



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

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

(11)



2-0002898

(51) **A61K 31/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00025

(22) 29/05/2019

(67) 1-2019-02809

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/12/2020 393

(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); Đồng Huy Giới (VN); Bùi Thị Thu Hương (VN).

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

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano isoflavon, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị pha phân tán; 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 isoflavon 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 isoflavon.

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 isoflavon.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Isoflavon là hợp chất polyphenol được tìm thấy chủ yếu trong cây họ đậu như đậu nành. Các isoflavon chính có trong đậu nành là daidzein, geistein, glyxitein, formononetin và biochanin. Tác dụng có lợi cho sức khỏe của isoflavon đã được biết đến từ lâu qua các nghiên cứu của các nhà khoa học Nhật Bản. Các nghiên cứu khảo sát đánh giá dựa trên thói quen sử dụng chế độ ăn giàu isoflavon. Các kết quả cho thấy với liều lượng isoflavon là 80 mg/ngày đã giúp cải thiện các triệu chứng rối loạn nội tiết ở phụ nữ thời kỳ mãn kinh. Isoflavon có cấu trúc tương tự 17 β -estradiol do vậy có thể gắn kết với các thụ thể estrogen đặc hiệu và thực hiện nhiều chức năng của estrogen. Tuy nhiên không giống như estrogen sản xuất trong cơ thể hoặc dạng tổng hợp (như trong liệu pháp thay thế hormone-HRT), isoflavon tự nhiên là các hợp chất điều biến thụ thể estrogen có chọn lọc có tác động khác nhau ở các thụ thể estrogen. Isoflavon có tác dụng giúp cân bằng lượng estrogen cho cơ thể và bảo vệ lớp collagen của da.

Evellyne và các cộng sự đã tổng hợp các nghiên cứu *in-vitro* và *in-vivo* về tác động của isoflavon đến sức khỏe. Tác giả đã nhận định trên bài “Isoflavones are safe compounds for therapeutical applications – Evaluation of in vitro data” (2008): isoflavon là hợp chất an toàn có thể được dùng như thực phẩm hàng ngày hoặc dưới dạng thực phẩm chức năng. Trong đó, tác giả đã nêu ra các nghiên cứu lâm sàng đánh giá mối tương quan giữa lượng isoflavon sử dụng với bệnh ung thư vú và bệnh tim mạch. Các nghiên cứu đã cho thấy tỷ lệ mắc ung thư vú thấp và bệnh tim mạch được cải thiện khi sử dụng thường xuyên isoflavon. Trong quá trình trao đổi chất, isoflavon được chuyển hóa thành hợp chất làm thúc đẩy quá trình tự chết ở tế bào ung thư (apoptotic). Các thí nghiệm *in-vitro* cho thấy isoflavon còn có tác dụng ức chế sự hình thành mạch máu đến

các tế bào ung thư giúp định dạng khối u. Bên cạnh những lợi ích nêu trên, isoflavon còn có tác dụng chống loãng xương và kích hoạt các tác nhân tái tạo hình thành xương tại các vùng bị tổn thương. Dang Z và các cộng sự đã thực hiện các thí nghiệm khác nhau với các hợp chất isoflavon là genistein, daidzein. Kết quả trên bài “The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis” (2004) đã chứng minh các isoflavon có tác dụng ức chế sự phụ thuộc PTH của quá trình tạo xương, tăng OPG và giảm RANKL hoặc cải thiện tỷ lệ OPG:RANKL đối với sự hình thành xương, giảm lượng interleukin-6. Kết quả cũng cho thấy các isoflavon làm tăng các hợp chất canxi, photpho trong các mô xương.

Từ tài liệu tổng hợp được cho thấy isoflavon là hợp chất thiên nhiên có nhiều hoạt tính sinh học đáng quý đã được nghiên cứu nhiều trên thế giới và đã được ứng dụng nhiều trong các sản phẩm thực phẩm và mỹ phẩm với tác dụng chống lão hóa, cân bằng nội tiết, ngăn ngừa các bệnh tim mạch và loãng xương. Các sản phẩm chủ yếu được dùng dưới dạng uống, nhưng isoflavon là một chất ít tan trong nước nên khả năng chuyển hóa của nó thấp. Hơn nữa, các nghiên cứu công bố hoạt tính của isoflavon thấp hơn 100 lần so với estrogen sinh lý. Do đó, cần cải thiện khả năng hòa tan của isoflavon trong các chế phẩm để tăng tính sinh khả dụng của hợp chất này. Một trong những giải pháp làm tăng tính sinh khả dụng của isoflavon mà các nhà dược học đã thực hiện đó là thay thế vị trí 17a-H bằng nhóm axetylenic để tạo thành etinylestradiol (là thành phần estrogen trong nhiều thuốc tránh thai). Ưu điểm của phương pháp này là tạo được dạng hợp chất mới có tính sinh khả dụng cao hơn. Nhưng nhược điểm là làm mất đi một số tính chất tự nhiên của isoflavon như ngăn ngừa ung thư, các bệnh tim mạch và loãng xương. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu khác đã tạo các chế phẩm isoflavon dạng nano.

Nirav V. Patel và cộng sự đã nghiên cứu chế tạo chế phẩm isoflavon ứng dụng trong điều trị ung thư. Để tăng tính sinh khả dụng của isoflavon, tác giả đã sử dụng chitosan làm chất mang và phương pháp tạo giọt vi nhũ tương. Chế phẩm tạo thành được sấy đông khô sử dụng 5% sucrose. Kết quả trên bài “Formulation and Evaluation of Genistein- a Novel Isoflavon loaded chitosan and Eudragit® nanoparticles for cancer

therapy” (2015) cho thấy chế phẩm tạo thành có kích thước khoảng 80 nm. Phương pháp này có ưu điểm tạo được chế phẩm có hàm lượng isoflavon cao (66%) nhưng kích thước hạt nano còn lớn.

Yiran Ma và các cộng sự đã dùng phương pháp bao gói isoflavon trong các hạt nano polyme PLGA. Kết quả nghiên cứu trên bài “The comparison of different daidzein-PLGA nanoparticles in increasing its oral bioavailability” (2012) công bố chế tạo thành công chế phẩm isoflavon dưới dạng bao gói trong nano polyme PLGA có kích thước từ 309 -323 nm, hàm lượng isoflavon đạt 88%, khả năng hấp thụ tăng từ 5-8 lần. So với các phương pháp khác, phương pháp này có ưu điểm tạo được chế phẩm có hàm lượng isoflavon cao (88%), bảo vệ isoflavon khỏi các tác nhân oxy hóa nhưng kích thước hạt nano còn khá to và thời gian chuyển hóa isoflavon sẽ chậm hơn so với các dạng nano khác.

Từ tài liệu tổng hợp được có thể thấy có rất nhiều phương pháp chuyển hóa isoflavon 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 isoflavon 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 isoflavon trong quá trình nano hóa.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là làm tăng tính sinh khả dụng của hoạt chất isoflavon. Để đạt được mục đích này, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano isoflavon. Quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho isoflavon hòa tan trong dung môi etanol theo tỷ lệ là 3:5 (g/mL) bằng 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 phòng 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 isoflavon, polyetylen glycol/tween 80 và lexitin trong hỗn hợp đồng nhất có tỷ lệ isoflavon:polyetylen glycol:lexitin là 1:5:5 (g/g/mL) vào thiết bị tạo nhũ trong thời gian 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 isoflavon 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 isoflavon.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Ảnh TEM của hệ vi nhũ tương nano isoflavon.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

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

a) Chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho isoflavon hòa tan trong dung môi etanol theo tỷ lệ là 3:5 (g/mL) bằng 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.

Mục đích ban đầu là tạo ra các hạt isoflavon với kích thước nano và ổn định trọng hệ, các tác giả đã sử dụng dung môi là etanol để hòa tan isoflavon làm pha phân tán. Các nghiên cứu trước đây cũng thường dùng dung môi etanol để tạo điều kiện cho pha phân

tán có thể phân tán tốt hơn trong hỗn hợp polyetylen glycol/tween 80. Bằng nhiều thí nghiệm thì các tác giả đã xác định được tỉ lệ hòa tan của isoflavon và etanol là 3:5 (g/mL) là tỉ lệ hòa tan thích hợp.

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 phòng với tốc độ khuấy 300 vòng/phút.

Vì 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 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 như polyme thiên nhiên ưa nước như protein (gelatin, albumin), polysaccharit (alginat, dextran, chitosan), polyme tổng hợp kỵ nước như polyester (poly (ϵ -caprolacton), poly axit lactic, poly axit lactic-co-glycolic. Các chất mang polyme với hàm lượng tải được 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, v.v., có thể được điều khiển bằng các tính chất hóa lý của polyme.

Tuy polyetylen glycol (PEG) là các chất mang polyme đã được sử dụng trong các 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, thêm vào đó việc sử dụng phối hợp PEG với tween 80 theo các nghiên cứu hiện nay là khá thông dụng để cân bằng chỉ số HLB và giảm độ sa lắng của các hạt tiểu phân nano. Bằng nhiều thực nghiệm, các tác giả đã tìm ra tỉ lệ PEG/tween 80 là 2:1 (g/ml) là tỉ lệ tối ưu của chất mang giúp cho hệ được ổn định nhất.

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 isoflavon, PEG/tween 80 và lexitin

trong hỗn hợp đồng nhất có tỷ lệ isoflavon: PEG: lexitin là 1:5:5 (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.

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 isoflavon 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 isoflavon.

Hỗn hợp thu được ở bước c có thể vẫn còn lẫn một lượng isoflavon dư nhất định do bám trên thành thiết bị hoặc cánh khuấy mà không được hòa tan trong dung môi, lượng isoflavon 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 isoflavon

Chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho 6g bột isoflavon hòa tan trong 10ml dung môi etanol. Phân tán đều hỗn hợp bằng máy khuấy có gia nhiệt trong khoảng 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.

Trộn 30g PEG 400 và 15 ml tween 80 và phân tán đều trên máy khuấy trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ phòng với tốc độ khuấy 300 vòng/ phút.

Trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang PEG/tween 80 và 30 ml chất nhũ hóa trong thiết bị tạo nhũ trong thời gian 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.

Để hỗn hợp thu được qua đêm 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 isoflavon.

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 phương pháp phân tích hiện đại. Kết quả phân tích như sau:

- Kết quả phân tích hàm lượng

Hàm lượng của isoflavon trong mẫu được đo bằng HPLC. Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng isoflavon trong mẫu phân tích đạt 3,02 %.

- Kết quả đo HR-TEM

Dung dịch isoflavon phân tán tốt trong nước, có chứa các hạt nano isoflavon hình cầu có đường kính khoảng 10-20 nm.

- Kết quả phân tích chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật

Mẫu nano isoflavon sau khi chế tạo được đi kiểm nghiệm các tiêu chuẩn về vi sinh vật và hóa lý. Kết quả kiểm nghiệm được thể hiện trong bảng dưới đây:

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
10.1	Tổng vi sinh vật hiếu khí	CFU/mL	ISO 4833-1:2013	KPH (LOD:1 CFU/mL)
10.2	<i>Cl. Perfringens</i>	CFU/mL	TCVN 4991:2005	KPH (LOD:1 CFU/mL)
10.3	Coliforms	CFU/mL	TCVN 6848:2007	KPH (LOD:1 CFU/mL)
10.4	<i>E. coli</i>	CFU/mL	TCVN 7924 -2:2008	KPH (LOD:1CFU/mL)

10.5	Tổng số bào tử nấm men-mốc		TCVN 8275-1:2010	KPH (LOD:1 CFU/mL)
10.6	Hàm lượng Cadmi	mg/kg	H.HD.QT.429(ICP-MS)	KPH (LOD:0,004 mg/kg)
10.7	Hàm lượng Chì	mg/kg	H.HD.QT.429(ICP-MS)	0.081

Kết quả cho thấy, mẫu isoflavon chế tạo được 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 isoflavon đã thành công trong việc điều chế hệ vi nhũ tương có chứa các tiểu phân nano isoflavon có kích thước 10-20 nm, 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 isoflavon phân tán tốt trong nước có độ an toàn cao, không độc hại và ít tác dụng phụ, nên hệ vi nhũ tương nano isoflavon 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

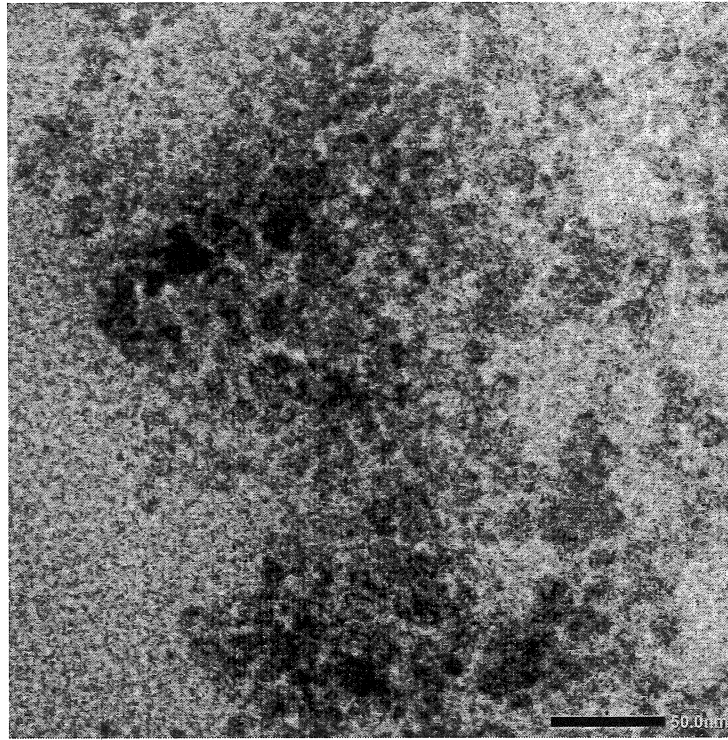
1. Quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano isoflavon, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho isoflavon hòa tan trong dung môi etanol theo tỷ lệ là 3:5 (g/mL) bằng 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 phòng 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 isoflavon, polyetylen glycol/tween 80 và lexitin trong hỗn hợp đồng nhất có tỷ lệ isoflavon: polyetylen glycol: lexitin là 1:5:5 (g/g/mL) vào thiết bị tạo nhũ trong thời gian 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 isoflavon 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 isoflavon.



Hình 1