



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002848

(51) A61K 31/00
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00012

(22) 29/03/2019

(67) 1-2019-01583

(45) 25/03/2022 408

(43) 26/10/2020 391A1

(73) Công ty Cổ phần Công nghệ mới Nhật Hải (VN)

Số 9 BT2, Bán đảo Linh Đàm, phường Hoàng Liệt, quận Hoàng Mai, thành phố Hà Nội

(72) Lưu Hải Minh (VN); Bùi Quốc Anh (VN).

(54) QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ HỆ VI NHŨ TƯƠNG NANO QUERXETIN

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano querxetin, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho querxetin hòa tan trong dung môi etanol;
- chuẩn bị hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/tween 80;
- tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/ tween 80 và chất nhũ hóa lexitin; và
- tạo hệ vi nhũ tương nano querxetin.

Lĩnh vực được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực dược phẩm, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano querxetin.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Querxetin là một loại flavonoid (nhóm hợp chất có nhiều tác dụng sinh học) thường được tìm thấy trong các loại rau củ và trái cây, đặc biệt trong vỏ táo, các trái cây họ cam, chanh, hành tây. Querxetin cũng được tìm thấy trong rượu vang và nụ của cây hoa Hòe (*Sophora japonica L.*). Trong một nghiên cứu của YaoLi và cộng sự “Querxetin, Inflammation and Immunity” đã thống kê cho thấy: ở Trung Quốc, các nam thanh niên khỏe mạnh thường tiêu thụ một lượng querxetin khoảng 18 mg/ ngày. Ở Mỹ, con số này là khoảng 13 mg/ ngày. Ở Tây Ban Nha, con số này cao hơn vào khoảng 18,48 mg/ngày và lượng querxetin được tìm thấy trong hầu hết các loại trái cây rau quả trong các bữa ăn.

Querxetin có nhiều hoạt tính sinh hoạt như chống oxy hóa, chống viêm, chống dị ứng, hạ huyết áp, hạ cholesterol máu. Nghiên cứu “Naturally occurring anti-inflammatory agents” của Am.J Pathol và cộng sự từ năm 1995 đã cho thấy khả năng chống viêm tự nhiên của các hợp chất tự nhiên querxetin. Hàng loạt nghiên cứu sau này cũng công bố về khả năng chống viêm được thử nghiệm trên các loại tế bào khác nhau trên cả người và động vật.

Tuy nhiên, querxetin lại có nhược điểm là tính sinh khả dụng thấp do độ tan của querxetin trong nước thấp. Nguyên nhân là do trong phân tử querxetin có sự hiện diện của nhiều nhóm -OH phenol, có khả năng hình thành các liên kết hydro nội, ngoại phân tử làm giảm độ tan của nó. Do đó, trên thế giới hiện nay có rất nhiều các công trình nghiên cứu cải thiện tính sinh khả dụng của querxetin bằng việc giảm kích thước hạt xuống nano và bọc bằng một chất ổn định để giữ các hạt không bị kết tụ, hoặc tạo các hạt tiểu phân phytosome, liposome với kích thước nhỏ để tăng khả năng hòa tan và hấp thụ qua hệ thống tiêu hóa.

Solmaz Rasaie và cộng sự trong công bố “Nano Phytosomes of Quercetin: A Promising Formulation for Fortification of Food Products with Antioxidants” cũng đã thành công trong việc chế tạo nano phytosome quercetin với các tiểu phân ở kích thước nano. Quy trình này đã tạo ra được dạng chế phẩm nano quercetin có tính sinh khả dụng tăng, nhưng nhược điểm là kích thước hạt nano quercetin tạo thành lớn (> 100 nm) nên thời gian hấp thụ qua thành ruột chậm.

Minaei A và cộng sự trong nghiên cứu “Co-delivery with nano-quercetin enhances doxorubicin-mediated cytotoxicity against MCF-7 cells” đã kết hợp thành công nano quercetin trong doxorubicin (DOX) để tạo ra chế phẩm phytosome quercetin với kích thước nano. Kết quả công bố cho thấy chế phẩm quercetin tạo thành đã đạt được kích thước nano. Phổ đo kích thước hạt cho thấy đường kính trung bình của các hạt rơi vào khoảng 85 nm.

Trong nước hiện nay cũng đã có một số nghiên cứu chế tạo quercetin dạng nano. Nguyễn Hồng Trang và các cộng sự đã nghiên cứu bào chế phytosome quercetin dạng nano bằng quy trình kết tủa trong dung môi. Kết quả trên bài “Nghiên cứu bào chế phytosome quercetin bằng quy trình kết tủa trong dung môi” công bố chế phẩm quercetin tạo được có kích thước 203,5 nm, hàm lượng quercetin trong chế phẩm khoảng 79%. Quy trình này có ưu điểm là đơn giản, hiệu suất cao nhưng chế phẩm tạo thành vẫn có kích thước hạt khá to.

Từ tài liệu tổng hợp được có thể thấy có rất nhiều quy trình chuyển hóa quercetin thành các hạt nano làm tăng khả năng hòa tan và hấp thụ qua đường tiêu hóa. Tuy nhiên, như đã nêu trên các hạt nano quercetin tổng hợp được vẫn có kích thước khá to, với kích thước này khả năng vận chuyển và phân bố trong hệ tuần hoàn cơ thể sẽ bị hạn chế. Do đó, có nhu cầu cao về một quy trình điều chế hệ vi nhũ tương có các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ hơn 50 nm, đồng đều, khả năng hòa tan tốt hơn trong nước và vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính quercetin trong quá trình nano hóa.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là tạo chế phẩm querxetin có độ tan cao, cải thiện tính thấm qua màng tế bào, hoạt tính ổn định, độ bền hệ vi nhũ tương cao. Để đạt được mục đích này, bằng cách tạo ra các hạt tiểu phân có kích thước nano, đồng đều, khả năng hòa tan tốt hơn trong nước và vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính querxetin trong quá trình nano hóa. Quy trình này bao gồm các bước:

- a) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho querxetin hòa tan trong dung môi etanol;
- b) chuẩn bị hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/tween 80;
- c) tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/ tween 80 và chất nhũ hóa lexitin; và
- d) tạo hệ vi nhũ tương nano querxetin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Phân bố kích thước hạt của hệ vi nhũ tương nano querxetin thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích.

Hình 2: Ảnh TEM của hệ vi nhũ tương nano querxetin thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano querxetin được trình bày một cách chi tiết dưới đây.

- a) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho querxetin hòa tan trong dung môi etanol theo tỷ lệ là 1:25 (g/mL) trên máy khuấy có gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C với tốc độ khuấy 1500 vòng/phút trong thời gian 15 giờ cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, thu được pha phân tán;

Với mục đích tạo ra các hạt tiểu phân chứa querxetin có kích thước nano và ổn định, các tác giả đã sử dụng etanol là dung môi có khả năng hòa tan querxetin cao,

nên đã giúp tạo pha phân tán tốt hơn và tạo điều kiện để pha phân tán có thể kết hợp với hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/etylen glycol tốt hơn.

Ngoài ra, việc sử dụng dung môi etanol có gốc hydroxyl (OH^-) tạo liên kết với nước, nên có tác dụng ổn định cấu trúc hệ vi nhũ tương dầu trong nước. Bằng các thử nghiệm, các tác giả xác định được với tỷ lệ querxetin:dung môi etanol là 1:25 (g/mL), thì querxetin đạt được độ hòa tan lớn nhất và tránh việc sử dụng dư thừa dung môi etanol gây lãng phí nguyên liệu;

b) chuẩn bị hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/tween 80 bằng cách trộn hỗn hợp polyetylen glycol (PEG) và tween 80 theo tỷ lệ 2:1(g/mL) được phân tán đều trên máy khuấy trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 60°C với tốc độ khuấy 300 vòng/ phút;

Khi querxetin được đưa vào cơ thể qua đường miệng, querxetin thường bị phá hủy trong đường tiêu hóa, một phần được hấp thu vào máu thông qua quá trình tiêu hóa, còn lại đa số querxetin bị đào thải ra môi trường. Vì vậy, cần quy trình điều chế hệ nhũ tương có các hạt tiểu phân chứa hoạt chất querxetin trong đó, querxetin với kích thước nhỏ có màng bao sinh học, nên cấu trúc querxetin có độ ổn định cao, không kết dính và có độ hòa tan cao.

Hệ vi nhũ tương theo giải pháp hữu ích được sử dụng trong các ngành công nghiệp thực phẩm và dược phẩm nên các chất được lựa chọn sử dụng phải có độ an toàn cao, không có độc tính và ít tác dụng phụ.

Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng các quá trình vận chuyển thuốc được nâng cao hiệu quả nhờ những hệ dẫn thuốc có nguồn gốc từ các loại polyme như polyme thiên nhiên ưa nước, polyme tổng hợp kỵ nước, poly axit lactic, poly axit lactic-co-glycolic. Các chất mang polyme với hàm lượng tải dược chất khá cao có thể đem đến nhiều thuận lợi về mặt dược động học như dược chất được giữ ổn định, có thể sử dụng điều trị trong thời gian dài bằng cách nhả chậm thuốc theo sự phân hủy polyme.

Tuy PEG là các chất mang polyme đã được sử dụng trong lĩnh vực dược phẩm và y tế, nhưng hệ vi nhũ tương thu được bằng cách sử dụng riêng lẻ PEG này có độ ổn định

chưa cao vì trong quá trình tạo hệ vi nhũ tương có sự đứt gãy về liên kết mạch polyme, nên tác giả giải pháp hữu ích đã kết hợp PEG và Tween 80. Khi dùng hỗn hợp chất mang PEG/ Tween 80 này để tạo hệ vi nhũ tương, nếu có sự đứt gãy về liên kết mạch thì Tween 80 sẽ tự điền đầy;

c) tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang PEG/ tween 80 và chất nhũ hóa lexitin sao cho các chất querxetin, PEG/tween 80 và lexitin trong hỗn hợp đồng nhất có tỷ lệ querxetin:PEG: lexitin là 10:50:50 (g/g/mL) vào thiết bị tạo nhũ trong 12 giờ ở nhiệt độ phòng với tốc độ khuấy 600 vòng/ phút, sau đó tăng tốc độ khuấy lên 800 vòng/ phút và nhiệt độ 120°C trong 4 giờ.

Giá trị cụ thể của tỉ lệ các chất trong hỗn hợp chất mang cũng như các chất nhũ hóa lexitin và các điều kiện như tốc độ khuấy, nhiệt độ, thời gian là kết quả của các quá trình thử nghiệm thực tế nhằm tối ưu hóa quy trình này;

d) tạo hệ vi nhũ tương nano querxetin bằng cách để qua đêm hỗn hợp đồng nhất thu được ở bước c ở nhiệt độ phòng, sau đó hỗn hợp được chạy trong thiết bị đồng hóa với áp suất 15 Mpa, lặp lại đồng hóa 5 lần, thu được hệ vi nhũ tương nano querxetin.

Hỗn hợp thu được ở bước c có thể vẫn còn lẫn một lượng querxetin dư nhất định do bám trên thành thiết bị hoặc cánh khuấy mà không được hòa tan trong dung môi, lượng querxetin này có thể sa lắng sau khi để qua đêm và làm hỗn hợp trở nên không đồng nhất. Do đó, hỗn hợp thu được ở bước c cần được chạy trong thiết bị đồng hóa có áp suất để giảm kích thước của các hạt này lại đồng thời làm hỗn hợp cuối cùng trở nên đồng nhất.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano querxetin

Chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho 10 g bột querxetin với độ tinh khiết 98% hòa tan trong 250 ml dung môi etanol. Phân tán đều hỗn hợp trên máy khuấy có gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C với tốc độ khuấy 1500 vòng/phút trong thời gian 15 giờ cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, thu được pha phân tán.

Chuẩn bị hỗn hợp chất mang PEG 1000/tween 80 bằng cách trộn 50g PEG 1000 và 25 ml tween 80 và phân tán đều trên máy khuấy trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 60°C với tốc độ khuấy 300 vòng/ phút.

Tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang PEG 1000/tween 80 và 50 ml lexitin trong thiết bị tạo nhũ trong 12 giờ ở nhiệt độ phòng với tốc độ khuấy 600 vòng/ phút, sau đó tăng tốc độ khuấy lên 800 vòng/phút ở nhiệt độ 120°C trong thời gian 4 giờ.

Tạo hệ vi nhũ tương nano querxetin bằng cách để qua đêm hỗn hợp đồng nhất thu được ở bước c ở nhiệt độ phòng, sau đó hỗn hợp được chạy trong thiết bị đồng hóa với áp suất 15 Mpa, lặp lại đồng hóa 5 lần thu được 110 g hệ vi nhũ tương nano querxetin.

Tiến hành thí nghiệm như phần mô tả chi tiết giải pháp hữu ích ở trên. Sản phẩm tạo thành được tiến hành kiểm tra với các quy trình phân tích hiện đại. Kết quả phân tích như sau:

- Kết quả phân tích hàm lượng

Dung dịch sản phẩm nano querxetin được thử tính hòa tan bằng cách dùng 1 ml dung dịch hòa tan trong 250 ml nước thu được dung dịch trong, có màu vàng nhạt, không lắng cặn. Hàm lượng querxetin của sản phẩm được xác định bằng quy trình sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) thu được kết quả 8,7 mg/ mL.

- Kết quả đo HR-TEM

Kích thước của các tiểu phân được chứng minh bằng ảnh TEM và phổ DLS đo kích thước hạt, kết quả cho thấy các hạt nano -querxetin có hình cầu và kích thước trung bình khoảng 20-50 nm.

- Kết quả phân tích chỉ tiêu cảm quan:

STT	Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
-----	--------------	---------

1	Trạng thái	Dạng dung dịch sệt, trong đồng nhất không tách lớp
2	Màu sắc	Màu vàng nâu đậm
3	Mùi, vị	Không ôi mốc, vị đắng

- Kết quả phân tích chỉ tiêu chất lượng chủ yếu

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Quy trình thử	Kết quả
1	pH		H.HD.QT.070	6,74
2	Hàm lượng carbohydrat	g/100g	H.HD.QT.336	79,5
3	Tỷ trọng	g/ml	H.HD.QT.084	1,077

- Kết quả phân tích chỉ tiêu vi sinh vật

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Quy trình thử	Kết quả
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/g	ISO 4833-1:2013	< 1 CFU/g
2	<i>Cl. perfringens</i>	CFU/g	TCVN 4991:2005	< 1 CFU/g
3	Coliforms	CFU/g	TCVN 6848:2007	< 1 CFU/g
4	<i>E.coli</i>	CFU/g	TCVN 7924-2:2008	< 1 CFU/g

- Kết quả phân tích hàm lượng kim loại nặng

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Quy trình thử	Kết quả
1	Hàm lượng cadimi	mg/kg	H.HD.QT.429 (ICP-MS)	<0,004
2	Hàm lượng chì	mg/kg	H.HD.QT.429 (ICP-MS)	0,023

Các kết quả về chỉ tiêu cảm quan, chỉ tiêu chất lượng, chỉ tiêu vi sinh vật và hàm lượng kim loại nặng cho thấy hệ vi nhũ tương thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích đạt các chỉ tiêu về an toàn thực phẩm.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano querxetin đã thành công trong việc điều chế hệ vi nhũ tương có chứa các tiểu phân nano querxetin có kích thước giảm, đồng đều và khả năng hòa tan tốt trong nước.

Các chất được sử dụng trong quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano querxetin phân tán tốt trong nước có độ an toàn cao, không độc hại và ít tác dụng phụ, nên hệ vi nhũ tương nano querxetin thu được từ quy trình theo sáng chế có độ an toàn cao khi sử dụng.

Quy trình theo sáng chế đơn giản, dễ thực hiện và phù hợp với các điều kiện thực tế hiện nay của nước

Sản phẩm cuối cùng thu được là hệ vi nhũ tương có các hạt nano querxetin phân tán tốt trong nước với kích thước các hạt nano trung bình trong khoảng từ 20-50 nm. Hàm lượng querxetin trong hệ là 8,7%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

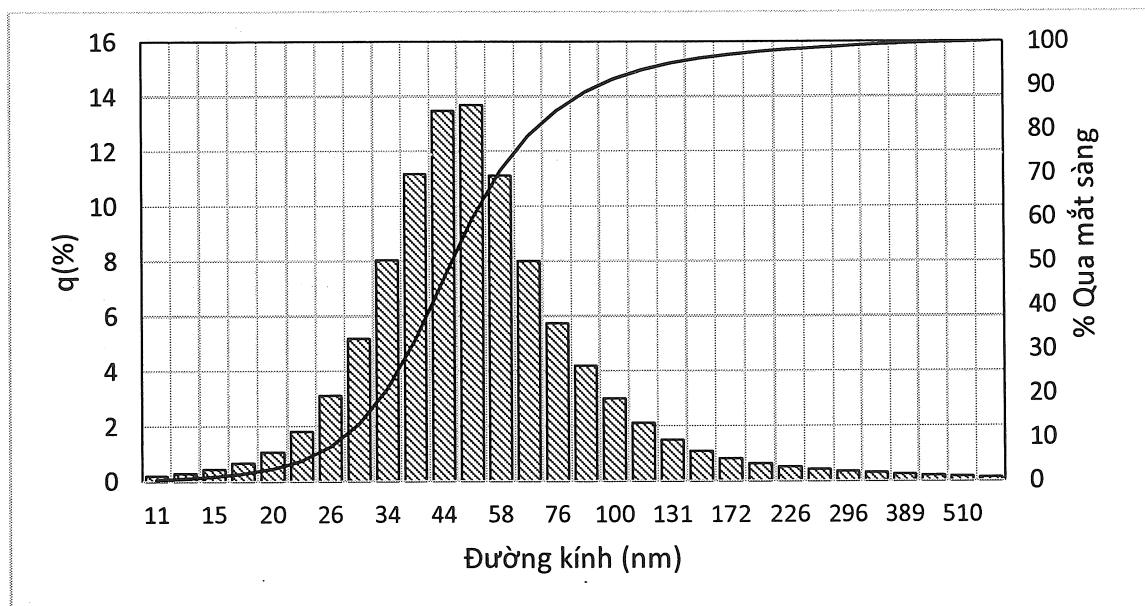
1. Quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano querxetin, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho querxetin hòa tan trong dung môi etanol theo tỷ lệ là 1:25 (g/mL) trên máy khuấy có gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C với tốc độ khuấy 1500 vòng/phút trong thời gian 15 giờ cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, thu được pha phân tán;

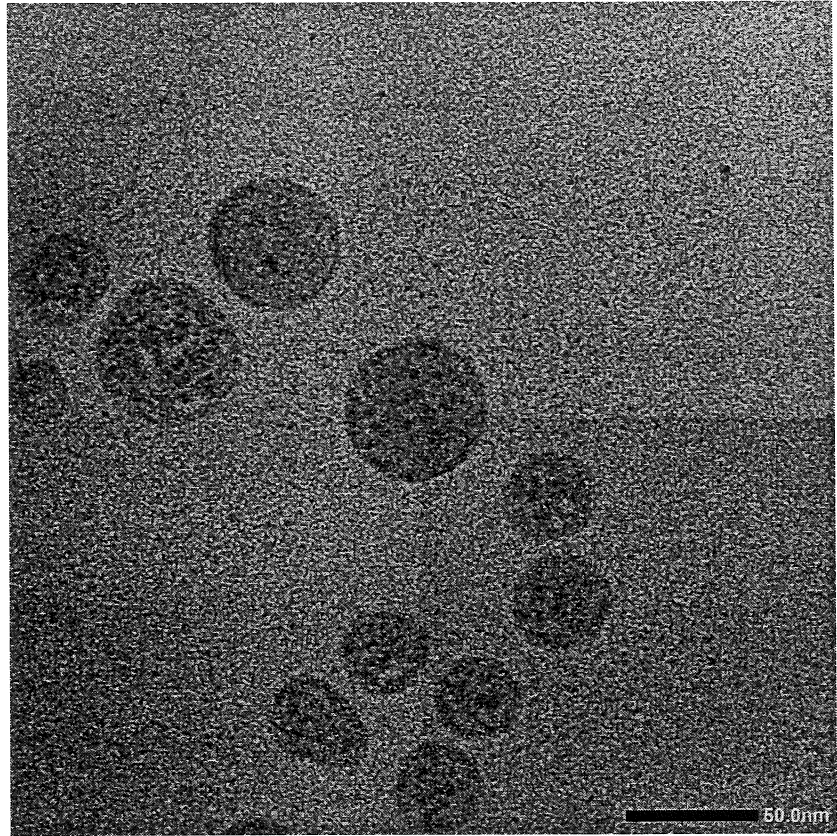
b) chuẩn bị hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/ tween 80 bằng cách trộn hỗn hợp polyetylen glycol và tween 80 theo tỷ lệ 2:1 (g/mL) được phân tán đều trên máy khuấy trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 60°C với tốc độ khuấy 300 vòng/ phút;

c) tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/tween 80 và chất nhũ hóa lexitin sao cho các chất querxetin, polyetylen glycol/tween 80 và lexitin trong hỗn hợp đồng nhất có tỷ lệ querxetin:polyetylen glycol:lexitin là 10:50:50 (g/g/mL) vào thiết bị tạo nhũ trong 12 giờ ở nhiệt độ phòng với tốc độ khuấy 600 vòng/ phút, sau đó tăng tốc độ khuấy lên 800 vòng/ phút ở nhiệt độ 120°C trong thời gian 4 giờ; và

d) tạo hệ vi nhũ tương nano querxetin bằng cách để qua đêm hỗn hợp đồng nhất thu được ở bước c ở nhiệt độ phòng, sau đó hỗn hợp được chạy trong thiết bị đồng hóa với áp suất 15 Mpa, lặp lại đồng hóa 5 lần, thu được hệ vi nhũ tương nano querxetin.



Hình 1



Hình 2