiến 2 mức 60 phút và 90 phút.

+ Đánh giá biến phụ thuộc là và có thể là hàm lượng geniposide.

- Dự kiến khảo sát quy trình chiết thực hiện qua 2 giai đoạn là quy mô phòng thí nghiệm và quy mô pilot với lượng nguyên liệu như sau:

* Phòng thí nghiệm: 1 mẻ 1kg dược liệu khô.

* Quy mô pilot: 1 mẻ 5kg dược liệu khô.

Phương pháp nghiên cứu cho nội dung 3: phân lập chất chỉ thị từ cao định chuẩn dành dành

Điều chế cao phân đoạn:

- Chiết phân bố lỏng-lỏng cao định chuẩn lần lượt với các đơn dung môi hữu cơ để thu các cao phân đoạn có độ phân cực khác nhau.

Phân lập chất chỉ thị:

- Các cao chiết phân đoạn có hàm lượng chất chỉ thị cao nhất được sắc ký qua cột VLC để thu được các phân đoạn có độ phân cực khác nhau.

- Theo dõi thành phần của các phân đoạn bằng SKLM trên bản silica gel F254 tráng sẵn, phát hiện vết bằng cách soi đèn UV 254 nm, sau đó nhúng thuốc thử, gộp các phân đoạn chứa các vết tương tự nhau.

- Các phân đoạn nhỏ hơn bằng VLC và tiếp tục sắc ký trên cột silica gel pha thuận và pha đảo, khai triển với dung môi thích hợp để thu được các chất tinh khiết. Theo dõi và kiểm tra quá trình tách trên cột bằng SKLM.

Khảo sát hợp chất phân lập được

- Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được bằng các kỹ thuật MS, NMR.

- Từ các dữ liệu phổ học ghi nhận được kết hợp với các dữ liệu phổ trong các tài liệu tham khảo, có thể biện giải, xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được.

Phương pháp nghiên cứu cho nội dung 4: xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cao dược liệu định chuẩn

* Quy trình định lượng trên HPLC

+ Khảo sát tìm điều kiện tách các chất đánh dấu bằng phương pháp HPLC, đầu dò PDA

Tiến hành sắc ký trên mẫu chuẩn để thăm dò điều kiện sắc ký tối ưu.

Khảo sát các điều kiện sắc ký tối ưu: thành phần pha động, tỷ lệ dung môi, tốc độ dòng, nhiệt độ cột, bước sóng phát hiện

- Tiến hành sắc ký mẫu hỗn hợp chuẩn và mẫu thử 6 lần liên tiếp với điều kiện sắc ký tối ưu đã thăm dò, xác định RSD của các thông số sắc ký: thời gian lưu (tR), diện tích pic (S), hệ số bất đối (AS), độ phân giải (RS) và hệ số dung lượng (k').

+ Xử lý mẫu cao dược liệu: Khảo sát điều kiện chiết chất đánh dấu trong cao dược liệu cho quy trình định lượng và đánh giá hiệu suất chiết của quy trình.

* Khảo sát ảnh hưởng của loại dung môi chiết

* Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết

* Khảo sát ảnh hưởng của thể tích dung môi chiết

* Khảo sát ảnh hưởng nhiệt độ chiết

Hiệu suất chiết (tỷ lệ phục hồi của quy trình chiết)

- Khi tiến hành khảo sát từng yếu tố ảnh hưởng thì điều kiện chiết cho những yếu tố còn lại được cố định.

* *Phương pháp định tính, định lượng và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao định chuẩn*

Cao chiết dược liệu cần được tiêu chuẩn hóa để làm cơ sở chất lượng cao nguyên liệu làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

Từ các kết quả nghiên cứu dự thảo tiêu chuẩn cơ sở cao chiết dược liệu.

Tiến hành khảo sát trên 3 lô cao chiết/dược liệu, việc khảo sát ban đầu bao gồm các chỉ tiêu sau:

- Hình thức cảm quan
- Độ ẩm
- Tro toàn phần
- Tro không tan trong acid hydroclorid
- Hàm lượng chất chiết được
- Giới hạn kim loại nặng
- Giới hạn nhiễm khuẩn
- Định tính
- Định lượng

Từ các kết quả nghiên cứu dự thảo tiêu chuẩn cơ sở cao định chuẩn Dành dành.

Phương pháp nghiên cứu cho nội dung 5: thiết kế công thức và xây dựng quy trình bào chế viên nang từ cao định chuẩn dành dành

- Cao định chuẩn dành dành được đưa vào khảo sát công thức bào chế đóng viên nang. Khảo sát công thức bào chế gồm các bước:

Bước 1: Khảo sát loại tá dược hút.

Bước 2: Khảo sát tỷ lệ tá dược hút và cao chiết.

Bước 3: Khảo sát loại tá dược rã phù hợp đảm bảo đạt tiêu chuẩn độ rã viên nang cứng theo Dược điển Việt Nam V.

- Sau khi nghiên cứu công thức cơ bản tiến hành nghiên cứu tối ưu hóa công thức bào chế viên nang cứng chứa cao cao chiết.

Phương pháp nghiên cứu cho nội dung 6: xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho chế phẩm

Khảo sát chế phẩm viên nang theo các chỉ tiêu

- Độ đồng đều khối lượng/ Độ rã / Mùi vị /Màu sắc
- Độ ẩm / Giới hạn nhiễm vi sinh vật / Kim loại nặng
- Sắc ký lớp mỏng chất đánh dấu / Định lượng chất đánh dấu bằng HPLC

Trên cơ sở đó, đề xuất bộ tiêu chuẩn cơ sở cho chế phẩm viên nang cứng.

Phương pháp nghiên cứu nội dung 7: thử nghiệm và đánh giá hiệu quả của sản phẩm

* Độc tính cấp

Tiến hành thử nghiệm:

Thử nghiệm sơ khởi: Chọn liều sơ khởi để sau 24h tìm được liều tối đa dung nạp có thể bơm qua kim (với thể tích không quá 0,5 ml/chuột) mà không có thú vật nào chết (d1) và liều tối thiểu làm chết tất cả các thú thử nghiệm (d2).

Khoảng cách giữa (d1) và (d2) là giới hạn từ đó chọn ra những liều để tiến hành thử nghiệm xác định.

Thử nghiệm xác định: Liều ở khoảng giữa (d1) và (d2) nên chọn cấp số nhân. Liều LD50 nên gia tăng số lượng súc vật để sự đo lường chính xác hơn. Sau khi uống thuốc chuột được đặt nhẹ nhàng vào hộp nhựa cho phép chuột di chuyển tự do trong hộp nhựa. Quan sát sau 72h và ghi nhận triệu chứng đã quan sát được trong mỗi lô.

* Hoạt tính kháng viêm

+ Trên mô hình sàng lọc in vitro, ức chế quá trình tạo nitric oxide (NO)

Vật liệu, hóa chất:

Tế bào RAW264.7 cung cấp bởi ATCC.

Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Griess reagent, LPS (lipopolysacharide) được mua từ nguồn Sigma-Aldrich (nay là Merck KGaA, Darmstadt, CHLB Đức) Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Tiến hành:

Tế bào RAW264.7 được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường DMEM ở 37oC, 5% CO_2, 10% FBS. Sau đó dịch tế bào được chuyển lên giếng phiến 96 với mật độ 2.5 x 105 tế bào/giếng. Tế bào được kích thích với 2 µL LPS (0.1 mg/mL) trong 24 giờ và bổ sung thuốc/chất thử các nồng độ khác nhau. Cardamonin được sử dụng làm đối chứng (+). Dịch huyền phù của tế bào được ủ với thuốc thử Griess, $NaNO_2$ ở các nồng độ khác nhau để xây dựng đường chuẩn. Đo hỗn hợp phản ứng ở $\lambda = 570nm$.

Tỷ lệ ức chế sản sinh NO (%) được xác định theo công thức:

$$\%UC = ([X_{TB}]_{mẫu} - [X_{TB}]_{LPS})/([X_{TB}]_{ĐC} - [X_{TB}]_{LPS}) \times 100$$

Trong đó: $[X_{TB}]$ là nồng độ NO trung bình tính dựa trên đường chuẩn $NaNO_2$.

Phần tế bào còn lại sau khi đã sử dụng để đánh giá các hoạt tính in vitro được bổ sung dung dịch MTT (0.5 mg/mL trong PBS), ủ 4 giờ trong tủ ấm 5% CO_2 ở 37^oC. Sản phẩm chuyển hóa dạng tinh thể formazan được hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) và đo mật độ quang ở $\lambda = 540/720nm$ trên thiết bị Infinite F50 (Tecan, Männedorf, Thụy Sỹ).

Tỷ lệ sống sót của tế bào CS% (Cell survival) tính theo % so với đối chứng: Tỷ lệ ức chế tế bào (%) = $[(OD_{[mẫu]}/OD_{[đốichứng(-)]}) \times 100] \pm \sigma$

+ Trên mô hình động vật in vivo

- Chuẩn bị trước khi gây viêm

Chuột được phân lô sơ bộ theo thể trọng và thể tích chân Mỗi bocal chứa trung bình 8-10 chuột. Trước khi gây viêm, tiến hành đo thể tích chân chuột ban đầu (V0).

- Tiến hành gây viêm và khảo sát hoạt tính kháng viêm

Chuột được gây viêm bằng cách tiêm dưới da vào gan bàn chân trái sau 0,025 ml dung dịch carrageenan 1%.

Tiến hành đo thể tích chân chuột sau khi tiêm 3 giờ (V1).

Độ chênh lệch giữa 2 lần đo trước và sau khi gây viêm được xem là độ phù, được tính theo công thức

$$X = \frac{(V1 - V0)}{V0} * 100\%$$

Những chuột có thể tích chân sưng phù từ 50-100% được giữ lại cho thử nghiệm tiếp theo. Sau đó chia ngẫu nhiên thành 4 lô như sau:

Lô chứng bệnh: chuột gây viêm không được điều trị.

Lô tá dược: chuột được điều trị bằng tá dược dùng điều chế chế phẩm

Lô thử: chuột điều trị bằng chế phẩm ở các liều khác nhau

Lô đối chứng: chuột được điều trị bằng thuốc kháng viêm.

Theo dõi độ phù của chân chuột mỗi ngày vào một giờ nhất định trong 6 ngày liên tiếp sau đó. Các lô thử sẽ được so sánh với lô đối chứng để kết luận về hiệu quả kháng viêm tương đối so với chất đối chứng dương.

Khả năng kháng viêm I (%) được đánh giá theo công thức:

$$I(\%) = \frac{X1 - X2}{X1 - X3} * 100\%$$

X1: độ phù chân của lô chứng bệnh

X2: độ phù chân của lô thử

X3: độ phù chân của lô đối chứng

8. Sản phẩm khoa học và công nghệ dự kiến:

- Cao đặc định chuẩn.
- Viên nang cứng.
- Chất chỉ thị.

9. Thời gian thực hiện: 26 tháng (từ 10/2019 đến 12/2021).