



(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)



1-0030762

(51)⁷ C01G 23/047; B82Y 40/00; C09D 5/14; (13) B
A61K 36/00; B82Y 5/00

(21) 1-2016-00251

(22) 19/06/2014

(86) PCT/MX2014/000094 19/06/2014

(87) WO 2014/204290 24/12/2014

(30) MX/a/2013/007201 20/06/2013 MX

(45) 25/01/2022 406

(43) 25/07/2016 340A

(73) INMOLECULE INTERNATIONAL LIMITED (GB)

16 Great Queen Street, Covent Garden, London WC2B5AH, United Kingdom

(72) LEÓN GUTIÉRREZ, Gabriela (MX).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HỢP CHẤT TITAN DIOXIT HẠT NANO, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HỢP CHẤT TITAN DIOXIT HẠT NANO, VÀ CHẾ PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vật liệu nano composit bao gồm hợp chất titan dioxit hạt nano, phương pháp sản xuất vật liệu nano composit này và chế phẩm chứa chúng. Vật liệu nano composit này bao gồm chất mang oxit kim loại hạt nano, tốt hơn nếu là titan dioxit, có bề mặt và lỗ, cỡ đường kính trung bình nằm trong khoảng từ 1 nm đến 100 nm, và diện tích bề mặt lớn hơn hoặc bằng 50 m²/g, nhóm chức thứ nhất được chọn từ hydroxyl, phosphat, sulfat, clorua, amino, metyl và folat, được hấp phụ hóa học lên bề mặt chất mang, và nhóm chức thứ hai bao gồm các phần chiết từ thảo mộc và/hoặc trái cây được hấp phụ vật lý lên bề mặt chất mang và lỗ.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình tổng hợp và điều chế hỗn hợp các phần chiết từ thảo mộc và trái cây, và hấp phụ nó lên vật liệu nano titan dioxit được biến đổi bằng nhóm chức, có công thức chung là $E/M_aO_{2(c)}(OH)_v(PO_4)_w(SO_4)_xCl_y(NH_2)_z$, trong đó E là dung dịch phức thu được từ phần chiết từ bưởi, chanh, quýt, và các phần chiết từ cây họ cam quýt khác, và M là titan. Cỡ hạt của chất nền, tính axit, cỡ lỗ trung bình của chất nền và cỡ hạt được kiểm soát trong quá trình tổng hợp. Vật liệu nano theo sáng chế được sử dụng để vô hoạt virus, loại bỏ vi khuẩn, vi khuẩn hiếu khí hình que mycobacterium, nấm và các bào tử. Sáng chế dự định sử dụng các hạt nano này để tẩy trùng và sát trùng các bề mặt sinh học và không bị giới hạn ở lĩnh vực ứng dụng cụ thể.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Từ buổi sơ khai, con người đã luôn cố gắng để thay đổi vật chất và gần đây, các nhà khoa học đã đạt được khả năng thao tác trên vật chất, họ có thể thao tác trên các vật liệu ở cấp độ nguyên tử và phân tử thông qua việc sử dụng công nghệ nano đã phát triển từ khoa học lý thuyết sang khoa học thực tiễn trong cuộc sống thường ngày. Ngày nay, công nghệ nano đang được phát triển để ngăn ngừa, chẩn đoán và điều trị các bệnh truyền nhiễm, với một số sản phẩm sắp đi vào giai đoạn thử nghiệm lâm sàng. Các tiến bộ trong lĩnh vực này tăng theo hàm số mũ (1-6). Khoa học nano và các nghiên cứu liên ngành đã tập hợp các nhà hóa học, nhà vật lý học, nhà sinh học và các kỹ sư đang quan tâm đến việc cần thiết phải phát triển các phương pháp thân thiện với hệ sinh thái và phát triển bền vững để tổng hợp vật liệu nano. Có xu hướng tích hợp các phương pháp hóa học xanh vào trong thiết kế các vật liệu và các quy trình thân thiện với môi trường. Cũng đã có những tiến bộ nhanh chóng trong việc tổng hợp các oxit hoặc vật liệu nano kim loại hỗn hợp tương thích sinh học và các oxit lưỡng kim đơn, cũng như biến đổi bề mặt chúng dùng cho các ứng dụng trong hoạt động sinh học và y học nano. Việc sinh tổng hợp các hạt nano là kết quả mới phát hiện giữa việc kết hợp công nghệ nano và công nghệ sinh học đang thu hút ngày càng nhiều chú ý do nhu cầu phát triển các công nghệ thân thiện với môi trường để tổng hợp vật liệu đang tăng

dần. Các phân tử sinh học làm chất thử đã được phát hiện là có ưu điểm lớn hơn so với các phân tử tương đương trong vai trò làm chất bảo vệ (7-13).

Tính chất của vật liệu có thể bị thay đổi đáng kể khi cỡ hạt của chúng giảm xuống mức nanomet. Trong ngành khoa học vật liệu, “phần tử” là thuật ngữ chung để mô tả các vật thể rắn nhỏ có kích thước nằm trong khoảng từ cấp độ nguyên tử (10^{-10}m) đến cấp độ vi mô (10^{-3}m). Tuy nhiên, cỡ phần tử thường được thấy là nằm trong khoảng từ 10^{-9} đến 10^{-5}m . Các phần tử lớn ($> 10^{-6}\text{m}$) thường được gọi là hạt (tức là zeolit, cacbon, kim loại Raney) và các phần tử nhỏ ($<15\text{ nm}$) gồm các oxit hỗn hợp (kim loại), tức là $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$, TiO_2 hoặc SiO_2 (14-20) thường được bổ sung. Tất cả các vật liệu đều chứa các hạt (phần tử) được tạo thành bởi sự kết tụ các hạt nano.

Trong các vật liệu truyền thống, các hạt có kích thước nằm trong khoảng từ 100 micromet đến hàng milimet (mm), trong khi hạt vật liệu nano có kích thước nằm trong khoảng một phần tỉ của mét (10^{-9}). Đường kính trung bình của sợi tóc người vào khoảng một nanomet. Bán kính nguyên tử vào khoảng từ 1 đến 3 Angstrom (Å), và 1 nanomet bằng 10 Å. Vật liệu nano rắn, cứng, bền và mềm dẻo ở nhiệt độ cao, chúng chống lại được sự phân hủy, sự xói mòn và ăn mòn, cũng như rất hoạt động về mặt hóa học. Các tính chất vật lý và hóa học của mỗi vật liệu nano hoặc vật liệu hạt nano được xác định bởi kiểu hợp chất và các tương tác tạo chức cho hạt nano; do đó mật độ electron và lượng hydroxyl trong mạng lưới có vai trò quan trọng trong việc làm đứt gãy ADN gây bệnh.

Một trong các lĩnh vực có tầm quan trọng của hạt nano ngày càng tăng là lĩnh vực tẩy trùng, trong đó sự phân bố hạt có hình dạng và kích cỡ xác định thu được sẽ cải thiện hoạt tính tẩy trùng. Cụ thể, cần đạt được trạng thái các hạt có mức độ phân tán cao với phần lớn các nguyên tử được định vị trên bề mặt hạt. Cấu trúc này bao gồm các thông số như vùng rắn, cỡ lỗ, cũng như là hình dạng và thể tích của lỗ. Các thông số này cũng quan trọng, vì chúng chịu trách nhiệm làm tăng tỷ lệ tẩy trùng. Sự hấp phụ của các nhóm chức lên bề mặt khiến cho chúng có tính chọn lọc đối với các vi sinh vật gây bệnh và sự hấp phụ của các phần chiết từ cây họ cam quýt mang lại cho chúng khả năng tẩy trùng.

Mặc dù hoạt tính này có thể liên quan trực tiếp đến tổng diện tích tiếp xúc giữa vật liệu với sinh vật, việc xác định bề mặt được xem là yêu cầu quan trọng để phân

tích đặc điểm của vật liệu này. Tương tự, cũng cần hiểu rõ bản chất của cấu trúc lỗ vì nó chịu trách nhiệm kiểm soát việc vận chuyển các chất thử và sản phẩm.

Titan dioxit có thể được tìm thấy trong tự nhiên ở ba pha kết tinh: anata, rutin, và brukit (titan oxit) (Fig. 2). Anata và brukit (titan oxit) có thể biến đổi thành rutin ở nhiệt độ cao. Anata có thể biến đổi ngược trở lại thành rutin bằng cách gia nhiệt. Một vài yếu tố góp phần vào việc dịch chuyển pha, như cỡ hạt, hình thái học tinh thể, nhưng cụ thể là, ảnh hưởng của các ion đến sự hấp thụ mạng lưới. Tài liệu kỹ thuật trích dẫn một trong ba pha, anata, có tính ổn định hóa học cao và chống ăn mòn, tương thích với các chất sinh học và có diện tích bề mặt riêng cao. Tuy nhiên, titan oxit trên thị trường là hỗn hợp (Degussa P25) chứa 60 đến 80% anata. Vấn đề duy nhất trong việc thu nhận anata là ở chỗ rutin ổn định hơn về mặt nhiệt động lực học. Cấu trúc của anata và rutin là khối tứ diện, trong khi brukit (titan oxit) là hệ thoi, mỗi nguyên tử titan được liên kết với 6 nguyên tử oxy ở khoảng cách gần như bằng nhau, và mỗi nguyên tử oxy liên kết với ba nguyên tử titan.

Do đó, đang có nhu cầu ngày càng tăng về chất tẩy trùng và chất sát trùng có tác dụng đặc hiệu làm bất hoạt virus và diệt vi khuẩn, vi khuẩn mycobacterium, mycoplasma, nấm, động vật nguyên sinh và các bào tử với hiệu quả cao đã được chứng minh trong việc kháng lại các vi sinh vật này và vi sinh vật khác.

Điều này có mối liên hệ với sự tăng các bệnh truyền nhiễm mới (ví dụ, HIV, cúm và cúm gia cầm) và sự xuất hiện trở lại các bệnh truyền nhiễm đã được kiểm soát trước đó do sự kháng thuốc, do các thay đổi về môi trường và các thay đổi về cách sống. Ngoài ra, việc sử dụng các thiết bị y tế mới, không được khử trùng bằng các kỹ thuật thông thường, như xử lý nhiệt, có thể làm lan rộng một số bệnh truyền nhiễm. Công nghệ nano sẽ có tác động mạnh lên các bệnh truyền nhiễm từ bệnh viện và các bệnh sinh ra từ đó, để cải thiện việc chẩn đoán, ngăn ngừa và phát hiện, các liệu pháp chỉ huy, và các vật liệu kháng khuẩn, kháng virus, kháng nấm, kháng vi khuẩn mycobacterium và diệt bào tử. Theo tài liệu chuyên ngành, hoạt tính kháng vi khuẩn mycobacterium có liên hệ mật thiết với hoạt tính diệt bào tử chủ yếu quay xung quanh *Bacillus Subtilis*.

Các kỹ thuật chẩn đoán kết hợp giữa hệ thống nhận diện với hệ thống phát hiện, bao gồm thanh đỡ (cantilever) di chuyển qua vị trí liên kết kháng nguyên với dây

kim loại nano phát hiện dòng tế bào liên kết miễn dịch.

Để ngăn ngừa, chất diệt vi sinh vật dựa trên công nghệ nano được thử nghiệm khả năng kháng HIV và các virus khác, và hiện nay đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng giai đoạn đầu. Các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm về các vắc xin mới kháng bệnh viêm gan B, bệnh lao, HIV, cúm và lớp phủ bề mặt kháng khuẩn hoặc vật liệu kháng khuẩn, bao gồm các vắc xin và lớp phủ bề mặt hoặc vật liệu dùng trong lĩnh vực y tế, có vẻ có triển vọng. Các lớp phủ bề mặt này có thể làm giảm vấn đề liên quan đến sự bám dính của vi khuẩn hoặc virus lên các bề mặt trong bệnh viện và có tác động có lợi đến sự truyền các vi khuẩn, virus, các bào tử, nấm, v.v... kháng nhiều thuốc (multiresistant) trong bệnh viện mà là vấn đề nghiêm trọng chưa giải quyết được. Titan dioxide có tương tác đặc hiệu với nhiều phân tử sinh học, vi trùng, tảo, tế bào và mô sống. Tương tác đặc hiệu nghĩa là chúng không giống các phản ứng thông thường giữa vật liệu không sống với phân tử sinh học hoặc mô sống. Các tương tác chủ yếu là có lợi trên khía cạnh các ứng dụng công nghệ sinh học. Titan dioxide được biết là tạo thành liên kết trực tiếp với mô sống có thể được sử dụng trong các ứng dụng vật liệu sinh học. Các lĩnh vực ứng dụng khác của titan dioxide gồm bộ cảm biến sinh học, công nghệ mô, liệu pháp gen (gene therapy), sự phân phối có kiểm soát chất trị liệu, và bảo vệ môi trường (21-30).

Tính an toàn đối với vi khuẩn vẫn là mối quan tâm lớn trong các chủ đề ưu tiên về sức khỏe, các tổ chức điều tiết, và các ngành công nghiệp trên toàn thế giới. Thông thường, nhiều chiến lược đã được sử dụng để kiểm soát vi sinh vật. Mặc dù các chất kháng vi sinh vật tổng hợp đã được chấp thuận ở nhiều nước, nhưng gần đây có xu hướng sử dụng các sản phẩm tự nhiên, đòi hỏi việc phát triển các chất kháng vi sinh vật an toàn, hiệu quả và chấp nhận được từ các nguồn thay thế.

Trong những năm gần đây, cụm hạt nano để diệt các phân tử virus, các tương tác virus-tế bào, và các virus gây bệnh, đã được xét đến trong các phương pháp để phát triển và phác thảo chiến lược mới. Rotavirus là chi virus ARN sợi kép trong họ Reoviridae (sợi kép - ds). Virus ARN là nhóm virus đa dạng có khoảng vật chủ rộng (người, động vật, thực vật, nấm và vi khuẩn), có nhiều mảnh hệ gen, tổ chức và số lượng (1 đến 12), và virion (số T, lớp capsid hoặc turet).

Bệnh cúm, thường được biết đến là bệnh cảm cúm, là bệnh truyền nhiễm do

virut ARN gây ra. Hạt virut hoặc virion cúm typ A có đường kính khoảng 80-120 nm và thường có dạng gần giống hình cầu, mặc dù có thể có dạng sợi. Khác với virut thông thường, bộ gen virut cúm typ A không phải là một mảnh axit nucleic đơn, mà là tám mảnh ARN đối nghĩa được chia đoạn (tổng là 13,5 kilobazơ), mã hóa 11 protein (HA, NA, NP, M1, M2, NS1, NEP, PA, PB1, PB1-F2, PB2). Đặc trưng nhất của các protein trong virut này là hemagglutinin và neuraminidaza - hai glycoprotein lớn, được tìm thấy ở bên ngoài hạt virut. Các chất xúc tác sinh học là hạt nano được tạo chức theo sáng chế sẽ phá vỡ các liên kết ARN và cấu trúc protein của loại virus này.

Phân chiết

Thực vật chứa nhiều thành phần và là nguồn giá trị cung cấp các phân tử có hoạt tính sinh học mới có tính kháng khuẩn. Các thành phần này được chiết từ các loại thực vật nhất định hoặc dưới dạng phân chiết tiêu chuẩn hóa hoặc dưới dạng nguồn hợp chất tinh khiết, tạo ra khả năng vô hạn để kiểm soát sự tăng sinh của vi khuẩn nhờ tính đa dạng hóa học của nó. Nhiều phân chiết từ thực vật có hoạt tính kháng khuẩn kháng lại nhiều vi khuẩn, nấm men và nấm mốc khác nhau, nhưng sự thay đổi về chất lượng và số lượng của các thành phần có hoạt tính sinh học vẫn là trở ngại lớn. Sự phát triển của các quy trình phân tách hiệu quả để tạo ra các phân chiết tiêu chuẩn, cũng như đánh giá tính an toàn và độc học của chất kháng khuẩn này cần nghiên cứu thêm (45-47).

Tính kháng khuẩn của tinh dầu (EO) đã được biết đến từ hàng thế kỷ và với nhu cầu thay đổi xu hướng khách hàng ngày càng tăng, cần tìm ra pháp chế và sự phân lập các chất gây bệnh kháng thuốc kháng sinh thay thế cho sản phẩm hóa học dựa trên các thuốc tủy trùng. Dầu từ trái cam quýt không chỉ hữu ích trong thực phẩm, mà chúng còn được chứng nhận là an toàn (generally recognized as safe - GRAS), và được thấy là chất ức chế, ở dạng dầu và hơi, kháng cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Nhóm dầu này có thể cung cấp chất kháng khuẩn tự nhiên, cần để đáp ứng nhiều điều kiện (45-47).

Các tài liệu patent trong tình trạng kỹ thuật

Patent Mỹ số 6,117,814. Patent này mô tả titan oxit chứa chất mang, còn kết hợp cả silic dioxit và nhôm oxit làm chất liên kết trong cấu trúc của nó. Mục đích của chất liên kết này là đem lại tính chất cơ học được cải thiện cho chất mang. Khoảng

kích thước của chất mang là khoảng từ 20 đến 120 micron. Chất mang này chứa khoảng 50% chất liên kết sản xuất bằng quy trình sol-gel.

Patent Mỹ số 6,087,405. Sáng chế này mô tả chất mang cho phản ứng Fischer-Tropsch của khí tổng hợp. Cấu trúc của chất mang này chứa kim loại từ nhóm VII. Tỷ lệ rutin-anata trong cấu trúc này là dấu hiệu phân biệt của sáng chế.

WO/2003/064324. Sáng chế này đề cập đến hợp phần polyme gốc titan oxit. Hợp phần theo sáng chế bao gồm polyme gốc titan oxit $\text{TiO}_x(\text{OH})$ và $(\text{H}_2\text{O})_z$ ($x + y + z = 3$) ở dạng gel hoặc sol. Polyme này, có cấu trúc một chiều (1D), được tạo nên từ các sợi đồng tâm có tính chu kỳ, được suy ra từ khoảng cách giữa các sợi này, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 4. Mỗi sợi bao gồm các khối tám mặt TiO_6 và mỗi khối tám mặt TiO_6 có chung hai mép đối diện với hai khối tám mặt liền kề ($2 \times 2,92 \text{ \AA}$) để tạo thành chuỗi vô tận phát triển dọc theo trục sợi. Theo sáng chế, hai chuỗi liền kề tạo thành các đường kép thu được từ các mép chung ($2 \times 3,27 \text{ \AA}$). Polyme theo sáng chế thích hợp để sử dụng làm yếu tố nhạy quang trong tế bào quang điện, như rèm che cửa sổ.

WO/2006/079757. Phương pháp điều chế dung dịch sol-gel tiền thân gồm oxit ổn định dựa trên chì, titan, ziricon và họ lantan và phương pháp điều chế gồm này. Sáng chế này đề cập đến phương pháp điều chế dung dịch sol-gel tiền thân oxit gồm ổn định dựa trên chì, titan, ziricon và họ lantan. Sáng chế này bao gồm các bước liên tiếp sau: a) điều chế dung dịch sol-gel bằng cách cho tiền chất chì phân tử, tiền chất titan phân tử, tiền chất ziricon phân tử và tiền chất lantan phân tử tiếp xúc với môi trường bao gồm dung môi diol và tùy ý rượu đơn béo; b) để yên dung dịch thu được trong khoảng thời gian đủ lâu để thu được dung dịch có độ nhớt về cơ bản là không đổi; và c) pha loãng dung dịch thu được trong bước trước đó với dung môi diol giống với dung môi được sử dụng trong bước a, hoặc dung môi có thể trộn lẫn với dung môi này, ở tỷ lệ định sẵn. Sáng chế này có thể dùng để điều chế vật liệu gồm oxit chứa chì, kim loại lantan, titan và ziricon.

WO/2007/141590. Các nguồn chứa titan oxit được tạo cấu trúc nano sol-gel để dùng trong việc giải phóng thuốc có kiểm soát ở hệ thần kinh trung ương và phương pháp tổng hợp. Sáng chế này đề cập đến nguồn chứa titan dioxid được tạo cấu trúc nano sol-gel và quá trình tổng hợp tương thích sinh học với mô não của nó. Sự phân

bổ theo cỡ lỗ, kích thước mầm tinh thể và mức độ phân bố pha kết tinh của anata, rutin và brukit (titan oxit) có thể được kiểm soát toàn bộ. Thiết bị này có thể được sử dụng để chứa thuốc về thần kinh. Nó có thể được cài trực tiếp vào mô não nhằm mục đích giải phóng thuốc có kiểm soát thời gian trong khoảng thời gian từ 6 tháng đến ba năm. Patent này sử dụng phương pháp sol-gel và bị hạn chế ở việc sản xuất hạt ngược với phương pháp theo sáng chế trong đó vật liệu sản xuất trước được sử dụng và bề mặt của nó được biến đổi bằng cách ngâm tẩm.

WO93/21969. Vật liệu phủ mới cho các ứng dụng y sinh, đặc biệt là để sử dụng trên các mô cấy y sinh, vật liệu phủ này bao gồm titan oxit có nguồn gốc từ gel, trong đó vật liệu này có khả năng kích thích sự hình thành canxi phosphat trên bề mặt của nó trong điều kiện in vitro, ví dụ trong dịch thể mô phỏng và/hoặc trong điều kiện in vivo, các quy trình điều chế vật liệu phủ, cũng như sử dụng chúng trong công nghệ cấy ghép y sinh.

US 8,404,743 B2. Hợp chất bao gồm phức hợp kẽm oxit liên kết hóa học với một hoặc nhiều phân tử có hydro axit như, ví dụ, axit hữu cơ. Sáng chế này còn đề xuất chế phẩm chứa hợp chất này và phương pháp tạo ra hợp chất này.

US 2012/0244086 A1. Chế phẩm dùng trong nha khoa, chứa phần chiết từ zingiber officinale bằng cách sử dụng vật liệu có nguồn gốc từ kẽm, có tính kháng khuẩn.

US 2012/0237455 A1. Chế phẩm dùng qua đường miệng, chứa phần chiết từ zizyphus joazeiro bằng cách sử dụng vật liệu có nguồn gốc từ kẽm, có tính kháng khuẩn.

EP 1,981,513 A2. Chế phẩm chăm sóc da tại chỗ chứa phần chiết từ kakadu plum hoặc phần chiết từ acai berry, hoặc kết hợp cả hai. Chế phẩm này có thể có giá trị về khả năng hấp thụ gốc oxy hóa (oxygen radical absorbance capacity - ORAC) cao. Chế phẩm này có thể cải thiện về bề ngoài, chức năng sinh lý, các tính chất lâm sàng, và/hoặc các tính chất lý sinh của da. Hạt nano không được sử dụng trong tài liệu này, nhưng sáng chế này thể hiện tính kháng khuẩn.

US 2012/0225147 A1. Chế phẩm dùng tại chỗ để cải thiện về mặt nhìn đối với bề ngoài của da, chứa lượng hữu hiệu của phần chiết từ Malpighia punicifolia

(acerola), *Myrciaria dubia* (camu camu), và *Ribes nigrum* (phúc bồn tử đen - black currant), và chất dẫn thuốc chấp nhận được đối với da bao gồm nước, glycerin, dimethicon hoặc xyclomethicon, axit stearic, cacbome, và natri hydroxit. Nó thể hiện tính kháng khuẩn.

EP 2,099,429 A2. Hạt nano dạng mixen bao gồm polyetylen glycol (PEG), phospholipit, cholesterol, glycolipit axit béo, axit mật, và saponin bọc độc tố botulin để giảm tác dụng gây độc của nó. Chúng thể hiện tính kháng khuẩn.

US 8,372,382 B2. Nhũ tương dầu trong nước không ion chứa ít hơn 50% trọng lượng nước, hỗn hợp chất nhũ hóa không ion và chất ổn định nhũ tương không ion, hỗn hợp các chất điều hòa độ ẩm da, chất làm ẩm và hỗn hợp chất hấp thụ UV. Nhũ tương có thể ổn định và có SPF là ít nhất 30. Hạt nano không được dùng trong đó, nhưng sáng chế này thể hiện tính kháng khuẩn.

EP 2,470,159 A1. Chế phẩm và phương pháp điều trị cho da bao gồm sự kết hợp tương thích về mặt hóa học các thành phần hoạt tính cho da bao gồm palmitoyl tetrapeptit-7, metylsilanol mannuronat, và *Lactobacillus ferment*, sự kết hợp tương thích về mặt hóa học của các thành phần hoạt tính cho da bao gồm các phần chiết từ thực vật từ *Punica granatum*, *Castanea sativa*, *Gossypium hirsutum*, và *Euterpe oleracea*, và chất dẫn thuốc chấp nhận được đối với da. Chế phẩm này có thể đặc trưng ở chỗ chúng có thể ở lại trên da người trong khi ngủ. Hạt nano không được sử dụng trong chế phẩm này, nhưng sáng chế này thể hiện tính kháng khuẩn.

US 5,792,793 A. Phức hợp tạo thành bởi sự kết hợp giữa hợp chất chứa nhóm thiol và ion bạc; chất kháng khuẩn, kháng nấm, và kháng virus chứa thành phần giống như chất hoạt tính; và chất kháng khuẩn, kháng nấm, và kháng virus tương thích với các chất dẫn thuốc và chất mang khác nhau, giữ được hoạt tính của nó trong thời gian dài, và giảm độc tính khi dùng qua đường miệng, giảm kích ứng da và kích ứng niêm mạc.

EP 2,448,416 A1. (từ WO/2011/002929A1) Chế phẩm bảo quản kháng khuẩn chứa nồng độ phần chiết từ thực vật thấp, trong các kết hợp hiệp đồng với các alkandiol trong hệ dung môi, tùy ý với các axit từ trái cây. Ngoài ra, sáng chế này đề cập đến chế phẩm bảo quản hoặc có tính kháng khuẩn chứa hợp chất bạc, tinh dầu hoặc thành phần riêng biệt, một hoặc nhiều muối kẽm, và một hoặc nhiều alkandiol.

Chế phẩm theo sáng chế này có thể dùng trong các sản phẩm chăm sóc cá nhân bao gồm các sản phẩm chăm sóc vết thương hoặc dùng trong thú y. Tốt hơn là, chế phẩm theo sáng chế này có ít mùi hoặc không có mùi phát hiện được trên người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích chính của sáng chế là sử dụng công nghệ nano để phát triển vật liệu nano titan dioxit với phần chiết từ thảo mộc hoặc trái cây được hấp phụ lên bề mặt của vật liệu này để sử dụng trong việc làm bất hoạt loại virus bất kỳ, và tiêu diệt vi khuẩn, nấm, mycoplasma, mycobacterium, động vật nguyên sinh và bào tử.

Việc tối ưu hóa vật liệu nano này cho phép kiểm soát được các thông số sau: tính axit của chất mang, diện tích theo BET, sự phân bố cỡ lỗ, cỡ hạt, mức độ tạo chức, sự phân tán phần chiết đã hấp phụ lên chất mang là lớn để thu được hoạt tính phá vỡ các liên kết CC và CN của protein, ARN và ADN cao ở vi sinh vật gây bệnh. Đáng nói là tất cả các phần chiết có chất mang nền này được phân tán toàn bộ qua chất mang để thu được hiệu quả bề gãy (crackinh) cao ở các liên kết CC và CN của protein và nucleotit.

Chất mang vật liệu nano là oxit kim loại vô cơ hạt nano được tạo chức nhờ quá trình ngâm tẩm. Vật liệu này được tạo chức và được phân tán đều với các phần chiết có cỡ hạt nhỏ (0,3-10 nm).

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề hiện tại của chất tẩy trùng, phần lớn trong số chúng là chất gây ô nhiễm, chất gây kích ứng, độc tố, chất không phân hủy sinh học được hoặc thậm chí là chất gây ung thư. Ngoài tính chọn lọc, không có tác hại nào gây ra đối với con người, đây là ưu điểm khác nữa đối với chất tẩy trùng không độc.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình minh họa hệ thống tách chiết hoạt chất từ thảo mộc và trái cây và dầu hữu cơ.

Hệ thống này là hệ thống cuộn hơi truyền thống có bình tạo hơi thứ nhất. Bình thót cổ thứ hai được cho nguyên liệu thô, mà nguyên liệu thô này sẽ đi qua quá trình tách chiết, và bình thót cổ thứ ba để gom chất lỏng.

Fig. 2 là hình minh họa pha kết tinh của titan dioxit.

Pha kết tinh của titan dioxit: anata, rutin và brukit (titan oxit). Pha anata ổn định meta và có oxy nằm phía ngoài tinh thể.

Fig. 3 là hình minh họa phổ hồng ngoại của vật liệu nano titan dioxit.

Fig. 4 là hình minh họa phổ nhiễu xạ tia X xác nhận sự có mặt của pha anata của titan dioxit.

Fig. 5 là hình minh họa việc soi kính hiển vi điện tử xác nhận cỡ hạt.

Việc soi kính hiển vi điện tử quét thấy được các cụm hạt nano có kích thước nằm trong khoảng từ 1 đến 100 nm. Việc soi kính hiển vi truyền qua chỉ ra sự tồn tại của các hạt $\leq 1-2$ nm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến thể liên hợp của vật liệu nano titan dioxit với phần chiết từ thảo mộc và/hoặc trái cây được hấp phụ lên bề mặt vật liệu, được tổng hợp bằng quy trình ngâm tẩm công nghiệp, sử dụng oxit vô cơ hạt nano (1-100 nm) làm chất mang. Các hạt nano oxit được tạo chức bằng các nhóm chức hữu cơ, các gốc vô cơ và các phần chiết từ thực vật được hấp phụ trên đó, tạo ra tính kháng khuẩn. Với cấu trúc như vậy, vật liệu nêu trên có khả năng tẩy trùng và sát trùng cao để diệt vi khuẩn, nấm, vi khuẩn mycobacterium, bào tử, vi khuẩn mycobacterium, động vật nguyên sinh và virus.

Vật liệu nano này thu được bằng cách sử dụng quy trình ngâm tẩm, làm biến đổi bề mặt vật liệu và phân tán các hạt tách chiết từ cây họ cam quýt có kích thước từ 0,3 đến 10 nm qua bề mặt chất mang.

Các yếu tố quan trọng trong việc thiết kế vật liệu chất mang

Cấu trúc tinh thể	Oxit kim loại kết tinh
Hợp phần hóa học	$E/M_aO_{2(c)}(OH)_v(PO_4)_w(SO_4)_xCl_y(NH_2)_z$ trong đó E là dung dịch phức hợp tách chiết; M là kim loại
Kích thước hạt, phần tử hoặc tinh thể	Sự phân bố từ 1 đến 100 nm
Bề mặt	50 m ² /g

Tách chiết chất hoạt tính từ thảo mộc và/hoặc trái cây

Quy trình sản xuất các phần chiết bao gồm hai bước. Đầu tiên, bước có etanol (etanolic) trong đó hạt, lá, vỏ quả (peel) và vỏ hạt (shell) của các trái cây lựa chọn, các trái cây này là nho, quýt, cam, bưởi, chanh, ổi, trong số các loài thực vật khác, được cho tiếp xúc với dung dịch rượu etylic ít nhất là 70% trong điều kiện khuấy không đổi ở tốc độ trong khoảng từ 100 đến 400 vòng/phút, ở nhiệt độ trong khoảng từ 30 đến 50°C, trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ. Phần rượu được loại khỏi phần chiết bằng cách lọc.

Phần bã thảo mộc được gom từ bước etanol trong hệ thống như được thể hiện trên Fig. 1, trong đó nước cất được đổ vào bình thót cổ thứ nhất và gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100 đến 130°C. Hơi tạo ra được chuyển qua ống sang bình thót cổ khác trong đó có phần bã thảo mộc và được giữ nóng ở nhiệt độ từ 40 đến 60°C. Hơi được gom lại ở đường ra của bình thót cổ thứ hai trong thiết bị ngưng có nước lạnh tuần hoàn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 4°C. Chất lỏng thu được được trộn với dung dịch thu được ở bước thứ nhất.

Hỗn hợp được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Chất lỏng thu được có màu thay đổi, phụ thuộc vào loại thực vật và trái cây sử dụng, không nhớt, có vị đắng mạnh và độ pH từ 2 đến 5.

Tạo chức cho chất mang

Quy trình tạo chức cho chất mang được cải thiện để bao gồm phần chiết.

Các khía cạnh quan trọng của vật liệu nano là các khía cạnh về đặc điểm hóa học của nó. Trước hết, khía cạnh mang lại tính đặc trưng cho sáng chế dưới dạng công nghệ nano, là một trong số các khía cạnh chính của nó và có ưu điểm trong việc loại bỏ vi sinh vật, ở chỗ nó có cỡ hạt nằm trong khoảng từ 1 đến 100 nm và có cấu trúc tinh thể, điều này cũng quan trọng vì nguyên tử oxy của vật liệu phải nằm phía ngoài tinh thể để cho phép sự tiếp cận của các nhóm chức hoặc quá trình thêm nhóm chức cũng như sự hấp phụ phần chiết.

Đối với quy trình khởi đầu, cần chuẩn bị các dung dịch có các nhóm chức hydroxyl, phosphat, sulfat, clorua, amino, metyl, và phosphat ở nồng độ 1,4 %. Đối với dung dịch này, các chất tan sau được sử dụng:

Bảng 1. Các tiền thân nhóm chức tạo ra tính chọn lọc cho vật liệu nano.

hydroxyl	phosphat	sulfat	clorua	amino	metyl	folat
Nước	Natri phosphat	Natri sulfat	Natri clorua	etyl amin	Metanol	Axit folic
Etanol	Axit phosphoric	Axit sulfuric	Axit clohydric	Axit gamma- amin-butyric	Axit formic	Axit pteroyl glutamic

Vật liệu nano titan dioxit được sản xuất trước trong công nghiệp được mua từ nhà cung cấp đã chọn, ưu tiên Degussa P25, đáp ứng các đặc điểm diện tích bề mặt là $50 \text{ m}^2/\text{g}$ và cỡ hạt nằm trong khoảng từ 1 đến 100 nm, được cho vào bình thót cổ cùng với nước ở tỷ lệ oxit-nước là 1:200. Quá trình khuấy được đặt ở tốc độ không đổi trong khoảng từ 100 đến 400 vòng/phút, và từ điểm đó nhiệt độ được duy trì trong khoảng từ 30 đến 100°C . Điều kiện khuấy và nhiệt độ phải được duy trì trong các khoảng này trong toàn bộ quá trình.

Các dung dịch đã chuẩn bị trước đó được thêm nhỏ giọt hoàn toàn một lần đến hết, theo thứ tự đã nêu, duy trì khuấy toàn bộ huyền phù ở tốc độ trong khoảng từ 100 đến 400 vòng/phút. Khi đã bổ sung xong một dung dịch, dung dịch tiếp theo cần được bổ sung sau khi chờ từ 5 đến 30 phút. Thời gian chờ là để cho phép sự hấp phụ của mỗi nhóm chức lên bề mặt vật liệu xảy ra hoàn toàn trước khi thêm dung dịch tiếp theo.

Sau đó, nó được sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 100°C để loại bỏ chất lỏng còn lại bất kỳ.

Sự hấp phụ phân chiết

Để thực hiện việc kết hợp các phân chiết, oxit sử dụng cần có diện tích bề mặt lớn hơn hoặc bằng $50 \text{ m}^2/\text{g}$.

Các phân chiết thêm vào chất mang có thể từ các phần khác nhau của cây như hoa, chồi, hạt, lá, vỏ cây, cỏ, gỗ, quả và rễ; cũng như từ các cây khác nhau như cây họ cam quýt, cây nho, cây lựu, vỏ cây như quế và hạt như hạt tiêu, lá như bạc hà, và nhiều phân chiết từ thực vật khác, mà đã chứng minh là có tính kháng khuẩn.

Dung dịch nước có 70% phân chiết được rót vào bình thót cổ trong điều kiện

khuấy không đổi ở tốc độ trong khoảng từ 100 đến 400 vòng/phút, sau đó tiếp tục ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 50°C, và vật liệu nano titan dioxit đã xử lý trước đó được thêm từ từ để kết hợp các nhóm chức từ quy trình trước, và duy trì khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 100 đến 400 vòng/phút trong 24 giờ.

70% dung dịch này gồm hỗn hợp chia phần của các phần chiết từ ít nhất ba nguồn thảo mộc hoặc trái cây, ví dụ quýt, bưởi, cam và chanh.

Thử nghiệm mô tả đặc điểm

Trong các thử nghiệm ví dụ này, titan oxit được sử dụng làm chất mang.

Phổ truyền hồng ngoại thể hiện dải trung tâm ở 3667 cm^{-1} . Dải này thu được do sự dao động kéo giãn nhóm OH. Thông thường, dải này được quan sát thấy ở 3700 cm^{-1} với titan dioxit tinh khiết, và nó là do sự có mặt của nhóm hydroxyl đầu tận, mà bởi các dao động kéo giãn OH, dẫn đến cả các vị trí axit Lewis và Brönsted. Các dao động uốn OH được đặt ở trung tâm ở 1633 cm^{-1} . Các dải hồng ngoại kết hợp với các dao động kéo giãn của nhóm amin được quan sát thấy ở 3230 cm^{-1} . Các quan sát này là phù hợp với thực tế rằng phức hợp có thể chỉ mất một nguyên tử và có khả năng xảy ra một vài sự phân rã của phức hợp này do TiO bất kỳ. Nằm trong vùng phổ năng lượng thấp, dải rộng ở giữa được quan sát thấy ở 1095 cm^{-1} có gờ ở 1228 cm^{-1} . Các dải này thu được do các dao động kéo giãn (-O-Si-O-). Vật liệu nano có một số đặc điểm khi được quan sát từ phổ hồng ngoại. Cụ thể, dải biến dạng HNH ở trung tâm ở 1548 cm^{-1} và dải duỗi không đối xứng ở 3230 cm^{-1} là rõ ràng. Phổ UV-Vis và phép phân tích nhiệt cho thấy rằng khi phần chiết từ trái cây họ cam quýt được hấp phụ lên bề mặt vật liệu nano, nhiệt độ phân rã và nhiệt độ bay hơi của nó tăng, có nghĩa là phần chiết được bảo vệ khỏi các yếu tố môi trường, do đó kéo dài tuổi thọ hữu ích của nó cũng như kéo dài thời gian sử dụng hoặc thời gian bảo quản của nó. Phổ hồng ngoại được thể hiện trên Fig. 3, và phổ nhiễu xạ tia X xác nhận sự có mặt của pha anata được thể hiện trên Fig. 4.

Vật liệu này có tính tẩy trùng và sát trùng vì thế nó có thể được sử dụng trong sản phẩm làm sạch, tẩy trùng, sát trùng và làm lành vết thương. Về mặt này, nó có thể được bao gồm trong các chế phẩm đa dạng, có thể bao gồm:

Thành phần	Giá trị nhỏ nhất (%)	Giá trị lớn nhất (%)
Vật liệu hạt nano	0,0001	40
Nước mềm	10	98
Natri lauryl sulfat	10	70
Natri lauryl ete sulfat	10	70
Amoni lauryl sulfat	10	70
Amoni lauryl ete sulfat	10	70
Monoetanolamin lauryl sulfat	10	70
Natri lauryl ete sulfosuxinat	10	70
Trietanolamin lauryl sulfat	10	70
Dexyl polyglycosit	10	70
Alkyl polyglycosit	10	70
Cocoamidopropyl betain	10	70
dietanolamin axit béo từ dừa	10	50
Polyetylen glycol	10	10
Propylen glycol	10	40
Axit etylendiamintetraaxetic (EDTA)	10	10
Axit xitric	10	20
Natri clorua	10	30
Glyxerin	10	50
Dầu khoáng	10	50
Dầu cọ dừa với etylen oxit	10	50
Axit stearic	10	70
Copolymer acrylat/acrylamit	10	40
Polysorbat 85	10	40
Copolymer natri acrylat	10	20
Copolymer natri acrylometyl taurat	10	20
Trideceth 6	10	20
Axit polyacrylic	10	20
Trietanolamin	10	20
Gôm xanthan	10	20

Gôm gua	10	20
Hương	10	20
Chất mùi vị	10	20
Màu vàng trứng	0	0,1
Màu đỏ số 6	0	0,1
Màu Rhodamin	0	0,1
Màu vàng chanh	0	0,1
Màu xanh anilin	0	0,1
Màu xanh lá emerald	0	0,1
Màu cam	0	0,1
Màu xanh lam số 1	0	0,1
Màu xanh lục số 5	0	0,1
Màu vàng số 5	0	0,1
Màu xanh lục số 8	0	0,1
Màu tím Woll	0	0,1

Thử nghiệm hoạt tính diệt virus

Môi trường nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào MDCK được nuôi cấy trong bình thót cổ 25 cm² với môi trường thiết yếu tối thiểu (minimum essential medium - MEM) (Gibco/BRL, NY, USA) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (Invitrogen, Mêhicô D.F.) và thuốc kháng sinh (penixilin 100 IU/mL, streptomycin 100 mg/mL và amphotericin B 10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis M. USA) ở 37°C với 5% CO₂ được sử dụng. Tế bào cần được cho phát triển đến khi tỷ lệ hợp dòng là 80%.

Chuẩn độ virus bằng phân tích ngưng kết hồng cầu (hemagglutination assay - HA)

Trong các ống nghiệm hoặc trên đĩa giếng chữ V, các dung dịch pha loãng kép của mẫu chứa virus được trộn cùng nhau, với huyền phù hồng cầu không đổi (thường dùng 10.000.000 tế bào/mL), và sau đó được ủ. Để đánh giá kết quả, lượng tế bào thêm vào được định lượng bằng cách sử dụng quang phổ kế, dung dịch pha loãng cuối cùng thể hiện sự ngưng kết hồng cầu (HA) hoàn toàn được xem là pha loãng giới hạn và được biểu diễn là đơn vị ngưng kết hồng cầu (hemagglutinating unit -HAU).

Chuẩn bị hồng cầu

Hồng cầu của gà con 3 đến 5 ngày tuổi được sử dụng. Gà con được làm chết bằng cách rút máu; máu được cho vào dung dịch Alsever. Tế bào được rửa vài lần bằng cách ly tâm ở tốc độ 1800 xg trong 5 phút, khi chất nổi bề mặt trở nên rõ ràng nó được loại bỏ và tế bào được điều chỉnh đến 10% trong PBS. Khi sử dụng dung dịch, nó được điều chỉnh đến 0,5% trong PBS.

Chuẩn độ hồng cầu

Mỗi mẻ virus phải được chuẩn độ. Các dung dịch pha loãng kép từ 1:10 đến 1:2560 được tạo ra bằng cách cho vào các giếng của đĩa 96 giếng đáy chữ V một lượng bằng 0,05 mL mỗi phần pha loãng. Một giếng hồng cầu dùng làm đối chứng cũng cần được bao gồm.

Huyền phù hồng cầu được thêm vào mỗi giếng đồng thời trộn nhẹ để không làm vỡ hồng cầu. Chúng được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong từ 1 đến 2 giờ.

Chuẩn độ HA được xác định bằng cách đọc dung dịch pha loãng có khả năng ngưng tụ hồng cầu cao nhất.

Giá trị chuẩn độ được báo cáo dưới dạng nghịch đảo của dung dịch pha loãng có khả năng ngưng tụ hồng cầu cao nhất. Và nó được hiểu là đơn vị ngưng kết hồng cầu: HAU/0,05 mL virus.

Xác định chuẩn độ virus sử dụng

Lượng virus cần để làm thử nghiệm cũng như tác dụng của chất sát trùng đối với các tế bào được chuẩn hóa. Dung dịch vật liệu nano titan dioxide với phần chiết từ thảo mộc trái cây hấp phụ lên bề mặt của nó được sử dụng ở tỷ lệ pha loãng khuyến cáo từ vật chứa chất sát trùng (được chuẩn bị bằng cách rót 75 mL vào 5 lít nước). 40 µl virus được trộn vào dung dịch pha loãng ở các HAU khác nhau (40, 20 và 4 HAU) và được ủ ở các thời điểm khác nhau: 1, 5 và 15 phút. Hỗn hợp từ mỗi thời điểm tương tác (virus-vật liệu nano) được cấy với các lớp đơn hợp dòng của tế bào MDCK, và được ủ trong hai giờ ở 37°C trong điều kiện không khí ẩm và 5% CO₂. Sau đó, loại bỏ chất cấy virus, bổ sung môi trường nuôi cấy mới không chứa huyết thanh thai bò, và ủ các lớp đơn trong 24 giờ.

Tác dụng của vật liệu nano titan dioxide với phần chiết từ thảo mộc hoặc trái cây được

hấp phụ lên bề mặt chất tẩy trùng của nó đối với sự nhiễm virus

Tế bào MDCK được nuôi cấy trên các đĩa 24 giếng cho đến khi hợp dòng. Các lượng dung dịch sát trùng khác nhau được trộn với liều lây nhiễm virus không đổi được sử dụng. Dung dịch này được ủ trong thời gian từ 10 đến 15 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được cấy với các lớp đơn tế bào hợp dòng trên các đĩa vi chuẩn độ trong hai giờ.

Sau đó, hỗn hợp dung dịch sát trùng và virus được lấy ra, được rửa bằng PBS vô trùng (pH = 7,45), và 1,5 mL metylxenluloza 2,0 % trong MEM được bổ sung vào mỗi giếng để ủ lần nữa ở 37°C với 5% CO₂ cho đến khi tạo thành các đĩa dung giải (tối đa là 10 ngày). Metylxenluloza được lấy ra, rửa lần nữa, bổ sung 200 µl metanol 75%, sau đó lấy ra sau 20 phút và tinh thể tím 1% được bổ sung trong 15 phút. Sau đó, dung dịch được rửa bằng nước máy, kiểm tra, và các đĩa dung giải được đếm dưới kính hiển vi. Liều tối thiểu của dung dịch sát trùng được tính toán theo khả năng gây bệnh tế bào của virus. Virus không có dung dịch sát trùng được sử dụng làm đối chứng lây nhiễm và tế bào không bị lây nhiễm được sử dụng làm đối chứng âm. Vì đây là thử nghiệm định tính, phần trăm giảm xấp xỉ ở các đĩa tạo thành được tính.

Với các thử nghiệm này, được thấy là sáng chế theo phần mô tả ức chế lên đến 100% tính lây nhiễm virus, như virus cúm, trong từ 0 đến 5 phút.

Kiểm tra hoạt tính diệt khuẩn và diệt nấm

Đối với phân tích phòng thí nghiệm và sự lưu mẫu, chọn ngẫu nhiên mẫu con đại diện của sản phẩm cần được phân tích, và ghi lại số lô.

Để xác định hoạt tính kháng vi sinh vật, chỉ một phương pháp được sử dụng, dựa trên việc xác định phần trăm giảm lượng vi sinh vật xác định khi tiếp xúc với chất sát trùng dưới các điều kiện thử nghiệm cụ thể.

Điều chế dung dịch

Dung dịch đệm phosphat 0,25 M

Trong bình định mức 1000 mL, hòa tan 34 g kali phosphat đơn hóa trị trong 500 mL nước, điều chỉnh độ pH nằm trong khoảng từ 7,1 đến 7,3 bằng dung dịch natri hydroxit, đưa đến thể tích định mức bằng nước, trộn và chia thành các phần 100 mL. Tiến hành vô trùng trong nồi hấp ở 394°K (121°C) trong 15 phút, để nguội, và giữ

trong tủ lạnh.

Dung dịch đệm phosphat pha loãng

Cho 1,25 mL dung dịch đệm phosphat 0,25 M vào bình định mức 1L và đưa đến thể tích định mức bằng nước, trộn và chia thành các phần 9 mL và 99 mL lần lượt trong ống nghiệm và bình thót cổ, vô trùng trong nồi hấp ở 394°K (121°C) trong 15 phút.

Dung dịch trung hòa cô đặc

Trộn 40 g azolexithin với 280 mL polysorbat 80 mL và 1,25 mL dung dịch đệm phosphat, pha loãng bằng nước để thu được 1L; điều chỉnh độ pH đến 7,2 bằng dung dịch thể tích natri hydroxit hoặc dung dịch thể tích axit clohydric, sau đó chia thành các phần 100 ml. Vô trùng trong nồi hấp ở 394°K (121°C) trong 20 phút.

Dung dịch trung hòa pha loãng

Trộn 100 ml dung dịch trung hòa đã cô đặc với 25 ml dung dịch đệm phosphat 0,25M, bổ sung 1675 ml nước, trộn cùng nhau và chia thành các phần 9 ml vào trong các ống nghiệm có ren kích thước 20 mm x 150 mm. Tiến hành vô trùng trong nồi hấp ở 394°K (121°C) trong 20 phút.

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Chuẩn bị và vô trùng môi trường nuôi cấy theo hướng dẫn của nhà sản xuất trên nhãn của sản phẩm. Trong trường hợp là môi trường nuôi cấy thạch cho phương pháp chuẩn với dung dịch trung hòa và trước khi vô trùng, bổ sung 25 mL dung dịch trung hòa vào 1 lít môi trường nuôi cấy thạch cho phương pháp chuẩn.

Canh trung hòa

Trộn các thành phần như được thể hiện trong bảng 1 cùng nhau, gia nhiệt cho đến khi xảy ra quá trình hòa tan, điều chỉnh độ pH đến 7,2, cho vào nồi hấp và vô trùng ở 394°K (121°C) trong 15 phút.

Bảng 1. Các thành phần của canh trung hòa

Trypton	5,0 g
Dịch chiết nấm men	2,5 g
Dextroza	10,0 g

Natri thioglycolat	1,0 g
Natri thiosulfat	6,0 g
Natri bisulfít	2,5 g
Polysorbat 80	5,0 g
Lexithin đậu tương	7,0 g
Tím Bromocresol	0,02 g
Nước cất	1 L

Vi sinh vật thử nghiệm và môi trường nuôi cấy

Staphylococcus aureus (thạch EMB)

Escherichia coli (thạch EMB)

Pseudomona aeruginosa

Salmonella sp (thạch EMB)

Enterobacter sp (Thạch E.M.B.)

Klebsiella pneumoniae (thạch EMB)

Candida albicans (thạch EMB)

Aspergillus niger (thạch EMB)

Chuẩn bị mẫu và điều tiết

Bảo quản vi sinh vật thử nghiệm

Bảo quản các chủng vi sinh vật bằng cách cấy lại hàng tuần trong ống nghiệm kích thước 16 mm x 125 mm với môi trường nuôi cấy nghiêng (7 ml thạch dinh dưỡng), ủ trong thời gian từ 20 giờ đến 24 giờ ở nhiệt độ 308°K đến 310°K (35°C đến 37°C) và giữ trong tủ lạnh.

Chuẩn bị huyền phù vi sinh vật thử nghiệm

Trước khi làm thử nghiệm, tạo hai mẫu cấy lại của mỗi vi sinh vật thử nghiệm và ủ trong thời gian từ 20 đến 24 giờ ở nhiệt độ 308°K đến 310°K (35°C đến 37°C).

Từ các môi trường nuôi cấy này, cấy lại mỗi vi sinh vật thử nghiệm trong các ống nghiệm 22 mm x 175 mm mỗi ống chứa 12 mL thạch dinh dưỡng được làm

nghiêng và ủ ở điều kiện quy định.

Làm dừng sự phát triển ở mỗi ống bằng 3 mL dung dịch nước muối, chuyển chất nổi bề mặt vào ống nghiệm vô trùng và tiếp tục pha loãng bằng cùng một dung dịch cho đến khi thu được huyền phù với các giá trị đọc được của độ truyền qua nằm trong khoảng từ 3% đến 5% ở bước sóng 580 nm.

Xác định số CFU/mL trong huyền phù và chỉ ra phần trăm độ truyền qua của huyền phù chứa 75 đến 125 x 10⁸CFU/mL. Thông số sau được kiểm tra theo các dự đoán của Mexican Official Standard NOM-092-SSA1 (xem 2 tài liệu tham khảo) và các giá trị này được xem xét cho các phân tích sau này.

Xác định số lượng sống ban đầu

Chuyển 1 mL huyền phù vi sinh vật thử nghiệm vào bình thót cổ Erlenmeyer chứa 99 mL dung dịch đệm phosphat loãng vô trùng, và tạo ra các dung dịch pha loãng theo hệ thập phân cần thiết để thu được các đĩa chứa khoảng từ 25 đến 250 khuẩn lạc mỗi đĩa.

Đặt vào các đĩa Petri vô trùng, 1 ml mỗi dung dịch pha loãng làm hai mẫu, thêm vào mỗi đĩa 15 mL đến 18 mL thạch đối với các phương pháp chuẩn, đồng nhất hóa và làm hóa rắn, lật các đĩa Petri lại và ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ 303°K - 308°K (30°C -35°C). Đếm khuẩn lạc có trong mỗi đĩa trong máy đếm khuẩn lạc.

QUY TRÌNH

- 1 Gieo chủng và nuôi cấy;
- 2 Xác định các tế bào sống sót;
- 3 Chuẩn bị mẫu;

Nếu cần, pha loãng thích hợp bằng nước để đạt được nồng độ của sản phẩm như yêu cầu bởi nhà sản xuất trên nhãn bao bì.

4. Cấy mẫu

Với mỗi vi sinh vật thử nghiệm, đo chính xác và đo làm hai lần 99 mL sản phẩm hoặc dung dịch pha loãng của nó, chuyển vào bình thót cổ Erlenmeyer vô trùng 250 mL có nắp xoáy.

Khuấy bình thót cổ, ngừng khuấy chỉ trước khi cấy, sao cho chất lỏng còn lại

vẫn chuyển động tạo thuận lợi cho việc kết hợp của chất cấy. Cấy riêng rẽ mỗi bình thót cổ với mỗi vi sinh vật thử nghiệm vào chính giữa bề mặt chất lỏng, tránh không cho pipet tiếp xúc với cổ hoặc thành của bình thót cổ.

Khuấy bình thót cổ có mẫu cấy ở bên trong và chính xác 30 giây sau khi cấy, chuyển 1 mL dung dịch này vào ống nghiệm chứa 9 mL dung dịch trung hòa được pha loãng hoặc canh trung hòa, trộn cùng nhau và chuyển làm hai lần các phần gồm 1,0 mL vào đĩa Petri vô trùng, và tiếp tục pha loãng cho đến khi thu được các dung dịch cần thiết để tạo ra được các đĩa có từ 25 đến 250 khuẩn lạc, bổ sung 15 mL đến 18 mL thạch với phương pháp chuẩn làm chất trung hòa vào mỗi đĩa, đồng nhất hóa và để hóa rắn, lật các đĩa lại và ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ từ 308°K đến 310°K (35°C đến 37°C).

Sau giai đoạn ủ, đếm số CFU trên mỗi đĩa.

Biểu diễn kết quả

Xác định % giảm

Tính trung bình các kết quả từ các đĩa số tế bào sống ban đầu và số tế bào còn sống, sau đó tính % giảm sử dụng công thức sau:

$$\% \text{ giảm} = 100 - \frac{S}{V.C.} \times 100$$

trong đó:

S là tế bào còn sống CFU/mL, và

V.C. là số tế bào sống ban đầu.

Báo cáo phần trăm giảm thu được ở mẫu sản phẩm.

Diễn giải kết quả

Sản phẩm được dán nhãn là chất diệt trùng phải làm giảm 99,999% số tế bào sống trong vòng 30 giây tiếp xúc ở nồng độ yêu cầu, khi số tế bào sống ban đầu nằm trong khoảng từ 75 đến 125 x 10⁸ CFU /mL.

Thử nghiệm hoạt tính diệt bào tử

Các thử nghiệm về tính hiệu quả được tiến hành dựa trên phương pháp AOAC 966.04, trong đó 59 trong số 60 mẫu kháng *Bacillus Subtilis* được thu nhận.

Quan trọng khi chỉ ra được rằng các thử nghiệm được tiến hành theo NMX-BB-040-SCFI-1999 “METODO GENERAL DE ANALISIS-DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS GERMICIDAS” (Phương pháp tổng quát để xác định nhờ phân tích hoạt tính kháng khuẩn ở sản phẩm sát trùng”) trong đó, theo tiêu chuẩn NMX nói trên, 100% *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus faecalis* và *Saccharomyces diastaticus* bị tiêu diệt trong khoảng thời gian từ 0 đến 5 phút, trong khi tính hiệu quả cũng là 100% theo NMX trong khoảng cách thời gian từ 5 đến 10 phút, và 99,995% trong khoảng cách thời gian từ 0 đến 5 giây đối với *Aspergillus niger* và *Staphylococcus aureus*, và 100% trong khoảng cách thời gian từ 10 đến 15 phút và 99,995% trong khoảng cách thời gian từ 0 đến 10 phút đối với *Pseudomonas aeruginosa*.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất titan dioxit hạt nano để điều chế chế phẩm diệt khuẩn, khử trùng, làm lành vết thương hoặc làm sạch, khác biệt ở chỗ titan dioxit hạt nano được biến đổi bằng các nhóm chức hữu cơ, gốc vô cơ và phần chiết từ trái cây và/hoặc thảo mộc được hấp phụ lên bề mặt và các lỗ của nó, và titan dioxit hạt nano này có diện tích bề mặt ít nhất là $50 \text{ m}^2/\text{g}$ và nằm trong cấu trúc tinh thể anatase của nó; trong đó đường kính cỡ trung bình của các hạt nano titan dioxit nằm trong khoảng từ 1 đến 100 nm, và cỡ hạt của phần chiết từ trái cây và/hoặc thảo mộc nằm trong khoảng từ 0,3 đến 10 nm; trong đó nhóm chức hữu cơ gồm hydroxyl; trong đó phần chiết từ trái cây và/hoặc thảo mộc gồm hỗn hợp của ít nhất ba phần chiết từ trái cây và/hoặc thảo mộc thu được từ các phần khác nhau của cây như hoa, chồi, hạt, lá, vỏ cây, cỏ, gỗ và rễ; và trong đó phần chiết trái cây được chọn từ các phần khác nhau của cây hoặc trái cây họ cam quýt như nho, quýt, cam, bưởi, chanh, ổi hoặc lựu.
2. Hợp chất theo điểm 1, còn khác biệt ở chỗ các gốc vô cơ gồm phosphat, sulfat, clorua, amino, metyl và folat.
3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, còn khác biệt ở chỗ phần chiết thảo mộc được chọn từ oregano (họ bạc hà), quế hoặc tiêu.
4. Phương pháp sản xuất hợp chất titan dioxit hạt nano để điều chế chế phẩm diệt khuẩn, khử trùng, làm lành vết thương hoặc làm sạch, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm các bước:
 - a) tạo ra phần chiết từ trái cây và/hoặc thảo mộc trong bước etanol thứ nhất, trong đó hạt, màng, vỏ quả và vỏ hạt được đặt tiếp xúc với dung dịch rượu etylic ít nhất 70% trong điều kiện khuấy không đổi và nhiệt độ định trước; phần rượu được loại bỏ khỏi phần chiết bằng cách lọc;
 - b) chiết hoạt chất và chất hữu cơ của dầu trái cây và thảo mộc sử dụng hệ thống bắt giữ bằng hơi truyền thống, trong đó nước cất và nhiệt được cấp vào bình thốt cổ thứ nhất; cấp nước cất và nhiệt vào bình thốt cổ thứ nhất, hơi sinh ra được chuyển qua ống đến bình thốt cổ thứ hai trong đó các gốc thu được trong bước etanol đã được đặt vào, trong đó bình thốt cổ thứ hai được giữ nóng; hơi được thu hồi ở đầu ra của bình thốt cổ thứ hai trong thiết bị ngưng tụ với sự

tuần hoàn của nước lạnh; chất lỏng thu được được trộn với hỗn hợp thu được trong bước thứ nhất, và hỗn hợp này được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ;

- c) điều chế dung dịch tiền thân của nhóm chức hữu cơ và gốc vô cơ ở nồng độ 1,4%;
- d) biến đổi hóa học chất mang titan dioxit hạt nano bằng cách đặt nó vào bình thót cổ có nước ở điều kiện khuấy không đổi ở tốc độ nằm trong khoảng từ 100 đến 400 vòng/phút, bổ sung dung dịch tiền thân của nhóm chức hữu cơ và gốc vô cơ thu được ở bước (c) trước đó;
- e) sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 100°C để loại bỏ phần lỏng còn lại; và,
- f) lấy dung dịch nước gồm 70% hỗn hợp phần chiết thu được ở bước b) và đặt nó vào bình thót cổ ở điều kiện khuấy không đổi và thêm từ từ titan dioxit hạt nano đã được xử lý với nhóm chức đồng thời giữ hoạt động khuấy không đổi.

5. Phương pháp theo điểm 4, còn khác biệt ở chỗ phần chiết trái cây được chọn từ các phần khác nhau của cây hoặc trái cây họ cam quýt như nho, quýt, cam, bưởi, chanh, ổi hoặc lựu.

6. Phương pháp theo điểm 4, còn khác biệt ở chỗ phần chiết từ thảo mộc được chọn từ oregano (họ bạc hà), quế hoặc tiêu.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 5 hoặc 6, còn khác biệt ở chỗ cỡ hạt của phần chiết nằm trong khoảng từ 0,3 đến 10 nm.

8. Phương pháp theo điểm 4, còn khác biệt ở chỗ trong bước a) việc khuấy được duy trì ở tốc độ nằm trong khoảng từ 100 đến 400 vòng/phút và ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 50°C trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ.

9. Phương pháp theo điểm 4, còn khác biệt ở chỗ trong bước b) bình thót cổ thứ nhất được gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 130°C và bình thót cổ thứ hai được giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C, trong khi nhiệt độ nước trong thiết bị ngưng tụ nằm trong khoảng từ 4°C đến 10°C.

10. Phương pháp theo điểm 4, còn khác biệt ở chỗ nền hạt nano titan dioxit có diện tích bề mặt là ít nhất 50 m²/g và nằm trong cấu trúc tinh thể anata của nó.
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 4 hoặc 10, còn khác biệt ở chỗ đường kính trung bình của hạt nano titan dioxit nằm trong khoảng từ 1 đến 100 nm.
12. Phương pháp theo điểm 4, còn khác biệt ở chỗ tỷ lệ titan dioxit/nước là 1: 200.
13. Phương pháp theo điểm 4, còn khác biệt ở chỗ nhóm chức hữu cơ gồm hydroxyl.
14. Phương pháp theo điểm 4, còn khác biệt ở chỗ các gốc vô cơ gồm phosphat, sulfat, clorua, amino, metyl và folat.
15. Phương pháp theo điểm 13 và 14, còn khác biệt ở chỗ dung dịch tiền thân của các nhóm chức và gốc vô cơ được bổ sung lần lượt, có thời gian chờ giữa mỗi dung dịch bổ sung.
16. Phương pháp theo điểm 15, còn khác biệt ở chỗ dung dịch tiền thân của các nhóm chức và gốc vô cơ được bổ sung nhỏ giọt hoàn toàn trong một lần.
17. Phương pháp theo điểm 15, còn khác biệt ở chỗ thời gian chờ giữa mỗi dung dịch bổ sung là từ 5 đến 30 phút, sao cho mỗi nhóm chức hữu cơ và gốc vô cơ được hấp phụ hoàn toàn lên bề mặt và lỗ của chất mang hạt nano titan dioxit.
18. Phương pháp theo điểm 4, còn khác biệt ở chỗ dung dịch nước gồm 70% hỗn hợp phân chiết gồm ít nhất ba phần chiết từ trái cây và/hoặc thảo mộc.
19. Chế phẩm diệt khuẩn, khử trùng, làm lành vết thương hoặc làm sạch, khác biệt ở chỗ chế phẩm này chứa: tối đa 40% hợp chất titan dioxit hạt nano được biến đổi bằng nhóm chức hữu cơ, gốc vô cơ và phân chiết từ thảo mộc và/hoặc trái cây được hấp phụ lên bề mặt và lỗ của nó; và, tá dược chấp nhận được.

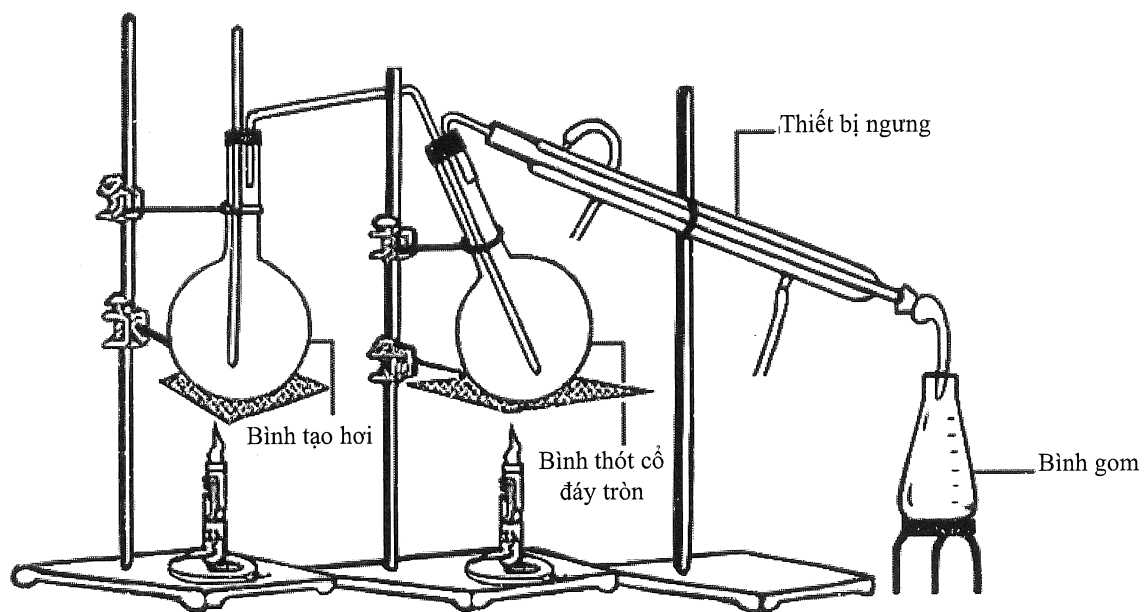


FIG. 1

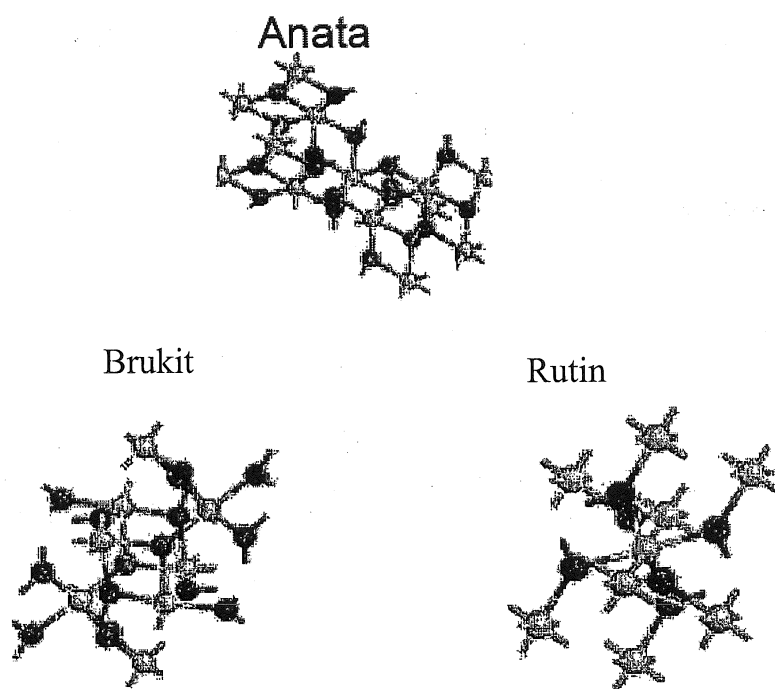


FIG. 2

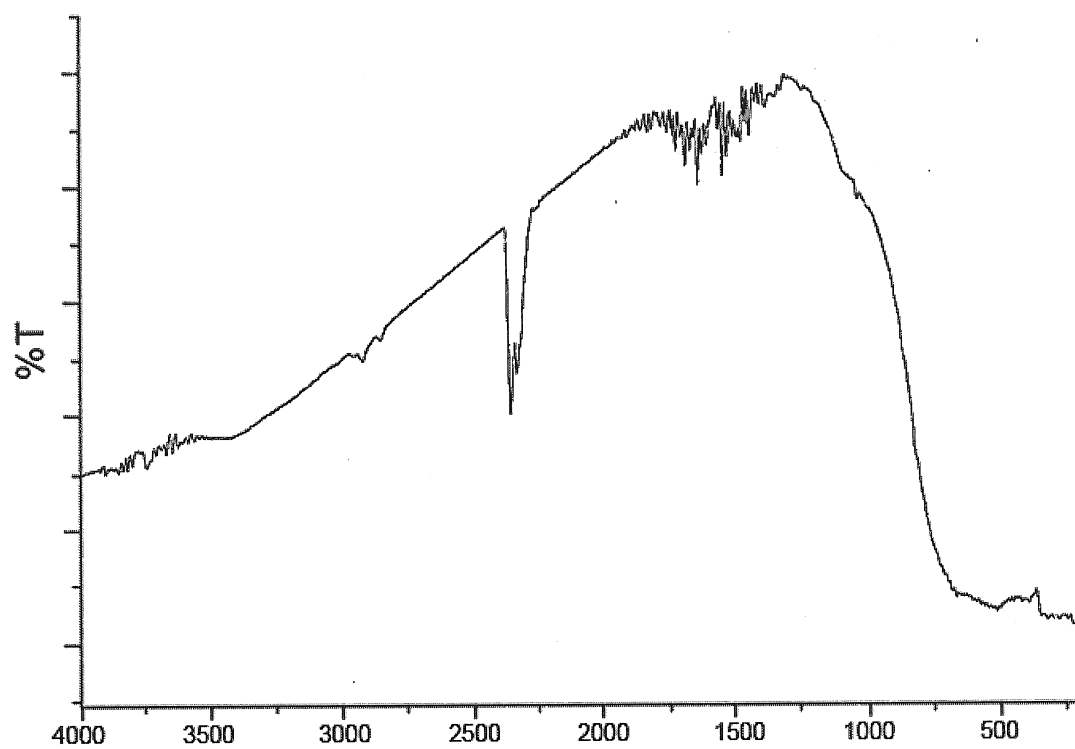


FIG. 3

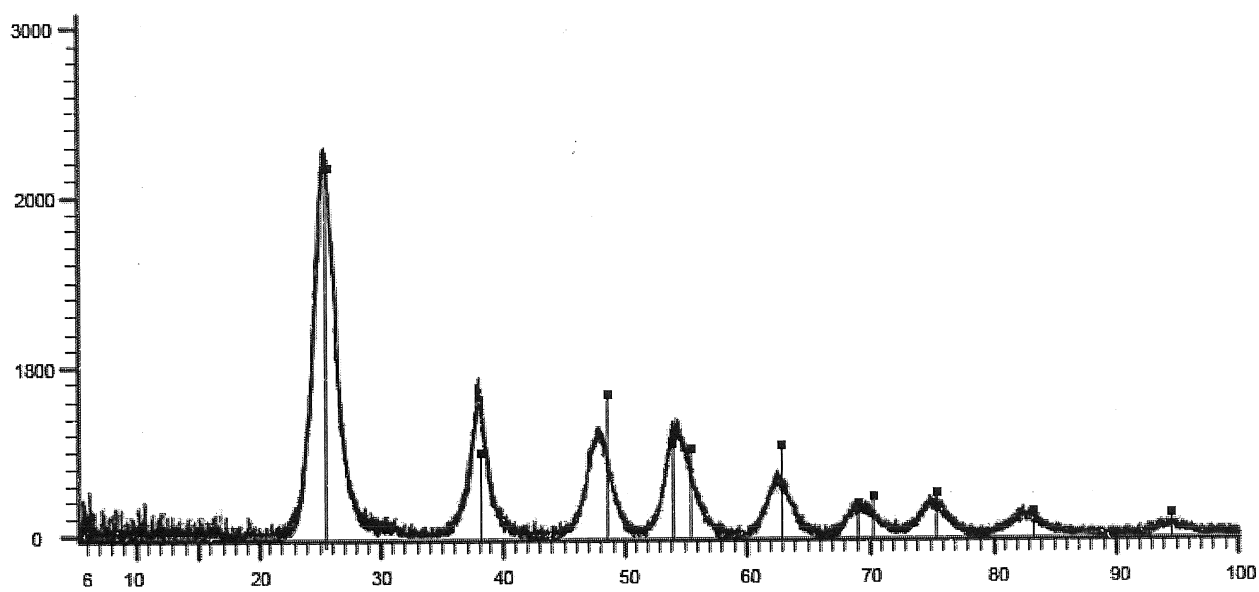


FIG. 4

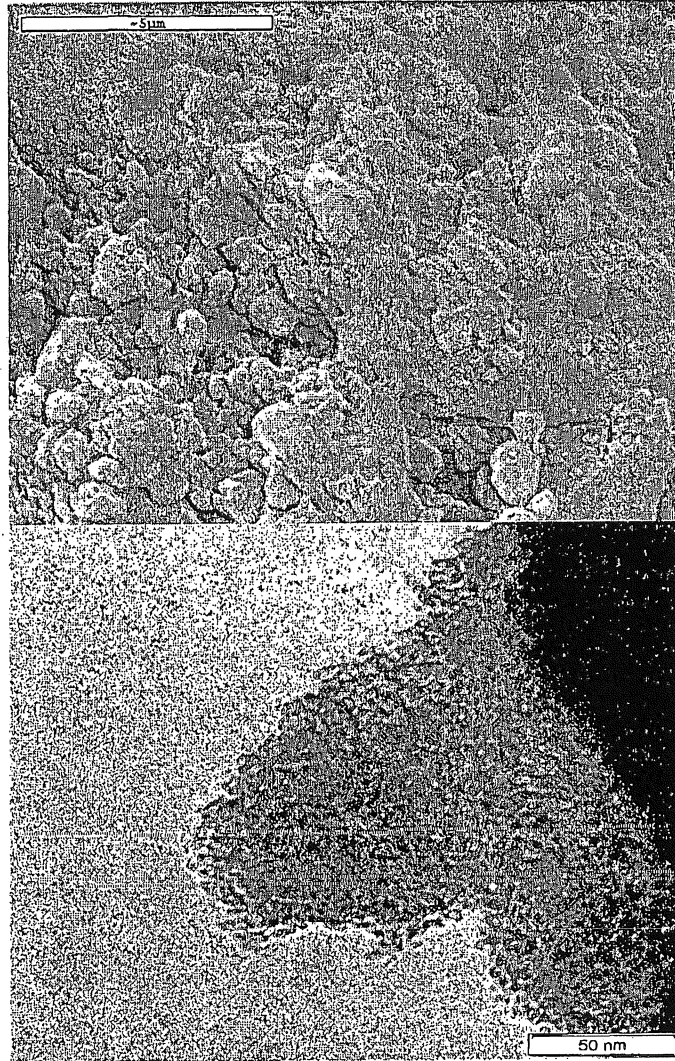


FIG. 5