



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0034958

(51)^{2020.01} A61K 31/00; A61P 35/00; A61K 9/14

(13) B

(21) 1-2020-05880

(22) 14/10/2020

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/01/2021 394

(73) Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Phường Nghĩa Đô, Quận Cầu Giấy, Thành Phố Hà Nội

(72) Nguyễn Xuân Nhiệm (VN); Phan Văn Kiệm (VN); Phạm Văn Cường (VN); Châu Văn Minh (VN); Nguyễn Hoài Nam (VN); Trần Đại Lâm (VN); Bùi Hữu Tài (VN); Phạm Hải Yến (VN); Đỗ Thị Thảo (VN); Nguyễn Thế Cường (VN).

(54) QUY TRÌNH CHẾ TẠO PHỨC HỆ VI NHŨ TƯƠNG NANO MALLOAPELTA B-CURCUMIN

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình chế tạo phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin bao gồm các bước: *i*) chuẩn bị hỗn hợp curcumin/cồn, *ii*) chuẩn bị hỗn hợp malloapelta B/triglycerol/lecithin/cồn, *iii*) tạo hỗn hợp chất mang PEG400-nước, *iv*) tạo hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin, và *v*) thu sản phẩm bằng cách để hỗn hợp đồng nhất thu được qua đêm, sau đó ly tâm.

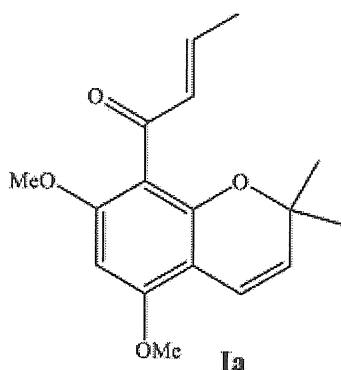
Phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin thu được theo sáng chế có tác dụng ức chế sự phát triển tế bào ung thư *in vitro* và khối u trên chuột nhắt trắng dòng BALB/c. Phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin phân tán tốt trong nước, có độ an toàn cao, không độc hại và ít tác dụng phụ khi sử dụng. Do đó, quy trình chế tạo phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin này theo sáng chế rất hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các sản phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến công nghệ trong lĩnh vực Y-Dược, cụ thể sáng chế đề cập đến quy trình điều chế phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin. Phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin thu được theo sáng chế có tác dụng ức chế sự phát triển tế bào ung thư *in vitro* và khối u trên chuột nhắt trắng dòng BALB/c. Phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin phân tán tốt trong nước có độ an toàn cao, không độc hại và ít tác dụng phụ. Do đó, quy trình chế tạo phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin này theo sáng chế rất hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các sản phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

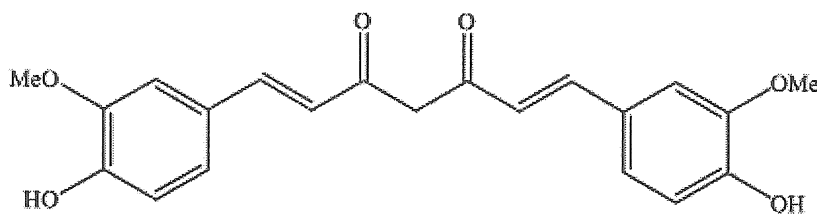
Hoạt chất malloapelta B có công thức Ia đã được đăng ký sáng chế cho quy trình phân lập với cấu trúc hoá học mới cũng như về hoạt tính chống ung thư bởi nhóm tác giả Châu Văn Minh, Phan Văn Kiệm và cộng sự, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên năm 2005.



Malloapelta B

Hoạt chất malloapelta B đã được chứng minh khả năng phòng chữa ung thư rất mạnh. Malloapelta B được phát hiện ức chế mạnh sự hoạt hoá của yếu tố nuclear factor-kappa B (NF-kB) với giá trị IC_{50} $0,54 \pm 0,05$ μ M, thấp hơn nhiều so với của chất đối chứng parthenolide với giá trị IC_{50} là $6,66 \pm 0,07$ μ M. Gần đây, các nhà khoa học Trung Quốc đã phát hiện hợp chất này ức chế sự kích hoạt NF-kB thông qua IKK bằng cách ngăn chặn phosphoryl hóa. Ngoài ra, malloapelta B cũng được phát hiện có khả năng điều hòa các gene đích liên quan đến yếu tố viêm và tăng sinh. Hợp chất này cũng được nghiên cứu chế tạo dạng nano với polyme đồng trùng hợp dạng nhánh poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) polyme và polyamidoamine (PAMAM). Kết quả cho thấy kích thước của chất mang nano và chất mang có chứa malloapelta B trong khoảng 146,8 ~ 194,5 nm. Chúng được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan HepG2, kết quả cho thấy malloapelta B tự do và malloapelta B dạng nano ức chế sự phát triển tế bào ung thư gan HepG2 với giá trị lần lượt là $11,32 \pm 0,61$ μ g/mL và $20,00 \pm 0,91$ μ g/mL. Kết quả cũng cho thấy lượng malloapelta B giải phóng ra khỏi chất mang nano 30 % trong 54 giờ ở pH 5,5.

Curcumin là hợp chất có công thức Ib sau đây:



Ib

Curcumin

Curcumin là thành phần chính của củ nghệ vàng và từ xa xưa đã được sử dụng như một dược liệu cổ truyền. Curcumin đã được phát hiện có khả năng điều trị như làm lành vết thương, kháng khuẩn, chống viêm, hạ cholesterol máu và kháng u. Tuy nhiên, curcumin có một nhược điểm lớn đó là rất khó tan trong nước. Vì thế sinh khả dụng của curcumin thấp.

Quá trình nano hóa là một xu hướng của công nghệ hiện đại, nó giúp tăng sinh khả dụng của malloapelta B và curcumin. Hoạt chất có hoạt tính sinh học ở dạng tự do, khi không được bao bọc bởi polyme có thể đi xuyên vách qua sự thẩm thấu và khuếch tán tự nhiên, tác dụng và hủy diệt các tế bào lành lẫn tế bào ung thư. Đối với các phần tử có kích thước nano. Do khả năng định hướng nhờ màng polymer dẫn, kích thước phần tử nhỏ hơn 100 nm giúp tăng khả năng thẩm thấu qua màng tế bào ung thư bởi vì vách huyết quản của các tổ chức tế bào ung thư có các kẽ hở khá lớn với đường kính khoảng 400 nm. Những kẽ hở này cho phép hoạt chất có hoạt tính sinh học/dược chất đi qua có thể đi vào trong tế bào ung thư. Như vậy, nhờ hiệu ứng tăng cường độ thâm nhập các hệ dẫn thuốc nano được vận chuyển một cách hướng đích đến tế bào ung thư và tiêu diệt chúng một cách chọn lọc với hàm lượng dược chất nhỏ hơn vẫn đạt được hiệu quả điều trị mong muốn.

Hiện nay, chưa có nghiên cứu nào về chế tạo hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin cũng như tác dụng kháng ung thư *in-vivo* và phát triển thành thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị bệnh ung thư. Vì thế việc nghiên cứu chế tạo phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin sẽ làm tăng tính sinh khả dụng của các hoạt chất malloapelta B và curcumin. Đặc biệt làm giảm độc tính của malloapelta B.

Anitha Krishnan Nair và cộng sự trong công bố đơn sáng chế tại Mỹ số US 2011/0229532 A1 đã đề cập quy trình điều chế phức hệ vi nhũ tương của hợp chất thuộc nhóm phenol thân dầu bằng cách sử dụng siêu âm với chất hoạt động bề mặt dạng không ion và một dung dịch không ion để tăng khả năng hòa tan trong nước.

Bakulesh Mafatlal Khamar và cộng sự (công bố đơn sáng chế số US 2013/0225689 A1) đã bảo hộ quy trình điều chế nano curcumin ở dạng lỏng, dạng muối và các dẫn xuất của cucurmin nhằm tăng sinh khả dụng để nâng cao hỗ trợ điều trị.

Do đó, rất cần thiết để xây dựng quy trình điều chế phức hệ vi nhũ tương có các hạt tiểu phân có kích thước nano, đồng đều, có khả năng tan tốt trong nước, nâng cao hoạt tính của phức hệ malloapelta B-curcumin trong quá trình nano hóa.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là làm tăng tính sinh khả dụng của phức hệ nano malloapelta B-curcumin để tạo ra phức hệ với các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ đồng đều, có khả năng hòa tan tốt hơn trong nước mà vẫn giữ được cấu trúc.

Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất quy trình điều chế phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin bằng cách tạo ra các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ hơn 100 nm, đồng đều, có khả năng hòa tan tốt hơn trong nước và vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính trong quá trình nano hóa, đặc trưng ở chỗ, quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị hỗn hợp curcumin/cồn (rượu etylic), trong đó curcumin được hòa tan với dung môi cồn theo tỷ lệ khối lượng/thể tích của curcumin/dung môi cồn là 2,4:10 kèm khuấy với tốc độ từ 400 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong thời gian 6 giờ;

ii) chuẩn bị hỗn hợp malloapelta B/triglycerol/lecithin/cồn, trong đó: malloapelta B được hòa tan với cồn theo tỷ lệ khối lượng:thể tích là 1,5:10 kèm khuấy với tốc độ từ 400 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong thời gian 3 giờ; và

cho từ từ hỗn hợp triglycerol:lecithin theo tỷ lệ khối lượng 3:1,5 vào dung dịch trên đây kèm khuấy với tốc độ từ 400 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong thời gian 3 giờ;

iii) tạo hỗn hợp chất mang, trong đó hỗn hợp chất mang polyetylglycol 400 (PEG400)-nước được tạo ra bằng cách phân tán đều PEG400 trong nước theo tỷ lệ khối lượng là 1,5/2,1 kèm rung siêu âm ở tần số 40 KHz trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ phòng;

iv) tạo hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin, trong đó hỗn hợp curcumin/cồn và hỗn hợp malloapelta B/triglycerol/lecithin/cồn được nhỏ từ từ vào hỗn hợp chất mang PEG400-nước kèm rung siêu âm ở tần số 40 KHz, gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong thời gian 6 đến 8 giờ;

v) thu sản phẩm bằng cách để hỗn hợp đồng nhất thu được qua đêm, sau đó ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút và lặp lại ly tâm 6 lần.

Sáng chế còn đề xuất phức hệ vi nhũ tương thu được bằng quy trình trên đây, trong đó phức hệ này:

có độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 7,4 mà các hạt tiểu phân tồn tại ổn định do trong môi trường trung tính này liên kết giữa malloapelta B-curcumin và vật liệu mang được giữ vững trong quá trình phân tán, và

có chỉ số cân bằng ưa nước-ky nước (HLB) nằm trong khoảng từ 13 đến 18, là hệ vi nhũ tương ưa nước để các hạt tiểu phân chứa malloapelta B-curcumin ưa nước, không kết dính, kích thước của các hạt tiểu phân malloapelta B-curcumin ổn định nằm trong khoảng từ 30 đến 35 nm

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn thông qua các phương án cụ thể chỉ với mục đích minh họa và không làm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Sáng chế đề xuất quy trình điều chế phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin bằng cách tạo ra các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ hơn 100 nm, đồng đều, có khả năng hòa tan tốt hơn trong nước và vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính trong quá trình nano hóa, quy trình này bao gồm các bước sau đây:

Bước i) chuẩn bị hỗn hợp curcumin/cồn, trong đó curcumin được hòa tan với dung môi cồn theo tỷ lệ khối lượng/thể tích của curcumin/dung môi cồn là 2,4:10 kèm khuấy với tốc độ từ 400 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong thời gian 6 giờ.

Với mục đích tạo ra các hạt tiểu phân chứa curcumin có kích thước nano và ổn định, nhóm tác giả sáng chế đã sử dụng cồn là dung môi có khả năng hòa tan curcumin cao, nên đã giúp tạo pha phân tán tốt hơn và tạo điều kiện để pha phân tán có thể kết hợp với chất mang PEG tốt hơn.

Ngoài ra, việc sử dụng dung môi cồn có gốc hydroxyl (OH-) tạo liên kết với nước, nên có tác dụng ổn định cấu trúc hệ vi nhũ tương dầu trong nước. Bằng các thử nghiệm, các tác giả sáng chế xác định được với tỷ lệ curcumin: cồn là 2.4:10 (khối lượng:thể tích) thì curcumin đạt được độ hòa tan lớn nhất và tránh việc sử dụng dư thừa dung môi cồn gây lãng phí nguyên liệu.

Bước ii) chuẩn bị hỗn hợp malloapelta B/triglyxerol/lexitin/cồn, trong đó: malloapelta B được hòa tan với cồn theo tỷ lệ khối lượng:thể tích là 1,5:10 kèm khuấy với tốc độ từ 400 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong thời gian 3 giờ; và cho từ từ hỗn hợp triglyxerol:lexitin theo tỷ lệ khối lượng 3:1,5 vào dung dịch trên đây kèm khuấy với tốc độ từ 400 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong thời gian 3 giờ.

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: polyme thiên nhiên ưa nước như protein, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gelatin, albumin, polysacarit, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alginat, dextran, chitosan, polyme tổng hợp kỵ nước như polyeste (poly (ϵ -caprolacton), poly axit lactic, poly axit lactic-co-glycolic. 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, v.v., có thể được điều khiển bằng các tính chất hóa lý của polyme.

Vì vậy, việc kết hợp nhiều polyme để ổn định hệ phân tán là điều cần thiết.

Bằng các nghiên cứu lý thuyết và thực nghiệm, các tác giả sáng chế nhận thấy rằng để điều chế phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin tan tốt trong nước, thì hệ 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, v.v.). Vì vậy, nhóm tác giả sáng chế đã lựa chọn chất nhũ hóa là lexitin và triglyxerol, bởi vì lexitin và triglyxerol là chất thân (ưa) nước, không có độc tính và độ an toàn cao.

Bước iii) tạo hỗn hợp chất mang, trong đó hỗn hợp chất mang polyetylen glycol 400 (PEG400)-nước được tạo ra bằng cách phân tán đều PEG400 trong nước theo tỷ lệ khối lượng là 1,5/2,1 kèm rung siêu âm ở tần số 40 KHz trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ phòng.

Bước iv) tạo hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin, trong đó hỗn hợp curcumin/cồn và hỗn hợp malloapelta B/triglyxerol/lexitin/cồn được nhỏ từ từ vào hỗn hợp chất mang PEG400-nước kèm rung siêu âm ở tần số 40 KHz, gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong thời gian 6 đến 8 giờ.

Trong các bước này, do việc chất nhũ hóa lexitin và triglyxerol là phân tử có 2 phần riêng biệt, phần thân dầu và phần ưa nước, nên có khả năng tạo liên kết với malloapelta B-curcumin và chất mang PEG400. Phần thân dầu của lexitin và triglyxerol tạo liên kết với curcumin và phần ưa nước của lexitin tạo liên kết với phần ưa nước của chất mang PEG, nên đã tạo ra các hạt tiểu phân nano malloapelta B-curcumin và với cấu trúc này các hạt tiểu phân đã bảo vệ tốt hoạt tính malloapelta B-curcumin.

Bước v) thu sản phẩm bằng cách để hỗn hợp đồng nhất thu được qua đêm, sau đó ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút và lặp lại ly tâm 6 lần.

Hệ vi nhũ tương thu được bằng quy trình theo sáng chế 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 malloapelta B-curcumin và vật liệu mang được giữ vững trong quá trình phân tán, trong khi hệ vi nhũ tương có độ pH <7 thì liên kết này suy yếu dẫn đến malloapelta B-curcumin sẽ bị phá hủy ngay trong đường tiêu hóa.

Hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin thu được bằng quy trình theo sáng chế có chỉ số cân bằng ưa nước-ky nước (HLB) nằm trong khoảng từ 13 đến 18 là hệ vi nhũ tương ưa nước. Hệ vi nhũ tương này có các hạt tiểu phân chứa malloapelta B-curcumin ưa nước, không kết dính, kích thước của các hạt tiểu phân curcumin ổn định nằm trong khoảng từ 30 đến 35 nm, nên có thể thâm nhập dễ dàng qua màng tế bào để phát huy hiệu quả và tăng độ phân tán của malloapelta B-curcumin trong nước, từ đó làm tăng tính sinh khả dụng của hoạt tính malloapelta B-curcumin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây sáng chế còn được mô tả một cách chi tiết thông qua các ví dụ cụ thể chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế.

Ví dụ 1: Chế tạo phức hệ nano malloapelta B-curcumin

Chuẩn bị hỗn hợp curcumin/cồn

Hòa tan 2,4 g curcumin với 10 mL cồn trên bằng máy khuấy có tốc độ 450 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 6 giờ.

Chuẩn bị hỗn hợp malloapelta B/triglyxerol/lexitin/cồn

Hòa tan 1,5 g malloapelta B với 10 mL cồn trên bằng máy khuấy có tốc độ từ 400 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 3 tiếng.

Cho từ từ hỗn hợp triglycerol/lexitin theo tỷ lệ 3g/1,5g trên bằng máy khuấy có tốc độ 450 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 3 tiếng.

Tạo hỗn hợp chất mang PEG 400/nước bằng cách phân tán đều PEG/nước theo tỷ lệ 1,5g/2,1g trên máy rung siêu âm ở tần số 40 KHz trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ phòng.

Tạo hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin (MC1)

Nhỏ từ từ hỗn hợp curcumin/cồn và hỗn hợp malloapelta B/triglycerol/lexitin/cồn vào cốc chứa PEG/nước. Kết hợp rung siêu âm ở tần số 40 KHz, gia nhiệt ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 6 đến 8 giờ.

Sản phẩm thu được bằng cách để qua đêm hỗn hợp đồng nhất thu được đem ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút và lặp lại ly tâm 6 lần.

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác kháng ung thư *in vitro* của phức hệ nano malloapelta B-curcumin (MC1)

Phức hệ theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt gây độc tế bào ung thư như sau:

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư được đánh giá theo phương pháp Sulforhodamine B (SRB). Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng SRB. Giá trị OD máy đo được tỷ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn.

Chất thử đã pha ở các nồng độ khác nhau được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng, thêm tế bào đã điều chỉnh nồng độ phù hợp ở trên vào các giếng này để có được nồng độ mong muốn. Ủ trong tủ ấm 48 giờ. Giếng không có chất thử nhưng có tế bào ung thư (180 μ L) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng axit triclo axetic (TCA) 20 %.

Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37°C, rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô ở nhiệt độ phòng.

Thêm 10 mM dung dịch Tris bazơ không đệm (unbuffered Tris base) để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút.

Đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Biotek).

Kết quả được thể hiện trên Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Tác dụng gây độc tế bào ung thư của các hợp chất và phức hệ MC1

STT	Hợp chất/phức hệ	Dòng tế bào (IC ₅₀ , μ g/mL)			
		HT29	SW480	AGS	MKN7
1	MC1	55,2 $\pm$ 2,87	57,57 $\pm$ 2,12	57,97 $\pm$ 4,07	44,47 $\pm$ 4,26
2	Malloapelta B	3,44 $\pm$ 0,21	4,43 $\pm$ 0,47	5,15 $\pm$ 0,48	4,62 $\pm$ 0,56
3	Ellipticine	0,38 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,02

Ví dụ 3: Thử nghiệm độc tính cấp của phức hệ **MC1**

Phương pháp thử nghiệm: 48 chuột nhắt trắng dòng BALB/c khoẻ mạnh, trọng lượng khoảng 18-22 g, không phân biệt giống, được nuôi trong điều kiện tiêu chuẩn về nhiệt độ, ánh sáng, được chia làm 8 lô (6 chuột/lô), và bị bỏ đói hoàn toàn 16 giờ trước khi được uống mẫu nghiên cứu. Sau khi cho chuột uống mẫu nghiên cứu, chuột được theo dõi về biểu hiện bên ngoài và số lượng chuột chết trong mỗi lô thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: Số lượng chuột chết, biểu hiện bên ngoài sau khi uống **MC1** trong 72 giờ

STT	Liều MC1 (mg/kgP)	Số chuột chết/lô	Biểu hiện bên ngoài
1	Đối chứng	0/6	Chuột di chuyển và ăn uống bình thường, không có biểu hiện rối loạn thần kinh, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt
2	2000	0/6	Chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt, không có biểu hiện rối loạn thần kinh, phân bình thường cho thấy không có rối loạn tiêu hóa
3	4000	0/6	Chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt, không có biểu hiện rối loạn thần kinh, phân bình thường cho thấy không có rối loạn tiêu hóa
4	6000	0/6	Chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt, không có biểu hiện rối loạn thần kinh, phân hơi nát, màu vàng.
5	8000	0/6	Chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt, không có biểu hiện rối loạn thần kinh, phân hơi nát, màu vàng.
6	10000	0/6	Chuột di chuyển chậm; Phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt Không có biểu hiện rối loạn thần kinh; Phân nát, màu vàng, sau 24 giờ uống mẫu phân bình thường.
7	15000	0/6	Chuột di chuyển bình thường; Phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt; Không có biểu hiện rối loạn thần kinh; Phân nát, màu vàng, sau 24 giờ uống mẫu phân bình thường.
8	20000	0/6	Chuột di chuyển và ăn uống bình thường; phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt; không có biểu hiện rối loạn thần kinh; phân nát, màu vàng, phân bình thường sau 24 giờ uống mẫu.

Kết quả thí nghiệm trên cho thấy: mẫu **MC1** ở các liều nghiên cứu từ 2000 mg/kg đến 20000 mg/kg đều không gây chết động vật thí nghiệm theo đường uống sau 3 ngày thí nghiệm. Tuy nhiên từ liều 6000 mg/kg, chuột có biểu hiện phân nát sau khi uống mẫu cho thấy có hiện tượng rối loạn tiêu hóa nhẹ. Vì vậy có thể kết luận liều 4000 mg/kgP là

liều an toàn cho chuột nhất theo đường uống, và liều thử nghiệm được lý đối với MC1 là từ 400 mg/kgP trở xuống.

Khối lượng cơ thể chuột: Khối lượng cơ thể chuột thí nghiệm được theo dõi trong 07 ngày kể từ khi uống MC1. Kết quả được thể hiện trong các bảng 3.

Bảng 3: Kết quả theo dõi khối lượng của chuột ở các lô

Liều MC1 (mg/kgP)	Khối lượng trung bình của chuột thí nghiệm (g/con)			
	Trước khi uống	ngày 1	ngày 4	ngày 7
Đối chứng	20,58±0,36	20,68±0,38	22,45±0,27	24,10±0,25
2000	20,50±0,26	20,92±0,41	22,15±0,45	23,68±0,54
4000	20,53±0,48	20,93±0,41	22,20±0,47	23,95±0,48
6000	20,48±0,36	20,90±0,28	22,07±0,36	23,57±0,27
8000	20,60±0,65	20,83±0,63	22,22±0,73	23,92±0,73
10000	20,42±0,55	20,52±0,52	22,02±0,45	23,60±0,48
15000	20,43±0,43	20,10±0,38	21,20±0,50	23,23±0,34
20000	20,42±0,32	20,20±0,41	21,33±0,54	23,17±0,41

Có thể thấy rằng:

- Trước khi uống mẫu thử: Khối lượng trung bình của chuột ở các nhóm thử trước khi đưa vào thử nghiệm không có sự khác biệt so với nhóm chứng ($P>0,05$).
- Sau khi uống mẫu thử 1 ngày, 4 ngày và 7 ngày: khối lượng chuột thí nghiệm được uống mẫu tăng dần theo thời gian và không có sự sai khác so với đối chứng sinh lý ($p>0,05$). Kết quả cho thấy mẫu nghiên cứu không ảnh hưởng đến quá trình phát triển bình thường của chuột.
- Tiêu thụ thức ăn và nước uống của chuột:
Nhóm đối chứng: chuột hoạt động và ăn uống bình thường.
Nhóm uống MC1: chuột tiêu thụ nước uống, thức ăn bình thường.
- Quan sát dấu hiệu ngộ độc:
Sau khi uống chế phẩm MC1, chuột ở các lô thí nghiệm hoạt động bình thường, không có dấu hiệu bất thường về thần kinh. Tuy nhiên có triệu chứng rối loạn tiêu hóa nhẹ làm tiêu chảy sau khi uống mẫu ở liều cao. Sau 7 ngày, mẫu MC1 cũng không gây chết chuột.

Ví dụ 4: Thử nghiệm về độc bán trường diễn bán trường diễn của MC1

Trên cơ sở kết quả nghiên cứu từ thử nghiệm độc cấp tính cho thấy liều 400 mg/kgP trên chuột nhắt trắng là liều an toàn cho các thử nghiệm được lí. Do vậy, thử nghiệm khả năng gây độc bán trường diễn trên chuột cống trắng được qui đổi tương đương sẽ là mức liều 200 mg/kgP. Do vậy 2 mức liều được lựa chọn cho thử nghiệm này của mẫu MC1 sẽ là 100 mg/kgP và 200 mg/kgP. Kết quả thu được như sau:

Tình trạng chung: Trong thời gian thí nghiệm, chuột ở cả 3 lô hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, ăn uống tốt, phân khô. Không thấy biểu hiện gì đặc biệt ở các lô thí nghiệm trong suốt thời gian nghiên cứu. Chuột được cân trọng

lượng tại các thời điểm ngày 0, 7, 14, 21 và 28 sau khi uống MC1. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của MC1 đến thể trọng chuột

STT	Thời gian (ngày)	Lô chứng (mg/kgP)	Liều (mg/kgP)	
			100	200
1	0	170,83±10,63	164,33±6,33	165,50±7,37
2	7	184,33±11,13	179,20±6,21	176,33±14,14
3	14	195,17±11,26	193,00±8,08	188,17±15,42
4	21	195,50±11,25	194,33±8,25	186,50±14,27
5	28	196,50±10,04	195,90±8,57	185,83±12,91

Kết quả ở bảng trên cho thấy: sau 4 tuần thí nghiệm, trọng lượng chuột ở tất cả các lô (lô chứng và lô uống mẫu) đều tăng lên so với trước khi nghiên cứu ($P<0,05$). Tại thời điểm kết thúc thí nghiệm, khối lượng chuột ở lô uống mẫu thấp hơn lô đối chứng. Tuy nhiên, sự khác biệt này chưa thể hiện ý nghĩa thống kê ($P>0,05$).

Đánh giá chức năng tạo máu: Để đánh giá ảnh hưởng của mẫu thử MC1 đến chức năng tạo máu khi cho uống bán trường diễn thì sau thời gian thí nghiệm chuột ở các lô được lấy máu, thu huyết thanh, xác định các chỉ tiêu huyết học. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5: Ảnh hưởng của MC1 đến chức năng tạo máu của chuột

STT	Các chỉ số	Lô Đối chứng	Liều (mg/kgP)	
			100	200
1	Bạch cầu ($10^9/L$)	6,72±0,50	6,97±0,35	7,20±1,09
2	Hồng cầu ($10^{12}/L$)	8,49±0,60	8,20±0,32	8,07±0,98
3	HGB (g/dL)	142,3±8,4	135,1±4,0	128,6±19,3
4	HCT (%)	0,43±0,02	0,44±0,02	0,40±0,07
5	MCV (fL)	51,10±1,72	52,95±0,67	48,63±2,84
6	MCH (pg)	16,80±0,38	16,48±0,29	15,90±0,90
7	MCHC (g/L)	329,3±4,5	311,9±9,5	327,3±7,3
8	CHCM (g/L)	343,0±4,5	320,0±10,9	340,3±8,1
9	CH (pg)	17,37±0,35	16,75±0,32	16,43±0,92
10	RDW (%)	16,03±2,68	18,60±1,62	16,23±1,14
11	HDW (g/dL)	34,90±3,90	35,05±4,42	35,43±1,58
12	Tiểu cầu ($10^9/L$)	517,0±50,0	458,5±23,9	523,6±53,1
13	MPV (fL)	8,27±0,51	8,25±0,72	8,77±0,03

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy:

- Số lượng hồng cầu giữa lô được uống MC1 thấp hơn so với đối chứng nhưng không có sự sai khác thống kê sau 4 tuần uống thuốc so với lô đối chứng ($P>0,05$).
- Số lượng huyết sắc tố (HGB), hematocrit (HCT), thể tích trung bình hồng cầu (MCV), nồng độ Hb trung bình hồng cầu (MCHC) hay độ phân bố hồng cầu (RDW) ở chuột uống MC1 có sự thay đổi so với đối chứng sau 04 tuần uống thuốc, tuy nhiên không có sự sai khác thống kê giữa lô uống mẫu và lô đối chứng ($P>0,05$).

- Số lượng bạch cầu trong máu chuột được uống **MC1** tăng nhẹ so với lô đối chứng sau 4 tuần thí nghiệm. Tuy nhiên sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$).
- Số lượng tiểu cầu trong máu chuột giữa lô được uống **MC1** và lô đối chứng là không có sự sai khác thống kê sau 4 tuần thí nghiệm ($P>0,05$).

Như vậy, sau 4 tuần uống mẫu **MC1** liên tục ở cả 2 mức liều là 100 và 200 mg/kgP, tất cả các chỉ số đánh giá chức năng tạo máu (số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($P>0,05$). Điều này cho thấy uống **MC1** ở các liều nghiên cứu không gây độc khi cho chuột cống trắng uống bán trường diễn trong 28 ngày.

Đánh giá chức năng gan, thận: Chức năng gan của chuột được đánh giá thông qua hoạt độ enzyme AST và ALT trong máu. Kết quả được trình bày ở bảng 6

Bảng 6: Ảnh hưởng của **MC1** đến hoạt độ AST, ALT và creatinin trong máu chuột

STT	Các chỉ số	Lô chứng bệnh lý	Liều MC1 (mg/kgP)	
			100	200
1	AST (U/L)	63,50 ± 13,50	85,30 ± 13,91	110,10 ± 24,47
2	ALT (U/L)	27,50 ± 5,28	29,33 ± 2,35	40,80 ± 9,55
3	Creatinin (μmol/L)	51,43 ± 5.70	49,07 ± 4.13	47,80 ± 4.71

Sau 4 tuần uống thuốc liên tục, các chỉ số đánh giá hoạt độ AST và ALT ở lô uống **MC1** liều 100 và 200 mg/kgP/ngày đều cao hơn so với đối chứng; nồng độ creatinin giảm nhẹ. Tuy nhiên khi sử dụng phép thử thống kê Student *t* test, cho thấy không có sự sai khác thống kê về từng giá trị giữa các lô thí nghiệm.

Kết quả mổ và kiểm tra trực quan các cơ quan

Sau quá trình thí nghiệm, chuột được mổ để kiểm tra trực quan các mô. Kết quả cho thấy:

- Lô đối chứng: gan màu nâu đậm, nhu mô gan đều; thận hai bên đối xứng, không có biểu hiện bất thường, lách có màu nâu, không sưng.
- Lô uống **MC1** với cả hai liều 100 và 200 mg/kgP/ngày: Gan, thận, lách bình thường không có sự khác biệt so với đối chứng.

Qua nghiên cứu độc tính cấp, với cả 2 liều 100 và 200 mg/kgP/ngày liên tục trong 4 tuần gây thay đổi nhẹ về các chỉ số cân nặng (giảm), chỉ số huyết học (giảm), enzym gan (tăng), thận (giảm) so với đối chứng, nhưng sự thay đổi này không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$).

Ví dụ 5: Thử nghiệm về tác dụng kháng u của **MC1** trên chuột gây u thực nghiệm

Phương pháp: Tế bào LLC được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò và 1% kháng sinh ở 37°C và 5% CO₂, khi tế bào mọc tốt tiến hành thu hoạch và tiêm vào bắp đùi chuột nồng độ 2×10^6 tế bào/con (là nồng độ gây u cho chuột thí nghiệm đạt 100%). Sau khi tiêm tế bào LLC, 5-7 ngày thấy có u thì cho chuột uống mẫu nghiên cứu. Chuột BALB/c khoẻ mạnh, có độ tuổi từ 8-9 tuần tuổi, được chia làm 4 lô (8 chuột/lô).

Lô 1: (đối chứng bệnh lý) tiêm LLC, sau 5 ngày thì uống nước với thể tích 0,3 mL/con/ngày.

Lô 2: (đối chứng tham khảo) tiêm LLC, có u thì uống capecitabine liều 200 mg/kgP/ngày.

Lô 3 (thử mẫu): tiêm LLC, sau 5 ngày thì uống MC1 liều 200 mg/kgP/ngày

Lô 4 (thử mẫu): tiêm LLC, sau 5 ngày thì uống MC1 liều 400 mg/kgP/ngày

Theo dõi chuột hàng ngày, cân khối lượng và đo kích thước khối u sơ cấp tại vị trí tiêm 7 ngày/lần để xác định khả năng ức chế khối u của mẫu nghiên cứu. Trọng lượng chuột thí nghiệm tại các thời điểm được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7: Ảnh hưởng của MC1 đến trọng lượng chuột thí nghiệm (g/con)

STT	Thời gian (ngày)	Lô chứng bệnh lý	Capecitabine 200 mg/kgP	Liều (mg/kgP)	
				200	400
1	0	29,11±1,23	30,00±0,66	30,00±1,28	30,06±0,86
2	7	30,30±1,05	30,29±0,84	29,63±0,84	31,06±0,80
3	14	30,30±1,26	29,53±1,83	29,40±1,83	30,19±0,69
4	21	33,26±1,31	31,59±0,94	31,41±1,88	31,56±1,65
5	28	35,42±1,27	32,13±1,13	32,90±1,84	32,63±1,55

Ghi chú: * $P<0,05$ so với đối chứng bệnh lý

Kết quả cho thấy trọng lượng cơ thể chuột tại các thời điểm 0, 7, 14, 21 và 28 ngày không có sự sai khác so với đối chứng âm ($P>0,05$).

Sự phát triển khối u ở các lô thí nghiệm: Sự phát triển của khối u là một chỉ tiêu rất quan trọng để đánh giá tác dụng kháng u của chất thử. Kết quả nghiên cứu về sự phát triển của khối u được trình bày ở bảng 8.

Bảng 8: Ảnh hưởng của MC1 đến quá trình phát triển của khối u (mm³)

STT	Thời gian (ngày)	Lô chứng bệnh lý	Capecitabine 200 mg/kgP	Liều (mg/kgP)	
				200	400
1	0	546±87	568±26	594±280	567±109
2	7	2818±444	2776±315	2724±1200	2308±280
3	14	5915±664	4297±853	4341±2503	4292±502
4	21	9088±840	6733±470	6559±3840	6791±731*
5	28	12246±887	7071±871	9256±2383	7829±1105*

Ghi chú: * $P<0,05$ so với đối chứng bệnh lý

Kết quả cho thấy: -

- Uống liều MC1 200 mg/kg/ngày thì thể tích khối u tại các thời điểm có giảm so với đối chứng bệnh lý nhưng chưa có sự sai khác thống kê ($P>0,05$).

- Uống liều MC1 400 mg/kg/ngày thì thể tích khối u tại các thời điểm 21 và 28 ngày đã giảm so với đối chứng và có sự sai khác thống kê ($P<0,05$). Các thời điểm còn lại không có sự sai khác.

- Đối chứng tham khảo uống capecitabine 200 mg/kg/ngày thì thể tích khối u tại các thời điểm sau 7, 14, 21 và 28 ngày có giảm so với đối chứng bệnh lý và ở mức có sai khác thống kê ($P<0,05$).

Khả năng ức chế khối u phát triển của mẫu: Khả năng ức chế khối u phát triển của mẫu được trình bày ở bảng 9.

Bảng 9: Ảnh hưởng của MC1 đến khả năng ức chế khối u

STT	Thời gian (ngày)	% ức chế khối u (so với đối chứng bệnh lý)		
		Capecitabine 200 mg/kgP	Liều MC1 (mg/kgP)	
			200	400
1	0	0,29	0,80	0,51
2	7	5,97	15,61	21,82
3	14	21,25	29,81	21,35
4	21	24,90	20,53	24,25
5	28	42,26*	24,42	36,07*

Ghi chú: * $P < 0,05$ so với đối chứng bệnh lý

Kết quả ở bảng trên cho thấy:

- Uống MC1 liều 200 mg/kgP sau 28 ngày ức chế được khoảng 24,42% thể tích khối u so với đối chứng bệnh lý.
- Uống MC1 liều 400 mg/kgP sau 28 ngày ức chế được 36,07% thể tích khối u so với đối chứng bệnh lý.
- Uống capecitabine 200 mg/kgP/ngày, sau 28 ngày ức chế được 42,26% thể tích khối u so với đối chứng bệnh lý.

Trọng lượng khối u tại thời điểm kết thúc thí nghiệm.

Bảng 10: Trọng lượng khối u tại thời điểm kết thúc thí nghiệm (28 ngày)

STT	Lô thí nghiệm	Trọng lượng u (g)
1	Lô chứng bệnh lý	13,63 ± 2,67
2	Capecitabine liều 200 mg/kgP	7,32 ± 1,51*
3	MC1 liều 200 mg/kgP	9,83 ± 1,36
4	MC1 liều 400 mg/kgP	8,67 ± 1,67*

Kết quả bảng trên cho thấy trọng lượng u trung bình ở lô được uống capecitabine và MC1 liều 400 mg/kg thấp hơn khá nhiều so với đối chứng bệnh lý, nhưng do sai số lớn nên chưa thể hiện rõ sự sai khác thống kê ($P > 0,05$).

Chỉ số huyết học tại thời điểm kết thúc thí nghiệm:

Bảng 11: Chỉ số huyết học tại thời điểm kết thúc thí nghiệm

Các chỉ số	Đối chứng bệnh lý	Capecitabine	MC1 liều 200 mg/kgP	MC1 liều 400 mg/kgP
Bạch cầu ($10^9/L$)	37,69±6,67	10,04±0,23	14.56±3,15*	12.08±0,27*
Hồng cầu ($10^{12}/L$)	5,81±0,52	6,06±0,30	7,54±1,67	6,96±0,44
Hemoglobin (g/L)	81,75±5,06	90,00±5,12	95.33±7.26	97,00±4,06*
HCT (L/L)	0,30±0,02	0,39±0,08	0,37±0,08	0,34±0,01
MCV (fL)	52,23±2,03	50,00±0,82	49,43±1,39	49,23±1,74
MCH (pg)	14,23±0,58	14,08±0,51	13,87±0,28	14,10±0,40

MCHC (g/L)	272,0±4,1	296,5±3,4	280,3±7,5	287,0±4,1
CHCM	271,7±2,5	297,2±3,7	283,0±6,6	283,0±3,9
CH	14,03±0,43	14,78±0,34	13,93±0,13	13,83±0,40
RDW (%)	21,83±1,31	19,30±0,39	18,30±1,66	17,93±2,05
HDW (fL)	26,53±1,68	22,63±1,59	22,53±4,28	22,20±0,91
Tiểu cầu (10 ⁹ /L)	692,0±28,7	657,2±17,7	703,6±17,1	702,0±19,2
MPV (fL)	5,03±1,48	7,03±0,18	7,07±0,41	7,43±0,53

* $P < 0,05$ so với đối chứng bệnh lý

Kết quả ở bảng trên cho thấy:

- Chỉ số bạch cầu được kiểm tra tại thời điểm kết thúc thí nghiệm ở lô uống MC1 liều 200 và 400 mg/kgP đã giảm theo chiều hướng tích cực và ở mức có sai khác so với đối chứng bệnh lý ($P < 0,05$). Các chỉ số còn lại chưa thể hiện sai khác thống kê ($P > 0,05$).

- Uống Capecitabine 200 mg/kg/ngày trong thời gian 28 ngày đã làm giảm chỉ số bạch cầu so với lô đối chứng và có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$), các chỉ số huyết học còn lại không có sự sai khác so với lô đối chứng.

Các chỉ số hóa sinh tại thời điểm kết thúc thí nghiệm.

Bảng 12: Các chỉ số hóa sinh tại thời điểm kết thúc thí nghiệm

STT	Chỉ số hóa sinh	Lô chứng bệnh lý	Capecitabine 200 mg/kgP	Liều MC1 (mg/kgP)	
				200	400
1	AST (U/I)	815,0±73,8	473,4±62,7*	417,8±68,5*	484,2±33,5*
2	ALT (U/I)	33,60±7,53	29,40±1,90	33,95±2,87*	32,53±4,55
3	Creatinin (μM)	26,10±0,60	24,80±0,40	28,63±2,23*	24,30±1,27

* $P < 0,05$ so với đối chứng bệnh lý

Kết quả ở trên cho thấy:

- Uống MC1 liều 200 mg/kgP trong thời gian 28 ngày đã làm giảm chỉ số AST so với lô đối chứng ($P < 0,05$); các chỉ số ALT và Creatinin không giảm so với lô đối chứng ($P > 0,05$);

- Uống MC1 liều 400 mg/kgP trong thời gian 28 ngày đã làm giảm chỉ số AST so với lô đối chứng ($P < 0,05$); các chỉ số ALT và Creatinin không giảm so với lô đối chứng ($P > 0,05$);

- Uống Capecitabine 200 mg/kgP/ngày trong thời gian 28 ngày đã làm giảm chỉ số ALT so với lô đối chứng và có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); Các chỉ số AST và Creatinin không có sự sai khác so với lô đối chứng.

Kết quả này có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao, tạo cơ sở để nghiên cứu phát triển các dược phẩm mới có tác dụng điều trị bệnh ung thư từ hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình điều chế phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin đã thành công trong việc điều chế phức hệ vi nhũ tương có các hạt tiểu phân chứa nano

malloapelta B và curcumin có kích thước giảm, đồng đều và khả năng hòa tan tốt trong nước và vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính trong quá trình nano hóa.

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

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

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình chế tạo phức hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin bao gồm các bước:

i) chuẩn bị hỗn hợp curcumin/cồn, trong đó curcumin được hòa tan với dung môi cồn theo tỷ lệ khối lượng/thể tích của curcumin/dung môi cồn là 2,4:10 kèm khuấy với tốc độ từ 400 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong thời gian 6 giờ;

ii) chuẩn bị hỗn hợp malloapelta B/triglyxerol/lexitin/cồn, trong đó: malloapelta B được hòa tan với cồn theo tỷ lệ khối lượng:thể tích là 1,5:10 kèm khuấy với tốc độ từ 400 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong thời gian 3 giờ; và

cho từ từ hỗn hợp triglyxerol:lexitin theo tỷ lệ khối lượng 3:1,5 vào dung dịch trên đây kèm khuấy với tốc độ từ 400 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong thời gian 3 giờ;

iii) tạo hỗn hợp chất mang, trong đó hỗn hợp chất mang polyetylen glycol 400 (PEG400)-nước được tạo ra bằng cách phân tán đều PEG400 trong nước theo tỷ lệ khối lượng là 1,5/2,1 kèm rung siêu âm ở tần số 40 KHz trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ phòng;

iv) tạo hệ vi nhũ tương nano malloapelta B-curcumin, trong đó hỗn hợp curcumin/cồn và hỗn hợp malloapelta B/triglyxerol/lexitin/cồn được nhỏ từ từ vào hỗn hợp chất mang PEG400-nước kèm rung siêu âm ở tần số 40 KHz, gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong thời gian 6 đến 8 giờ;

v) thu sản phẩm bằng cách để hỗn hợp đồng nhất thu được qua đêm, sau đó ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút và lặp lại ly tâm 6 lần.

2. Phức hệ vi nhũ tương thu được bằng quy trình theo điểm 1, trong đó phức hệ này:

có độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 7,4 mà các hạt tiểu phân tồn tại ổn định do trong môi trường trung tính này liên kết giữa malloapelta B-curcumin và vật liệu mang được giữ vững trong quá trình phân tán, và

có chỉ số cân bằng ưa nước-kỵ nước (HLB) nằm trong khoảng từ 13 đến 18 mà là hệ vi nhũ tương ưa nước để các hạt tiểu phân chứa curcumin-Malloapelta B ưa nước, không kết dính, kích thước của các hạt tiểu phân curcumin ổn định nằm trong khoảng từ 30 đến 35 nm.