



(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)



1-0035650

(51)⁷ A61K 9/107; A61K 9/14; B82Y 5/00;
A61K 9/1075

(13) B

(21) 1-2020-00058

(22) 03/01/2020

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/05/2020 386ASC

(73) Công ty cổ phần Wakamono (VN)

95 Trần Trọng Cung, phường Tân Thuận Đông, quận 7, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Đặng Thị Hồng Ngọc (VN); Lại Nam Hải (VN).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ PADEMARK (PADEMARK CO.,LTD.)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT HỆ VI NHŨ TƯƠNG NANO FUCOXANTHIN

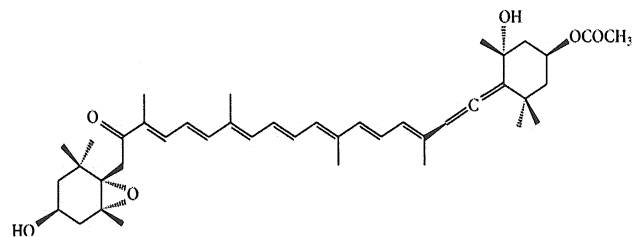
(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano fucoxanthin cải tiến bao gồm các bước: (i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho fucoxanthin hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ fucoxanthin: dung môi etanol là 8:10 theo khối lượng ở tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 8 giờ; (ii) chuẩn bị chất mang bằng cách gia nhiệt PEG (polyetylen glycol) dạng lỏng chiếm từ 40 đến 60% khối lượng hỗn hợp PEG và nước 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 hỗn hợp chất mang và 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: gia nhiệt cho đến khi nhiệt độ đạt 100°C, bổ sung TWEEN 80 và dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 với tỉ lệ nằm trong khoảng từ 30:71 đến 30:70 theo khối lượng vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán thu được ở bước (iii) 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 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 1 đến 2 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 trong thời gian 30 đến 60 phút cho đến khi nhiệt độ còn nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C; tiến hành nhũ toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/ phút; (v) đồng hóa hỗn hợp bằng cách bơm qua hệ thống đồng hóa áp lực cao ở 30Mpa; (vi) lọc sản phẩm bằng cách bơm qua hệ thống lọc nano trước khi chiết rót đóng gói.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano fucoxanthin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Fucoxanthin là một xantophyl, với công thức $C_{42}H_{58}O_6$. Nó được tìm thấy như một sắc tố phụ trong lục lạp của tảo nâu và hầu hết các loại dị hợp tử khác, mang lại cho chúng màu nâu hoặc xanh ô liu. Các nghiên



cứ gần đây đã báo cáo rằng fucoxanthin có nhiều chức năng sinh lý và đặc tính sinh học, hỗ trợ điều trị tiểu đường, chống viêm, ngăn sự phát triển của tế bào ung thư và bảo vệ gan cũng như tác dụng bảo vệ tim mạch và mạch máu não. Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây đã chứng minh tác dụng chống béo phì của fucoxanthin thông qua giảm nồng độ triglycerit trong huyết tương và gan, cholesterol, ức chế tích lũy lipid nội bào trong quá trình biệt hóa tế bào mỡ, giảm nồng độ leptin trong huyết tương liên quan đến việc giảm trọng lượng mô mỡ. *Zhang, Hui, et al 2015, Peng, Juan, et al.2011. Knecht, Lisa 2012.*

Fucoxanthin có hoạt tính cao trong cơ thể, nhưng fucoxanthin có cấu trúc không ổn định, dễ bị ảnh hưởng do tiếp xúc với nhiệt, ánh sáng, oxy, enzym, lipid không bão hòa và các phân tử của chất có khả năng oxy hóa (prooxidant) khác (*Zhang, Hui, et al 2015*); khả năng hòa tan trong nước kém, độ pH không ổn định, nhạy cảm với quá trình oxy hóa và khả dụng sinh học bị suy giảm (*Gupta, Vijai Kumar 2017*); sinh khả dụng thấp ở người (*Asai, Akira 2008*) khi đánh giá nồng độ fucoxanthin trong huyết tương trước và sau chế độ ăn trong 1 tuần giàu epoxyxantophyl cho thấy sự hấp thu kém.

Do đó cải thiện khả năng hấp thu, tăng sinh khả dụng của chất này là rất cần thiết. Áp dụng công nghệ nano là một ứng dụng công nghệ mới để tạo hệ dẫn thuốc và tăng sinh khả dụng của chất. Với kích thước hạt dưới 100nm, sẽ tăng khả năng hấp thu và khả năng lưu giữ. Fucoxanthin được gói trong hệ dẫn thuốc nano, kích thước hạt nhỏ hơn

100nm giúp vận chuyển chất đến đích một cách chọn lọc, hiệu quả và tiết kiệm được chất. Ở nước ta, công nghệ nano trong y sinh học vẫn còn mới, chưa có nhiều ứng dụng nhưng đã thu hút rất nhiều sự quan tâm nghiên cứu. Các nghiên cứu phổ biến nhất hiện nay là về ứng dụng của nano curcumin và các hệ vận chuyển thuốc đến tế bào đích, chưa có nghiên cứu về chế tạo nano fucoxanthin. Sử dụng các hạt nano để mang thuốc và nhả thuốc là hướng mới để điều trị bệnh và ứng dụng các hạt nano trong thực phẩm, thực phẩm chức năng, và mỹ phẩm.

Tác giả Anitha Krishnan Nair và các đồng tác giả trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2011/0229532 A1 đã đề cập quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương của hợp chất thuộc nhóm polyphenol thân dầu bằng cách sử dụng siêu âm với chất hoạt động bề mặt dạng không ion và một dung môi dạng không ion để tăng khả năng hòa tan trong nước. Cụ thể sáng chế này nói về quá trình nano hóa curcumin và các dẫn xuất của curcumin, không áp dụng được cho các chất khác.

Cũng đã biết Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Việt Nam số VN 63896 A (đơn số 1-2019-00609), công bố ngày 25/6/2019 đã bộc lộ quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương chứa canabidiol (CBD) bao gồm các bước:

(i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho CBD hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ là 8:10, 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 hỗn hợp polyetylen glycol (PEG) và nước ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C;

(iii) bổ sung chất mang vào pha phân tán theo tỷ lệ 40:60 ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C;

(iv) nhũ hóa bằng cách bổ sung dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 (ACRYSOL K-140) ở nhiệt độ 100°C vào hỗn hợp thu được ở bước (iii) theo tỷ lệ 40:60, trong môi trường chân không, khi dừng phản ứng thì hạ nhiệt độ từ từ xuống từ 40 đến 60°C; tiến hành nhũ hóa hỗn hợp ở tốc độ khuấy cao trong vòng 30 phút;

(v) lọc sản phẩm bằng cách bơm qua hệ thống lọc nano trước khi chiết rót đóng gói (xem điểm 1 yêu cầu bảo hộ). Kích thước hạt của hệ vi nhũ tương là nằm trong khoảng từ 30 đến 80nm (xem các bảng ở các trang 8, 9).

Tuy nhiên, quy trình đề cập trong VN 63869 A chỉ phù hợp để sản xuất hệ vi nhũ tương chứa canabidiol (CBD) mà không phù hợp để áp dụng cho sản xuất hệ vi nhũ tương chứa fucoxanthin.

Trong tài liệu “Preparation and stability of fucoxanthin-loaded microemulsions”. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 20 (2014) 2103-2110, công bố ngày 03/10/2013 của Jing Dai và đồng tác giả đã bộc lộ quy trình bào chế hệ vi nhũ tương fucoxanthin bao gồm các bước: Dung dịch fucoxanthin trong triglycerit chuỗi trung bình (medium chain triglyceride-MCT) được trộn với MCT, dung dịch thu được được sử dụng làm pha dầu; Tween 80 được trộn với PEG-400 với tỷ lệ khối lượng 4:1 và pha dầu thu được ở trên được bổ sung vào tạo hỗn hợp dầu/chất nhũ hóa; Dung dịch muối đệm phosphat được nhỏ giọt vào pha dầu, hỗn hợp được khuấy sử dụng thanh từ ở 600 vòng/phút (rpm) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng trong điều kiện tối thu được vi nhũ tương nano fucoxanthin (xem trang 2104). Tuy nhiên quy trình bào chế hệ vi nhũ tương fucoxanthin được bộc lộ trong tài liệu này có nhược điểm là kích thước hạt không đạt độ đồng nhất cao, hàm lượng chất fucoxanthin chứa trong hệ thấp chỉ đạt 0.1–0.25%

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN 10667050 A công bố ngày 10/5/2017 bộc lộ quy trình bào chế nano nhũ tương chứa fucoxanthin bao gồm các bước: hòa tan fucoxanthin trong dung môi ở 30-70°C để tạo dầu fucoxanthin, trong đó dung môi là dầu trà, dầu hướng dương, dầu ngô; dầu fucoxanthin được trộn với pha dầu để tạo thành pha dầu thứ nhất; bổ sung chất nhũ hóa vào pha dầu thứ nhất thu được ở bước trên tạo thành pha dầu được trộn thứ hai ở 30-55°C, trong đó chất nhũ hóa gồm một hoặc hai chất được chọn từ lecithin đậu tương, phospholipit lòng đỏ trứng, natri taurocholat, muối mật, tween và este sucroza; bổ sung nước có chứa chất làm bền tan trong nước vào pha dầu được trộn thứ hai, thực hiện đồng hóa bằng cách trộn (xem tóm tắt, yêu cầu bảo hộ). Tuy nhiên quy trình bào chế nano nhũ tương chứa fucoxanthin được bộc lộ trong CN

10667050 A này có nhược điểm là trọng lượng của pha nước chứa chất ổn định hòa tan trong nước chiếm 91-95,8% tổng trọng lượng, trọng lượng pha dầu chiếm từ 4,2-9%, do đó hàm lượng fucoxanthin trong hệ thấp dưới 9%. Hệ nhũ tương nano fucoxanthin này giúp cải thiện độ ổn định của fucoxanthin, như đã nêu trong điểm 9, chất ổn định hòa tan trong nước là 0,0005% ~ 10%, chỉ ổn định khi hàm lượng hoà tan trong nước thấp. Sáng chế chỉ dừng ở bước tạo hệ nhũ chưa tạo được cấu trúc hạt nano.

Trong tài liệu “In vitro and in vivo study of fucoxanthin bioavailability from nanoemulsion-based delivery systems: impact of lipid carrier type”, Journal of functional foods 17 (2015) 293-304, công bố ngày 11/6/2015 của L. Salvia-Trujillo và đồng tác giả đã bộc lộ quy trình bào chế hệ nano nhũ tương chứa fucoxanthin bao gồm các bước: Chuẩn bị pha lipid bằng cách trộn dầu MCT được làm giàu fucoxanthin với dầu mang (bao gồm dầu MCT, LCT hoặc dầu không tiêu hóa được); pha nước bao gồm dung dịch đệm phosphat và chất hoạt động bề mặt Tween 80; trộn pha dầu vào pha nước theo tỷ lệ 30:70 dùng thiết bị trộn cắt tốc độ cao thu được nhũ tương thô; ba loại nhũ tương khác nhau ngay lập tức được cho qua thiết bị vi hóa lỏng 3 lần ở 12.000 psi thu được nano nhũ tương (xem mục 2.2.1 các trang 294, 295). Tuy nhiên quy trình bào chế hệ nano nhũ tương chứa fucoxanthin được bộc lộ trong tài liệu này có nhược điểm là kích thước hạt dao động lớn và lớn hơn 100nm, $202,3 \pm 0,6$, $201,0 \pm 1,4$ và 249 ± 39 nm, công thức tương ứng sử dụng LCT, MCT và dầu. Ngoài ra, sản phẩm tạo thành chưa ổn định, vẫn còn hiện tượng hình thành giọt dầu sau nhũ.

Các quy trình bào chế nano nhũ tương fucoxanthin nói trên tạo ra các hạt tiểu phân có kích thước lớn hơn 100nm hoặc dưới 100nm nhưng hàm lượng chất rất thấp, các hạt không đồng đều kích thước, nên hiệu quả hòa tan trong nước chưa cao. Quy trình tạo các hạt tiểu phân curcumin và CBD không thể áp dụng cho fucoxanthin vì đặc tính hóa học của các chất khác nhau..

Do đó, có nhu cầu về quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương có các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ hơn 100nm, đồng đều, có khả năng hòa tan tốt hơn trong nước và vẫn giữ

được cấu trúc, hoạt tính fucoxanthin trong quá trình nano hóa, đặc biệt là khả năng áp dụng quy trình vào sản xuất số lượng lớn, quy mô công nghiệp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano fucoxanthin cải tiến nhằm khắc phục các nhược điểm của quy trình đã biết nêu trên để 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 fucoxanthin, cụ thể là tăng khả năng hấp thu và tăng sinh khả dụng, đặc biệt là quy trình đã được tối ưu, đơn giản, nguyên liệu dễ tìm và giá thành hợp lý, có khả năng áp dụng quy trình vào sản xuất số lượng lớn, quy mô công nghiệp.

Để đạt được mục đích nêu trên, quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano fucoxanthin theo sáng chế bao gồm các bước:

(i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho fucoxanthin hòa tan trong dung môi ethanol với tỷ lệ fucoxanthin: dung môi ethanol là 8:10 theo khối lượng bằng máy khuấy có 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) dạng lỏng chiếm từ 40 đến 60% khối lượng hỗn hợp PEG và nước 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 hỗn hợp chất mang và 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: gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán thu được ở bước (iii) cho đến khi nhiệt độ đạt 100°C, bổ sung Tween 80 và dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 (PEG-40 hydrogenated castor oil) với tỉ lệ Tween 80: dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 nằm trong khoảng từ 30:71 đến 30:70 theo khối lượng vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu ở bước (iii) với tỷ lệ hỗn hợp Tween 80 và dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40: hỗn hợp chất mang và pha phân tán 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 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 1 đến 2 giờ, kiểm soát chất lượng sản phẩm tạo thành được 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 khoảng thời gian từ 30 đến 60 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) đồng hóa hỗn hợp bằng cách bơm qua hệ thống đồng hóa áp lực cao (high pressure homogenizer) 30Mpa (300 bar);

(vi) 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 fucoxanthin 90% đã biết và nano fucoxanthin thu được bằng quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano fucoxanthin theo sáng chế.

Hình 2 là ảnh phổ đo SEM kích thước hạt nano fucoxanthin thu được bằng quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano fucoxanthin theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano fucoxanthin cải tiến theo sáng chế được thực hiện như sau:

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

tốt fucoxanthin, 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. Việc sử dụng dung môi etanol có gốc hydroxyl (OH-) tạo liên kết với nước, nên có tác dụng ổn định cấu trúc hệ vi nhũ tương trong dầu trong nước. Bằng các thử nghiệm, các tác giả sáng chế xác định được với tỷ lệ fucoxanthin: etanol là 8:10 (theo khối lượng) thì fucoxanthin đạt được độ hòa tan lớn nhất và tránh dư thừa dung môi etanol gây lãng phí. Việc sử dụng khuấy và gia nhiệt để tạo fucoxanthin phân tán tốt hơn, khi tác giả thử nghiệm với nhiều điều kiện khuấy và nhiệt độ khác nhau cho thấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C thì pha phân tán fucoxanthin 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 chiếm từ 40 đến 60% khối lượng hỗn hợp PEG và nước đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C, khuấy đều.

Khi sử dụng fucoxanthin thường bị phá hủy trong đường tiêu hóa, một phần được hấp thu vào máu, còn lại đa số bị đào thải. Vì vậy cần quy trình sản xuất hạt tiểu phân chứa hoạt chất fucoxanthin, với kích thước nhỏ có màng bao sinh học, cấu trúc có độ ổn định, không kết dính và độ hòa tan cao. Bởi vì hệ vi nhũ tương theo sáng chế 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, quy trình sử dụng chất mang PEG (polyetylen glycol) 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 40:60 theo khối lượng, tiếp tục gia nhiệt hỗn hợp chất mang và 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) Bước thứ tư: nhũ hóa bằng cách: gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán thu được ở bước (iii) cho đến khi nhiệt độ đạt 100°C, bổ sung Tween 80 và dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 (PEG-40 hydrogenated castor oil - hay còn gọi là ACRYCOL K-140) với tỉ lệ Tween 80: dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 nằm trong khoảng từ 30:71 đến 30:70 theo khối lượng vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán thu được ở bước (iii) với tỷ lệ hỗn hợp Tween 80 và dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40: hỗn hợp chất mang và pha phân tán 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 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 1 đến 2 giờ, kiểm soát chất lượng sản phẩm tạo thành được 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 trong khoảng 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 toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút.

Bằng các nghiên cứu lý thuyết và thực nghiệm, các tác giả sáng chế nhận thấy rằng để sản xuất nano fucoxanthin 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,...). Vì vậy, các tác giả sáng chế đã lựa chọn chất nhũ hóa là Tween 80 và hay dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 với tỉ lệ 30:70 theo khối lượng, bởi vì Tween 80 và dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 đều là chất thân nước, không có độc tính và độ an toàn cao, tuy nhiên khi sử dụng đơn lẻ hiệu quả sử dụng khi tạo cấu trúc nano chưa cao, thời gian phản ứng lâu, không phù hợp trong sản xuất quy mô công nghiệp. Các tác giả sáng chế đã phải tiến hành rất nhiều thử nghiệm để

xác định được với tỷ lệ Tween 80 và dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 để hình thành các mạch polyme bền vững.

Do chất nhũ hóa Tween 80 và dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 là phân tử có 2 phần riêng biệt, phần thân dầu và phần thân nước, nên có khả năng tạo liên kết với fucoxanthin và hỗn hợp chất mang. Phần thân dầu của Tween 80 và dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 tạo liên kết với fucoxanthin và phần thân nước tạo liên kết với phần thân nước của hỗn hợp chất mang PEG, nên đã tạo ra các hạt tiêu phân nano fucoxanthin và với cấu trúc này bảo vệ tốt hoạt tính fucoxanthin.

Tạo hệ vi nhũ tương nano fucoxanthin bằng cách thực hiện kết hợp khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 600 vòng/phút trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở 100°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ, sau đó tiến hành nhũ hóa toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút. Việc kết hợp Tween 80 và dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 với tỉ lệ 30:70 đã cải thiện hiện quả phản ứng, rút ngắn thời gian phản ứng xuống một nửa, chỉ còn từ 1 đến 2 giờ thay vì từ 3 đến 5 giờ nếu dùng đơn lẻ.

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 tiêu phân tồn tại ổn định do trong môi trường trung tính này liên kết giữa fucoxanthin 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 fucoxanthin sẽ bị phá hủy trong đường tiêu hóa.

Hệ vi nhũ tương nano fucoxanthin thu được bằng quy trình theo sáng chế có HLB (hydrophilic lipophilic balance - là độ cân bằng ưa kị nước có giá trị từ 0 đến 40) nằm trong khoảng từ 13 đến 18 là hệ vi nhũ tương thân nước. Hệ vi nhũ tương này có các hạt tiêu phân chứa fucoxanthin thân nước, không kết dính, kích thước của các hạt ổn định nằm trong khoảng từ 30 đến 90 nm, nên có thể thâm nhập dễ dàng qua màng tế bào để phát huy hiệu quả và tăng độ hòa tan của fucoxanthin trong nước, từ đó làm tăng tính sinh khả dụng của chất.

(v) Bước thứ năm: đồng hóa hỗn hợp bằng cách bơm qua hệ thống đồng hóa áp lực cao (high pressure homogenizer) 30Mpa (300 bar). Đồng hóa huyền phù nhằm làm giảm kích thước các hạt thuộc pha phân tán và phân bố đều chúng trong pha liên tục để hạn chế sự tách pha dưới tác dụng của trọng lực, đảm bảo độ đồng đều, ổn định của dung dịch, tăng tuổi thọ cho sản phẩm.

(vi) Bước thứ sáu: 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.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ: Sản xuất hệ vi nhũ tương nano fucoxanthin

Ví dụ 1: Điều chế 41,7g nano fucoxanthin

Chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho 8g fucoxanthin hòa tan trong 10g dung môi ethanol 96⁰ bằng máy khuấy có tốc độ 400 vòng/phút, kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ 40⁰C 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 (trong quá trình khuấy ethanol bay hơi 10%).

Chuẩn bị chất mang: hỗn hợp gồm 5g PEG và 5g nước được gia nhiệt đến 70⁰C, khuấy đều bằng máy khuấy từ gia nhiệt IKA C-MAG HS 7 công suất 1000 W, thu được 10g chất mang là hỗn hợp PEG và nước.

Bổ sung 10g chất mang vào 15g pha phân tán đã chuẩn bị ở trên, tiếp tục gia nhiệt đến 50⁰C, khuấy với tốc độ 600 vòng/phút bằng máy cô quay chân không IKA RV 10 digital - RV 10 digital. Thu được 25g hỗn hợp chất mang và pha phân tán.

Cân 5g Tween 80 và 11,7g ACRY SOL K-140, sau đó trộn đều thu được 16,7g hỗn hợp. Gia nhiệt 25g hỗn hợp chất mang và pha phân tán thu được cho đến khi nhiệt độ đạt 100⁰C. Bổ sung 16,7g hỗn hợp tween 80 và ACRY SOL K-140 đã chuẩn bị vào 25g hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu được ở trên, tiếp tục khuấy ở tốc độ 700 vòng/phút, trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở 100⁰C trong thời gian trong 2 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 trong thời gian 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 IKA T 25 digital ULTRA- TURRAX công suất 800W.

Tiếp theo, đồng hóa hỗn hợp bằng cách bơm toàn bộ hỗn hợp qua hệ thống đồng hóa áp lực cao ở 30Mpa bằng máy đồng hóa áp lực cao Panda plus công suất tối đa 60Mpa.

Trước khi chiết rót, sản phẩm được bơm qua hệ thống lọc nano máy được nhóm tác giả nghiên cứu tạo ra bằng cách tạo hệ thống bơm áp suất cao tích hợp màng lọc có đường kính 200nm với mục đích loại bỏ lượng fucoxanthin dư không tạo thành hạt tiểu phân, thu được hệ vi nhũ tương nano fucoxanthin phân tán tốt trong nước.

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

Tiến hành đo kích thước hạt nano fucoxanthin bằng phương pháp *tán xạ ánh sáng động* (Dynamic Light Scattering - *DLS*) cho thấy kích thước hạt nằm trong khoảng từ 15 đến 40nm chiếm tỉ lệ 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. Trong DLS, ánh sáng đi qua mẫu, và ánh sáng tán xạ được phát hiện và ghi nhận ở một góc độ nhất định.

Điện thế zeta hay điện thế động: điện thế giữa pha phân tán và môi trường phân tán.

Kích thước (nm, theo TEM)	Kích thước (nm, theo DLS)	Thế zeta (mV)	Độ ổn định (tháng)	Tính tan trong nước
30-90	30-90	-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 PEG với đầu thau đầu hydro hóa PEG-40 (ACRYSOL K-140), thu được hệ vi nhũ tương tương có các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ từ 30 đến 90nm, có 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 fucoxanthin 90% đã biết và nano fucoxanthin thu được bằng quy trình theo sáng chế, trong đó bình A thể hiện fucoxanthin 90% phân tán trong nước đã biết, bình B thể hiện nano fucoxanthin phân tán trong nước thu được bằng quy trình theo sáng chế. Hình 1 cho thấy fucoxanthin 90% đã biết không tan trong nước, tạo hạt lơ lửng trong nước, dung dịch đục, để thêm một thời gian đóng lại dưới đáy bình (bình A); nano fucoxanthin thu được bằng quy trình theo sáng chế phân tán hoàn toàn trong nước tạo dung dịch trong suốt, đồng nhất (bình B).

Theo Hình 2, là kết quả ảnh phổ đo SEM kích thước hạt nano fucoxanthin thu được bằng quy trình sáng chế, ta thấy các hạt có sự đồng đều về kích thước, dao động trong khoảng 30 đến 90nm.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình sản xuất nano fucoxanthin cải tiến theo sáng chế đã thành công trong việc sản xuất hệ vi nhũ tương tương có các hạt tiểu phân nano fucoxanthin có kích thước nhỏ từ 30 đến 90nm, đồng đều và khả năng hòa tan tốt trong nước mà vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính fucoxanthin trong quá trình nano hóa.

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

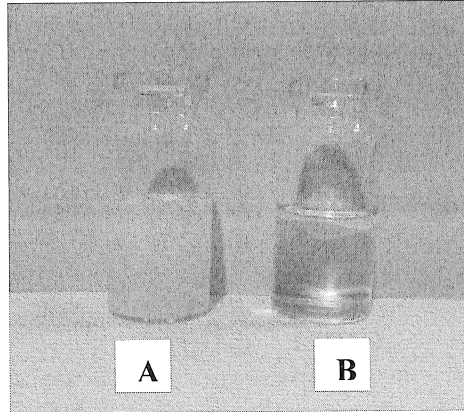
Quy trình theo sáng chế đơn giản, dễ thực hiện và phù hợp với các điều kiện thực tế hiện nay của nước ta.

Yêu cầu bảo hộ

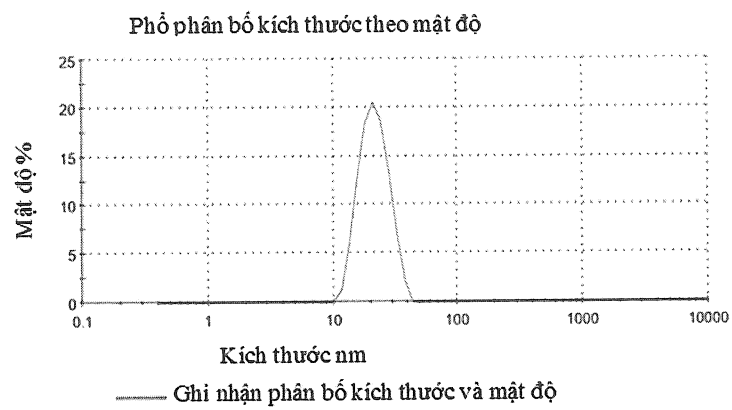
1. Quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano fucoxanthin bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho fucoxanthin hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ fucoxanthin: dung môi etanol là 8:10 theo khối lượng bằng máy khuấy có 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 PEG (polyetylen glycol) dạng lỏng chiếm từ 40 đến 60% khối lượng hỗn hợp PEG và nước 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 hỗn hợp chất mang và 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: gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán thu được ở bước (iii) cho đến khi nhiệt độ đạt 100°C, bổ sung Tween 80 và dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 với tỉ lệ Tween 80: dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 nằm trong khoảng từ 30:71 đến 30:70 theo khối lượng vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán thu được ở bước (iii) với tỷ lệ hỗn hợp Tween 80 và dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40: hỗn hợp chất mang và pha phân tán 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 100°C, trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở 100°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ, kiểm soát chất lượng sản phẩm tạo thành được 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 khoảng thời gian từ 30 đến 60 phút cho đến khi nhiệt độ còn nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C; tiến hành nhũ toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút;
- (v) đồng hóa hỗn hợp bằng cách bơm qua hệ thống đồng hóa áp lực cao ở 30Mpa;

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



Hình 1



Hình 2