



(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)



2-0002859

(51) **A61K 9/107; B82Y 5/00; A61K 9/14**
2016.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00552 (22) 16/01/2020
(67) 1-2020-00336
(45) 25/04/2022 409 (43) 27/04/2020 385ASC
(73) Công ty cổ phần Wakamono (VN)
95 Trần Trọng Cung, phường Tân Thuận Đông, Quận 7, TP. Hồ Chí Minh.
(72) Lại Nam Hải (VN); Đặng Thị Hồng Ngọc (VN).
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ PADEMARK (PADEMARK CO.,LTD.)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT HỆ VI NHŨ TƯƠNG NANO EPIGALLOCATECHIN-3-GALAT (EGCG)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano EGCG bao gồm các bước: (i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho EGCG hòa tan trong dung môi etanol bằng máy khuấy và kết hợp gia nhiệt và giữ nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 8 giờ; (ii) chuẩn bị chất mang bằng cách gia nhiệt PEG dạng lỏng đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy đều; (iii) bổ sung chất mang vào pha phân tán theo tỷ lệ 3:1 theo khối lượng, tiếp tục giữ nhiệt độ hỗn hợp chất mang và pha phân tán nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy trong môi trường hút chân không; (iv) nhũ hóa bằng cách: gia nhiệt cho đến khi nhiệt độ đạt 60°C, bổ sung dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 (PEG-40 Hydrogenated Castor Oil) và Polysorbate (Tween) theo tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 3:1,5 đến 4:1 vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu được ở bước (iii), tiếp tục khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C, trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 đến 5 giờ, kiểm soát chất lượng sản phẩm tạo thành cho đến khi kiểm tra thấy trong suốt, dừng phản ứng, hạ nhiệt độ đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C; tiến hành nhũ hóa trong thiết bị tạo nhũ toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút; (v) hỗn hợp thu được được làm lạnh đến 25°C và được bơm bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm ở tần số 60 Hz, sau đó lọc sản phẩm bằng cách bơm qua hệ thống lọc nano trước khi chiết rót đóng gói.

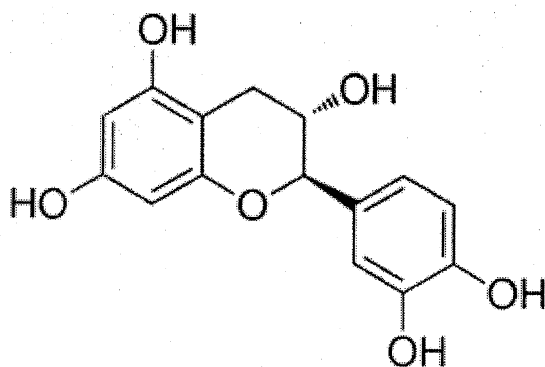
Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano epigallocatechin-3-galat.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Catechin là một loại hợp chất phenolic, rất phong phú trong trà, ca cao, rượu vang đỏ và các loại quả mọng, có hoạt tính chống oxy hóa mạnh, đặc biệt là epigallocatechin-3-galate (EGCG). Tương tác của catechin với các isoenzyme topoisomerase dường như đóng một vai trò quan trọng đối với tính toàn vẹn DNA. Tên của họ hóa học catechin bắt nguồn từ catechu, là nước ép tannic hay chiết xuất đun sôi từ *Mimosa catechu* (*Acacia catechu* L.f).

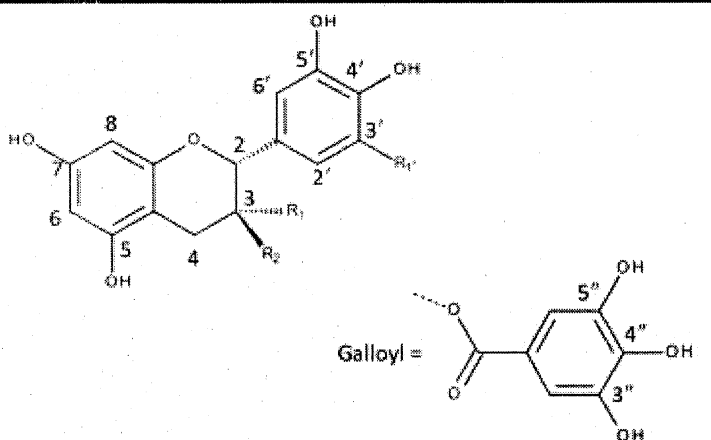
Catechin có công thức hóa học là $C_{15}H_{14}O_6$, phân tử lượng là 290.27 g/mol và có cấu trúc phân tử như sau:



Trà xanh, được sản xuất từ lá *Camellia sinensis*, là một trong những đồ uống được tiêu thụ rộng rãi nhất trên thế giới. Đồ uống này tập trung nhiều chất chống oxy hóa là nhóm polyphenol, cụ thể như catechin (flavan-3-ols) (Graham H. N., 1992; Cirillo G. và cộng sự và cộng sự, 2016). Trà xanh có một lượng lớn polyphenol được chia thành ba nhóm chính: Flavanols, flavones, và flavonols. Flavanols chiếm phần lớn hàm lượng trong trà xanh, với catechin chiếm khoảng một phần ba trọng lượng lá khô và được phân phối chủ yếu bởi bốn phân tử: (-)-Epigallocatechin-3-galate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-galate

(ECG), và (-)-epicatechin (EC) (Melanie và cộng sự, 2014). Trong đó, EGCG dồi dào và có hoạt tính trị liệu nhất, chiếm tới 65% tổng hàm lượng catechin (Islam M. A., 2012).

Catechins



R_1	R_2	R_1	
H	OH	H	(+)-Catechin (C)
OH	H	H	(-)-Epicatechin (EC)
OH	H	OH	(-)-Epigallocatechin (EGC)
Galloyl	H	H	(-)-Epicatechingallat (ECG)
Galloyl	H	OH	(-)-Epigallocatechingallat (EGCG)

Epigallocatechin-3-galate (EGCG), là một chất chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, kháng virus mạnh mẽ và có khả năng điều chỉnh các con đường truyền tín hiệu tế bào liên quan đến việc ngăn ngừa một số bệnh, bao gồm ung thư, đái tháo đường, thoái hóa thần kinh, béo phì và bệnh tim mạch. EGCG không độc hại, không có tác dụng phụ được ghi nhận, làm cho hợp chất tự nhiên này trở thành lựa chọn phổ biến cho nghiên cứu và phòng ngừa và điều trị một số bệnh. Tuy nhiên, hợp chất polyphenol này có sinh khả dụng thấp và do đó cần một liều lớn để đạt được nồng độ trị liệu.

Ngày nay, hầu hết các phương pháp điều trị hiện đại hiện có để điều trị ung thư đều rất tốn kém và độc hại và có hiệu quả thấp trong điều trị bệnh (Barr R. D. và cộng sự và cộng sự, 2016). Các bệnh tim mạch có tỷ lệ mắc cao do lối sống ít vận động, dinh dưỡng kém và các yếu tố môi trường xung quanh. Một chế độ ăn giàu cholesterol, chất béo và đường có thể dẫn đến các bệnh mạch vành như xơ cứng động mạch và thiếu máu cục bộ (Lee S. K. và cộng sự, 2012; Gokulakrishnan A. và cộng sự, 2011). Do đó, việc nghiên cứu các hợp chất tự nhiên như EGCG

có nguồn gốc từ trà xanh là rất cấp bách để phòng ngừa và điều trị ung thư và các bệnh khác (Singh B. N. và cộng sự, 2011). Tuy nhiên, sự hấp thu kém và không ổn định của EGCG là nhược điểm chính để sử dụng phân tử này trong phòng ngừa và điều trị.

Một số nghiên cứu đã áp dụng việc sử dụng các vật liệu nano để cải thiện tính khả dụng sinh học và tính ổn định của EGCG. Các loại vật liệu nano khác nhau đã được sử dụng, bao gồm các hạt nano lipid, liposom, hạt nano polyme, hạt nano vàng và các loại vật liệu nano khác bao gồm vật liệu vô cơ, protein và peptit.

Phần lớn các nghiên cứu đã tập trung vào các vật liệu nano lipid và polyme, có thể là do các đặc tính có lợi của chúng như tính tương thích sinh học. Mặt khác, sự an toàn của các vật liệu nano vàng và vô cơ vẫn chưa chắc chắn. Việc đóng gói EGCG trong các vật liệu nano, tăng cường sự ổn định và hiệu quả điều trị cao hơn trong điều trị nhiều chứng rối loạn bao gồm ung thư, thoái hóa thần kinh, da và mắt (Andreia G. và cộng sự, 2017).

Qiaomei Ru và cộng sự (2010) đã điều chế thành công hệ vi nhũ tương dạng nhũ tương dầu trong nước (O/W) được ổn định bởi α -carrageenan và β -lactoglobulin bằng phương pháp đồng nhất áp suất cao (HPH), với mục tiêu phát triển các chất mang tương thích sinh học cho thành phần hoạt tính của trà xanh, Epigallocatechin-3-galat (EGCG). Hệ vi nhũ tương O/W dưới áp suất với kích thước giọt khoảng 400nm đã được sử dụng để đóng gói EGCG. Kết quả cho thấy, khi nồng độ EGCG lên tới 0,5% trong nhũ tương, thì EGCG có thể được gói gọn thành công trong các nhũ tương O/W được ổn định bởi α -carrageenan và β -lactoglobulin. Trong vòng 14 ngày, kích thước giọt nhũ tương cho thấy những thay đổi không đáng kể. Tuy nhiên, khi nồng độ EGCG > 0,5%, quan sát cho thấy sự không ổn định đáng kể của các nhũ tương O/W do sự liên kết giữa EGCG và β -lactoglobulin. Kết quả cũng cho thấy hoạt động chống ung thư *in vitro* của nano nhũ tương EGCG được tăng cường và hiệu quả hơn so với EGCG tự do.

Tài liệu “Exploring oral nanoemulsions for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs” của S. Kotta và đồng tác giả trong Expert Opinion Drug Delivery, Vol.9, P.585-598 công bố ngày 09/03/2012 đã bộc lộ phương pháp điều chế hệ vi nhũ tương chứa các hợp chất ít tan trong nước, trong đó có epigallocatechin galat (EGCG). Tài liệu này liệt kê các chất hoạt động bề mặt để điều chế vi nhũ tương, trong đó có dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 (Cremophor, Polyoxyl 40 hydrogenated castor oil) và các PEG sorbitan (Tween), và chúng có thể được sử

dụng kết hợp trong một hệ vi nhũ tương. Tuy nhiên, trong quy trình này tác giả đưa ra nhiều phương pháp thử dưới mô hình khảo sát thử nghiệm, chưa áp dụng cho quy mô sản xuất công nghiệp được. Cụ thể với phương pháp tạo nhũ tương nano vi lỏng áp suất cao không sử dụng các chất hoạt động trên, sử dụng áp suất cao tạo kích thước hạt dưới 100nm các bước thực hiện và phương pháp khác với quy trình thực hiện của giải pháp; phương pháp siêu âm không sử dụng các chất hoạt động trên, sử dụng sóng siêu âm tạo kích thước hạt từ 90 đến 120nm các bước thực hiện và phương pháp khác với quy trình thực hiện của giải pháp; ngoài ra còn phương pháp PIT, PIC,... nhưng không nêu hiệu quả đạt được sau thử nghiệm và các bước thực hiện hoàn toàn khác với giải pháp.

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US2018/0243211 A1 công bố ngày 30/08/2018 đã bộc lộ được phẩm chứa các mixen chứa EGCG, trong đó các mixen này được tạo ra bởi các chất hoạt động bề mặt được chọn từ các loại dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 (Cremophor) và các polysorbate (Tween), hoặc hỗn hợp của chúng. Quy trình này tạo các hạt có kích thước dao động từ 3 đến 250nm, biên độ dao động lớn, tính đồng nhất hạt chưa cao.

Tài liệu “Micro and nano encapsulation and controlled-release of phenolic compounds and other food ingredients” của tác giả Yan Jiang trong Disertation, công bố ngày 26/03/2010 đã bộc lộ các chất tạo nhũ được sử dụng để tạo vi nhũ tương chứa các polyphenol như là EGCG, trong đó có chất tạo nhũ polyoxyetylen sorbitan (Tween) và cũng bộc lộ việc sử dụng kết hợp hai hoặc nhiều chất nhũ hóa. Tuy nhiên, Tài liệu này không bộc lộ các điều kiện cụ thể để điều chế hệ vi nhũ tương nano epigallocatechin-3-galat, chỉ có quy trình thử nghiệm với curcumin, nhũ tương nano curcumin có kích thước hạt trung bình là 150,5nm và 148,4nm cho 1% và 1,5% curcumin tương ứng. Hiệu quả bao bọc là 77,5% đối với nhũ tương curcumin 1% và 71,5% đối với nhũ tương 1,5%. Với quy trình này hàm lượng chất đưa vào còn thấp chỉ từ 1 đến 1,5%, kích thước hạt chưa đồng nhất.

Đã biết đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Việt Nam số 1-2019-00609 công bố ngày 25/06/2019 đã bộc lộ quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano cannabidiol bao gồm các bước:

(i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho cannabidiol hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ khối lượng cannabidiol: thể tích dung môi etanol là 8:10 ở tốc độ nằm trong khoảng từ 300

đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 8 giờ;

(ii) chuẩn bị chất mang bằng cách gia nhiệt polyetylen glycol (PEG) và nước với từ 40 đến 60% theo khối lượng đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C, khuấy đều;

(iii) bổ sung chất mang vào pha phân tán theo tỷ lệ 40:60 theo khối lượng, tiếp tục gia nhiệt pha phân tán đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút;

(iv) nhũ hóa bằng cách: khi nhiệt độ đạt 100°C, bổ sung dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 (ACRYSOL K-140) vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu ở bước (iii) theo tỷ lệ 40:60 theo khối lượng, tiếp tục khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút, ở nhiệt độ nằm trong khoảng 100°C, trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở 100°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 đến 5 giờ, kiểm soát chất lượng sản phẩm tạo thành cho đến khi kiểm tra thấy trong suốt, dừng phản ứng, hạ nhiệt độ từ từ cho đến khi nhiệt độ còn nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C; tiến hành nhũ hóa toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút;

(v) lọc sản phẩm bằng cách bơm qua hệ thống lọc nano trước khi chiết rót đóng gói.

Kích thước các hạt của hệ vi nhũ tương nano cannabidiol thu được là từ 30-80nm.

Quy trình đề cập trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Việt Nam số 1-2019-00609 không phù hợp để áp dụng để sản xuất hệ vi nhũ tương nano Epigallocatechin-3-galat.

Do đó, công thức tạo hạt nano EGCG cho đến nay vẫn cần phải tiếp tục tối ưu. Cho đến nay chưa có nghiên cứu nào đề cập đến việc sử dụng hệ vi nhũ tương dầu trong nước sử dụng chất nhũ hóa dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40, một tá dược phổ biến trong dược phẩm và mỹ phẩm nhằm làm tăng tính tan và tăng độ bền của EGCG.

Vì vậy, cần thiết có quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương có các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ hơn 100nm, đồng đều, khả năng hòa tan tốt hơn trong nước và vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính EGCG trong quá trình nano hóa.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano epigallocatechin-3-galat (EGCG) tạo các hạt có kích thước nhỏ hơn 100nm, đồng đều, có khả năng hòa tan trong nước mà hoạt tính và cấu trúc không đổi giúp làm tăng hiệu quả sử dụng của hoạt chất epigallocatechin-3-galat, cụ thể là tăng khả năng hấp thu và tăng sinh khả dụng.

Để đạt được mục đích nêu trên, quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano epigallocatechin-3-galat theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

(i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho epigallocatechin-3-galat hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ khối lượng epigallocatechin-3-galat: dung môi etanol là 8:10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt và giữ nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 8 giờ;

(ii) chuẩn bị chất mang bằng cách gia nhiệt polyetylen glycol (PEG) dạng lỏng đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy đều;

(iii) bổ sung chất mang vào pha phân tán theo tỷ lệ 3:1 theo khối lượng, tiếp tục giữ nhiệt độ hỗn hợp chất mang và pha phân tán nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút trong môi trường hút chân không;

(iv) nhũ hóa bằng cách: gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu ở bước (iii) cho đến khi nhiệt độ đạt 60°C, bổ sung dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 (PEG-40 Hydrogenated Castor Oil) và Polysorbate (Tween) theo tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 3:1,5 đến 4:1 vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán theo tỷ lệ nằm trong khoảng từ 40:61 đến 40:60 theo khối lượng, tiếp tục khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C, trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 đến 5 giờ, kiểm soát chất lượng sản phẩm tạo thành bằng cách cho hòa tan vào nước và đo độ trong, nếu không đạt độ trong suốt thì tiếp tục gia nhiệt và đo độ trong 30 phút một lần cho đến khi kiểm tra thấy trong suốt, dừng phản ứng, hạ nhiệt độ trong thời gian từ 30 đến 60 phút cho đến khi nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C; tiến hành nhũ hóa trong thiết bị tạo nhũ toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút;

(v) Hỗn hợp thu được được làm lạnh đến 25°C và được bơm bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm (Ultrasonic Atomizer Nozzle) ở tần số 60 Hz, sau đó lọc sản phẩm bằng cách bơm qua hệ thống lọc nano trước khi chiết rót đóng gói.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh so sánh khả năng phân tán trong nước giữa nano epigallocatechin-3-galat (EGCG) thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích (bình A) và EGCG đã biết (bình B);

Hình 2 là ảnh kết quả phổ đo TEM kích thước hạt nano EGCG thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano epigallocatechin-3-galat (EGCG) theo giải pháp hữu ích được thực hiện như sau:

(i) Bước thứ nhất: chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho EGCG hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ khối lượng EGCG: dung môi etanol là 8:10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt và giữ nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 8 giờ.

Việc gia nhiệt tạo điều kiện để pha phân tán có thể kết hợp với chất mang polyetylen glycol (PEG) tốt hơn. Việc sử dụng khuấy và gia nhiệt để tạo EGCG phân tán tốt hơn, khi tác giả thử nghiệm với nhiều điều kiện khuấy và nhiệt độ khác nhau, cho thấy với tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C thì pha phân tán EGCG là tốt hơn và kết hợp với chất mang PEG tốt hơn.

(ii) Bước thứ hai: chuẩn bị chất mang bằng cách gia nhiệt polyetylen glycol (PEG) dạng lỏng, trong đó PEG chiếm từ 40 đến 60% khối lượng hỗn hợp PEG và nước, đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy đều.

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các quá trình vận chuyển thuốc có thể được nâng cao hiệu quả nhờ những hệ dẫn thuốc có nguồn gốc từ các loại polyme, quy trình sử dụng chất mang polyetylen glycol (PEG) là polyme mạch dài có công thức chung là $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n\text{H}$. Các chất mang polyme với hàm lượng tải dược chất khá cao có thể đem tới nhiều thuận lợi về mặt dược

động học như dược chất được giữ ổn định, có thể sử dụng để điều trị trong thời gian dài bằng quá trình nhả chậm thuốc theo sự phân hủy polyme, sự phân bố sinh học của dược chất, tính hướng đích, tính thấm qua màng tế bào,... có thể được điều khiển bằng các tính chất hóa lý của polyme.

(iii) Bước thứ ba: bổ sung chất mang vào pha phân tán (theo tỷ lệ 3:1) theo khối lượng, tiếp tục giữ nhiệt độ hỗn hợp chất mang và pha phân tán nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút trong môi trường hút chân không.

(iv) Bước thứ tư: nhũ hóa bằng cách: gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu được ở bước thứ ba cho đến khi nhiệt độ đạt 60°C, bổ sung hỗn hợp dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 (PEG-40 Hydrogenated Castor Oil) và Polysorbate (Tween có công thức hoá học $C_{64}H_{124}O_{26}$) theo tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 3:1,5 đến 4:1 vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán theo tỷ lệ nằm trong khoảng từ 40:61 đến 40:60 theo khối lượng, tiếp tục khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 đến 5 giờ, kiểm soát chất lượng sản phẩm được tạo thành bằng cách cho hòa tan vào nước và đo độ trong, nếu không đạt độ trong suốt thì tiếp tục gia nhiệt và đo độ trong 30 phút một lần cho đến khi kiểm tra thấy trong suốt, dừng phản ứng, hạ nhiệt độ từ từ trong thời gian từ 30 đến 60 phút cho đến khi nhiệt độ còn nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C. Sau đó tiến hành nhũ hóa trong thiết bị tạo nhũ toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút.

Bằng các nghiên cứu lý thuyết và thực nghiệm, các tác giả giải pháp hữu ích nhận thấy rằng để sản xuất nano EGCG tan tốt trong nước, thì hệ vi nhũ tương này ở dạng nhũ tương dầu trong nước. Việc lựa chọn chất nhũ hóa để tăng tính bền của hệ vi nhũ tương dựa vào đặc điểm của hệ vi nhũ tương (dạng hệ vi nhũ tương dầu trong nước, dạng hệ vi nhũ tương nước trong dầu,...). Vì vậy, các tác giả giải pháp hữu ích đã lựa chọn chất nhũ hóa là dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40, bởi vì dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 là chất thân nước, không có độc tính và có độ an toàn cao. Các tác giả giải pháp hữu ích đã tiến hành rất nhiều thử nghiệm để xác định được với tỷ lệ hỗn hợp chất mang PEG và pha phân tán là 4:6 để hình thành các mạch polyme bền vững.

Do chất nhũ hóa dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 và Polysorbate (Tween) đều là phân tử có 2 phần riêng biệt, phần thân dầu và phần thân nước, nên có khả năng tạo liên kết với EGCG và hỗn hợp chất mang. Phần thân dầu tạo liên kết với EGCG và phần thân nước tạo liên kết với phần thân nước của hỗn hợp chất mang PEG, nên đã tạo ra các hạt tiểu phân nano EGCG và với cấu trúc này bảo vệ tốt hoạt tính EGCG.

Như vậy, việc tạo hệ vi nhũ tương nano EGCG bằng cách thực hiện kết hợp khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 đến 5 giờ, sau đó tiến hành nhũ hóa trong thiết bị nhũ nhũ hóa toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, với tốc độ khuấy nằm trong khoảng 400 đến 800 vòng/phút.

Hệ vi nhũ tương thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích có độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 7,4. Với giá trị độ pH này, các hạt tiểu phân tồn tại ổn định do trong môi trường trung tính này liên kết giữa EGCG và vật liệu mang được giữ trong quá trình phân tán, trong khi hệ vi nhũ tương có độ pH <7 thì liên kết này suy yếu dẫn đến hạt nano EGCG sẽ bị phá hủy trong đường tiêu hóa.

Hệ vi nhũ tương nano EGCG thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích có chỉ số cân bằng ưa nước – ưa dầu viết tắt là HLB, nằm trong khoảng từ 13 đến 18 là hệ vi nhũ tương thân nước. Hệ vi nhũ tương này có các hạt tiểu phân chứa EGCG thân nước, không kết dính, kích thước của các hạt ổn định nằm trong khoảng từ 30 đến 80 nm, nên có thể thâm nhập dễ dàng qua màng tế bào để phát huy hiệu quả và tăng độ hòa tan của EGCG trong nước, từ đó làm tăng tính sinh khả dụng của chất.

(v) Bước thứ năm: Hỗn hợp thu được được làm lạnh đến 25°C và được bơm bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm (Ultrasonic Atomizer Nozzle) ở tần số 60 Hz, sau đó lọc sản phẩm bằng cách bơm qua hệ thống lọc nano trước khi chiết rót đóng gói để loại bỏ các lượng dư các chất và đảm bảo độ đồng đều, ổn định của dung dịch.

Hạt nano có xu hướng kết tụ, để phân tán hạt nano cần phải cung cấp đủ năng lượng để tách các lực liên kết. Sử dụng vòi phun siêu âm là một phương tiện hiệu quả trong việc phân tán hạt nano và giảm kích thước hạt nano, tạo ra các hạt có kích thước nhỏ hơn và kích thước đồng đều hơn. Sự phân tán và phá vỡ sự kết tụ của hạt nano là kết quả của hiện tượng xâm khí thực do

sóng siêu âm. Khi siêu âm lan truyền vào trong dung môi, sẽ liên tục tạo ra các chu kỳ xen kẽ giữa áp suất cao và áp suất thấp, điều này tác động lên lực liên kết của hạt nano.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ: Sản xuất 100g hệ vi nhũ tương nano EGCG

Chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho 8g EGCG hòa tan trong 10g dung môi etanol 96° bằng máy khuấy có tốc độ 400 vòng/phút, kết hợp gia nhiệt và giữ nhiệt ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 6 giờ để tạo thành dung dịch đồng nhất bằng máy khuấy từ gia nhiệt IKA C-MAG HS 7 công suất 1000 W. Thu được 15g pha phân tán (dung môi etanol 96° bay hơi một phần trong quá trình khuấy gia nhiệt).

Chuẩn bị chất mang: 45g PEG dạng lỏng được gia nhiệt đến 60°C, khuấy đều bằng máy khuấy từ gia nhiệt IKA C-MAG HS 7 công suất 1000 W.

Bổ sung 45g chất mang vào 15g pha phân tán đã chuẩn bị ở trên (tỷ lệ chất mang: pha phân tán là 3:1 theo khối lượng), tiếp tục gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đến 60°C, khuấy với tốc độ 600 vòng/phút trong môi trường hút chân không bằng máy khuấy từ gia nhiệt IKA C-MAG HS 7 công suất 1000 W. Thu được 60g hỗn hợp chất mang và pha phân tán.

Sau đó, gia nhiệt 60g hỗn hợp chất mang và pha phân tán thu được cho đến khi nhiệt độ đạt 60°C, bổ sung 40g ACRY SOL K-140 và Tween (trong đó gồm 32g ACRY SOL K-140 và 8g Tween) vào 60g hỗn hợp chất mang và pha phân tán thu được, tiếp tục khuấy ở tốc độ 700 vòng/phút, trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở 60°C trong thời gian trong 5 giờ, kiểm soát chất lượng sản phẩm tạo thành bằng cách cho hòa tan vào nước và đo độ trong suốt, nếu không đạt thì tiếp tục gia nhiệt và đo độ trong 30 phút một lần cho đến khi kiểm tra thấy trong suốt, dừng phản ứng, hạ nhiệt độ từ từ trong thời gian nằm trong khoảng từ 30 phút đến 60 phút cho đến khi nhiệt độ còn 50°C; tiến hành nhũ hóa toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ 800 vòng/phút bằng máy nhũ IKA T25 DIGITAL ULTRA- TURRAX công suất 800W.

Hỗn hợp thu được được làm lạnh đến 25°C và được bơm bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm (Ultrasonic Atomizer Nozzle) ở tần số 60 Hz. Trước khi chiết rót, sản phẩm được bơm qua hệ thống lọc nano (gồm màng lọc đường kính lỗ 1µm, kết hợp bơm áp suất cao *Leybold*,

250-600bar (25-60MPa), lưu lượng bơm nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10ml/phút) nhằm mục đích loại bỏ lượng EGCG dư không tạo thành hạt tiểu phân, thu được hệ vi nhũ tương nano EGCG phân tán tốt trong nước.

Bằng phương pháp đo phổ bằng UV-vis các tác giả giải pháp hữu ích đã nhận thấy là vị trí các pick của EGCG nguyên liệu và hệ vi nhũ tương nano EGCG hoàn toàn trùng khớp. Điều này cho thấy hệ vi nhũ tương thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính EGCG trong quá trình nano hóa. Sử dụng phương pháp đo phổ bằng UV-Vis để định lượng hàm lượng EGCG trong hệ vi nhũ. Kết quả cho thấy nồng độ EGCG trong hệ vi nhũ tương nano EGCG nằm trong khoảng từ 8% đến 10%.

Tiến hành đo kích thước hạt nano EGCG bằng kính hiển vi điện tử quét TEM (**Kính hiển vi điện tử truyền qua** - *transmission electron microscopy*, viết tắt: TEM) được thể hiện theo Hình 2 cho thấy kích thước hạt dao động từ nằm trong khoảng từ 10nm đến 50nm chiếm tỉ lệ gần như tối đa 100% trong dung dịch.

Kích thước hạt được đo bằng DLS: Các hạt lơ lửng trong một chất lỏng liên tục trải qua chuyển động ngẫu nhiên, và kích thước của các hạt trực tiếp ảnh hưởng đến tốc độ của chúng. Hạt nhỏ di chuyển nhanh hơn so với những hạt lớn hơn. Hạt nano EGCG được xác định điện tích bề mặt và đo độ phân bố hạt sử dụng máy Dynamic Light Scattering system (DLS, Zetasizer Ver. 6.20, Malvern Instruments, Hoa Kỳ).

Trong DLS, ánh sáng đi qua mẫu, và ánh sáng tán xạ được phát hiện và ghi nhận ở một góc độ nhất định. Kết quả đo trên máy DLS cho thấy hạt nano EGCG thu được có kích thước chủ yếu đạt 10-50 nm.

Như vậy, các kết quả kích thước hạt nano EGCG sử dụng DLS là phù hợp với kết quả TEM.

Thế zeta hay điện thế động: Độ tích điện bề mặt của hạt nano ảnh hưởng đến độ bền của hạt trong dung dịch cũng như sự tương tác của hạt với tế bào. Về mặt lý thuyết, thế zeta được sử dụng như một tiêu chí để đánh giá độ bền. Thế zeta là điện thế giữa pha phân tán và môi trường phân tán. Hạt nano EGCG được xác định điện tích bề mặt và đo độ phân bố hạt sử dụng máy DLS. Theo lý thuyết, các hạt có thế zeta > -40 mV được xem là bền (Qiu và cộng sự, 2016).

Trong quy trình này, thế zeta của nano EGCG đạt ≥ -40 mV, cho thấy hạt nano EGCG thu được có độ bền tốt.

Kích thước (nm, theo TEM)	Kích thước (nm, theo DLS)	Thế zeta (mV)	Độ ổn định (tháng)	Tính tan trong nước
10-50	10-50	-40	> 12	tan tốt trong nước, sau khi hoà tan trong nước hệ ổn định > 7 ngày

Từ kết quả trên thấy rằng, với việc sử dụng chất mang polyetylen glycol (PEG) với đầu thau dầu hydro hóa PEG-40, thu được hệ vi nhũ tương có các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ (từ 10 nm đến 50 nm), có độ ổn định cao (>12 tháng), tan tốt trong nước và sau khi hoà tan trong nước hệ ổn định > 7 ngày.

Theo Hình 1, là ảnh so sánh khả năng phân tán trong nước giữa EGCG đã biết và nano EGCG thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó bình A thể hiện nano EGCG phân tán trong nước thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích, bình B thể hiện EGCG đã biết phân tán trong nước. Nano EGCG thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích phân tán hoàn toàn trong nước tạo dung dịch màu vàng trong suốt, đồng nhất.

Theo Hình 2, là kết quả ảnh phổ đo TEM kích thước hạt nano EGCG thu được bằng quy trình giải pháp hữu ích, ta thấy kích thước hạt trung bình là 12,27nm, với mật độ 100%, với đỉnh phổ 1 có đường kính hạt 12,69nm, chiều rộng 2,874nm. Các hạt có sự đồng đều về kích thước, dao động trong khoảng 10-50nm (Hình 2), không xuất hiện các đỉnh phổ khác.

Bảng dưới đây thể hiện các số liệu đo:

		Đường kính (nm)	Mật độ %	Chiều rộng (nm)

Kích thước hạt trung bình (d.nm): 12,27	Đỉnh phổ 1	12,69	100	2,874
Pdl: 0,077	Đỉnh phổ 2	0,00	0,00	0,00
Khả năng chận: 0,939	Đỉnh phổ 3	0,00	0,00	0,00
Kết quả đánh giá: tốt				

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano EGCG theo giải pháp hữu ích đã thành công trong việc sản xuất hệ vi nhũ tương có các hạt tiểu phân nano EGCG có kích thước nhỏ, từ 10 đến 50nm, đồng đều và khả năng hòa tan tốt trong nước mà vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính EGCG trong quá trình nano hóa.

Các chất được sử dụng trong quy trình sản xuất nano EGCG phân tán tốt trong nước có độ an toàn cao, không độc hại và ít tác dụng phụ, nên hệ vi nhũ tương nano EGCG thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích có độ an toàn cao khi sử dụng.

Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản, dễ thực hiện và phù hợp với các điều kiện thực tế hiện nay của nước ta.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano epigallocatechin-3-galat bao gồm các bước:

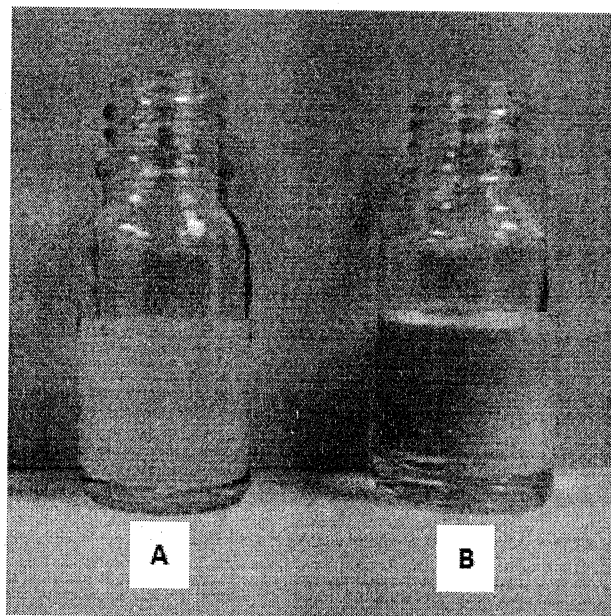
(i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho epigallocatechin-3-galat hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ khối lượng epigallocatechin-3-galat: dung môi etanol là 8:10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt và giữ nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 8 giờ;

(ii) chuẩn bị chất mang bằng cách gia nhiệt polyetylen glycol (PEG) dạng lỏng đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy đều;

(iii) bổ sung chất mang vào pha phân tán theo tỷ lệ 3:1 theo khối lượng, tiếp tục giữ nhiệt độ hỗn hợp chất mang và pha phân tán nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút trong môi trường hút chân không;

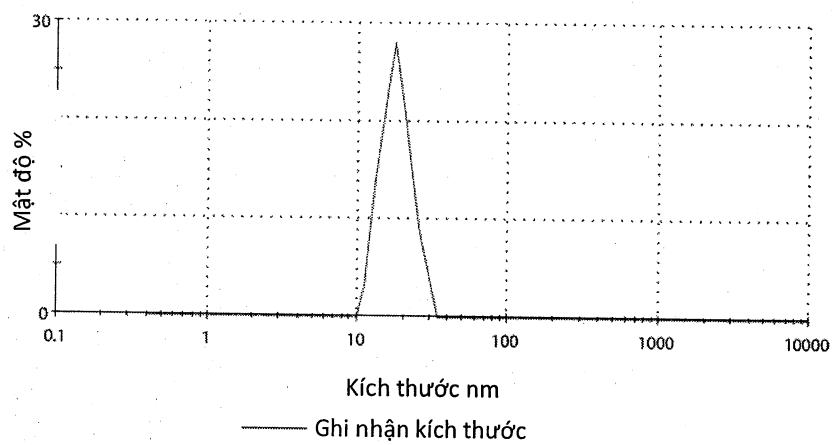
(iv) nhũ hóa bằng cách: gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu ở bước (iii) cho đến khi nhiệt độ đạt 60°C, bổ sung dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 (PEG-40 Hydrogenated Castor Oil) và Polysorbate (Tween) theo tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 3:1,5 đến 4:1 vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán theo tỷ lệ nằm trong khoảng từ 40:61 đến 40:60 theo khối lượng, tiếp tục khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C, trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 đến 5 giờ, kiểm soát chất lượng sản phẩm tạo thành bằng cách cho hòa tan vào nước và đo độ trong, nếu không đạt độ trong suốt thì tiếp tục gia nhiệt và đo độ trong 30 phút một lần cho đến khi kiểm tra thấy trong suốt, dừng phản ứng, hạ nhiệt độ trong thời gian từ 30 đến 60 phút cho đến khi nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C; tiến hành nhũ hóa trong thiết bị tạo nhũ toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút;

(v) hỗn hợp thu được được làm lạnh đến 25°C và được bơm bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm ở tần số 60 Hz, sau đó lọc sản phẩm bằng cách bơm qua hệ thống lọc nano trước khi chiết rót đóng gói.



Hình 1

Phổ phân bố kích thước theo mật độ



Hình 2