



(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)



1-0033759

(51)^{2020.01} A61K 33/38; A61K 31/722

(13) B

(21) 1-2021-01223

(22) 09/03/2021

(45) 25/10/2022 415

(43) 25/05/2021 398

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

Nhà A2, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) HÀ PHƯƠNG THƯ (VN); LÊ THỊ THU HƯƠNG (VN); PHAN KẾ SƠN (VN);
TRẦN THỊ LAN ANH (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ HỆ NANO KHÁNG SINH TỔ HỢP DÙNG CHO GIA
CẦM VÀ HỆ NANO KHÁNG SINH TỔ HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag và hệ nano kháng sinh tổ hợp này. Phương pháp bào chế bao gồm 7 bước, trong đó nano Ag được hình thành bằng phản ứng của ion Ag^+ với dung dịch chitosan. Phản ứng này đồng thời giúp tăng độ tan của chitosan trong môi trường trung tính. Dung dịch này sau đó được phun sương vào dung dịch alginat có chứa doxycyclin. Florphenicol được hòa tan trong etanol trước khi thêm vào dung dịch kể trên. Sau cùng, dung môi được khuấy cho bay hơi trong 24 h và li tâm loại bỏ tạp chất. Hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag có dạng dung dịch màu vàng nâu trong suốt, kích thước hạt từ 50 đến 100 nm, thế Zeta có giá trị tuyệt đối trên 30 mV, hàm lượng mỗi kháng sinh trong hệ nano tổ hợp đạt từ 10-30%, nồng độ nano Ag từ 100-300 ppm. Hệ nano theo sáng chế có khả năng tiêu diệt vi khuẩn có hại trong chăn nuôi gia cầm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ nano và ứng dụng công nghệ nano trong thú y (phòng trị bệnh cho gia cầm). Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag chứa 2 kháng sinh phối hợp là Doxycyclin và Florphenicol, tổ hợp cùng thành phần nano bạc, giúp diệt trừ vi khuẩn gây bệnh trong chăn nuôi gia cầm. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycycline-Florphenicol-nano Ag nêu trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hiện nay, thuốc kháng sinh giữ vai trò quan trọng trong dự phòng và điều trị các bệnh truyền nhiễm và nhiễm khuẩn trong chăn nuôi. Tuy nhiên, tình trạng lạm dụng thuốc kháng sinh trong thức ăn làm chất kích thích sinh trưởng cũng như sử dụng quá liều trong phòng trị bệnh gây ra hiện tượng kháng kháng sinh và tồn dư kháng sinh trong thực phẩm. Vì vậy, hướng ứng chương trình toàn cầu trong việc sử dụng kháng sinh có trách nhiệm, giữa năm 2017, Việt Nam cũng đã công bố “Kế hoạch hành động Quốc gia về quản lý sử dụng kháng sinh và phòng chống kháng kháng sinh trong sản xuất chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản giai đoạn 2017-2020”. Theo đó, việc loại bỏ sử dụng kháng sinh vào mục đích kích thích tăng trưởng, hạn chế và tiến tới loại bỏ sử dụng kháng sinh vào mục đích phòng bệnh đã được ghi vào kế hoạch hành động và đã có những thực thi ban đầu. Chẳng hạn, kháng sinh đã bị cấm sử dụng trong thức ăn chăn nuôi (với vai trò chất kích thích sinh trưởng), bị hạn chế sử dụng và hướng đến cấm sử dụng trong điều trị các bệnh trên vật nuôi trong vòng 10 năm tới. Như vậy, để đảm bảo sức khỏe cho vật nuôi, nâng cao năng suất chăn nuôi, đồng thời đáp ứng yêu cầu giảm liều kháng sinh thì việc tạo ra những sản phẩm mới vừa hiệu quả trong phòng trị bệnh, vừa không sử dụng lượng lớn kháng sinh là vấn đề cấp thiết. Tuy nhiên, ở ngay cả

những quốc gia tiên tiến như Mỹ, kháng sinh vẫn là phương pháp cần thiết phải sử dụng để điều trị bệnh nhiễm khuẩn trên vật nuôi. Vì vậy, vấn đề đặt ra là chúng ta phải tìm được giải pháp để giảm lượng kháng sinh sử dụng nhưng vẫn đảm bảo được hiệu quả phòng trị bệnh tương đương hoặc tốt hơn liều đang dùng.

Công nghệ nano đã và đang được ứng dụng trong mọi lĩnh vực của đời sống, đặc biệt là trong nông nghiệp. Nhiều nghiên cứu gần đây đã chỉ ra khả năng ứng dụng của các hệ nano trong nâng cao năng suất, chất lượng cây trồng. Tuy nhiên, ứng dụng của công nghệ nano trong chăn nuôi gia súc, gia cầm vẫn còn rất mới mẻ. Tài liệu “Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery” (*Current medicinal chemistry* 2010) của Zhang và cộng sự bộc lộ hệ dẫn thuốc nano là một phương thức đầy hứa hẹn để vượt qua những thách thức hiện nay liên quan đến liệu pháp kháng sinh do tính chất hóa lý độc đáo của chúng, bao gồm tỷ lệ diện tích bề mặt/khối lượng lớn, kích thước nhỏ và sự tương tác độc đáo với vi sinh vật và tế bào của vật chủ, cũng như khả năng biến đổi cấu trúc và chức năng của chúng. Một số chất kháng sinh là những chất rất ít tan trong nước làm cho khả năng hấp thu kém. Trong khi đó, một số chất kháng sinh tan được trong nước, khả năng hấp thu tốt hơn nhưng lại nhanh chóng bị đào thải khỏi cơ thể, làm cho hiệu quả điều trị không cao. Do đó, mang kháng sinh lên hệ mang nano giúp cải thiện khả năng hấp thu và hiệu quả điều trị của chúng. Thêm vào đó, nhiều nghiên cứu, chẳng hạn như “Synergetic effects of doxycycline-loaded chitosan nanoparticles for improving drug delivery and efficacy” của Cover và cộng sự trên tạp chí *International journal of nanomedicine* 2012, đã chỉ ra hệ dẫn thuốc nano có khả năng vượt qua các cơ chế kháng thuốc đặc hiệu của vi khuẩn. Những lợi thế này góp phần khắc phục tính kháng thuốc do việc lạm dụng kháng sinh. Đồng thời, các kỹ thuật nano tạo điều kiện làm tăng chỉ số điều trị của nhiều thành phần hoạt chất. Sự thay đổi kích thước từ hàng chục micromet đến hàng chục hoặc hàng trăm nanomet đã trở thành một đột phá đáng kể trong công nghệ, y tế và thú y.

Patent US 2011/021814.0 A1 cung cấp thành phần của hạt nano chứa một hoặc một vài polime phân hủy sinh học trong số các polime poly(lactic acid), poly(lactide-co-glycollide), polyanhydride, poly(1,3-bis-(carboxyphenoxypropane)sebacic acid và 1 tác nhân kháng vi sinh vật. Nhóm tác

giả d'Angelo và cộng sự trong bài báo “Overcoming barriers in *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: Engineered nanoparticles for local delivery of a cationic antimicrobial peptide” (*Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2015) đã bào chế hệ dẫn thuốc nano mang colistin trên polyme PLGA bằng phương pháp khuếch tán dung môi/nhũ tương. Hệ nano này được phủ với chitosan và PVA cho phép điều chỉnh các đặc tính bề mặt và cải thiện sự vận chuyển của hệ thống nano thông qua chất nhầy nhân tạo; các hạt nano colistin thể hiện hiệu quả cao trong việc loại bỏ màng sinh học của vi khuẩn so với colistin tự do. Cũng trên nền polyme PLGA, nhóm tác giả Baelo và cộng sự trong nghiên cứu “Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections” (*Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 2015) đã tổng hợp hệ nano polyme Ciprofloxacin được chức năng hóa với DNase I, với hoạt tính kháng khuẩn mạnh trên chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*. Các hạt nano này làm thay đổi mô hình xử lý màng sinh học, vì ngoài việc giải phóng có kiểm soát ciprofloxacin, chúng có thể hướng đích và phá huỷ màng sinh học bằng cách làm suy giảm DNA ngoại bào (yếu tố làm ổn định mạng lưới màng sinh học)

Tác giả Boyer và cộng sự trong nghiên cứu “Co-delivery of nitric oxide and antibiotic using polymeric nanoparticles” (*Chemical science* 2016) đã bào chế hệ nano polyme mang đồng thời Gentamicin và oxit nitric. Hệ này cho thấy hiệu quả làm giảm khả năng sống sót của *P. aeruginosa* tới hơn 90%. Tác giả Natasha F Cover (A Novel Device and Nanoparticle-Based Approach for Improving Diagnosis and Treatment of pelvic Inflammatory Disease) đã bào chế hệ nano Doxycycline được bọc trong các hạt nano làm từ chitosan có thể phân hủy sinh học có thể cải thiện việc cung cấp thuốc từ từ, do đó giảm thiểu tác dụng phụ và cải thiện hiệu quả của thuốc. Hiệu suất mang thuốc đạt 56% và hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* chống lại *Escherichia coli* rất cao, ức chế hơn 90% sự phát triển của vi khuẩn trong 4 giờ.

Chitosan và alginat được một số nghiên cứu sử dụng làm hệ mang một số thuốc như lovastatin (Thai và cộng sự, “Characterization of

chitosan/alginate/lovastatin nanoparticles and investigation of their toxic effects in vitro and in vivo”, *Scientific Reports* 2020) hoặc vitamin B2 (Azevedo và cộng sự, “Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2”, *International Journal of Biological Macromolecules* 2014). Tuy nhiên, các nghiên cứu này đều sử dụng chung phương pháp gel hóa ion, trong đó mỗi dung dịch chitosan và alginat đều đòi hỏi có pH đạt giá trị chính xác, lần lượt ở 4,6 và 4,9. Việc điều chỉnh pH đến pH axit như vậy có thể gây phát sinh thêm thời gian và chi phí sản xuất. Thêm vào đó, môi trường pH axit có thể ảnh hưởng tới chất lượng và hiệu quả sử dụng của các thuốc được mang trên hệ.

Các loại kháng sinh được sử dụng phổ biến nhất để điều trị bệnh trong chăn nuôi gia súc, gia cầm hiện nay là Florphenicol và Doxycyclin. Florphenicol là kháng sinh thuộc nhóm Phenicol, là dẫn xuất của Thiamphenicol. Florphenicol là kháng sinh có phổ kháng khuẩn rộng, có tác dụng trên cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương, một số vi khuẩn nội bào như *Richketsia*, *Chlamydia*, vi khuẩn kỵ khí như *Clostridium spp*, *Bacteroides spp*. Doxycycline là kháng sinh phổ rộng, có tác dụng diệt khuẩn. Thuốc này ức chế vi khuẩn tổng hợp protein do gắn vào tiểu đơn vị 30S và có thể cả với 50S của ribosom trong vi khuẩn nhạy cảm; thuốc cũng có thể gây ra các thay đổi ở màng bào tương. Doxycycline có phạm vi kháng khuẩn rộng với vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí Gram dương và Gram âm, và cả với một số vi sinh vật kháng thuốc như *Rickettsia*, *Coxiella burnetii*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia spp.*, *Legionella spp.*, *Ureaplasma*, một số *Mycobacterium* không điển hình, và *Plasmodium spp*.

Trên thị trường hiện nay đã có sản phẩm phối hợp 2 kháng sinh kể trên dùng cho chăn nuôi. Tuy nhiên việc sử dụng 2 kháng sinh này dưới dạng nano hoặc dưới dạng nano phối hợp với nano bạc còn chưa được thực hiện.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế:

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp bào chế hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag nhằm giải quyết những vấn đề nêu trên. Hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag thu được có dạng dung dịch màu vàng nâu trong suốt, kích thước hạt từ 50 đến 100 nm, thế Zeta có

giá trị tuyệt đối trên 30 mV, hàm lượng mỗi kháng sinh trong hệ nano tổ hợp đạt từ 10-30%, nồng độ nano Ag từ 100-300 ppm. Hệ nano theo sáng chế có khả năng tiêu diệt vi khuẩn có hại trong chăn nuôi gia cầm.

Theo một khía cạnh, phương pháp bào chế hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag theo sáng chế bao gồm các bước:

- (1) Chitosan được hòa tan trong dung dịch axit axetic 0,5%. Nồng độ chitosan được khống chế trong khoảng từ 0,2 đến 5 mg/ml. Hòa tan AgNO_3 trong nước và cho vào dung dịch chitosan, khuấy đều, sao cho nồng độ ion Ag^+ trong dung dịch chitosan đạt từ 200 đến 2000 mg/l;
- (2) đun nóng hỗn hợp tại nhiệt độ từ 40 đến 80°C trong thời gian từ 0,5 đến 5 giờ để thực hiện phản ứng giữa chitosan và ion Ag^+ tạo ra nano Ag phân tán trong mạng lưới của polime này. Đồng thời phân tử chitosan được oxi hóa bởi ion Ag^+ xuất hiện thêm các nhóm chức tan tốt trong nước như COO^- giúp tăng khả năng hòa tan của nó trong môi trường trung tính. Dung dịch này được đưa về nhiệt độ phòng trước khi thực hiện bước tiếp theo (dung dịch 1);
- (3) hòa tan alginat trong nước cất thu được dung dịch alginat nồng độ từ 0,5 đến 5 mg/ml. Doxycycline được hòa tan trong nước cất và chuyển vào dung dịch alginat với tỉ lệ doxycyclin:alginat thay đổi từ 1:5 đến 5:1 (dung dịch 2);
- (4) dung dịch 1 ở bước (2) được đưa vào bình phun sương và phun vào dung dịch 2 ở bước (3) với áp suất hoạt động trong khoảng từ 2,5 đến 4 bar. Trong khi đó dung dịch 1 được khuấy trộn liên tục với tốc độ khuấy tối thiểu từ 250 đến 600 vòng/phút. Tỉ lệ thể tích dung dịch 2:dung dịch 1 thay đổi tại các tỉ lệ 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 và 1:5;
- (5) florphenicol được hòa tan trong etanol với nồng độ từ 1 đến 10 mg/ml (dung dịch 3);
- (6) dung dịch 3 ở bước (5) được nhỏ giọt từ từ vào hỗn hợp phản ứng ở bước (4) với tốc độ nhỏ giọt từ 1 đến 5 giọt trong 2 giây và duy trì khuấy trộn trong quá trình nhỏ giọt;
- (7) làm bay hơi dung môi từ từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ, sau đó dung dịch được ly tâm tốc độ 450 vòng/phút 3 lần rồi lọc và loại bỏ các

phần không tan thu được hệ nano tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ quy trình bào chế hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag

Hình 2 là phổ FTIR của Alginat (1), Chitosan (2), Doxycycline (3), Florphenicol (4), và hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag (5)

Hình 3 là giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD) của hệ nano tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag

Hình 4 là ảnh FESEM (a) và TEM (b) của hệ dẫn thuốc tích hợp Doxycycline-Florphenicol-nano Ag

Hình 5 là phân bố kích thước hạt và thế Zeta của hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag

Hình 6 là phổ UV-Vis và đường chuẩn nồng độ-độ hấp thụ quang của (a) (c) Doxycycline và (b)(d) Florfenicol

Hình 7 là biểu đồ giải phóng thuốc Doxycycline và Florphenicol từ hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag

Hình 8 mô tả hoạt tính kháng khuẩn của hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag (D1) trên vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dựa vào các hình vẽ kèm theo. Sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag và hệ nano kháng sinh tổ hợp này.

Ở khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế hệ nano kháng sinh tổ hợp.

Phương pháp bào chế

Trong sáng chế, chúng tôi sử dụng các nguyên liệu như alginat, chitosan được sản xuất tại Việt Nam, các hóa chất như AgNO₃, Doxycyclin và Florphenicol là sản phẩm thương mại sản xuất tại Trung Quốc.

Như được thể hiện trên hình 1, phương pháp bào chế hệ nano kháng sinh tổ hợp bao gồm 7 bước, trong đó nano Ag được hình thành bằng phản ứng của ion Ag^+ với dung dịch chitosan. Phản ứng này đồng thời giúp tăng độ tan của chitosan trong môi trường trung tính do một số nhóm chức của chitosan bị oxi hóa bởi ion Ag^+ thành nhóm tan trong nước COO^- . Đây chính là một điểm sáng tạo của sáng chế, bởi lẽ các nghiên cứu khác đều đòi hỏi dung dịch chitosan phải đưa vào môi trường axit để duy trì trạng thái hòa tan. Trong sáng chế này, chỉ cần hòa tan chitosan trong môi trường axit ở thời điểm ban đầu, sau quá trình oxi hóa bởi ion Ag^+ , dung dịch này vẫn có thể hòa tan trong môi trường trung tính (nước cất). Trong bước tiếp theo, dung dịch này sau đó được phun sương vào dung dịch alginat có chứa doxycyclin. Đây là điểm sáng tạo tiếp theo của phương pháp bào chế hệ nano kháng sinh tổ hợp đề cập trong sáng chế này. Tác dụng của việc phun sương là giúp các dung dịch được tiếp xúc theo từng lớp và đảm bảo khuấy trộn đồng đều, các tương tác được hình thành một cách bền vững. Florphenicol được hòa tan trong etanol trước khi thêm vào dung dịch kể trên. Sau cùng, dung môi được khuấy cho bay hơi trong 24 h và li tâm loại bỏ tạp chất.

Các bước chi tiết của quy trình bào chế như sau: (i) Chitosan được hòa tan trong dung dịch axit axetic 0,5%. Nồng độ chitosan được khống chế trong khoảng từ 0,2 đến 5 mg/ml. Hòa tan AgNO_3 trong nước và cho vào dung dịch chitosan, khuấy đều, sao cho nồng độ ion Ag^+ trong dung dịch chitosan đạt từ 200 đến 2000 mg/l. (ii) Đun nóng hỗn hợp tại bước (i) đến nhiệt độ từ 40 đến 80°C trong thời gian từ 0,5 đến 5 giờ để thực hiện phản ứng giữa chitosan và ion Ag^+ tạo ra nano Ag phân tán trong mạng lưới của polime này. Đồng thời phân tử chitosan được oxi hóa bởi ion Ag^+ xuất hiện thêm các nhóm chức tan tốt trong nước như COO^- giúp tăng khả năng hòa tan của nó trong môi trường trung tính. Dung dịch này được đưa về nhiệt độ phòng trước khi thực hiện bước tiếp theo (dung dịch 1). (iii) Hòa tan alginat trong nước cất thu được dung dịch alginat nồng độ từ 0,5 đến 5 mg/ml. Doxycycline được hòa tan trong nước cất và chuyển vào dung dịch alginat với tỉ lệ doxycyclin:alginat thay đổi từ 1:5 đến 5:1 (dung dịch 2). (iv) Dung dịch 1 ở bước (ii) được đưa vào bình phun sương và phun vào dung dịch 2 ở bước (3) với áp suất hoạt động trong khoảng từ 2,5 đến 4 bar. Trong khi đó dung dịch 1

được khuấy trộn liên tục với tốc độ khuấy tối thiểu từ 250 đến 600 vòng/phút. Tỷ lệ thể tích dung dịch 2:dung dịch 1 thay đổi tại các tỷ lệ 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 và 1:5. (v) Florphenicol được hòa tan trong etanol với nồng độ từ 1 đến 10 mg/ml (dung dịch 3). (vi) Dung dịch 3 ở bước (v) được nhỏ giọt từ từ vào hỗn hợp phản ứng ở bước (iv) với tốc độ nhỏ giọt từ 1 đến 5 giọt trong 2 giây và duy trì khuấy trộn trong quá trình nhỏ giọt. (vii) Làm bay hơi dung môi từ từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ, sau đó dung dịch được ly tâm tốc độ 450 vòng/phút 3 lần rồi lọc và loại bỏ các phần không tan thu được hệ nano tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag.

Ở khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag. Các tác giả sáng chế đã xác định các đặc trưng về cấu trúc và tính chất của sản phẩm này, cụ thể như sau:

Các đặc điểm cấu trúc của hệ nano kháng sinh tổ hợp:

Cấu trúc của hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag được đánh giá bằng phổ hồng ngoại (Fourier Transformation Infrared Spectroscopy – FTIR) (hình 2). Trong phổ FTIR của hệ nano kháng sinh tổ hợp, tất cả các dao động đặc trưng của các nhóm chức trong Doxycyclin (DOX), Alginat, Chitosan hoặc Florphenicol (FLO) đều xuất hiện tại các vị trí đặc trưng (bảng 1). Đồng thời, sự dịch chuyển vị trí các đỉnh FTIR của các kháng sinh này cho thấy sự tương tác giữa thuốc, nano bạc và các polime.

Bảng 1. Các đỉnh đặc trưng trên phổ hồng ngoại (cm^{-1})

Alginat	Chitosan	DOX	FLO	Hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol- nano Ag
1630 (C=O)	1630 (C=O)	1618 (C=O)	1681 (C=O)	1634 - 1682
1042 (C-O)		1041 (C-O)	1149 (C-O)	1024-1151
3450 (-OH)	3450 (-OH)	3417 (-OH)	3436 (-OH)	3441

			3324	
			(-NH)	

Các đỉnh đặc trưng của FLO ở 1681 cm^{-1} (dao động cộng hóa trị $\text{C}=\text{O}$) và 1149 cm^{-1} (dao động biến dạng $\text{C}-\text{OH}$) cũng xuất hiện trong phổ của hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag. Trong khi đó, các đỉnh đặc trưng của FLO ở số sóng 3324 cm^{-1} (dao động cộng hóa trị của nhóm $\text{N}-\text{H}$) và 3436 cm^{-1} (dao động hoá trị $-\text{OH}$ ancol) được cho là dịch chuyển tới 3441 cm^{-1} , đồng thời dao động này cũng được chỉ định cho sự hiện diện của dao động kéo dài $-\text{OH}$ trong Doxycyclin và alginat. Đỉnh trung bình ở mức 2928 cm^{-1} thuộc về các dao động kéo dài của $\text{CH}(\text{sp}^3)$ của alginate và Doxycycline. Đỉnh hấp thụ trung bình ở $1634\text{--}1682\text{ cm}^{-1}$ thuộc về dao động kéo dài của nhóm $\text{C}=\text{O}$. Trong hình 2, đỉnh đặc trưng của chitosan ở khoảng 1630 cm^{-1} . Đỉnh này cũng tồn tại trong phổ của hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag. Những dao động điển hình này đã xác nhận sự thành công trong việc đóng gói Doxycycline và Florphenicol bởi hệ mang chứa Alginat, Chitosan và nano Ag.

Đặc trưng cấu trúc tinh thể của hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag được thể hiện trên hình 3. Các kết quả cho thấy, các nhiễu xạ đặc trưng của hạt nano bạc tại các góc 2θ là 38° , 44° , 64° , 76° tương ứng với các mặt phẳng tinh thể (111), (200), (220) và (311) (theo ngân hàng phổ JCPDS card No 04-0783). Những kết quả trên khẳng định sự hình thành của các hạt nano bạc trong hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag.

Hình thái học của các hạt nano được đặc trưng bởi phương pháp chụp ảnh hiển vi điện tử quét (FESEM) và hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Kết quả cho thấy các tiểu phân hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag có dạng hình cầu, với kích thước nhỏ trong khoảng từ 50-100 nm (hình 4).

Phương pháp tán xạ laze động (DLS) được sử dụng để xác định kích thước trung bình, phân bố kích thước hạt và giá trị điện thế zeta của hệ phân tán trong môi trường nước (hình 5). Kết quả cho thấy kích thước hạt trung bình của các hạt nano kháng sinh tổ hợp Doxycycline-Florphenicol-nano Ag trong nước là 128 nm. Kích thước trung bình các hạt thu được bằng phương pháp DLS cao hơn kích thước quan sát được trên ảnh hiển vi điện tử (50-100 nm). Điều này được giải

thích là do sự khác nhau về trạng thái tồn tại của hạt nano trong hai phương pháp phân tích kể trên. Đối với phương pháp FESEM, mẫu được chụp ở trạng thái khô, khi đó, các polime (alginat và chitosan) sẽ tồn tại ở trạng thái chặt chẽ hơn. Trong khi đó, đối với phương pháp DLS, các hạt tồn tại trong môi trường nước, các phân tử polime sẽ “ruỗi” tự do hơn làm cho bán kính động học của hạt sẽ tăng lên.

Thế zeta là một đại lượng cho thấy độ bền và sự ổn định của hệ hạt phân tán trong môi trường nước. Giá trị tuyệt đối của thế zeta càng lớn thì độ bền càng cao. Đối với hệ hạt nano kháng sinh tổ hợp Doxycycline-Florphenicol-nano Ag, thế zeta thu được là -33,9 mV. Giá trị này cho thấy, hệ nano thu được bền trong môi trường nước.

Hiệu suất mang thuốc và hàm lượng nano Ag của hệ nano kháng sinh tổ hợp

Nồng độ DOX và FLO trong các dung dịch được xác định dựa trên phương trình thu được từ đường chuẩn của chúng (DOX: $A = 0,02773C + 0,04384$, $R^2 = 0,9999$; và FLO: $A = 16,21262C + 0,10607$, $r^2 = 0,9993$) và độ hấp thụ của thuốc tự do trong mẫu được pha loãng 30 lần (hình 6).

Dựa vào độ hấp thụ của dung dịch trước và sau quá trình tải lên hệ chất mang, hàm lượng của DOX và FLO trong mẫu bào chế được xác định lần lượt là 2,1 và 4,0 mg/mL. Từ đó, các thông số về khả năng mang thuốc và hiệu suất nano hoá được tính toán và trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Khả năng mang thuốc và hiệu suất nano hoá của hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag

Mẫu	Hiệu suất nano hoá thuốc (%)		Khả năng mang thuốc (%)	
	DOX	FLO	DOX	FLO
Hệ nano	87.34 ± 2.05	77.52 ± 1.88	12.81 ± 0.75	23.65 ± 1.03

Hàm lượng bạc trong hệ nano kháng sinh tổ hợp được xác định bằng phổ hấp thụ nguyên tử AAS (Atomic Absorption Spectrophotometric). Kết quả cho thấy hàm lượng bạc trong hệ dẫn thuốc đạt 152,43 mg/l (152,43 ppm).

Trong trường hợp chung, khả năng mang thuốc của hệ nano tổ hợp đạt từ 10-30% đối với mỗi kháng sinh, nồng độ nano Ag đạt từ 100-300 ppm.

Khả năng giải phóng thuốc in vitro

Khả năng giải phóng *in vitro* của DOX và FLO từ hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag được thực hiện ở 37 °C, pH 7,4 và 5,0, nhằm mục đích đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện này đến hành vi của thuốc trong các điều kiện môi trường bên ngoài khác nhau. Đối với cả hai loại thuốc DOX và FLO, việc giải phóng thuốc từ các hạt nano đã cho thấy hồ sơ giải phóng hai pha (hình 7). Sự giải phóng ban đầu liên quan đến việc giải phóng nhanh các phân tử thuốc diễn ra trong 8 giờ đầu tiên. Trong giai đoạn thứ hai, thuốc đã được giải phóng dần dần và đạt được hơn 50% lượng thuốc được giải phóng.

Ở pH 7,4, khoảng 3,2% DOX đã được giải phóng trong vòng 0,5 giờ đầu tiên, và sau đó nhanh chóng tăng lên 58,1% sau 8 giờ. Sau 72 giờ, DOX được giải phóng từ hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag đạt 73,5%. So với DOX, tốc độ phát hành của FLO chậm hơn từ hệ dẫn thuốc nano này. Sau 8 giờ, lượng FLO được giải phóng từ hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag là khoảng 39,2% và đạt giá trị cao nhất là 55,7% sau 72 giờ. Ở pH 5,0, tốc độ giải phóng của cả hai loại thuốc này nhanh hơn ở môi trường trung tính pH 7,4. Sau 72 giờ, lượng DOX và FLO được giải phóng từ hệ thống nano này lần lượt là 85,4% và 68,3%. Điều này một lần nữa khẳng định môi trường trung tính của quá trình bào chế giúp lưu giữ thuốc trong hệ chất mang tốt hơn. Thêm vào đó, pH 5,0 là giá trị pH đặc trưng cho môi trường bệnh lý của dịch tiết viêm, cũng như môi trường nội bào của các đại thực bào bị nhiễm bệnh. Do đó, hệ nano kháng sinh tổ hợp này có khả năng giải phóng các loại thuốc tốt tại vị trí viêm, có khả năng điều trị bệnh lý truyền nhiễm. Ngoài ra, trong cả hai môi trường pH 7,4 và pH 5,0, tốc độ giải phóng của DOX luôn cao hơn FLO, điều này có thể do tính kỵ nước cao của FLO trong môi trường đánh giá.

Hoạt tính kháng khuẩn in vitro của hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag

Hoạt tính kháng khuẩn của hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag (D1) *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (hình 8). Kết quả cho thấy đường kính vòng vô khuẩn của hệ nano kháng sinh tổ hợp đối với *S.aureus* và *E.coli* lần lượt là 36 và 48 mm. Như vậy, hệ nano này nhạy cảm trên cả chủng vi khuẩn Gram dương và Gram âm, trong đó, hoạt tính trên vi khuẩn Gram âm *E.coli* mạnh

hơn trên vi khuẩn Gram dương *S.aureus*. Kết quả này cho thấy hệ nano thu được theo sáng chế này có hạt tính cao hơn hệ nano Doxycycline trong một nghiên cứu khác của R. Ramírez-Agudelo và cộng sự, với giá trị đường kính vòng vô khuẩn trên vi khuẩn *S. aureus* từ 23 – 27 nm [16].

Giá trị nồng độ ức chế 50% IC_{50} và nồng độ ức chế tối thiểu 100% vi khuẩn (MIC) của hệ nano kháng sinh tổ hợp trên một số dòng vi khuẩn được trình bày trong bảng 3, khẳng định hiệu quả diệt vi khuẩn của sản phẩm này cao hơn nhiều so với kháng sinh tự do.

Bảng 3: IC_{50} và MIC của hệ nano kháng sinh tổ hợp so với các kháng sinh tự do

Tên mẫu	Giá trị ($\mu\text{g/ml}$)	Gram (+)			Gram (-)		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Hệ nano kháng sinh tổ hợp	IC_{50}	$0,54 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,005$	$1,56 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,01$	$0,012 \pm 0,001$	$0,78 \pm 0,03$
	MIC	12,5	>50	>50	>50	0,78	12,5
DOX	IC_{50}	>200	200	>200	>200	>200	>200
	MIC	>200	>200	>200	>200	>200	>200
FLO	IC_{50}	$1,05 \pm 0,08$	$2,15 \pm 0,1$	$3,19 \pm 0,2$	$3,26 \pm 0,2$	$0,67 \pm 0,05$	$21,77 \pm 0,6$
	MIC	25	100	>100	>100	1,56	100

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế trở nên sáng tỏ hơn qua những ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, đây không phải là giới hạn thực hiện sáng chế.

Ví dụ thực hiện phương pháp bào chế hệ nano kháng sinh tổ hợp:

- 1) 10 g chitosan được hòa tan trong 10 l dung dịch axit axetic 0,5%. Nồng độ dung dịch chitosan thu được là 1 mg/ml. Hòa tan 3,4 g AgNO_3 vào nước và cho vào dung dịch chitosan, khuấy đều. Nồng độ ion Ag^+ trong dung dịch chitosan đạt giá trị 216 mg/l.
- 2) Đun nóng hỗn hợp tại nhiệt độ từ 40 đến 80°C trong thời gian từ 0,5 đến 5 giờ để thực hiện phản ứng giữa chitosan và ion Ag^+ tạo ra nano Ag phân tán

trong mạng lưới của polime này. Đồng thời phân tử chitosan được oxi hóa bởi ion Ag^+ xuất hiện thêm các nhóm chức tan tốt trong nước như COO^- giúp tăng khả năng hòa tan của nó trong môi trường trung tính. Dung dịch này được đưa về nhiệt độ phòng trước khi thực hiện bước tiếp theo (dung dịch 1).

- 3) Hòa tan 5 g alginat trong 5 l nước cất thu được dung dịch alginat nồng độ 1 mg/ml. 5 g doxycycline được hòa tan trong nước cất và chuyển vào dung dịch alginat (tỉ lệ doxycyclin:alginat = 1:1) (dung dịch 2).
- 4) Dung dịch 1 ở bước (2) được đưa vào bình phun sương và phun vào dung dịch 2 ở bước (3) với áp suất hoạt động là 3 bar. Trong khi đó dung dịch 1 được khuấy trộn liên tục với tốc độ khuấy tối thiểu là 300 vòng/phút. Tỉ lệ thể tích dung dịch 2:dung dịch 1 là 1:2.
- 5) 10 g florphenicol được hòa tan trong 1 l etanol (nồng độ 10 mg/ml) (dung dịch 3).
- 6) Dung dịch 3 ở bước (5) được nhỏ giọt từ từ vào hỗn hợp phản ứng ở bước (4) với tốc độ nhỏ giọt từ 2 giọt/giây và duy trì khuấy trộn trong quá trình nhỏ giọt.
- 7) Làm bay hơi dung môi từ từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ, sau đó dung dịch được ly tâm tốc độ 450 vòng/phút 3 lần rồi lọc và loại bỏ các phần không tan thu được hệ nano tổ hợp [Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag.

Những lợi ích có thể đạt được

Hiệu quả kỹ thuật của sáng chế được thể hiện ở 5 yếu tố chính:

Một là, việc phối hợp các kháng sinh thông dụng với nano bạc nhằm đạt 3 mục đích: mở rộng phổ kháng khuẩn, loại trừ nguy cơ xuất hiện chủng đề kháng, đạt được tác dụng diệt khuẩn nhanh và mạnh nhờ tác dụng hiệp đồng do công nghệ nano đem lại. Cụ thể, hệ nano kháng sinh tích hợp cho phép giảm liều dùng, từ đó hạn chế dư lượng kháng sinh trong vật nuôi, giảm lượng kháng sinh bị đào thải gây biến đổi hệ vi sinh vật trong môi trường. Ngoài ra, với lượng thuốc ít hơn được đưa vào cơ thể vật chủ sẽ ít gây tác hại tới các tế bào lành của vật chủ, do đó giảm thiểu những tác động tới cơ thể vật chủ. Bên cạnh đó, việc giảm thiểu lượng kháng sinh được sử dụng là một giải pháp nhằm hạn chế hiện tượng kháng thuốc

của các loại vi khuẩn. Đây thực sự là điều có ý nghĩa bởi khi hiện tượng kháng thuốc xuất hiện sẽ rất khó khăn trong việc xử lý, chữa trị, nhiều trường hợp còn dẫn tới việc không thể tiêu diệt các loại vi khuẩn kháng thuốc.

Hai là, trên thị trường hiện tại chưa có nhiều sản phẩm kháng sinh nano cho gia cầm. Hệ nano kháng sinh tổ hợp đề xuất trong sáng chế này cho phép phòng và chữa trị bệnh cho vật nuôi được tốt hơn, liều dùng chỉ bằng 5% đến 10% kháng sinh thông thường. Với nhu cầu sử dụng kháng sinh rất lớn trong chăn nuôi tại Việt Nam, khi sản phẩm kháng sinh nano được đưa ra thị trường sẽ giúp giảm thiểu chi phí sử dụng, tăng năng suất, chất lượng và hiệu quả kinh tế cho ngành chăn nuôi; đồng thời đáp ứng được các yêu cầu về phát triển nông nghiệp xanh, sạch.

Ba là, hệ nano kháng sinh tổ hợp đề xuất trong sáng chế này được sản xuất bởi công nghệ trong nước, công nghệ do chính các nhà khoa học Việt Nam nghiên cứu và sở hữu, sử dụng nhiều nguyên liệu sẵn có trong nước như các polime tự nhiên (alginat và chitosan), góp phần gia tăng chuỗi giá trị trong sản xuất.

Bốn là, về mặt xã hội, hệ nano kháng sinh tổ hợp đề xuất trong sáng chế này cho phép làm giảm liều kháng sinh phải sử dụng, do đó giảm thiểu nguy cơ về kháng thuốc kháng sinh cho cộng đồng trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam và góp phần làm giảm thiểu lượng kháng sinh tồn dư trong cơ thể vật nuôi, đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm. Sử dụng kháng sinh nano chính là giải pháp để bảo vệ môi trường, góp phần vào quá trình phát triển kinh tế-xã hội một cách bền vững.

Năm là, sáng chế đề xuất phát triển hệ dẫn thuốc có cấu trúc nano hoàn toàn mới có thể phục vụ trong nông nghiệp công nghệ cao, đặc biệt là trong chăn nuôi gia cầm. Hệ nano kháng sinh tổ hợp này không những làm giảm liều sử dụng thuốc kháng sinh, mà còn giúp làm tăng độ tan với những hoạt chất khó tan hoặc kém tan trong nước, do đó giúp tăng hiệu quả hấp thu thuốc, tăng tác dụng điều trị của thuốc. Các điểm sáng tạo trong phương pháp bào chế hệ nano kháng sinh tổ hợp trình bày trong sáng chế này không chỉ giúp tạo ra được một sản phẩm có chất lượng tốt với giá hợp lý mà còn góp phần phát triển, ứng dụng công nghệ nano và từng bước hiện đại hóa sản xuất thuốc thú y trong nước.

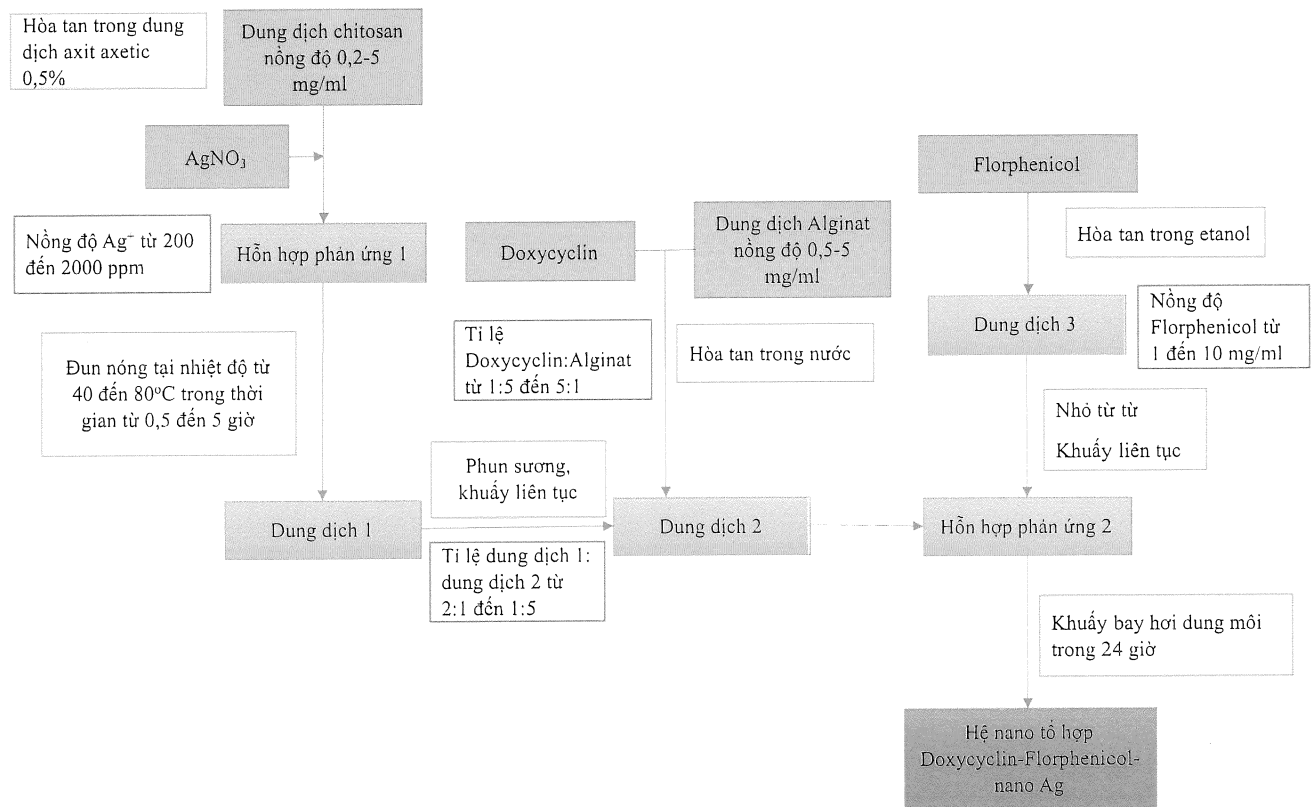
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp bào chế hệ nano kháng sinh tổ hợp dùng cho gia cầm bao gồm các bước:

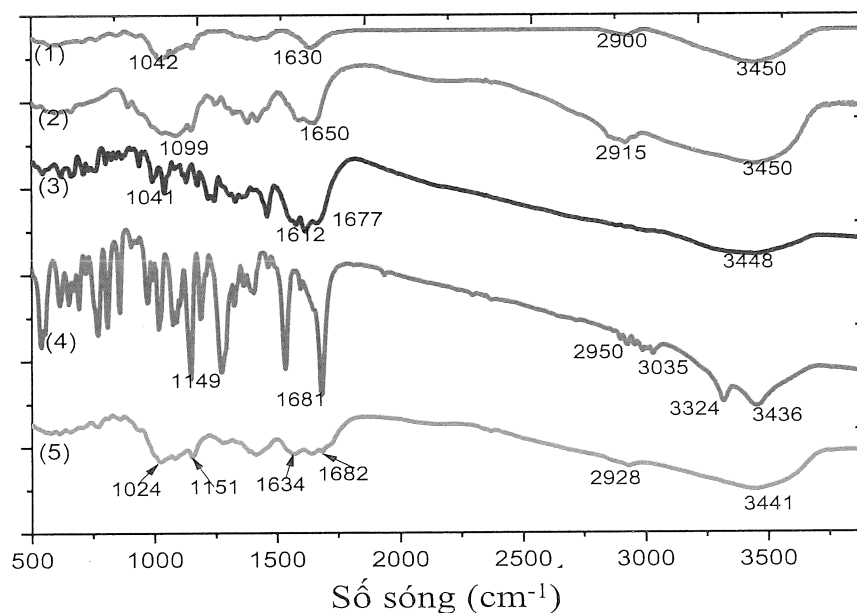
- (i) chitosan được hòa tan trong dung dịch axit axetic 0,5%; nồng độ chitosan được khống chế trong khoảng từ 0,2 đến 5 mg/ml; hòa tan AgNO_3 trong nước và cho vào dung dịch chitosan sao cho nồng độ ion Ag^+ trong dung dịch chitosan đạt từ 200 đến 2000 mg/l;
- (ii) đun nóng hỗn hợp ở bước (i) tại nhiệt độ từ 40 đến 80°C trong thời gian từ 0,5 đến 5 giờ để thực hiện phản ứng giữa chitosan và ion Ag^+ tạo ra nano Ag phân tán trong mạng lưới của polime này; đồng thời phân tử chitosan được oxi hóa bởi ion Ag^+ xuất hiện thêm các nhóm chức tan tốt trong nước như COO^- giúp tăng khả năng hòa tan của nó trong môi trường trung tính; dung dịch này được đưa về nhiệt độ phòng trước khi thực hiện bước tiếp theo (dung dịch 1);
- (iii) hòa tan alginat trong nước cất thu được dung dịch alginat nồng độ từ 0,5 đến 5 mg/ml; doxycyclin được hòa tan trong nước cất và chuyển vào dung dịch alginat với tỉ lệ doxycyclin:alginat thay đổi từ 1:5 đến 5:1 (dung dịch 2);
- (iv) dung dịch 1 ở bước (ii) được đưa vào bình phun sương và phun vào dung dịch 2 ở bước (iii) với áp suất hoạt động trong khoảng từ 2,5 đến 4 bar; trong khi đó dung dịch 1 được khuấy trộn liên tục với tốc độ khuấy tối thiểu từ 250 đến 600 vòng/phút; tỉ lệ thể tích dung dịch 2:dung dịch 1 thay đổi tại các tỉ lệ 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 và 1:5;
- (v) florphenicol được hòa tan trong etanol với nồng độ từ 1 đến 10 mg/ml (dung dịch 3);
- (vi) dung dịch 3 ở bước (v) được nhỏ giọt từ từ vào hỗn hợp phản ứng ở bước (iv) với tốc độ nhỏ giọt từ 1 đến 5 giọt trong 2 giây và duy trì khuấy trộn trong quá trình nhỏ giọt;
- (vii) làm bay hơi dung môi từ từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ, sau đó dung dịch được ly tâm tốc độ 450 vòng/phút 3 lần rồi lọc và loại bỏ các phần không tan thu được hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag.

2. Hệ nano kháng sinh tổ hợp Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag, chứa doxycyclin với lượng 10-30%, florphenicol với lượng 10-30%, nồng độ nano Ag từ 100-300 ppm, kích thước hạt từ 50 đến 100 nm, trong đó hệ nano kháng sinh này có dạng dung dịch màu vàng nâu, trong suốt, thế Zeta có giá trị tuyệt đối trên 30 mV, và có khả năng tiêu diệt vi khuẩn có hại trong chăn nuôi gia cầm.

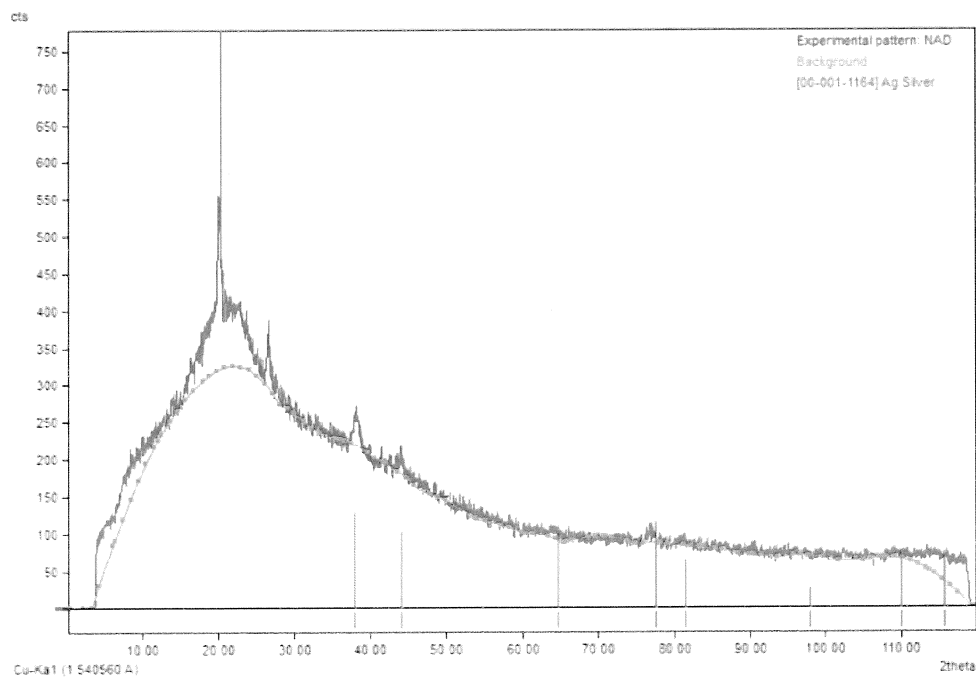
Hình 1. Sơ đồ quy trình chế tạo hệ nano kháng sinh tổ hợp [Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag]



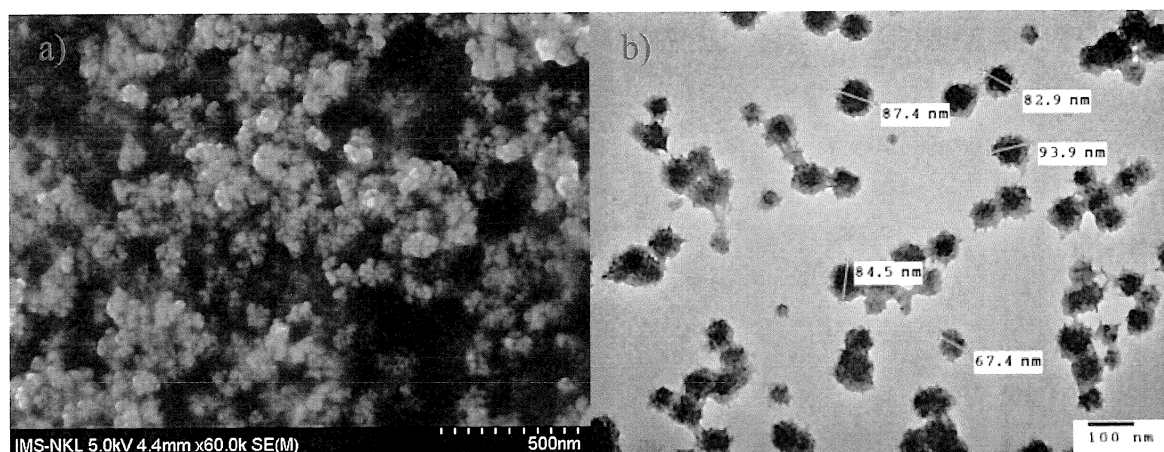
Hình 2. Phổ FTIR của Alginat (1), Chitosan (2), Doxycyclin (3), Florphenicol (4), và hệ nano kháng sinh tổ hợp [Doxycyclin-Florphenicol-nano bạc] (5)



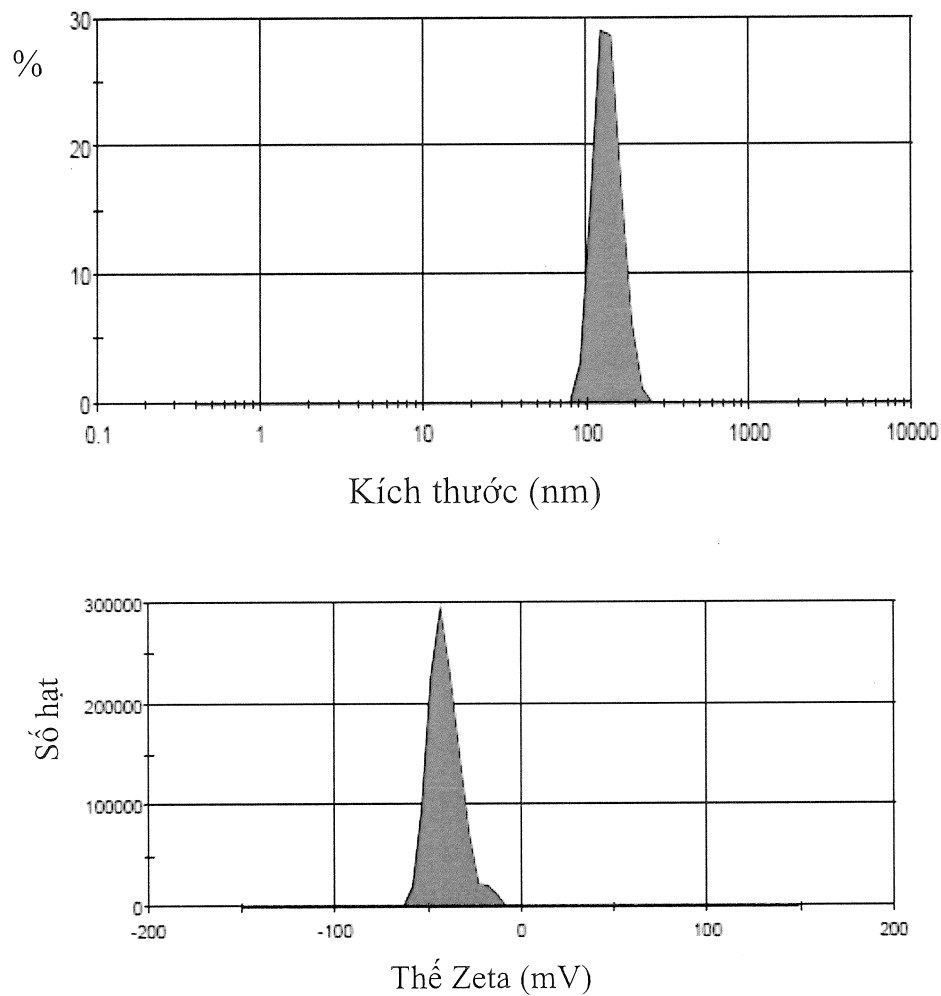
Hình 3. Giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD) của hệ nano kháng sinh tổ hợp [Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag]



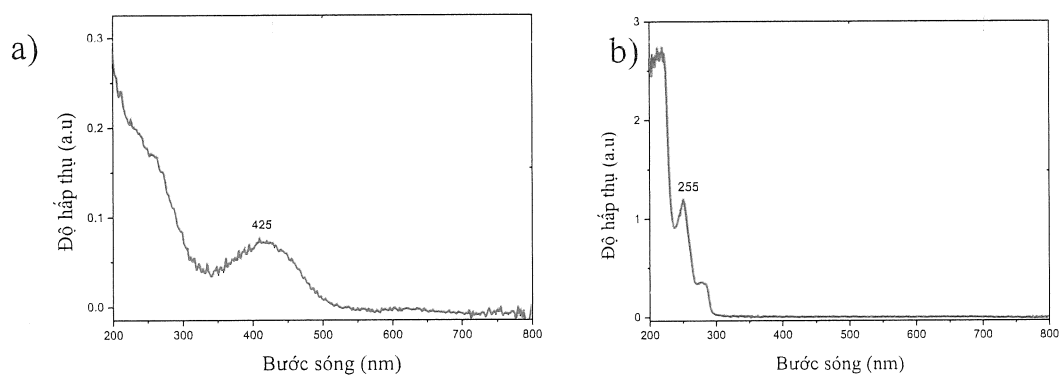
Hình 4: Ảnh FESEM (a) và TEM (b) của hệ nano kháng sinh tổ hợp [Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag]

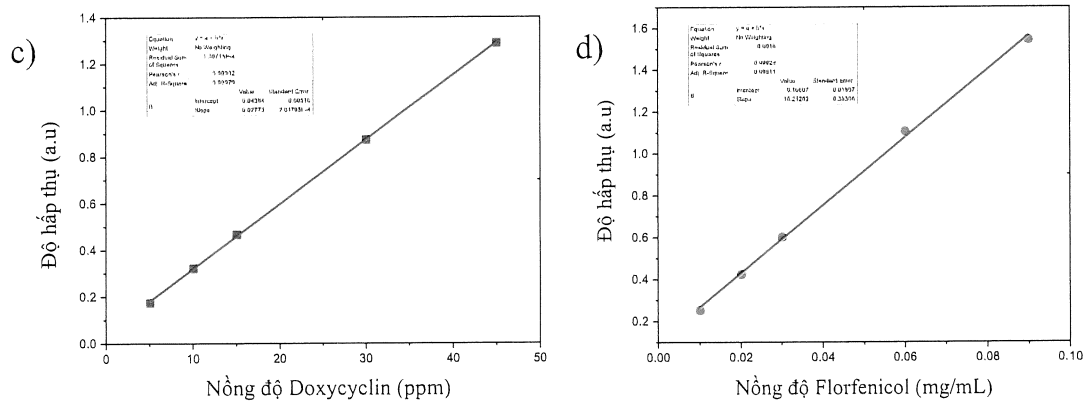


Hình 5. Phân bố kích thước hạt và thế Zeta của hệ nano kháng sinh tổ hợp [Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag]

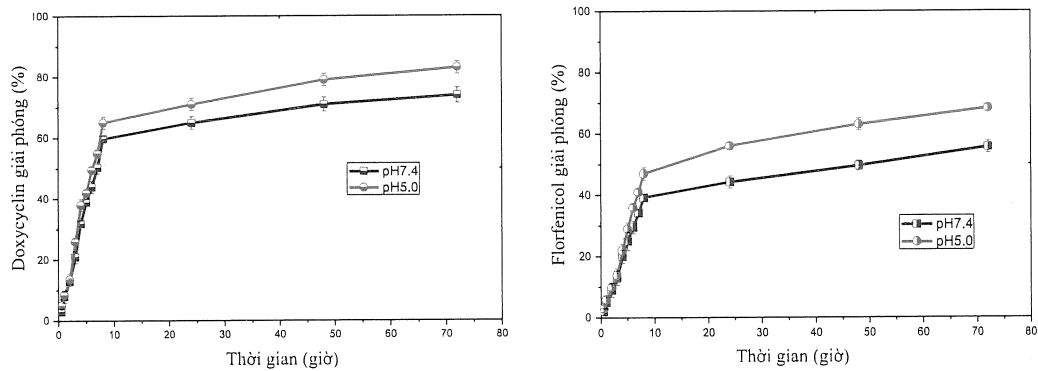


Hình 6. Phổ UV-Vis và đường chuẩn nồng độ-độ hấp thụ quang của (a) (c) Doxycyclin và (b)(d) Florfenicol





Hình 7. Biểu đồ giải phóng thuốc Doxycycline và Florphenicol từ hệ nano kháng sinh tổ hợp [Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag]



Hình 8. Hoạt tính kháng khuẩn của hệ nano kháng sinh tổ hợp [Doxycyclin-Florphenicol-nano Ag] (D1) trên vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*

