BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM

TRẦN DIỆU LINH

NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT, BÀO CHẾ VÀ ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP CỦA VIÊN NANG CTHEPAB

LUẬN VĂN THẠC SỸ

HÀ NỘI, NĂM 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM

TRẦN DIỆU LINH

NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT, BÀO CHẾ VÀ ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP CỦA VIÊN NANG CTHEPAB

Chuyên ngành : Y học cổ truyền

Mã số : 8720115

LUẬN VĂN THẠC SỸ

Người hướng dẫn khoa học:

1. **PGS. TS Đậu Xuân Cảnh**
2. **PGS. TS Lê Thị Tuyết**

HÀ NỘI - 2020

LỜI CẢM ƠN

Hoàn thành luận văn này, với tất cả lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được gửi lời cảm ơn đến Đảng ủy, Ban Giám đốc, Phòng đào tạo Sau Đại học, các Bộ môn, Khoa phòng Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, là nơi trực tiếp đào tạo và tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận văn.

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới PGS. TS Đậu Xuân Cảnh và PGS. TS Lê Thị Tuyết, Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, người thầy hướng dẫn trực tiếp luôn theo sát, thường xuyên giúp đỡ, cho tôi nhiều ý kiến quý báu, sát thực trong quá trình học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận văn này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Đảng ủy, Ban Giám hiệu Trường Học Viện Quân Y đã quan tâm, tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong việc thu thập, hoàn thiện số liệu và nghiên cứu để hoàn thành đề tài.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn đến các Thầy, các Cô trong Hội đồng thông qua đề cương luận văn đã cho tôi nhiều ý kiến quý báu trong quá trình hoàn thiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn các Thầy, các Cô, các bác sỹ, kỹ thuật viên của Bộ môn Dược lý, trường Học Viện Quân Y đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu tại Bộ môn.

Tôi vô cùng biết ơn gia đình, bạn bè, anh chị em đồng nghiệp và tập thể học viên lớp cao học khóa 10 chuyên ngành Y học cổ truyền đã động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Xin trân trọng cảm ơn!

Học viên

Trần Diệu Linh

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Trần Diệu Linh, học viên Cao học khóa 10 Học viện Y Dược học Cổ truyền Việt Nam, chuyên ngành Y học cổ truyền, xin cam đoan:

1. Đây là luận văn do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Đậu Xuân Cảnh và PGS.TS Lê Thị Tuyết.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam;
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày 22 tháng 6 năm 2020

Học viên

Trần Diệu Linh

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ 1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. Dược liệu dùng trong nghiên cứu. 3
1.1.1. Cà gai leo. 4
1.1.2. Cỏ sữa lá nhỏ 5
1.1.3. Chi tử. 7
1.1.4. Đại hoàng 8
1.1.5. Đinh lăng. 9
1.1.6. Nấm trùng thảo (Đông trùng hạ thảo). 11
1.1.7. Linh chi. 13
1.1.8. Hà thủ ô đỏ 14
1.2. Kỹ thuật bào chế bột cao khô định chuẩn. 16
1.2.1. Khái niệm. 16
1.2.2. Kỹ thuật chiết xuất dược liệu 17
1.2.3. Kỹ thuật phun sấy làm khô dịch chiết dược liệu. 21
1.3. Viên nang cứng. 21
1.3.1. Thành phần viên nang. 21
1.3.2. Ưu nhược điểm viên nang cứng. 23
1.4. Quy trình bào chế viên nang cứng. 24
1.4.1. Quy trình tạo hạt. 24
1.4.2. Quy trình đóng hạt vào nang. 25
1.5.Tổng quan về nghiên cứu độc tính cấp. 25
1.5.1. Nguyên nhân tiến hành thử độc tính. 25
1.5.2. Thử nghiệm độc tính cấp. 26
Chương 2: NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU. 29
2.1. Nguyên vật liệu và thiết bị nghiên cứu. 29

2.1.1. Nguyên vật liệu..... 29
2.1.2. Thiết bị, dụng cụ. 30
2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu. 31
2.3. Phương pháp nghiên cứu. 32
2.3.1. Thiết kế nghiên cứu. 32
2.3.2. Phương pháp nghiên cứu. 32
2.4. Các biến số, chỉ số trong nghiên cứu. 41
2.4.1. Nghiên cứu chiết xuất, bào chế của viên nang cứng CTHepaB... 41
2.4.2. Nghiên cứu độc tính cấp của viên nang CTHepaB. 43
2.5. Phân tích và xử lý số liệu. 44
2.6. Đạo đức trong nghiên cứu 44
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN..... 45
3.1. Nghiên cứu chiết xuất, bào chế của viên nang cứng CTHepaB..... 45
3.1.1. Kết quả nghiên cứu quy trình bào chế cao khô CTHepaB và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao khô CTHepaB 45
3.1.2. Nghiên cứu xây dựng công thức bào chế viên nang cứng CTHepaB và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở viên nang cứng CTHepaB..... 60
3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp. 74
KẾT LUẬN 77
TÀI LIỆU THAM KHẢO
PHỤ LỤC

DANH MỤC VIẾT TẮT

YHCT	: Y học cổ truyền
YHHĐ	: Y học hiện đại
WHO	: Tổ chức y tế thế giới WHO
DĐVN V	: Dược điển Việt Nam V
MAE	: Chiết xuất bằng vi sóng
HPMC	: Hydroxypropyl methylcellulose
ĐVTN	: Động vật thực nghiệm
OECD	: Tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế
MD	: Maltodextrin
AE	: Aerosil
SME	: Chụp dưới kính hiển vi điện tử
LD50	: Độc tính cấp
TĐ	: Thu được
DL	: Dược liệu
DM	: Dung môi
TD	: Tá dược
HS	: Hiệu suất
CR	: Chất rắn
CI	: Chỉ số nén
T^o	: Nhiệt độ
TCCL	: Tiêu chuẩn chất lượng
SKLM	: Sắc ký lớp mỏng
T	: Mẫu thử
ĐC	: Đối chiếu
TCCS	: Tiêu chuẩn cơ sở
CT	: Công thức
KLTB	: Khối lượng trung bình

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Cỡ số vỏ nang và thể tích của chúng 22
Bảng 2.1. Thành phần của bài thuốc CTHepaB 29
Bảng 2.2. Thành phần dược chất, tá dược khảo sát xây dựng công thức viên nang cứng CTHepaB 36
Bảng 2.3: Định lượng Glycoalkaloid toàn phần tính theo Solasodin 39
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của kích thước dược liệu 45
Bảng 3.2. Khối lượng cao thu được từ các lần chiết ở các thời gian chiết khác nhau 46
Bảng 3.3. Bảng hiệu suất chiết suất cao với các tỷ lệ DL/DM khác nhau 47
Bảng 3.4. Thiết kế ảnh hưởng của loại tá dược hỗ trợ phun sấy 48
Bảng 3.5. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của loại TD đến quá trình phun sấy 49
Bảng 3.6. Thiết kế khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ TD hỗ trợ phun sấy 51
Bảng 3.7. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ TD đến quá trình phun sấy 51
Bảng 3.8. Thiết kế khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đầu vào đến quá trình phun sấy 52
Bảng 3.9. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đầu vào đến quá trình phun sấy 53
Bảng 3.10. Kết quả xác định hàm ẩm của bột cao khô CTHepaB 55
Bảng 3.11. Kết quả đánh giá độ tan của bột cao khô CTHepaB trong nước 55
Bảng 3.12. Kết quả xác định tro toàn phần trong mẫu cao khô CTHepaB ... 56
Bảng 3.13. Kết quả định lượng hàm lượng Glycoalcaloid trong mẫu thử theo Solasodin của bột cao khô CTHepaB 58
Bảng 3.14. Kết quả đánh giá độ nhiễm khuẩn của bột cao khô CTHepaB 58

Bảng 3.15. Kết quả kiểm nghiệm giới hạn kim loại nặng của bột cao khô CTHepaB 59
Bảng 3.16. Thành phần dược chất, tá dược trong các công thức khảo sát 60
Bảng 3.17. Kết quả xác định khối lượng riêng của các thành phần đóng nang.. 61
Bảng 3.18. Thành phần công thức khảo sát bào chế viên nang 62
Bảng 3.19. Kết quả đo độ rã của các công thức khảo sát 63
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của thành phần công thức đến độ ẩm của viên nang.. 64
Bảng 3.21. Kết quả định lượng Glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin trong các công thức khảo sát 65
Bảng 3.22. Công thức bào chế viên nang cứng CTHepaB 65
Bảng 3.23. Kết quả xác định độ đồng đều khối lượng viên nang cứng CTHepaB 68
Bảng 3.24. Kết quả kiểm nghiệm hàm lượng kim loại nặng của viên nang cứng CTHepaB 69
Bảng 3.25. Kết quả xác định độ rã của viên nang cứng CTHepaB 69
Bảng 3.26. Kết quả định lượng hàm lượng Glycoalcaloid trong mẫu thử theo Solasodin của viên nang CTHepaB. 71
Bảng 3.27. Kết quả kiểm nghiệm độ nhiễm khuẩn viên nang cứng CTHepaB.. 72
Bảng 3.28. Độc tính cấp theo đường uống của CTHepaB trên chuột nhắt trắng trong 72 giờ. 74
Bảng 3.29. Độc tính cấp theo đường uống của CTHEPAB trên chuột nhắt trắng trong 168 giờ..... 75

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cà gai leo (Solanum hainanense Hance Solanaceae) 4
Hình 1.2. Cỏ sữa lá nhỏ (Eurphorbia thymifolia Burm)..... 5
Hình 1.3. Chi tử (Gardenia jasminoides ellis)..... 7
Hình 1.4. Đại hoàng (Radix et Rhizoma Rhei)..... 8
Hình 1.5. Đinh lăng (Cordyceps Militaris)..... 9
Hình 1.6: Đông trùng hạ thảo (Cordyceps militaris) 11
Hình 1.7. Linh chi (Ganoderma lucidum) 13
Hình 1.8. Hà thủ ô (Fallopia multiflora)..... 14
Hình 2.1: Các dược liệu trong bài thuốc CTHepaB..... 30
Hình 3.1: Bột cao khô của CT2, CT3, CT4, CT5, CT6 50
Hình 3.2: Bột cao khô của CT4, CT7, CT8, CT9 52
Hình 3.3: Bột cao khô của CT3, CT10, CT11, CT12..... 54
Hình 3.4: Sơ đồ quy trình bào chế bột cao khô CTHepaB..... 54
Hình 3.5: Hình ảnh chụp SEM cấu trúc bột cao khô CTHepaB 56
Hình 3.6: Sắc ký đồ lớp mỏng định tính Cà gai leo trong bột cao khô CTHepaB..57
Hình 3.7: Sắc ký đồ lớp mỏng định tính Chi tử trong bột cao khô CTHepaB. 57
Hình 3.8: Sắc ký đồ lớp mỏng định tính Hà thủ ô trong bột cao khô CTHepaB..57
Hình 3.9: Sơ đồ các giai đoạn bào chế viên nang CTHepaB 66
Hình 3.10. Viên nang CTHepaB..... 67
Hình 3.11: Sắc ký đồ lớp mỏng định tính Cà gai leo trong viên nang CTHepaB ..70
Hình 3.12: Sắc ký đồ lớp mỏng định tính Chi tử trong viên nang CTHepaB ...70
Hình 3.13: Sắc ký đồ lớp mỏng định tính Hà thủ ô trong viên nang CTHepaB. 71

ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus viêm gan B (HBV - virus hepatitis B) nhân lên ở gan, gây nên các rối loạn chức năng gan, làm tổn thương tế bào gan và gây bệnh viêm gan virus B (VGVRB). Nhiễm virus viêm gan B là một vấn đề sức khỏe mang tính toàn cầu và là một trong những nguyên nhân gây tử vong phổ biến trên thế giới. Việt Nam là nước có tỷ lệ người nhiễm HBV cao, ước tính có khoảng 8,6 triệu người nhiễm virus viêm gan B. Tỷ lệ nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính được ước tính khoảng 8,8% ở phụ nữ và 12,3% ở nam giới [8].

Theo y học cổ truyền (YHCT), VGVRB được quy về các chứng hoàng đản, hiếp thống, tích tụ. Nền YHCT từ xưa cũng có nhiều kinh nghiệm điều trị bệnh về gan mật bằng cách sử dụng cây cỏ, nguyên liệu có nguồn gốc từ thiên nhiên. Một trong số những kinh nghiệm đó là những bài thuốc cổ phương điều trị bệnh gan mật được truyền lại đến ngày nay như Nhân trần cao thang, Tiêu dao tán...,và trong những năm gần đây các nhà khoa học đã đi sâu nghiên cứu cho thấy nhiều loại thảo dược điều trị VGVRB có hiệu quả như: Hoàng kỳ, Đan sâm, Cốt khí, Bạch hoa xà thiệt thảo, Diệp hạ châu, Cà gai leo…

Với kinh nghiệm lâm sàng lâu năm, PGS. TS Đậu Xuân Cảnh đã đúc kết, đưa ra bài thuốc CTHepaB (gồm 8 vị thuốc Cà gai leo 30g, Cỏ sữa nhỏ lá 20g, Chi tử 10g, Đại hoàng 5g, Đinh lăng 10g, Nấm trùng thảo 5g, Linh chi 10g, Hà thủ ô 10g) và có hiệu quả nhất định trên bệnh nhân. Các vị thuốc này chủ yếu có vị đắng, tính mát, quy kinh can, có tác dụng thanh nhiệt giải độc, ích can, bổ khí huyết.

Hiện nay ở Việt Nam, việc quản lý chất lượng nguồn dược liệu rất khó khăn, trên thị trường lưu hành rất nhiều dược liệu không rõ nguồn gốc, không qua kiểm nghiệm, kém chất lượng. Việc sử dụng các dược liệu kém chất lượng sẽ gây ảnh hưởng không nhỏ tới sức khỏe của người bệnh. Ngoài

ra để một thang thuốc sử dụng được cũng mất nhiều công sức và thời gian để sắc. Vì vậy việc hiện đại hóa thang thuốc là điều rất cấp bách hiện nay.

Do vậy, để góp phần nghiên cứu phát triển một chế phẩm thuốc mới, hiện đại hóa dạng bào chế để thuận lợi việc sử dụng điều trị trong cộng đồng, đánh giá tính an toàn và tác dụng của thuốc CTHepaB, chúng tôi nghiên cứu chiết xuất, bào chế viên nang cứng CTHepaB từ bột cao khô định chuẩn, chiết xuất từ bài thuốc CTHepaB với tám loại dược liệu trên.

Vì vậy chúng tôi nghiên cứu đề tài: "**Nghiên cứu chiết xuất, bào chế và đánh giá độc tính cấp của viên nang CTHepaB**" với mục tiêu nghiên cứu sau:

1. *Xây dựng quy trình chiết xuất, bào chế của viên nang cứng CTHepaB.*
2. *Đánh giá độc tính cấp của viên nang cứng CTHepaB trên động vật thực nghiệm.*

Chương 1
TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Dược liệu dùng trong nghiên cứu.

- CTHepaB là bài thuốc được đúc kết từ kinh nghiệm trong quá trình điều trị lâm sàng của PGS.TS Đậu Xuân Cảnh, có tác dụng bảo vệ tế bào gan, ức chế hoạt động của virus, tăng cường sức đề kháng, giúp gan hoạt động hiệu quả hơn. Bài thuốc gồm 8 vị thuốc:

+ Cà gai leo 30g
+ Cỏ sữa lá nhỏ 20g
+ Chi tử 10g
+ Đại hoàng 5g
+ Đinh lăng 10g
+ Nấm trùng thảo (Đông trùng hạ thảo) 5g
+ Linh chi 10g
+ Hà thủ ô 10g

- Bài thuốc có tác dụng thanh nhiệt giải độc, ích can, bổ khí ích huyết với:

+ Quân: Cà gai leo có tác dụng thanh nhiệt giải độc, lợi thủy thấp.
+ Thần: Cỏ sữa lá nhỏ, chi tử giúp cà gai leo thanh nhiệt giải độc ở can, lợi thấp thái hoàng.
+ Tá: Đinh lăng, đông trùng hạ thảo, linh chi, hà thủ ô bồi bổ nguyên khí, nâng cao chính khí, đẩy lùi thấp nhiệt độc, phục hồi hình thái, công năng tạng phủ.
+ Sứ: Đại hoàng dẫn thấp nhiệt ra đường đại tiện.

1.1.1. Cà gai leo.

Hình 1.1. Cà gai leo (Solanum hainanense Hance Solanaceae)

- Tên gọi khác: Cà gai dây, cà vanh, cà quýnh, cà lù, gai cườm.

- Tên khoa học: *Solanum hainanense Hance Solanaceae*.

- Mô tả cây: Là loại cây có thân leo, dài từ 60-100cm, rất nhiều gai, cành xèo rộng, trên phủ lông hình sao. Lá hình trứng hay thuôn, phía gốc lá hình rìu hay hơi tròn, mép nguyên hay hơi lượn và khía thùy, hai mặt nhất là mặt dưới phủ lông trắng nhạt, phiến dài 3-4cm, rộng 12-20mm, có gai, cuống dài 4-5mm. Hoa tím nhạt, nhị vàng, họp thành cụm gồm 2-5 hoa. Quả hình cầu, khi chín có màu vàng bóng nhẵn, đường kính 5-7mm. Hạt màu vàng, hình thận dẹt.

- Bộ phận dùng: Rễ, cành, lá.

- Thành phần hóa học: Rễ cây có chứa tinh bột và nhiều chất hóa học khác nhau, đặc biệt là Glycoancaloid.

- Tính vị quy kinh: Cà gai leo có vị hơi the, tính ấm, hơi có độc, có tác dụng tán phong thấp, tiêu độc, tiêu đờm, trừ ho, giảm đau, cầm máu.

- Tác dụng dược lý:

+ Các hoạt chất trong cà gai leo có công dụng trong việc giải độc gan, tăng cường chức năng gan, hạn chế tối đa tổn thương tế bào gan do virus cũng như tác nhân gây hại ngoài môi trường sống nên giúp người VGVRB

bảo vệ gan hiệu quả.

+ Theo nghiên cứu của Hoàng Thị Phương Liên, Hồ Việt Sang, Nguyễn Minh Đức, Đỗ Thị Hồng Tươi về khảo sát độc tính cấp đường uống và tác động giải độc rượu của cao chiết từ một bài thuốc dân gian. Bài thuốc giải độc rượu gồm Dong riềng, Bình tinh, Mật nhân, Cà gai leo, Cỏ mực được sử dụng qua nhiều đời của gia đình ông Lê Văn Lâm, sau đó là bác sỹ Hồ Việt Sang để bổ gan, giải độc rượu và cai rượu. Cao thuốc từ bài thuốc dân gian có tính an toàn cao với liều Dmax trên chuột nhắt là 30g/kg. Cao thuốc thể hiện tác động giải độc rượu cấp tương đương viên sủi giải rượu Hadiphar và bảo vệ gan tương đương Silymarin trên mô hình gây nghiện rượu mạn [16].

- Chỉ định và liều dùng:

+ Hỗ trợ điều trị viêm gan, xơ gan, hỗ trợ chống tế bào gây ung thư: Cà gai leo (thân, rễ, lá) 30 g, Cây dừa cạn 10 g, Cây chó đẻ răng cưa (diệp hạ châu) 10 g. Tất cả sao vàng, sắc uống mỗi ngày 1 thang.

+ Hỗ trợ điều trị các bệnh về gan (viêm gan B, xơ gan...): Dùng 35 g rễ hoặc thân lá Cà gai leo, sắc với 1 lít nước, còn 300 ml chia uống 3 lần trong ngày, giúp hạ men gan, giải độc gan rất tốt.

+ Ngoài ra còn để điều trị nhiều chứng bệnh khác.

1.1.2. Cỏ sữa lá nhỏ.

Hình 1.2. Cỏ sữa lá nhỏ (Eurphorbia thymifolia Burm)

- Tên gọi khác: Cỏ sữa đất, cỏ sữa lá nhỏ, vú sữa đất, cỏ sữa đỏ, cây

lợi sữa.

- Tên khoa học**:** *Eurphorbia thymifolia Burm*.

- Mô tả cây: Cây mọc hoang, được người dân thu há quanh năm. Chỉ cần nhổ cây về đem rửa thật sạch, phơi khô cả cây.

- Bộ phận dùng: Toàn cây gồm lá, thân và rễ cây đều dùng được làm thuốc.

- Thành phần hóa học: Thân và lá cây có hoạt chất Cosmoslin. Rễ cây có Taraxerol, Tirucallol, Myrixylalcohol.

- Tính vị quy kinh: Cỏ sữa lá nhỏ có vị hơi chua, tính hàn, có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, tiêu viêm, thông huyết, tiêu độc, thông sữa.

- Tác dụng dược lý:

+ Dung dịch cỏ sữa 1/20 đến 1/40 có tác dụng ức chế sự sinh sản của các loại vi trùng lỵ Sonner, Flexne và Shiga.

+ Một số công bố trên thế giới đã chứng minh cỏ sữa có các tác dụng sinh học: tác dụng kháng khuẩn kháng nấm, chống dị ứng, chống viêm; ức chế miễn dịch, ức chế khối u, chống virus; tác dụng an thần, giảm đau, bảo vệ gan. Về thành phần hóa học, các Flavonoid và các hợp chất Phenol đã được phân lập, xác định là các thành phần chính trong cây cỏ sữa. Tuy nhiên, ở Việt Nam, các nghiên cứu về cây cỏ sữa còn rất ít. Nghiên cứu này nhằm góp phần bổ sung dữ liệu về hóa thực vật của cây cỏ sữa lá nhỏ. Đã sử dụng phương pháp ngâm chiết với dung môi Ethanol 96% ở nhiệt độ phòng và bằng phương pháp sắc ký cột phân lập được 3 hợp chất từ cây cỏ sữa lá nhỏ thu hái ở tỉnh Nam Định. Cấu trúc của các hợp chất này được xác định thông qua kết quả đo nhiệt độ nóng chảy, góc quay cực riêng, phổ tử ngoại-khả kiến, phổ hồng ngoại, phổ khối, phổ cộng hưởng hạt nhân và so sánh với các dữ liệu công bố của các hợp chất liên quan. Các hợp chất được xác định

là: (2S)- Strobopinin (1), Isokanugin (2), Amentoflavon (3), Cả 3 hợp chất này đều lần đầu tiên phân lập được từ thân cây cỏ sữa lá nhỏ[45].

- Chỉ định và liều dùng:

+ Điều trị kiết ly: Cỏ sữa lá nhỏ tươi 80g, Mơ lông tươi 50g sắc nước uống hàng ngày.

+ Điều trị tắc tia sữa, thiếu sữa:Cỏ sữa nhỏ tươi 100g, hạt cây gạo 40g sắc nước uống hàng ngày.

+ Điều trị đi cầu ra máu tươi:Cỏ sữa tươi 100g, Huyết dụ 50g đun với 1 lít nước, đun cạn còn 400ml chia 3 lần uống trong ngày.

+ Ngoài ra còn để điều trị nhiều chứng bệnh khác.

1.1.3. Chi tử.

Hình 1.3. Chi tử (Gardenia jasminoides ellis)

- Tên gọi khác: dành dành, sơn chi, sơn chi tử.

- Tên khoa học: *Gardenia jasminoides ellis*.

- Mô tả cây: Cây chi tử là một cây thuốc nam quý, dạng cây nhỏ, nhẵn, cành mềm khía rãnh dọc, lá mọc đối hay mọc vòng 3, hình thuôn trái xoan, đôi khi bầu dục dài, tù và có mũi nhọn ở đỉnh, hình nêm ở gốc, màu nâu đen bóng ở trên mặt, nhạt hơn ở mặt dưới, dai, gân mảnh nổi rõ, lá kèm mềm, nhọn đầu ôm lấy cả cành như bẹ. Hoa mọc đơn độc ở đầu cành, trắng, rất thơm. Cuống có 6 cạnh hình cánh. Đài 6, thuôn nhọn đầu, ống đài có 6 cánh dọc. Tràng 6, tròn ở đỉnh, ống tràng nhẵn cả hai mặt. Nhị 6, chỉ ngắn,

bao phấn tù. Bầu 2 ô không hoàn toàn, vòi dài bằng ống tràng noãn rất nhiều. Quả thuôn bầu dục có đài còn lại ở đỉnh, có 6-7 cạnh dọc có cánh. Hạt rất nhiều, dẹt. Ra hoa từ tháng 4-11. Quả tháng 5-12.

- Bộ phận dùng: Quả chín dành dành.

- Thành phần hóa học: Gardenoside, Geniposide, Genipin , Crocin,, Cocetin D-mannitol, Sitostreol.

- Tính vị quy kinh: Vị đắng tính hàn, quy kinh tâm, phế, vị, tam tiêu.

- Tác dụng dược lý: Tác dụng tả hỏa trừ phiền, thanh nhiệt lợi thấp, lương huyết giải độc, chủ trị chứng nhiệt, bệnh tâm phiền, sốt cao, bứt rứt,,thấp nhiệt vàng da, tiểu tiện ít, đỏ, nhiệt lâm, huyết lâm, huyết nhiệt xuất huyết, ung thũng sang độc, đắp ngoài trị chấn thương phần mềm.

- Chỉ định và liều dùng: trị tâm phiền rạo rực, hoàng đản, bệnh về bộ máy tiết niệu, thổ huyết, chảy máu cam, lỵ ra máu, hư phiền không ngủ. Ngày dùng 6-12g.

1.1.4. Đại hoàng.

Hình 1.4. Đại hoàng (Radix et Rhizoma Rhei)

- Tên gọi khác : Xuyên đại hoàng, tướng quân.

- Tên khoa học: *Radix et Rhizoma Rhei*.

- Mô tả cây: Thân hình trụ trong rỗng, cao độ 1m, ngoài nhẵn. Rễ phình thành củ màu vàng, sẫm, mùi thơm hăng. Lá mọc so le, có cuống dài,

phiến lá hình tim to bằng cái quạt, đầu nhọn, mép khía răng thưa và sâu, dáng như chia thuỳ nông không đều. Hoa mọc thành chùm dài màu tím. Quả bế 3 cạnh.

- Bộ phận dùng: Thân, rễ.

- Thành phần hóa học: Emodin và Rhein.

- Tính vị quy kinh: vị đắng, tính hàn, qui kinh tỳ, vị, đại tràng, can, tâm.

- Tác dụng dược lý: Nước sắc Đại hoàng có tác dụng lợi tiểu, bảo vệ gan và giảm Cholesterol máu đối với thỏ bị gây cao Cholesterol và cho uống thuốc.

- Chỉ định và liều dùng:

+ Dùng chữa hạ lỵ, ứ huyết, kinh bế thuỷ thũng, thấp nhiệt gây vàng da, ung thũng đinh độc. Hiện nay dùng với liều nhẹ làm thuốc giúp sự tiêu hoá, chữa kém ăn, ăn không tiêu, da vàng, hay đau bụng. Ngày uống 0,10-0,50gam dưới dạng sắc, bột, hay thuốc viên.

+ Dùng với liều cao làm thuốc tẩy nhẹ, dùng cho người đầy bụng, đi lỵ, hoàng đản (da và mắt vàng). Ngày uống 3-10g. Thường dùng phối hợp với các vị thuốc khác như chỉ thực, hậu phác, hoàng liên, mang tiêu v.v...

1.1.5. Đinh lăng.

Hình 1.5. Đinh lăng (Cordyceps Militaris)

- Tên gọi khác: Cây gỏi cá.

- Tên khoa học: *Cordyceps Militaris*.

- Mô tả cây:

+ Cây đinh lăng thuộc cây thân bụi có khả năng mọc xanh tốt quanh năm, chiều cao của cây từ 0,5 đến 2 m.

+ Thân cây có hình tròn vỏ cây sần sùi nhưng không có gai. Trên thân cây thường có những vết sẹo lồi to do lá rụng, thân cây thường có màu nâu xám. Cây đinh lăng thường được sử dụng làm thuốc chủ yếu là những cây đinh lăng nhỏ hay còn gọi là đinh lăng nếp có thân gỗ nhỏ hơn, chiều cao cây thường từ 0,8 đến 1,5 m, thân cây cũng không có gai.

+ Cây đinh lăng thuộc họ lá mọc cách, kép lông chim 2- 3 lần.

+ Chiều dài lá thường từ 20 đến 40 cm. Những lá chét thường chia thùy nhọn không đều. mặt trên của lá có màu xanh, phần mặt dưới của lá thường bóng hơn.

+ Phần gốc lá và phiến lá có hình dáng thuộn nhọn, dài từ 3 đến 5 cm, rộng từ 0,5 đến 1,5 cm.

+ Gân lá thường có hình lông chim, phần gân chính thường nổi rõ và có thêm 3 đến 4 cặp gân phụ chia theo từng đường lá.

+ Cuống lá đinh lăng thường dài, có hình tròn hoặc màu xanh đậm, đôi khi có xuất hiện những đốm lá hình nhạt ở trên cuống. Đáy cuống phình to ra thành bẹ lá.

- Bộ phận dùng: Rễ, thân, cành, lá.

- Thành phần hóa học: Thành phần hoá học chính là Saponin triterpenic. Bột rễ đinh lăng lá nhỏ có chứa 20 Acid amin, Vitamin nhóm B, các nguyên tố vi lượng, trong đó có một số acid amin mà cơ thể người không thể tổng hợp được.

- Tính vị quy kinh: Rễ đinh lăng có vị ngọt, tính bình. Lá vị nhạt, hơi

đắng, tính bình.

- Tác dụng dược lý: Tác dụng của dịch chiết đinh lăng lá nhỏ có nhiều điểm tương tự sâm Triều Tiên. Về độc tính, người ta thấy đinh lăng lá nhỏ của Việt Nam ít độc hơn so với nhân sâm Triều Tiên và sâm Liên Xô Eleutherococus.

- Chỉ định và liều dùng: có tác dụng bổ năm tạng, giải độc, bổ huyết, tăng sữa, tiêu thực, tiêu sưng viêm. Đinh lăng là thuốc tăng lực.

+ Ngày dùng 1-6g rễ hoặc 30-50g thân, cành; dùng dưới dạng thuốc sắc hoặc ngâm rượu. Lá tươi (50-100g) nấu cháo để ăn, lợi sữa, giã đắp chữa vết thương, mụn nhọt, lá còn dùng để ăn gỏi cá.

+ Chữa viêm gan: Rễ đinh lăng 12g; nhân trần 20g; ý dĩ 16g; chi tử, hoài sơn, biển đậu, rễ cỏ tranh, xa tiền tử, ngũ gia bì, mỗi vị 12g; uất kim, nghệ, ngưu tất, mỗi vị 8g. Sắc uống ngày 1 thang.

+ Chữa thiếu máu: Rễ đinh lăng, Hà thủ ô, Thục địa, Hoàng tinh, mỗi vị 100g, Tam thất 20g, tán bột, sắc uống ngày 100g bột hỗn hợp.

1.1.6.Nấm trùng thảo (Đông trùng hạ thảo).

Hình 1.6: Đông trùng hạ thảo (Ophiocordyceps sinensis)

- Tên gọi khác: Gọi chính xác hơn là Nấm Đông Trùng Hạ Thảo. Gọi tên như vậy là xuất phát từ quan sát thực tế khi thấy vào mùa hè nấm mọc chồi từ đầu con sâu nhô lên khỏi mặt đất. Vào mùa đông thì nhìn cặp cá thể này giống con sâu (côn trùng), còn đến mùa hè thì chúng trông giống một

loài thực vật (thảo mộc) hơn. Nấm trùng thảo được nuôi cấy từ Đông trùng hạ thảo.

- Tên khoa học: *Ophiocordyceps sinensis.*

- Mô tả: Vào mùa hè nấm mọc chồi từ đầu con sâu nhô lên khỏi mặt đất. Vào mùa đông thì nhìn cặp cá thể này giống con sâu (côn trùng), còn đến mùa hè thì chúng trông giống một loài thực vật (thảo mộc) hơn.

- Bộ phận dùng: Cả con và lá.

- Thành phần hóa học: Cordycepin, Adenosin. Trong đó có Adenosine, Selen là các khoáng vi lượng rất cần thiết cho cơ thể, có khả năng tăng cường hệ miễn dịch, giúp ngăn ngừa và hỗ trợ điều trị ung thư.

- Tính vị quy kinh: Ngọt bình vào phế thận.

- Tác dụng dược lý: Trong sinh khối Nấm Đông Trùng Hạ Thảo có chứa 17 Axit amin như các nguyên tố vi lượng nhiều khoáng chất quan trọng. Trong đó có Adenosine, Selen là các khoáng vi lượng rất cần thiết cho cơ thể, có khả năng tăng cường hệ miễn dịch, giúp ngăn ngừa và hỗ trợ điều trị ung thư. Đông Trùng Hạ Thảo là loại thuốc bổ quý giá có tác dụng tích cực với các bệnh thận hư tăng cường sinh lý, giảm đau nhức khớp, bổ phổi, bồi bổ cơ thể, giúp ăn ngon ngủ khỏe, giảm lão hoa kéo dài tuổi thọ.

- Chỉ định và liều dùng: Trong YHCT Trung Hoa và Tây Tạng, Đông trùng hạ thảo được xem là có sự cân bằng tuyệt vời giữa âm và dương, bởi nó vừa là thực vật vừa là động vật, được hình thành vào mùa đông và trưởng thành vào mùa hạ. Cho nên đông trùng hạ thảo được xem là một vị thuốc quý, có thể chữa được "bách hư bách tổn", cụ thể một số bệnh:

+ Tác dụng của Đông trùng hạ thảo trong việc hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến gan: Gần như tất cả các nghiên cứu về mối quan hệ giữa Đông trùng hạ thảo và chức năng gan đều cho thấy Đông trùng hạ thảo giúp tăng hiệu quả hoạt động của gan. Ngày nay, Đông trùng hạ thảo thường được sử

dụng trong điều trị xơ gan, viêm gan B, C mãn tính tại nhiều nước ở châu Á. Ngoài ra, đông trùng hạ thảo còn được sử dụng kết hợp với một số loại nấm dược liệu khác để hỗ trợ cho Lamivudine trong điều trị viêm gan siêu vi B.

+ Tác động đến hệ miễn dịch: Đông trùng hạ thảo không chỉ kích thích hệ miễn dịch mà còn, kỳ diệu thay, có khả năng ức chế hệ miễn dịch.

+ Hỗ trợ điều trị ung thư.

1.1.7. Linh chi.

Hình 1.7. Linh chi (Ganoderma lucidum)

- Tên gọi khác: Tiên thảo, Nấm trường thọ, Vạn niên nhung.
- Tên khoa học: *Ganoderma lucidum*.
- Bộ phận dùng: Hay dùng linh chi đỏ.
- Thành phần hóa học: 7 Acid amin, Protein, Saponin, Sterol.
- Tính vị quy kinh: Hồng chi có vị đắng, tính bình, không độc.
- Tác dụng dược lý:

+ Theo các nhà nghiên cứu tại Trung tâm ung thư quốc gia Nhật Bản, 80% các thử nghiệm trên động vật bị ung thư đã cho thấy kết quả rất khả quan, khi cho các loài động vật này sử dụng các chiết xuất từ nấm Linh chi đỏ. Các hợp chất trong mỗi loại nấm làm tăng hoạt động chống khối u của các tế bào NK và cải thiện phản ứng kháng thể[11].

+ Các thành phần trong nấm linh chi nuôi trồng có thể ngăn ngừa tế bào ung thư S.

- Chỉ định và liều dùng:

+ An thần, tăng trí nhớ, chữa viêm gan cấp và mãn tính, điều hoà huyết áp, tăng tuổi thọ.

+ Ngày nay người ta biết trong nấm Linh chi có Germanium giúp tế bào hấp thụ Oxy tốt hơn; Polysaccharit làm tăng sự miễn dịch trong cơ thể, làm mạnh gan, diệt tế bào ung thư; Acid ganodermic chống dị ứng, chống viêm.

+ Suy nhược thần kinh, chóng mặt, mất ngủ.

+ Viêm khí quản mạn tính, bệnh ho lao do nhiễm bụi Silic.

+ Viêm gan, huyết áp cao.

+ Đau mạch vành tim, tăng Cholesterol huyết.

+ Đau dạ dày, chán ăn.

+ Thấp khớp, thống phong.

+ Nói chung, Linh chi được sử dụng làm thuốc để bồi bổ cơ thể, làm giảm chất béo và chất đường trong máu, nâng cao tính miễn dịch của cơ thể, kéo dài quá trình lão hoá của các cơ quan trong cơ thể.

+ Mỗi ngày dùng 2-5g thái mỏng hoặc tán thành bột sắc uống. Nước sắc có mùi thơm, vị hơi đắng, có thể thêm đường hay mật ong vào cho dễ uống. Dùng ngoài xông trị viêm mũi.

1.1.8. Hà thủ ô đỏ.

Hình 1.8. Hà thủ ô (Fallopia multiflora)

- Tên gọi khác: Giao đằng, thủ ô, địa tinh, khua lình (Thái), mằn năng ón (Tày), xạ ú sí (Dao).

- Tên khoa học: *Fallopia multiflora*.

- Mô tả:

+ Cây: Dây leo, sống nhiều năm. Thân rễ phồng thành củ. Thân quấn, mọc xoắn vào nhau, mặt ngoài thân có màu xanh tía, nhẵn, có vân. Lá mọc so le, có cuống dài. Phiến lá hình tim, dài 4 - 8cm, rộng 2,5 - 5cm, đầu nhọn, mép nguyên hoặc hơi lượn sóng, cả hại mặt đều nhẵn. Bẹ chìa mỏng, màu nâu nhạt, ôm lấy thân. Hoa tự chùm nhiều nhánh. Hoa nhỏ, đường kính 2mm, mọc cách xa nhau ở kẽ những lá bắc ngắn, mỏng. Bao hoa màu trắng, 8 nhụy (trong số đó có 3 nhụy hơi dài hơn). Bầu hoa có 3 cạnh, 3 vòi ngắn rời nhau. Đầu nhụy hình mào gà rủ xuống. Quả 3 góc, nhẵn bóng, đựng trong bao hoa còn lại, 3 bộ phận ngoài của bao hoa phát triển thành cánh rộng, mỏng, nguyên.

+ Dược liệu: Rễ củ hình tròn, dài, không đều, củ nhỏ để nguyên, củ to bổ đôi theo chiều dọc, hay chặt thành từng miếng to. Mặt ngoài có những chỗ lồi lõm do các nếp nhăn ăn sâu tạo thành. Mặt cắt ngang có lớp bần mỏng màu nâu sẫm, mô mềm vỏ màu đỏ hồng, có nhiều bột, ở giữa có ít lõi gỗ.

- Bộ phận dùng: Rễ củ phơi hay sấy khô của cây Hà thủ ô đỏ.

- Thành phần hóa học: Chrysophanic acid, Emodin, Rhein, Chrysophanic acid, Anthrone, Lecithin.

- Tính vị quy kinh: đắng, ngọt, sáp, hơi ôn, quy kinh can thận.

- Tác dụng dược lý:

+ Hà thủ ô có tác dụng hạ Cholesterol huyết thanh, phòng chống và giảm nhẹ xơ cứng động mạch, có thể tác dụng giảm xơ cứng động mạch và do thuốc có thành phần Lecithin

+ Thuốc làm chậm nhịp tim. Làm tăng nhẹ lưu lượng máu động mạch vành và bảo vệ được cơ tim thiếu máu.

+ Thuốc có tác dụng nhuận tràng do dẫn chất Oxymethylanthraquinone làm tăng nhu động ruột. Hà thủ ô sống có tác dụng nhuận tràng mạnh hơn Hà thủ ô chín.

+ Tác dụng kháng khuẩn và virus: thuốc có tác dụng ức chế đối với trực khuẩn lao ở người và trực khuẩn lỵ Flexner. Thuốc có tác dụng ức chế virus cúm.

- Chỉ định và liều dùng:

+ Bổ máu, chống viêm, chữa thận suy, yếu gan, thần kinh suy nhược, ăn ngủ kém, sốt rét mạn tính, thiếu máu, ít sữa, các bệnh của phụ nữ sau khi đẻ, xích bạch đới, đau lưng, thấp khớp, di tinh, khí hư, đại tiện ra máu, đái buốt, đái dắt, đái ra máu, mẩn ngứa, bệnh ngoài da.

+ Uống lâu ngày chữa người già xơ cứng mạch máu não, huyết áp cao hoặc nam giới tinh yếu khó có con, chữa huyết hư máu nóng, tóc khô hay rụng, sớm bạc, hồi hộp chóng mặt, ù tai hoa mắt, lưng gối rũ mỏi, khô khát táo bón, điều kinh bổ huyết.

+ 12-20g một ngày, dạng thuốc sắc, thuốc bột, rượu bổ. Khi dùng phải chế biến, phụ liệu chính là đậu đen.

1.2. Kỹ thuật bào chế bột cao khô định chuẩn.

1.2.1. Khái niệm.

- Cao dược liệu là chế phẩm được chế bằng cách cô đặc hoặc sấy đến thể chất quy định dịch chiết thu được từ dược liệu thực vật hay động vật với dung môi thích hợp. Đó là những chế phẩm có thể là cao lỏng, bán rắn hoặc rắn [7].

- Cao định chuẩn: Một cao định chuẩn hay tiêu chuẩn (Standardised extract) phải mô tả được bản chất và nồng độ dung môi sử dụng để chiết xuất,

trạng thái vật lý của dịch chiết, số lượng tương đương của dược liệu dùng để bào chế dịch chiết biểu thị bằng x-y hoặc tỷ lệ (a-b):1 của dược liệu để bào chế với số lượng của chế phẩm bào chế. Hơn nữa, giới hạn hàm lượng của chất định lượng cũng phải được nêu rõ [7].

- Phân loại: Theo thể chất, cao dược liệu được chia làm 3 loại:

+ Cao lỏng: Có thể chất lỏng hơi sánh, thường quy ước 1ml cao lỏng tương đương với 1gam dược liệu dùng điều chế cao.

+ Cao đặc: Có thể chất đặc quánh hoặc dẻo, sờ không dính tay ở nhiệt độ thường, nhưng chảy lỏng thành khối dịch đặc hoặc nhớt khi đun nóng. Cao đặc được điều chế bằng cách cô đặc kéo dài và cẩn thận các dịch chiết của dược liệu. Tỉ lệ dung môi còn lại trong cao thường không quá 20%. Do đó độ ổn định kém và dễ nhiễm vi sinh vật nên phần lớn cao đặc nay được thay bằng cao khô.

+ Cao khô: Là khối khô hay bột khô, rất dễ hút ẩm. Hàm ẩm không quá 5%. Ngoại lệ một số cao khô hàm ẩm dưới 5% nhưng có thể chất dẻo, ví dụ cao chứa nhiều hợp chất thân dầu, hoặc cao có tỉ lệ lớn các thành phần thân nước tạo ra hỗn hợp eutectic. Khi để lạnh, khối dẻo rắn lại và có thể nghiền được [7].

1.2.2. Kỹ thuật chiết xuất dược liệu.

- Có nhiều phương pháp chiết xuất dược liệu khác nhau. Với các phương pháp chiết thông thường bằng dung môi dựa trên việc lựa chọn dung môi kết hợp song song với sử dụng nhiệt độ và khuấy trộn, phương pháp chiết xuất có thể được phân thành hai loại là phương pháp chiết lạnh (ngâm lạnh, ngấm kiệt...) và phương pháp chiết nóng (sắc, hầm, hãm, chiết soxhlet...). Ngoài ra, hiện nay có nhiều phương pháp kỹ thuật hiện đại được ứng dụng rộng rãi và hiệu quả cao hơn như phương pháp chiết xuất bằng siêu âm, chiết xuất bằng vi sóng, chiết xuất dưới áp suất cao, chiết xuất

ngược dòng liên tục, chiết xuất bằng dung môi siêu tới hạn…

1.2.2.1. Chiết xuất bằng siêu âm.

- Chiết xuất có sự tác động của siêu âm là phương pháp ngâm cải tiến với việc sử dụng sóng siêu âm tần số cao giúp chiết xuất dễ dàng hơn. Các nghiên cứu về chiết xuất dược liệu đều khẳng định siêu âm rút ngắn đáng kể thời gian chiết. Trong đa số các trường hợp chỉ cần siêu âm từ 5 đến 15 phút thu được kết quả tương tự như âm hoạc ngấm kiệt trong nhiều giờ [7].

- Ưu điểm: Chiết xuất với sự trợ giúp của siêu âm thể hiện sự hiệu quả, đơn giản và ít tốn kém so với các kỹ thuật chiết xuất thông thường. Ưu điểm chính của phương pháp này là làm tăng khối lượng chiết xuất và động học của quá trình chiết xuất cũng nhanh hơn nên rút ngắn được thời gian chiết xuất. Siêu âm cũng có thể làm giảm nhiệt độ chiết xuất, cho phép chiết xuất các hợp chất kém bền với nhiệt. So với chiết xuất bằng vi sóng và siêu tới hạn thì thiết bị chiết siêu âm rẻ hơn và tiến hành dễ dàng hơn. Hơn nữa, trong chiết xuất siêu âm có thể sử dụng nhiều loại dung môi để chiết xuất một khoảng rộng các hoạt chất [7].

- Nhược điểm: Siêu âm trong chiết xuất có thể làm biến đổi các chất chiết do nhiệt độ tăng cao và sự hình thành Hydroqeroxyl, nhất là dung môi có nước. Một số hoạt chất trong dược liệu khi sử dụng siêu âm dễ bị phân hủy. Vì vậy phải cẩn thận khi chọn điều kiện chiết xuất cũng như phương pháp phát hiện sản phẩm phân hủy [7].

1.2.2.2. Chiết xuất bằng vi sóng.

- Chiết xuất dưới hỗ trợ của vi sóng (MAE) là một phương pháp mới, thể hiện tính ưu việt hơn so với các phương pháp chiết truyền thống. MAE là phương pháp chiết xuất rất hấp dẫn do tốc độ chiết xuất nhanh, lượng dung môi sử dụng nhỏ, chi phí thấp và thân thiện với môi trường [7].

- Ưu điểm: Chiết xuất bằng vi sóng là một phương pháp mới, có khả năng chiết xuất rất nhanh, lượng dung tiêu thụ ít hơn so với chiết soxhlet và

siêu âm (30ml trong MAE so với 300 - 500 ml trong chiết soxhlet); Cải thiện năng suất và hiệu quả chiết xuất khi so sánh với các kỹ thuật chiết xuất hiện đại khác như chiết siêu âm, chiết siêu tới hạn, chiết áp suất cao...Nó cho phép kiểm soát các thông số chiết xuất (thời gian, nhiệt độ và lực tác động) và có thể khuấy trộn khi chiết xuất. MAE là kỹ thuật thân thiện với môi trường, khi thực hiện trong thiết bị kín có thể kiểm soát tốt dung môi chiết và có chế độ an toàn khi có bất kỳ sự dò rỉ dung môi trong quá trình chiết xuất [7].

- Nhược điểm: Cần phải sử dụng các dung môi phân cực, có thể ít hiệu quả để chiết xuất các hoạt chất hoặc các dung môi không phân cực hay dễ bay hơi. Làm sạch hay loại tạp dịch chiết là cần thiết vì phương pháp này có hiệu quả chiết rất cao đối với cả hoạt chất và tạp chất, thiết bị chiết vi sóng tương đối đắt tiền [7].

1.2.2.3. Chiết xuất bằng dung môi siêu tới hạn.

- Trạng thái siêu tới hạn: Đối với một chất ở điều kiện nhất định chúng sẽ tồn tại ở một trong ba trạng thái là rắn, lỏng và hơi, nó phụ thuộc vào nhiệt độ, áp suất và thể tích. Nếu nén chất khí tới một áp suất đủ cao, chất khí sẽ hóa lỏng. Tuy nhiên, có một giá trị áp suất mà ở đó, nếu nâng dần nhiệt độ lên thì chất lỏng cũng không trở về trạng thái khí, mà rơi vào một vùng trạng thái đặc biệt gọi là trạng thái siêu tới hạn (Supercritical). Hay nói cách khác, trạng thái siêu tới hạn đạt được khi nhiệt độ và áp suất của một chất được nâng lên trên giá trị tới hạn của nó [7].

- Ưu điểm: Trạng thái siêu tới hạn có khả năng hòa tan tương tự như dung môi hữu cơ nhưng khuếch tán nhanh hơn, độ nhớt và sức căng bề mặt thấp hơn. Đặc tính hòa tan của một chất lỏng siêu tới hạn dễ kiểm soát hơn vì nó phụ thuộc vào điều kiện nhiệt độ và áp suất. Có thể dễ dàng và nhanh chóng điều chỉnh nhiệt độ và áp suất của bình chiết và bình tách để chiết và tách phân đoạn các chất. Khi thêm các đồng dung môi (như Methanol, Ethanol...) có thể thay đổi độ phân cực của dung môi để tăng tính chọn lọc

tách chiết các chất nên có thể chiết được cả các nhóm chất có tính phân cực hơn như Flavonoid, Alcaloid…Trong quy trình công nghiệp liên quan đến thuốc hoặc thực phẩm, không phải lo lắng vì tồn dư của dung môi. Chất sử dụng thông thường nhất là CO_2 có đặc tính trơ, tinh khiết, rẻ tiền, không tự kích nổ, không bắt lửa và duy trì sự cháy, ít độc với cơ thể, không ăn mòn thiết bị. CO_2 có thể được thu hồi nên chi phí sản xuất thấp. Sản phẩm thu được tinh khiết, ít bị phân hủy và biến đổi do trạng thái siêu tới hạn đạt được ở nhiệt độ và áp suất thấp [7].

- Nhược điểm: Thiết bị chuyên dùng, đắt tiền. Không thích hợp với mẫu chiết ở thể lỏng. Chỉ thích hợp để chiết các hợp chất ít phân cực. Khó lường được khi dùng hỗn hợp dung môi [7].

1.2.2.4. Chiết xuất ngược dòng liên tục.

- Nguyên tắc: Nếu khối dược liệu chuyển động được chiết xuất bởi một dung môi chuyển động liên tục ngược chiều, quá trình được gọi là chiết xuất ngược dòng liên tục. Quá trình được thực hiện trong các thiết bị làm việc liên tục. Dược liệu được cho vào một đầu của thiết bị. Ban đầu dược liệu được tiếp xúc với dung môi đã chứa chất tan. Quá trình di chuyển trong thiết bị chiết, dược liệu được tiếp xúc với những dung môi có nồng độ chất tan giảm dần. Đến cuối thiết bị chiết nó được tiếp xúc với dung môi mới. Theo chiều ngược lại, dung môi ban đầu được tiếp xúc với dược liệu có hàm lượng hoạt chất tăng dần. Trước khi ra khỏi thiết bị, dung môi được tiếp xúc với dược liệu mới. Bằng cách này dược liệu có thể được chiết kiệt hoàn toàn nếu tốc độ di chuyển của dược liệu và dung môi được lựa chọn phù hợp [7].

- Ưu điểm: Năng suất cao và dễ tự động hóa, thiết bị chiết xuất liên tục được dùng khi cần chiết lượng lớn nguyên liệu [7].

- Nhược điểm: Khối lượng nguyên liệu ít và thường xuyên thay đổi không thích hợp với các dây chuyền chiết xuất liên tục [7].

1.2.3. Kỹ thuật phun sấy làm khô dịch chiết dược liệu.

- Phun sấy là quá trình chuyển nguyên liệu dạng lỏng thành sản phẩm khô dạng bột. Dòng chất lỏng được phân tán thành những giọt nhỏ li ti nhờ bộ phận phun sương. Những giọt nhỏ phun ran gay lập tức tiếp xúc với dòng khí nóng, kết quả là nước bốc hơi nhanh chóng nhưng nhiệt độ của nguyên liệu vẫn ở mức thấp. Nhờ vậy nguyên liệu được sấy khô mà không làm thay đổi đáng kể tính chất của sản phẩm. Thời gian sấy khô các giọt lỏng dạng sương trong phun sấy nhanh hơn nhiều so với các quá trình sấy khác [7].

- Phun sấy gồm ba giai đoạn cơ bản:

+ Giai đoạn 1: Chuyển dịch lỏng cần sấy thành dạng sương mù nhờ bộ phận phun sương trong thiết bị.

+ Giai đoạn 2: Hòa trộn giọt phun với dòng khí nóng để tách ẩm ra khỏi nguyên liệu.

+ Giai đoạn 3: Tách sản phẩm ra khỏi dòng khí nóng bằng cyclon hoặc túi lọc.

- Ưu điểm:

+ Sản phẩm có dạng bột mịn, đồng nhất, xốp, dễ hòa tan, không cần qua giai đoạn nghiền, nên dễ sử dụng trong các dạng thuốc rắn.

+ Thời gian tiếp xúc với nhiệt rất ngắn, do đó chất lượng sản phẩm ít bị biến đổi, áp dụng được với dịch chiết chứa các thành phần nhạy cảm với nhiệt.

+ Thiết bị có năng suất cao và có thể hoạt động liên tục.

- Nhược điểm: Kích thước thiết bị lớn, chi phí đầu tư cao và tốn năng lượng.

1.3. Viên nang cứng.

1.3.1. Thành phần viên nang.

1.3.1.1. Vỏ nang.

- Thành phần của vỏ nang: Thành phần chính của vỏ nang là Gelatin, ngoài ra còn có chất màu, cản quang, chất bảo quản.. Các Polyme khác cũng

có thể được sử dụng để thay thế Gelatin làm vỏ nang, (ví dụ Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) gel hóa ở nhiệt độ cao).

- Hình dạng của vỏ nang: Vỏ nang cứng gồm hai nửa hình trụ lồng khít vào nhau (mỗi nửa có một đầu kín và một đầu hở). Thân và nắp nang có hai khớp khóa; khớp sơ bộ và khớp chính. Vỏ nang có nhiều cỡ, thể tích khác nhau và được đánh số tương ứng với thể tích.

- Kích cỡ vỏ nang: Vỏ nang rỗng được sản xuất theo kích cỡ đường kính thống nhất, gồm các loại được đánh số từ 000 đến 5. Trên thực tế, sử dụng phổ biến ba loại vỏ nang là nang số 0; số 1 và số 2, thể tích của mỗi loại vỏ nang được trình bày trên bảng 1.1 dưới đây:

Bảng 1.1.Cỡ số vỏ nang và thể tích của chúng [7].

Cỡ nang	000	00	0	1	2	3	4	5
Thể tích nang (ml)	1,37	0,91	0,67	0,50	0,37	0,30	0,21	0,10

1.3.1.2. Hỗn hợp nạp trong vỏ nang.

Cao dược liệu thường được phối hợp với các tá dược thích hợp, bào chế thành dạng hạt để nạp vào nang. Việc lựa chọn tá dược tủy thuộc vào bản chất của cao dược liệu. Đối với cao dược liệu, các loại tá dược thường được lựa chọn để khảo sát bao gồm:

- Tá dược độn: Các loại tá dược độn dùng trong viên nén như tinh bột, lactose, dicalciphosphat đều có thể dùng trong viên nang. Calci carbonat và magnesi carbonat là những tá dược có khả năng hút, cho nên có thể dùng cho viên nén chứa cao mềm dược liệu.

- Tá dược dính: Cao dược liệu có thể chất dẻo dính nên bản thân cao có thể đóng vai trò tá dược dính trong công thức. Ethanol cũng được dùng làm tá dược dính trong công thức chứa cao dược liệu, giúp cho việc phân tán cao và khối bột dễ dàng hơn, cho hạt dễ sấy khô. Ngoài ra còn dùng hồ tinh

bột, dịch thể gelatin, dịch gôm Arabic, dung dịch PVP…

- Tá dược trơn: Tá dược trơn giúp hạt trơn chảy đều, đảm bảo hạt được phân bố đồng đều vào nang. Các tá dược trơn thường dùng là Magnesi stearat, Talc, Aerosil...

- Tá dược rã: Trong trường hợp có xát hạt hay có nén ép (máy có đĩa phân liều hoặc vít phân liều) thì nên có tá dược rã để giúp thuốc phóng thích nhanh. Nên sử dụng các tá dược siêu rã (Tinh bột biến tính, Cellulose biến tính, Crospovidon) để giảm khối lượng hạt đóng vào nang [7].

1.3.2. Ưu nhược điểm viên nang cứng.

- Ưu điểm viên nang cứng:

+ Sinh khả dụng cao hơn viên nén quy ước, có khả năng giải phóng dược chất nhanh do vỏ nang dễ rã và tiểu phân dược chất chưa bị nén hoặc bị nén ít.

+ Đa dạng trong việc phối hợp các thành phần đóng vào nang, có thể là các dạng bào chế khác nhau, có thể giúp cách ly các thành phần tương kỵ.

+ Hình thức, màu sắc của sản phẩm đẹp.

+ Che dấu được mùi vị, dễ nuốt do có hình dạng thuôn, bề mặt trơn.

+ Dễ đóng gói, vận chuyển, bảo quản.

+ Có thể kiểm soát giải phóng dược chất theo mong muốn.

- Nhược điểm viên nang cứng:

+ Năng suất sản xuất thấp hơn so với viên nén.

+ Chi phí sản xuất thường cao hơn so với viên nén.

+ Không áp dụng được với các dược chất hút ẩm mạnh.

+ Khi uống, có thể kích ứng đường tiêu hóa, do tập trung nồng độ dược chất cao tại chỗ nhanh khi mở vỏ.

+ So với viên nén, viên nang là dạng thuốc tương đối dễ nghiên cứu để xây dựng công thức. Dễ triển khai sản xuất ở các quy mô khác nhau, có thể

sử dụng các máy đóng nang thủ công trong quy mô nhỏ hoặc các máy đóng nang bán tự động và tự động trong quy mô sản xuất lớn. Chính vì vậy trong đề tài này, chúng tôi lựa chọn dạng bào chế viên nang cứng cho CTHepaB.

1.4. Quy trình bào chế viên nang cứng.

1.4.1. Quy trình tạo hạt.

- Cao dược liệu có thể chất dẻo dính, hàm lượng nước cao, do đó chúng tôi lựa chọn phương pháp xát hạt ướt để tạo hạt. Đây cũng là phương pháp tạo hạt thông dụng nhất hiện nay do có nhiều ưu điểm như dễ phân phối dược chất đồng đều hơn, quy trình và thiết bị đơn giản, dễ thực hiện.

- Các bước của quá trình tạo hạt ướt bao gồm:

+ Nghiền và trộn hỗn hợp bột khô: Các thành phần ban đầu cần phải được trộn kỹ để đảm bảo sự phân bố đồng đều của hoạt chất trong hạt. Đây là quá trình trộn rắn - rắn, thường được tiến hành qua bước nghiền mịn trước để đảm bảo đồng nhất hỗn hợp.

+ Tạo khối ẩm của hỗn hợp bột: Thêm tá dược dính lỏng vào khối bột, trộn cho đến lúc tá dược thấm đều vào khối bột, tạo ra sự liên kết các tiểu phân bột vừa đủ để tạo hạt. Để tá dược dễ thấm vào khối bột, nên dùng tá dược nóng, nhất là với những tá dược có độ nhớt cao như dịch thể gelatin, hồ tinh bột.

+ Xát hạt: Khối ẩm sau khi trộn đều, để ổn định trong một khoảng thời gian nhất định rồi xát qua cỡ rây quy định.

+ Sấy hạt: Hạt sau khi xát, tải thành lớp mỏng và sấy ở nhiệt độ quy định. Trước khi sấy, có thể để thoáng gió cho hạt se mặt, sau đó đưa vào buồng sấy và nâng nhiệt độ từ từ cho hạt dễ khô đều. Trong quá trình sấy, thỉnh thoảng đảo hạt, tách các cục vón và kiểm tra nhiệt độ sấy. Hạt thường được sấy cho đến độ ẩm từ 1 – 7% tùy từng loại dược chất.

+ Sửa hạt: Hạt sau khi sấy, phải xát hạt lại qua cỡ rây quy định để phá vỡ các cục vón, tạo ra được khối hạt có kích thước đồng nhất [7].

1.4.2. Quy trình đóng hạt vào nang.

Quy trình đóng hạt vào nang gồm 3 giai đoạn:

- Mở vỏ nang.
- Đóng thuốc vào nang.
- Đóng nắp nang: Sau khi đóng thuốc vào nang, nắp nang được lắp vào thân nang bằng khớp chính. Nang sau đó được làm sạch bột, đánh bóng và đóng gói [6], [7].

1.5.Tổng quan về nghiên cứu độc tính cấp.

1.5.1. Nguyên nhân tiến hành thử độc tính.

- Nghiên cứu về độc tính của các thuốc đông y nhằm :

+ Đánh giá tính xác thực của thuốc (Authenticity) với các tiêu chuẩn cảm quan, thực vật, hóa lý và nếu có thể cả tiêu chuẩn sinh học.

+ Đánh giá chất lượng thuốc thông qua việc xác định hàm lượng tạp chất, hàm lượng hoạt chất hoặc nhóm hoạt chất của dược liệu.

+ Đánh giá hiệu quả của quy trình bào chế cổ truyền.

+ Đánh giá độc tính của thuốc.

+ Đánh giá tác dụng điều trị.

+ Đánh giá tác dụng hỗ trợ điều trị.

+ Đánh giá tác dụng có lợi đối với sức khỏe con người.

+ Các đánh giá khác tùy theo mục tiêu nghiên cứu.

- Hiện nay nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam thường sử dụng thuốc đông y để điều trị, mang lại lợi ích lớn cho người bệnh vì ít tác dụng không mong muốn, ít tốn kém [17].

1.5.2. Thử nghiệm độc tính cấp.

1.5.2.1. Mục tiêu.

- Thử độc tính cấp nhằm cung cấp thông tin cho việc xếp loại mức độ độc của thuốc; điều trị ngộ độc cấp; thiết lập mức liều cho những thử nghiệm độc tính tiếp theo. Do vậy, các phép thử độc tính cấp cần xác định:

+ Liều an toàn

+ Liều dung nạp tối đa;

+ Liều gây ra độc tính có thể quan sát được;

+ Liều thấp nhất có thể gây chết động vật thí nghiệm (nếu có).

+ Liều LD_{50} gần đúng (nếu có thể xác định được).

+ Những triệu chứng ngộ độc điển hình có thể quan sát được trên động vật và khả năng hồi phục (nếu có).

1.5.2.2. Mô hình thử.

- Nguyên tắc lựa chọn:

+ Tùy theo mục đích của mỗi nghiên cứu và loại mẫu thử và những thông tin sẵn có để lựa chọn mô hình thử thích hợp. Loài động vật gặm nhấm thường được sử dụng là chuột nhắt, chuột cống; loài không gặm nhấm có thể dùng là chó hoặc khỉ. Số nhóm và số lượng cho mỗi nhóm tùy theo mô hình áp dụng.

+ Thử sơ bộ: thường được thực hiện trong hầu hết các mô hình thử. Dựa vào kết quả trong thử nghiệm sợ bộ để lựa chọn, bố trí thử nghiệm chính thức. Với những trường hợp thông tin cho thấy mẫu thử hoặc các chất liên quan có thể không độc hoặc ít độc, có thể thử trên một loài động vật (gặm nhấm). Đối với các chế phẩm có độc cao hoặc có yêu cầu đặc biệt về khoa học, cần thiết thử trên hai loài ĐVTN (gặm nhấm và không gặm nhấm).

+ Khuyến cáo: Để bảo vệ động vật, các mô hình sử dụng số ít động vật

thí nghiệm được ưu tiên lựa chọn.

- Mô hình liều cố định:

+ Nguyên tắc: Mô hình thử liều cố định được các nước thuộc OECD áp dụng và ban hành chính thức năm 2001 [54]. Thử nghiệm được thực hiện với các mức liều xác định 5,50,300,2000,5000mg/kg hay 1,0/kg ĐVTN. Lựa chọn liều thử đầu tiên liều thử trên một nhóm 5 ĐVTN. Thử nghiệm tiếp tục cho đến khi xác định mức độ độc dựa trên đáp ứng ĐVTN chết hoặc không và các triệu chứng ngộ độc, khả năng hồi phục quan sát được. Xác định giá trị LD_{50} gần đúng (nếu có). Phép thử phù hợp với tất cả trường hợp cần xác định độc tính cấp [17].

- Mô hình Tăng-Giảm:

+ Nguyên tắc: Mô hình thử Tăng- Giảm được các nước thuộc OECD áp dụng và ban hành chính thức năm 2001 [55]. Thử nghiệm được tiến hành trên các mức liều được tính theo hệ số bươc nhảy liều, thực hiện lần lượt trên từng ĐTVN theo tiến trình tăng hoặc giảm liều và tiếp tục cho đến khi đạt điều kiện dừng lại. Đánh giá kết quả bằng quan sát các biểu hiện và triệu chứng ngộ độc theo qui định chung và tính giá trị LD_{50} gần đúng (nếu có) theo qui định riêng của phương pháp.

+ Phương pháp này áp dụng phù hợp cho các chất có thể gây chết nhanh trong 1-2 ngày không phù hợp cho các chất gây chết từ từ trong 5 ngày hoặc hơn. Ngoài ra, có thể áp dụng phương pháp này trong trường hợp cần thử trên loài động vật không gặm nhấm.

- Mô hình thử theo Behrens:

+ Nguyên tắc: Mô hình được Behrens đề xuất từ năm 1929 với lập luận " Những con vật đã sống ở một mức liều thử nào đó thì sẽ sống với tất cả những mức liều thấp hơn và những con vật đã chết ở một mức liều sẽ chết ở tất cả các mức liều cao hơn".

- Mô hình theo Litchfield – wilcoxon:

+ Nguyên tắc: Mô hình được Litchfield- Wilcoxon đề xuất năm 1949 sau khi xem xét, cải tiến và cố gắng khắc phục những hạn chế của một số phương pháp trước đó. Kết quả được ghi đồ thị trên giấy log- probit và được tính theo phương pháp toán đồ có hiệu chỉnh, do vậy cho kết quả chính xác hơn. Trước đây, phương pháp thường được áp dụng trong tính giá trị LD50 cho những chất có độc tính cao [17].

- Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp Litchfield-Wilcoxon do có tính chính xác cao nhất

Chương 2
NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và thiết bị nghiên cứu.

2.1.1. Nguyên vật liệu.

- Dược liệu: Bài thuốc CTHepaB nghiên cứu, cụ thể như sau:

Bảng 2.1. Thành phần của bài thuốc CTHepaB

TT	Thành phần bài thuốc	Bộ phận dùng	Tên khoa học	Liều lượng
1.	Cà gai leo	Rễ	*Solanum hainanense Hance Solanaceae.*	30g
2.	Cỏ sữa nhỏ lá	Lá, thân, rễ (toàn cây) (thường phần trên mặt đất)	*Eurphorbia thymifolia Burm.*	20g
3.	Chi tử	Quả chín dành dành	*Gardeniae jasminoidis Ellis*	10g
4.	Đại Hoàng	Thân, rễ	*Radix et Rhizoma Rhei*	05g
5.	Đinh lăng	Toàn bộ cây	*Cordyceps Militaris*	10g
6.	Nấm trùng thảo (Đông trùng hạ thảo)	Cả con và lá	*Ophiocordyceps sinensis*	05g
7.	Linh chi	Linh chi đỏ	*Ganoderma lucidum*	10g
8.	Hà thủ ô	Củ Hà thủ ô đỏ	*Fallopia multiflora*	10g

Hình 2.1: Các dược liệu trong bài thuốc CTHepaB

- Các dược liệu trong bài thuốc được dùng dưới dạng dược liệu khô và đạt tiêu chuẩn trong Dược điển Việt Nam V [9], được chế biến theo qui định của YHCT và cân theo tỷ lệ như trên (đã được rửa sạch,sấy ở 60^{o}C).

- Hoá chất dung môi sử dụng trong nghiên cứu: Benzen; n-hexan; Dichlomethane; Diethyl ether; Silicagel; NaOH; Acetic anhydride; Calcium chloride; Acetone; HPMC K100M; HPMC K4M; Chloride amonium; Hydrochloride acid; Iodine; Ammonia; nước cất hai lần; Nitrate ferric; Lutrol; Glyceryl stearat; Cremophor R; Cremophor RH; Magienium sulfate; glucose; PEG 4000; mantose; Lactose; Talc; Avicel PH102; Na glucnat starch.

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ.

- Cân phân tích Sartorius (độ chính xác 0,1 mg).
- Cân kỹ thuật (độ chính xác 0,01 g).
- Thiết bị phun sấy LPG5, Trung Quốc.
- Màng lọc kích thước lỗ 0,22µm và 0,45µm.
- Pipet chính xác, bình định mức: Loại A.

- Cốc có mỏ, bình nón, ống nghiệm các loại.
- Bản mỏng silicagel F_{254} tráng sẵn.
- Rây 355 Microns, 3 In Dia, 45MeshSz, Grainger, Anh.
- Máy ly tâm lạnh Universal 320 (Hettich - Đức).
- Máy lắc Minishaker, IKA USA.
- Hệ thống cất quay chân không Ellye (Nhật).
- Cân xác định hàm ẩm tự động Shimadzu - MOC63u, Nhật Bản.
- Máy đo thể tích biểu kiến của hạt và bột ERWEKA SVM (Đức).
- Máy đo tốc độ chảy của hạt và bột ERWEKA GWF (Đức).
- Máy trắc nghiệm hoà tan SR8 plus(Mỹ).
- Máy quang phổ UV-VIS Cintra 40 (Australia).
- Máy đo pH Mettler Toledo MP 220 (Thuỵ sỹ).
- Tủ sấy Memmert ULM - 2001 (Đức).
- Lò nung Emin SX2 – 2.5 – 10 Trung Quốc.
- Bộ lọc hút chân không Alltech – Mỹ.
- Chén nung platinium, 30 ml, Sigma – Mỹ.
- Máy thử độ rã PTZ DIST3, Đức.
- Máy đóng nang – DXD – Teiwan.
- Máy lau nang – Teiwan.
- Các dụng cụ thiết bị khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu.

- Địa điểm: Trung tâm Đào tạo - Nghiên cứu dược, Trung tâm nghiên cứu ứng dụng sản xuất thuốc, Trung tâm nghiên cứu Y - Dược học quân sự, Bộ môn Dược lý - Học viện Quân y; Học viện Y – Dược học cổ truyền Việt Nam

- Thời gian: năm 2019.

2.3. Phương pháp nghiên cứu.

2.3.1. Thiết kế nghiên cứu.

- Nghiên cứu điều chế dịch chiết CTHepaB.
- Nghiên cứu bào chế bột cao khô CTHepaB.
- Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho bột cao khô.
- Nghiên cứu xây dựng công thức bào chế viên nang cứng CTHepaB.
- Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của viên nang cứng CTHepaB.
- Nghiên cứu trên động vật thực nghiệm đánh giá độc tính cấp của viên nang cứng CTHepaB.

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu.

2.3.2.1. Nghiên cứu chiết xuất, bào chế của viên nang cứng CTHepaB.

a. Nghiên cứu bào chế được bột cao khô định chuẩn của bài thuốc CTHepaB và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao khô CTHepaB.

* Nghiên cứu quy trình bào chế cao khô CTHepaB.

- Bào chế cao lỏng CTHepaB từ bài thuốc CTHepaB.

- Cao lỏng của bài thuốc CTHepaB được bào chế theo phương pháp chiết nóng với dung môi là nước, chiết cả bài thuốc theo phương pháp cổ truyền, không chiết riêng từng vị thuốc [7], [13]. Quá trình bào chế cao lỏng được tiến hành theo các bước sau:

+ Xác định các dược liệu đầu vào đạt tiêu chuẩn DĐVN V [5].

+ Cân các dược liệu đạt tiêu chuẩn kiểm nghiệm đầu vào theo công thức.

+ Làm sạch, loại bỏ các tạp chất lạ (nếu có).

+ Nghiền dược liệu bằng máy nghiền búa qua mắt rây 2.0. Khảo sát ảnh hưởng của kích thước dược liệu đến hiệu suất chiết.

+ Làm ẩm dược liệu. Thêm nước ngập dược liệu theo tỷ lệ thích hợp. Khảo sát tỷ lệ dược liệu/dung môi đến hiệu suất chiết cao.

+ Đun sôi và tiếp tục gia nhiệt để hỗn hợp sôi nhỏ thêm 0,5 giờ; 1 giờ;

2 giờ nữa, để nguội, lọc loại tạp, thu được dịch chiết. Khảo sát thời gian và số lần chiết xuất đến hiệu suất chiết cao.

+ Gộp các dịch chiết được cao lỏng CTHepaB.

+ Cô cao đặc, sau đó sấy thành cao khô. Xác định hiệu suất chiết cao.

- Bào chế cao khô CTHepaB từ cao lỏng CTHepaB.

Sau khi khảo sát được quy trình chiết xuất, tiến hành chiết xuất theo quy trình đã xây dựng để thu được cao lỏng CTHepaB (1:1) bào chế bột cao khô CTHepaB bằng phương pháp phun sấy. Các bước tiến hành như sau:

+ Giai đoạn chuẩn bị:

• Chuẩn bị dịch phun: Từ cao lỏng CTHepaB 1:1 trên thêm tá dược và nước để được dịch phun có hàm lượng chất rắn và tỷ lệ tá dược theo các điều kiện khảo sát.

• Chuẩn bị thiết bị phun sấy: Máy phun sấy được vệ sinh sạch sẽ. Lắp đặt các bộ phận của thiết bị vào phần thân máy.

• Chuẩn bị bao bì đóng gói: Túi nilon, lọ thủy tinh có nút kín... đựng sản phẩm.

+ Giai đoạn phun sấy:

• Bật nguồn cấp điện và bật máy. Bật quạt gió, kiểm tra các điểm nối và cửa buồng sấy, không được hở. Cài đặt nhiệt độ đầu vào và bật gia nhiệt.

• Khi đạt được nhiệt độ đầu vào và nhiệt độ đầu ra, bật súng phun và bơm, rửa bằng nước trong khoảng 30 phút. Sử dụng máy khuấy từ khuấy đều để dịch phun đồng nhất. Cấp dịch phun.

• Trong quá trình phun sấy thường xuyên kiểm tra các thông số máy.

• Khi hết dịch phun thu sản phẩm vào lọ thủy tinh, đóng nút kín. Giữa các lần phun, rửa bằng nước 30 phút, tránh tắc vòi phun và tránh nhầm lẫn của lần phun trước.

+ Giai đoạn kết thúc:

• Tắt bơm, súng phun, gia nhiệt, để nguội máy đến khoảng 60^0C rồi tắt quạt gió, tắt nguồn điện. Tháo dỡ các bộ phận máy và vệ sinh sạch sẽ.

d.Các thông số khảo sát phun sấy:

• Loại tá dược hỗ trợ phun sấy: Maltodextrin (MD), Aerosil (AE), MD/ AE (50:50), MD/AE (70:30) và phun trực tiếp không cho tá dược.

• Tỷ lệ tá dược/chất rắn trong cao lỏng LN: 0,5; 0,4; 0,3; 0,2.

• Nhiệt độ đầu vào của buồng phun: 150^0C, 140^0C, 130^0C,120^0C.

+ Căn cứ khảo sát lựa chọn quy trình phun sấy, các chỉ tiêu đánh giá lựa chọn gồm:

Thông số vật lý của bột, phương pháp thử và cách tính:

• Hình thái bột: Quan sát bằng cảm quan (hình thức, màu sắc, mùi vị).

• Tỷ trọng biểu kiến của bột (g/ml) và chỉ số nén CI (%): Cân chính xác khoảng 5 g bột, cho vào ống đong 25ml khô sạch, đọc thể tích ban đầu của bột (V_1), gõ đến thể tích không đổi (V_2). Tỷ trọng gõ (d_2) là tỷ trọng biểu kiến của bột, tỷ trọng không gõ (d_1) và chỉ số nén (CI) tính theo công thức:

$$d_1 = m/V_1 d_2 = m/V_2$$

$$CI\ (\%) = \frac{d_2 - d_1}{d_2} x100$$

• Độ ẩm: Xác định độ ẩm theo phương pháp mất khối lượng do làm khô. Bằng máy đo hàm ẩm tự động (cân khoảng 2g, ở 105^0C trong 4 giờ).

• Hiệu suất thu hồi hoạt chất:

$$H_{HC}(\%) = \frac{\text{Hàm lượng hoạt chất trong bột cao khô}}{\text{Hàm lượng hoạt chất theo lý thuyết}} \text{ x } 100$$

Hoạt chất để xác định là glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin theo phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại.

Hàm lượng hoạt chất theo lý thuyết tính theo công thức sau:

$$HL_{LT} = \frac{C_{DC} \text{ x } M_{DC}}{M_{DC} \text{ x} CR_{DC} + M_{TD}}$$

Trong đó:

C_{DC}: Hàm lượng hoạt chất trong dịch phun sấy (µg/g).

M_{DC}: Khối lượng dịch chiết cho mẻ phun sấy (g).

CR_{DC}: Tỷ lệ (%) chất rắn có trong cao lỏng 1:1.

M_{TD}: Khối lượng tá dược độn thêm vào cho một mẻ phun sấy (g).

Hiệu suất phun sấy tính theo công thức sau:

$$H_{PS}\ (\%) = \frac{M_{SP} \text{ x } (100\text{-}A)}{M_{DC} \text{ x } CR_{DC} + M_{TD}}$$

Trong đó:

H_{PS}: Hiệu suất phun sấy.

M_{DC}: Khối lượng dịch chiết của 1 mẻ phun sấy (g).

CR_{DC}: Tỷ lệ (%) chất rắn trong dịch chiết của 1 mẻ phun sấy.

M_{TD}: Khối lượng tá dược độn thêm dịch chiết của 1 mẻ phun sấy (g).

M_{SP}: Khối lượng bột cao khô thu được (g).

A: Độ ẩm của bột cao khô phun sấy (%).

* Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho cao khô CTHepaB.

Tiến hành kiểm nghiệm đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng cao khô CTHepaB. Căn cứ vào kết quả kiểm nghiệm và đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng cao khô CTHepaB để xây dựng tiêu chuẩn cơ sở. Tiêu chuẩn gồm có đầy đủ các chỉ tiêu chất lượng và phương pháp thử.

- Tính chất: Thử bằng cảm quan chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

- Độ tan: Tiến hành theo DĐVN V, liều thử là 1 gam bột cao khô.

- Độ ẩm: Tiến hành theo DĐVN V (2 g, 105^0C, 4 giờ).

- Tro toàn phần: Cân chính xác khoảng 1g bột cao khô CTHepaB, tiến hành thử theo DĐVN V [5].

- Hình thái kích thước tiểu phân: Chụp khối bột dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM): Bột cao khô CTHepaB phải có dạng hình cầu bề mặt nhăn nheo, xốp, hình ảnh kích thước chụp SEM ≤ 200 μm.

- Định tính: Định tính một số dược liệu có trong bài thuốc: cà gai leo, chi tử và hà thủ ô, xác định theo phương pháp sắc ký lớp mỏng.

- Định lượng: Định lượng glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin theo phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại.

- Giới hạn nhiễm khuẩn: Thử theo DĐVN V [5], phương pháp đĩa thạch.

- Giới hạn kim loại nặng: Tiến hành theo phương pháp của DĐVN V.

b. Nghiên cứu xây dựng công thức bào chế viên nang cứng CTHepaB và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở viên nang cứng CTHepaB.

* Nghiên cứu xây dựng công thức bào chế viên nang cứng CTHepaB

- Từ bột cao khô CTHepaB bán thành phẩm đã được tiêu chuẩn hóa ở trên, tiếp tục nghiên cứu bào chế viên nang cứng CTHepaB với hàm lượng 400 mg bột cao phun sấy.

- Để xây dựng công thức bào chế, chúng tôi lựa chọn một số tá dược để khảo sát công thức viên.

Bảng 2.2. Thành phần dược chất, tá dược khảo sát xây dựng công thức viên nang cứng CTHepaB.

TT	Thành phần	Vai trò	Hàm lượng
1	Bột cao khô CTHepaB	Dược chất	400 mg
2	Natri stach glycolat	Tá dược siêu rã	Khảo sát
3	Lactose phun sấy	Tá dược độn	Khảo sát
4	Aerosil	Tá dược trơn, chống ẩm	Khảo sát
5	Magnesi stearat	Tá dược trơn	5 mg

- Từ tính chất của bột dược chất, căn cứ vào yêu cầu chất lượng của chế phẩm, chúng tôi lựa chọn các tá dược khảo sát gồm: tá dược rã, tá dược chống hút ẩm, tá dược trơn và tá dược độn.

- Chúng tôi lựa chọn cỡ nang là nang số 0 với dung tích là 0,67 ml. Lượng tá dược thêm vào được tính theo công thức sau:

$$m_{td} = (V_{nang} – m_{dc} / d_{dc}) \times d_{td}$$

Trong đó:

m_{td}: Khối lượng tá dược thêm vào.

V_{nang} : Thể tích nang.

m_{dc}: Khối lượng hỗn hợp dược chất.

$d_{dc,}$ d_{td}: Tỷ trọng của hỗn hợp dược chất và tá dược.

- Phương pháp bào chế: Để khảo sát công thức, chúng tôi tiến hành bào chế qua các bước như sau:

+ Chuẩn bị nguyên liệu, dụng cụ và thiết bị: các nguyên liệu đạt tiêu chuẩn mới đưa vào sản xuất. Dụng cụ, thiết bị phải sạch, được hiệu chỉnh và phù hợp với quy mô sản xuất.

+ Trộn bột kép:

• Trộn bột dược chất với tá dược chống hút ẩm.

• Trộn tiếp bột với các tá dược còn lại theo nguyên tắc đồng lượng.

+ Xát hạt qua rây 0,355 mm để đồng nhất khối bột.

+ Đóng nang trên máy đóng nang thủ công.

+ Làm sạch nang bằng máy lau nang.

+ Lựa chọn các nang đạt tiêu chuẩn.

+ Đóng lọ.

+ In nhãn và đóng hộp.

+ Bảo quản: nơi khô mát, tránh ánh sáng trực tiếp.

- Căn cứ lựa chọn công thức:

+ Độ rã: thử theo phương pháp của DĐVN V [5].

+ Tính hút ẩm: Các công thức khảo sát được đóng nang được để khay ở cùng điều kiện: nhiệt độ $30^0C \pm 2^0C$, độ ẩm tương đối 75 ± 5%. Sau các khoảng thời gian khác nhau lấy mẫu và xác định độ ẩm bằng máy Shimadzu - MOC63u (Nhật Bản).

+ Độ ổn định của hoạt chất Glycoalkaloid toàn phần tính theo Solasodin: Thử nghiệm sơ bộ trong 30 ngày. Định lượng Glycoalkaloid toàn phần tính theo Solasodin theo phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại.

* Nghiên cứu tiêu chuẩn cơ sở của viên nang cứng CTHepaB.

- Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của viên nang cứng CTHepaB trên các chỉ tiêu sau:

+ Tính chất: Thử bằng cảm quan chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

+ Độ đồng đều khối lượng: Thử theo DĐVN V. Yêu cầu: ± 7,5%.

+ Độ rã: Thử theo DĐVN V [5]. Yêu cầu: Không quá 30 phút.

+ Mất khối lượng do làm khô: Không quá 5,0%. Tiến hành theo DĐVNV [5].

+ Định tính: Định tính một số dược liệu: cà gai leo, chi tử và hà thủ ô, xác định theo phương pháp sắc ký lớp mỏng.

+ Định lượng: Định lượng Glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin theo phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại.

- Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 0,05 g Solasodin chuẩn, chọ vào bình định mức 100 ml, thêm một ít Methanol (TT), lắc cho tan hết Solasodin, thêm tiếp Methanol (TT) đến vạch và lắc đều.

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 20,0 g chế phẩm, đun hồi lưu trong cách thủy trong 3 h với 50 ml dung dịch Acid acetic 5 % trong Methanol (TT). Để nguội, lọc qua phễu thủy tinh xốp số 4, rửa bình và phễu lọc bằng 30 ml dung dịch acid acetic 5 % trong Methanol (TT), gộp dịch lọc và dịch rửa, cô trên cách thủy đến cạn. Hòa tan cắn bằng lắc siêu âm với

Methanol (TT), chuyển vào bình định mức 10 ml, thêm Methanol (TT) đến vạch. Đậy nút và lắc đều.

- Cách tiến hành:

Lần lượt cho vào 3 bình gạn dung tích 50 ml các dung dịch sau:

Bảng 2.3: Định lượng Glycoalkaloid toàn phần tính theo Solasodin

Dung dịch sử dụng	**Bình 1**	**Bình 2**	**Bình 3**
	Dung dịch chuẩn (ml)	Dung dịch thử (ml)	Mẫu trắng (ml)
Dung dịch đệm Phosphat 0,1 M pH 8,0 (TT)	5	5	5
Dung dịch xanh Bromothymol 0,2 % (Hoà tan 0,2 g xanh Bromthymol (TT) trong Ethanol 20 % (TT), thêm Ethanol 20 % (TT) vừa đủ 100 ml.	0,5	0,5	0,5
Dung dịch Solasodin chuẩn (0,5 mg/ml)	0,5	0	0
Dung dịch thử	0	0,5	0
Methanol	0	0	0,5
Cloroform	10	10	10

Lắc kỹ 3 bình trên trong 15 phút, sau đó để yên khoảng 30 phút cho phân lớp. Gạn lấy lớp Cloroform vào 3 bình gạn khác. Lắc lớp Cloroform với 10 ml dung dịch natri Hydroxyd 0,05 N (TT). Để yên 30 min cho phân lớp. Gạn lấy dung dịch kiềm màu xanh. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 616 nm của các dung dịch kiềm thu được.

Tính hàm lượng Glycoalcaloid trong mẫu thử theo Solasodin dựa vào độ hấp thụ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng của Solasodin chuẩn.

+ Giới hạn nhiễm khuẩn: Thử theo DĐVN V [5], phương pháp đĩa thạch. Yêu cầu: Phải đạt yêu cầu mức 4 (DĐVN V).

2.3.2.2.Đánh giá độc tính cấp của viên nang cứng CTHepaB trên động vật thực nghiệm.

a. Cỡ mẫu và cách chọn mẫu.

60 con chuột nhắt trắng chủng Swiss thuần chủng cả 2 giống, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, tại thời điểm nghiên cứu mỗi con 6 tuần tuổi, trọng lượng mỗi con là 20 ± 2g chia 6 lô, mỗi lô 10 con.

b. Cách tiến hành:

- Được xác định trên chuột nhắt trắng theo đường uống bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon theo quy định và hướng dẫn của Bộ Y tế và Tổ chức Y tế thế giới [9].

- Xác định độc tính cấp (LD_{50}) của thuốc CTHepaB trên chuột nhắt trắng theo "quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực thuốc cổ truyền" và "phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc" [17].

- Xác định độc tính cấp là tìm liều cao nhất không gây chết chuột, liều thấp nhất gây chết 100% và các liều trung gian.

- 60 con chuột nhắt trắng được nhịn ăn 12 giờ trước khi thí nghiệm nước uống sạch được cung cấp đầy đủ sau đó chia thành 6 lô mỗi lô 10 con, số chuột các lô này, sau 12 giờ nhịn ăn, cho chuột uống thuốc với thể tích 0,2ml/10g thể trọng/lần nhưng với các liều tăng dần, tối đa 3 lần/ 24 giờ, mỗi lần uống cách nhau 3 giờ, cụ thể như sau:

+ Lô 1: Uống thuốc "CTHepaB" với liều 60ml tương đương 6g/kg trọng lượng chuột.

+ Lô 2: Uống thuốc "CTHepaB" với liều 60ml tương đương 12g/kg trọng lượng chuột.

+ Lô 3: Uống thuốc "CTHepaB" với liều 60ml tương đương 18g/kg trọng lượng chuột.

+ Lô 4: Uống thuốc "CTHepaB" với liều 60ml tương đương 24g/kg trọng lượng chuột.

+ Lô 5: Uống thuốc "CTHepaB" với liều 60ml tương đương 30g/kg trọng lượng chuột.

+ Lô 6: Uống thuốc "CTHepaB" với liều 60ml tương đương 36g/kg trọng lượng chuột.

- 6 lô thử được uống "CTHepaB" với liều với liều tăng dần để xác định độc tính cấp.

- Tìm liều cao nhất không gây chết chuột, liều thấp nhất gây chết 100% số chuột và các liều trung gian.

- Chuột được uống thuốc cưỡng bức, thuốc thử được đưa thẳng vào dạ dày chuột bằng kim cong đầu tù.

- Tính toán xác định LD_{50}: Trong số các mức liều đem thử, khoảng cách giữa mức liều cao nhất chưa gây chết một con chuột nào và mức liều thấp nhất gây chết 100% số chuột, cùng số chuột chết trong mỗi lô ở các mức liều nằm trong khoảng cách này được sử dụng để tính toán.

2.4. Các biến số, chỉ số trong nghiên cứu.

2.4.1. Nghiên cứu chiết xuất, bào chế của viên nang cứng CTHepaB.

2.4.1.1. Nghiên cứu bào chế được bột cao khô định chuẩn của bài thuốc CTHepaB và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao khô CTHepaB.

a. Nghiên cứu quy trình bào chế cao khô CTHepaB của bài thuốc CTHepaB.

- Bào chế được cao lỏng CTHepaB từ bài thuốc CTHepaB bằng phương pháp chiết nóng với dung môi là nước:

+ Khảo sát ảnh hưởng của kích thước dược liệu đến hiệu suất chiết.

+ Thu được dịch chiết theo thời gian.

+ Khảo sát tỷ lệ dược liệu/dung môi đến hiệu suất chiết cao.

+ Khảo sát thời gian và số lần chiết xuất đến hiệu suất chiết cao.

+ Xác định hiệu suất chiết cao.

+ Thu được cao lỏng CTHepaB (1:1).

- Bào chế được cao khô CTHepaB từ cao lỏng CTHepaB bằng phương pháp phun sấy:

+ Các thông số khảo sát phun sấy:

• Loại tá dược, tỷ lệ tá dược hỗ trợ, ảnh hưởng đến quá trình phun sấy.

• Tỷ lệ tá dược/chất rắn trong cao lỏng.

• Nhiệt độ đầu vào của buồng phun.

+ Các chỉ tiêu đánh giá lựa chọn cao khô CTHepaB gồm:

• Thông số vật lý của bột.

• Hình thái bột: Quan sát bằng cảm quan (hình thức, màu sắc, mùi vị).

• Tỷ trọng biểu kiến của bột (g/ml) và chỉ số nén CI (%).

• Độ ẩm.

• Hiệu suất thu hồi hoạt chất.

b. Xây dựng được tiêu chuẩn cơ sở cho cao khô CTHepaB.

Tiêu chuẩn gồm có đầy đủ các chỉ tiêu chất lượng:

- Tính chất.

- Độ tan.

- Độ ẩm.

- Tro toàn phần.

- Hình thái kích thước tiểu phân.

- Định tính: Định tính một số dược liệu có trong bài thuốc: Cà gai leo, Chi tử và Hà thủ ô.

- Định lượng: Định lượng Glycoalkaloid toàn phần.
- Giới hạn nhiễm khuẩn.
- Giới hạn kim loại nặng.

2.4.1.2. Xây dựng công thức bào chế viên nang cứng CTHepaB và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở viên nang cứng CTHepaB

a. Xây dựng dược công thức bào chế viên nang cứng CTHepaB

- Khảo sát được công thức viên nang:

+ Độ rã.
+ Tính hút ẩm.
+ Độ ổn định của hoạt chất glycoalkaloid toàn phần.

- Chọn cỡ nang là nang số 0 với dung tích là 0,67 ml và xác định được công thức bào chế viên nang cứng CTHepaB.

- Đóng nang trên máy đóng nang thủ công.
- Lựa chọn các nang đạt tiêu chuẩn.

b. Nghiên cứu tiêu chuẩn cơ sở của viên nang cứng CTHepaB.

Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của viên nang CTHepaB trên các chỉ tiêu sau:

- Tính chất.
- Độ đồng đều khối lượng.
- Độ rã.
- Mất khối lượng do làm khô.
- Giới hạn nhiễm khuẩn.
- Kim loại nặng.
- Định tính được một số dược liệu: cà gai leo, chi tử và hà thủ ô.
- Định lượng được Glycoalkaloid toàn phần.

2.4.2. Nghiên cứu độc tính cấp của viên nang CTHepaB.

- Theo dõi chuột hàng ngày về số lượng sống chết, tình trạng chung, khả năng hoạt động, mức độ tiêu thụ thức ăn, nước uống, tình trạng phân, lông.

2.5. Phân tích và xử lý số liệu.

- Các dữ liệu được phân tích bằng phần mềm Microsoft excel 2007.

- LD_{50} được tính bằng phần mềm Excel, có kiểm tra lại bằng phương pháp Litchfield-Wilcoxon.

2.6. Đạo đức trong nghiên cứu

- Nghiên cứu được thực hiện với mục đích xác định độc tính cấp của viên nang cứng CTHepaB trên thực nghiệm nhằm mục đích tìm ra thêm một phương pháp điều trị mới đảm bảo an toàn và hiệu quả cho bệnh nhân bị viêm gan ngoài ra không có bất cứ mục đích nào khác.

- Các số liệu thu thập trong nghiên cứu là hoàn toàn trung thực, có độ tin cậy và chính xác cao.

CHƯƠNG 3
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Nghiên cứu chiết xuất, bào chế của viên nang cứng CTHepaB.

3.1.1. Kết quả nghiên cứu quy trình bào chế cao khô CTHepaB và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao khô CTHepaB.

3.1.1.1. Xây dựng quy trình bào chế cao lỏng CTHepaB.

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của kích thước dược liệu

Mẫu thử		**Khối lượng dược liệu (g)**	**Hàm ẩm (%)**	**Cao khô TĐ (g)**	**Hiệu suất (%)**
Phiến	Lần 1	100,26	18,80	5,64	5,63
	Lần 2	100,29	19,10	5,69	5,67
	Lần 3	100,24	19,25	5,66	5,65
	Mean ± SD			**5,66 ± 0,03**	**5,65 ± 0,02**
Bột thô	Lần 1	100,32	17,65	5,94	5,92
	Lần 2	100,41	18,20	6,01	5,99
	Lần 3	.100,28	17,95	5,98	5,96
	Mean ± SD			**5,98 ± 0,04**	**5,96 ± 0,03**

Kết quả bảng 3.1.cho thấy:

- Hiệu suất chiết xuất với dược liệu được xây thô là 5,96 % so với 5,65 % hiệu suất chiết xuất dược liệu phiến.

- Bởi vậy sử dụng dược liệu được xay thô cho các nghiên cứu tiếp theo để khảo sát các thông số qui trình chiết xuất.

Bảng 3.2. Khối lượng cao thu được từ các lần chiết ở các thời gian chiết khác nhau

Thời gian/số lần		**Khối lượng dược liệu (g)**	**Cao khô TĐ (g)**	**Tỷ lệ % so với toàn bộ cao chiết**
0,5 h	Lần 1	100,28	3,11	58,24
	Lần 2		1,32	24,72
	Lần 3		0,61	11,42
	Lần 4		0,30	5,62
	Tổng		**5,34**	**100**
1 h	Lần 1	100,31	3,91	64,63
	Lần 2		1,57	25,95
	Lần 3		0,46	7,60
	Lần 4		0,11	1,82
	Tổng		**6,05**	**100**
2 h	Lần 1	100.25	4,19	68,80
	Lần 2		1,35	22,17
	Lần 3		0,46	7,55
	Lần 4		0,09	1,48
	Tổng		**6,09**	**100**

Kết quả bảng 3.2.cho thấy:

- Khi thời gian chiết tăng thì lượng cao chiết được cũng tăng lên. Khối lượng cao thu được ở tập trung chủ yếu ở 3 lần chiết đầu tiên lần lượt 94,38%, 98,18% và 98,52%.

- Nhận thấy lượng cao thu được với thời gian chiết 1h/lần là 6,05g không khác biệt nhiều so với 2h/lần là 6,09 g.

- Tổng khối lượng cao thu được ở 3 lần chiết đầu trong điều kiện 1h/lần là 98,18%, ở lần chiết 4 sản phẩm thu được rất ít (1,82%).

Bảng 3.3. Bảng hiệu suất chiết suất cao với các tỷ lệ DL/DM khác nhau

Tỷ lệ DL/DM		**Khối lượng DL (g)**	**Khối lượng cao (g)**	**Hiệu suất (%)**
1/8	Lần 1	100,12	5,92	5,91
	Lần 2	100,09	5,86	5,85
	Lần 3	100,15	5,96	5,95
	Mean ± SD		**5,91 ± 0,05**	**5,91 ± 0,05**
1/10	Lần 1	100,08	6,04	6,04
	Lần 2	100,11	6,03	6,02
	Lần 3	100,13	6,07	6,06
	Mean ± SD		**6,05 ± 0,02**	**6,04 ± 0,02**
1/12	Lần 1	100,14	6,06	6,05
	Lần 2	100,06	6,04	6,04
	Lần 3	100,16	6,09	6,08
	Mean ± SD		**6,06 ± 0,02**	**6,06 ± 0,02**

Kết quả bảng 3.3.cho thấy:

- Hiệu xuất chiết xuất cao toàn phần khi chiết với tỉ lệ dược liệu/dung môi là 1/8 (5,91%) là thấp nhất.

- Ở tỷ lệ 1/10 hiệu suất chiết xuất 6,04% không khác biệt so với sử dụng tỉ lệ dược liệu/dung môi là 1/12 (hiệu suất chiết xuất là 6,06%).

3.1.1.2. Kết quả nghiên cứu bào chế cao khô CTHepaB từ cao lỏng CTHepaB

Bảng 3.4. Thiết kế ảnh hưởng của loại tá dược hỗ trợ phun sấy

CT	Cao 1:1 (g)	% CR/ Cao	Loại tá dược	Tỷ TD/CR	Nhiệt độ đầu vào (^{0}C)	Tốc độ cấp dịch (ml/phút)
CT1	250	6,02	-	1/3	140	30
CT2	250		AE			
CT3	250		MD:AE (20/80)			
CT4	250		MD:AE (40/60)			
CT5	250		MD:AE (60/40)			
CT6	250		MD:AE (80/20)			

Kết quả bảng 3.4.cho thấy:

- Từ một số kết quả nghiên cứu về phun sấy cao lỏng dược liệu, lựa chọn tá dược hỗ trợ phun sấy để khảo sát là Maltodextrin (MD) và Aerosil (AE).

- Dùng kết hợp MD/AE (80:20), MD/AE (60:40), MD/AE (40:60), MD/AE (20:80), chỉ dùng AE và không dùng tá dược. Phun sấy với cùng điều kiện là tỷ lệ tá dược/chất rắn (TD/CR) là 1: 3; nhiệt độ đầu vào là 140^{0}C, tốc độ cấp dịch 30 ml/phút; áp suất dòng khí là 0,2 MPa.

Bảng 3.5. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của loại TD đến quá trình phun sấy

Mẫu thử	**Tá dược độn và tỷ lệ phối hợp MD và AE**	**Chỉ tiêu chất lượng cao khô CTHepaB**					
		Độ ẩm (%)	**Tỷ trọng (g/ml)**	**Chỉ số nén CI**	**HS phun sấy (%)**	**Hiệu suất thu hồi (%)**	**Hình thức cảm quan**
CT1	Không sử dụng	-	-	-	-	-	Khối kết dính bám trong buồng sấy
CT2	AE	4,22	0,88	29,32	89,54	93,61	Bột khô, màu nâu, mùi thơm đặc trưng
CT3	**MD/AE (2/8)**	**4,31**	**0,90**	**31,75**	**87,60**	**99,32**	**Bột khô tơi, màu nâu, mùi thơm đặc trưng**
CT4	MD/AE (4/6)	4,55	0,85	36,24	83,14	98,64	Bột khô tơi, màu nâu, mùi thơm đặc trưng
CT5	MD/AE (6/4)	4,62	0,89	37,56	78,81	93,86	Bột khô, tơi vừa, màu nâu, mùi thơm đặc trưng
CT6	MD/AE (8/2)	4,96	0,86	38,60	75,01	95,23	Bột khô, màu nâu mùi thơm đặc trưng

CT2 CT3

CT4 CT5 CT6

Hình 3.1: Bột cao khô của CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Kết quả bảng 3.5.cho thấy:

- Tiến hành phun sấy mỗi công thức làm 3 lần lấy kết quả trung bình và đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng của bột phun sấy.

- Khi không sử dụng tá dược (CT1) thì bột cao khô đa phần dính hết vào buồng sấy. Khi bổ sung tá dược (CT2-CT6) đã cải thiện đáng kể chất lượng của bột cao khô bao gồm cả hiệu suất phun sấy và hiệu suất thu hồi hoạt chất.

- Đặc biệt khi sử dụng MD/AE (2/8) tức (CT3) các chỉ tiêu về hàm lượng và hiệu suất hoạt chất trong bột cao khô, cũng như hiệu suất phun sấy, tỷ trọng và chỉ số nén CI cao nhất.

Bảng 3.6. Thiết kế khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ TD hỗ trợ phun sấy

CT	Cao (1:1) (g)	% CR/ Cao	Loại tá dược	Tỷ lệ TD/CR	Nhiệt độ đầu vào (^{0}C)	Tốc độ cấp dịch (ml/ phút)
CT7	250	6,02	MD:AE (20:80)	**1/2**	140	30
CT3				**1/3**		
CT8				**1/4**		
CT9				**1/5**		

Kết quả bảng 3.6.cho thấy:

- Để đánh giá một số chỉ tiêu của bột cao khô, trước tiên chúng tôi tiến hành thiết kế thực nghiệm các công thức phun sấy: từ CT3 tiếp tục khảo sát tỷ lệ của tá dược hỗ trợ phun sấy so với hàm lượng chất rắn trong cao lỏng 1:1 với các tỷ lệ khác nhau là: 1/2; 1/3; 1/4; 1/5 tiến hành trên cùng điều kiện là: MD:AE (20:80), hàm lượng chất rắn trong dịch phun là 6,02 %, nhiệt độ đầu vào là 140^{0}C, tốc độ cấp dịch là 30 ml/phút.

Bảng 3.7. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ TD đến quá trình phun sấy

Mẫu	Tỷ lệ TD/ chất rắn	Chỉ tiêu chất lượng cao khô CTHepaB					
		Độ ẩm (%)	Tỷ trọng (g/ml)	Chỉ số nén CI (%)	HS phun sấy (%)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hình thức cảm quan
CT7	1/2	4,09	0,86	29,30	87,68	95,80	Bột khô tơi, màu nâu mùi thơm đặc trưng
CT3	**1/3**	**4,30**	**0,89**	**31,74**	**87,62**	**99,31**	**Bột khô tơi, màu nâu, mùi thơm đặc trưng**
CT8	1/4	4,68	0,84	36,18	86,15	98,72	Bột khô tơi, màu nâu, mùi thơm đặc trưng
CT9	1/5	4,75	0,80	39,24	84,63	99,46	Bột khô tơi, màu nâu, mùi thơm đặc trưng

CT3 CT7 CT8 CT9

Hình 3.2: Bột cao khô của CT4, CT7, CT8, CT9

Kết quả bảng 3.7.cho thấy:

- Khi càng tăng tỷ lệ TD/CR (từ 1/5 → 1/4 → 1/3 → 1/2) thì càng làm giảm độ ẩm (4,75% → 4,68% → 4,30% → 4,09%) và tính hút ẩm của khối bột, làm tăng tỷ trọng của bột cao khô (0,80 g/ml → 0,84 → 0,89 → 0,86 g/ml), làm giảm chỉ số nén CI tức khả năng trơn chảy của khối bột tăng, hiệu suất phun sấy và hiệu suất thu hồi hoạt chất càng cao.

- Công thức CT3 (Tỷ lệ TD/ chất rắn là 1/3**)** cho thấy: sản phẩm có hàm ẩm thấp, tỷ trọng và khả năng trơn chảy cao, hiệu suất phun sấy cao mà hàm lượng hoạt chất cũng tương đối cao.

Bảng 3.8. Thiết kế khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đầu vào đến quá trình phun sấy

CT	**Cao 1:1 (g)**	**% CR/cao**	**Loại tá dược**	**Tỷ lệ TD/CR**	**Nhiệt độ đầu vào (^{0}C)**	**Tốc độ cấp dịch (ml/phút)**
CT3	250	6,02	MD:AE (20:80)	1/3	**140**	30
CT10					**150**	30
CT11					**130**	30
CT12					**120**	30

Kết quả bảng 3.8.cho thấy: Để đánh giá một số chỉ tiêu của bột cao khô thu được sau quá trình phun sấy bột cao khô, do ảnh hưởng của nhiệt độ đầu vào, nên chúng tôi đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đầu vào ở 120^0c; 130^0c; 140^0c; 150^0c nhưng với cùng tốc độ sấy và cùng các chỉ số khác.

Bảng 3.9. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đầu vào đến quá trình phun sấy

Mẫu	**Nhiệt độ (ºC)**	**Chỉ tiêu chất lượng cao khô CTHepaB**					
		Độ ẩm (%)	**Tỷ trọng (g/ml)**	**Chỉ số nén CI (%)**	**HS phun sấy (%)**	**Hiệu suất thu hồi (%)**	**Hình thức cảm quan**
CT10	150	3,26	0,85	30,72	84,06	96,05	Bột khô tơi, màu nâu hơi sậm, mùi thơm đặc trưng
CT3	**140**	**4,35**	**0,88**	**31,76**	**87,64**	**99,28**	**Bột khô tơi, màu nâu mùi thơm đặc trưng**
CT11	130	5,82	0,89	31,89	81,12	96,19	Bột khô tơi, màu nâu mùi thơm đặc trưng
CT12	120	6,60	0,90	32,18	79,23	95,86	Bột khô, màu nâu mùi thơm đặc trưng

CT3 CT10 CT11 CT12

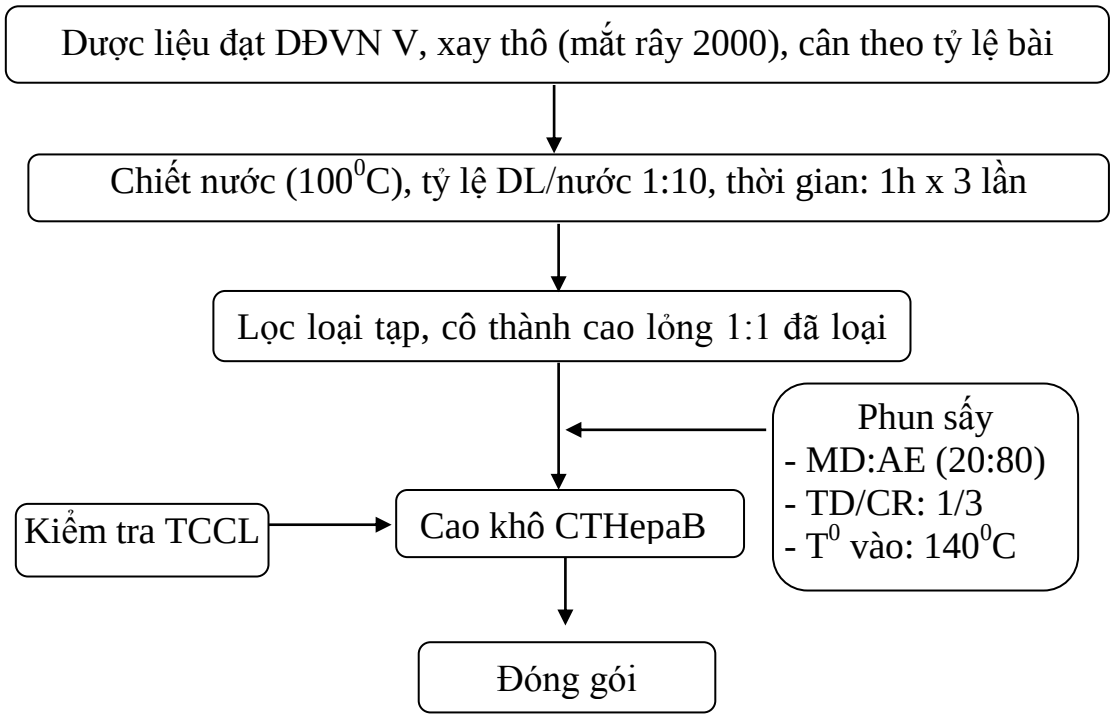
Hình 3.3: Bột cao khô của CT3, CT10, CT11, CT12

Kết quả bảng 3.9.cho thấy:

- Nhiệt độ càng cao (nhiệt độ đầu vào ở 120^0c; 130^0c; 140^0c; 150^0c) thì độ ẩm của sản phẩm bột cao khô càng giảm (6,60%; 5,82%; 4,35%; 3,26%); tương ứng là hiệu suất phun sấy (79,23; 81,12; 87,64 và 84,06%) và suất thu hồi (95,86; 96,19; 99,28 và 96,05%).

- Nhiệt độ cao quá hoặc thấp quá đều làm giảm hiệu suất phun sấy.

- Từ các đánh giá trên cho thấy, để thu được bột cao khô CTHepaB có thể đáp ứng tốt yêu cầu về hàm lượng hoạt chất, hiệu suất thu hồi và hiệu suất phun sấy thì nhiệt độ thích hợp nhất là 140^0C, tức là lựa chọn công thức CT3.



Hình 3.4: Sơ đồ quy trình bào chế bột cao khô CTHepaB

3.1.1.3. Kết quả xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao khô CTHepaB

- Kết quả kiểm nghiệm tính chất (hình thức): Là dạng bột khô tơi, màu vàng nâu, mùi thơm đặc trưng của dược liệu, không bị nấm mốc, dễ bị hút ẩm khi để ngoài không khí.

- Kết quả kiểm nghiệm độ ẩm**:** Bằng máy đo hàm ẩm tự động Shimadzu (Cân khoảng 2-4 g bột cao khô, ở nhiệt độ 105^0 C, trong 4 giờ) làm 5 lần lấy giá trị trung bình.

Bảng 3.10. Kết quả xác định hàm ẩm của bột cao khô CTHepaB

Mẫu	Mất khối lượng do làm khô (%)
1	4,28
2	4,35
3	4,62
4	4,18
5	4,24
$\overline{X}$ ± SD	4,33 ± 0,17

Kết quả bảng 3.10.cho thấy:

- Độ ẩm của bột cao khô CTHepaB ở tất cả các mẫu thử nghiệm đều nhỏ hơn 5,0%. Giá trị này được tính cho 5 mẫu là 4,33 ± 0,17%, phù hợp với tiêu chuẩn cao khô của DĐVN V.

- Kết quả xác định độ tan của bột cao khô CTHepaB

Bảng 3.11. Kết quả đánh giá độ tan của bột cao khô CTHepaB trong nước

Mẫu	Tan hết trong 5 phút	Kết quả
1	Tan hoàn toàn	Đạt yêu cầu
2	Tan hoàn toàn	Đạt yêu cầu
3	Tan hoàn toàn	Đạt yêu cầu
4	Tan hoàn toàn	Đạt yêu cầu
5	Tan hoàn toàn	Đạt yêu cầu

Kết quả bảng 3.11 cho thấy: 100% các mẫu đều tan hết trong nước, đạt yêu cầu về độ tan của bột cao khô theo quy định của DĐVN V.

- Kết quả hàm lượng tro toàn phần.

Bảng 3.12. Kết quả xác định tro toàn phần trong mẫu cao khô CTHepaB

Mẫu	Tro toàn phần (%)
1	3,95
2	4,06
3	4,31
4	3,86
5	4,13
$\overline{X} \pm SD$	4,06 ± 0,17

Kết luận: các mẫu cao khô đem thử có hàm lượng tro toàn phần là 4,06 ± 0,17%. Vì vậy, giới hạn tro toàn phần không quá 5%.

- Kết quả hình thái, kích thước tiểu phân.

Hình 3.5: Hình ảnh chụp SEM cấu trúc bột cao khô CTHepaB

Kết quả hình ảnh chụp SEM cho thấy: Bột cao khô CTHepaB có dạng hình cầu bề mặt nhăn nheo, xốp. Có kích thước tiểu phân 5-30µm, phân bố khá đồng nhất. Như vậy hình thái, kích thước tiểu phân phù hợp với tiêu chuẩn cao khô bào chế theo phương pháp phun sấy.

- Kết quả định tính.

+ Định tính cà gai leo trong bột cao khô CTHepaB, theo phương pháp SKLM.

T: Mẫu thử

ĐC: Đối chiếu

Hình 3.6: Sắc ký đồ lớp mỏng định tính Cà gai leo trong bột cao khô CTHepaB

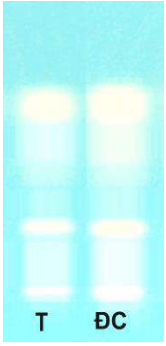
+ Định tính chi tử trong bột cao khô CTHepaB, theo phương pháp SKLM.

T: Mẫu thử

ĐC: Đối chiếu

Hình 3.7: Sắc ký đồ lớp mỏng định tính Chi tử trong bột cao khô CTHepaB

+ Định tính hà thủ ô trong bột cao khô CTHepaB, theo phương pháp SKLM



T: Mẫu thử

ĐC: Đối chiếu

Hình 3.8: Sắc ký đồ lớp mỏng định tính Hà thủ ô trong bột cao khô CTHepaB

Kết quả hình ảnh chụp cho thấy: Sắc ký đồ của mẫu thử Cà gai leo, Chi tử, Hà thủ ô trong bột cao khô CTHepaB có các vết cùng màu, cùng R_r với vết của mẫu đối chiếu.

- Kết quả định lượng

Bảng 3.13. Kết quả định lượng hàm lượng Glycoalcaloid trong mẫu thử theo Solasodin của bột cao khô CTHepaB

Mẫu	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**$\bar{X}$ ±SD**
Glycoalcaloid (mg/g)	11,22	11,04	11,52	10,88	10,93	11,38	**11,16 ± 0,26**

Kết quả cho thấy: hàm lượng Glycoalcaloid trong mẫu thử theo solasodin của bột cao khô CTHepaB đạt 11,16 ± 0,26 mg/g.

- Kết quả thử giới hạn nhiễm khuẩn cao khô CTHepaB.

Bảng 3.14. Kết quả đánh giá độ nhiễm khuẩn của bột cao khô CTHepaB

Yêu cầu	**Kết quả**	**Kết luận**
Tổng số vi khuẩn hiếu khí sống lại được không quá 10^4 trong 01 g.	≤ 10	Đạt
Tổng số Enterobacteria không quá 500 trong 01 g.	Lớn hơn 5 và nhỏ hơn 50	Đạt
Nấm và mốc không quá 100 trong 01 g.	≤ 10	Đạt
Không được có Salmonella trong 10 g.	Không có	Đạt
Mẫu không có Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureustrong 01g.	Không có	Đạt

Kết quả cho thấy: Bột cao khô CTHepaB đáp ứng các chỉ tiêu theo mức 4 của DĐVN V, đây là mức công bố phù hợp cho các thuốc, bán thành phẩm từ dược liệu.

- Kết quả hàm lượng kim loại nặng.

Bảng 3.15. Kết quả kiểm nghiệm giới hạn kim loại nặng của bột cao khô CTHepaB

Mẫu	Giới hạn kim loại nặng
1	< 10 ppm
2	< 10 ppm
3	< 10 ppm
4	< 10 ppm
5	< 10 ppm

Kết quả cho thấy tất cả các mẫu kiểm nghiệm, giới hạn kim loại nặng đều < 10 ppm.

- Kết quả xây dựng TCCS bột cao khô CTHepaB

Từ các kết quả về kiểm nghiệm một số chỉ tiêu chất lượng như đã nêu ở trên, chúng tôi đề xuất TCCS của bột cao khô CTHepaB như sau:

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

HỌC VIỆN YDHCTVN	**CAO KHÔ CTHEPAB**	**Ký mã hiệu: CCT-TCCS01** **Có hiệu lực từ ngày ký.**

* Nguồn gốc: Là sản phẩm được chiết xuất, phun sấy bào chế thành cao khô từ bài thuốc CTHepaB.

Đạt các yêu cầu về chất lượng

(1). Tính chất: Là dạng bột khô tơi, màu vàng nâu, mùi thơm đặc trưng của dược liệu, không bị nấm mốc, dễ bị hút ẩm khi để ngoài không khí.

(2). Độ tan: Tan hoàn toàn trong nước trong 5 phút.

(3). Độ ẩm: Không quá 5,0%.

(4). Hình thái kích thước tiểu phân: hình cầu, bề mặt nhăn nheo, xốp; hình ảnh kích thước chụp dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) ≤ 200 µm.

(5). Tro toàn phần: Không quá 5%.

(6). Định tính: Chế phẩm phải thể hiện phép thử định tính của cà gai leo, chi tử, hà thủ ô theo phương pháp SKLM.

(7). Định lượng: Hàm lượng glycoalcaloid trong mẫu thử theo solasodin ≥ 9,5mg/g tính theo khối lượng bột cao khô tuyệt đối.

(8). Giới hạn nhiễm khuẩn: Phải đạt yêu cầu mức 4 (DĐVN V)

(9). Giới hạn kim loại nặng: Không quá 10ppm.

(10). Đóng gói, bảo quản:

- Đóng trong túi PE 2 lớp, có nhãn đúng quy định.
- Để nơi khô mát, tránh ánh sáng.

3.1.2. Nghiên cứu xây dựng công thức bào chế viên nang cứng CTHepaB và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở viên nang cứng CTHepaB.

3.1.2.1. Kết quả xây dựng công thức bào chế viên nang cứng CTHepaB.

Từ tính chất của dược chất, yêu cầu chất lượng của chế phẩm, lựa chọn một số tá dược để nghiên cứu bào chế viên nang cứng CTHepaB.

Bảng 3.16. Thành phần dược chất, tá dược trong các công thức khảo sát

Thành phần	**Khối lượng thành phần khảo sát (mg)**							
	CT1	**CT2**	**CT3**	**CT4**	**CT5**	**CT6**	**CT7**	**CT8**
Bột cao khô CTHepaB	400							
Natri stach glycolat	0	10	20	30	20	20	30	30
Aerosil	5	5	5	5	10	15	10	0
Magnesi stearat	5							
Lactose phun sấy	Vừa đủ nang số 0							

Kết quả cho thấy:

+ Tá dược siêu rã: Natri stach glycolat từ 0 - 30 mg/viên nhằm làm cho viên rã nhanh.

+ Tá dược chống hút ẩm là Aerosil từ 0 - 15 mg/viên nhằm tạo lớp áo hạn chế sự hút ẩm cho dược chất trong quá trình bào chế và bảo quản.

+ Tá dược trơn là Magnesi stearat với khối lượng 5 mg/viên, giúp điều hòa sự trơn chảy của khối bột khi đóng nang để đảm bảo độ đồng đều khối lượng cho chế phẩm.

+ Tá dược độn: Lactose phun sấy được sử dụng là tá dược độn do kích thước tiểu phân đồng đều, ít hút ẩm, trơn chảy tốt, thêm vào để vừa đủ khối lượng đóng nang số 0.

Bảng 3.17. Kết quả xác định khối lượng riêng của các thành phần đóng nang

Thành phần	**Khối lượng riêng (g/ml)**							
	CT1	**CT2**	**CT3**	**CT4**	**CT5**	**CT6**	**CT7**	**CT8**
Bột cao khô CTHepaB	0,8							
Hỗn hợp tá dược: Natri starch glycolat, Aerosil và Magnesi stearat	0,38	0,58	0,65	0,69	0,59	0,53	0,64	0,71
Lactose phun sấy	0,72							

Kết quả ở bảng trên cho thấy: Phối hợp tá dược Natri starch glycolat, Aerosil và Magnesi stearat ở các tỷ lệ khác nhau tạo nên hỗn hợp bột tá dược có tỷ trọng khác nhau theo xu hướng càng tăng tỷ lệ Natri starch glycolat và giảm tỷ lệ Aerosil càng làm tăng tỷ trọng của hỗn hợp bột này.

Bảng 3.18. Thành phần công thức khảo sát bào chế viên nang

Thành phần	**Khối lượng thành phần khảo sát (mg)**							
	CT1	**CT2**	**CT3**	**CT4**	**CT5**	**CT6**	**CT7**	**CT8**
Bột cao khô CTHepaB	400							
Natri starch glycolat	0	10	20	30	20	20	30	30
Aerosil	5	5	5	5	10	15	10	0
Magesi stearat	5							
Lactose phun sấy	70,2	64,1	55,6	47,4	46,3	34,6	38,5	53,4
Khối lượng viên	480,2	484,1	485,6	487,4	481,3	474,6	483,5	488,4

Từ kết quả xác định tỷ trọng ở trên, để bào chế viên nang số 0 có dung tích nang là 0,67ml, tính thể tích của bột cao khô lộc nhung, đông trùng và hỗn hợp các tá dược (Natri starch glycolat, Aerosil và Magnesi stearat), từ đó xác định được số thể tích còn lại để tính ra khối lượng của tá dược độn lactose cần thêm vào cho vừa đủ dung tích nang.

Bảng 3.19. Kết quả đo độ rã của các công thức khảo sát

Thông số	**Độ rã của viên ở các công thức khác nhau, n=6**							
	CT1	**CT2**	**CT3**	**CT4**	**CT5**	**CT6**	**CT7**	**CT8**
Độ rã (phút) **Xtb ± SD**	7,38 ± 0,41	6,21 ± 0,43	4,48 ± 0,39	4,21 ± 0,25	4,52 ± 0,43	4,49 ± 0,32	4,61 ± 0,33	4,76 ± 0,42
p	$p_{1,2 - 3,4,5,6,7,8} < 0,05$; $p_{1,2} > 0,05$; $p_{3,4,5,6,7,8} > 0,05$							

Kết quả ở bảng trên cho thấy:

+ Công thức CT1 có thời gian rã lớn nhất là 7,38 phút. Công thức CT2 có thời gian rã ngắn hơn so với công thức CT1là 6,21 phút.

+ CT3 đến CT8 có thời gian rã nhanh hơn so với CT1 và CT2. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).

+ Sự khác biệt về thời gian rã giữa các công thức từ CT3 đến CT8 không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

+ Các công thức CT3, CT5, CT6 và các công thức CT4, CT7 và CT8 có cùng tỷ lệ tá dược siêu rã, chỉ khác nhau về tỷ lệ Aerosil và Lactose nhưng có thời gian rã tương đương nhau.

Bảng 3.20. Ảnh hưởng của thành phần công thức đến độ ẩm của viên nang

Thời gian	Độ ẩm của các mẫu ở các thời gian khác nhau, n=6							
	CT1	**CT2**	**CT3**	**CT4**	**CT5**	**CT6**	**CT7**	**CT8**
0 giờ	4,89 ± 0,22	4,81 ± 0,24	4,52 ± 0,23	4,39 ± 0,21	4,79 ± 0,25	4,32 ± 0,21	4,58 ± 0,26	4,81 ± 0,30
12 giờ	9,51 ± 0,49	9,32 ± 0,54	8,82 ± 0,50	9,69 ± 0,48	7,51 ± 0,43	6,59 ± 0,23	6,89 ± 0,46	10,88 ± 0,69
24 giờ	12,45 ± 0,72	12,38 ± 0,82	11,81 ± 0,68	11,69 ± 0,62	9,22 ± 0,54	8,61 ± 0,49	8,91 ± 0,66	Dính bết
48 giờ	Dính bết	Dính bết	Dính bết	Dính bết	11,79 ± 0,74	11,58 ± 0,62	11,27 ± 0,65	Dính bết

Kết quả ở bảng trên cho thấy:

+ Công thức CT8 không sử dụng Aerosil có tính hút ẩm cao nhất, sau 12 giờđã bị dính bết. Các công thức từ CT1 đến CT4 sử dụng Aerosil là 5mg/viên, khác nhau về tỷ lệ Natri starch glycolat và Lactose cũng thể hiện tính hút ẩm mạnh, sau 12 giờ các công thức này có độ ẩm trong khoảng từ 8,8% (CT3) đến 9,7% (CT4) và ở thời điểm sau 48 giờ đã bị chảy bết.

+ Khi tăng Aerosil lên 10 mg/viên ở công thức CT5, CT7 và 15mg/viên ở công thức CT6 đã làm giảm tính hút ẩm của khối bột đóng trong viên. Độ ẩm của các công thức CT5, CT6 và CT7 sau 24 giờ chỉ ở mức tương đương với độ ẩm của các công thức CT1 đến CT4 sau 12 giờ. Tại thời điểm 48 giờ, độ ẩm của các công thức này trong khoảng từ 11,27%

(CT7) đến 11,79% (CT5).

Bảng 3.21. Kết quả định lượng Glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin trong các công thức khảo sát

Hàm lượng Glycoalkaloid toàn phần tính theo Solasodin trong viên (mg/viên), Xtb ± SD, n = 6							
CT1	**CT2**	**CT3**	**CT4**	**CT5**	**CT6**	**CT7**	**CT8**
4,46 ± 0,21	4,52 ± 0,33	4,38 ± 0,41	4,58 ± 0,39	4,42 ± 0,28	4,49 ± 0,24	4,36 ± 0,36	4,54 ± 0,31

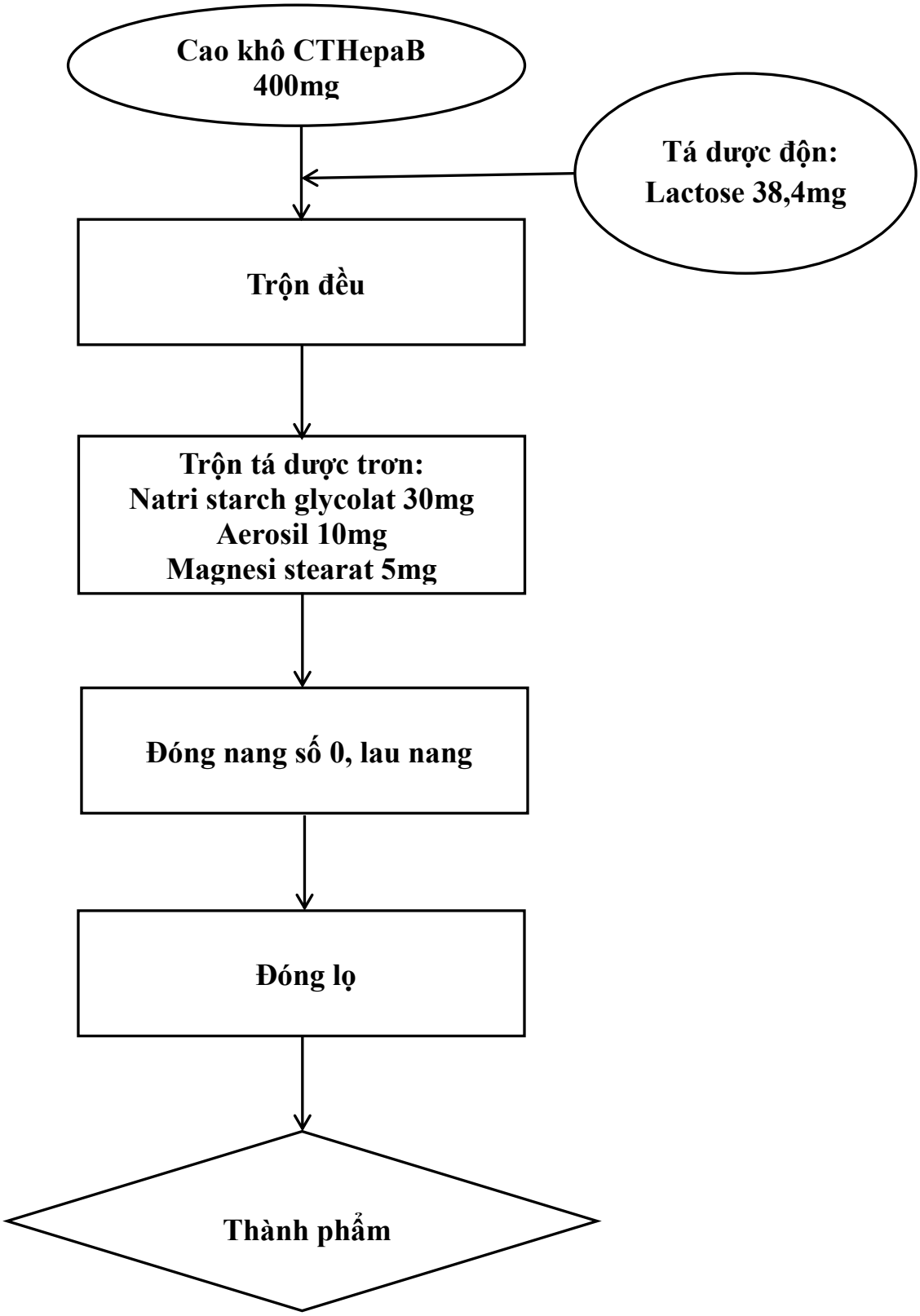
Kết quả trên cho thấy: Các công thức đều ổn định với hàm lượng Glycoalkaloid toàn phần tính theo Solasodin trong các công thức ở mức tương đương nhau, trong khoảng từ 4,36 ± 0,36 mg/viên đến 4,58 ± 0,39 mg/viên. Sự khác biệt về hàm lượng Glycoalkaloid toàn phần tính theo Solasodin trong các công thức là không có ý nghĩa thống kê với p > 0,05.

Bảng 3.22. Công thức bào chế viên nang cứng CTHepaB

TT	**Thành phần**	**Khối lượng**
1	Bột cao khô CTHepaB	400 mg
2	Natri starch glycolat	30 mg
3	Aerosil	10 mg
4	Magnesi stearat	5 mg
5	Lactose phun sấy	38,4 mg
6	Khối lượng viên	483,4 mg (~480 mg)

Kết quả cho thấy viên nang CTHepaB được hàm lượng 400mg với khối lượng viên 483,4 mg đóng lọ 60 viên/lọ.

- Sơ đồ các giai đoạn bào chế:



Hình 3.9: Sơ đồ các giai đoạn bào chế viên nang CTHepaB

Hình 3.10. Viên nang CTHepaB

3.1.2.2. Kết quả nghiên cứu tiêu chuẩn cơ sở của viên nang cứng CTHepaB

- Kết quả kiểm nghiệm tính chất (hình thức): Là dạng viên nang, bên trong chứa bột thuốc khô tơi, đồng đều về kích thước hạt. Màu vàng nâu, mùi đặc trưng của dược liệu. Không có hiện tượng hút ẩm, không bị mềm và biến màu, không nhiễm nấm mốc.

- Kết quả kiểm nghiệm độ đồng đều khối lượng

Bảng 3.23. Kết quả xác định độ đồng đều khối lượng viên nang cứng CTHepaB

Viên số	**Khối lượng bột thuốc trong nang (mg)**	**Viên số**	**Khối lượng bột thuốc trong nang (mg)**
1	485,1	11	477,3
2	483,6	12	483,8
3	479,3	13	495,5
4	461,5	14	486,4
5	483,2	15	480,3
6	484,1	16	495,8
7	494,7	17	469,7
8	491,3	18	482,4
9	464,5	19	483,1
10	481,2	20	465,8
Khối lượng trung bình viên: 481,43 ± 9,8 **Độ lệch chuẩn khối lượng trung bình: ≤ 2,04%**			

Kết quả cho thấy độ lệch khỏi khối lượng trung bình của các viên nang cứng CTHepaB đem thử đều ≤ 2,04%, phù hợp với tiêu chuẩn viên nang của DĐVN V.

- Kết quả kiểm nghiệm kim loại nặng của viên nang cứng CTHepaB

Bảng 3.24. Kết quả kiểm nghiệm hàm lượng kim loại nặng của viên nang cứng CTHepaB

Mẫu thử	**Tổng hàm lượng các kim loại nặng (ppm) (Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, As và Hg)**
1	2,5
2	3,1
3	1,5
4	1,8
5	2,3

Kết quả cho thấy hàm lượng tổng các kim loại nặng Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, As và Hg đều từ 1,5 – 3,1 ppm.

- Kết quả xác định độ rã của viên nang cứng CTHepaB.

Bảng 3.25. Kết quả xác định độ rã của viên nang cứng CTHepaB

Viên số	**Thời gian rã (phút)**
1	4,6
2	4,9
3	5,2
4	4,5
5	5,5
6	4,8

Kết quả xác định độ rã cho thấy, viên nang cứng CTHepaB có thời gian rã ngắn. Tất cả các viên đều rã trong vòng khoảng 4 - 6 phút. Đáp ứng yêu cầu của DĐVN V (≤ 30 phút).

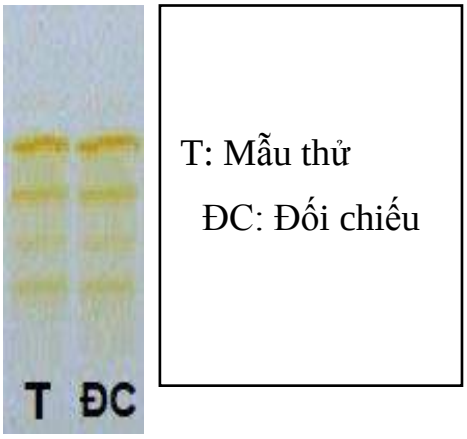
- Kết quả định tính viên nang cứng CTHepaB

+ Định tính cà gai leo trong viên nang cứng CTHepaB

Hình 3.11: Sắc ký đồ lớp mỏng định tính Cà gai leo trong viên nang CTHepaB

Kết quả: Sắc ký đồ của mẫu thử có các vết cùng màu, cùng R_f với vết của mẫu đối chiếu.

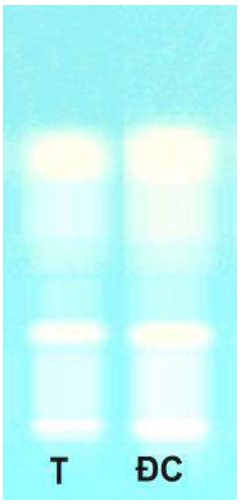
+ Định tính chi tử trong bột cao khô CTHepaB.



Hình 3.12: Sắc ký đồ lớp mỏng định tính Chi tử trong viên nang CTHepaB

Kết quả: Sắc ký đồ của mẫu thử có các vết cùng màu, cùng R_f với vết của mẫu đối chiếu.

+ Định tính hà thủ ô trong bột cao khô CTHepaB.



T: Mẫu thử

ĐC: Đối chiếu

Hình 3.13: Sắc ký đồ lớp mỏng định tính Hà thủ ô trong viên nang CTHepaB.

Kết quả: Sắc ký đồ của mẫu thử có các vết cùng màu, cùng R_f với vết của mẫu đối chiếu.

- Kết quả định lượng

Bảng 3.26. Kết quả định lượng hàm lượng Glycoalcaloid trong mẫu thử theo Solasodin của viên nang CTHepaB.

Mẫu	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	$\bar{X}$**±SD**
Glycoalcaloid (mg/viên)	4,32	4,44	4,52	4,49	4,36	4,38	**4,39 ± 0,09**

Kết quả cho thấy: hàm lượng Glycoalcaloid trong mẫu thử theo Solasodin của viên nang cứng CTHepaB đạt 4,39 ± 0,09 mg/viên.

- Kết quả kiểm nghiệm giới hạn nhiễm khuẩn

Bảng 3.27. Kết quả kiểm nghiệm độ nhiễm khuẩn viên nang cứng CTHepaB

Yêu cầu	**Mẫu 1**	**Mẫu 2**	**Mẫu 3**	**Mẫu 4**	**Mẫu 5**
Tổng số vi khuẩn hiếu khí sống lại được không quá 10^4 trong 01 g.	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10
Tổng số Enterobacteria không quá 500 trong 01 g.	Lớn hơn 5 và nhỏ hơn 50	Lớn hơn 5 và nhỏ hơn 50	Lớn hơn 5 và nhỏ hơn 50	Lớn hơn 5 và nhỏ hơn 50	Lớn hơn 5 và nhỏ hơn 50
Nấm và mốc không quá 100 trong 01 g.	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10
Không được có Salmonella trong 10 g.	Không có	Không có	Không có	Không có	Không có
Mẫu không có Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus trong 01g.	Không có	Không có	Không có	Không có	Không có
Kết luận	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

Kết quả đánh giá độ nhiễm khuẩn cho thấy: Viên nang cứng CTHepaB đáp ứng các chỉ tiêu theo mức 4 của DĐVN V.

- Kết quả xây dựng TCCS viên nang cứng CTHepaB

Từ các kết quả về kiểm nghiệm một số chỉ tiêu chất lượng như đã nêu ở trên, chúng tôi đề xuất TCCS của viên nang viên nang cứng CTHepaB như sau:

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

HỌC VIỆN YDHCTVN	**Viên nang CTHEPAB**	**Ký mã hiệu: VCT-TCCS02** **Có hiệu lực từ ngày ký.**

Nguồn gốc: Viên nang CTHepaB là dạng nang cứng, có thành phần chính là bột cao khô CTHepaB được bào chế bằng phương pháp phun sấy. Đã đạt yêu cầu về chất lượng như sau:

(1). Công thức:

Công thức bào chế cho 1 viên nang cứng:

Cao khô CTHepaB	Bốn trăm miligam	400 mg
Tá dược (Natri starch glycolat, Magnesi stearat, Aerosil, Lactose)	Vừa đủ	1 viên

(2). Tiêu chuẩn nguyên liệu:

Cao khô CTHepaB	Đạt tiêu chuẩn cơ sở
Natri starch glycolat	Đạt tiêu chuẩn USP 30
Aerosil	Đạt tiêu chuẩn EP 2002
Magnesi stearat	Đạt tiêu chuẩn BP 2005
Lactose	Đạt tiêu chuẩn DĐVN V

(3). Chất lượng thành phẩm:

- Tính chất: Là dạng viên nang, bên trong chứa bột thuốc khô tơi, đồng đều về kích thước hạt. Màu vàng nâu, mùi đặc trưng của dược liệu. Không có hiện tượng hút ẩm, không bị mềm và biến màu, không nhiễm nấm mốc.

- Độ đồng đều khối lượng: ± 7,5%.
- Kim loại nặng: Không quá 10 ppm.
- Độ rã: không quá 30 phút.
- Định tính: Chế phẩm phải có phản ứng định tính của cà gai leo, chi tử và hà thủ ô.
- Định lượng: Hàm lượng hàm lượng glycoalcaloid trong mẫu thử theo solasodin: không ít hơn 3,8 mg/viên.
- Giới hạn nhiễm khuẩn: Phải đạt yêu cầu mức 4, DĐVN V

(4). Đóng gói và bảo quản

- Lọ 60 viên có hút ẩm, có nhãn đúng quy định.
- Để nơi khô mát, tránh ánh sáng.

3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp.

Bảng 3.28. Độc tính cấp theo đường uống của CTHepaB trên chuột nhắt trắng trong 72 giờ.

Lô chuột	Số chuột thí nghiệm	**Liều dùng (g/kg thể trọng)**	**Thể tích cho uống**	Số chuột sống sau 72 giờ		Số chuột chết sau 72 giờ	
				n	%	n	%
Lô 1	10	6,0	0,2 mL/10g x 3lần	10	100%	0	0,0%
Lô 2	10	12,0	0,2 mL/10g x 3lần	10	100%	0	0,0%
Lô 3	10	18,0	0,2 mL/10g x 3lần	10	100%	0	0,0%
Lô 4	10	24,0	0,2 mL/10g x 3lần	10	100%	0	0,0%
Lô 5	10	30,0	0,2 mL/10g x 3lần	10	100%	0	0,0%
Lô 6	10	36,0	0,2 mL/10g x 3lần	10	100%	0	0,0%

Kết quả cho thấy: Chuột được uống bột cao khô trong viên nang CTHepaB từ mức liều thấp nhất là 12,0g cao khô/kg thể trọng cho tới liều

cao nhất có thể trong 24 giờ là 36,0g cao khô/kg, ở cùng thể tích 0,2ml/10g/lần x 3 lần (tức 60ml/kg). Theo dõi liên tục 72 giờ sau khi uống thuốc thấy:

+ Không có con chuột thí nghiệm nào bị chết sau uống thuốc 72 giờ (0,0%).

+ Ở các mức liều cho uống, các con chuột đi ngoài bình thường.

+ Tất cả con chuột thí nghiệm ở các lô đều ăn uống bình thường, nước tiểu bình thường, lông mượt, mắt trong, hoạt động bình thường.

Bảng 3.29. Độc tính cấp theo đường uống của CTHEPAB trên chuột nhắt trắng trong 168 giờ.

Lô chuột	**Số chuột thí nghiệm**	**Liều dùng (g/kg thể trọng)**	**Thể tích cho uống**	**Số chuột sống sau 168 giờ**		**Số chuột chết sau 168 giờ**	
				n	**%**	**n**	**%**
Lô 1	10	6,0	0,2 mL/10g x 3lần	10	100%	0	0,0%
Lô 2	10	12,0	0,2 mL/10g x 3lần	10	100%	0	0,0%
Lô 3	10	18,0	0,2 mL/10g x 3lần	10	100%	0	0,0%
Lô 4	10	24,0	0,2 mL/10g x 3lần	10	100%	0	0,0%
Lô 5	10	30,0	0,2 mL/10g x 3lần	10	100%	0	0,0%
Lô 6	10	36,0	0,2 mL/10g x 3lần	10	100%	0	0,0%

Từ bảng 3.29 cho thấy:

Chuột được uống bột cao khô trong viên nang CTHepaB từ mức liều

thấp nhất là 12,0g cao khô/kg thể trọng cho tới liều cao nhất có thể trong 24 giờ là 36,0g cao khô/kg, ở cùng thể tích 0,2ml/10g/lần x 3 lần (tức 60ml/kg). Theo dõi liên tục 168 giờ (7 ngày) sau khi uống thuốc thấy:

+ Không có con chuột thí nghiệm nào bị chết sau uống thuốc 168 giờ (0,0%).

+ Ở các mức liều cho uống, các con chuột đi ngoài bình thường.

+ Tất cả con chuột thí nghiệm ở các lô đều ăn uống bình thường, nước tiểu bình thường, lông mượt, mắt trong, hoạt động bình thường.

Nghiên cứu của Nguyễn Trọng Thông (2012) "Kết quả thử độc tính cấp và bán trường diễn của viên Giải độc gan Tuệ Linh trên thực nghiệm" [25], kết quả viên giải độc gan Tuệ Linh có thành phần từ Cà gai leo và Mật nhân không gây độc, có thể sử dụng lâu dài. So sánh với nghiên cứu trên, với mức liều cao nhất có thể cho chuột nhắt trắng uống trong 24h là 36g/kg thể trọng, không có chuột nào chết cũng như không có biểu hiện bất thường nào tên tất cả các chuột nghiên cứu. Bước đầu khẳng định viên nang cứng CTHepaB có tính an toàn cao trong thử nghiệm độc tính cấp theo đường uống.

KẾT LUẬN

1. Chiết xuất, bào chế được viên nang CTHepaB .

a. Bào chế cao khô CTHepaB và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao khô CTHepaB.

- Hiệu suất chiết xuất với dược liệu xay thô là 5,96% so với 5,65% hiệu suất chiết xuất dược liệu phiến. Do vậy lựa chọn dược liệu xay thô cho các nghiên cứu tiếp theo để khảo sát thông số quy trình chiết xuất.

- Lựa chọn chiết 3 lần với thời gian chiết 1h/lần.

- Xây dựng được quy trình bào chế cao khô CTHepaB từ cao lỏng 1:1; sử dụng tá dược độn là hỗn hợp Maltodextrin: Aerosil (20:80); với tỷ lệ tá dược/ chất rắn là 1/3; nhiệt độ đầu vào là 140^0C; nhiệt độ đầu ra: 108-110^0C; tốc độ cấp dịch là 30 ml/phút; áp suất bơm nén: 0,2 Mpa.

- Xây dựng và thẩm định tiêu chuẩn chất lượng cao khô CTHepaB đạt yêu cầu về chất lượng gồm các chỉ tiêu về tính chất, độ tan, độ ẩm, hình thái kích thước tiểu phân, tro toàn phần, định tính, định lượng, giới hạn nhiễm khuẩn, giới hạn kim loại nặng.

b. Xây dựng công thức bào chế viên nang CTHepaB và tiêu chuẩn cơ sở viên nang cứng CTHepaB.

- Xây dựng được công thức bào chế viên nang cứng CTHepaB 400mg với khối lượng viên 483,4mg.

- Xây dựng và thẩm định tiêu chuẩn cơ sở của viên nang cứng CTHepaB đã đạt các yêu cầu về chất lượng gồm công thức viên nang, tiêu chuẩn nguyên liệu, chất lượng thành phẩm.

2. Độc tính cấp của viên nang CTHepaB.

- Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24h là 36g/kg thể trọng, theo dõi trong 72h và 168h thấy không có chuột nào chết cũng như không có biểu hiện bất thường nào tên tất cả các chuột nghiên cứu cho thấy

chưa tìm thấy LD_{50} của viên nang cứng CTHepaB. Kết quả này chứng tỏ viên nang CTHepaB an toàn khi đánh giá độc tính cấp theo đường uống trên chuột nhắt trắng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Bộ Y Tế (2007). Quyết định số 01/2007/ QĐ-BYT về việc ban hành quy định về thử thuốc trên lâm sàng.
2. Bộ Y Tế (2014). Công văn 19098/QLD-ĐK về việc lưu hành thuốc từ dược liệu có phối hợp mới thành phần dược liệu.
3. Bộ Y Tế (2018). "Quy định về thử thuốc trên lâm sàng", Thông tư số 29/2018/TT-BYT ngày 29 tháng 10 năm 2018.
4. Bộ Y Tế (2010). "Hướng dẫn kết hợp Y học cổ truyền với Y học hiện đại". Thông tư 50/2010/TT-BYT.
5. Bộ Y Tế (2017). Dược điển Việt Nam V.
6. Bộ Y Tế (2016). Kỹ thuật bào chế và sinh dược học các dạng thuốc Tập 2. Nhà xuất bản y học.
7. Bộ môn công nghiệp dược (2017). Kỹ thuật chiết xuất dược liệu. Trường đại học dược Hà Nội. Nhà xuất bản y học.
8. Cục y tế dự phòng. Bệnh viêm gan virus. Bộ y tế.
9. Cục Khoa học công nghệ và Đào tạo (2015). Quyết định 141/QĐ-K2ĐT về tài liệu chuyên môn "Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu" .
10. Chử Thị Thanh Huyền và cộng sự (2012). *"Nghiên cứu định lượng Acid oleanolic trong cao khô đinh lăng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao"*. Tạp chí dược học số 438 - Tháng 10/2012 – Tr. 34-38.
11. Doris Chapman. Cuốn "Sổ tay sức khỏe" tr. 256.
12. Dương Ngọc Tú và cộng sự (2018). *"Chiết xuất và phân lập một số hợp chất từ đông trùng hạ thảo (Cordyceps militaris) nuôi cấy tại Đà Lạt"*. Tạp chí dược học số 501 - Tháng 1/2018 – Tr. 22-25.

13. Đỗ Tất Lợi (2006). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản y học.
14. Đỗ Trung Đàm (2006). "*Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm*". Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo, nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, 377 – 392.
15. Đỗ Trung Đàm (2014). Phương pháp xác định độc tính của thuốc. Nhà xuất bản y học.
16. Hoàng Thị Phương Liên và cộng sự (2017). "*Khảo sát độc tính cấp đường uống và tác động giải độc rượu của cao chiết từ một bài thuốc dân gian".* Tạp chí dược học số 500 - Tháng 12/2017 – Tr. 36-40.
17. Lê Quang Cường (2015). Hướng dẫn thử nghiệm phi lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y thuốc từ dược liệu (ban hành kèm theo Quyết định số /QĐ-BYT ngày / /2015).
18. Lê Thị Như Thảo và cộng sự (2015). *"Sản xuất saponin bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào đinh lăng (Polyscisa fruticosa L. Harms)"*. Tạp chí dược học số 469 - Tháng 5/2015 – Tr. 36-41.
19. Lê Thị Huyền Trang và cộng sự (2017). *"Nghiên cứu xây dựng quy trình chiết xuất adenosin và cordycepin từ đông trùng hạ thảo nuôi cấy (Cordyceps militaris)"*. Tạp chí dược học số 492 - Tháng 4/2017 – Tr. 24-28.
20. Nguyễn Trọng Thông và cộng sự (2014). **"***Nghiên cứu tác dụng tăng đáp ứng miễn dịch của viên Giải độc gan Tuệ Linh trên thực nghiệm*". Đề tài NCKH Đại học Y Hà Nội.
21. Nguyễn Thế Khánh, Phạm Tử Dương (2001). Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng. Nhà xuất bản Y học.
22. Nguyễn Thị Thùy Dương và cộng sự (2018). *"Phân lập và thiết lập chất chuẩn 3-O-β-D-glucopyranosyl (1->4)-β-D glucuronopyranosyloleanolic acid 28-O-β-D-glucopyranosyl ester từ lá cây đinh lăng"*. Tạp chí dược học số 501 - Tháng 1/2018 – Tr.37-41.

23. Nguyễn Xuân Duy và cộng sự (2016). *"Hoạt tính chống oxy hóa và ức chế enzym tyrosinase của nấm linh chi thượng hoàng (Phellinus linteus) ở Việt Nam".* Tạp chí dược học số 479 - Tháng 3/2016 – Tr. 38-4.
24. Nguyễn Ngọc Quang và cộng sự (2012). *"Đánh giá kết quả bước đầu của viên Giải Độc Gan Tuệ Linh trong hỗ trợ điều trị viêm gan virus B mạn tính".*
25. Nguyễn Trọng Thông (2012). *"Kết quả thử độc tính cấp và bán trường diễn của viên Giải Độc Gan Tuệ Linh trên thực nghiệm".*
26. Nguyễn Thị Ngọc Thùy (2008). *"Nghiên cứu chiết xuất Irdoid và tác dụng hạ đường huyết của vị thuốc Chi tử".*
27. Nguyễn Văn Bạch và cộng sự (2015). *"Nghiên cứu đặc điểm hình thái và đặc điểm vi học của cây hà thủ ô đỏ (Fallopia multiflora (Thunb.) Haralds.)"*. Tạp chí dược học, số 471 - Tháng 7/2015 – Tr. 64-68.
28. Phạm Văn Hiển và cộng sự (2017). *"Nghiên cứu bào chế bột cao khô đông trùng hạ thảo (Cordyceps militarisL. ex Fr. Link) nuôi cấy tại Việt Nam bằng phương pháp phun sấy".* Tạp chí dược học số 497 - Tháng 9/2017 – Tr.70-73.
29. Phạm Văn Hiển và cộng sự (2016). *"Đánh giá hàm lượng adenosin và cordycepin trong các bộ phận khác nhau của đông trùng hạ thảo nuôi cấy (Cordyceps sinensis (Berk) Sacc bằng phương pháp HPLC".* Tạp chí dược học số 486 - Tháng 10/2016 – Tr. 28-32.
30. Phạm Kim Mãn và cộng sự (1999). *"Tác dụng chống ung thư của Cà gai leo".* Tạp chí Dược liệu , số 3-4 tr. 126.
31. Phạm Văn Ty (2005). Virut học. Nhà xuất bản giáo dục, Hà Nội.
32. Phùng Hòa Bình và cộng sự (2010*). "Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ và phương pháp sao đến thành phần Iridoid trong vị thuốc chi tử (Semen Gardeniae augustae".* Tạp chí dược học số 413 - Tháng 9/2010 – Tr. 20-23.

33. Trường đại học y Hà Nội (2006). Chuyên đề nội khoa y học cổ truyền. Nhà xuất bản y học.
34. Trung tâm Á châu đại học Stanford (2016). Cẩm nang cho cán bộ y tế về Viêm gan B.
35. Trần Thị Văn Thi và cộng sự (2012). *"Chiết xuất, xác định hàm lượng và khảo sát tác dụng dược lý của phân đoạn polysaccharid từ nấm linh chi nuôi trồng tại Thừa Thiên Huế".* Tạp chí dược học, số 433 - Tháng 5/2012 – Tr.18-22.
36. Trần Thị Nguyên Đăng và cộng sự (2018). *"Nghiên cứu điều chế hệ tiểu phân nano chứa cao linh chi (Ganoderma lucidum (Leyss. ex Fr.) Karst.) hướng tác dụng kháng cholinesterase".* Tạp chí dược học, số 509 - Tháng 9/2018 – Tr. 76-79.
37. Trường Đại học Y Hà Nội (2012). Bài giảng Y học cổ truyền tập 1, Nhà xuất bản y học.
38. Trương Thị Thu Hiền và cộng sự (2018). *"Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cây cà gai leo (Solanum procumbens Lour) trên mô hình gây tổn thương gan bằng Paracetamol ở chuột nhắt trắng".* Tạp chí quân sự số 6 -2018 tr. 14-21.
39. Trần Thị Hồng Phương và cộng sự (2016). *"Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn chất lượng của hà thủ ô đỏ chế (Radix Fallopiae multiflorae praeparata)".* Tạp chí dược học số 480 - Tháng 4/2016 – Tr. 32-34.
40. Trần Thị Khánh Tường. Viêm gan virus B. Bộ môn Nội đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch.
41. Trịnh Thị Xuân Hòa (1999). *"Một số đặc điểm lâm sàng, siêu cấu trúc gan và hiệu quả bước đầu điều trị bệnh nhân viêm gan virut B mạn hoạt động bằng thuốc Cà gai leo".*

42. Trần Quốc Tuấn (2016). *"Thử nghiệm lâm sàng đánh giá tác dụng hỗ trợ điều trị của viên Giải độc gan Tuệ Linh trên bệnh nhân suy giảm miễn dịch".*
43. Trịnh Thị Xuân Hòa và cộng sự (2004). *"Nghiên cứu điều trị hỗ trợ bệnh nhân viêm gan virut B mạn hoạt động bằng thuốc HAINA (Lâm sàng giai đoạn 3)".*
44. Trần Phi Hoàng Yến và cộng sự (2017). *"Theo nghiên cứu Góp phần chuẩn hóa cao chiết toàn phần từ nấm linh chi đỏ (Ganoderma lucidum L.)".* Tạp chí dược học số 498 - Tháng 10/2017 – Tr. 43-45.
45. Vũ Đức Lợi và cộng sự (2017). *"Chiết xuất, phân lập một số hợp chất từ cây cỏ sữa lá nhỏ (Euphorbia thymifolia Burm.)".* Tạp chí dược học số 490 - Tháng 2/2017 – Tr. 70-72, 78.
46. Vũ Đình Vinh (2001). Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hoá. Nhà xuất bản Y học.
47. Văn phòng đại diện WHO tại Việt Nam. www.pro.who.int.
48. Vũ Minh Trang và cộng sự (2011). *"Các hợp chất phenolic từ cây cỏ sữa lá nhỏ (Euphorbia thymifolia Burm., Euphorbiaceae)".* Tạp chí dược học số 425 - Tháng 9/2011 – Tr. 45-48.
49. Vũ Đình Hoàng (2017). "*Nghiên cứu công nghệ sản xuất cao chiết chứa anthraquinon từ Đại Hoàng (Rheum sp.) làm nguyên liệu sản xuất thuốc bảo vệ thực vật".*
50. World Health Organization hepatitis B (2008).
51. Phí Thị Cẩm Miện, Trần Văn Thái, Đồng Huy Giới, Bùi Thị Thu Hương, Đỗ Thị Thảo (2017). *"Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan của dịch chiết Chùm ngây (Moringa oleifera) trên chuột gây tổn thương gan bằng Carbon Tetrachloride (CCl4)"*. Tạp chí Khoa học Nông Nghiệp Việt Nam, tập 15, số 2.

52. Nguyễn Mạnh Cường ,Trần Thu Hường, Phạm Ngọc Khanh , Vũ Thị Hà , Nguyễn Thị Cúc , Đỗ Thị Thảo (2015). *"Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của rễ cây Xáo tam phân (Paramignya trimera) trên chuột gây tổn thương gan bằng Paracetamol"*. Tạp chí Khoa học công nghệ, số 54.

Tài liệu tiếng Anh

53. OECD (2002). Drug Safety Evaluation I: Acute and subchronic toxicity assessement; USA Academy Press.
54. OECD 420 (2001). OECD guideline for testing of chemicals – Acute oral toxicity – Fixed does procedure.
55. OECD 423 (2001). OECD guideline for testing of chemicals – Acute oral toxicity – Acute toxic class method.
56. Turner R.A. (1971). "Screening method in pharmacology", Volume II, P. 75-85.
57. WHO (1993). Research Guidelines For Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines, ROWP, Manila, Philippines.
58. WHO (2000). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine, EDM/TRM, Geneva, Switzerland.
59. WHO **(**2002), Traditional Medicine Strategy 20022005.
60. World Health Organization (2006), Stability testing of active substances and pharmaceutical products, Working document QAS/ 06.179.
61. World Health Organization (2013), WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023.
62. Woo M. W., Mujumdar A. S., Daud W. R. W. (2010), Spray Drying Technology, Volume 1, Published in Singapore.

PHỤ LỤC 1

QUY TRÌNH BÀO CHẾ VIÊN NANG CTHEPAB

1. Quy trình bào chế bột cao khô CTHepaB.

1.1. Bào chế cao lỏng CTHepaB từ bài thuốc CTHepaB.

Cao lỏng của bài thuốc CTHepaB được bào chế theo phương pháp chiết nóng với dung môi là nước, chiết cả bài thuốc theo phương pháp cổ truyền, không chiết riêng từng vị thuốc. Quá trình bào chế cao lỏng được tiến hành theo các bước sau:

- Xác định các dược liệu đầu vào đạt tiêu chuẩn DĐVN V.
- Cân các dược liệu đạt tiêu chuẩn kiểm nghiệm đầu vào theo công thức.
- Làm sạch, loại bỏ các tạp chất lạ (nếu có).
- Dược liệu được xay thô qua mắt rây 2.0.
- Tiến hành chiết với nước theo với tỷ lệ dược liệu/dung môi 1:10, thời gian chiết là 1h/lần x3 lần, nhiệt độ 100℃.

1.2. Bào chế cao khô CTHepaB từ cao lỏng CTHepaB.

Bào chế bột cao khô CTHepaB từ cao lỏng bằng phương pháp phun sấy với các thông số:

- Tá dược hỗ trợ phun sấy: MD:AE (20:80).
- Tỷ lệ tá dược/chất rắn: 1/3.
- Tỷ lệ chất rắn trong cao lỏng (1:1): 6,02.
- Nhiệt độ đầu vào: 140℃.
- Tốc độ cấp dịch: 30 ml/phút.
- Nhiệt độ đầu ra: 108 - 110℃.
- Áp suất bơm nén: 0,2 Mpa.

2. Quy trình bào chế viên nang CTHepaB từ bột cao khô định chuẩn.

- Bước 1: Chuẩn bị nguyên phụ liệu:

+ Các nguyên liệu đạt tiêu chuẩn mới đưa vào bào chế.

+ Thiết bị, dụng cụ sạch.

+ Phòng trộn và đóng nang: Nhiệt độ 25^0C, độ ẩm < 30%.

- Bước 2: Trộn bột:

+ Cân riêng rẽ các nguyên liệu theo công thức.

+ Trộn đều bột cao khô CTHepaB với lactose trong 15 phút. Rây qua rây 0,315 cho đồng nhất.

+ Trộn tiếp Aerosil, Magesi stearat, Natri starch glyconat (qua rây 0,180) vào hỗn hợp bột trên trong 10 phút. Rây qua rây 0,315 cho đồng nhất.

+ Sấy hỗn hợp bột ở nhiệt độ 60 - 70ºC trong 60 phút (đến khi hàm ẩm bột nhỏ hơn 3%).

- Bước 3: Đóng nang, đóng lọ:

+ Hỗn hợp bột sau khi sấy được đóng nang số 0 trên máy đóng nang bán tự động. Loại bỏ những nang bị lỗi.

+ Làm sạch nang: cho nang qua máy lau nang.

+ Viên nang CTHepaB được đóng lọ 60 viên/lọ.

- Bước 4: Đóng gói và kiểm nghiệm:

+ Viên nang CTHepaB được đóng lọ 60 viên/lọ.

+ Đóng hộp.

+ Kiểm nghiệm thành phẩm theo tiêu chuẩn cơ sở.

PHỤ LỤC 2

ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA VIÊN NANG CTHEPAB

1. Phương pháp nghiên cứu.

- Điều kiện bảo quản và khoảng thời gian lấy mẫu: Viên nang cứng CTHepaB được đóng gói với quy cách 60 viên/lọ và được bảo quản ở điều kiện lão hoá cấp tốc (40℃ ± 2℃, RH 75% ± 5%) lấy mẫu ở các thời điểm 0, 3 tháng và 6 tháng và bảo quản ở điều kiện nghiên cứu dài hạn (30℃ ± 2℃, RH 75% ± 5%) lấy mẫu ở các thời điểm 0, 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng.

- Thử nghiệm và tiêu chuẩn thử:

+ Bộ phận Bảo đảm chất lượng chịu trách nhiệm bảo quản và thử nghiệm mẫu theo điều kiện bảo quản và phương pháp thử đã được thẩm định.

+ Các mẫu được lấy ra khỏi nơi bảo quản vào ngày thử như đã ghi trong thời gian biểu và để ở 40℃ - 80℃ cho đến khi phân tích.Công việc phân tích phải được tiến hành không được muộn hơn 2 tuần sau khi lấy mẫu ra khỏi nơi bảo quản.

- Quy trình thử nghiệm: Theo Tiêu chuẩn số CTHepaB - 2018..

- Các thông số quá trình thử nghiệm: theo tiêu chuẩn cơ sở.

- Số lượng mẫu thử (của 1 lô/ điều kiện bảo quản).

Bảng 1.1. Số mẫu thử nghiên cứu độ ổn định viên nang cứng CTHepaB ở điều kiện lão hoá cấp tốc

Chỉ tiêu thử	Sốviên/lần thử	Số lần thử	Tổng số (viên)
Tính chất	(*)	3	0
Độ đồng đều khối lượng	20	3	60
Kim loại nặng	20	3	60
Độ rã	6	3	18
Định tính	30	3	90
Định lượng	20	3	60
Giới hạn nhiễm khuẩn	20	3	60
Tổng	Làm tròn và trừ hư hao: tổng số là 400viên (*) được tiến hành cùng với các tiêu chí khác		

Bảng 1.2. Số mẫu thử nghiên cứu độ ổn định viên nang cứng CTHepaB ở điều kiện nghiên cứu dài hạn

Chỉ tiêu thử	Sốviên/lần thử	Số lần thử	Tổng số (viên)
Tính chất	(*)	4	0
Độ đồng đều khối lượng	20	4	80
Kim loại nặng	20	4	80
Độ rã	6	4	24
Định tính	30	4	120
Định lượng	20	4	80
Giới hạn nhiễm khuẩn	20	4	80
Tổng	Làm tròn và trừ hư hao: tổng số là 500 viên (*) được tiến hành cùng với các tiêu chí khác		

- Thời gian biểu lấy mẫu thử nghiệm

Bảng 1.3. Thời gian biểu lấy mẫu nghiên cứu độ ổn định ở điều kiện lão hoá cấp tốc của viên nang cứng CTHepaB

Bảo quản		Thời gian biểu		
Thời điểm	**Điều kiện**	**Lô 121118**	**Lô 141118**	**Lô 151118**
Bắt đầu	Nhiệt độ 40 ^{o}C ± 2^{o}C; độ ẩm tương đối 75% ± 5%	12.11.2018	14.11.2018	15.11.2018
3 tháng		12.02.2019	14.02.2019	15.02.2019
6 tháng		12.05.2019	14.05.2019	15.05.2019

Bảng 1.4. Thời gian biểu lấy mẫu nghiên cứu độ ổn định ở điều kiện nghiên cứu dài hạn của viên nang cứng CTHepaB

Bảo quản		**Thời gian biểu**		
Thời điểm	**Điều kiện**	**Lô 121118**	**Lô 141118**	**Lô 151118**
Bắt đầu	Nhiệt độ 30 ^{o}C ± 2^{o}C; độ ẩm tương đối 75% ± 5%	12.11.2018	14.11.2018	15.11.2018
3 tháng		12.02.2019	14.02.2019	15.02.2019
6 tháng		12.05.2019	14.05.2019	15.05.2019
9 tháng		12.08.2019	14.08.2019	15.08.2019

- Chỉ tiêu chấp nhận

Bảng 1.5. Chỉ tiêu chất lượng được chấp nhận của viên nang cứng CTHepaB theo tiêu chuẩn cơ sở

Chỉ tiêu đánh giá	**Yêu cầu chất lượng**
Tính chất	Phải đạt yêu cầu theo quy định
Độ đồng đều khối lượng	± 7,5%
Kim loại nặng	Không quá 10 ppm
Độ rã	Không quá 30 phút
Định tính	Phải đạt yêu cầu theo quy định
Định lượng	Hàm lượng glycoalcaloid: không ít hơn 180 µg/viên.
Giới hạn nhiễm khuẩn	Phải đạt yêu cầu mức 4 theo DĐVN V

- Dự đoán tuổi thọ của viên nang cứng CTHepaB từ kết quả nghiên cứu lão hóa cấp tốc:

Kết quả từ nghiên cứu độ ổn định của chế phẩm thuốc có thể sử dụng để dự đoán tuổi thọ của sản phẩm ở điều kiện bảo quản thực tế. Phương pháp này dựa trên cơ sở động học bậc 0 của phương trình Van't Hoff:

$$t_{90}(t_2) = k \times t_{90}(t_1) + t_0$$

Trong đó:

$t_{90}(t_2)$: Tuổi thọ của thuốc ở nhiệt độ bảo quản

$t_{90}(t_1)$: Tuổi thọ của thuốc ở điều kiện lão hóa cấp tốc = 0,1053/K

t_1: Nhiệt độ lão hóa cấp tốc

t_2: Nhiệt độ bảo quản

K: giá trị trung bình của Kt

$$Kt = \frac{-2{,}303\log(\frac{C}{Co})}{\Delta t}$$

C và Co: hàm lượng của thuốc ở thời điểm t và t_0

Δt: khoảng thời gian $t-t_0$.

k: Hệ số Van't Hoff = $2^{\Delta t/10}$

t_0: thời gian kể từ ngày xuất xưởng đến ngày bắt đầu bảo quản thực nghiệm.

2. Kết quả nghiên cứu.

2.1. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của viên nang CTHepaB ở điều kiện lão hoá cấp tốc.

- Kết quả đánh giá độ ổn định về tính chất

Bảng 2.1. Kết quả đánh giá tính chất của viên nang CTHepaB ở điều kiện lão hóa cấp tốc

Thời điểm nghiên cứu	Yêu cầu	Lô thử		
		Lô 121118	**Lô 141118**	**Lô 151118**
0 (Ban đầu)	Phải đạt yêu cầu theo quy định	Đúng	Đúng	Đúng
3		Đúng	Đúng	Đúng
6		Đúng	Đúng	Đúng

Nhận xét: Viên nang CTHepaB đạt chất lượng về chỉ tiêu tính chất ở các thời điểm nghiên cứu lão hoá cấp tốc.

- Kết quả nghiên cứu độ ổn định về độ đồng đều khối lượng

Bảng 2.2. Kết quả kiểm tra độ đồng đều khối lượng của viên nang CTHepaB ở các thời điểm nghiên cứu lão hóa cấp tốc

Thời điểm nghiên cứu (tháng)	Yêu cầu	Lô thử		
		Lô 121118	Lô 141118	Lô 151118
0 (Ban đầu)	± 7,5% so với KLTB bột thuốc trong nang	Đạt	Đạt	Đạt
3		Đạt	Đạt	Đạt
6		Đạt	Đạt	Đạt

Nhận xét: Ở tất cả các thời điểm nghiên cứu lão hoá cấp tốc, viên nang CTHepaB đều đạt yêu cầu về độ đồng đều khối lượng theo tiêu chuẩn cơ sở đã xây dựng.

- Kết quả nghiên cứu độ ổn định về kim loại nặng

Bảng 2.3. Kết quả đánh giá hàm lượng kim loại nặng của viên nang CTHepaB ở các thời điểm nghiên cứu lão hóa cấp tốc

Thời điểm nghiên cứu (tháng)	Yêu cầu	Hàm lượng kim loại nặng (ppm)		
		Lô 121118	Lô 141118	Lô 151118
0 (Ban đầu)	Không quá 10ppm	2,9	2,7	2,2
3		2,5	2,8	3,0
6		2,9	2,8	2,4

Nhận xét: Hàm lượng kim loại nặng ở các thời điểm nghiên cứu lão hóa cấp tốc của viên nang CTHepaB đều nhỏ hơn 10 ppm. Kết quả này cho thấy viên nang CTHepaB đạt yêu cầu về tiêu chí hàm lượng kim loại nặng ở các thời điểm nghiên cứu.

- Kết quả nghiên cứu độ ổn định về độ rã

Bảng 2.4. Kết quả kiểm tra độ rã ở điều kiện lão hóa cấp tốc

Thời điểm nghiên cứu	Yêu cầu	Thời gian rã (phút)		
		Lô 121118	Lô 141118	Lô 151118
0 (Ban đầu)	Không quá 30 phút	5,7	4,5	4,9
3		5,0	4,3	4,8
6		4,7	5,7	4,8

Nhận xét: Thời gian để các viên nang CTHepaB rã hoàn toàn đều nhỏ hơn 30 phút. Như vậy nang CTHepaB đạt yêu cầu về tiêu chí độ rã ở các thời điểm nghiên cứu lão hoá cấp tốc.

- Kết quả nghiên cứu độ ổn định về định tính

Bảng 2.5. Kết quả kiểm tra định tính ở điều kiện lão hóa cấp tốc

Thời điểm nghiên cứu	Yêu cầu	Lô thử		
		Lô 121118	Lô 141118	Lô 151118
0 (Ban đầu)	Phải đạt yêu cầu theo quy định	Đúng	Đúng	Đúng
3		Đúng	Đúng	Đúng
6		Đúng	Đúng	Đúng

Nhận xét: Kết quả cho thấy, viên nang CTHepaB đáp ứng được yêu cầu quy định về tiêu chí định tính ở các thời điểm nghiên cứu lão hóa cấp tốc.

- Kết quả nghiên cứu độ ổn định về định lượng:

Bảng 2.6. Kết quả định lượng glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin ở điều kiện lão hóa cấp tốc

Thời điểm nghiên cứu	Yêu cầu	Hàm lượng glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin (mg/viên)		
		Lô 121118	Lô 141118	Lô 151118
0 (Ban đầu)	Hàm lượng glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin không ít hơn 3,8 mg/viên	4,53 ± 0,23	4,38 ± 0,22	4,43 ± 0,39
3		4,46 ± 0,35	4,33 ± 0,38	4,38 ± 0,25
6		4,42 ± 0,29	4,28 ± 0,24	4,34 ± 0,31

Nhận xét: Hàm lượng glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin trong viên nang CTHepaB đều lớn hơn 3,8 mg/viên ở các thời điểm nghiên cứu lão hóa cấp tốc. Kết quả cho thấy độ ổn định của hàm lượng glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin ở điều kiện lão hóa cấp tốc.

- Kết quả nghiên cứu độ ổn định về giới hạn nhiễm khuẩn

Bảng 2.7. Kết quả xác định giới hạn nhiễm khuẩn ở điều kiện lão hóa cấp tốc

Thời điểm nghiên cứu	Yêu cầu	Lô thử		
		Lô 121118	Lô 141118	Lô 151118
0 (Ban đầu)	Phải đạt yêu cầu theo quy định	Đạt	Đạt	Đạt
3		Đạt	Đạt	Đạt
6		Đạt	Đạt	Đạt

Nhận xét: Kết quả đánh giá độ nhiễm khuẩn cho thấy: Viên nang CTHepaB đáp ứng các chỉ tiêu theo mức 4 của DĐVN V ở các thời điểm nghiên cứu lão hóa cấp tốc.

Kết luận: Nghiên cứu độ ổn định của viên nang CTHepaB ở điều kiện lão hóa cấp tốc ở các thời điểm ban đầu, 3 tháng và 6 tháng bảo quản ở điều kiện nhiệt độ $40^0C \pm 2^0C$ và độ ẩm tương đối 75% ± 5% cho thấy chế phẩm này là hoàn toàn đạt các chỉ tiêu chất lượng về tính chất, độ đồng đều khối lượng, kim loại nặng, độ rã, định tính, định lượng và giới hạn nhiễm khuẩn.

2.2. Kết quả dự đoán độ ổn định của viên nang CTHepaB từ nghiên cứu lão hóa cấp tốc.

Từ kết quả nghiên cứu độ ổn định ở điều kiện lão hóa cấp tốc, sử dụng phương trình Van't Hoff để dự đoán tuổi thọ sản phẩm.

Bảng 2.8. Dự đoán độ ổn định dựa vào kết quả định lượng Adenosin

Lô	Thời điểm	log(C/Co)	Δt	K	k	t90(t1)	Ktb	t90(t2)
Lô 121118	3 tháng	-0,00624	3	0,00479	2	18,17	0,0058	36,3
	6 tháng	-0,01771	6	0,00680	2			
Lô 151118	3 tháng	-0,00564	3	0,00433	2	23,29	0,0045	46,6
	6 tháng	-0,01226	6	0,00471	2			
Lô 151118	3 tháng	-0,00807	3	0,00620	2	20,93	0,0050	41,9
	6 tháng	-0,01007	6	0,00387	2			

Dựa vào kết quả trên, tuổi thọ dự đoán của chế phẩm là 36,3 tháng

Căn cứ vào kết quả này, có thể đưa ra dự đoán rằng, sản phẩm ổn định trong vòng 36 tháng. Tuy nhiên, để đánh giá sâu hơn và chính xác hơn, cần theo dõi độ ổn định thực tế ở điều kiện nghiên cứu dài hạn để đưa ra hạn dùng chính xác cho chế phẩm. Do vậy chúng tôi tiếp tục theo dõi độ ổn định

dài hạn theo đúng điều kiện bảo quản thực tế theo quy định của Bộ Y tế Việt Nam.

2.3. Kết quả nghiên cứu độ ổn định viên nang CTHepaB ở điều kiện nghiên cứu dài hạn

- Kết quả đánh giá độ ổn định về tính chất

Bảng 2.9. Kết quả đánh giá tính chất của viên nang CTHepaB ở điều kiện nghiên cứu dài hạn

Thời điểm nghiên cứu	Yêu cầu	Lô thử		
		Lô 121118	**Lô 141118**	**Lô 151118**
0 (Ban đầu)	Phải đạt yêu cầu theo quy định	Đúng	Đúng	Đúng
3		Đúng	Đúng	Đúng
6		Đúng	Đúng	Đúng
9		Đúng	Đúng	Đúng

Nhận xét: viên nang CTHepaB đạt chất lượng về chỉ tiêu tính chất ở các thời điểm nghiên cứu độ ổn định dài hạn.

- Kết quả nghiên cứu độ ổn định về độ đồng đều khối lượng

Bảng 2.10. Kết quả kiểm tra độ đồng đều khối lượng của viên nang CTHepaB ở các thời điểm nghiên cứu dài hạn

Thời điểm nghiên cứu (tháng)	Yêu cầu	Lô thử		
		Lô 121118	**Lô 141118**	**Lô 151118**
0 (Ban đầu)	± 7,5% so với KLTB bột thuốc trong nang	Đạt	Đạt	Đạt
3		Đạt	Đạt	Đạt
6		Đạt	Đạt	Đạt
9		Đạt	Đạt	Đạt

Nhận xét: ở tất cả các thời điểm nghiên cứu độ ổn định dài hạn, viên nang CTHepaB đều đạt yêu cầu về độ đồng đều khối lượng theo tiêu chuẩn cơ sở đã xây dựng.

- Kết quả nghiên cứu độ ổn định về kim loại nặng

Bảng 2.11. Kết quả đánh giá hàm lượng kim loại nặng của viên nang CTHepaB ở các thời điểm nghiên cứu độ ổn định dài hạn

Thời điểm nghiên cứu (tháng)	Yêu cầu	Hàm lượng kim loại nặng (ppm)		
		Lô 121118	Lô 141118	Lô 151118
0 (Ban đầu)	Không quá 10ppm	2,5	2,7	2,7
3		2,8	2,7	2,8
6		2,8	2,9	3,0
9		2,8	2,9	2,9

Nhận xét: Hàm lượng kim loại nặng ở các thời điểm nghiên cứu độ ổn định dài hạn của viên nang CTHepaB đều nhỏ hơn 10 ppm. Kết quả này cho thấy viên nang CTHepaB đạt yêu cầu về tiêu chí hàm lượng kim loại nặng ở các thời điểm nghiên cứu.

- Kết quả nghiên cứu độ ổn định về độ rã

Bảng 2.12. Kết quả kiểm tra độ rã ở điều kiện nghiên cứu dài hạn

Thời điểm nghiên cứu	Yêu cầu	Thời gian rã (phút)		
		Lô 121118	Lô 141118	Lô 151118
0 (Ban đầu)	Không quá 30 phút	4,7	4,5	4,5
3		4,6	4,5	4,6
6		4,8	4,4	4,8
9		5,0	4,7	4,8

Nhận xét: Thời gian để các viên nang CTHepaB rã hoàn toàn đều nhỏ hơn 30 phút. Như vậy nang CTHepaB đạt yêu cầu về tiêu chí độ rã ở các thời điểm nghiên cứu độ ổn định dài hạn.

- Kết quả nghiên cứu độ ổn định về định tính

Bảng 2.13. Kết quả kiểm tra định tính ở điều kiện nghiên cứu dài hạn

Thời điểm nghiên cứu	Yêu cầu	Lô thử		
		Lô 121118	**Lô 141118**	**Lô 151118**
0 (Ban đầu)	Phải đạt yêu cầu theo quy định	Đúng	Đúng	Đúng
3		Đúng	Đúng	Đúng
6		Đúng	Đúng	Đúng
9		Đúng	Đúng	Đúng

Nhận xét: Kết quả cho thấy, viên nang CTHepaB đáp ứng được yêu cầu quy định về tiêu chí định tính ở các thời điểm nghiên cứu độ ổn định dài hạn.

- Kết quả nghiên cứu độ ổn định về định lượng

Bảng 2.14. Kết quả định lượng glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin ở điều kiện nghiên cứu dài hạn

Thời điểm nghiên cứu	Yêu cầu	Hàm lượng glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin (mg/viên)		
		Lô 121118	**Lô 141118**	**Lô 151118**
0 (Ban đầu)	Hàm lượng glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin không ít hơn 3,8 mg/viên	4,43 ± 0,26	4,38 ± 0,32	4,47 ± 0,23
3		4,39 ± 0,29	4,34 ± 0,24	4,43 ± 0,32
6		4,36 ± 0,25	4,30 ± 0,31	4,39 ± 0,26
9		4,32 ± 0,24	4,27 ± 0,27	4,36 ± 0,25

Nhận xét: Hàm lượng glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin trong viên nang CTHepaB đều lớn hơn 3,8 mg/viên ở các thời điểm nghiên cứu độ ổn định dài hạn. Kết quả cho thấy độ ổn định của hàm lượng glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin ở điều kiện nghiên cứu dài hạn.

- Kết quả nghiên cứu độ ổn định về giới hạn nhiễm khuẩn

Bảng 2.15. Kết quả xác định giới hạn nhiễm khuẩnở điều kiện nghiên cứu dài hạn

Thời điểm nghiên cứu	Yêu cầu	Lô thử		
		Lô 121118	Lô 141118	Lô 151118
0 (Ban đầu)	Phải đạt yêu cầu theo quy định	Đạt	Đạt	Đạt
3		Đạt	Đạt	Đạt
6		Đạt	Đạt	Đạt
9		Đạt	Đạt	Đạt

Nhận xét: Kết quả đánh giá độ nhiễm khuẩn cho thấy: Viên nang CTHepaB đáp ứng các chỉ tiêu theo mức 4 của DĐVN V (phụ lục 13.6) ở các thời điểm nghiên cứu độ ổn định dài hạn.

Nhận xét: Nghiên cứu độ ổn định của viên nang CTHepaB ở điều kiện dài hạn tại các thời điểm ban đầu, 3, 6, 9 tháng bảo quản ở điều kiện nhiệt độ $30^0C \pm 2^0C$ và độ ẩm tương đối 75% ± 5% cho thấy chế phẩm này là hoàn toàn đạt các chỉ tiêu chất lượng về tính chất, độ đồng đều khối lượng, kim loại nặng, độ rã, định tính, định lượng và giới hạn nhiễm khuẩn tới thời điểm lấy mẫu hiện tại (9 tháng).

Kết quả nghiên cứu này cho thấy, khi đánh giá ở điều kiện thực tế thì hàm lượng glycoalkaloid toàn phần tính theo solasodin giảm ít hơn so với dự đoán từ phương trình động học Van’t Hoff.

Từ các kết quả nghiên cứu độ ổn định ở điều kiện lão hóa cấp tốc, điều kiện thường và dự đoán tuổi thọ của thuốc, có thể đi đến kết luận: viên nang CTHepaB ổn định tới 36 tháng ở điều kiện bảo quản phù hợp với yêu cầu của Bộ Y tế.