



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

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

(11)



1-0027629

(51)⁷ A61K 31/01; A61K 31/05

(13) B

(21) 1-2019-04520

(22) 15/08/2019

(45) 25/03/2021 396

(43) 25/10/2019 379A

(73) Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Hoàng Mai Hà (VN); Đặng Thị Tuyết Anh (VN); Hồ Thị Oanh (VN); Hắc Thị Nhung (VN); Nguyễn Đức Tuyển (VN); Nguyễn Văn Tuyển (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HỆ NANO LYCOPEN/RESVERATROL

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol hai thành phần gồm lycopene và resveratrol có khả năng phân tán tốt trong nước với kích thước hạt nhỏ từ 66-102nm, bao gồm các bước: tổng hợp chất bao bọc vi nang copolyme PLA-PEG có khối lượng phân tử M_w là 8400, với chỉ số PDI là 1,2; tạo hệ nano lycopene/resveratrol theo các tỷ lệ hàm lượng hai hoạt chất lycopene và resveratrol khác nhau bằng phương pháp sấy phun. Vitamin E được sử dụng làm chất chống oxy hóa nhằm nâng cao độ bền hệ nano lycopene/resveratrol.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

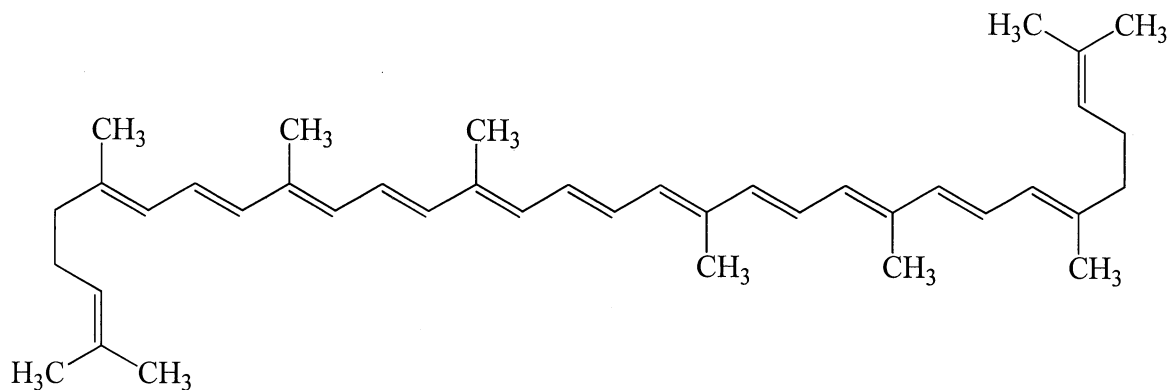
Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol có khả năng phân tán tốt trong nước, cụ thể là sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hệ nano hai thành phần: lycopene và resveratrol, sử dụng chất bao bọc vi nang là copolyme polylactid-polyetylen glycol (PLA-PEG).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khoa học và công nghệ nano đang thu hút được sự quan tâm nghiên cứu ngày càng lớn do tiềm năng ứng dụng của chúng trong nhiều lĩnh vực quan trọng của cuộc sống. Trong đó, dạng hạt nano của một số hoạt chất có hoạt tính sinh học cao với nhiều tính chất ưu việt hứa hẹn mang lại sự phát triển trong các ngành dược phẩm, mỹ phẩm và công nghệ thực phẩm. Các nhà nghiên cứu trên toàn thế giới đã công nhận rằng một số lượng đáng kể các chất có hoạt tính sinh học khi đưa vào cơ thể có tác động đến chuỗi quá trình sinh hóa xảy ra trong cơ thể, mang lại lợi ích có thể kiểm chứng và không có các tác dụng phụ có hại (Nguyễn Lâm Dũng, Các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học).

Một số hoạt chất quý nổi bật như lycopene, resveratrol được biết đến là những hoạt chất chống oxy hóa có hoạt tính mạnh trong tự nhiên (Qingguo Lu, US 2014/0316175A1 và Hsieh, WO 2010/132021).

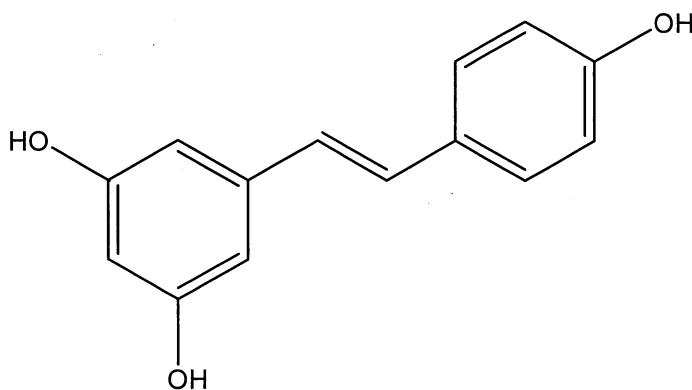
Lycopene là một carotenoit, một dạng sắc tố tự nhiên màu đỏ tươi có trong thực vật và một số loài sinh vật quang hợp khác. Lycopene được tìm thấy trong nhiều loại rau quả có màu đỏ như cà chua, gấc, cà rốt, đu đủ... [Judith Müller-Maatsch và cộng sự, 2007]. Hoạt chất này được tổng hợp trong tự nhiên nhờ vi sinh vật và thực vật nhưng không có ở động vật. Cơ thể không thể tự tổng hợp được lycopene mà phải bổ sung từ thức ăn hàng ngày. Phân tử lycopene có công thức phân tử $C_{40}H_{56}$, khối lượng phân tử là 536 Da, thành phần cấu tạo gồm 13 liên kết đôi, trong đó có 11 liên kết đôi liên hợp, cấu trúc phân tử như sau:



Hoạt tính chống oxi hóa của lycopene cao gấp 3,2 lần so với β -caroten và gấp 100 lần so với vitamin E. Hoạt chất lycopene hoạt động như một chất chống lại các tác nhân oxi hóa như tia UV, hấp thụ bức xạ của ánh sáng mặt trời và khi phối hợp trong mỹ phẩm dưỡng da, nó có thể làm giảm ảnh hưởng của tia UV lên da, hoặc có thể bảo vệ khỏi các ảnh hưởng ngắn hạn (cháy nắng) và dài hạn (ung thư da) của ánh sáng mặt trời (T.C. Kha và cộng sự, 2013). Trong một nghiên cứu năm 1999, 33 bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt ở Viện Ung thư Detroit được chia thành 2 nhóm, nhóm 1 sử dụng 30 mg lycopene và nhóm 2 sử dụng giả dược (nhóm đối chứng) trong vòng 30 ngày trước khi phẫu thuật. Kết quả cho thấy các tế bào khối u ngừng lan rộng ở 67% bệnh nhân ở nhóm 1 so với 44% ở nhóm đối chứng (nhóm 2) (Giovannucci E và cộng sự, 2002). Các công bố của Levy (1995), Sharoni (1994), Sharoni và Levy (1996) đã so sánh hiệu quả chống ung bướu của lycopene so với α và β -caroten, kết quả cho thấy lycopene có hiệu quả cao hơn α và β -caroten trong việc ức chế các tế bào ung thư phổi và tế bào ung thư tuyến vú (Vuong và cộng sự, 2006). Đến năm 2002, Tiến sĩ Edward Giovannucci thuộc Trường Đại học Y Harvard công bố kết quả nghiên cứu: bổ sung cà chua, nước sốt cà chua- loại quả chứa hàm lượng lycopene cao vào chế độ ăn ít nhất hai lần một tuần giúp giảm nguy cơ ung thư tuyến tiền liệt tới 21-34%. Nhóm nghiên cứu của Vuong và cộng sự năm 2006, cũng nhận định lycopene là hoạt chất có hoạt tính chống oxi hóa cao, tiêu diệt gốc tự do. Trong tác phẩm “Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam”, GS.TS. Đỗ Tất Lợi đã khẳng định hoạt chất lycopene có trong dầu gấc tác dụng như

những thuốc có vitamin A, đặc biệt khi bôi trên các vết thương, vết loét sẽ làm vết thương chóng lành, chóng lên da non. Từ những công dụng tuyệt vời của lycopene mà cho đến nay, hoạt chất hiện đang trở nên rất phổ biến trên toàn thế giới, được ứng dụng làm thực phẩm bổ sung cho sức khỏe. Bởi vậy, các hướng nghiên cứu về lycopene ngày càng thu hút các nhà khoa học.

Nếu như lycopene được biết đến là một carotenoid có hoạt tính sinh học cao, thì resveratrol là một terpenoid cũng có khả năng chống oxy hóa và chống viêm nổi tiếng (Chiang-Wen Lee và cộng sự, 2012). Resveratrol có công thức phân tử $C_{14}H_{12}O_3$ và khối lượng phân tử là 228 DA. Hoạt chất có nhiều trong vỏ quả nho đỏ, đậu phộng, dứa và dâu tằm, cốt khí củ. Resveratrol có dạng tinh thể màu trắng nhạt, ít tan trong nước, tan nhiều trong dung môi hữu cơ như ethanol và acetone (Jialei Li và cộng sự, 2012). Cấu trúc phân tử của resveratrol như sau:



Trong tự nhiên hoạt chất hoạt động như phytoalexin- một chất kháng sinh giúp thực vật chống lại vi khuẩn, vi nấm, virus khi bị sâu bệnh tấn công. Resveratrol có khả năng phòng ngừa ung thư, làm chậm quá trình lão hóa, được xem là một thành phần chống oxy hóa kép, vượt trội hơn cả vitamin C, vitamin E, hạn chế tác động của các gốc tự do lên collagen và elastin, nguyên nhân dẫn đến lão hóa da (Thomas Walle, 2011).

Tuy lycopene và resveratrol đều là những hoạt chất có hoạt tính sinh học cao nhưng khả năng hòa tan trong nước kém, khó hấp thu vào cơ thể, do đó hạn chế ứng dụng thực tiễn của các hoạt chất này. Sau khi vào cơ thể, lycopene hay

resveratrol chủ yếu tập trung tại mô mỡ và các cơ quan nội tạng như tuyến thượng thận, gan, tuyến tiền liệt và tinh hoàn (Slomski và Norris, 2005). Bên cạnh đó, hoạt chất lycopene có nhược điểm là không bền, dễ bị oxi hóa, dễ bị phân hủy bởi nhiệt và ánh sáng trong quá trình chế biến và bảo quản. Do đó, chế tạo thành công hệ nano lycopene/resveratrol chứa hai thành phần lycopene và resveratrol không những nâng cao sinh khả dụng của các hoạt chất thành phần, cải thiện độ bền lycopene mà còn là một hướng nghiên cứu khoa học mới có tiềm năng ứng dụng lớn.

Hiện nay, các nghiên cứu mới dừng lại ở việc sản xuất hệ composit giữa lycopene và resveratrol. Các bằng sáng chế mới chỉ đề cập đến nghiên cứu tỷ lệ hàm lượng tối ưu giữa thành phần lycopene và resveratrol trong quá trình tạo sản phẩm chữa bệnh, chống ung thư, làm đẹp da và thuốc chống viêm. Ví dụ như:

- Hàm lượng lycopene trong khoảng 0,1-2% trọng lượng/thể tích và resveratrol trong khoảng 0,05-1,5% trọng lượng/thể tích được kết luận là phù hợp khi chế tạo phức hệ sản phẩm chống oxi hóa có chứa các muối kim loại, axit amin, amin rượu và vitamin B. Tỷ lệ giữa lycopene: resveratrol trong hệ sản phẩm nằm trong khoảng 1:15-40:1 (Shakarchi, NZ 2003/0526350);

- Trong sáng chế US 2008/0262081A1 của Raederstorff và cộng sự, mô tả tỷ lệ lycopene với resveratrol khi bổ sung vào cơ thể thông qua chế độ ăn uống có tác dụng chống quá trình lão hóa thích hợp là 1:42-1:14;

- Một sản phẩm cải thiện làn da, dưỡng da với sự kết hợp hai hoạt chất lycopene và resveratrol tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol trong sản phẩm khoảng 4:1 cũng được công bố trong sáng chế quốc tế số WO 2005/107729 (Kang, 2005);

- Hsieh và nhóm tác giả trong sáng chế quốc tế số WO2010/132021 đã công bố chế tạo được sản phẩm chăm sóc sức khỏe chứa lycopene và resveratrol có hoạt tính sinh học tốt dùng để bổ sung dưỡng chất, giúp hạn chế lão hóa và cholesterol trong máu...

Nghiên cứu trong các bằng sáng chế nêu trên đều tập trung khảo sát tỷ lệ lycopene với resveratrol trong quá trình tạo sản phẩm, sao cho phù hợp để có tác dụng mong muốn, hiện chưa có công trình bài báo hay sáng chế nào đề cập đến việc sản xuất bột nano lycopene/resveratrol, đặc biệt là sử dụng phương pháp đơn giản, dễ thực hiện để tăng khả năng áp dụng công nghiệp của sản phẩm.

Trong bằng sáng chế số IN283098 B công bố năm 2017 về phương pháp chế tạo một tổ hợp hạt bao gồm hai hay nhiều chất chống oxy hóa trong đó có lycopene và resveratrol, kết hợp với một vật liệu polyme. Sản phẩm thu được có kích thước hạt trên 200 nm. Theo định nghĩa hạt nano là các hạt kích thước từ 1 tới 100 nm (một số quan điểm cho rằng hạt nano là hạt có kích thước dưới 200 nm). Như vậy, xét trên mọi quan điểm thì tổ hợp hạt chứa lycopene và resveratrol trong tài liệu này chưa đạt kích thước nanomet. Ngoài ra, phương pháp bào chế bao gồm các bước: xử lý chất chống oxy hóa thứ nhất bằng dung môi hữu cơ là PEG-400 hoặc N-metyl pyrrolidon; xử lý chất chống oxy hóa thứ hai bằng vật liệu polyme (poly lactid (PLA), polycaprolacton (PCL), hoặc copolyme PLA-PCL) với sự có mặt của dung môi etylaxetat, diclometan, axeton. Các chất chống oxy hóa được đề cập có thể là lycopene, resveratrol, vitamin E. Nhũ tương tạo thành bằng cách trộn hai dung dịch trên trong điều kiện khuấy liên tục; sau đó bổ sung nhũ tương thu được vào chất ổn định là vitamin ETPGS; tiếp tục xử lý hỗn dịch với nước để tạo ra sự tách pha, kết tủa thu được vi hạt trong pha hữu cơ. Cuối cùng là công đoạn tách pha hữu cơ và sấy để thu được bột khô. Phương pháp chế tạo tổ hợp hạt này có nhược điểm là quy trình tương đối phức tạp, xử lý lần lượt từng hoạt chất trong dung môi và vật liệu polyme, sau đó mới trộn và nhũ hóa. Từ hỗn dịch muốn tạo được bột khô cần phải tách loại pha nước và sấy pha hữu cơ. Công đoạn thu bột khô ở bước này dễ xảy ra việc còn tồn dư dung môi trong sản phẩm. Như vậy, cần cải tiến phương pháp nêu trên theo cách có thể tiến hành một cách đơn giản, dễ thực hiện để áp dụng được ở quy mô lớn; và điều quan trọng là sản phẩm thu được phải đạt kích thước

nanomet, có khả năng phân tán tốt trong nước. Từ đó mới có thể nâng cao ứng dụng của tổ hợp lycopene/resveratrol trong dược phẩm và mỹ phẩm.

Trong một đơn đăng ký sáng chế khác với số công bố CN106344510 A, Zhang Zhiming và nhóm cộng sự đưa ra phương pháp sản xuất vi nhũ tương lycopene gồm các bước: Trước hết trộn tinh thể lycopene, chất đồng nhũ hóa (glycerol hoặc sorbitol), chất nhũ hóa (lecithin, axit caprylic glycerit, và Span 60) tan trong dầu và chất chống oxy hóa (axit L-ascorbic, polyphenol trong trà, resveratrol và hesperidin) để thu được huyền phù; sau đó nghiền hệ huyền phù để thu được pha dầu. Trộn nước và chất nhũ hóa (Tween hoặc lipid sucroset) tan trong nước thành pha nước; cuối cùng trộn đồng nhất pha nước và pha dầu để thu được vi nhũ tương lycopene. Phương pháp sản xuất vi nhũ tương lycopene nêu trong sáng chế là phương pháp nghiền cơ học, sản phẩm thu được ở dạng micro, chưa đạt tới kích thước nano. Sản phẩm thu được mới chỉ dừng lại ở hệ vi nhũ tương, chưa phải ở dạng bột khô. Trong khi đó, các hợp chất carotenoit kém bền như lycopene nếu được chế tạo về dạng bột nano sẽ có độ bền cao hơn, dễ dàng bào chế thành dạng viên nang mang lại tiềm năng ứng dụng lớn hơn dạng vi nhũ.

Do đó, để giải quyết các vấn đề kỹ thuật nêu trên, nhóm tác giả sáng chế đề cập phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol dạng bột khô với quy trình chế tạo đơn giản, an toàn và dễ thực hiện. Hệ sản phẩm nano lycopene/resveratrol không những cải thiện được độ bền thành phần lycopene, giúp giảm kích thước hạt, tăng khả năng phân tán trong nước và sinh khả dụng của các hoạt chất thành phần, mà còn nâng cao ứng dụng của sản phẩm trong các ngành dược phẩm, mỹ phẩm và công nghiệp thực phẩm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol bằng phương pháp sấy phun sử dụng chất bao bọc vi nang là copolyme PLA-PEG và các chất hoạt động bề mặt là lecithin và tween.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol có khả năng phân tán tốt trong nước, với kích thước hạt trung bình từ 66nm-102nm. Trước hết để đưa ra phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol, nhóm tác giả sáng chế đã khảo sát và lựa chọn chất hoạt động bề mặt phù hợp và đặc biệt là tổng hợp chất bao bọc vi nang copolyme PLA-PEG. Chất bao bọc vi nang này không chỉ có tác dụng hình thành hạt nano mà còn có tác dụng tạo bột, nâng cao độ trơn chảy của bột nano sau khi sấy phun.

Copolyme PLA-PEG tổng hợp được bằng cách mở vòng trùng hợp L-Lactide trong PEG-6000 sử dụng xúc tác thiếc octoat $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ trong môi trường khí nitơ. Sản phẩm thu được sau đó bảo quản ở điều kiện nhiệt độ -16°C để thực hiện các bước tiếp theo.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol có kích thước hạt trung bình từ 66nm-102nm. Trong đó, sau quá trình tổng hợp copolyme PLA-PEG là quy trình sản xuất hệ hạt nano, bao gồm các bước chính sau:

a) tạo pha nội: trộn hoạt chất lycopene với resveratrol, sau đó bổ sung chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa và chất bao bọc vi nang copolyme polylactid-polyetylen glycol (PLA-PEG); hòa tan hỗn hợp này vào dung môi tetrahydrofuran sử dụng máy đồng nhất ở tốc độ 8400 vòng/phút trong 45 phút;

b) tạo dung dịch nano lycopene/resveratrol trong pha ngoại nước: bổ sung từ từ dung dịch pha nội vào nước cất trong điều kiện khuấy bằng máy khuấy đồng nhất tốc độ cao ở tốc độ 9000-10000 vòng/phút, khuấy trong 30 phút;

c) tạo bột hệ nano lycopene/resveratrol: dung dịch nano lycopene/resveratrol thu được nêu trên được đưa vào máy sấy phun, thu được sản phẩm dạng bột màu đỏ mịn.

Các tác giả sáng chế đã thực hiện một số phương án thực nghiệm với phương pháp sản xuất trên, các thực nghiệm được khảo sát theo tỷ lệ hàm lượng

lycopen: resveratrol lần lượt là 1:2, 1:1 và 2:1 và khảo sát sự có mặt của chất chống oxi hóa là vitamin E, theo đó:

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol với tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol là 1:2;

Theo phương án thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol với tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol là 1:2 với sự có mặt của chất chống oxi hóa là vitamin E;

Theo phương án thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol với tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol là 1:1;

Theo phương án thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol với tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol là 1:1 với sự có mặt của chất chống oxi hóa là vitamin E;

Theo phương án thứ năm, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol với tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol là 2:1;

Theo phương án thứ sáu, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol với tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol là 2:1 với sự có mặt của chất chống oxi hóa là vitamin E;

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol có khả năng phân tán tốt trong nước với kích thước hạt nhỏ và độ bền cao. Sự tương hợp tốt giữa lycopene và resveratrol thu được các hệ nano có đường kính hạt dao động từ 66-102nm. Ngoài ra, sự có mặt của chất chống oxi hóa khi thêm vào hệ nano có tác dụng cải thiện đáng kể độ bền hoạt chất lycopene có trong hệ nano lycopene/resveratrol.

Hiệu quả của sáng chế:

- Quy trình sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol trong nước sử dụng các chất hoạt động bề mặt và chất bao bọc vi nang copolyme PLA-PEG, tạo bột bằng phương pháp sấy phun là một quy trình chế tạo đơn giản, dễ thực hiện ở quy mô lớn;

- Hệ nano lycopene/resveratrol có khả năng phân tán tốt trong nước, kích thước hạt nhỏ, giúp tăng khả năng hấp thu vào cơ thể, do đó sản phẩm có thể ứng dụng làm dược phẩm và mỹ phẩm.
- Sản phẩm hệ nano lycopene/resveratrol cho thấy sự có mặt của resveratrol và vitamin E giúp làm tăng độ bền của lycopene;
- Nhờ sử dụng chất bao bọc vi nang copolyme PLA-PEG, hệ nano lycopene/resveratrol thu được có độ bền cao, cỡ hạt nhỏ, giúp nâng cao hoạt tính sinh học cũng như sinh khả dụng của hệ này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được trình bày cụ thể và được hiểu rõ ràng hơn qua việc mô tả chi tiết sáng chế cùng với các hình vẽ minh họa kèm theo, trong đó:

Hình 1 là sơ đồ tổng hợp copolyme PLA-PEG;

Hình 2 là phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của copolyme PLA-PEG;

Hình 3 là sơ đồ phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol;

Hình 4 là phổ FT-IR của các mẫu hệ nano lycopene/resveratrol;

Hình 5 là phổ UV-Vis của các mẫu hệ nano lycopene/resveratrol;

Hình 6 là ảnh TEM và giản đồ phân bố kích thước hạt của hệ nano lycopene/resveratrol (1/2);

Hình 7 là ảnh TEM và giản đồ phân bố kích thước hạt của hệ nano lycopene/resveratrol (1/1);

Hình 8 là ảnh TEM và giản đồ phân bố kích thước hạt của hệ nano lycopene/resveratrol (2/1);

Hình 9 là các đồ thị thể hiện độ bền của lycopene trong hệ nano lycopene/resveratrol theo thời gian trong điều kiện bảo quản -16°C .

Mô tả chi tiết sáng chế

Lycopene và resveratrol: hai hoạt chất chính sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol.

Trong sáng chế, nhóm tác giả sử dụng hoạt chất lycopene được chiết tách một cách trực tiếp từ màng gấc và có độ tinh khiết trên 98%.

Hoạt chất resveratrol sử dụng cho quá trình sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol là resveratrol thương mại, chiết xuất từ rễ cây cốt khí củ với độ tinh khiết trên 98%.

Tổng hợp copolyme PLA-PEG:

Sơ đồ tổng hợp copolyme PLA-PEG được thể hiện như Hình 1. Quy trình tổng hợp copolyme PLA-PEG cụ thể như sau:

- i) Lắp hệ phản ứng sử dụng sinh hàn hồi lưu và đuôi không khí trong hệ bằng dòng khí nitơ;
- ii) Cân chính xác 180g PEG-6000 (0,03mol) + 86,4g Lactide (0,6mol) + 2 lít toluen + 2g Sn(Oct)₂, ($n_{\text{lactide}}: n_{\text{PEG}}=20:1$) chuyển vào bình phản ứng, khuấy và gia nhiệt đến 110°C;
- iii) Sau 6 giờ, tắt bếp và để nguội hỗn hợp;
- iv) Cắt quay chân không để loại dung môi toluen. Sản phẩm thu được được tinh chế bằng cách hòa tan trong dung môi diclometan và kết tủa bằng dung môi hexan. Giai đoạn kết tủa được thực hiện 2 lần để thu được sản phẩm có độ tinh khiết cao;
- v) Sấy chất rắn trong môi trường chân không;
- vi) Bảo quản ở -16°C.

Copolyme PLA-PEG thu được có khối lượng phân tử M_w là 8.400 với chỉ số PDI=1,2 được xác định bằng phương pháp sắc ký thẩm gel GPC.

Cấu trúc của copolyme PLA-PEG được khẳng định bằng phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR trong CDCl₃ (Hình 2). Kết quả cho thấy copolyme có độ tinh khiết cao. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton cho thấy các tín hiệu đặc trưng cho proton của copolyme PLA-PEG. Tín hiệu cộng hưởng và vị trí proton trong copolyme PLA-PEG như sau:

- Độ dịch chuyển hoá học $\delta \sim 1,59$ ppm đặc trưng cho CH₃ trong PLA

- Độ dịch chuyển hoá học $\delta \sim 5,03$ ppm đặc trưng cho CH trong PLA
- Độ dịch chuyển hoá học $\delta \sim 3,63$ ppm đặc trưng cho CH₂ trong PEG

Phổ ¹³C-NMR chỉ ra các tín hiệu đặc trưng của các nguyên tử C. Quy ghép các tín hiệu cộng hưởng và các nguyên tử cacbon trong copolyme PLA-PEG cho kết quả như sau:

- Độ dịch chuyển hoá học $\delta \sim 169,5$ ppm đặc trưng cho C=O trong PLA
- Độ dịch chuyển hoá học $\delta \sim 77,2$ ppm đặc trưng cho CH₂ trong PEG
- Độ dịch chuyển hoá học $\delta \sim 70,5$ ppm đặc trưng cho CH trong PLA
- Độ dịch chuyển hoá học $\delta \sim 16,7$ ppm đặc trưng cho CH₃ trong PLA

Sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol:

Lycopene là một hoạt chất không phân cực, không tan trong nước và tan rất ít trong dầu ăn. Bên cạnh đó, hoạt chất cũng có nhược điểm là kém bền, dễ bị oxi hóa, khả năng tương thích sinh học thấp. Để nâng cao sinh khả dụng, việc chuyển hóa lycopene thành dạng nano dễ hấp thu vào cơ thể, đồng thời tăng độ bền của hoạt chất, hứa hẹn sẽ là một giải pháp hữu hiệu biến lycopene thành nguồn dược liệu quý. Sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol, với sự kết hợp giữa hai thành phần hoạt chất lycopene và resveratrol không những tăng độ bền các thành phần hạt nano, tăng khả năng phân tán tốt trong nước, nâng cao các hoạt tính sinh học của chúng khi hấp thu vào cơ thể, mà còn phát triển hướng nghiên cứu về các hoạt chất có hoạt tính sinh học cao tồn tại ở dạng kích thước nanomet. Đây là một hướng nghiên cứu mới, hiện chưa có công trình khoa học công bố về hệ hạt nano này.

Quá trình sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol như sau: Lycopene và resveratrol được phối trộn với các tỷ lệ khác nhau, sau đó thêm các chất hoạt động bề mặt, chất chống oxi hóa và chất bao bọc vi nang copolyme tổng hợp ở trên, hòa tan các thành phần trong dung môi tetrahydrofuran sử dụng máy đồng nhất Ultra-Turrax với tốc độ 8400 vòng/phút trong 45 phút; hỗn hợp sau khi đã

hòa tan hoàn toàn được bổ sung từ từ vào dung dịch nước cất đồng thời khuấy đều ở tốc độ 9000-10000 vòng/phút trong khoảng thời gian 30 phút. Dung dịch hệ nano lycopene/resveratrol trong nước sau đó được đưa vào hệ thống máy sấy phun, thu được bột nano lycopene/resveratrol có màu đỏ mịn. Sơ đồ quy trình sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol được thể hiện trên Hình 3.

Bảng 1. Thành phần các mẫu hệ nano lycopene/resveratrol

Mẫu	Lycopene (g)	Resveratrol (g)	Lecithin (g)	Tween (g)	Vitamin E (g)	Copolymer PLA-PEG (g)	Hàm lượng lycopene (%)	Hàm lượng resveratrol (%)
NLR1	4	8	12	12	0	64	4	8
NLR2	4	8	12	12	4	60	4	8
NLR3	6	6	12	12	0	64	6	6
NLR4	6	6	12	12	4	60	6	6
NLR5	8	4	12	12	0	64	8	4
NLR6	8	4	12	12	4	60	8	4

Cấu trúc, hình thái và tính chất của hệ nano lycopene/resveratrol

i) Cấu trúc hệ nano lycopene/resveratrol

Cấu trúc của các mẫu hệ nano lycopene/resveratrol thu được sau quá trình chế tạo được phân tích bằng phổ FT-IR. Phổ FT-IR cho thấy các tín hiệu đặc trưng của hai hoạt chất thành phần là lycopene và resveratrol trong hệ nano lycopene/resveratrol, cụ thể như Hình 4.

Nhận thấy rằng, pic đặc trưng của nhóm -OH trong phổ FT-IR của tinh thể resveratrol là ở 3250cm^{-1} . Tuy nhiên, trong phổ FT-IR của hệ NLR1, NLR3 và NLR5 cho thấy nhóm -OH của resveratrol đã được kéo dài chuyển sang các vị trí dao động lần lượt là 3365cm^{-1} , 3398cm^{-1} , 3375cm^{-1} , đây là dấu hiệu của liên kết hydro giữa resveratrol với chất hoạt động bề mặt và copolyme PLA-PEG. Bên cạnh đó, các đỉnh pic đặc trưng của lycopene trong phổ FT-IR trong hệ nano NLR1, NLR3 và NLR5 cũng dịch chuyển dao động so với các pic đặc trưng trong phổ FT-IR của lycopene tinh khiết. Ví dụ như dao động $\text{CH}_{\text{str}}(\text{SP}^2)$ của lycopene trong hệ nano có xu hướng dịch gần về các bước sóng 2923cm^{-1} , 2924cm^{-1} , 2922cm^{-1} trong khi dao động này ở phổ FT-IR của lycopene tinh khiết là 3038cm^{-1} . Sự thay đổi vị trí các đỉnh pic tương ứng với các dao động đặc trưng của lycopene trong hệ nano cho thấy sự tương hợp tốt giữa lycopene và copolyme PLA-PEG. Một ví dụ khác cũng cho thấy dao động $\text{C}=\text{C}_{\text{str}}(\text{Trans})$ của lycopene trong hệ nano NLR1, NLR3 và NLR5 lần lượt ở các bước sóng $1593,09\text{cm}^{-1}$; $1604,15\text{cm}^{-1}$; $1604,26\text{cm}^{-1}$ trong khi dao động này của lycopene tinh khiết là $1625,97\text{cm}^{-1}$. Hiện tượng này là do tương tác ngoại phân tử giữa lycopene và resveratrol. Sự có mặt của resveratrol đã cải thiện, nâng cao độ bền của lycopene, hạn chế sự kém bền do 11 liên kết đôi liên hợp có trong cấu trúc hoạt chất lycopene.

ii) Định lượng lycopene và resveratrol có trong hệ nano lycopene/resveratrol bằng quang phổ hấp thụ UV-Vis

Cân chính xác lần lượt 20mg bột nano NLR1, NLR3 và NLR5 vào bình nón chứa 20g dung môi tetrahydrofuran, khuấy nhẹ để các hệ nano tan hoàn toàn. Sử dụng pipet hút và cân chính xác 100mg dung dịch mỗi hệ trên vào bình nón 100ml chứa 50g dung môi, thu được lần lượt dung dịch chuẩn của các hệ nano có nồng độ 2 ppm.

Dùng tetrahydrofuran làm mẫu trắng. Quét phổ hấp thụ của các dung dịch NLR1, NLR3 và NLR5 vừa pha bằng máy đo quang phổ hấp thụ UV-Vis SP-

3000 nano trong dải bước sóng từ 200-800nm. Kết quả cho thấy, trên phổ xuất hiện các đỉnh hấp thụ đặc trưng của lycopene và resveratrol. Đỉnh hấp thụ đặc trưng của resveratrol trong các hệ nano lần lượt xuất hiện ở hai bước sóng 298nm và 324nm. Ba đỉnh pic hấp thụ đặc trưng của lycopene trong hệ nano lần lượt là 450nm, 479nm, 510nm. Phổ UV-Vis trong Hình 5 cho thấy, cường độ hấp thụ của các pic resveratrol và lycopene trong các mẫu tương ứng tỷ lệ với tỷ lệ hàm lượng hai hoạt chất resveratrol và lycopene có trong hệ nano lycopene/resveratrol.

iii) Đặc điểm hình thái hạt và sự phân bố kích thước hạt của hệ nano lycopene/resveratrol

Các mẫu NLR1, NLR3 và NLR5 có tỷ lệ lycopene/resveratrol lần lượt là 1/2, 1/1 và 2/1, tương ứng với các kết quả đo trong Hình 6, Hình 7 và Hình 8. Hình 6 cho thấy, hạt nano thu được có dạng hình cầu, kích thước hạt nhỏ trong dải từ 30-120nm (ảnh TEM) và đường kính hạt trung bình là 66nm (giản đồ phân bố kích thước hạt). Tương tự ở Hình 7 và 8 cho thấy kích thước hạt trung bình trong hệ nano NLR3 và NLR5 lần lượt là 79nm và 102nm. Nhận thấy rằng, với tỷ lệ lycopene/resveratrol càng tăng thì sự phân bố kích thước hạt trong hệ nano lycopene/resveratrol không đồng đều, và kích thước hạt trung bình lớn dần.

Sau quá trình đánh giá cấu trúc, hình thái và tính chất của sản phẩm thu được cho thấy nhóm tác giả bằng sáng chế đã chế tạo thành công hệ nano lycopene/resveratrol.

iv) Đánh giá độ bền của các mẫu nano lycopene/resveratrol

Với cấu trúc gồm 13 liên kết đôi, trong đó 11 liên kết đôi liên hợp, lycopene có nhược điểm là không bền, dễ bị oxy hóa, dễ bị phân hủy bởi nhiệt và ánh sáng trong quá trình chế biến và bảo quản, làm giảm sinh khả dụng của hoạt chất này. Trong khi resveratrol được biết đến là một hoạt chất bền nhiệt, gần như không bị phân hủy ở nhiệt độ phòng. Với cấu trúc gồm ba nhóm hydroxyl và nhiều liên kết đôi liên hợp, resveratrol có khả năng chống oxy hóa mạnh hơn rất nhiều so với vitamin C và glutathione. Do đó, sản xuất hệ nano

lycopen/resveratrol không những nâng cao hoạt tính sinh học của các hoạt chất thành phần, đồng thời sự tương hợp giữa lycopene và resveratrol sẽ cải thiện độ bền của lycopene. Bên cạnh đó, nhóm tác giả bằng sáng chế đã khảo sát độ bền của hệ nano với sự hỗ trợ của chất chống oxy hóa là vitamin E. Vitamin E có sự tương hợp tốt với lycopene giúp cho hệ nano trở nên bền hơn. Kết quả đánh giá độ bền của hệ nano được thể hiện trong Bảng 2 và Hình 9:

Bảng 2. Độ bền các mẫu hệ nano theo thời gian bảo quản ở -16°C

Mẫu	Độ bền (%)				
	0 ngày	15 ngày	30 ngày	60 ngày	90 ngày
NLR1	100	99,2	98,2	96,5	94,8
NLR2	100	99,5	98,8	97,0	95,6
NLR3	100	98,8	97,4	95,1	93,1
NLR4	100	99,1	98,0	96,1	94,2
NLR5	100	98	96	93,7	91,5
NLR6	100	98,2	96,4	94,5	92,8

Như vậy, trong cùng điều kiện bảo quản là -16°C , các mẫu bột nano có độ bền tỷ lệ thuận với hàm lượng resveratrol/lycopen trong hệ nano lycopene/resveratrol. Tỷ lệ resveratrol: lycopene càng tăng thì độ bền hệ nano càng cao. Ngoài ra, với vai trò là một chất chống oxy hóa, sự có mặt của Vitamin E cũng giúp tăng độ bền của hoạt chất lycopene có trong hệ nano.

Sau 3 tháng bảo quản ở -16°C , hàm lượng lycopene trong hệ nano NLR2 còn lại là 95,6%. Như vậy, có thể thấy rằng lycopene trong hệ này bị phân hủy khá chậm, hoạt chất lycopene trong hệ nano lycopene/resveratrol chế tạo được tương đối bền và ổn định.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol với tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol là 1:2 (hệ nano NLR1)

Các chất hoạt động bề mặt bao gồm 12g lecithin, 12g tween được cho vào bình phản ứng thứ nhất. Sau đó, thêm vào bình phản ứng 4g lycopene, 8g resveratrol và 64g copolyme PLA-PEG. 1 lít dung môi tetrahydrofuran được đưa vào bình phản ứng để hòa tan hoàn toàn hỗn hợp. Sau khoảng thời gian khuấy 45 phút, dung dịch thu được màu đỏ đậm trong suốt, được đưa từ từ vào bình phản ứng thứ hai chứa 2,5 lít nước cất. Quá trình này được thực hiện đồng thời dưới máy đồng nhất tốc độ cao trong khoảng thời gian 30 phút. Cuối cùng, hỗn hợp nano lycopene/resveratrol trong nước được đưa vào hệ thống máy sấy phun để thu bột nano lycopene/resveratrol có màu đỏ đậm.

Sản xuất hệ nano NLR1 với tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol là 1:2, có ưu điểm ở chỗ, sự tương hợp tốt của lycopene và resveratrol cho hệ nano có kích thước hạt trung bình là 66nm và sự phân bố kích thước hạt khá đồng đều.

Ví dụ 2: Phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol với sự có mặt của vitamin E (hệ nano NLR2)

Phương pháp sản xuất tương tự trong ví dụ 1. Tuy nhiên, hàm lượng chất bao bọc vi nang copolyme PLA-PEG giảm xuống còn 60g để bổ sung thêm 4g chất chống oxy hóa là vitamin E, sau đó tiến hành các bước tạo bột như ví dụ 1.

Khả năng tương hợp rất tốt giữa lycopene và vitamin E cho kết quả sau 3 tháng bảo quản hàm lượng lycopene còn lại là 95,6%. Vitamin E đóng vai trò là chất bảo vệ, giúp lycopene giảm được sự phân hủy bởi các tác nhân oxy hóa trong quá trình chế tạo cũng như bảo quản hệ nano.

Ví dụ 3: Sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol với tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol là 1:1 (hệ nano NLR3)

Phương pháp sản xuất tương tự như trong ví dụ 1. Hàm lượng hai hoạt chất thay đổi theo tỷ lệ 1:1 là 6g lycopene và 6g resveratrol. Hệ nano NLR3 thu được với tỷ lệ hàm lượng lycopene/resveratrol tăng so với hệ nano NLR1, do đó

sự phân bố kích thước hạt trong hệ NLR3 không đồng đều như NLR1 và kích thước hạt trung bình tăng lên là 79nm.

Ví dụ 4: Phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol với sự có mặt của vitamin E (hệ NLR4)

Phương pháp sản xuất tương tự như ví dụ 1. Tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol là 1:1 là 6g lycopene và 6g resveratrol, hệ NLR4 có thêm 4g chất chống oxy hóa vitamin E, theo đó lượng copolyme PLA-PEG giảm xuống là 60g. Ưu điểm của vitamin E có trong hệ NLR4 là nâng cao độ bền hệ nano so với hệ nano NLR3 không có sự tham gia của chất chống oxy hóa.

Ví dụ 5: Sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol với tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol là 2:1 (hệ nano NLR5)

Phương pháp sản xuất tương tự như trong ví dụ 1. Tuy nhiên, hàm lượng hai hoạt chất thay đổi theo tỷ lệ 2:1 là 8g lycopene và 4g resveratrol. Hệ nano NLR5 thu được có kích thước hạt trung bình là 102nm, sự phân bố kích thước hạt chưa thật đồng đều.

Ví dụ 6: Phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol với sự có mặt của vitamin E (hệ NLR6)

Phương pháp sản xuất tương tự như ví dụ 1. Tỷ lệ hàm lượng lycopene: resveratrol là 2:1, hệ NLR6 có thêm 4g chất chống oxy hóa vitamin E, theo đó hàm lượng copolyme PLA-PEG giảm xuống là 60g. Kết quả sau quá trình chế tạo, hệ nano NLR6 cho thấy rằng độ bền hoạt chất lycopene có trong hệ NLR6 cao hơn so với hệ NLR5 là 1,3%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol gồm hai thành phần lycopene và resveratrol có khả năng phân tán tốt trong nước với kích thước hạt nhỏ từ 66-102nm, bao gồm các bước:

a) tạo pha nội: trộn hoạt chất lycopene với resveratrol, sau đó bổ sung chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa và chất bao bọc vi nang copolyme polylactid-polyetylen glycol (PLA-PEG); hòa tan hỗn hợp này vào dung môi tetrahydrofuran sử dụng máy đồng nhất ở tốc độ 8400 vòng/phút trong 45 phút;

b) tạo dung dịch nano lycopene/resveratrol trong pha ngoại nước: bổ sung từ từ dung dịch pha nội vào nước cất trong điều kiện khuấy bằng máy khuấy đồng nhất tốc độ cao ở tốc độ 9000-10000 vòng/phút, khuấy trong 30 phút;

c) tạo bột hệ nano lycopene/resveratrol: dung dịch nano lycopene/resveratrol thu được nêu trên được đưa vào máy sấy phun, thu được sản phẩm dạng bột màu đỏ mịn.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt được sử dụng là lecithin, tween.

3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất chống oxy hóa là vitamin E.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lycopene và resveratrol được sử dụng với tỷ lệ lycopene: resveratrol là 1:2.

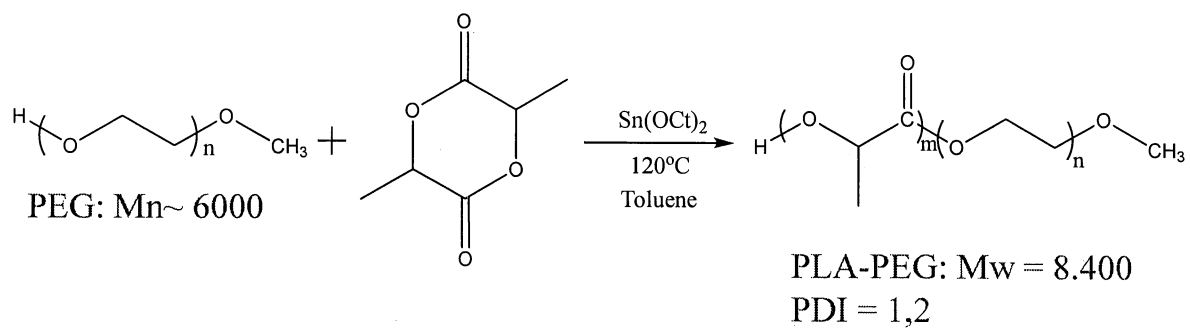
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lycopene và resveratrol được sử dụng với tỷ lệ lycopene: resveratrol là 1:1.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lycopene và resveratrol được sử dụng với tỷ lệ lycopene: resveratrol là 2:1.

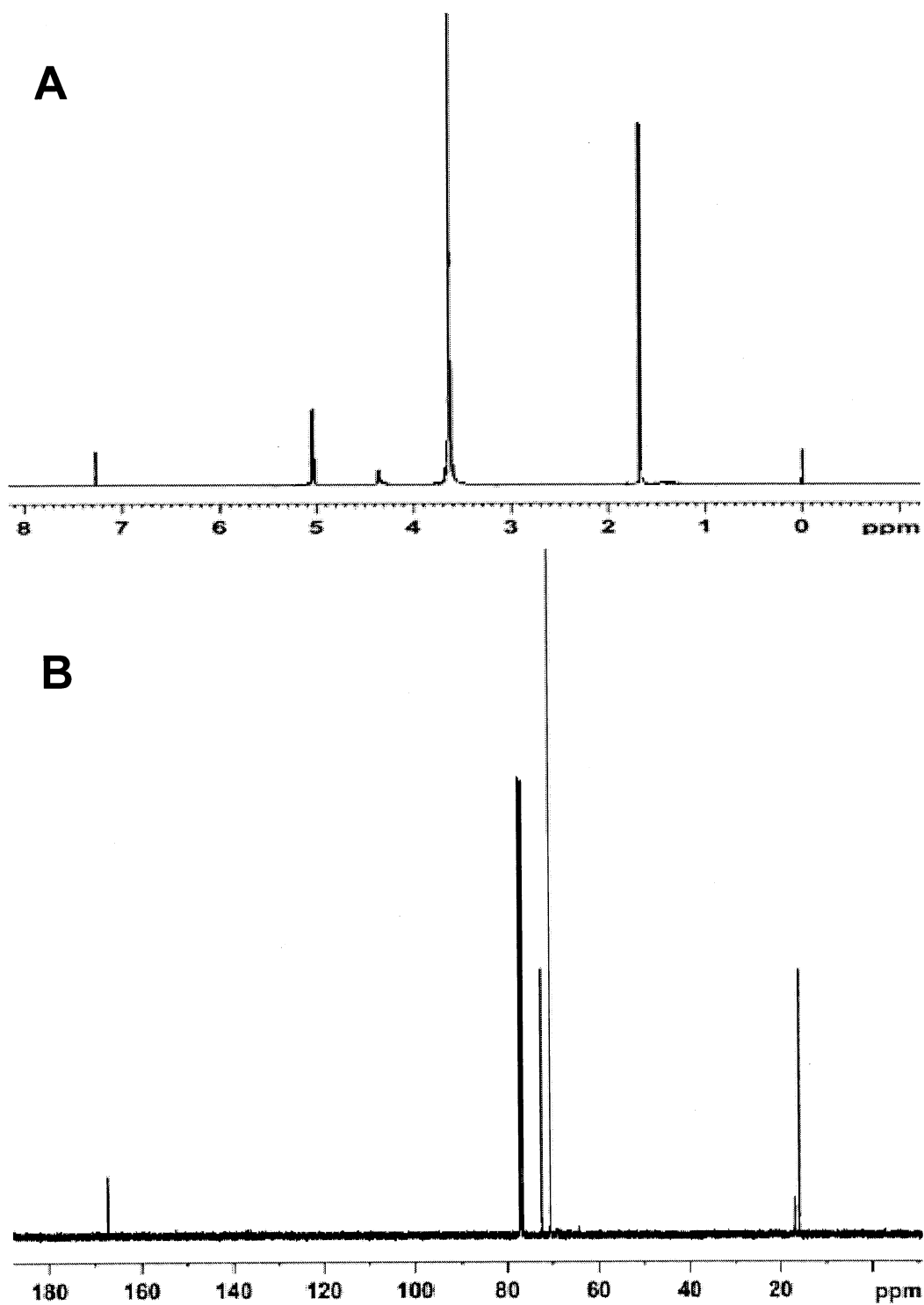
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lycopene được tách trực tiếp từ màng gấc và có độ tinh khiết trên 98%.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó resveratrol có độ tinh khiết trên 98%.

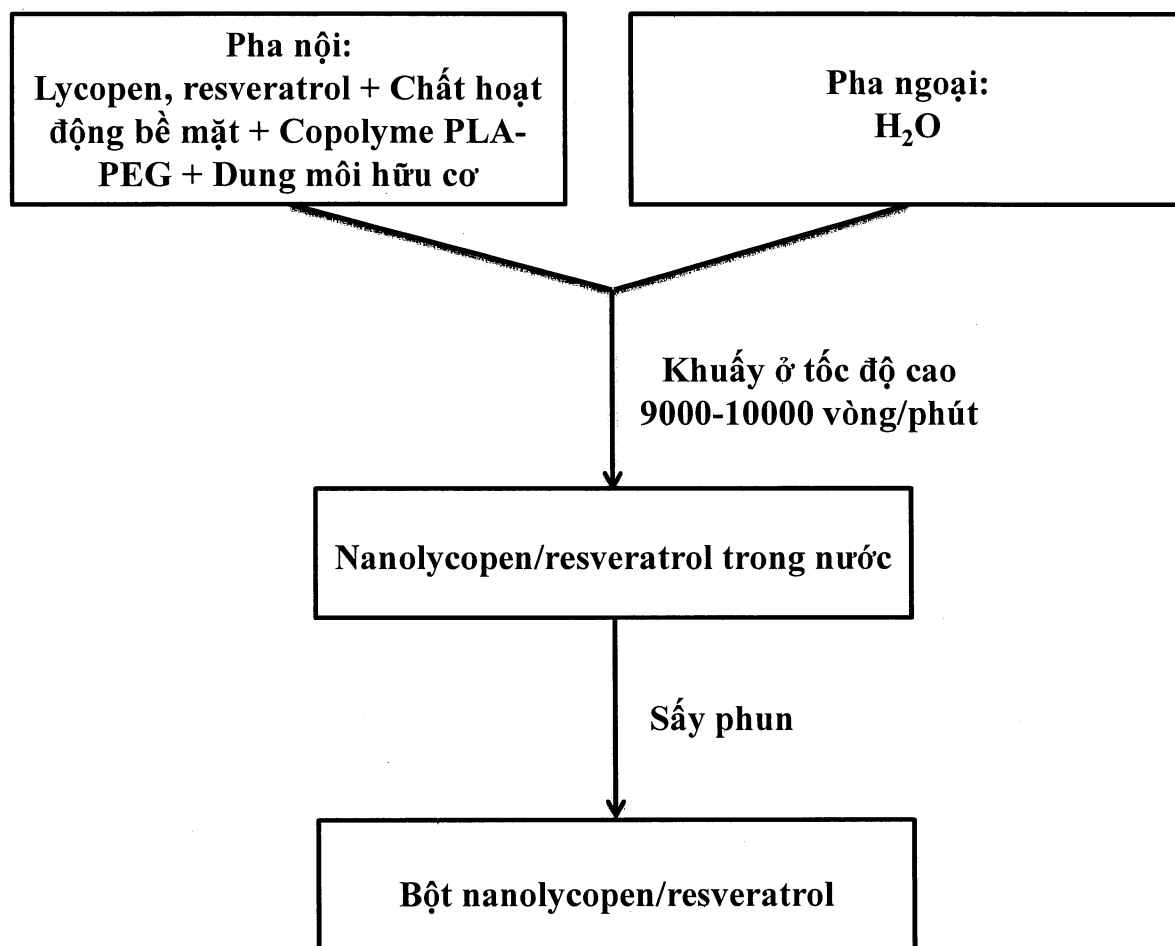
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất bao bọc vi nang copolyme PLA-PEG sử dụng trong phương pháp này được tổng hợp từ PEG-6000 và lactid trong hệ phản ứng với tỷ lệ mol là 1:20, môi trường khí trơ N_2 ; phản ứng được tiến hành trong dung môi toluen với sự có mặt của chất xúc tác $Sn(Oct)_2$; sản phẩm thu được được tinh chế hai lần trong hệ dung môi diclometan/hexan; và hệ nano lycopene/resveratrol thu được có độ ổn định cao, sau 3 tháng bảo quản ở $-16^\circ C$ duy trì được hàm lượng lycopene còn lại ở mức cao là 95,6%.



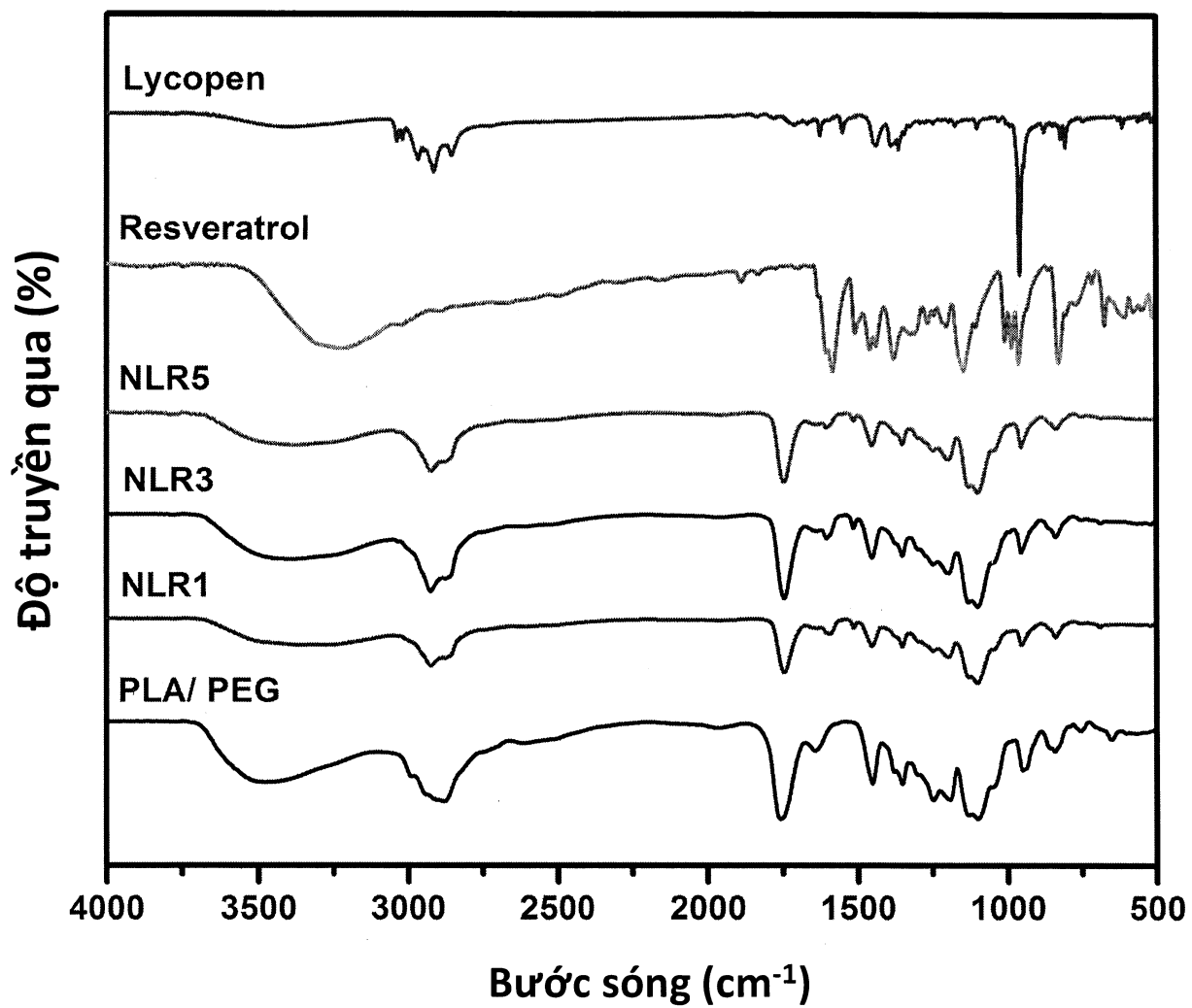
Hình 1. Sơ đồ tổng hợp copolyme PLA-PEG



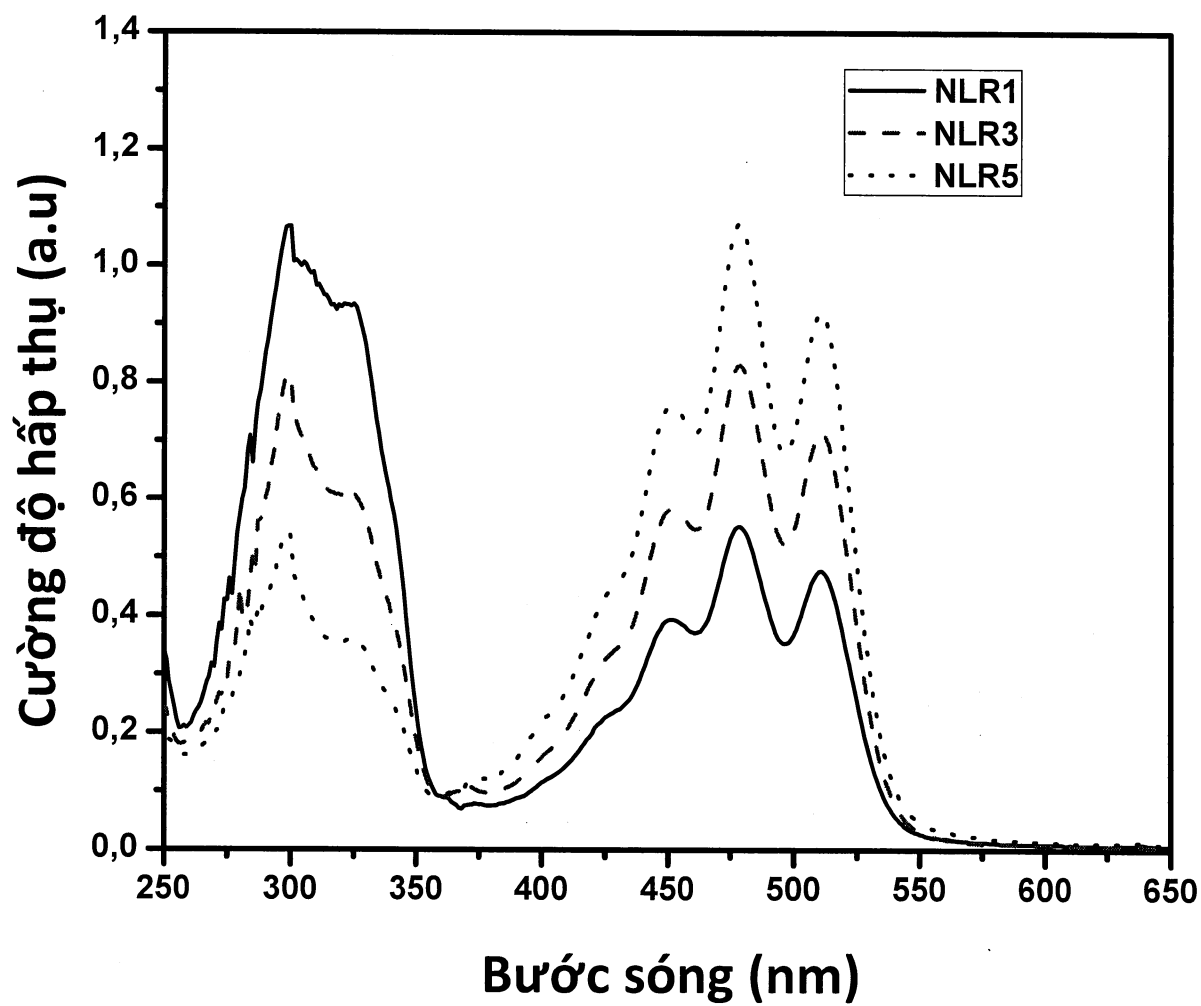
Hình 2. Phổ ^1H (A) và ^{13}C -NMR (B) của copolyme PLA-PEG



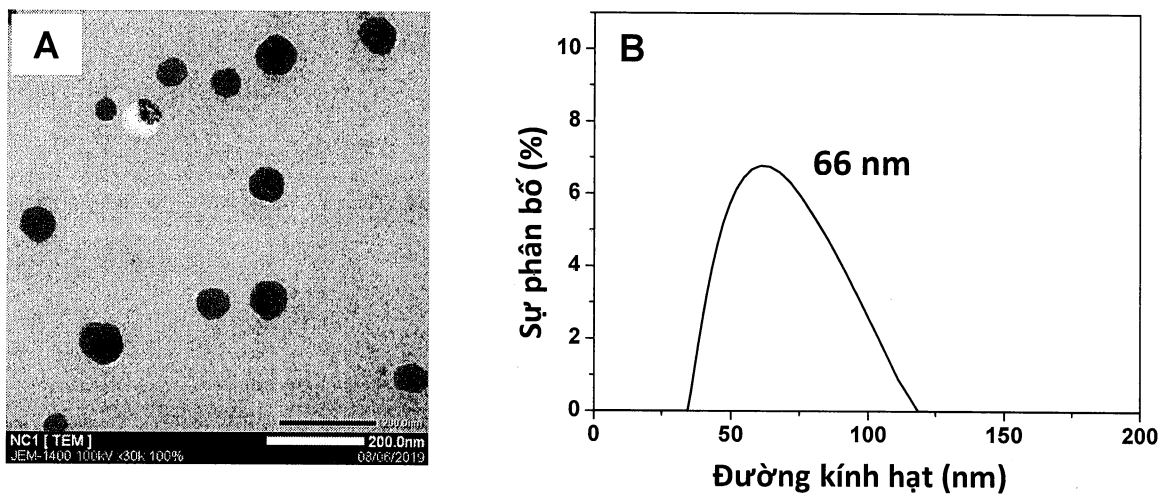
Hình 3. Sơ đồ quy trình sản xuất hệ nano lycopene/resveratrol



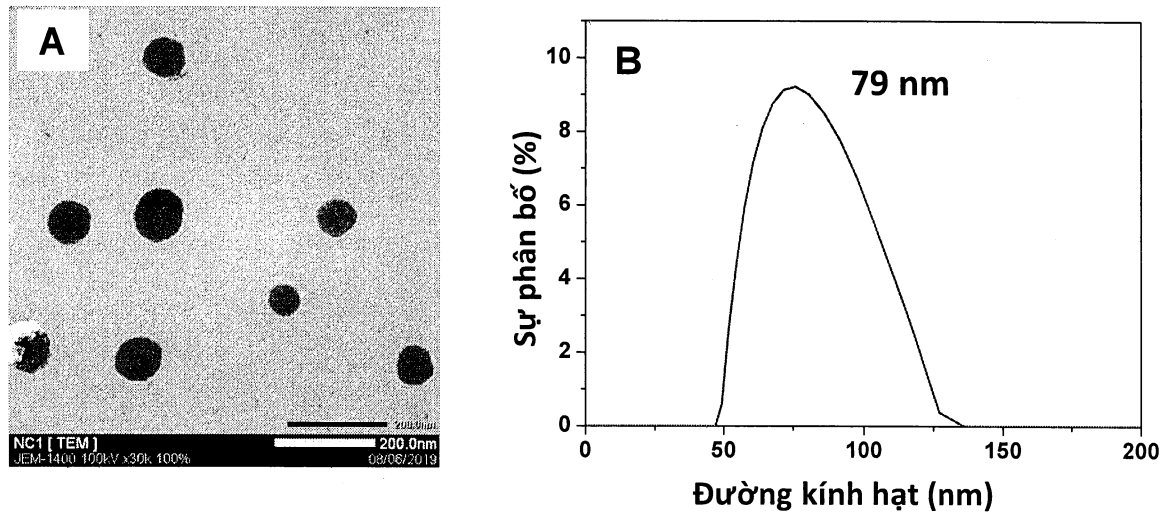
Hình 4. Phổ FT-IR của các mẫu bột lycopene/resveratrol



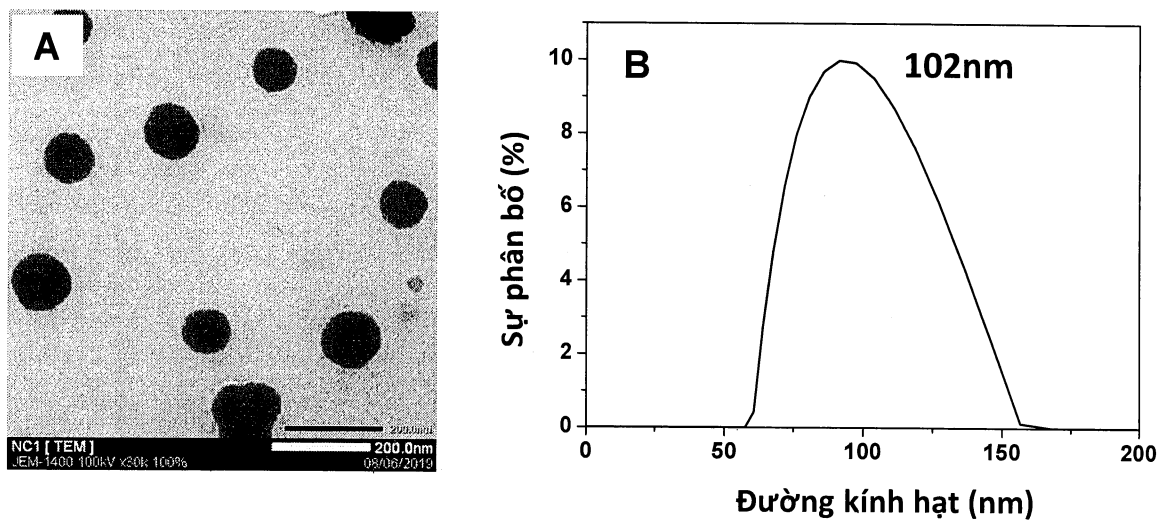
Hình 5. Phổ UV-Vis của các mẫu bột hệ nano lycopene/resveratrol



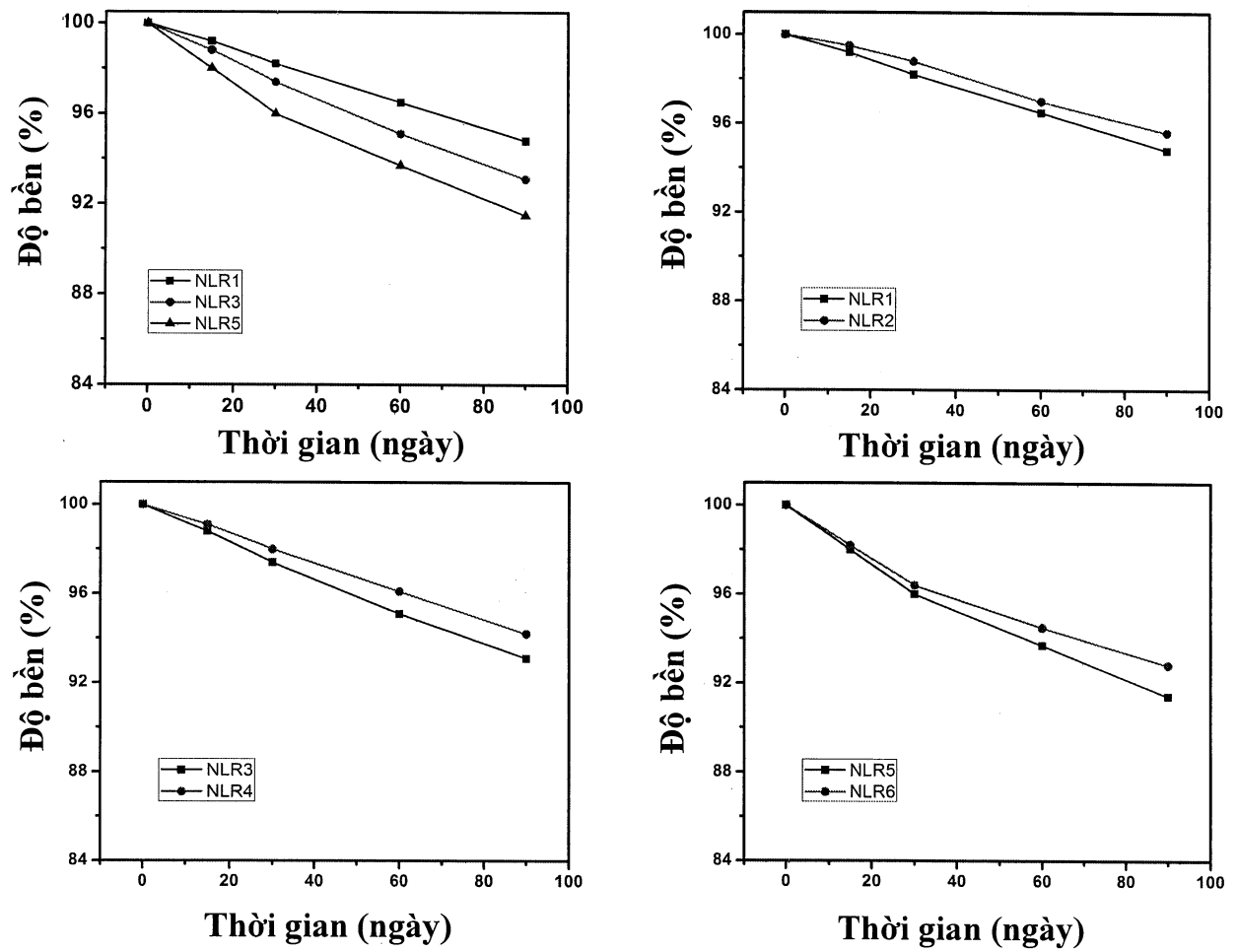
Hình 6. Ảnh TEM (A) và giản đồ phân bố kích thước hạt (B) của hệ nano lycopene/resveratrol (1/2)



Hình 7. Ảnh TEM (A) và giản đồ phân bố kích thước hạt (B) của hệ nano lycopene/resveratrol (1/1)



Hình 8. Ảnh TEM (A) và giản đồ phân bố kích thước hạt (B) của hệ nano lycopene/resveratrol (2/1)



Hình 9. Độ bền của lycopene trong hệ nano lycopene/resveratrol theo thời gian trong điều kiện bảo quản -16°C