



(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)



1-0029985

(51)⁷ A61K 35/74; A61K 9/14; A61K 36/63; (13) B
A61K 9/10; A61K 31/716; A61K 36/07

(21) 1-2016-03126 (22) 03/02/2015
(86) PCT/EP2015/052202 03/02/2015 (87) WO2015/114164 06/08/2015
(30) 14153705.0 03/02/2014 EP; PCT/EP2014/064449 07/07/2014 EP
(45) 25/11/2021 404 (43) 25/11/2016 344A
(73) APURANO PHARMACEUTICALS GMBH (DE)
Rabenkopfstraße 24a, 81545 Munich, Germany
(72) BRAND, Werner (DE).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ HỖN DỊCH NANO

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế hỗn dịch nano ổn định chứa ít nhất một nguyên liệu tự nhiên, bao gồm các bước sau: a. điều chế ít nhất một nguyên liệu tự nhiên có kích cỡ hạt (D_{100}) nhỏ hơn $320\mu\text{m}$; không phải là chiết xuất; b. phân tán ít nhất một nguyên liệu tự nhiên thu được ở bước a. trong dung môi; c. nghiền thể phân tán thu được ở bước b. đến kích cỡ hạt (D_{90}) nhỏ hơn 1000nm ($D_{90} < 1000\text{nm}$), trong đó ít nhất một nguyên liệu tự nhiên được phân tán trong bước b. ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 20% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng dung môi sử dụng trong hỗn dịch nano, và trong đó bước phân tán b. hoặc bước nghiền c. bao gồm công đoạn bổ sung chất ổn định; trong đó chất ổn định được chọn từ nhóm bao gồm phospholipit; polysorbat; hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza và polyvinylpyrrolidon; copolyme ba khối dạng không ion; copolyvinylpyrrolidon; caprylocaproyl polyoxyl-8 glyxerit; lauroyl polyoxyl-32 glyxerit; gelatin; lecithin (phosphatit); gôm acacia; cholesterol; tragacanth; polyoxyetylen alkyl ete; dẫn xuất dầu thầu dầu polyoxyetylen; este của axit béo và polyoxyetylen sorbitan; este của axit béo và sorbitan; polyetylen glycol; polyoxyetylen stearat; monoglyxerit và diglyxerit; silic dioxit dạng keo; natri dodecylsulfat; magie nhôm silicat; trietanolamin; axit stearic; canxi stearat; glyxerol monostearat; rượu xetostearylic; sáp nhũ hóa xetomacrogol; rượu mạch ngắn và mạch trung bình; oleoyl polyoxyl-6 glycerit; plurol oleique; propan-1,2,3-triol, rượu polyvinyllic và dioctyl natri sulfosuccinat; trong đó ít nhất một nguyên liệu tự nhiên được chọn từ nhóm bao gồm thực vật, vi khuẩn lam, tảo và nấm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế hỗn dịch nano từ nguyên liệu tự nhiên, hỗn dịch nano chứa ít nhất một nguyên liệu tự nhiên, thuốc chứa hỗn dịch nano này; và chế phẩm bổ sung dinh dưỡng chứa hỗn dịch nano này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các nguyên liệu tự nhiên, như thực vật, vi khuẩn lam, tảo hoặc nấm, chứa hoạt chất có hoạt lực điều trị bệnh. Để chiết xuất các hoạt chất này từ nguyên liệu tự nhiên, nhiều được phẩm đã biết bao gồm chế phẩm ngâm hoặc chế phẩm tắm rượu hoặc nước, chiết xuất bột khô ở dạng viên nén hoặc viên nang, hoặc chế phẩm tiêm truyền. Tuy nhiên, có nhiều nhược điểm liên quan đến việc sử dụng các loại thuốc này. Nhiều thành phần này bị phân hủy trong đường tiêu hóa hoặc bị chuyển hóa lần đầu ở gan. Ngoài ra, một số người khó nuốt viên tròn hoặc không thể dung nạp dạng thuốc rắn bất kỳ. Hơn nữa, nhiều hoạt chất của các nguyên liệu tự nhiên hòa tan kém trong nước. Do đó, hoạt lực và tác dụng điều trị bệnh của nhiều hoạt chất của các nguyên liệu tự nhiên bị hạn chế.

Patent Mỹ số 5,858,410 đề cập đến được phẩm “hỗn dịch nano” được điều chế bằng phương pháp đồng nhất hóa ở áp suất cao. Trước khi sử dụng phương pháp đồng nhất hóa ở áp suất cao, hỗn dịch nano được điều chế bằng quy trình nghiền bằng ngọc trai, là quy trình tốn thời gian hơn so với phương pháp đồng nhất hóa bằng áp suất. Kỹ thuật này cũng là đối tượng của Patent Mỹ số 5,271,944. Một số phương pháp khác đã được sử dụng để điều chế hỗn dịch nano với mức độ thành công khác nhau bao gồm phương pháp khuấy sử dụng năng lượng thấp, phương pháp khuấy bằng tuabin, phương pháp nghiền keo, phương pháp sử dụng sóng âm thanh, phương pháp sử dụng vòi phun, phương pháp nghiền với dung môi, phương pháp trộn sử dụng roto và stato và phương pháp siêu âm.

Đơn Patent Trung Quốc số CN 1 416 847 A đề cập đến phương pháp điều chế hỗn dịch nano chứa *Radix Panacis Quinquefolii* (Nhân sâm Mỹ) được điều chế bằng phương pháp đồng nhất hóa ở áp suất cao ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 11,1% (khối lượng/khối lượng).

Đơn Patent Châu Âu số EP 2 226 171 A1 đề cập đến phương pháp phân giải vật liệu gỗ (ví dụ gỗ linh sam (*Douglas fir*)) bằng cối xay để thu được sợi xenluloza có đường kính sợi trung bình cao nhất bằng 30nm và vật liệu kết hợp sợi xenluloza tương ứng được sản xuất từ sợi xenluloza này. Các sợi này có chiều dài trung bình bằng 50 μ m.

Đơn Patent Hàn Quốc số KR 2011 0 130 104 A đề cập đến phân bón hữu cơ chứa các hạt nano chứa tảo biển, bột vỏ của động vật có vỏ, zeolit và các khoáng chất khác, trong đó mỗi hạt khác nhau có thể được nghiền cho đến khi đạt được kích cỡ nằm trong khoảng từ 1nm đến 100nm.

Tuy nhiên, phương pháp điều chế hỗn dịch nano đã biết không bao gồm phương pháp điều chế hỗn dịch nano từ nguyên liệu tự nhiên chứa lượng lớn nguyên liệu tự nhiên, tức là nồng độ cao của nguyên liệu tự nhiên. Do đó, vẫn cần có phương pháp điều chế hỗn dịch nano từ nguyên liệu tự nhiên, hỗn dịch nano này có thể hữu ích trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến phương pháp điều chế hỗn dịch nano từ toàn bộ hoặc một phần nguyên liệu tự nhiên có thể được sử dụng trong bào chế thuốc.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế hỗn dịch nano ổn định chứa ít nhất một nguyên liệu tự nhiên, bao gồm các bước sau:

- a. điều chế ít nhất một nguyên liệu tự nhiên có kích cỡ hạt (D_{100}) nhỏ hơn 320 μ m; không phải là chiết xuất;
- b. phân tán ít nhất một nguyên liệu tự nhiên thu được ở bước a. trong dung môi;
- c. nghiền thể phân tán thu được ở bước b. đến kích cỡ hạt (D_{90}) nhỏ hơn 1000nm ($D_{90} < 1000\text{nm}$),

trong đó ít nhất một nguyên liệu tự nhiên được phân tán trong bước b. ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 20% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng dung môi sử dụng trong hỗn dịch nano, và trong đó bước phân tán b. hoặc bước nghiền c. bao gồm công đoạn bổ sung chất ổn định;

trong đó chất ổn định được chọn từ nhóm bao gồm phospholipit; polysorbat; hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza và polyvinylpyrrolidon;

copolyme ba khối dạng không ion; copolyvinylpyrrolidon; caprylocapropyl polyoxyl-8 glyxerit; lauraoyl polyoxyl-32 glyxerit; gelatin; lecithin (phosphatit); gôm acacia; cholesterol; tragacanth; polyoxyetylen alkyl ete; dẫn xuất dầu thầu dầu polyoxyetylen; este của axit béo và polyoxyetylen sorbitan; este của axit béo và sorbitan; polyetylen glycol; polyoxyetylen stearat; monoglyxertit và diglyxerit; silic dioxit dạng keo; natri dodexylsulfat; magie nhôm silicat; trietanolamin; axit stearic; canxi stearat; glyxerol monostearat; rượu xetostearylic; sáp nhũ hóa xetomacrogol; rượu mạch ngắn và mạch trung bình; oleoyl polyoxyl-6 glycerit; plurol oleique; propan-1,2,3-triol, rượu polyvinyllic và dioctyl natri sulfosuccinat; trong đó ít nhất một nguyên liệu tự nhiên được chọn từ nhóm bao gồm thực vật, vi khuẩn lam, tảo và nấm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hỗn dịch nano thu được từ phương pháp theo khía cạnh thứ nhất.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hỗn dịch nano theo khía cạnh thứ nhất để sử dụng trong bào chế thuốc để sử dụng qua khoang miệng, khu trú hoặc qua đường miệng cho động vật, tốt hơn là người, hoặc để sử dụng trong bào chế thuốc để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, tiêm vào nội tủy mạch, tiêm tĩnh mạch, qua da hoặc qua niêm mạc, tốt hơn nếu sử dụng qua khoang miệng, khu trú hoặc qua đường miệng, cho động vật, tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hỗn dịch nano theo khía cạnh thứ nhất để sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư, bệnh viêm ruột, bệnh viêm khớp, bệnh lây nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch ở người, các bệnh lây nhiễm virus khác, bệnh da liễu, như bệnh viêm da thần kinh hoặc bệnh vẩy nến, hoặc bệnh tự miễn, như bệnh xơ cứng rải rác. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hỗn dịch nano theo khía cạnh thứ nhất để bào chế thuốc.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện thiết bị hóa keo;

Fig.2 là đồ thị thể hiện kích cỡ hạt (D_{90}) của hỗn dịch nano điều chế từ lá ôliu ở năng lượng riêng được sử dụng để nghiền theo ví dụ 1.1;

Fig.3 là biểu đồ thể hiện khối lượng khô của chiết xuất và hỗn dịch nano điều chế từ lá ôliu theo ví dụ 1.3;

Fig.4 là đồ thị thể hiện kích cỡ hạt (D_{90}) của hỗn dịch nano điều chế từ *spirulina* ở năng lượng riêng được sử dụng để nghiền theo ví dụ 2.1;

Fig.5 là biểu đồ thể hiện khối lượng khô của chiết xuất và hỗn dịch nano điều chế từ *spirulina* theo ví dụ 2.3;

Fig.6 là đồ thị thể hiện kích cỡ hạt (D_{90}) của hỗn dịch nano điều chế từ *agaricus subrufescens* (ABM) ở năng lượng riêng được sử dụng để nghiền theo ví dụ 3.1 (đường nét đậm) và ví dụ 3.2 (đường nét đứt);

Fig.7 là đồ thị thể hiện kích cỡ hạt (D_{90}) của hỗn dịch nano điều chế từ *agaricus subrufescens* (ABM) ở năng lượng riêng được sử dụng để nghiền theo ví dụ 3.1 (đường nét đậm) và ví dụ 3.3 (đường nét đứt);

Fig.8 là biểu đồ thể hiện khối lượng khô của chiết xuất và hỗn dịch nano điều chế từ *agaricus subrufescens* (ABM) theo Ví dụ 3.5;

Fig.9 là biểu đồ thể hiện hàm lượng beta-glucan của hỗn dịch nano và các chiết xuất khác nhau điều chế từ *agaricus subrufescens*, so với bột *agaricus subrufescens* như được điều chế theo ví dụ 4.1.

Fig.10 là biểu đồ thể hiện tác dụng của phương pháp ổn định vật lý đối với hỗn dịch nano silic oxit được điều chế theo ví dụ 5.1.

Fig.11 là biểu đồ thể hiện tác dụng của phương pháp ổn định hóa học không sử dụng propan-1,2,3-triol đối với hỗn dịch nano điều chế từ *agaricus subrufescens* như được điều chế theo ví dụ 3.1.

Fig.12 là biểu đồ thể hiện tác dụng của phương pháp ổn định hóa học có sử dụng 20% (thể tích/thể tích) propan-1,2,3-triol đối với hỗn dịch nano điều chế từ *agaricus subrufescens* như được điều chế theo ví dụ 3.1.

Fig.13 là biểu đồ thể hiện tác dụng của phương pháp ổn định hóa học có 50% (thể tích/thể tích) propan-1,2,3-triol đối với hỗn dịch nano điều chế từ *agaricus subrufescens* như được điều chế theo ví dụ 3.1.

Fig.14 là đồ thị thể hiện khối lượng riêng (ví dụ, khối lượng mol trung bình) của beta-1,3/1,6-glucan của hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối

lượng) được điều chế theo ví dụ 3.1 và chiết xuất *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế theo ví dụ 3.4.

Fig.15 là biểu đồ thể hiện hàm lượng tương đối của bạch cầu đơn nhân biểu hiện dectin-1 (tính theo %) trong mẫu tế bào đơn nhân máu ngoại vi không được kích thích (PBMC - peripheral blood mononuclear cell), PBMC được kích thích bằng hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế theo ví dụ 3.1 và chiết xuất *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế theo ví dụ 3.4.

Fig.16 là biểu đồ thể hiện mức độ cảm ứng *in-vitro* xytokin TNF-alpha gây ra bởi hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế theo ví dụ 3.1 và chiết xuất *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế theo ví dụ 3.4.

Fig.17 là biểu đồ thể hiện mức độ cảm ứng *in-vitro* xytokin IL-10 gây ra bởi hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế theo ví dụ 3.1 và chiết xuất *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế theo ví dụ 3.4.

Fig.18 là biểu đồ thể hiện mức độ cảm ứng *in-vitro* xytokin IL-6 gây ra bởi hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế theo ví dụ 3.1 và chiết xuất *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế theo ví dụ 3.4.

Fig.19 là đồ thị thể hiện phân bố kích cỡ hạt của hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế theo ví dụ 3.1.

Fig.20 là đồ thị thể hiện phân bố kích cỡ hạt của hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) (như được điều chế theo ví dụ 12).

Fig.21 là biểu đồ thể hiện mức độ cảm ứng *in-vivo* tế bào T biểu hiện CD3 và CD25 hoạt hóa bởi CD25 gây ra bởi hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) (như được điều chế theo ví dụ 12) khi sử dụng theo đường uống.

Fig.22 là biểu đồ thể hiện mức độ cảm ứng *in-vivo* tế bào T biểu hiện CD3 và CD25 hoạt hóa bởi CD25 gây ra bởi bột *agaricus subrufescens* ở dạng viên nang uống.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế và phạm vi của sáng chế được xác định bởi bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo. Phần mô tả chi tiết sáng chế chỉ nhằm mục đích minh họa. Các phương án không thuộc các điểm yêu cầu bảo hộ này chỉ nhằm mục đích đối chiếu.

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế hỗn dịch nano ổn định chứa ít nhất một nguyên liệu tự nhiên, bao gồm các bước sau:

a. điều chế ít nhất một nguyên liệu tự nhiên có kích cỡ hạt (D_{100}) nhỏ hơn $320\mu\text{m}$; không phải là chiết xuất;

b. phân tán ít nhất một nguyên liệu tự nhiên thu được ở bước a. trong dung môi;

c. nghiền thể phân tán thu được ở bước b. đến kích cỡ hạt (D_{90}) nhỏ hơn 1000nm ($D_{90} < 1000\text{nm}$),

trong đó ít nhất một nguyên liệu tự nhiên được phân tán trong bước b. ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 20% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng dung môi sử dụng trong hỗn dịch nano, và trong đó bước phân tán b. hoặc bước nghiền c. bao gồm công đoạn bổ sung chất ổn định;

trong đó chất ổn định được chọn từ nhóm bao gồm phospholipit; polysorbat; hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza và polyvinylpyrrolidon; copolyme ba khối dạng không ion; copolyvinylpyrrolidon; caprylocaproyl polyoxyl-8 glyxerit; lauroyl polyoxyl-32 glyxerit; gelatin; lecithin (phosphatit); gôm acacia; cholesterol; tragacanth; polyoxyetylen alkyl ete; dẫn xuất dầu thầu dầu polyoxyetylen; este của axit béo và polyoxyetylen sorbitan; este của axit béo và sorbitan; polyetylen glycol; polyoxyetylen stearat; monoglyxerit và diglyxerit; silic dioxit dạng keo; natri dodecylsulfat; magie nhôm silicat; trietanolamin; axit stearic; canxi stearat; glyxerol monostearat; rượu xetostearyllic; sáp nhũ hóa xetomacrogol; rượu mạch ngắn và mạch trung bình; oleoyl polyoxyl-6 glyxerit; plurol oleique; propan-1,2,3-triol, rượu polyvinyllic và dioctyl natri sulfosuccinat; trong đó ít nhất một nguyên liệu tự nhiên được chọn từ nhóm bao gồm thực vật, vi khuẩn lam, tảo và nấm.

Sáng chế như mô tả dưới đây có thể được thực hiện trong trường hợp không có bất kỳ yếu tố hoặc các yếu tố, giới hạn hoặc các giới hạn không được bộc lộ cụ thể trong bản mô tả này.

Sáng chế sẽ được mô tả với các phương án cụ thể và một số hình vẽ kèm theo, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án và hình vẽ này cũng như bộ yêu cầu bảo hộ. Các thuật ngữ được đề cập dưới đây được hiểu theo nghĩa thông thường của chúng trừ khi có quy định khác.

Khi thuật ngữ “chứa” được sử dụng trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ của sáng chế, nó không loại trừ các yếu tố khác. Thuật ngữ “bao gồm” được xem là phương án ưu tiên của thuật ngữ “chứa”. Sau đây, nếu một nhóm được xác định để chứa ít nhất một số phương án cụ thể, thì điều này cũng cần được hiểu là để bộc lộ một nhóm, mà tốt hơn nếu chỉ bao gồm các phương án này.

Trong trường hợp mạo từ bất định hay xác định được sử dụng khi đề cập đến danh từ số ít, tức là “a”, “an” hoặc “the”, mạo từ này cũng bao gồm danh từ số nhiều trừ khi có quy định khác.

Thuật ngữ “có thể thu được” hoặc “có thể xác định” và “thu được” hoặc “xác định” được sử dụng thay cho nhau. Thuật ngữ này có nghĩa là, trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “thu được” không có nghĩa là để chỉ, ví dụ phương án phải thu được bằng, ví dụ trình tự các bước theo sau thuật ngữ “thu được” mặc dù đó là một sự hiểu biết hạn chế luôn luôn bao gồm bởi thuật ngữ “thu được” hoặc “xác định” là phương án ưu tiên.

Thuật ngữ “hỗn dịch nano” được dùng trong bản mô tả để chỉ hỗn dịch chứa hạt nano trong dung môi, ví dụ nước, etanol, hoặc hỗn hợp của chúng. Hỗn dịch nano có thể còn chứa chất ổn định, hoặc các hợp chất khác. Hỗn dịch nano chứa hợp chất hòa tan ít trong nước ở dạng hạt nano được tạo hỗn dịch trong dung môi. Hỗn dịch nano này được sử dụng để tăng cường “độ hòa tan” (hoặc độ phân tán) của hợp chất hòa tan ít trong dung môi, môi trường lipit, hoặc cả hai. Khi “độ hòa tan” tăng, thì nồng độ cao hơn trong huyết tương của hợp chất kém hòa tan đạt được và nồng độ cực đại trong huyết tương của hợp chất đạt được nhanh hơn. Thuật ngữ “hỗn dịch” và “thể phân tán” được sử dụng thay cho nhau trong sáng chế, khi chỉ hạt rắn trong dung môi.

Thuật ngữ “hạt nano” được dùng trong bản mô tả để chỉ hạt có kích cỡ hạt nhỏ hơn 1000nm. Hạt nano chứa hợp chất trong dung môi có thể là hạt sơ cấp, hoặc hạt tích tụ chứa hạt có kích cỡ nhỏ hơn. Kích cỡ hạt trong hỗn dịch nano có thể được đo bằng thiết bị phân tích nhiễu xạ laze (ví dụ Beckman Coulter LS 13320 hoặc Horiba LA-950).

Thuật ngữ “độ hòa tan” hoặc “giới hạn độ hòa tan” của nguyên liệu tự nhiên được dùng trong bản mô tả để chỉ hàm lượng tối đa của nguyên liệu tự nhiên có thể hòa tan trong dung môi. Theo sáng chế, độ hòa tan của nguyên liệu tự nhiên trong dung môi đặc hiệu có thể được xác định như sau: hàm lượng ban đầu của nguyên liệu tự nhiên khô có kích cỡ hạt $D_{90} < 320\mu\text{m}$ được sử dụng để điều chế hỗn dịch chứa nguyên liệu tự nhiên trong dung môi, như nước cất, ở hàm lượng bằng 5% hoặc 10% (khối lượng/khối lượng). Để điều chế hỗn dịch này, nguyên liệu tự nhiên được tạo hỗn dịch trong 60 phút trong dung môi ở nhiệt độ 30°C. Sau đó, hỗn dịch thu được được ly tâm ở tốc độ 1500g trong 30 phút, và chất kết tủa được phân tách ra khỏi dịch nổi và cân để kiểm soát. Dịch nổi được sấy ở nhiệt độ 60°C trong 24 giờ, dẫn đến nguyên liệu tự nhiên được hòa tan trong dịch nổi (tính theo khối lượng khô), và cân. Độ hòa tan được tính toán bằng phương trình sau:

Độ hòa tan (%) = khối lượng của dịch nổi (tính theo khối lượng khô) x 100/khối lượng ban đầu của bột nguyên liệu tự nhiên (tính theo khối lượng khô).

Thuật ngữ “chỉ số hòa tan” được dùng trong bản mô tả để chỉ lượng nguyên liệu tự nhiên trong hỗn dịch nano theo sáng chế so với độ hòa tan hoặc giới hạn độ hòa tan của nguyên liệu tự nhiên trong dung môi sử dụng để điều chế hỗn dịch nano. Chỉ số hòa tan là lượng nguyên liệu tự nhiên có trong hỗn dịch nano (tính theo % (khối lượng/khối lượng)) chia cho độ hòa tan của nguyên liệu tự nhiên trong dung môi sử dụng. Nói cách khác, khi chỉ số hòa tan bằng 1, giới hạn độ hòa tan của nguyên liệu tự nhiên trong dung môi đạt được. Khi chỉ số hòa tan nhỏ hơn 1, lượng nguyên liệu tự nhiên trong hỗn dịch nano nhỏ hơn giới hạn độ hòa tan, và chỉ số hòa tan cao hơn 1 cho thấy rằng lượng nguyên liệu tự nhiên hòa tan trong dung môi có trong hỗn dịch nano cao hơn, tức là hàm lượng của nguyên liệu tự nhiên trong hỗn dịch nano cao hơn giới hạn độ hòa tan của nó.

Thuật ngữ “sợi xenluloza” được dùng trong bản mô tả để chỉ sợi thực vật (đặc biệt là sợi gỗ) chứa polysaccarit với chuỗi mạch thẳng gồm vài trăm đến hơn mười nghìn đơn vị beta-1,4-D-glucoza với chiều dài sợi > 1µm. Do đó, sợi xenluloza không chứa beta-

1,3/1,6-glucan có dạng hình cầu với đường kính $< 1\mu\text{m}$ hoặc hình elip có chiều dài bán trục $< 1\mu\text{m}$.

Theo phương án ưu tiên, ít nhất một nguyên liệu tự nhiên được chọn từ nhóm bao gồm thực vật, tốt hơn nếu thực vật không bao gồm nhân sâm và/hoặc sợi xenluloza, vi khuẩn lam, tảo và nấm. Theo phương án khác, nguyên liệu tự nhiên không bao gồm nhân sâm và/hoặc sợi xenluloza. Thực vật theo sáng chế có thể bao gồm thực vật có hạt, ví dụ lớp bạch quả (cây bạch quả), ngành dây gắm, thực vật lá kim, quả nón (ví dụ cây lá kim) và thực vật hạt kín (thực vật có hoa), ví dụ các phân lớp, như phân lớp ngọc lan, phân lớp hành (ví dụ dứa), bộ sơ ri (ví dụ cây cỏ ban, vỏ cây liễu trắng), phân lớp hoa hồng (ví dụ cây tầm ma), thực vật họ cải (ví dụ đu đủ), bộ đậu (ví dụ cây đậu ván đại), bộ bạc hà (ví dụ cây ôliu và lá ôliu), bộ tực đoạn (ví dụ cây cơm cháy). Vi khuẩn lam có thể bao gồm *spirulina*. Tảo có thể bao gồm *domains rhodobionta* (ví dụ tảo đỏ, tảo nâu và tảo silic), tảo lục và *glaucobionta*. Nấm có thể bao gồm *acrasobionta*, *myxomycota*, *heterokontobionta*, và *mycobionta* (ví dụ nấm trụ, như *agaricus subrufescens*).

Theo phương án ưu tiên khác, nguyên liệu tự nhiên là cây bạch quả, dứa, cây cỏ ban, vỏ cây liễu trắng, cây tầm ma, đu đủ, cây đậu ván đại, lá ôliu, cây cơm cháy, *spirulina*, tảo lục *chlorella*, tảo đỏ, tảo nâu và tảo silic tảo lục và *glaucobionta*, *agaricus subrufescens*, cây nhũ hương, cây rễ vàng, vỏ cây canhkina, cây ipeca, cây mần tưới, cây nhăng, rễ chàm, cây nghệ, cây móng quỳ, cây móng mèo, *cystus incanus*, hạt lanh, *sylibum marianum* (cây kế sữa), *chelidonium majus* (cây bạch khuất hai lá lớn), cây quỳ thiên trúc (*kaplan-pelargonie*), cây cúc đại, hạt nho.

Theo phương án ưu tiên khác, nguyên liệu tự nhiên không bao gồm nhân sâm và/hoặc sợi xenluloza.

Theo phương án ưu tiên khác, ít nhất một nguyên liệu tự nhiên là bộ phận hoặc toàn bộ nguyên liệu tự nhiên, tốt hơn nếu toàn bộ nguyên liệu tự nhiên. Phương pháp theo sáng chế có thể sử dụng nguyên liệu tự nhiên bất kỳ dưới dạng toàn bộ, hoặc các bộ phận của chúng. Ví dụ, chỉ các bộ phận của thực vật có thể được sử dụng, như rễ, thân, lá, quả, hoa, hoặc các bộ phận tương tự, phụ thuộc vào loại nguyên liệu tự nhiên.

Theo phương án ưu tiên khác, hỗn dịch nano chứa hỗn hợp của ít nhất hai nguyên liệu tự nhiên. Do đó, hỗn dịch nano có thể là hỗn dịch nano chứa một nguyên liệu tự

nhiên, hoặc hỗn hợp chứa nhiều hơn một nguyên liệu tự nhiên, tức là ít nhất hai nguyên liệu tự nhiên. Hỗn dịch nano cũng có thể còn chứa các bộ phận khác nhau của cùng nguyên liệu tự nhiên, tức là các bộ phận của rễ và bộ phận của hoa, và/hoặc hỗn dịch nano có thể bao gồm các loại khác nhau của các nguyên liệu tự nhiên, tức là thực vật khác hoặc thực vật và vi khuẩn lam.

Theo phương án ưu tiên khác, nguyên liệu tự nhiên được sử dụng trong điều chế hỗn dịch nano được sấy ở bước a.1, trước khi thực hiện bước a., tốt hơn nếu được sấy đông khô và/hoặc sấy nhiệt.

Theo phương án ưu tiên khác, nguyên liệu tự nhiên được sử dụng trong điều chế hỗn dịch nano thu được ở bước a. của phương pháp nêu trên có hàm lượng nước w nhỏ hơn 15% ($w < 15\%$), tốt hơn nếu nhỏ hơn 12% ($w < 12\%$), tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 10% ($w < 10\%$), và tốt nhất nếu nhỏ hơn 8% ($w < 8\%$).

Tốt hơn nếu nguyên liệu tự nhiên được sử dụng trong điều chế hỗn dịch nano theo sáng chế có hàm lượng nước thấp. Thuật ngữ “hàm lượng nước” hoặc “hàm lượng ẩm dư” được dùng trong bản mô tả để chỉ hàm lượng nước w của nguyên liệu, như nguyên liệu tự nhiên, được tính toán từ khối lượng của nguyên liệu ẩm hoặc ướt $m_{ướt}$ và khối lượng của nguyên liệu khô không chứa nước $m_{khô}$ và khối lượng của nguyên liệu có hàm lượng ẩm dư m_{dur} bằng cách sử dụng công thức sau: hàm lượng ẩm dư [%] $w = (m_{dur} - m_{khô}) / (m_{ướt} - m_{khô}) * 100\%$

Hàm lượng nước thấp như vậy có thể có lợi khi điều chế hỗn dịch nano. Ngoài ra, có thể hữu ích khi đưa nguyên liệu tự nhiên đến kích cỡ hạt (D_{100}) nhỏ hơn $320\mu\text{m}$. Nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để giảm hàm lượng nước của nguyên liệu tự nhiên, phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này có thể được sử dụng kết hợp với sáng chế. Ví dụ, nguyên liệu tự nhiên có thể được đông khô (tức là, sấy đông khô) hoặc sấy nhiệt. Có thể có lợi để làm sạch, gọt vỏ và/hoặc tách lõi nguyên liệu tự nhiên, phụ thuộc vào loại nguyên liệu tự nhiên trước khi thực hiện bước sấy. Ví dụ cụ thể về hai phương pháp sấy được mô tả dưới đây.

Các nguyên liệu tự nhiên có thể được sấy đông khô bằng máy đông khô, tức là theo quy trình 4-bước như sau:

Nguyên liệu tự nhiên được cắt thành các miếng nhỏ có kích cỡ khoảng 1 đến 2cm bằng dao phụ thuộc vào kích cỡ và cấu trúc của nguyên liệu tự nhiên;

Các mảnh có kích cỡ 1 đến 2cm được đặt trong máy phay (ví dụ Grindomix® 200 hoặc 300 do Retsch GmbH, Germany cung cấp) và nghiền theo các thông số sau: 10 giây ở tốc độ 2000 vòng/phút, tiếp theo 10 giây ở tốc độ 5000 vòng/phút và giai đoạn cuối 20 giây ở tốc độ 10000 vòng/phút;

Bột nghiền thu được được kết đông ở nhiệt độ -18°C trong 4 giờ và tiếp tục đặt vào máy đông khô và đông khô cho đến khi nhiệt độ sản phẩm là 20°C.

Cần hiểu rằng quy trình đông khô nêu trên không bị giới hạn cụ thể, và chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này có thể thay đổi quy trình này, phụ thuộc vào loại nguyên liệu tự nhiên. Ví dụ, vi khuẩn lam có thể được sấy đông khô trực tiếp, không cần nghiền hoặc cắt trước. Tương tự, các thông số để cắt các mảnh trong máy phay cũng có thể được điều chỉnh theo nhu cầu.

Các nguyên liệu tự nhiên cũng có thể được sấy khô trong không khí hoặc trong lò ở nhiệt độ, ví dụ nằm trong khoảng từ 36°C đến 45°C cho đến khi hàm lượng ẩm dư nhỏ hơn 8%, phụ thuộc vào độ nhạy nhiệt của các hợp chất trong nguyên liệu tự nhiên.

Theo phương án ưu tiên khác, nguyên liệu tự nhiên được sử dụng trong điều chế hỗn dịch nano thu được ở bước a. của phương pháp nêu trên được nghiền thô trước và/hoặc sau khi sấy ở bước a.1, tốt hơn nếu trong máy phay, và tùy ý được sàng đến kích cỡ hạt (D_{100}) nhỏ hơn 320 μ m. Bước nghiền nguyên liệu tự nhiên có thể được thực hiện với nguyên liệu tự nhiên nguyên vẹn, tức là không cần cắt hoặc sấy trước, hoặc nguyên liệu tự nhiên có thể được cắt thành các miếng và/hoặc sấy như mô tả nêu trên. Ngoài ra, nguyên liệu tự nhiên có thể được sàng để thu được bột nguyên liệu tự nhiên có kích cỡ hạt (D_{100}) nhỏ hơn 320 μ m.

Ví dụ về phương pháp nghiền thô và sàng nguyên liệu tự nhiên đã được sấy đông khô như sau:

Bột nguyên liệu tự nhiên đã được sấy đông khô được đặt trong máy phay (ví dụ Grindomix® 200 hoặc 300 do Retsch GmbH, Germany cung cấp) và nghiền theo các thông số sau: 10 giây ở tốc độ 2000 vòng/phút, tiếp theo 10 giây ở tốc độ 5000 vòng/phút và giai đoạn cuối 20 giây ở tốc độ 10000 vòng/phút;

Bột nguyên liệu tự nhiên thu được từ máy phay được sàng bằng sàng có kích cỡ mắt sàng bằng 320 μ m;

Các hạt nguyên liệu tự nhiên có kích cỡ lớn hơn 320 μ m được đặt một lần nữa vào máy phay để tiếp tục nghiền, sau đó sàng bằng sàng có kích cỡ mắt sàng bằng 320 μ m. Bột thừa của bước nghiền thứ hai hoặc thứ ba có thể được loại bỏ.

Tương tự, ví dụ về phương pháp nghiền thô và sàng nguyên liệu tự nhiên đã được sấy nhiệt như sau:

Nguyên liệu tự nhiên đã được sấy nhiệt được cắt thành các miếng nhỏ có kích cỡ khoảng 1 đến 2cm bằng dao;

Các mảnh có kích cỡ 1 đến 2cm được đặt trong máy phay (ví dụ Grindomix[®] 200 hoặc 300 do Retsch GmbH, Germany cung cấp) và nghiền theo các thông số sau: 10 giây ở tốc độ 2000 vòng/phút, tiếp theo 10 giây ở tốc độ 5000 vòng/phút và giai đoạn cuối 20 giây ở tốc độ 10000 vòng/phút;

Bột nguyên liệu tự nhiên thu được từ máy phay được sàng bằng sàng có kích cỡ mắt sàng bằng 320 μ m;

Các hạt nguyên liệu tự nhiên có kích cỡ lớn hơn 320 μ m được đặt một lần nữa vào máy phay để tiếp tục nghiền, sau đó sàng bằng sàng có kích cỡ mắt sàng bằng 320 μ m. Bột thừa của bước nghiền thứ hai hoặc thứ ba có thể được loại bỏ.

Ít nhất một nguyên liệu tự nhiên có kích cỡ hạt (D_{100}) nhỏ hơn 320 μ m thu được ở bước a. được phân tán trong dung môi ở bước b. bằng phương pháp theo sáng chế.

Theo phương án ưu tiên khác, dung môi là nước, tốt hơn nếu nước cất, hoặc hỗn hợp nước và etanol.

Nước được sử dụng làm dung môi có thể là loại nước bất kỳ, như nước thường, nước tinh khiết, nước cất, nước cất hai lần hoặc nước cất ba lần, hoặc nước khử khoáng. Tương tự, etanol cũng được sử dụng có thể là etanol thường, hoặc hỗn hợp nước và etanol. Do đó, hỗn dịch nano thu được có thể là hỗn dịch nano chứa nước, hoặc hỗn dịch nano chứa etanol, hoặc hỗn dịch nano chứa hỗn hợp nước và etanol, hoặc dung môi bất kỳ hoặc hỗn hợp dung môi khác. Thuật ngữ “dung môi” được dùng trong bản mô tả để

chỉ một dung môi hoặc hỗn hợp dung môi. Tốt hơn nếu, dung môi là dung môi được dùng khi hỗn dịch nano được sử dụng làm thuốc.

Theo phương án ưu tiên khác, hỗn dịch nano là hỗn dịch nano chứa nước hoặc hỗn dịch nano chứa hỗn hợp nước và etanol.

Khi phân tán nguyên liệu tự nhiên ở bước b. trong dung môi, nguyên liệu tự nhiên có hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 20% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng dung môi sử dụng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 2% đến 10% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 2% đến 5% (khối lượng/khối lượng) hoặc nằm trong khoảng từ 5% đến 10% (khối lượng/khối lượng). Theo phương án ưu tiên khác, nguyên liệu tự nhiên, tốt hơn nếu có hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 70% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng dung môi sử dụng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 40% đến 70% (khối lượng/khối lượng), hoặc nằm trong khoảng từ 10% đến 40% (khối lượng/khối lượng). Hàm lượng của nguyên liệu tự nhiên tính theo % (khối lượng/khối lượng) được tính theo tổng hàm lượng dung môi sử dụng để điều chế hỗn dịch nano. Ví dụ, 50g bột của nguyên liệu tự nhiên cộng với 1000g dung môi, hỗn dịch nano 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế. Với khoảng nồng độ này, bước nghiền tiếp theo hỗn dịch thành hỗn dịch nano được thực hiện dễ dàng. Thê phân tán này có thể được điều chế bằng cách khuấy dung môi và nguyên liệu tự nhiên, ví dụ bằng máy khuấy từ hoặc thiết bị khuấy bất kỳ khác, tốt hơn nếu với tốc độ lên đến 1000 vòng/phút.

Do đó, theo phương án ưu tiên khác, ít nhất một nguyên liệu tự nhiên được phân tán trong bước b. ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 20% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng dung môi sử dụng trong hỗn dịch nano, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 2% đến 10% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 2% đến 5% (khối lượng/khối lượng) hoặc nằm trong khoảng từ 5% đến 10% (khối lượng/khối lượng).

Theo phương án đặc biệt ưu tiên, ít nhất một nguyên liệu tự nhiên có trong hỗn dịch nano ở hàm lượng tạo ra chỉ số hòa tan cao hơn 0,4, hoặc cao hơn 0,5, hoặc cao hơn 0,8, hoặc cao hơn 1, hoặc thậm chí cao hơn 1,1.

Tốt hơn nếu, hỗn dịch nano được ổn định bằng cách sử dụng chất ổn định. Chất ổn định có thể được chọn từ nhóm bao gồm phospholipit, polysorbat, propan-1,2,3-triol

(glyxerin), chất ổn định tĩnh điện hoặc không gian và chất hoạt động bề mặt. Chất ổn định có thể được bổ sung vào thể phân tán ở bước b., hoặc trong bước nghiền c., hoặc thậm chí sau bước nghiền c. Tốt hơn nếu một số chất ổn định được bổ sung vào hỗn dịch nano, tốt hơn nếu trong bước phân tán b., như phospholipit, chất hoạt động bề mặt dạng không ion và chất nhũ hóa, tức là polysorbat. Tốt hơn nếu các chất ổn định khác được bổ sung trong bước nghiền c., như copolyme ba khối dạng không ion, như poloxame. Thậm chí tốt hơn nếu các chất ổn định khác được bổ sung sau bước nghiền c., như propan-1,2,3-triol hoặc dioctyl natri sulfosuccinat. Khi chất ổn định được bổ sung trong bước phân tán b., tốt hơn nếu bổ sung chất ổn định ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 50% lên đến 200% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng của nguyên liệu tự nhiên, đặc biệt khi chất ổn định là phospholipit. Khi chất ổn định là chất hoạt động bề mặt dạng không ion hoặc chất nhũ hóa, như polysorbat, tốt hơn nếu chất ổn định được bổ sung ở hàm lượng lên đến 1,5% (khối lượng/khối lượng), tính theo hàm lượng dung môi. Trong quá trình nghiền ở bước c., khi kích cỡ hạt riêng (D_{90}) nằm trong khoảng từ $2\mu\text{m}$ lên đến $10\mu\text{m}$ đã đạt được, hoặc khi kích cỡ hạt (D_{90}) không tiếp tục giảm trong bước nghiền c., ví dụ ít nhất bằng 4% trong 1 giờ nghiền, hoặc khi kích cỡ hạt (D_{90}) tăng trong bước nghiền c. ít nhất bằng 10% trong 1 giờ nghiền, tốt hơn nếu bổ sung chất ổn định, như copolyme ba khối dạng không ion, như poloxame.

Theo phương án ưu tiên, chất ổn định được chọn từ nhóm bao gồm phospholipit; polysorbat; hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza và polyvinylpyrrolidon; copolyme ba khối dạng không ion, như poloxame (ví dụ, Kolliphor[®] P407 hoặc poloxame 188); copolyvinylpyrrolidon; Labrasol[®]; Gelucire[®]; gelatin; lecithin (phosphatit); gôm acacia; cholesterol; tragacanth; polyoxyetylen alkyl ete; dẫn xuất dầu thầu dầu polyoxyetylen; este của axit béo và polyoxyetylen sorbitan; este của axit béo và sorbitan; polyetylen glycol; polyoxyetylen stearat; monoglyxerit và diglyxerit; silic dioxid dạng keo; natri dodexylsulfat; magie nhôm silicat; trietanolamin; axit stearic; canxi stearat; glyxerol monostearat; rượu xetostearylic; sáp nhũ hóa xetomacrogol; rượu mạch ngắn và mạch trung bình; Labrafil[®]; Purol-oleique[®]; propan-1,2,3-triol, rượu polyvinylic và dioctyl natri sulfosuccinat. Ví dụ ưu tiên về polysorbat là polysorbat 80 và polysorbat 20. Tốt hơn nữa nếu chất ổn định được chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 80, polysorbat 20, Kolliphor[®] P407 và poloxame 188. Theo phương án đặc biệt ưu tiên, chất

ổn định là Kolliphor® P407, hoặc polysorbat 80, như Tween® 80. Theo phương án ưu tiên khác, bước phân tán b. bao gồm bước bổ sung chất ổn định được chọn từ nhóm bao gồm phospholipit và polysorbat.

Theo phương án ưu tiên khác, bước phân tán b. bao gồm bước bổ sung polysorbat ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 2% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng dung môi sử dụng trong hỗn dịch nano, và/hoặc polysorbat được chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 80 và polysorbat 20.

Theo phương án ưu tiên khác, bước phân tán b. bao gồm bước bổ sung phospholipit ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 100% đến 200% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn nếu với hàm lượng bằng 130% đến 170% (khối lượng/khối lượng), tính theo hàm lượng nguyên liệu tự nhiên, tốt hơn nếu phospholipit chứa phosphatidylcholin ở hàm lượng lên đến 95% (khối lượng) và lysophosphatidylcholin ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 30% (khối lượng). Tốt hơn nếu, phospholipit chứa phosphatidylcholin ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 95%, tốt hơn nếu phospholipit chứa phosphatidylcholin ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 75%, và lysophosphatidylcholin ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 30% (ví dụ Lipoid P100, P75, R LPC20 do Lipoid GmbH, Germany cung cấp). Tốt hơn nếu phospholipit được bổ sung ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 100% đến 300% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 50% đến 200% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng của nguyên liệu tự nhiên.

Khi chất ổn định không gian được sử dụng làm chất ổn định, thì chất ổn định không gian được hấp thụ hoặc gắn vào bề mặt của hạt nano và tạo ra hàng rào không gian có kích cỡ lớn và dày đặc lớn hơn lực hấp dẫn Van der Waals nhờ đó chất ổn định không gian làm giảm kết tụ, tích tụ hoặc thậm chí kết dính hạt. Tốt hơn nếu chất ổn định không gian là tá dược được dụng và được chọn từ hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza và polyvinylpyrrolidon. Tốt hơn nếu chất ổn định không gian là copolyme ba khối dạng không ion Kolliphor® P407. Kolliphor® P407 chứa chuỗi kỵ nước trung tâm polyoxypropylen (poly(propylen oxit)) được giới hạn ở hai đầu bởi hai chuỗi thân nước polyoxyetylen (poly(etylen oxit)). Có thể có lợi để bổ sung chất ổn định không gian trong bước nghiền c. Do đó, tốt hơn nếu chất ổn định không gian được bổ sung ở hàm lượng

nằm trong khoảng từ 0,5% đến 2% (khối lượng/khối lượng) trong bước nghiền c., tốt hơn nữa nếu khi các hạt có kích cỡ hạt (D_{90}) nhỏ hơn $5\mu\text{m}$.

Chất ổn định ưu tiên khác được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là glycerin (propan-1,2,3-triol). Tốt hơn nếu glycerin được bổ sung sau bước nghiền c., tốt hơn nữa nếu ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 30% đến 100% (thể tích/thể tích) hoặc nằm trong khoảng từ 40% đến 100% (thể tích/thể tích), còn tốt hơn nữa nếu ở hàm lượng bằng 40% (thể tích/thể tích) hoặc 50% (thể tích/thể tích), tính theo tổng thể tích của dung môi.

Ngoài glycerin, hoặc theo cách khác, dioctyl natri sulfosuccinat là chất ổn định tĩnh điện có thể được sử dụng, tốt hơn nếu ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 2% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng dung môi, tốt hơn nếu được bổ sung sau bước nghiền c.

Trong bước nghiền c., thể phân tán chứa nguyên liệu tự nhiên ở kích cỡ hạt nhỏ hơn $320\mu\text{m}$ được nghiền đến kích cỡ hạt (D_{90}) nhỏ hơn 1000nm . Kích cỡ này có thể đạt được trong máy nghiền thích hợp bất kỳ.

Theo phương án ưu tiên, bước nghiền c. được thực hiện trong máy nghiền bi ướt, tốt hơn nếu máy nghiền bi khuấy ướt.

Theo phương án ưu tiên khác, bước nghiền c. bao gồm bước nghiền thứ nhất c.1 trong máy nghiền bi ướt, tốt hơn nếu máy nghiền bi khuấy ướt, với đường kính bi nghiền nằm trong khoảng từ 0,5mm đến 1,5mm, và bước nghiền thứ hai c.2 trong máy nghiền bi ướt, tốt hơn nếu máy nghiền bi khuấy ướt, với đường kính bi nghiền nằm trong khoảng từ 0,3mm đến 0,4mm, và bước nghiền thứ ba c.2 trong máy nghiền bi ướt, tốt hơn nếu máy nghiền bi khuấy ướt, với đường kính bi nghiền nằm trong khoảng từ 0,05mm đến 0,2mm. Tốt hơn nếu, bước nghiền thứ hai c.2 được sử dụng cho đến khi thu được kích cỡ hạt (D_{90}) nằm trong khoảng từ 3 đến $6\mu\text{m}$, và bước nghiền thứ ba c.3 được sử dụng cho đến khi thu được kích cỡ hạt (D_{90}) nằm trong khoảng từ 80 đến 500nm , tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 80 đến 300nm . Theo phương án ưu tiên khác, với kích cỡ hạt ban đầu (D_{100}) của bột nguyên liệu tự nhiên nhỏ hơn $320\mu\text{m}$, bước nghiền c. bao gồm bước nghiền thứ nhất c.1 trong máy nghiền bi ướt, tốt hơn nếu máy nghiền bi khuấy ướt, với đường kính bi nghiền nằm trong khoảng từ 0,4mm đến 0,5mm, và bước nghiền thứ hai c.2 trong máy

nghiên bi ướt, tốt hơn nếu máy nghiền bi khuấy ướt, với đường kính bi nghiền nằm trong khoảng từ 0,05mm đến 0,2mm, tốt hơn nếu, bước nghiền thứ nhất c.1 được sử dụng cho đến khi thu được kích cỡ hạt (D_{90}) nằm trong khoảng từ 2 đến 6 μ m, và bước nghiền thứ hai c.2 được sử dụng cho đến khi thu được kích cỡ hạt (D_{90}) nằm trong khoảng từ 80 đến 500nm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 80 đến 300nm. Tốt hơn nữa nếu nhiệt độ của buồng nghiền nằm trong khoảng từ 25°C đến 36°C, và tốc độ vòng nằm trong khoảng từ 10 đến 14 m/giây, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 11 đến 14 m/giây.

Do đó, theo phương án ưu tiên, thể phân tán thu được ở bước b. được nghiền ở bước c. đến kích cỡ hạt (D_{90}) nhỏ hơn 500nm ($D_{90} < 500\text{nm}$), tốt hơn nếu nhỏ hơn 300nm ($D_{90} < 300\text{nm}$), tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 250nm ($D_{90} < 250\text{nm}$), và tốt nhất nếu nhỏ hơn 200nm ($D_{90} < 200\text{nm}$), như được đo bằng thiết bị phân tích nhiễu xạ laze hoặc tán xạ ánh sáng động.

Do đó, hỗn dịch nano thu được có thể có kích cỡ hạt (D_{90}) nhỏ hơn 500nm ($D_{90} < 500\text{nm}$), tốt hơn nếu nhỏ hơn 300nm ($D_{90} < 300\text{nm}$), tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 250nm ($D_{90} < 250\text{nm}$), và tốt nhất nếu nhỏ hơn 200nm ($D_{90} < 200\text{nm}$), như được đo bằng thiết bị phân tích nhiễu xạ laze hoặc tán xạ ánh sáng động, và kích cỡ hạt cao hơn 40nm ($D_{90} > 40\text{nm}$).

Hỗn dịch nano thu được có thể tiếp tục được tinh chế để thu được kết quả độ ổn định tốt nhất dưới dạng hỗn dịch đơn hạt, trong đó hạt đơn lẻ có kích cỡ trung bình nhỏ hơn 300nm, tốt hơn nếu nhỏ hơn 200nm. Hỗn dịch đơn hạt có thể đạt được bằng cách lọc hỗn dịch này. Thiết bị lọc có thể làm giảm kích cỡ hạt (D_{90}) đến nhỏ hơn 450nm, tốt hơn nếu nhỏ hơn 300nm, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 220nm. Thiết bị lọc bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng, như thiết bị lọc Sartorius Stedim Biotech. Khi hỗn dịch nano được lọc đến 450nm, bước lọc này làm cho độ lệch chuẩn của phân bố kích cỡ hạt thậm chí hẹp hơn, có thể góp phần làm tăng độ ổn định. Theo cách khác, hỗn dịch đơn hạt cũng có thể đạt được bằng các phương pháp xử lý tương đương. Cụ thể, hỗn dịch theo ví dụ 12 là hỗn dịch đơn hạt mà không cần lọc.

Trong bước nghiền c., năng lượng riêng đặc hiệu được áp dụng cho hỗn dịch nano. Năng lượng riêng được xác định là năng lượng hiệu dụng (năng lượng tổng trừ đi công suất không tải) của máy nghiền bi khuấy ướt tính theo đơn vị [kW] nhân với thời gian nghiền tính theo đơn vị [h] ([giờ]) và chia cho tổng lượng của hỗn dịch nano tính theo

đơn vị [t] ([tấn]) bao gồm lượng dung môi, bột nguyên liệu tự nhiên và toàn bộ chất ổn định tính theo đơn vị [t] ([tấn]).

Ngoài phương pháp ổn định hóa học sử dụng chất ổn định như mô tả nêu trên, hỗn dịch nano cũng có thể được ổn định vật lý bằng thiết bị hóa keo (ví dụ thiết bị cải tiến Kamena do Levigata GmbH, Germany cung cấp), như được thể hiện trên Fig.1. Trong phương pháp này, hỗn dịch nano được dẫn vào thùng chứa (1) bằng cách quay rôto (4) và rôto hỗ trợ (5) vào ống trụ lõm (3) ở đầu bên trên qua các tấm vách ngăn một cách gần như hỗn loạn tự do. Bên trong ống trụ lõm (3), dòng hỗn dịch nano chảy xuống (7) tác động lực quay ngược chiều hướng lên dòng hỗn dịch nano, được khuấy bởi các rôto (4,5) ở đầu ra ở đầu bên dưới của ống trụ lõm. Ở vị trí va chạm của dòng hỗn dịch nano chảy xuống và dòng hỗn dịch nano quay ngược chiều, các hạt nano được nạp tĩnh bằng ma sát. Tải trọng tĩnh hoặc hạt tích điện này có thể gây phân tách các hạt nano, do đó làm ổn định vật lý. Sau đó, hỗn dịch nano gia tăng kích cỡ (6) ở ống trụ hypebol bên ngoài theo chiều ngược lại. Do đó, hỗn dịch nano được giữ di chuyển lên xuống theo chiều thẳng đứng. Do đó, năng lượng nhiệt gây ra được kiểm soát bằng thiết bị làm mát bằng nước được tích hợp trên thành đôi (2) của thùng chứa (1), ở đó môi trường làm lạnh được cấp vào và chuyển hướng khỏi thành đôi (8a, 8b 9a, 9b).

Do đó, theo phương án ưu tiên, hỗn dịch nano còn được xử lý trong bước hóa keo d. trong thiết bị hóa keo sau bước nghiền c., tốt hơn nếu bằng cách bổ sung oxy. Ngoài ra, quá trình hóa keo này có thể thay thế việc sử dụng chất ổn định, và theo phương án ưu tiên khác, hỗn dịch nano không chứa chất ổn định bất kỳ, đặc biệt không chứa propan-1,2,3-triol.

Như mô tả chi tiết nêu trên, hỗn dịch nano theo sáng chế có thể được ổn định hóa học hoặc vật lý.

Hỗn dịch nano theo sáng chế cũng có thể chứa oxy (O_2). Theo sáng chế, khi nước giàu oxy, oxy có thể hòa tan trong nước, như hòa tan vật lý hoặc hóa học trong nước, hoặc bám dính vào hạt nano bất kỳ. Để làm giàu hỗn dịch nano với lượng dư oxy, thiết bị hóa keo nêu trên có thể được sử dụng. Theo phương pháp cụ thể của sáng chế, khoảng một phút sau khi bắt đầu quá trình hóa keo, oxy có thể được bổ sung cho đến khi hỗn dịch nano chứa oxy với nồng độ nằm trong khoảng từ 20 đến 30mg/L. Bằng phương pháp này, oxy được bổ sung vào hỗn dịch nano bằng cách hấp thụ trái ngược với phương pháp

áp lực, khi oxy được đưa vào dung dịch bằng áp lực. Thiết bị hóa keo hiệu năng cao do Levigata Ltd. cung cấp có thể được sử dụng làm thiết bị làm giàu oxy, nhưng không chỉ giới hạn ở thiết bị này.

Theo phương án ưu tiên theo sáng chế, hỗn dịch nano có nồng độ oxy nằm trong khoảng từ 20 đến 30mg/L.

Ngoài ít nhất một nguyên liệu tự nhiên và tùy ý oxy, hỗn dịch nano theo sáng chế cũng có thể chứa ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm chất thơm, chất bảo quản, chất hoạt động bề mặt và chất tăng cường tính thấm, như riboflavin hoặc axit ascorbic.

Hỗn dịch nano tùy ý có thể được lọc trong bước lọc sau bước c. và tùy ý trước hoặc sau bước d. Bằng cách thực hiện bước lọc này, kích cỡ của các hạt nano trong hỗn dịch nano có thể tiếp tục được điều chỉnh theo nhu cầu. Ví dụ, bước lọc vô trùng hỗn dịch nano có thể được thực hiện. Thiết bị lọc vô trùng có thể làm giảm kích cỡ hạt (D_{90}) đến nhỏ hơn 450nm, tốt hơn nếu nhỏ hơn 220nm. Thiết bị lọc bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng, như thiết bị lọc Milipore chuẩn. Khi hỗn dịch nano được lọc đến 220nm, bước lọc này làm cho độ lệch chuẩn của phân bố kích cỡ hạt thậm chí hẹp hơn, có thể góp phần làm tăng độ ổn định.

Theo phương án ưu tiên theo sáng chế, hỗn dịch nano được lọc sau bước c. và tùy ý trước hoặc sau bước d., tốt hơn nếu bằng thiết bị lọc vô trùng, tốt hơn nữa nếu đến kích cỡ hạt nhỏ hơn 450nm, và tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 220nm.

Trước khi sử dụng hỗn dịch nano, hàm lượng của hỗn dịch nano có thể được điều chỉnh theo nhu cầu. Mặt khác, hỗn dịch nano có thể được pha loãng bằng cách bổ sung thêm dung môi. Mặt khác, hàm lượng của hỗn dịch nano có thể tăng trong bước bổ sung e. Việc tăng nồng độ có thể đạt được bằng cách làm bay hơi dung môi, tốt hơn nếu trong buồng sấy, tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ không vượt quá 40°C, và tùy ý ở áp suất giảm. Tốt hơn nếu hỗn dịch nano thành phẩm có hàm lượng nguyên liệu tự nhiên nằm trong khoảng từ 10% đến 40% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 10% đến 20% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng dung môi có trong hỗn dịch nano.

Do đó, theo phương án ưu tiên, hàm lượng của hỗn dịch nano được gia tăng trong bước bổ sung e. bằng cách làm bay hơi dung môi, tốt hơn nếu trong buồng sấy, đến hàm lượng của nguyên liệu tự nhiên nằm trong khoảng từ 10% đến 40% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 10% đến 20% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng dung môi có trong hỗn dịch nano.

Hỗn dịch nano chứa các nguyên liệu tự nhiên được điều chế theo phương pháp nêu trên và mô tả chi tiết bằng các ví dụ trong phần thử nghiệm khác biệt với chiết xuất bởi các yếu tố sau:

Hàm lượng của các hoạt chất

Do hỗn dịch nano chứa toàn bộ hoặc các bộ phận của nguyên liệu tự nhiên ở thành phần tự nhiên của nó dưới dạng các hạt nano, và không chỉ các thành phần được chiết xuất, như các hợp chất hòa tan trong nước, nồng độ của các hợp chất thân nước cũng như các hợp chất kỵ nước trong hỗn dịch nano cao hơn chiết xuất. Trong chiết xuất, chỉ các hợp chất thân nước hoặc kỵ nước ở dạng dung dịch do độ hòa tan của chúng trong dung môi tương ứng.

Khối lượng khô

Do bản chất của hỗn dịch nano, khối lượng khô thường tương đương hoặc gần như tương đương với khối lượng hợp chất bổ sung ở bước b. để thu được hỗn dịch nano. Trái lại, khối lượng khô của chiết xuất luôn nhỏ hơn khối lượng hợp chất bổ sung vào dung môi, do độ hòa tan của các hợp chất hầu như đều nhỏ hơn 100% rất nhiều.

Phản ứng oxy hóa

Do các hạt nano thường được phân tán trong hỗn dịch nano có độ hòa tan hạn chế, nên khả năng xảy ra các phản ứng hóa học là không quan trọng như trong các chế phẩm dạng dung dịch. Do đó, độ ổn định hóa học của hỗn dịch nano thường cao hơn dung dịch. Độ ổn định oxy hóa của hỗn dịch nano là do cơ chế tương tự như lớp oxy hóa trên bề mặt nhôm. Quá trình phân hủy đơn lớp trên bề mặt hạt nano được tạo ra khi chúng tiếp xúc với nước và oxy. Đơn lớp này có thể bảo vệ thành phần bên trong của các hạt nano không bị phân hủy thêm, do đó cải thiện độ ổn định oxy hóa của hỗn dịch nano.

Độ ổn định hóa học

Cấu trúc nano độc đáo của các hạt nano làm tăng đáng kể tỷ lệ diện tích bề mặt so với thể tích mà tạo ra các đặc tính khác biệt đáng kể, cả trong điều kiện *in-vitro* lẫn *in-vivo*, như so với các hạt micro quy ước. Mặc dù các tinh thể nano dược chất có nhiều ưu điểm, nhưng chúng cũng có một số nhược điểm bao gồm phương pháp sản xuất phức tạp và độ ổn định không cao. Độ ổn định là một trong các tiêu chuẩn quan trọng để đảm bảo độ an toàn và hiệu lực của dược phẩm. Trong hỗn dịch nano sử dụng theo đường tiêm tĩnh mạch, ví dụ sự hình thành các hạt có kích cỡ lớn ($> 5 \mu\text{m}$) có thể gây phong bế mao mạch và tắc mạch, do đó phân bố kích cỡ và kích cỡ hạt dược chất cần được kiểm soát chặt chẽ trong quá trình bảo quản. Hỗn dịch nano theo sáng chế không chứa các hạt có kích cỡ lớn như vậy.

Độ ổn định vật lý

Điện tích của hạt là một trong các yếu tố quyết định độ ổn định vật lý của hỗn dịch nano. Các hạt càng lớn càng được tích điện đều, lực đẩy tĩnh điện giữa các hạt càng cao và độ ổn định vật lý càng cao. Thông thường điện tích của hạt được định lượng dưới dạng thế zeta, được đo, ví dụ bằng khả năng di chuyển của các hạt trong điện trường.

Phương pháp điều chế hỗn dịch nano nêu trên tạo ra hỗn dịch nano. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến hỗn dịch nano có thể thu được theo phương pháp bất kỳ của sáng chế.

Hơn nữa, hỗn dịch nano theo sáng chế có thể được sử dụng trong bào chế thuốc hoặc chế phẩm bổ sung dinh dưỡng, như thực phẩm bổ sung dinh dưỡng. Hỗn dịch nano theo sáng chế có thể hữu ích để sử dụng trong bào chế thuốc để sử dụng theo đường khoang miệng, khu trú và/hoặc đường miệng cho động vật, tốt hơn là người.

Hỗn dịch nano chứa các nguyên liệu tự nhiên có các ưu điểm khác biệt bao gồm có thể sử dụng qua niêm mạc. Hỗn dịch nano chứa các nguyên liệu tự nhiên chứa nồng độ cao của các hoạt chất tính trên đơn vị thể tích, các hạt kích cỡ nhỏ chứa các hoạt chất không hòa tan trong nước, do đó tạo ra triển vọng mới đối với các dược phẩm điều hòa miễn dịch, khi các hoạt chất kích thích miễn dịch được hấp thu bởi tế bào miễn dịch, mà cần có kích cỡ hạt nhỏ của các hoạt chất kích thích miễn dịch.

Để sử dụng qua khoang miệng, tốt hơn nếu dược chất cần ở dạng lỏng và hiệu quả ở liều thấp do khả năng hấp thu các chất qua khoang miệng bị hạn chế. Hơn nữa các hạt

được chất được sử dụng qua khoang miệng cần có kích cỡ nm, tức là nhỏ hơn khoảng 300nm, do sự vận chuyển qua khoang miệng bị hạn chế. Do hỗn dịch nano theo sáng chế có kích cỡ hạt D_{90} nhỏ hơn 300nm, nên hỗn dịch nano này có thể hữu ích để sử dụng qua khoang miệng.

Bên trong khoang miệng, có hai đường đưa thuốc đã được chấp nhận để sử dụng hoạt chất sinh học. Đường phân phối dưới lưỡi đạt được thông qua các màng niêm mạc bên dưới đáy miệng. Do tính thấm cao và cung cấp nhiều máu, nên việc vận chuyển qua khoang miệng tạo ra tần suất tác dụng nhanh, tạo ra đường phân phối thích hợp cho các hoạt chất có tính thấm cao với yêu cầu thời gian phân phối nhanh và phác đồ dùng thuốc không thường xuyên. Đường đưa thuốc thứ hai đã được chấp nhận là qua niêm mạc khoang miệng. Vùng này bao gồm các màng niêm mạc ở lớp bên trong của má. Vùng này cũng được cung cấp rất nhiều máu, và tạo ra thời gian phục hồi tế bào nhanh sau căng thẳng hoặc tổn thương. Mặc dù niêm mạc khoang miệng có tính thấm thấp hơn vùng dưới lưỡi, nhưng sự giãn nở của niêm mạc rất nhẹ nhàng và tương đối cố định tạo ra chu trình hấp thu mong muốn rất hữu hiệu để giải phóng kéo dài và giải phóng có kiểm soát các hoạt chất sinh học. Tương tự như các đường đưa thuốc qua niêm mạc khác, hai ưu điểm chính của hai đường đưa thuốc này bao gồm tránh được chuyển hóa bước một qua gan và thải trừ trước khi hấp thu vào cơ thể bên trong đường tiêu hóa.

Ngoài ra, chất tăng cường tính thấm bất kỳ đã biết có thể làm tăng khả năng hấp thu của hỗn dịch nano theo sáng chế.

Ngoài việc sử dụng qua đường miệng, hỗn dịch nano theo sáng chế cũng có thể được sử dụng ngoài đường tiêu hóa, tiêm vào nội tủy mạch, tiêm tĩnh mạch, qua da hoặc qua niêm mạc cho động vật, tốt hơn là người. Do đó, theo phương án ưu tiên, sáng chế mô tả việc sử dụng hỗn dịch nano trong bào chế thuốc để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, tiêm vào nội tủy mạch, tiêm tĩnh mạch, qua da hoặc qua niêm mạc, tốt hơn nếu sử dụng qua khoang miệng, khu trú hoặc qua đường miệng, cho động vật, tốt hơn là người.

Sáng chế đề cập đến hỗn dịch nano ổn định chứa các nguyên liệu tự nhiên, phương pháp điều chế hỗn dịch nano này và mô tả việc sử dụng hỗn dịch nano này, cho phép phân phối tăng cường các hoạt chất sinh học vào dòng máu của đối tượng. Khi hỗn dịch nano này tiếp xúc với cơ thể, tức là với vùng khoang miệng bao gồm niêm mạc khoang miệng, hợp chất được hấp thu vào dòng máu ở lượng đủ để tạo ra đáp ứng sinh học mong

muốn. Do đó, hỗn dịch nano có thể được phân phối bằng dạng thuốc xịt thông thường hoặc vi tăng sôi, thuốc khí dung hoặc thuốc lỏng. Quá trình phân phối có thể được thực hiện bằng đường ngoài tiêu hóa, tiêm vào nội tủy mạc, tiêm tĩnh mạch, qua da, qua niêm mạc, phương pháp bất kỳ hoặc toàn bộ các phương pháp thông thường đã được chấp nhận để phân phối được chất. Các yếu tố khác biệt đáng kể nhất đối với hỗn dịch nano điều chế theo phương pháp của sáng chế so với, ví dụ chiết xuất bao gồm (i) khối lượng mol trung bình của các hoạt chất chính của nguyên liệu tự nhiên - khối lượng mol trung bình thấp hơn, độ sinh khả dụng cao hơn, (ii) mức độ nhận biết các hoạt chất chính của nguyên liệu tự nhiên ở cơ quan của người bởi các thụ thể đặc hiệu của người (tức là các thụ thể nhận biết tác nhân gây bệnh hoặc thụ thể tương tự toll TLR; chỉ khi mức độ phát hiện bởi TLR cao, tác dụng kích thích miễn dịch gia tăng có thể được kích hoạt bởi một loạt chu trình tín hiệu sau), và (iii) tác dụng thu được của các hoạt chất chính của nguyên liệu tự nhiên ở cơ quan của người. Đối với nguyên liệu tự nhiên *agaricus subrufescens*, các yếu tố khác biệt này được thể hiện trong ví dụ 7 đến 9 sử dụng beta-1,3/1,6-glucan là hoạt chất chính của *agaricus subrufescens*, mà không hòa tan trong nước.

Hỗn dịch nano theo sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư, bệnh viêm ruột, bệnh viêm khớp, bệnh lây nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch ở người, các bệnh lây nhiễm virus khác, bệnh da liễu, như bệnh viêm da thần kinh hoặc bệnh vẩy nến, hoặc bệnh tự miễn, như bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm mạch, bệnh viêm khớp dạng thấp hoặc bệnh viêm da cơ. Hỗn dịch nano theo sáng chế là hữu hiệu trong việc tạo ra nồng độ cao của các hoạt chất của các nguyên liệu tự nhiên trong dòng máu trong thời gian kéo dài như so với tức là chiết xuất điều chế từ nguyên liệu tự nhiên. Điều này đặc biệt áp dụng cho các hợp chất kỵ nước chứa trong such các nguyên liệu tự nhiên. Hơn nữa, hỗn dịch nano chứa các hợp chất điều hòa miễn dịch từ nguyên liệu tự nhiên kích thích hệ miễn dịch theo cách thức mạnh hơn và rộng hơn, do chúng chứa nhiều hạt được chất kích thích miễn dịch ở kích cỡ nm và hàm lượng cao, được hấp thu hoặc nhận biết mạnh hơn bởi quần thể miễn dịch tương ứng so với, ví dụ chiết xuất.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn trong phần ví dụ sau. Tuy nhiên, cần hiểu rằng phạm vi bảo hộ không chỉ được xác định bằng yêu cầu bảo hộ kèm theo, và không chỉ giới hạn ở các ví dụ sau. Các ví dụ sau được thực hiện để mô tả chi tiết hơn sáng chế và

cần hiểu rằng sáng chế được thực hiện không chỉ giới hạn như sáng chế được mô tả và yêu cầu bảo hộ. Các biến đổi như vậy của sáng chế, bao gồm việc thay thế toàn bộ các phương án tương đương đã biết hoặc được phát triển sau đó, có thể nằm trong phạm vi của chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này, và các thay đổi về công thức bào chế hoặc thiết kế thử nghiệm, được xem là nằm trong phạm vi của sáng chế này.

Ví dụ 1:

Ví dụ 1.1: Chế phẩm hỗn dịch nano ổn định điều chế từ lá ôliu

Bột lá ôliu khô (200g, kích cỡ hạt D_{90} : $< 320\mu\text{m}$, hàm lượng ẩm dư $< 5\%$) được bổ sung vào nước cất hai lần (4000g), để thu được thể phân tán nước chứa 5% (khối lượng/khối lượng) bột lá ôliu. Độ hòa tan của bột lá ôliu có kích cỡ hạt $D_{90} < 320\mu\text{m}$ bằng 1,44% (khối lượng/khối lượng). Căn cứ vào trị số này, hàm lượng của hỗn dịch nano 5% (khối lượng/khối lượng) cao gấp 3,5 lần giới hạn độ hòa tan của bột lá ôliu (tức là chỉ số hòa tan bằng 3,5). Thể phân tán này được nghiền đến kích cỡ hạt (D_{90}) nhỏ hơn 400nm trong máy nghiền bi khuấy ướt (loại X1, Buehler AG, Switzerland) sử dụng bi nghiền zirconia ổn định bằng ytri có kích cỡ nằm trong khoảng từ 0,4mm đến 0,5mm cho đến khi kích cỡ hạt (D_{90}) bằng khoảng 380nm, sau đó sử dụng bi nghiền zirconia ổn định bằng ytri có kích cỡ 0,1 mm cho đến khi thu được kích cỡ hạt cuối cùng (D_{90}) bằng 272nm. Ở kích cỡ hạt (D_{90}) bằng 380nm, Tween[®] 80 (14,5g, 0,4% (khối lượng/khối lượng)) được bổ sung vào. Bước bổ sung này đã làm giảm kích cỡ hạt xuống đến 340nm. Bước bổ sung thêm Kolliphor[®] P407 (29g, 0,7% (khối lượng/khối lượng)) ở kích cỡ hạt (D_{90}) khoảng 340nm đã giảm đáng kể kích cỡ hạt (D_{90}) đến 272nm (Fig.2). Năng lượng riêng [kWh/t] sử dụng để nghiền được thể hiện trên Fig.2.

Ví dụ 1.2: Chiết xuất lá ôliu (so sánh)

Lượng tương tự của bột ôliu (200g, kích cỡ hạt D_{90} : $< 320\mu\text{m}$) được chiết xuất trong nước cất hai lần (4000g) trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Ví dụ 1.3: So sánh khối lượng khô

Khối lượng khô của chiết xuất (Ví dụ 1.2) và hỗn dịch nano (Ví dụ 1.1) nêu trên được xác định bằng cách lọc tương ứng chiết xuất và hỗn dịch nano, bằng màng lọc có kích cỡ 0,45 μm (Millipore, màng este xenluloza). Các chất rắn đã lọc được sấy và khối lượng khô của các hạt đã lọc được xác định. Như được thể hiện trên Fig.3, khối lượng

khô của hỗn dịch nano bằng 4,5% (khối lượng/khối lượng) so với 0,3% (khối lượng/khối lượng) của chiết xuất với cùng hàm lượng của bột lá ôliu (5% (khối lượng/khối lượng)).

Ví dụ 2:

Ví dụ 2.1: Chế phẩm hỗn dịch nano ổn định *spirulina*

Bột *spirulina* (300g, 10% (khối lượng/khối lượng), kích cỡ hạt D_{90} : < 150 μ m, hàm lượng ẩm dư < 5%) và Kolliphor® P407 (60g) được bổ sung vào nước cất hai lần (3000g), để thu được thể phân tán nước chứa *spirulina*. Độ hòa tan của bột *spirulina* có kích cỡ hạt D_{90} < 150 μ m bằng 0,52% (khối lượng/khối lượng). Căn cứ vào trị số này, hàm lượng của hỗn dịch nano 10% (khối lượng/khối lượng) cao gấp 19,2 lần giới hạn độ hòa tan của bột *spirulina* (tức là chỉ số hòa tan bằng 19,2). Thể phân tán này được nghiền đến kích cỡ hạt (D_{90}) khoảng 80nm trong máy nghiền bi khuấy ướt (loại X1, Buehler AG, Switzerland) sử dụng bi nghiền ziconia ổn định bằng ytri có kích cỡ nằm trong khoảng từ 0,4mm đến 0,5mm cho đến khi kích cỡ hạt (D_{90}) bằng khoảng 120nm, sau đó sử dụng bi nghiền ziconia ổn định bằng ytri có kích cỡ 0,1 mm cho đến khi kích cỡ hạt cuối cùng (D_{90}) bằng 80nm. Năng lượng riêng [kWh/t] sử dụng để nghiền được thể hiện trên Fig.4.

Ví dụ 2.2: Chiết xuất *spirulina* (so sánh)

Lượng tương tự của bột *spirulina* (300g, kích cỡ hạt D_{90} : < 150 μ m) được chiết xuất trong nước cất hai lần (3000g) trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Ví dụ 2.3: So sánh khối lượng khô

Khối lượng khô của chiết xuất (Ví dụ 2.2) và hỗn dịch nano (Ví dụ 2.1) nêu trên được xác định bằng cách lọc tương ứng chiết xuất và hỗn dịch nano, bằng màng lọc có kích cỡ 0,45 μ m (Millipore, màng este xenluloza). Các chất rắn đã lọc được sấy và khối lượng khô của các hạt đã lọc được xác định. Như được thể hiện trên Fig.5, khối lượng khô của hỗn dịch nano bằng 9,4% (khối lượng/khối lượng) so với 3,3% (khối lượng/khối lượng) của chiết xuất với cùng hàm lượng của bột *spirulina* (10% (khối lượng/khối lượng)).

Ví dụ 3:

Ví dụ 3.1: Chế phẩm hỗn dịch nano ổn định điều chế từ nấm *agaricus subrufescens* và 5% P100, 0,5% Tween® 80 và 1% Kolliphor P407

Bột *agaricus subrufescens* (150g, kích cỡ hạt D_{90} : $< 320\mu\text{m}$, hàm lượng ẩm dư $< 5\%$), Lipoid P100 (150g, 5% (khối lượng/khối lượng)) và polysorbat Tween® 80 (15g, 0,5% (khối lượng/khối lượng)) được bổ sung vào nước cất hai lần (3000g), để thu được thể phân tán nước chứa 5% (khối lượng/khối lượng) bột *agaricus subrufescens*. Độ hòa tan của bột *agaricus subrufescens* có kích cỡ hạt $D_{90} < 320\mu\text{m}$ bằng 3,2% (khối lượng/khối lượng). Căn cứ vào trị số này, hàm lượng của hỗn dịch nano 5% (khối lượng/khối lượng) cao gấp 1,6 lần giới hạn độ hòa tan của bột *agaricus subrufescens* (tức là chỉ số hòa tan bằng 1,6). Thể phân tán này được nghiền trong máy nghiền bi khuấy ướt (loại X1, Buehler AG, Switzerland) sử dụng bi nghiền ziconia ổn định bằng ytri có kích cỡ nằm trong khoảng từ 0,4mm đến 0,5mm cho đến khi kích cỡ hạt (D_{90}) bằng khoảng $6,3\mu\text{m}$, sau đó sử dụng bi nghiền ziconia ổn định bằng ytri có kích cỡ 0,1 mm cho đến khi thu được kích cỡ hạt cuối cùng (D_{90}) bằng 240nm. Năng lượng riêng [kWh/t] sử dụng để nghiền được thể hiện trên Fig.6 (đường nét đậm). Ở kích cỡ hạt (D_{90}) khoảng $6,3\mu\text{m}$, Kolliphor® P407 (30g, 1% (khối lượng/khối lượng)) được bổ sung vào. Kích cỡ hạt cuối cùng (D_{90}) của hỗn dịch nano bằng 240nm (cũng xem Fig.6 - đường nét đậm).

Ví dụ 3.2: Chế phẩm hỗn dịch nano ổn định điều chế từ nấm *agaricus subrufescens* và 10% P100, 0,5% Tween® 80 và 1% Kolliphor P407

Bột *agaricus subrufescens* (150g, kích cỡ hạt D_{90} : $< 320\mu\text{m}$), Lipoid P100 (300g, 10% (khối lượng/khối lượng)) và polysorbat Tween® 80 (15g, 0,5% (khối lượng/khối lượng)) được bổ sung vào nước cất hai lần (3000g), để thu được thể phân tán chứa 5% (khối lượng/khối lượng) bột *agaricus subrufescens* trong nước. Thể phân tán này được nghiền trong máy nghiền bi khuấy ướt (loại X1, Buehler AG, Switzerland) sử dụng bi nghiền ziconia ổn định bằng ytri có kích cỡ nằm trong khoảng từ 0,4mm đến 0,5mm cho đến khi kích cỡ hạt (D_{90}) bằng khoảng $6,3\mu\text{m}$, sau đó sử dụng bi nghiền ziconia ổn định bằng ytri có kích cỡ 0,1 mm cho đến khi thu được kích cỡ hạt cuối cùng (D_{90}) bằng 368 nm. Năng lượng riêng [kWh/t] sử dụng để nghiền được thể hiện trên Fig.6 (đường nét đứt). Ở kích cỡ hạt (D_{90}) khoảng $2,6\mu\text{m}$, Kolliphor® P407 (30g, 1% (khối lượng/khối lượng)) được bổ sung vào. Kích cỡ hạt cuối cùng (D_{90}) của hỗn dịch nano bằng 368 nm (cũng xem Fig.6 - đường nét đứt).

Ví dụ 3.3: Chế phẩm hỗn dịch nano ổn định điều chế từ nấm *agaricus subrufescens* và 5% P100, 0,75% Tween® 80

150g bột *agaricus subrufescens* (kích cỡ hạt D_{90} : $< 320\mu\text{m}$), Lipoid P100 (150g, 5% (khối lượng/khối lượng)) và polysorbat Tween® 80 (15g, 0,5% (khối lượng/khối lượng)) được bổ sung vào nước cất hai lần (3000g), để thu được thể phân tán nước chứa 5% (khối lượng/khối lượng) bột *agaricus subrufescens*. Thể phân tán này được nghiền trong máy nghiền bi khuấy ướt (loại X1, Buehler AG, Switzerland) sử dụng bi nghiền zirconia ổn định bằng ytri có kích cỡ nằm trong khoảng từ 0,4mm đến 0,5mm. Năng lượng riêng [kWh/t] sử dụng để nghiền được thể hiện trên Fig.7 (đường nét đứt). Kích cỡ hạt (D_{90}) của hỗn dịch nano đã giảm đến 343 nm ở năng lượng riêng bằng 15170 kWh/t (cũng xem Fig.7 - đường nét đứt). Sau khi nghiền liên tục ở năng lượng riêng tăng, kích cỡ hạt tăng đột biến, có thể do diện tích bề mặt lớn của hạt, và gây kết tụ. Thậm chí bước bổ sung thêm polysorbat Tween® 80 (7,5g, để thu được tổng hàm lượng bằng 0,75% (khối lượng/khối lượng)) không làm giảm đáng kể kích cỡ hạt. Trong ví dụ so sánh, hỗn dịch nano tương tự nhưng có bổ sung 1% Kolliphor® P407 (Ví dụ 3.2 nêu trên) và 0,5% polysorbat Tween® 80 có kích cỡ hạt nhỏ hơn và độ ổn định cũng cao hơn (Fig.7 - đường nét đậm).

Ví dụ 3.4: Chiết xuất nấm *agaricus subrufescens* (so sánh)

Lượng tương tự của bột *agaricus subrufescens* (150g, kích cỡ hạt D_{90} : $< 320\mu\text{m}$) được chiết xuất trong nước cất hai lần (3000g) trong 2 giờ ở nhiệt độ 22°C.

Ví dụ 3.5: So sánh khối lượng khô

Khối lượng khô của chiết xuất (Ví dụ 3.4) và hỗn dịch nano (Ví dụ 3.1) nêu trên được xác định bằng cách lọc tương ứng chiết xuất và hỗn dịch nano, bằng màng lọc có kích cỡ 0,45 μm (Millipore, màng este xenluloza). Các chất rắn đã lọc được sấy và khối lượng khô của các hạt đã lọc được xác định. Như được thể hiện trên Fig.8, khối lượng khô của hỗn dịch nano bằng 4,4% (khối lượng/khối lượng) so với 0% (khối lượng/khối lượng) của chiết xuất với cùng hàm lượng của bột *agaricus subrufescens* (5% (khối lượng/khối lượng)).

Ví dụ 4:

Ví dụ 4.1: Hàm lượng của các hoạt chất

Hoạt chất chính của *agaricus subrufescens* là beta-1,3/1,6-glucan, do đó glucan này có thể được sử dụng làm chất chuẩn để so sánh nồng độ của các chiết xuất *agaricus subrufescens* và hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* khác nhau. Ngoài hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) theo ví dụ 3.1 và chiết xuất *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) theo ví dụ 3.4, các chiết xuất khác được điều chế theo cùng cách thức theo ví dụ 3.4. Các loại chiết xuất khác trong Fig.9 ở đó toàn bộ các quy trình được thực hiện với cùng các thông số (150g bột *agaricus subrufescens* cộng với 3000g dung môi, thời gian chiết xuất trong 2 giờ) với các dung môi khác nhau (nước cất hai lần và etanol 60% (thể tích/thể tích) (EtOH)) và các nhiệt độ khác nhau (nhiệt độ phòng 22°C và 80°C), như được thể hiện trên Fig.9. Fig.9 là biểu đồ thể hiện kết quả so sánh hàm lượng beta-1,3/1,6-glucan của các chiết xuất khác nhau của bột *agaricus subrufescens*, và hỗn dịch nano theo ví dụ 3.1, so với bột *agaricus subrufescens* tinh khiết sử dụng để điều chế chiết xuất và hỗn dịch nano. Hỗn dịch nano chứa beta-1,3/1,6-glucan của bột với hàm lượng bằng 98%, trong khi đó chiết xuất etanol ở nhiệt độ phòng chứa beta-1,3/1,6-glucan với hàm lượng chỉ bằng 2% và chiết xuất nước cất hai lần ở nhiệt độ 80°C chứa beta-1,3/1,6-glucan ở hàm lượng lên đến 46%. Điều này cho thấy rằng trong hỗn dịch nano hầu hết toàn bộ beta-1,3/1,6-glucan từ phần bột được giữ lại.

Ví dụ 5

Ví dụ 5.1: Chế phẩm hỗn dịch nano ổn định silic oxit

Bột silic oxit (100g, kích cỡ hạt D_{90} : < 25nm) được bổ sung vào nước cất hai lần (2000g), để thu được thể phân tán nước chứa 5% (khối lượng/khối lượng) bột silic oxit. Hỗn dịch nano silic oxit này được làm ổn định bằng phương pháp vật lý mô tả chi tiết nêu trên. Thế zeta, được đo bằng thiết bị phân tích nhiễu xạ laze Zetasizer (Malvern Instruments, UK) được sử dụng làm thông số vật lý để đánh giá tác dụng của phương pháp ổn định vật lý. Do đó, thế zeta được đo trước và sau khi ổn định vật lý bằng thiết bị hóa keo. Do quá trình ổn định vật lý trong thiết bị hóa kéo trong 3 phút ở tần số bằng 3000 phút⁻¹, nên thế zeta giảm từ -0,84mV đến -10,4mV. Trị số này giảm đáng kể so với trị số khi không ổn định vật lý (Fig.10).

Ví dụ 6

Trong Ví dụ 6, các hỗn dịch nano khác nhau được thử nghiệm về độ ổn định kéo dài. Thử nghiệm độ ổn định ở điều kiện lão hóa cấp tốc được thực hiện bằng thiết bị ly tâm phân tích (Lumifuge do LUM GmbH, Germany sản xuất) để phân loại và đánh giá hiện tượng phân tách, như kết lắng, lơ lửng hoặc đông vón của hỗn dịch nano. Thử nghiệm này được sử dụng để xác định độ ổn định của hỗn dịch nano. Hỗn dịch nano được xem là ổn định kéo dài khi không có hoặc có rất ít hạt nano bị kết lắng, lơ lửng hoặc đông vón.

Trong thử nghiệm độ ổn định ở điều kiện lão hóa cấp tốc, hỗn dịch nano được gia tốc trong thiết bị ly tâm ở tốc độ bằng 2000g ($g = \text{gia tốc trọng trường} = 9,81 \text{ m/giây}^2$). Với sự trợ giúp của các đặc tính không gian Lumifuge và hệ số tắt phân giải theo thời gian so với toàn bộ chiều dài mẫu thu được. Ánh sáng song song (I_0) chiếu vào toàn bộ công đo mẫu và ánh sáng truyền qua I được phát hiện bằng hàng ngàn cảm biến bố trí đều trên toàn bộ mẫu từ trên xuống dưới với độ phân giải thang micro. Độ truyền qua được chuyển đổi thành hệ số tắt bằng công thức $\lg(I/I_0)$, và nồng độ hạt có thể được tính toán. Để thu được hỗn dịch nano có độ ổn định kéo dài, propan-1,2,3-triol có thể được bổ sung vào để làm tăng độ nhớt hỗn dịch nano và ngăn ngừa các hạt nano kết lắng trong hỗn dịch nano. Các ví dụ sau thể hiện tác dụng của bước bổ sung propan-1,2,3-triol.

Ví dụ 6.1: Chế phẩm hỗn dịch nano ổn định kéo dài điều chế từ nấm *agaricus subrufescens* và 0% propan-1,2,3-triol

Hỗn dịch nano như được điều chế theo ví dụ 3.1 được điều chế và khuấy trong khoảng 30 phút bằng máy khuấy từ, không bổ sung propan-1,2,3-triol. Sau đó, thử nghiệm độ ổn định ở điều kiện lão hóa cấp tốc được thực hiện bằng thiết bị ly tâm phân tích (Lumifuge do LUM GmbH, Germany sản xuất) để phân loại và đánh giá hiện tượng phân tách, như kết lắng, lơ lửng hoặc đông vón của hỗn dịch nano, như mô tả nêu trên.

Fig.11 là đồ thị thể hiện đường cong độ truyền qua của hỗn dịch nano với 0% propan-1,2,3-triol. Như được thể hiện trên Fig.11, các hạt có kích cỡ lớn kết lắng trong điều kiện trọng lực bằng 2000g trong vòng quay thứ nhất (các đường màu xám nhạt nằm giữa độ truyền qua bằng 40% và khoảng 25%), sau đó các hạt có kích cỡ lớn khác rơi ra trong các vòng quay tiếp theo cho đến khi sau 20 phút chất lắng được tạo ra ở đáy công

đo. Độ truyền qua giảm từ 44% ở thời điểm ban đầu xuống đến 10% (chất kết lắng ở đáy ống đo), thể hiện quá trình kết lắng trong điều kiện trọng lực bằng 2000g. Điều này thể hiện độ không ổn định kéo dài của hỗn dịch nano.

Ví dụ 6.2: Chế phẩm hỗn dịch nano ổn định kéo dài điều chế từ nấm *agaricus subrufescens* và 20% propan-1,2,3-triol

Hỗn dịch nano (500mL) như được điều chế theo ví dụ 3.1 được điều chế và 20% (thể tích/thể tích) propan-1,2,3-triol được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được khuấy trong khoảng 30 phút bằng máy khuấy từ. Sau đó, thử nghiệm độ ổn định ở điều kiện lão hóa cấp tốc nêu trên được thực hiện.

Fig.12 là đồ thị thể hiện đường cong độ truyền qua của hỗn dịch nano và 20% propan-1,2,3-triol. Như được thể hiện trên Fig.12, lượng các hạt có kích cỡ lớn (các đường màu xám nhạt nằm giữa độ truyền qua 50% và 40%) kết lắng trong điều kiện trọng lực bằng 2000g thấp hơn nhiều trong vòng quay thứ nhất, cho đến khi sau 20 phút chất lắng được tạo ra ở đáy ống đo. Độ truyền qua giảm từ 58% ở thời điểm ban đầu xuống đến 10% (chất kết lắng ở đáy ống đo), thể hiện quá trình kết lắng trong điều kiện trọng lực bằng 2000g. Điều này cho thấy rằng bằng cách bổ sung 20% (thể tích/thể tích) propan-1,2,3-triol độ ổn định của hỗn dịch nano có thể tăng.

Ví dụ 6.3: Chế phẩm hỗn dịch nano ổn định kéo dài điều chế từ nấm *agaricus subrufescens* và 50% propan-1,2,3-triol

Hỗn dịch nano (500mL) như được điều chế theo ví dụ 3.1 được điều chế và 50% (thể tích/thể tích) propan-1,2,3-triol được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được khuấy trong khoảng 30 phút bằng máy khuấy từ. Sau đó, thử nghiệm độ ổn định ở điều kiện lão hóa cấp tốc nêu trên được thực hiện.

Fig.13 là đồ thị thể hiện đường cong độ truyền qua của hỗn dịch nano with 50% propan-1,2,3-triol. Như được thể hiện trên Fig.13, không có sự kết lắng trong 20 phút trong điều kiện trọng lực bằng 2000g (các đường màu xám nhạt nằm giữa độ truyền qua 50% và khoảng 53%). Không có chất kết lắng ở đáy ống đo. Điều này cho thấy rằng bằng cách bổ sung 50% (thể tích/thể tích) propan-1,2,3-triol, độ ổn định của hỗn dịch nano cũng tăng.

Ví dụ 7: Khối lượng mol trung bình của β -1,3/1,6-glucan trong hỗn dịch nano và chiết xuất nấm *agaricus subrufescens* với cùng hàm lượng bằng 5% (khối lượng/khối lượng)

Fig.14 là đồ thị thể hiện khối lượng riêng (ví dụ, khối lượng mol trung bình) của β -1,3/1,6-glucan của hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* như được điều chế theo ví dụ 3.1 và chiết xuất như được điều chế theo ví dụ 3.4 (hỗn dịch nano 1: 20 μ L thể tích tiêm trong bộ phận phát hiện; hỗn dịch nano 2: 10 μ L thể tích tiêm trong bộ phận phát hiện, chiết xuất: 10 μ L thể tích tiêm trong bộ phận phát hiện). Khối lượng mol của hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* được đo bằng hai thể tích tiêm để xác định độ tin cậy của phương pháp phân tích, mà thể hiện độ ổn định. Khối lượng mol trung bình của hoạt chất β -1,3/1,6-glucan trong hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* nằm trong khoảng từ 15 đến 16kDa và khối lượng mol trung bình của hoạt chất β -1,3/1,6-glucan trong chiết xuất bằng 135kDa. Điều này cho thấy rằng phương pháp điều chế hỗn dịch nano từ nguyên liệu tự nhiên theo sáng chế làm giảm đáng kể khối lượng mol của hoạt chất chính β -1,3/1,6-glucan. Điều này dẫn đến sự tái hấp thu cao hơn của β -1,3/1,6-glucan có trong hỗn dịch nano khi sử dụng.

Ví dụ 8: Định lượng β -1,3/1,6-glucan trong hỗn dịch nano và chiết xuất nấm *agaricus subrufescens* với cùng hàm lượng bằng 5% (khối lượng/khối lượng)

Dectin-1 là thụ thể chính trên các tế bào miễn dịch phát hiện β -1,3/1,6-glucan ở cơ quan của người. Fig.15 là biểu đồ thể hiện hàm lượng tương đối của bạch cầu đơn nhân biểu hiện dectin-1 (tính theo %) trong mẫu chứa tế bào đơn nhân máu ngoại vi không được kích thích (PBMC), PBMC được kích thích bằng hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế theo ví dụ 3.1 và chiết xuất *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) được điều chế theo ví dụ 3.4, tương ứng. Số lượng PBMC tăng 409% khi được kích thích bằng hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng) so với mẫu không được kích thích, so với số lượng PBMC tăng 122% khi kích thích bằng chiết xuất *agaricus subrufescens* 5% (khối lượng/khối lượng).

Ví dụ 9: Mức độ cảm ứng xytokin TNF-alpha bởi hỗn dịch nano và chiết xuất nấm *agaricus subrufescens* với cùng hàm lượng bằng 5% (khối lượng/khối lượng)

TNF-alpha là một trong số các xytokin chính trong tiến triển bệnh. Fig.16 là biểu đồ thể hiện kết quả so sánh mức độ cảm ứng *in-vitro* xytokin TNF-alpha gây ra bởi hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* được điều chế theo ví dụ 3.1 và chiết xuất *agaricus subrufescens* được điều chế theo ví dụ 3.4. Mức độ cảm ứng TNF-alpha bởi hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* cao gấp 60 lần so với chiết xuất *agaricus subrufescens*.

Ví dụ 10: Mức độ cảm ứng xytokin IL-10 bởi hỗn dịch nano và chiết xuất nấm *agaricus subrufescens* với cùng hàm lượng bằng 5% (khối lượng/khối lượng)

Fig.17 là biểu đồ thể hiện kết quả so sánh mức độ cảm ứng *in-vitro* xytokin IL-10, là một trong số các xytokin tiền viêm chính, gây ra bởi hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* được điều chế theo ví dụ 3.1 và chiết xuất *agaricus subrufescens* được điều chế theo ví dụ 3.4. Mức độ cảm ứng IL-10 bởi hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* cao gấp 26,5 lần so với chiết xuất *agaricus subrufescens*.

Ví dụ 11: Mức độ cảm ứng xytokin IL-6 bởi hỗn dịch nano và chiết xuất nấm *agaricus subrufescens* với cùng hàm lượng bằng 5% (khối lượng/khối lượng) là tác dụng thu được ở cơ quan của người

Fig.18 là biểu đồ thể hiện kết quả so sánh mức độ cảm ứng *in-vitro* xytokin IL-6, là một trong số các xytokin tiền viêm chính, gây ra bởi hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* được điều chế theo ví dụ 3.1 và chiết xuất *agaricus subrufescens* được điều chế theo ví dụ 3.4. Mức độ cảm ứng IL-10 bởi hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* cao gấp 6,7 lần so với chiết xuất *agaricus subrufescens*.

Ví dụ 12: Cải thiện phân bố hạt của hỗn dịch nano nấm *agaricus subrufescens* với hàm lượng bằng 5% (khối lượng/khối lượng) và 7,5% lipid

Bột *agaricus subrufescens* (150g, kích cỡ hạt D_{90} : < 320 μ m), Lipoid P100 (225g, 7,5% (khối lượng/khối lượng)) và polysorbat Tween[®] 80 (15g, 0,5% (khối lượng/khối lượng)) được bổ sung vào nước cất hai lần (3000g), để thu được thể phân tán nước chứa 5% (khối lượng/khối lượng) bột *agaricus subrufescens*. Thể phân tán này được nghiền trong máy nghiền bi khuấy ướt (loại X1, Buehler AG, Switzerland) sử dụng bi nghiền ziconia ổn định bằng ytri có kích cỡ nằm trong khoảng từ 0,4mm đến 0,5mm cho đến khi

kích cỡ hạt (D_{90}) bằng khoảng $15\mu\text{m}$, sau đó sử dụng bi nghiền ziconia ổn định bằng ytri có kích cỡ $0,1\text{ mm}$ cho đến khi thu được kích cỡ hạt cuối cùng (D_{100}) bằng 375nm . Ở kích cỡ hạt (D_{90}) khoảng $4\mu\text{m}$, Kolliphor[®] P407 (30g, 1% (khối lượng/khối lượng)) được bổ sung vào. Kích cỡ hạt cuối cùng (D_{100}) của hỗn dịch nano bằng 375nm . Không cần lọc hỗn dịch nano thu được.

Bằng cách bổ sung thêm 2,5% (khối lượng/khối lượng) Lipoid P100 so với Ví dụ 3.1, hai mục đích cải thiện chính đã đạt được. Thứ nhất, kích cỡ hạt cuối cùng (D_{100}) thu được bằng 375nm (xem Fig.20), so với kích cỡ hạt (D_{100}) bằng $10\mu\text{m}$ (xem Fig.19) trong ví dụ 3.1. Thứ hai, phân bố hạt đơn hình thái thu được, so với phân bố hạt hai hình thái trong ví dụ 3.1 (xem Fig.19 và Fig.20, tương ứng). Để duy trì hỗn dịch nano ổn định, tốt hơn nếu hỗn dịch nano này có phân bố hạt đơn hình thái để tránh hoặc giảm hiện tượng tích tụ Ostwald có thể xuất hiện và tạo ra hỗn dịch nano không ổn định. Mức độ khác biệt cũng được thể hiện rõ ràng từ phân bố hạt chi tiết của hai ví dụ. Trong ví dụ 3.1, kích cỡ hạt (D_{10}) bằng $0,108\mu\text{m}$, kích cỡ hạt (D_{50}) bằng $0,159\mu\text{m}$, kích cỡ hạt (D_{90}) bằng $0,240\mu\text{m}$, và kích cỡ hạt (D_{100}) bằng $10\mu\text{m}$ (Fig.19). Trái lại, phân bố hạt chi tiết theo ví dụ 12 là kích cỡ hạt (D_{10}) bằng $0,065\mu\text{m}$, kích cỡ hạt (D_{50}) bằng $0,104\mu\text{m}$, kích cỡ hạt bằng (D_{90}) $0,178\mu\text{m}$, và kích cỡ hạt (D_{100}) bằng $0,375\mu\text{m}$ (Fig.20).

Ví dụ 13: Mức độ cảm ứng tế bào T hoạt hóa bởi CD25 bởi hỗn dịch nano nấm *agaricus subrufescens* theo ví dụ 12 là tác dụng thu được ở cơ quan của người

Tế bào T hoạt hóa bởi CD25 là nhóm tế bào T quan trọng được xem là yếu tố tạo ra sự chuyển dịch đáp ứng từ tế bào hỗ trợ T2 (Th2) sang tế bào hỗ trợ T1 (Th1). Sự chuyển dịch trong cân bằng Th1/Th2 theo đáp ứng Th1 làm tăng khả năng phòng ngừa virus của hệ miễn dịch. Trong ví dụ sau, mức độ gia tăng tế bào T hoạt hóa bởi CD25 được thử nghiệm trên cơ thể người bằng hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* theo ví dụ 12 so với bột *agaricus subrufescens* có bán trên thị trường. Hỗn dịch nano như được điều chế theo ví dụ 12 được trộn với propan-1,2,3-triol (glyxerin) để thu được hỗn hợp chứa 40% glyxerin. Hỗn hợp này được sử dụng cho nhóm thứ nhất gồm tám người ở liều lượng bằng $3,78\text{ mL/ngày}$ bằng bơm xịt. Liều lượng này tương ứng với 105mg *agaricus subrufescens* (hàm lượng chất rắn khô). Trong nhóm thứ nhất, số lượng tế bào T hoạt hóa bởi CD25 tăng 33% trong 4 tuần sau khi bắt đầu sử dụng (Fig.21). Để so sánh, nhóm thứ hai gồm tám người được cho sử dụng bột *agaricus subrufescens* ở dạng viên nang (kích

cỡ hạt bằng khoảng 220 μ m) ở liều lượng khuyến cáo hàng ngày bằng 2520mg. Trong nhóm thứ hai, số lượng tế bào T hoạt hóa bởi CD25 tăng 11,5% trong 4 tuần sau khi bắt đầu sử dụng (Fig.22).

Như dữ liệu nêu trên, hỗn dịch nano *agaricus subrufescens* theo ví dụ 12 tạo ra mức độ gia tăng tế bào T hoạt hóa bởi CD25, cao gấp 3 lần so với bột *agaricus subrufescens*. Nói cách khác, hỗn dịch nano theo ví dụ 12 có hoạt lực cao gấp khoảng 3 lần so với bột *agaricus subrufescens*. Điều này thậm chí còn đáng ngạc nhiên hơn khi liều lượng đã thấp hơn 24 lần so với bột *agaricus subrufescens*.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế hỗn dịch nano ổn định chứa ít nhất một nguyên liệu tự nhiên, bao gồm các bước sau:

- a. điều chế ít nhất một nguyên liệu tự nhiên có kích cỡ hạt (D_{100}) nhỏ hơn $320\mu\text{m}$; không phải là chiết xuất;
- b. phân tán ít nhất một nguyên liệu tự nhiên thu được ở bước a. trong dung môi;
- c. nghiền thể phân tán thu được ở bước b. đến kích cỡ hạt (D_{90}) nhỏ hơn 1000nm ($D_{90} < 1000\text{nm}$),

trong đó ít nhất một nguyên liệu tự nhiên được phân tán trong bước b. ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 20% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng dung môi sử dụng trong hỗn dịch nano, và trong đó bước phân tán b. hoặc bước nghiền c. bao gồm công đoạn bổ sung chất ổn định;

trong đó chất ổn định được chọn từ nhóm bao gồm phospholipit; polysorbat; hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza và polyvinylpyrrolidon; copolyme ba khối dạng không ion; copolyvinylpyrrolidon; caprylocaproyl polyoxyl-8 glyxerit; lauroyl polyoxyl-32 glyxerit; gelatin; lecithin (phosphatit); gôm acacia; cholesterol; tragacanth; polyoxyetylen alkyl ete; dẫn xuất dầu thầu dầu polyoxyetylen; este của axit béo và polyoxyetylen sorbitan; este của axit béo và sorbitan; polyetylen glycol; polyoxyetylen stearat; monoglyxerit và diglyxerit; silic dioxit dạng keo; natri dodexylsulfat; magie nhôm silicat; trietanolamin; axit stearic; canxi stearat; glyxerol monostearat; rượu xetostearyllic; sáp nhũ hóa xetomacrogol; rượu mạch ngắn và mạch trung bình; oleoyl polyoxyl-6 glycerit; plurol oleique; propan-1,2,3-triol, rượu polyvinyllic và dioctyl natri sulfosuccinat;

trong đó ít nhất một nguyên liệu tự nhiên được chọn từ nhóm bao gồm thực vật, vi khuẩn lam, tảo và nấm.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một nguyên liệu tự nhiên là một phần hoặc toàn bộ nguyên liệu tự nhiên, tốt hơn nếu toàn bộ nguyên liệu tự nhiên.

3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nguyên liệu tự nhiên được sấy ở bước a.1, trước khi thực hiện bước a., tốt hơn nếu được sấy đông khô

và/hoặc sấy nhiệt, và/hoặc trong đó nguyên liệu tự nhiên ở bước a. có hàm lượng nước w nhỏ hơn 15% ($w < 15\%$), tốt hơn nếu nhỏ hơn 12% ($w < 12\%$), tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 10% ($w < 10\%$), và tốt nhất nếu nhỏ hơn 8% ($w < 8\%$).

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nguyên liệu tự nhiên được nghiền thô trước và/hoặc sau khi sấy ở bước a.1, tốt hơn nếu trong máy phay, và tùy ý được sàng đến kích cỡ hạt (D_{100}) nhỏ hơn $320\mu\text{m}$.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ít nhất một nguyên liệu tự nhiên được phân tán trong bước b. ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 2% đến 10% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng dung môi sử dụng trong hỗn dịch nano, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 2% đến 5% (khối lượng/khối lượng) hoặc nằm trong khoảng từ 5% đến 10% (khối lượng/khối lượng).

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước phân tán b. bao gồm bước bổ sung chất ổn định, tốt hơn nếu trong đó bước phân tán b. bao gồm bước bổ sung phospholipit và/hoặc polysorbat, tốt hơn nếu

a. trong đó bước phân tán b. bao gồm bước bổ sung polysorbat ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 2% (khối lượng/khối lượng), và/hoặc trong đó polysorbat được chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 80 và polysorbat 20, hoặc

b. trong đó bước phân tán b. bao gồm bước bổ sung phospholipit ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 50% đến 200% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng của nguyên liệu tự nhiên, tốt hơn nếu trong đó phospholipit chứa phosphatidylcholin ở hàm lượng lên đến 95% (khối lượng) và/hoặc lysophosphatidylcholin ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 30% (khối lượng); hoặc

c. trong đó chất ổn định là polyme được chọn từ nhóm bao gồm hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza và polyvinylpyrrolidon; hoặc trong đó chất ổn định được chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 80, polysorbat 20, poloxame 407 và poloxame 188.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước nghiền c. được thực hiện trong máy nghiền bi khuấy ướt, tốt hơn nếu:

a. trong đó bước nghiền c. bao gồm bước nghiền thứ nhất c.1 trong máy nghiền bi ướt, tốt hơn nếu máy nghiền bi khuấy ướt, với đường kính bi nghiền nằm trong khoảng từ 0,5mm đến 1,5mm, và bước nghiền thứ hai c.2 trong máy nghiền bi ướt, tốt hơn nếu máy nghiền bi khuấy ướt, với đường kính bi nghiền nằm trong khoảng từ 0,3mm đến 0,4mm, và bước nghiền thứ ba c.2 trong máy nghiền bi ướt, tốt hơn nếu máy nghiền bi khuấy ướt, với đường kính bi nghiền nằm trong khoảng từ 0,05mm đến 0,2mm, hoặc

b. trong đó bước nghiền c. bao gồm bước nghiền thứ nhất c.1 trong máy nghiền bi ướt, tốt hơn nếu máy nghiền bi khuấy ướt, với đường kính bi nghiền nằm trong khoảng từ 0,4mm đến 0,5mm, và bước nghiền thứ hai c.2 trong máy nghiền bi ướt, tốt hơn nếu máy nghiền bi khuấy ướt, với đường kính bi nghiền nằm trong khoảng từ 0,05mm đến 0,2mm.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước nghiền c. bao gồm bước bổ sung chất ổn định, tốt hơn nếu chất ổn định là chất ổn định tĩnh điện và/hoặc không gian, ở kích cỡ hạt $D_{90} < 9\mu\text{m}$, tốt hơn nếu $D_{90} < 3\mu\text{m}$, tốt hơn nữa nếu $D_{90} < 800\text{nm}$ và tốt nhất nếu $D_{90} < 300\text{nm}$, tốt hơn nếu trong đó chất ổn định được chọn từ nhóm bao gồm phospholipit; polysorbat; hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza; polyvinylpyrrolidon; copolyme ba khối dạng không ion, như poloxame (ví dụ, poloxame 407 hoặc poloxame 188); copolyvinylpyrrolidon; caprylocapropyl polyoxyl-8 glyxerit; lauroyl polyoxyl-32 glyxerit; gelatin; lecithin (phosphatit); gôm acacia; cholesterol; tragacanth; polyoxyetylen alkyl ete; dẫn xuất dầu thầu dầu polyoxyetylen; este của axit béo và polyoxyetylen sorbitan; este của axit béo và sorbitan; polyetylen glycol; polyoxyetylen stearat; monoglyxerit và diglyxerit; silic dioxit dạng keo; natri dodexylsulfat; magie nhôm silicat; trietanolamin; axit stearic; canxi stearat; glyxerol monostearat; rượu xetostearylic; xấp nhũ hóa xetomacrogol; rượu mạch ngắn và mạch trung bình; oleoyl polyoxyl-6 glycerit; plurol oleique; propan-1,2,3-triol, rượu polyvinyllic và dioctyl natri sulfosuccinat, tốt hơn nếu chất ổn định được chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 80, polysorbat 20, poloxame 407 và poloxame 188.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung propan-1,2,3-triol (glyxerin) sau khi kết thúc bước nghiền c, tốt hơn nếu trong đó chất ổn định là glyxerin được bổ sung ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 30% đến 100% (thể tích/thể tích), tốt hơn nếu ở hàm lượng bằng 40% (thể tích/thể tích) hoặc 50% (thể tích/thể tích), tính theo tổng thể tích của dung môi.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hỗn dịch nano còn được xử lý trong bước hóa keo d. trong thiết bị hóa keo sau bước nghiền c., tốt hơn nếu bằng cách bổ sung oxy, khi hỗn dịch nano không cần chứa propan-1,2,3-triol.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hỗn dịch nano này được lọc sau bước c. và tùy ý trước hoặc sau bước d., tốt hơn nếu bằng thiết bị lọc vô trùng, tốt hơn nữa nếu hỗn dịch nano này được lọc đến kích cỡ hạt nhỏ hơn 450nm, và tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 220nm, và hoặc trong đó hỗn dịch nano này còn chứa ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm chất thơm, chất bảo quản, chất hoạt động bề mặt và chất tăng cường tính thấm.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó thể phân tán thu được ở bước b. được nghiền đến kích cỡ hạt (D_{90}) nhỏ hơn 500nm ($D_{90} < 500\text{nm}$), tốt hơn nếu nhỏ hơn 300nm ($D_{90} < 300\text{nm}$), tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 250nm ($D_{90} < 250\text{nm}$), và tốt nhất nếu nhỏ hơn 200nm ($D_{90} < 200\text{nm}$), như được đo bằng thiết bị phân tích nhiễu xạ laze hoặc tán xạ ánh sáng động.

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hàm lượng của hỗn dịch nano được gia tăng trong bước bổ sung e. bằng cách làm bay hơi dung môi, tốt hơn nếu trong buồng sấy, đến hàm lượng của nguyên liệu tự nhiên nằm trong khoảng từ 10% đến 40% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 10% đến 20% (khối lượng/khối lượng), tính theo tổng hàm lượng của hỗn dịch nano, và/hoặc trong đó ít nhất một nguyên liệu tự nhiên có trong hỗn dịch nano ở hàm lượng tạo ra chỉ số hòa tan cao hơn 0,4, hoặc cao hơn 0,5, hoặc cao hơn 0,8, hoặc cao hơn 1, hoặc thậm chí cao hơn 1,1.

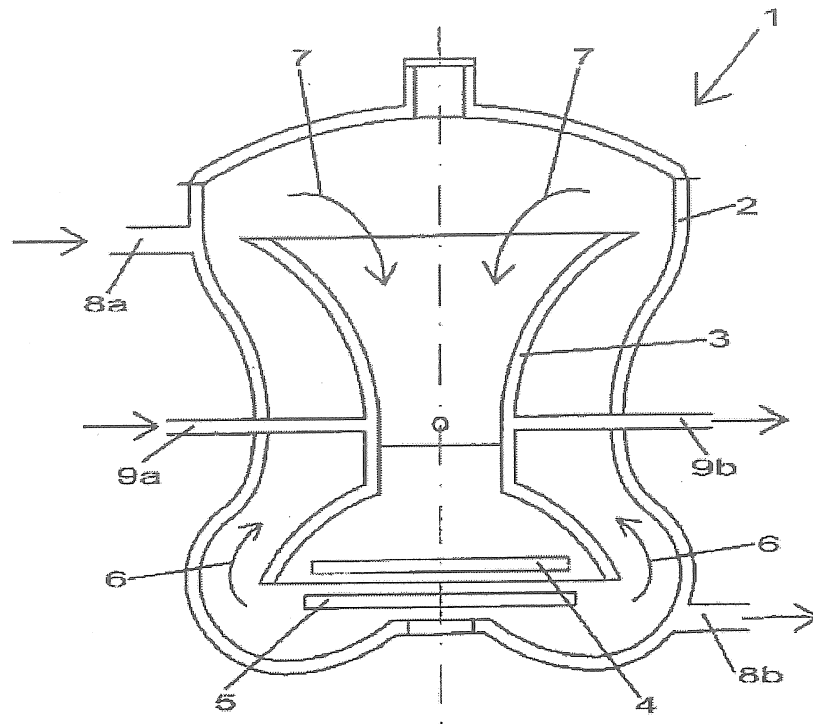


Fig.1

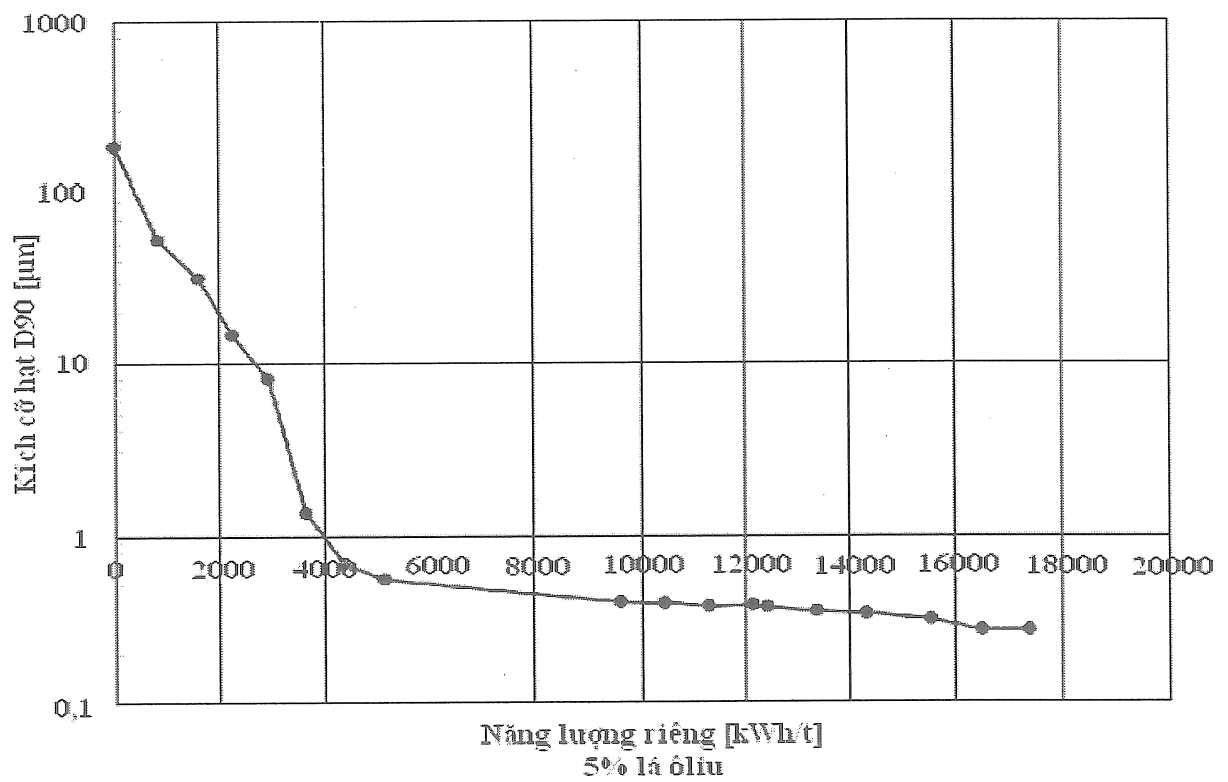
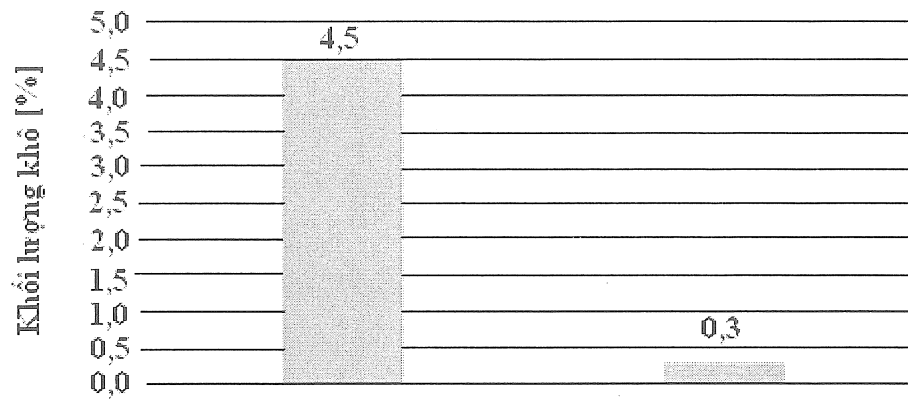


Fig.2



Hỗn dịch nano chứa 5% lá ôliu, Chiết xuất chứa 5% lá ôliu, 2 giờ
lọc bằng màng lọc có kích cỡ 0,45 μ m lọc bằng màng lọc có kích cỡ 0,45 μ m

Fig.3

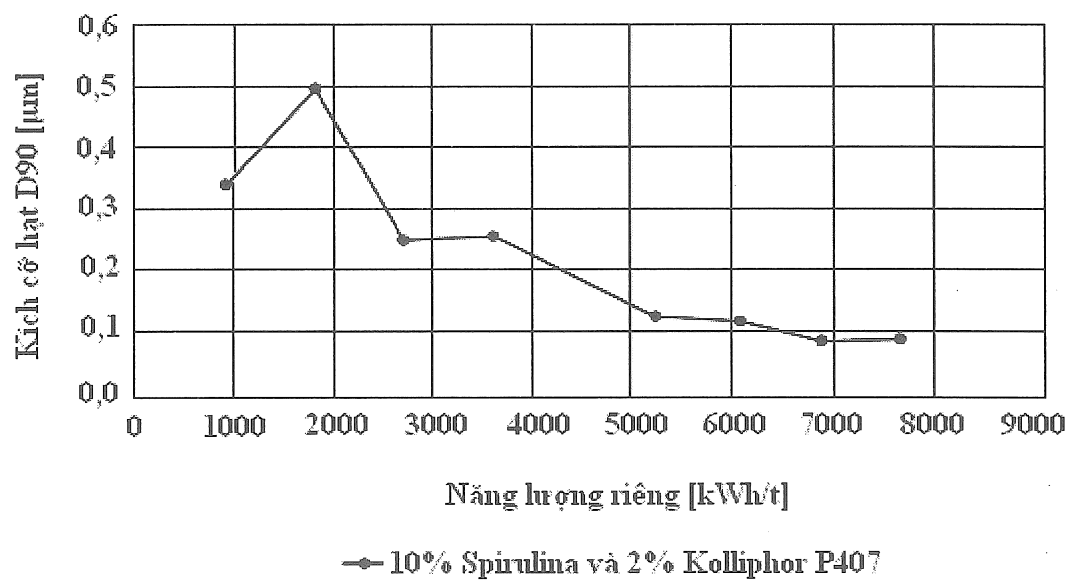


Fig.4

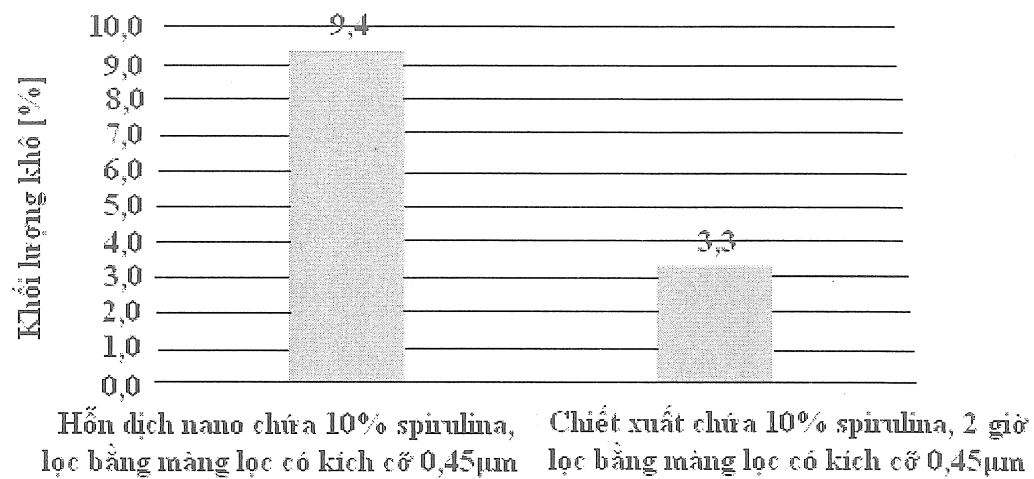


Fig.5

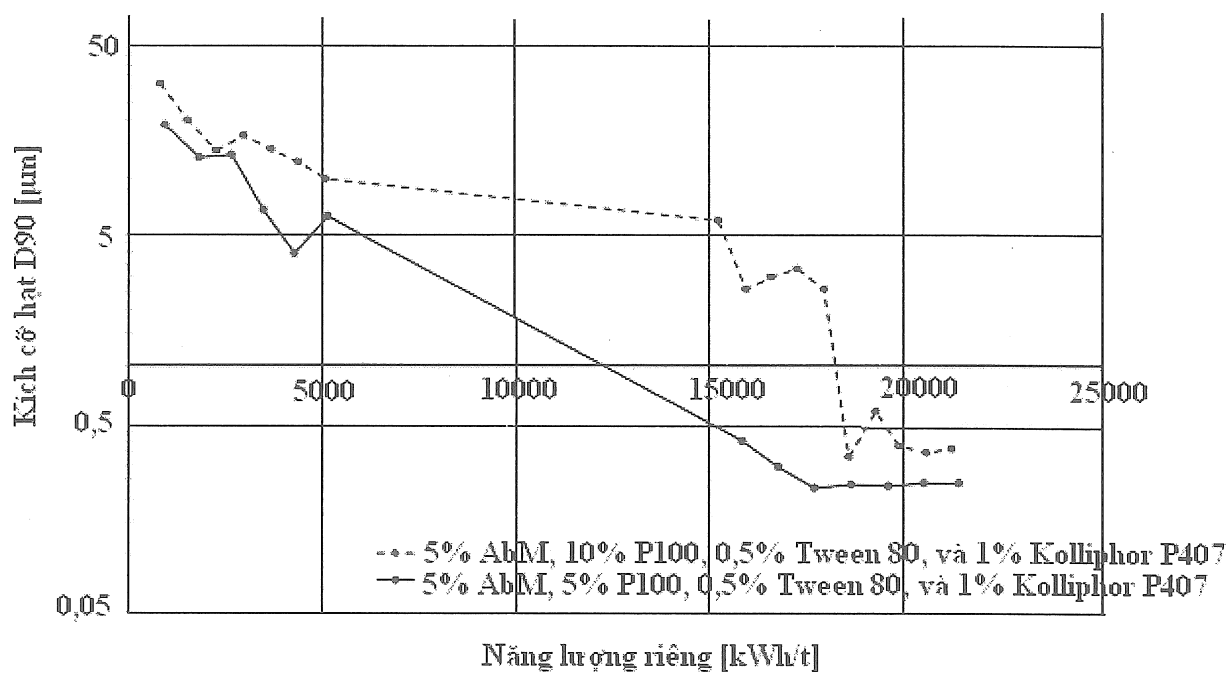


Fig.6

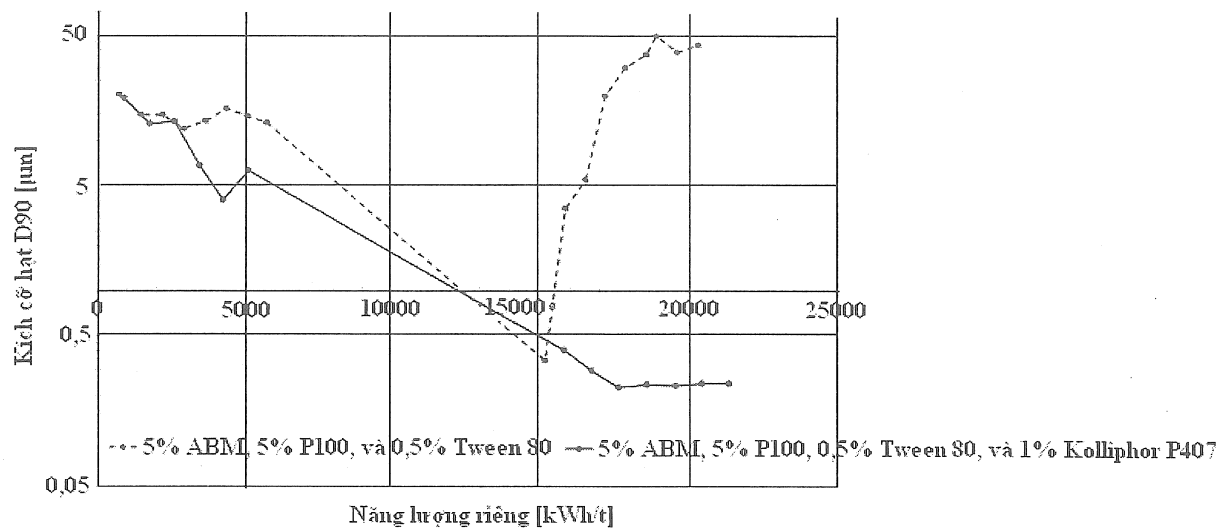


Fig.7

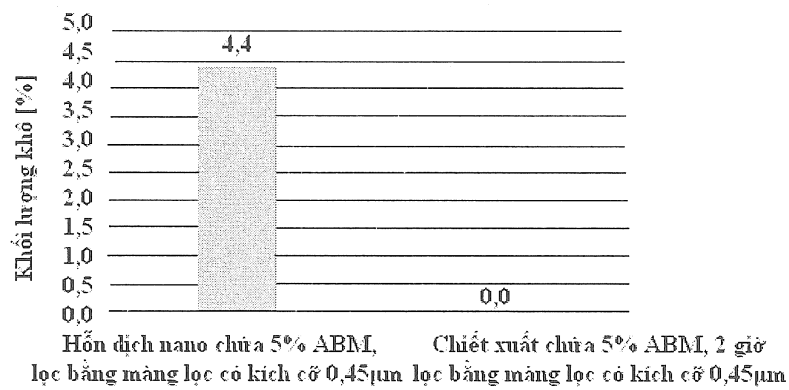


Fig.8

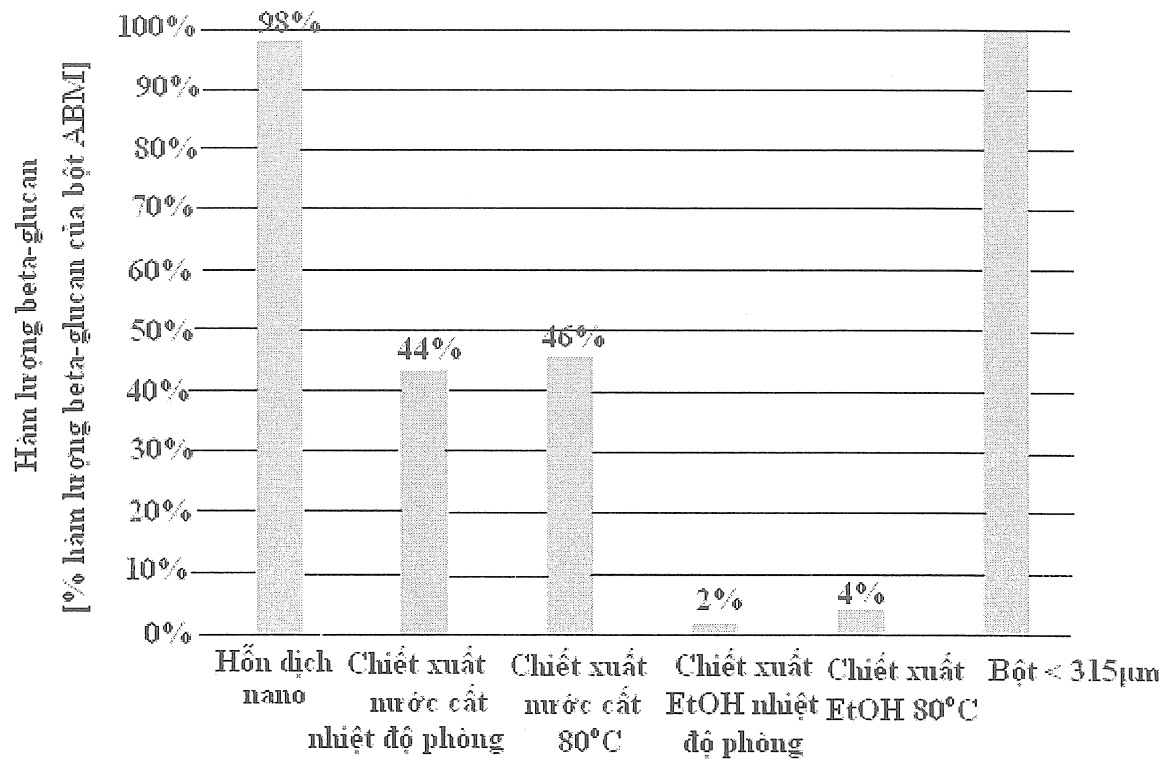


Fig.9

Tác dụng của sự keo hóa đến độ ổn định vật lý

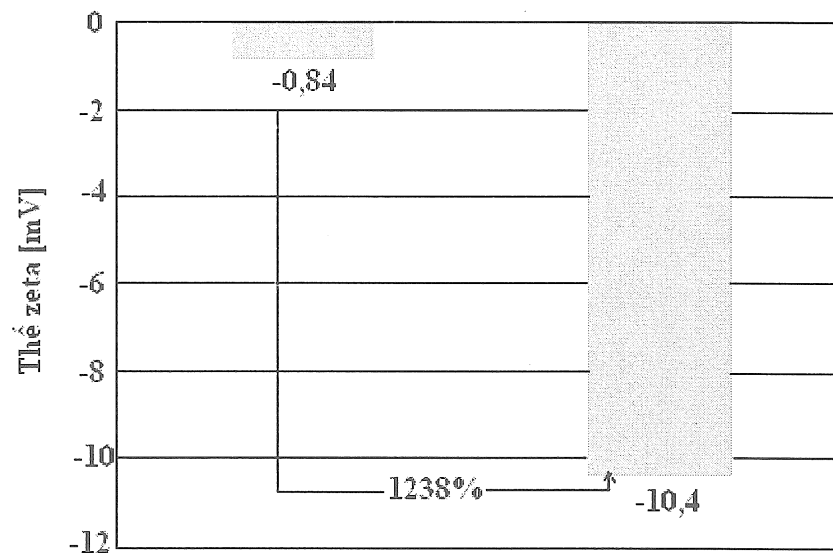


Fig.10

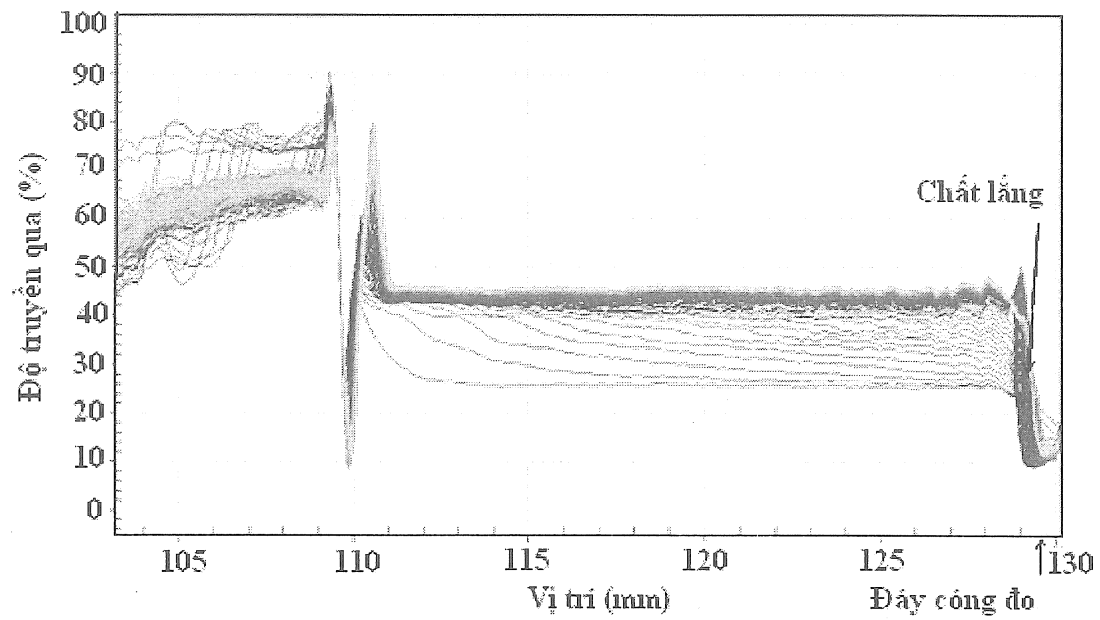


Fig.11

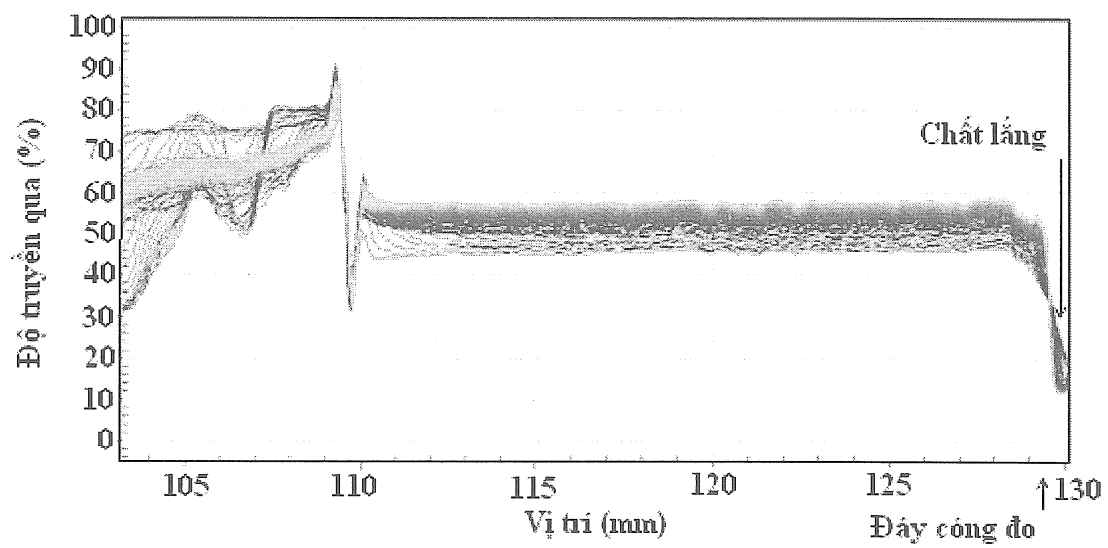


Fig.12

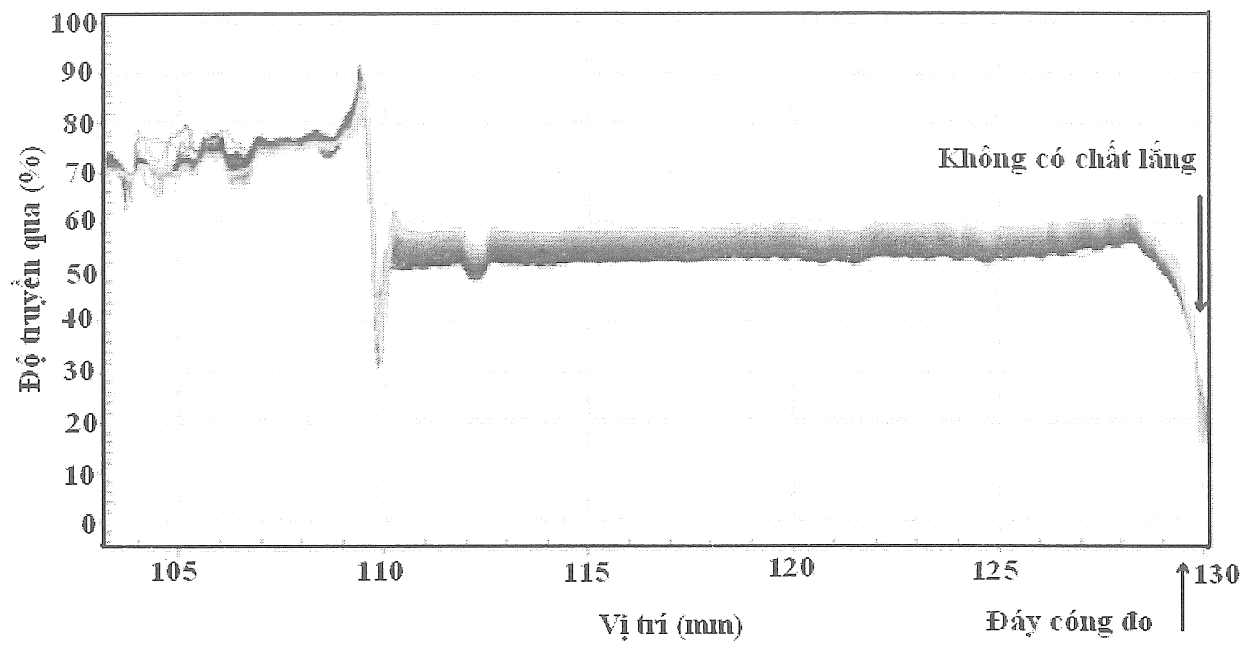


Fig.13

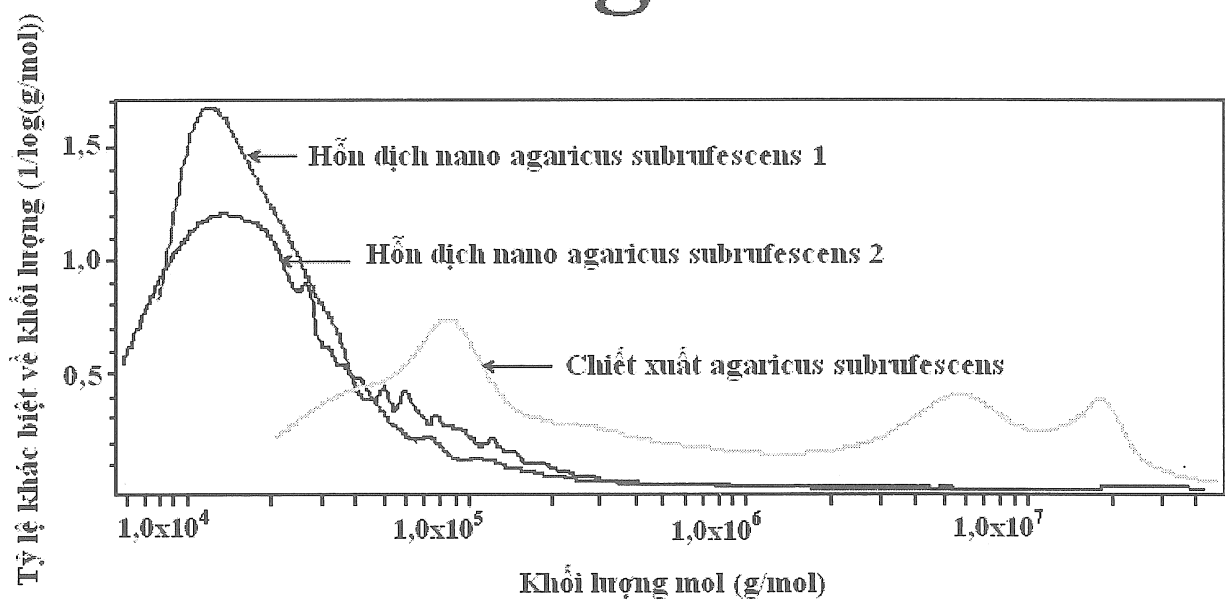


Fig.14

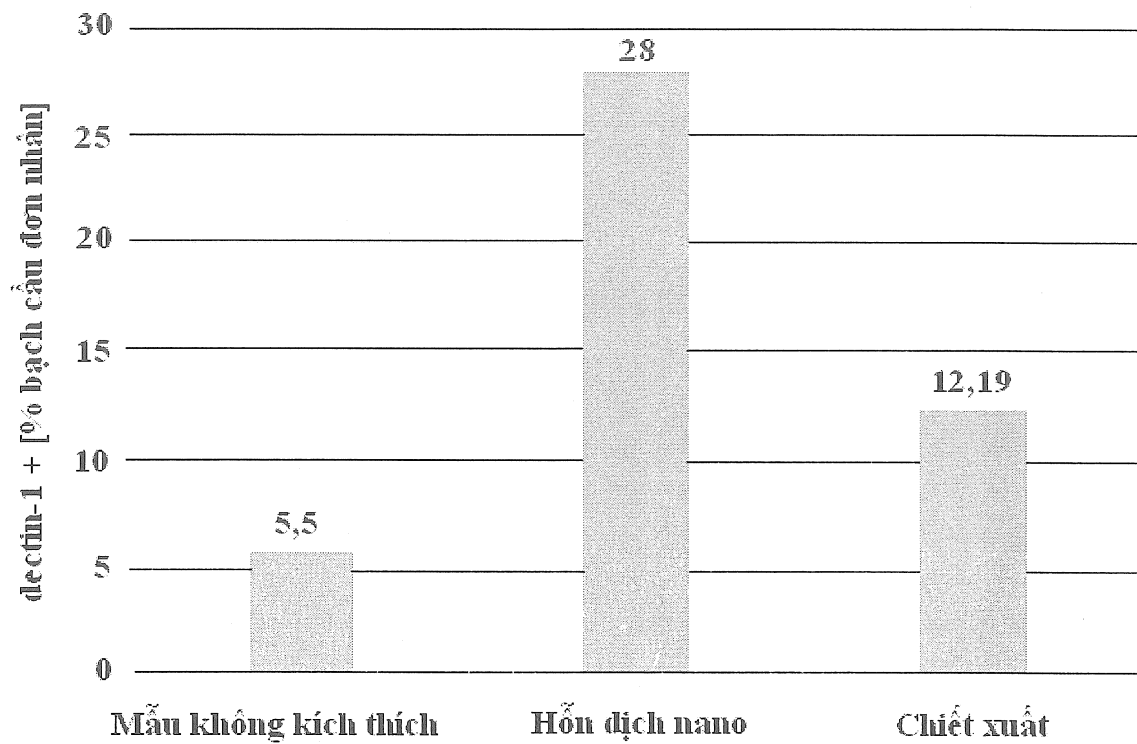


Fig.15

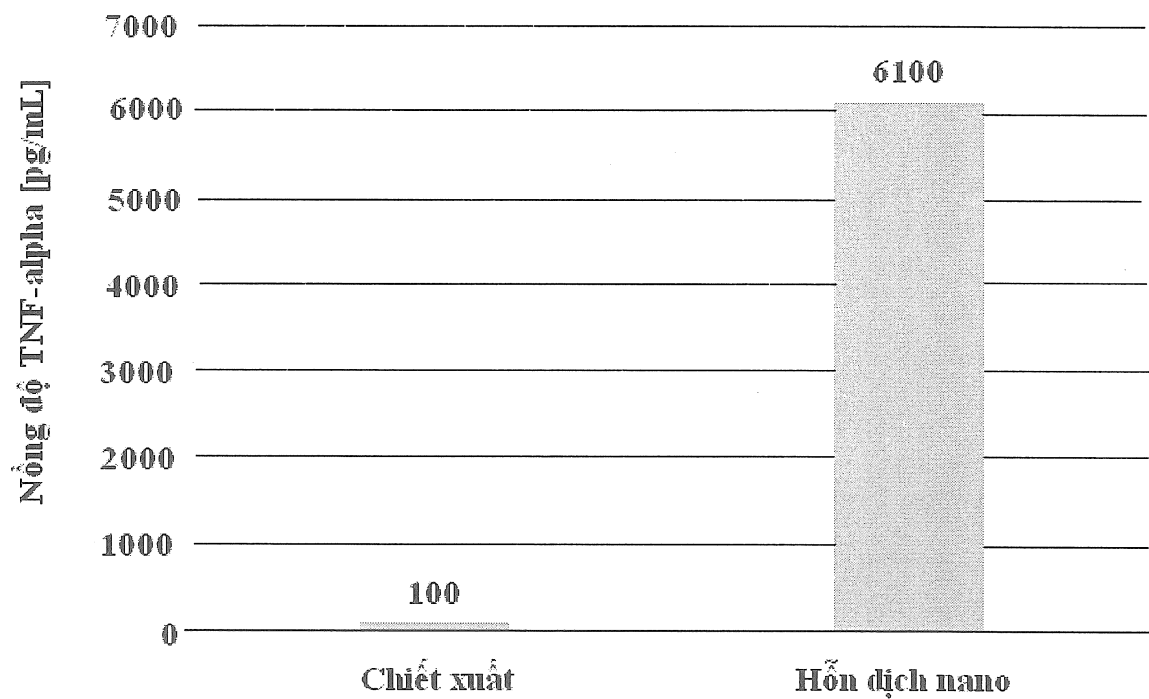
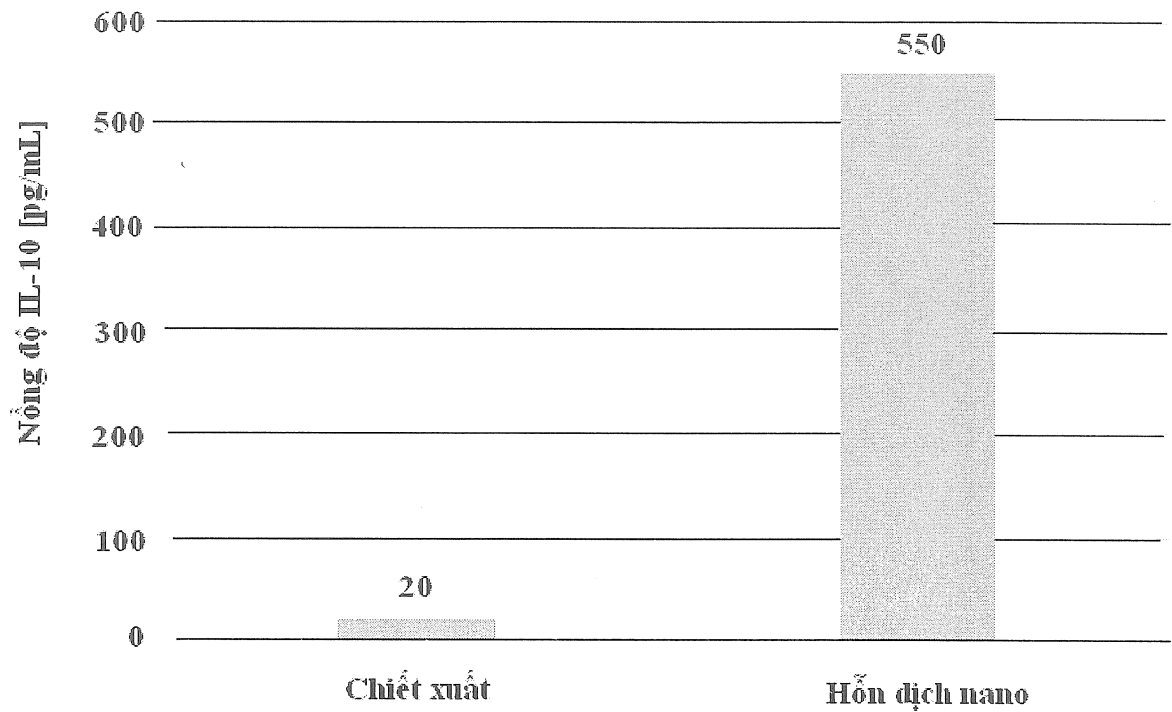
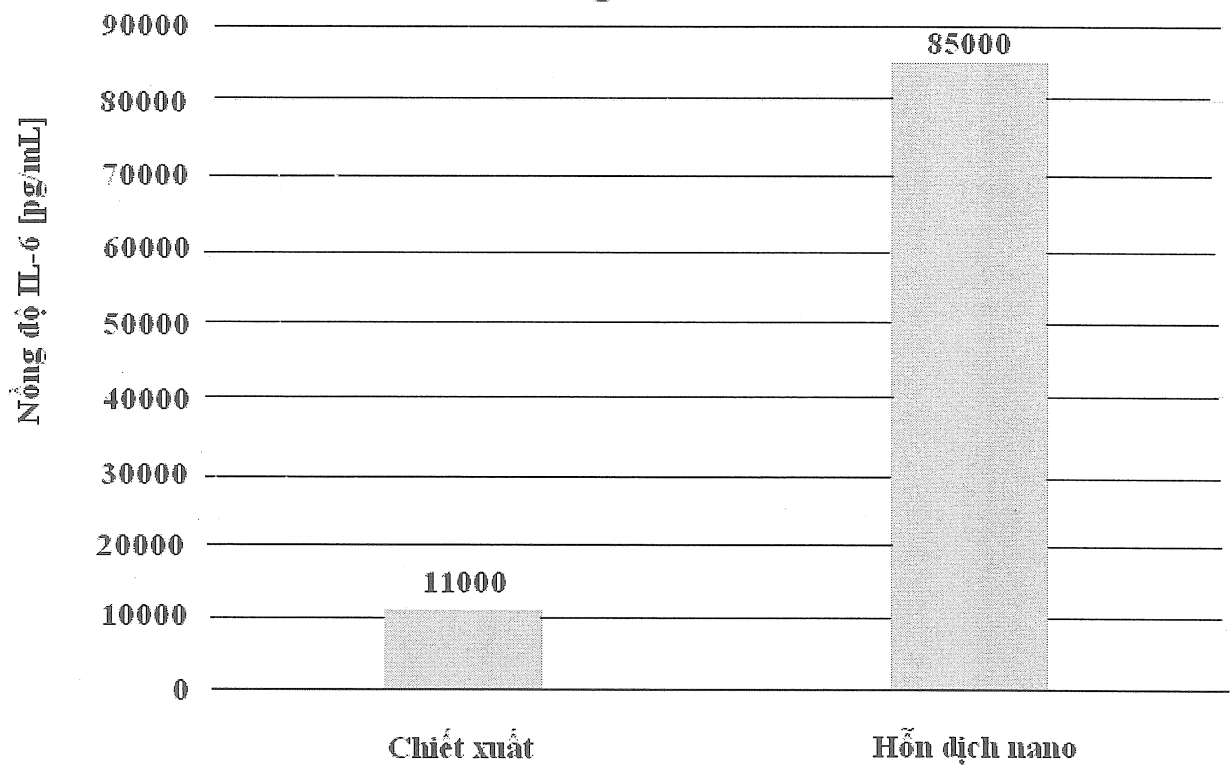
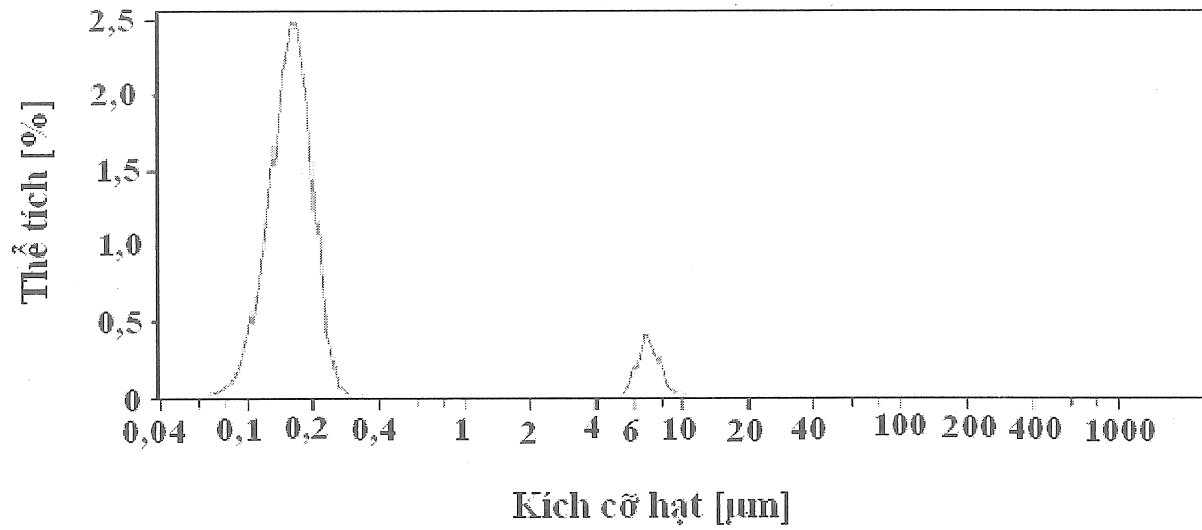
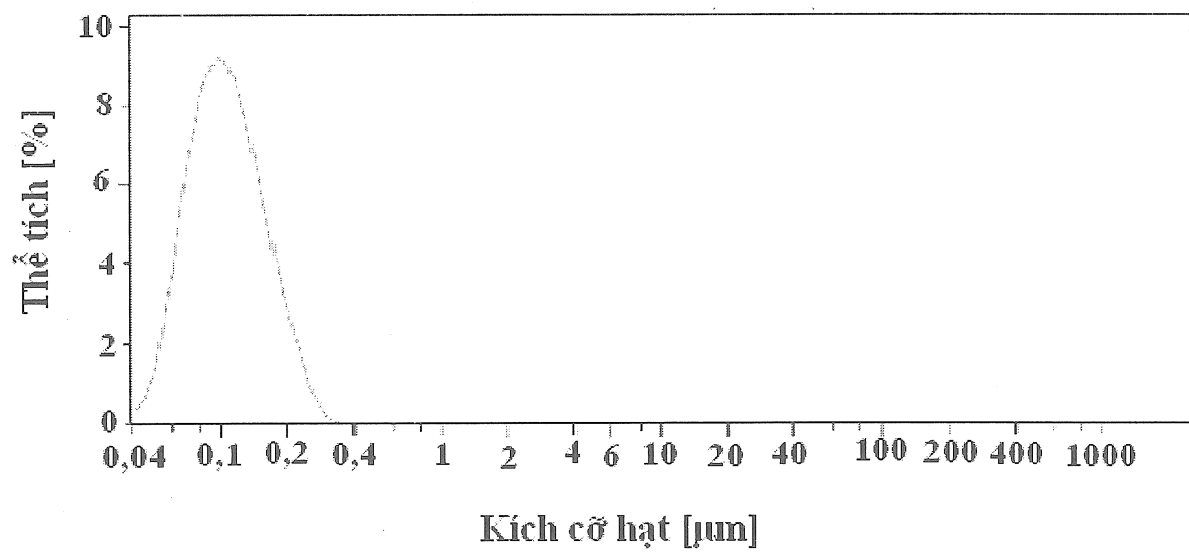


Fig.16

**Fig.17****Fig.18**

**Fig.19****Fig.20**

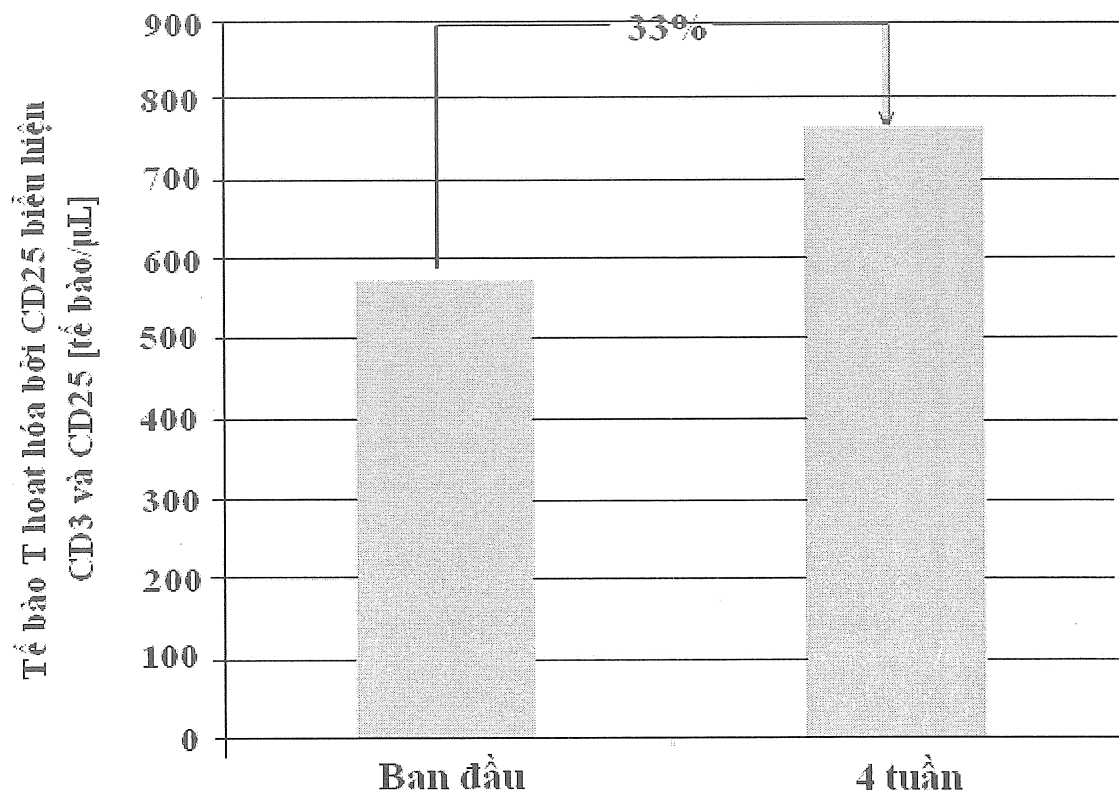


Fig.21

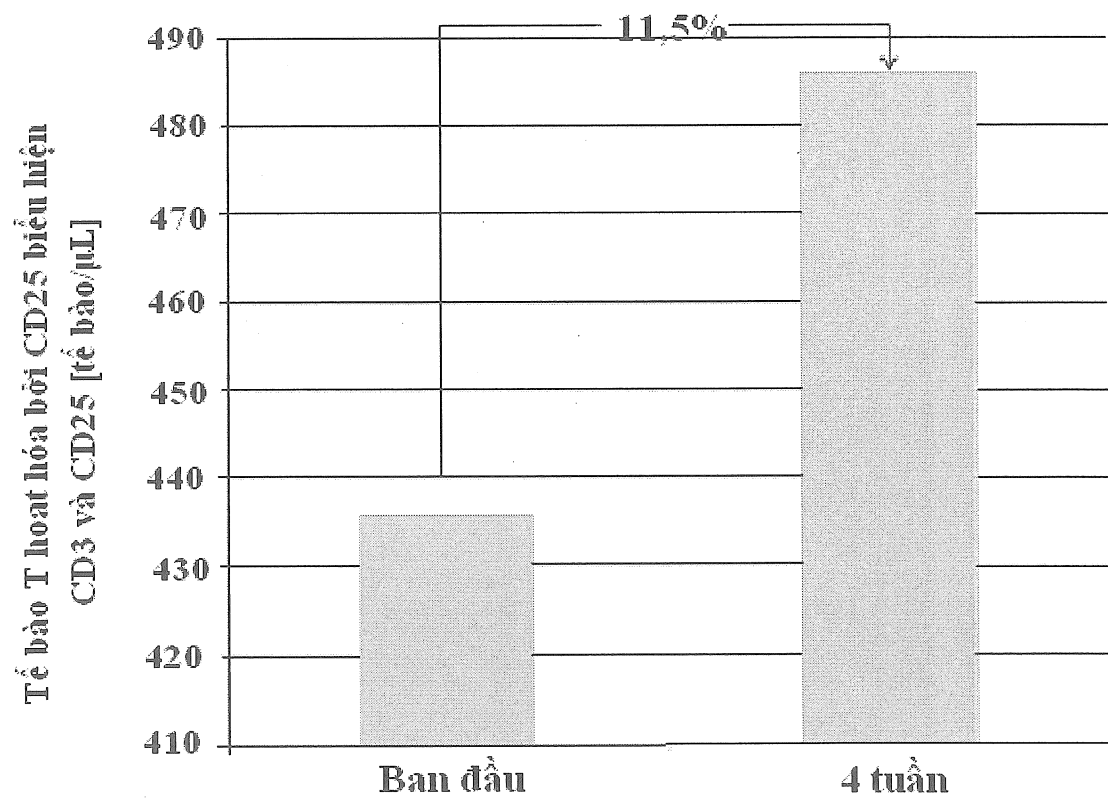


Fig.22