



(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)



1-0031505

(51)^{2019.01} B82Y 5/00; A61K 36/746; A61P 19/10 (13) B

(21) 1-2020-01116

(22) 28/02/2020

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/06/2020 387ASC

(73) VIỆN KHOA HỌC VẬT LIỆU - VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)

Nhà A2, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) HÀ PHƯƠNG THƯ (VN); TRẦN THỊ LAN ANH (VN); ĐỖ HẢI ĐOAN (VN); LÊ THỊ THU HƯƠNG (VN); ĐỒNG THỊ NHÂM (VN); PHAN KẾ SƠN (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HỆ NANO CAO ĐỊNH CHUẨN BA KÍCH TÍM (MORINDA OFFICINALIS HOW.) VÀ HỆ NANO CAO ĐỊNH CHUẨN BA KÍCH TÍM ĐƯỢC SẢN XUẤT BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến đến phương pháp sản xuất hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím (*Morinda officinalis* How.) trên cơ sở cao định chuẩn Ba kích tím. Cụ thể, hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím thu được theo phương pháp của sáng chế ở dạng bột màu vàng nhạt, mùi thơm, kích thước hạt nano thu được nằm trong khoảng 50-70nm. Hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím thu được theo sáng chế vừa làm tăng độ tan và hấp thu của các antraquinon và iridoit chống loãng xương từ Ba kích, vừa thích hợp và thuận tiện sử dụng cho mọi đối tượng. Với kích thước nano, hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím có khả năng hòa tan tốt trong dịch sinh học, hấp thu qua các khe nang ở niêm mạc đường tiêu hóa đi vào hệ mạch máu, bảo vệ thuốc an toàn khi đi qua gan, đồng thời không bị đào thải quá nhanh khỏi hệ thống tuần hoàn. Nhờ đó, hiệu quả điều trị loãng xương của thuốc tăng đáng kể, trong khi liều sử dụng thấp hơn so với bình thường.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực dược phẩm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím (*Morinda officinalis* How.) trên cơ sở cao định chuẩn Ba kích tím và hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím thu được theo phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong bệnh loãng xương, sự suy giảm số lượng cũng như chức năng của các tế bào tạo xương đồng thời tăng sinh các tế bào hủy xương làm cho xương càng suy yếu. Ba kích tím, tên khoa học là *Morinda officinalis* How. (Rubiaceae), là một loại cây thảo, sống lâu năm, thân leo. Trong y học cổ truyền, Ba kích có tác dụng ôn thận tráng dương bổ thận ích tinh, cường gân cốt, khử phong thấp. Từ xa xưa, người dân đã sử dụng ba kích ngâm rượu để uống nhằm cải thiện sinh lý, cường dương. Ngày nay, trong đông y thường dùng Ba kích dùng để điều trị các bệnh về xương khớp, gân mềm yếu, đau lưng mỏi gối, tê mỏi tay chân, loãng xương, v.v.. Tám antraquinon được phân lập từ Ba kích bao gồm: Physcion (1); rubiadin - 1 - methyl ete (2); 2 -hydroxy-1-metoxyl - antraquinon (3); 1,2-dihydroxy-3 - methylantraquinon (4); 1,3,8-trihydroxy-2-metoxyl - antraquinon (5); 2-hydroxymethyl-3 - hydroxyantraquinon (6); 2 - metoxyantraquinon (7) và scopoletin (8). Các chất này đều có tác dụng ức chế tế bào hủy xương, các antraquinon 2,3 có tác dụng kích thích tăng sinh tế bào tạo xương, trong khi các hợp chất 4,5 có tác dụng kích thích hoạt động của tế bào tạo xương.

Trong rễ Ba kích cũng chứa một số loại polysaccharit như: các loại insulin-fructan mạch thẳng có liên kết β -(2 $\rightarrow$ 1) và các polysaccharit cấu tạo từ các tiểu đơn vị

axit galacturonic, arabinoza và galactoza, v.v., các polysacarit này có khả năng kích thích sự biểu hiện các gen liên quan đến xương, từ đó có tác dụng chống loãng xương. Ngoài ra, các polysacarit trong rễ Ba kích còn có tác dụng chống oxy hóa, giảm mệt mỏi, chống trầm cảm và tăng cường miễn dịch. Nhiều nghiên cứu cũng đã chứng minh được tác dụng chống loãng xương của các polysacarit chiết từ rễ Ba kích thông qua cơ chế làm giảm nồng độ alkaline phosphatase - một enzym chịu trách nhiệm trong quá trình thải trừ nhóm phosphat từ các phân tử, và các interleukin 6 và TNF- α - các chất kích thích các tế bào hủy xương dẫn đến giảm mật độ xương.

Ngoài ra, cũng tìm thấy trong Ba kích các iridoit như asperulosit, monotropein, morindolit. Trong đó, monotropein có tác dụng chống viêm, chống viêm ruột kết và giảm đau xương do loãng xương và cũng đã được chứng minh có tác dụng giảm đau do loãng xương, phòng ngừa mất xương do nhiễm khuẩn. Nghiên cứu cho thấy monotropein ngăn chặn quá trình giảm khối lượng xương, đồng thời tăng cường quá trình vi tạo xương thông qua tăng cường hình thành xương và ức chế sản sinh các cytokin viêm. Monotropein chiết từ rễ Ba kích tím có khả năng bảo vệ xương thông qua cơ chế làm tăng hàm lượng khoáng, mật độ khoáng trong xương và tỷ lệ thể tích của xương, đồng thời tăng cường vi cấu trúc xương. Bên cạnh đó, các nghiên cứu cũng khẳng định monotropein ức chế sản sinh các cytokin viêm và tăng sinh tế bào tạo xương.

Như vậy, từ cây Ba kích tím hoàn toàn có thể tách chiết các hoạt chất và tạo thành sản phẩm phòng chống loãng xương. Các hoạt chất được tách ra dưới dạng cao định chuẩn Ba kích đảm bảo các tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế thế giới (WHO).

Những thành phần chủ yếu mang hoạt tính chống loãng xương trong rễ Ba kích là các anthraquinon - những chất khó tan trong nước hoặc iridoit có sinh khả dụng thấp. Thêm vào đó, nghiên cứu về chuyển hóa và dược động học của các chất này đã chứng minh rằng, anthraquinon và iridoit có độ hấp thụ kém và nhanh bị loại khỏi cơ thể hay có thời gian bán thải ngắn. Để khắc phục những nhược điểm của nhóm hoạt chất này, cần tìm kiếm dạng bào chế thích hợp nhằm cải thiện được độ

hòa tan được chất, vừa thích hợp và thuận tiện sử dụng cho mọi đối tượng, đồng thời giá thành không quá cao. Sự ra đời của công nghệ nano mở ra những cơ hội mới, đầy tiềm năng cho nhiều lĩnh vực ứng dụng khoa học và công nghệ, đặc biệt là trong công nghệ dược phẩm. Hệ dẫn thuốc nano là một giải pháp tối ưu nhờ những hiệu ứng đặc biệt: i) Nâng cao độ bền của các loại dược phẩm, các tác nhân hoạt tính sinh học (gọi chung là các hoạt chất) dưới tác động của các yếu tố môi trường như nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm, độ pH, v.v.; (ii) Nâng cao khả năng hấp thu vào cơ thể của các loại hoạt chất; (iii) Tăng cường hiệu quả tác động của hoạt chất. Với kích thước nano, các hệ dẫn thuốc này có khả năng hòa tan tốt trong dịch sinh học, hấp thu qua các khe nang ở niêm mạc đường tiêu hóa để vào hệ mạch máu, bảo vệ thuốc an toàn khi qua gan, đồng thời không bị đào thải nhanh khỏi hệ thống tuần hoàn. Nhờ đó, hiệu quả điều trị của thuốc tăng lên đáng kể và liều sử dụng thấp hơn so với bình thường.

Trong nghiên cứu của mình, sau khi tách chiết các antraquinon, iridoit và polysacarit dưới dạng cao định chuẩn từ rễ Ba kích tím, các tác giả sáng chế đã tiến hành nano hóa các hoạt chất (antraquinon, iridoit) bằng chất mang là polysacarit. Các polysacarit trong Ba kích cũng là một nguồn polyme tiềm năng làm chất mang thuốc và chiếm tới 10-25% khối lượng khô. Không dừng lại ở việc làm chất mang thuốc đơn thuần, các polysacarit cũng đóng vai trò trong phòng chống loãng xương. Việc sử dụng chính các polysacarit này để tạo hệ mang thuốc mang các antraquinon và iridoit giúp khai thác triệt để được nguồn nhiên liệu đồng thời phát huy được tối đa tác dụng chống loãng xương của Ba kích. Hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím dựa trên các polysacarit trong Ba kích có khả năng tương hợp sinh học và phân hủy sinh học tốt giúp tăng sinh khả dụng của thuốc, từ đó tăng khả năng chống loãng xương. Đồng thời, để tăng tác dụng dược lý và hiệu quả điều trị, các tác giả sáng chế đã phối hợp nano hoá nha đam cùng với cao định chuẩn Ba kích tím. Theo y học cổ truyền, nha đam giúp tái tạo khối xương đối với các bệnh nhân loãng xương, thấp khớp và viêm khớp. Nghiên cứu đã cho thấy nha đam làm tăng sinh đáng kể tế bào

xương, được biểu hiện trên protein hình thái xương 7 (bone morphogenetic protein-7- BMP7) và sự hình thành xương mới. Ngoài ra, trong nha đam còn chứa Acemannan - một polysacarit có vai trò sinh học trong việc tái tạo xương, tăng khối lượng xương, thể tích xương và mật độ xương trong xương.

Sáng chế này tập trung nghiên cứu chế tạo hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím, sử dụng chính các polysacarit, oligosacarit có trong cao chiết nước từ rễ Ba kích tím để nano hóa các thành phần có hoạt tính trong rễ Ba kích tím như antraquinon và iridoit và trong cao chiết nha đam để tạo ra sản phẩm nano trên cơ sở Ba kích tím với tác dụng chính là phòng chống loãng xương.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên.

Để đạt được mục đích này, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím bao gồm các bước:

(i) hoà tan cao chiết nước từ rễ Ba kích tím chứa polysacarit và các oligosacarit trong nước cất, với tỷ lệ khối lượng của cao chiết nước Ba kích tím và thể tích nước cất là 1:1;

(ii) phân đoạn cao định chuẩn Ba kích tím giàu antraquinon và iridoit được hòa tan trong rượu etylic tuyệt đối, trong đó tỷ lệ khối lượng cao định chuẩn Ba kích tím: thể tích rượu etylic là 1:1, rồi nhỏ từ từ, tốt hơn là với tốc độ 0,5mL/phút vào dung dịch thu được ở bước (i) theo tỷ lệ 1:1 (về thể tích) trong điều kiện nhiệt độ phòng, khuấy đều với tốc độ khuấy 600 vòng/phút trong 2 giờ;

(iii) hoà tan cao chiết tổng nha đam trong rượu etylic tuyệt đối, trong đó tỷ lệ khối lượng cao chiết nha đam: thể tích rượu etylic là 1:1;

(iv) nhỏ từ từ, tốt hơn là với tốc độ 0,5mL/phút dung dịch chứa cao chiết tổng nha đam vào hệ thu được ở bước (ii) trong điều kiện nhiệt độ phòng, tốc độ khuấy 600 vòng/phút với tỷ lệ thể tích của dung dịch chứa cao chiết tổng nha đam: dung

dịch thu được ở bước (ii) là 1: 2,5 và khuấy đều trên máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ;

(v) làm bay hơi dung môi từ từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ; và

(vi) làm đông khô dung dịch chứa nano cao định chuẩn Ba kích tím thu được để cho ra sản phẩm nano cao định chuẩn Ba kích tím ở dạng bột màu vàng nhạt, mùi thơm, kích thước hạt nano thu được nằm trong khoảng 50-70nm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím thu được từ phương pháp sản xuất nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ quy trình sản xuất sản phẩm dạng bột nano cao định chuẩn Ba kích tím;

Hình 2 là phổ FT-IR của (1) cao chiết nước Ba kích tím, (2) cao định chuẩn Ba kích tím, (3) cao chiết tổng nha đam, (4) nano cao định chuẩn Ba kích tím;

Hình 3 là hình vẽ minh họa hình thái học của nano cao định chuẩn Ba kích tím được khảo sát bởi phương pháp FESEM;

Hình 4 là hình vẽ minh họa sự phân bố kích thước của nano cao định chuẩn Ba kích tím;

Hình 5 là hình vẽ minh họa thế Zeta của nano cao định chuẩn Ba kích tím; và

Hình 6 là hình vẽ minh họa tác động của nano cao định chuẩn Ba kích tím, đối chứng âm và đối chứng dương (Alendronat) ở các nồng độ khác nhau tới sự tạo khoáng canxi trên tế bào MC3T3-E1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp nano hóa cao định chuẩn Ba kích tím bao gồm các bước được mô tả chi tiết dưới đây.

Trước hết, cao chiết nước từ rễ Ba kích tím chứa polysacarit và các oligosacarit trong nước cất, trong đó tỷ lệ khối lượng của cao chiết nước Ba kích tím và thể tích nước cất là 1:1. Tiếp đó, phân đoạn cao định chuẩn Ba kích tím giàu

antraquinon và iridoit được hoà tan trong rượu etylic tuyệt đối, trong đó tỷ lệ khối lượng cao định chuẩn Ba kích tím: thể tích rượu etylic là 1:1, sau đó nhỏ từ từ, tốt hơn là với tốc độ 0,5mL/phút vào bình phản ứng chứa cao chiết nước từ rễ Ba kích tím hòa tan trong nước theo tỷ lệ 1:1 (về thể tích), khuấy đều với tốc độ khuấy 600 vòng/phút trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiếp đó, hoà tan cao chiết tổng nha đam trong rượu etylic tuyệt đối, trong đó tỷ lệ khối lượng cao chiết tổng nha đam: thể tích rượu etylic là 1:1; rồi nhỏ từ từ, tốt hơn là với tốc độ 0,5mL/phút vào hệ trên trong điều kiện nhiệt độ phòng, tốc độ khuấy 600 vòng/phút với tỷ lệ thể tích của dung dịch chứa cao chiết tổng nha đam: dung dịch trên là 1: 2,5 và khuấy đều trên máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng. Sau 48 giờ, dung môi được cho bay hơi từ từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ. Để bảo quản sản phẩm tốt hơn, chúng tôi tiến hành đông khô dung dịch chứa nano cao định chuẩn Ba kích tím thu được để cho ra sản phẩm nano cao định chuẩn Ba kích tím ở dạng bột màu vàng.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành đo phổ hấp thụ hồng ngoại của nano cao định chuẩn Ba kích tím. Hình 2 là phổ hồng ngoại FT-IR của cao chiết nước từ rễ Ba kích tím, cao định chuẩn Ba kích tím, cao chiết tổng nha đam và nano cao định chuẩn Ba kích tím. Dễ dàng nhận thấy một số đỉnh hấp thụ đặc trưng của các nguyên liệu (cao chiết nước từ rễ Ba kích tím, cao định chuẩn Ba kích tím, cao chiết tổng nha đam) đã bị dịch chuyển khi được nano hóa trong sản phẩm. Cụ thể, các dao động đặc trưng của liên kết O-H của cao chiết nước từ rễ Ba kích tím 3394, cao chiết tổng nha đam 3434 và cao định chuẩn Ba kích tím 3381 đều bị dịch chuyển trong phổ của sản phẩm 3432. Tương tự như vậy, liên kết đôi C=O ở cao chiết tổng nha đam 1590, cao chiết nước Ba kích tím 1641 và cao định chuẩn Ba kích 1640 cũng thay đổi số sóng khi xuất hiện trong phổ của sản phẩm nano 1642. Ngoài ra, sự thay đổi không quá nhiều của dao động C-O-C của các chất ban đầu (cao chiết nước Ba kích tím 1032, cao định chuẩn Ba kích tím 1034) so với của sản phẩm 1076 cũng góp phần chứng minh sự biến đổi về cấu trúc của các thành phần trong sản phẩm so với nguyên liệu ban đầu. Sự dịch chuyển của các pic trong phổ của sản phẩm nano

so với phổ của các hợp chất ban đầu thể hiện sự nano hóa cao định chuẩn Ba kích tím phối hợp với cao chiết tổng nha đam bằng cao chiết nước Ba kích tím đã xảy ra.

Hình 3 là hình ảnh FESEM của nano cao định chuẩn Ba kích tím, kích cỡ của các tiểu phân nano cao định chuẩn Ba kích tím khá nhỏ và đồng đều, có dạng hình cầu và phân bố đồng đều với đường kính trong khoảng 50-70 nm. Kết quả phân bố kích thước theo phương pháp DLS (hình 4) cũng khẳng định lại hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím thu được có phân bố kích thước hẹp, kích thước trung bình khoảng 67 nm. Hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím được đánh giá khá bền vững thông qua giá trị thế zeta âm là -36,2 mV (hình 5).

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím thu được theo phương pháp của sáng chế.

Độc tính và tác dụng chống loãng xương của nano cao định chuẩn Ba kích tím được đánh giá thông qua các thử nghiệm sinh học *in vitro*.

- Xác định tác động đến sự hoạt động của enzym alkaline phosphatase (ALP) trong tế bào MC3T3-E1 cho thấy hoạt động của ALP tăng cường ở mức có ý nghĩa thống kê dưới tác động của nano cao định chuẩn Ba kích tím ở nồng độ 25 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$) với mức hoạt tính đạt 112,19%. Tuy nhiên, mẫu đối chứng dương (Alendronat) cho thấy hoạt tính gây độc tế bào và chưa thể hiện hoạt tính cảm ứng ALP, hoạt động của ALP giảm mạnh nhưng chưa ở mức có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) với mức hoạt tính đạt 85,57-90,47% (bảng 1).

- Xác định khả năng tăng cường tổng hợp collagen của tế bào MC3T3-E1 cho thấy hoạt động tổng hợp collagen được tăng cường ở mức có ý nghĩa thống kê dưới tác động của mẫu BN1 ở nồng độ 25 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$) với mức hoạt tính đạt 106,50%. Trong khi đó, hoạt động tổng hợp collagen được tăng cường ở mức có ý nghĩa thống kê dưới tác động của mẫu đối chứng dương ở tất cả các nồng độ nghiên cứu ($P < 0,05$) với mức hoạt tính đạt 109,14 - 116,74% (bảng 2).

- Xác định khả năng kích thích tạo khoáng canxi của tế bào MC3T3-E1 cho thấy hoạt động tạo khoáng canxi được tăng cường ở mức có ý nghĩa thống kê dưới tác động của mẫu BN1 ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$) với mức hoạt tính đạt 155,88%. Đồng thời, mẫu đối chứng dương cho thấy hoạt động tạo khoáng được tăng cường ở mức có ý nghĩa thống kê ở tất cả các nồng độ nghiên cứu ($P < 0,05$) với mức hoạt tính đạt 109,14 - 116,74% (bảng 3). Hình ảnh tế bào được thể hiện trên hình 6.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dòng tế bào thử nghiệm tác dụng chống loãng xương *in vitro*: nguyên bào xương chuột MC3T3-E1 được cung cấp bởi ngân hàng tế bào ATCC (Manassas, Virginia, USA).

Thiết bị:

Máy rung siêu âm, máy đông khô, kính hiển vi soi ngược có chụp ảnh, Box laminar, tủ ẩm CO_2 , máy đọc ELISA (Bio-Rad), các vật liệu nuôi cấy tế bào, phòng thí nghiệm và các điều kiện nuôi cấy tế bào.

Phương pháp nghiên cứu vật liệu

- Phổ hồng ngoại FTIR (FTIR SHIMADZU Spectrophotometer)
- Kính hiển vi điện tử quét FESEM (Hitachi S-4800)
- Thiết bị đo kích thước và thế zeta (Nano ZS - Malvern-UK)

Phương pháp thử nghiệm sinh học:

- Xác định sự phát triển của tế bào MC3T3-E1 dưới tác động của chất nghiên cứu bằng phương pháp MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazol brom) thông qua sự hình thành sản phẩm formazan màu khi đưa MTT vào giếng tế bào dưới tác động của enzym trong tế bào sống. Các tế bào được ủ với chất thử trong tủ ẩm 37°C , 5% CO_2 trong 3 ngày. % sống sót tế bào được đánh giá bằng máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad), đọc kết quả ở bước sóng 490 nm.

- Đánh giá sự hoạt động của alkaline phosphatase (ALP) bằng ALP Assay Kit (Abcam, Cambridge, England) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Đánh giá khả năng kích thích tạo collagen bằng phương pháp nhuộm Sirius red. Khả năng kích thích tạo collagen được đánh giá thông qua giá trị mật độ quang được xác định bằng máy đo ELISA (Bio-Rad) ở bước sóng 550nm.

- Đánh giá khả năng kích thích tạo khoáng bằng phương pháp nhuộm Anizarin red S. Khả năng kích thích tạo khoáng (% tạo canxi) được đánh giá thông qua giá trị mật độ quang ở bước sóng 561nm bằng máy đo Microplate Reader (Biorad).

Phương pháp tính toán và xử lý kết quả: Các số liệu được xử lý trên Excel, được trình bày dạng mean $\pm$ SD. Các thuật toán thống kê Student's t-test, F'test và phương pháp phân tích phương sai một nhân tố ngẫu nhiên (one way ANOVA) để kiểm tra sự sai khác có ý nghĩa so với đối chứng âm, với $P < 0,05$ được coi là sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê sinh học.

Ví dụ 1. Phương pháp chiết tách cao định chuẩn Ba kích tím và cao chiết nước Ba kích tím từ rễ Ba kích tím (*Morinda officinalis* How.)

Rễ Ba kích rút lõi, chia nhỏ, sấy khô sau đó nghiền thành bột mịn. Ngâm 100g bột Ba kích trong 1L dung môi rượu etylic tuyệt đối: nước cất theo tỷ lệ về thể tích 7: 3, nhiệt độ chiết là 70°C trong 24 giờ, lấy dịch chiết, lặp lại 3 lần để chiết hoàn toàn. Cô quay chân không dịch chiết Ba kích tới khi thành cao đặc (độ ẩm < 20%); sau đó sấy tĩnh ở 60 - 70°C đến khi độ ẩm < 5%. Tán, rây cao khô Ba kích thành bột mịn.

Chiết tách phân đoạn cao định chuẩn Ba kích tím giàu antraquinon và iridoit: Cao chiết Ba kích được phân tán trong nước, sau đó lắc hỗn hợp với diethyl ete và etyl axetat. Dịch chiết diethyl ete và etyl axetat sau đó được cất quay để loại hoàn toàn dung môi hữu cơ, thu được hỗn hợp antraquinon. Sản phẩm được tinh chế bằng cách hòa tan cần antraquinon trong ete và lặp lại bước chiết với nước nhiều lần.

Phần bã được liệu sau khi tách cao định chuẩn thu được để khô tự nhiên cho bay hết cồn, sau đó được đưa vào bình chiết hồi lưu, chiết 4 lần bằng nước cất, lọc thu được dịch chiết nước. Loại các protein bằng cách rửa chúng bằng hỗn hợp n-butanol-cloroform (theo tỷ lệ về thể tích là 1:4), ly tâm loại rửa. Để tách các sacarit khỏi các axit hữu cơ, vitamin bằng lượng lớn etanol, lọc v.v. và thu được các sacarit tinh khiết, rửa chúng. Hòa tan lại trong nước cất, loại tạp bằng sắc kí trao đổi anion. Dịch lọc thu được được rửa qua đêm bằng etanol lạnh, sấy khô. Polysacarit và oligosacarit được tách riêng bằng cách cho kết tinh phân đoạn theo độ cồn tăng dần, polysacarit kết tinh ở ngay nồng độ cồn thấp. Oligosacarit kết tinh ở nồng độ cồn cao hơn.

Ví dụ 2. Phương pháp chiết tách cao chiết tổng nha đam

Thân nha đam được rửa sạch, gọt vỏ. Chiết nha đam trong cồn bằng cách ngâm 100g nha đam trong 1L rượu etylic tuyệt đối ở nhiệt độ 70°C trong 24 giờ. Sau khi thu được dịch chiết, tiếp tục chiết lại trong rượu etylic thêm 2 lần nữa, để chiết được hoàn toàn. Dịch chiết thu được là tổng dịch thu được sau 3 lần chiết. Cô quay chân không dịch chiết nha đam tới khi thành cao đặc (độ ẩm < 20%); sau đó sấy tĩnh ở 60 - 70°C đến khi độ ẩm < 5%.

Ví dụ 3. Phương pháp sản xuất hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím

Hoà tan 100 mg cao chiết nước từ rễ Ba kích tím trong 100 mL nước cất hai lần. Đồng thời, hoà tan hoàn toàn 100 mg phân đoạn cao định chuẩn Ba kích tím vào 100 ml rượu etylic tuyệt đối. Cho từ từ với tốc độ 0,5mL/phút dung dịch chứa phân đoạn cao định chuẩn Ba kích tím trong cồn vào dung dịch chứa cao chiết nước Ba kích tím, khuấy đều trên máy khuấy từ với tốc độ khuấy 600 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong vòng 2 giờ. Hoà tan 80 mg cao chiết tổng nha đam vào 80 ml rượu etylic tuyệt đối. Cho từ từ với tốc độ 0,5mL/phút dung dịch chứa cao chiết tổng nha đam trong cồn vào dung dịch trên, khuấy đều với tốc độ khuấy 600 vòng/phút trong 48 giờ. Tiếp đó, dung môi được cho bay hơi từ từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian

24 giờ. Phần dung dịch chứa nano cao định chuẩn Ba kích tím được đem đi đông khô thu được dạng bột nano cao định chuẩn Ba kích tím. Kích thước hạt nano đo được khoảng từ 50-70 nm.

Ví dụ 4. Thử nghiệm đánh giá hoạt tính biệt hoá nguyên bào xương thành tế bào xương

Tế bào tiền nguyên bào xương MC3T3-E1 là loại tế bào có khả năng biệt hóa thành các tế bào tạo xương. Trong quá trình biệt hóa, tế bào MC3T3-E1 thể hiện những đặc điểm đặc trưng của nguyên bào xương như sản xuất alkaline phosphatase (ALP), tăng cường tổng hợp collagen là chất nền ngoại bào từ procollagen và cuối cùng là tạo khoáng trên chất nền ngoại bào. Vì vậy, dòng tế bào này được sử dụng rộng rãi trên thế giới để đánh giá khả năng chống loãng xương của các mẫu nghiên cứu. Các chỉ tiêu như khả năng kích thích tạo ALP, khả năng tăng cường tổng hợp collagen và khả năng tăng cường tạo khoáng là các dấu hiệu đặc trưng cho khả năng chống loãng xương.

Tác động của mẫu nghiên cứu đến hoạt động của ALP trong tế bào MC3T3-E1 khi so sánh với đối chứng âm và đối chứng dương (Alendronat) được thể hiện dưới dạng % hoạt tính ở bảng 1.

Bảng 1. Tác động của mẫu nghiên cứu đến hoạt động của ALP

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Nano cao định chuẩn Ba kích tím		Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Đối chứng dương	
	% hoạt tính	% tế bào sống		% hoạt tính	% tế bào sống
100	93,91	90,97	1	85,57	93,67
50	102,63	97,44	0,5	88,73	96,25
25	112,19*	101,06	0,25	90,47	97,29
Đối chứng âm	100,00	100,00			

Tác động của mẫu nghiên cứu đến khả năng tăng cường tổng hợp collagen của tế bào MC3T3-E1 khi so sánh với đối chứng âm và đối chứng dương (Alendronat) được thể hiện dưới dạng % hoạt tính ở bảng 2.

Bảng 2. Tác động của mẫu nghiên cứu đến sự tổng hợp collagen

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Nano cao định chuẩn Ba kích tím		Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Đối chứng dương	
	% hoạt tính	% tế bào sống		% hoạt tính	% tế bào sống
100	100,33	90,97	1	109,14*	93,67
50	100,11	97,44	0,5	115,09*	96,25
25	106,50*	101,06	0,25	116,74*	97,29
Đối chứng âm	100,00	100,00			

Tác động của mẫu nghiên cứu đến khả năng tăng cường tổng hợp collagen của tế bào MC3T3-E1 khi so sánh với đối chứng âm và đối chứng dương (Alendronat) sau được thể hiện dưới dạng % hoạt tính ở bảng 3.

Bảng 3. Tác động của các mẫu nghiên cứu đến sự tạo khoáng

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Nano cao định chuẩn Ba kích tím		Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Đối chứng dương	
	% hoạt tính	% tế bào sống		% hoạt tính	% tế bào sống
100	155,88*	99,92	1	45,23	17,03
50	91,43	103,09	0,5	201,57**	90,98
25	86,89	103,46	0,25	159,53*	102,51
Đối chứng âm	100,00	100,00			

Hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím đã thể hiện khả năng cảm ứng biệt hóa nguyên bào xương và chống loãng xương ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) khi tăng cường hoạt động của ALP, tổng hợp collagen ở nồng độ 25 $\mu\text{g/ml}$; tăng hoạt động tạo khoáng canxi ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$. So với hệ nano cao định chuẩn Ba kích

tím, mẫu đối chứng dương đã thể hiện khả năng cảm ứng biệt hóa nguyên bào xương và chống loãng xương ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) khi tăng cường hoạt động tổng hợp collagen, tạo khoáng mạnh ở nồng độ 0,5 và 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Tuy nhiên, mẫu đối chứng dương cho thấy hoạt tính gây độc tế bào và chưa thể hiện hoạt tính cảm ứng ALP.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Loãng xương là căn bệnh thường gặp ở con người từ giai đoạn trung niên trở về già, đặc biệt là trên phụ nữ. Tại Việt Nam, tỷ lệ dân số bước vào độ tuổi già hóa và số lượng người già đang ngày càng tăng cao. Do vậy, nhu cầu về các sản phẩm cho phòng và chống loãng xương đang ngày càng mở rộng. Tại Việt Nam, các sản phẩm có nguồn gốc từ thiên nhiên đang dần chiếm được niềm tin từ người tiêu dùng do hiệu quả tác dụng tốt và thân thiện với môi trường. Cùng với đó, những chính sách trong việc phát triển nguồn cây dược liệu cũng như các công nghệ chế biến, sản xuất hiện đại cho các sản phẩm có nguồn gốc thiên nhiên cũng được khuyến khích và đầu tư mạnh mẽ. Ba Kích tím là một trong những loại dược liệu của Việt Nam được sử dụng từ lâu đời với tác dụng cải thiện sức khỏe của con người. Tuy vậy, các sản phẩm sản xuất từ Ba Kích tím mới chỉ tồn tại dưới dạng củ thô hoặc ngâm rượu, điều này gây cản trở việc thương mại sản phẩm tới tay người tiêu dùng. Hiện nay, chưa có sản phẩm nào từ Ba Kích dưới dạng thực phẩm chức năng được bào chế phù hợp với mọi đối tượng tiêu dùng. Hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím có tác dụng phòng ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh loãng xương được nghiên cứu, phát triển sản xuất trên quy mô công nghiệp hứa hẹn sẽ thu hút được sự quan tâm lớn từ thị trường. Công nghệ hiện đại được phát triển bởi chính các nhà khoa học Việt Nam cho phép tạo ra sản phẩm có chất lượng tốt với chi phí giá thành hợp lý, phù hợp với người tiêu dùng.

Về kinh tế, sản phẩm nano cao định chuẩn Ba kích tím này có thể đóng góp cho việc sử dụng dược liệu chiết xuất từ cây cỏ Việt Nam, giúp khai thác có hiệu quả tiềm năng thiên nhiên. Nếu thành công có thể từng bước thay thế các dược phẩm

nhập khẩu đắt tiền. Ba kích là một giống cây rất phổ biến ở một số tỉnh phía Bắc. Việc nano hóa dược chất từ cây Ba kích và Nha đam, để tăng hiệu quả sử dụng, giảm thiểu tác dụng phụ, giảm liều lượng sử dụng trên người dùng sẽ mang lại một hiệu quả kinh tế rất lớn.

Về mặt xã hội, loãng xương được đánh giá là một trong những bệnh mãn tính tiêu tốn nhiều chi phí điều trị nhất, tương đương với bệnh đái tháo đường và cao hơn nhiều so với hai bệnh ung thư ở phụ nữ là ung thư vú và ung thư cổ tử cung. Bên cạnh đó, loãng xương cũng đã và đang là gánh nặng cho chương trình chăm sóc sức khỏe người dân. Vì thế, nhu cầu của thị trường thuốc về thuốc điều trị trong nước là rất lớn. Các thuốc tăng cường sinh lực và chống loãng xương đang lưu hành trên thị trường hầu hết là sản phẩm nhập ngoại với giá thành đắt, không phải tất cả các bệnh nhân đều có thể tham gia điều trị được. Với nhu cầu ngày càng tăng như vậy, việc có một sản phẩm có hiệu quả, giá thành rẻ do được chế tạo trong nước (giá vật liệu và nhân công rẻ) sẽ đáp ứng được mong đợi của thị trường. Và nhân văn hơn là số bệnh nhân được điều trị sẽ tăng lên nhiều lần khi giá thành của sản phẩm rẻ, phù hợp với kinh tế của nước ta hiện nay. Đồng thời, góp phần làm giảm chảy máu ngoại tệ khi phải nhập thuốc ở nước ngoài. Việc sản xuất vật liệu nano trong nước sẽ tận dụng được nguồn nguyên liệu trong nước, đồng thời góp phần tạo thêm công việc cho người lao động.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím (*Morinda officinalis* How.) bao gồm các bước:

(i) hoà tan cao chiết nước từ rễ Ba kích tím chứa polysacarit và các oligosacarit trong nước cất, với tỷ lệ khối lượng của cao chiết nước Ba kích tím và thể tích nước cất là 1:1;

(ii) phân đoạn cao định chuẩn Ba kích tím giàu antraquinon và iridoit được hòa tan trong rượu etylic tuyệt đối, trong đó tỷ lệ khối lượng cao định chuẩn Ba kích tím: thể tích rượu etylic là 1:1, rồi nhỏ từ từ, tốt hơn là với tốc độ 0,5mL/phút vào dung dịch thu được ở bước (i) theo tỷ lệ 1:1 (về thể tích) trong điều kiện nhiệt độ phòng, khuấy đều với tốc độ khuấy 600 vòng/phút trong 2 giờ;

(iii) hoà tan cao chiết tổng nha đam trong rượu etylic tuyệt đối, trong đó tỷ lệ khối lượng cao chiết nha đam: thể tích rượu etylic là 1:1;

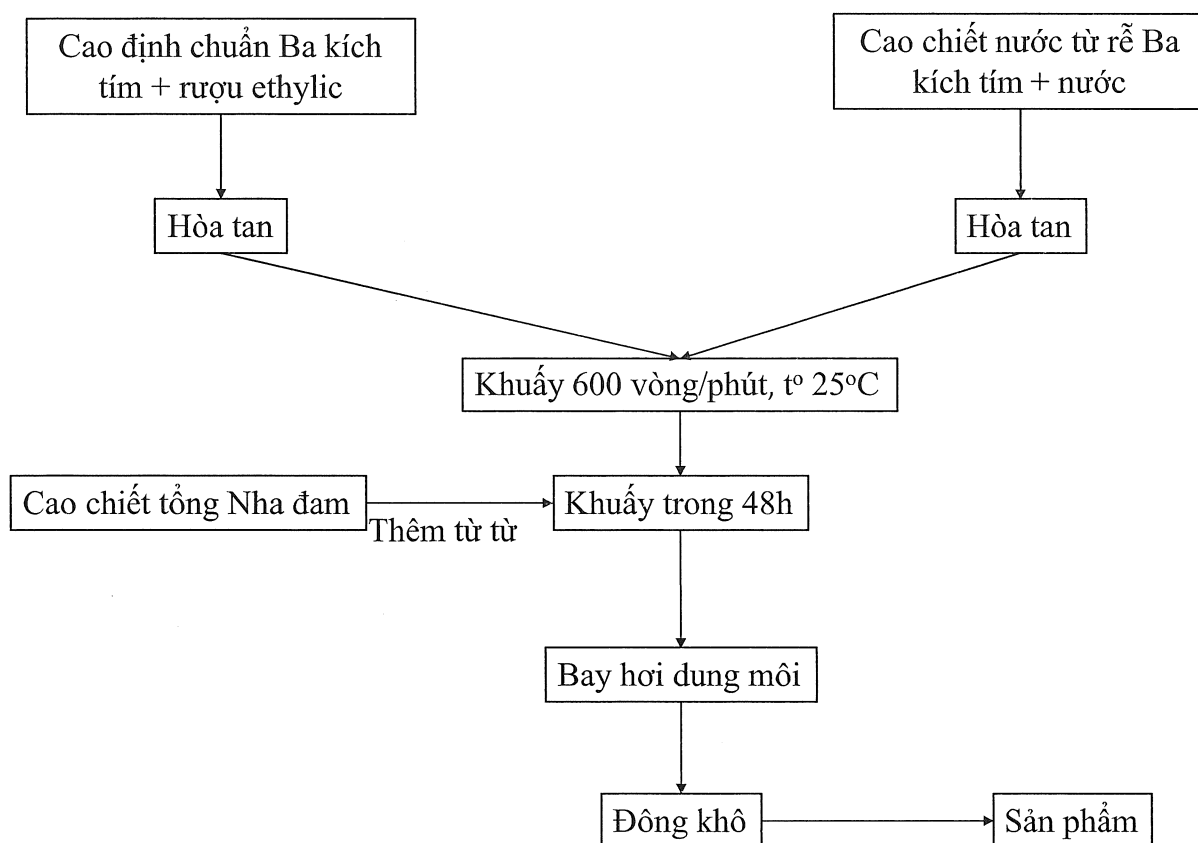
(iv) nhỏ từ từ, tốt hơn là ở tốc độ 0,5mL/phút, dung dịch chứa cao chiết tổng nha đam vào dung dịch thu được ở bước (ii) trong điều kiện nhiệt độ phòng, tốc độ khuấy 600 vòng/phút với tỷ lệ thể tích của dung dịch chứa cao chiết tổng nha đam: dung dịch thu được ở bước (ii) là 1: 2,5 và khuấy đều trên máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ;

(v) làm bay hơi dung môi từ từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ; và

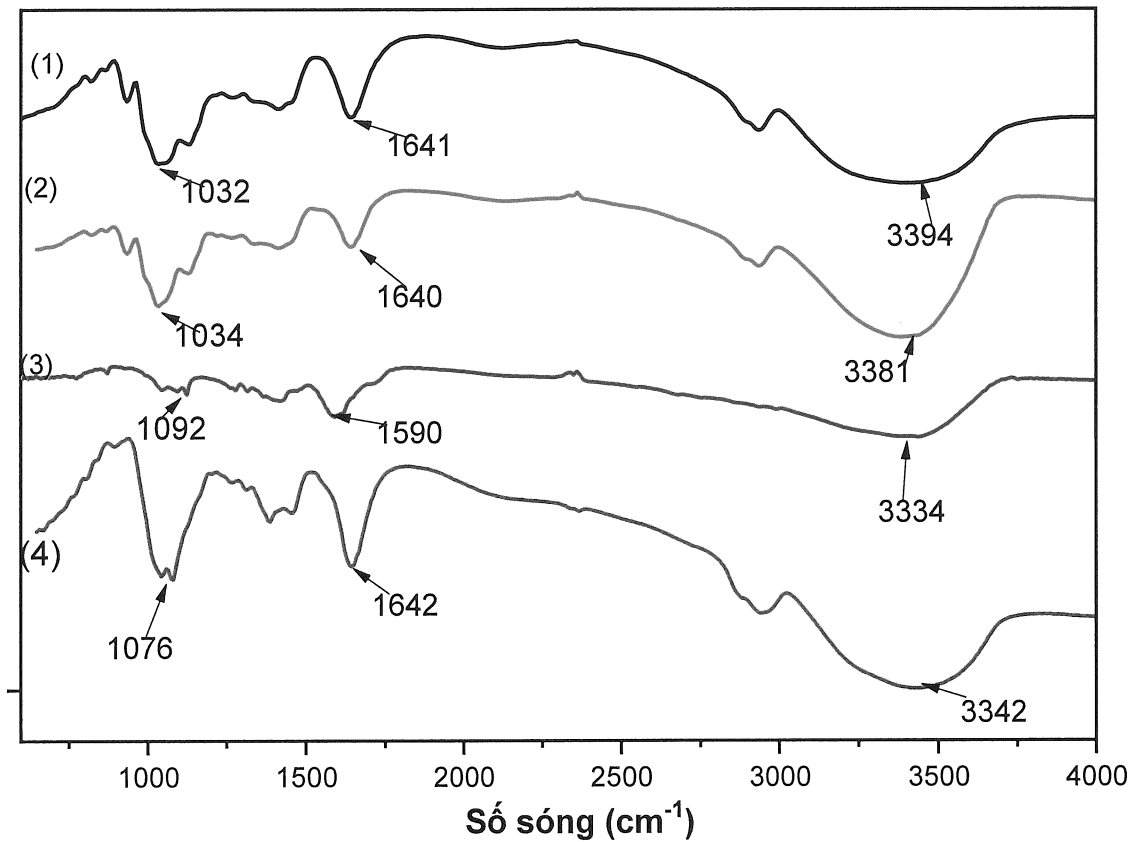
(vi) làm đông khô dung dịch chứa nano cao định chuẩn Ba kích tím thu được ở bước (v) để cho ra hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím ở dạng bột màu vàng nhạt, mùi thơm, kích thước hạt nano thu được nằm trong khoảng 50-70nm.

2. Hệ nano cao định chuẩn Ba kích tím (*Morinda officinalis* How.) được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 1.

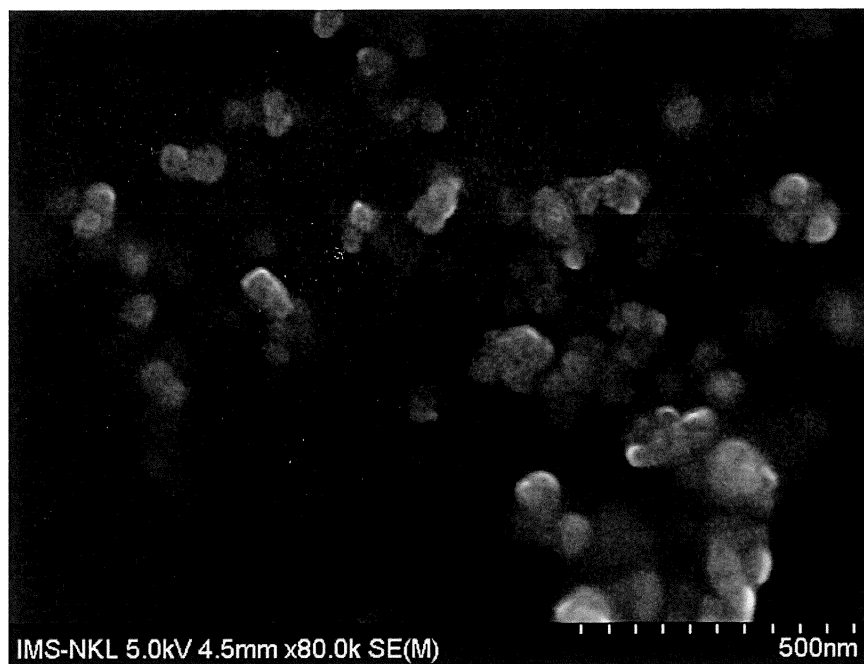
Hình 1. Sơ đồ quy trình sản xuất sản phẩm dạng bột nano cao định chuẩn Ba kích tím



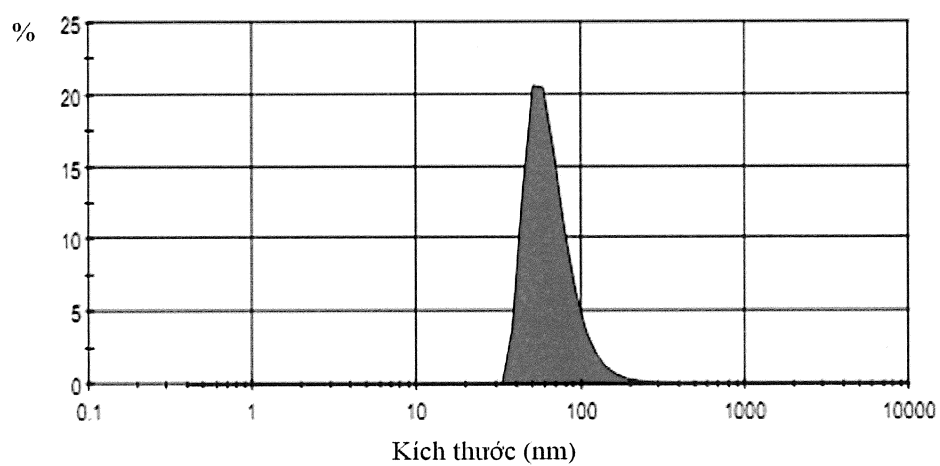
Hình 2. Phổ FT-IR của (1) Cao chiết nước Ba kích tím, (2) Cao định chuẩn Ba kích tím, (3) Cao chiết tổng Nha đam, (4) Nano cao định chuẩn Ba kích tím

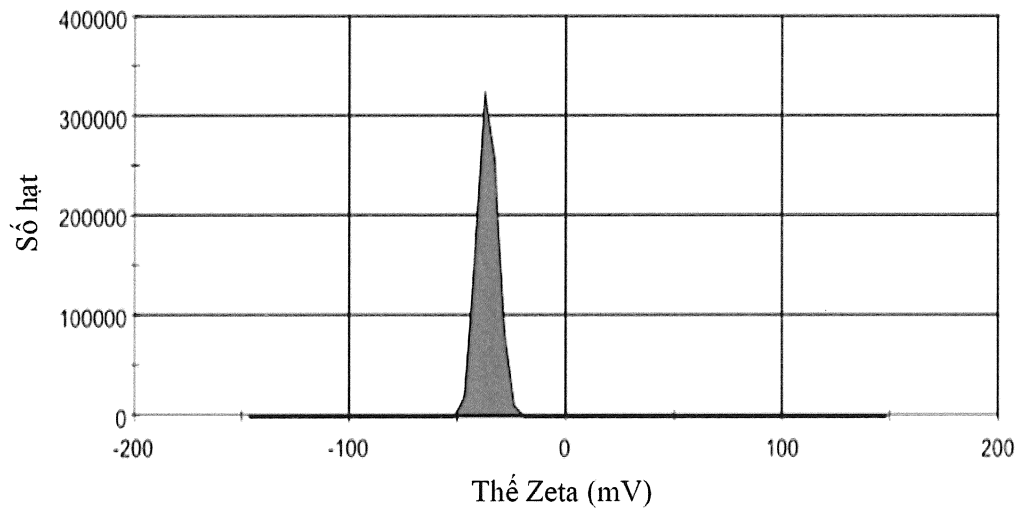


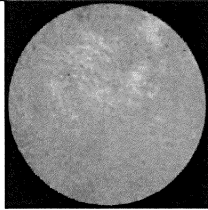
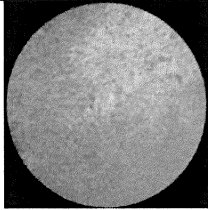
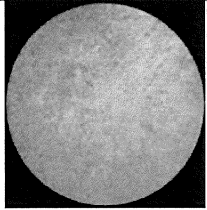
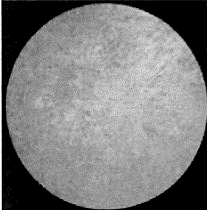
Hình 3. Ảnh chụp FESEM của nano cao định chuẩn Ba kích tím



Hình 4. Phân bố kích thước của nano cao định chuẩn Ba kích tím



Hình 5. Thế Zeta của nano cao định chuẩn Ba kích tím**Hình 6.** Tác động của Nano cao định chuẩn Ba kích tím, Đối chứng âm và Đối chứng dương (Alendronat) ở các nồng độ khác nhau tới sự tạo khoáng canxi trên tế bào MC3T3-E1

Nano cao định chuẩn Ba kích tím (100µg/mL)	Nano cao định chuẩn Ba kích tím (50µg/mL)	Nano cao định chuẩn Ba kích tím (25µg/mL)	Đối chứng âm
			
Đối chứng dương (1 µg/mL)	Đối chứng dương (0,5 µg/mL)	Đối chứng dương (0,25 µg/mL)	
