



(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)



1-0036061

(51)^{2020.01} A61K 9/00

(13) B

(21) 1-2020-03131

(22) 02/06/2020

(45) 26/06/2023 423

(43) 25/08/2020 389ASC

(73) Công ty Cổ phần Công nghệ mới Nhật Hải (VN)

Số 9 BT2 Bán đảo Linh Đàm, phường Hoàng Liệt, quận Hoàng Mai, thành phố Hà Nội

(72) Lưu Hải Minh (VN); Bùi Quốc Anh (VN).

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

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano piperin, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị pha dầu; b) chuẩn bị hỗn hợp chất hoạt động bề mặt; c) tạo hỗn hợp tiền nhũ tương; và d) đồng hóa hỗn hợp nhũ tương thu hệ vi nhũ tương.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano piperin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Piperin (“Piperine”) là hợp chất hoạt tính sinh học chính trong hạt tiêu đen đang thu hút sự quan tâm nghiên cứu từ nhiều nhà khoa học. Các nghiên cứu về tác dụng dược lý đã chỉ ra tiềm năng chống oxy hóa, chống viêm, chống ung thư, chống trầm cảm, giảm đau... của piperin.

Chonpathompikunlert cùng các cộng sự và một số nhà nghiên cứu khác đã công bố tác dụng của piperin đối với các bệnh liên quan đến thần kinh như chống trầm cảm, động kinh và ngăn ngừa thoái hóa thần kinh. Tác dụng tiềm năng của piperin trong kiểm soát động kinh đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu trên động vật và một báo cáo lâm sàng, cho thấy piperin có thể làm giảm tần số động kinh ở bệnh nhân động kinh.

Nghiên cứu của Lee và cộng sự đã chứng minh rằng piperin kết hợp với axit gamma-aminobutyric (GABA) đã kích hoạt sự hình thành các hợp chất trung gian p38 và JNK MAPK, làm tăng biểu hiện EPO và EPO-R, dẫn đến điều hòa các tế bào miễn dịch IL-10 và NF-B. Một nghiên cứu về bệnh hen suyễn do ovalbumin gây ra, việc sử dụng piperin đã làm giảm sự tăng cường bạch cầu ái toan và giảm kích ứng đường thở bằng cách ức chế hoạt động của tế bào T và sản xuất cytokin Th2.

Brahman Nikol và các cộng sự báo cáo rằng piperin sẽ ức chế trọng lượng cơ thể, và cải thiện độ nhạy insulin và leptin, từ đó có thể ngăn ngừa béo phì. Trong nghiên cứu của hai mươi dẫn xuất piperin có chứa gốc benzothiazol, chín chất tương tự piperin thể hiện hoạt động chống tiểu đường cao hơn, so với tiêu chuẩn, rosiglitazon. Piperin thể hiện hoạt động chống tăng đường huyết ở chuột mắc bệnh tiểu đường do alloxan sau 14 ngày uống với liều 20 mg/kg.

Piperin ức chế viêm đường hô hấp bằng cách tăng cường biểu hiện gen TGF-beta ở phổi. Piperin còn có khả năng làm giảm sản xuất IL-6, MMP-13 và prostaglandin E ở

khoảng nồng độ 10-100 μ g/ml. Piperin khi được sử dụng cùng với curcumin (từ *Curcuma longa*) sẽ góp phần ngăn chặn tình trạng viêm nhiễm do chế độ ăn nhiều chất béo ở chuột C57BL/6 và ngăn ngừa hội chứng chuyển hóa. Piperin còn có tiềm năng chống viêm trên chuột bị viêm loét đại tràng do axit axetic gây ra. Một nghiên cứu khác đã chỉ ra khi cho chuột uống piperin với liều 6 mg/kg/ngày sẽ làm giảm tình trạng viêm trên mô hình gây viêm bởi carrageenan.

Nghiên cứu *in vitro* trên các tế bào ung thư khác nhau cho thấy piperin có tác dụng gây độc tế bào (chọn lọc đối với các tế bào khối u) chống lại một số loại ung thư, bao gồm vú, phổi, tuyến tiền liệt, cổ tử cung và một số loại ung thư khác. Khi dùng đường uống, piperin đã làm giảm tỷ lệ mắc một số dạng ung thư đường tiêu hóa. Dịch chiết cùi của hạt tiêu đen (có chứa piperin) đã được báo cáo có hiệu quả chống ung thư phổi thông qua việc thay đổi sự peroxy hóa lipid, dẫn đến sự lan rộng của các phản ứng gốc tự do và tổn thương tế bào. Ngoài ra, piperin có thể thu hẹp chu kỳ tế bào ở pha G1/S, ức chế tế bào nội mô tĩnh mạch rốn của người (HUVEC) tăng sinh và di căn.

Qua các tài liệu đã công bố có thể thấy piperin là một hợp chất có hoạt tính sinh học với phổ hoạt tính rộng. Tuy nhiên, các ứng dụng trong y sinh của nó vẫn còn hạn chế do tính sinh khả dụng kém và độ hòa tan trong nước thấp. Do đó, cần cải thiện khả năng hòa tan của piperin trong các chế phẩm để tăng tính sinh khả dụng của hợp chất này. Tianjing Ren và các cộng sự đã nghiên cứu chế phẩm piperin dạng nano được bao trong polyme polymetacrylat bằng phương pháp bay hơi dung môi. Kết quả công bố trên bài "*Piperin-loaded nanoparticles with enhanced dissolution and oral bioavailability for epilepsy control*" cho thấy sản phẩm tạo thành có kích thước trong khoảng từ 130 nm. Nghiên cứu đã cải thiện tính hòa tan của piperin nhưng kích thước các hạt nano còn khá to nên sẽ ảnh hưởng đến sự phân bố của chế phẩm trong hệ tuần hoàn.

Một phương pháp khác để tăng độ hòa tan của piperin được Ashour và các cộng sự đã sử dụng là phương pháp phân tán trong chất rắn bằng công nghệ ép đùn nóng chảy. với tỷ lệ 10% (w/w) piperin trong Soluplus®. Sự phân tán rắn này đã cải thiện khả năng hòa tan trong dung dịch nước của piperin hơn 160 lần và tăng sự phân tán hấp thụ gấp

112 lần so với piperin nguyên chất. Kết quả này đã được công bố trên bài “*Hot melt extrusion as an approach to improve solubility, permeability and oral absorption of a psychoactive natural product, piperin*”. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi kỹ thuật phức tạp và thiết bị đắt tiền.

Boddupalli và các cộng sự đã điều chế chế phẩm piperin dạng nhũ tương bằng phương pháp bay hơi dung môi. Kết quả công bố trên bài “*In-vitro and in-vivo evaluation of hepato protection and anti ulceractivities of piperin gastro retentive micropospheres*” cho thấy các hạt nhũ tương piperin có kích thước trung bình từ 114,5 đến 354,4 μm , hiệu suất của chế phẩm đạt 76-79%. Phương pháp này đã tăng hiệu quả hòa tan của piperin, tuy nhiên kích thước hạt nhũ tương còn khá to, nên quá trình chuyển hóa piperin trong hệ tiêu hóa sẽ bị hạn chế.

Từ tài liệu tổng hợp được có thể thấy có rất nhiều phương pháp chuyển hóa piperin thành các hạt nano làm tăng khả năng hòa tan và hấp thụ qua đường tiêu hóa. Tuy nhiên, như đã nêu trên các hạt nano piperin tổng hợp được vẫn có kích thước khá to, với kích thước này khả năng vận chuyển và phân bố trong hệ tuần hoàn cơ thể sẽ bị hạn chế. Do đó, sáng chế này sẽ đề cập đến quy trình tạo piperin dạng các tiểu phân nano có kích thước nhỏ hơn (dưới 50 nm). Quy trình được sử dụng trong sáng chế là tạo hệ vi nhũ tương piperin. Vi nhũ tương là một hệ phân tán có kích thước hạt từ 10 nm – 100 nm, có độ trong suốt cao, bền nhiệt động học, phân tán tốt trong nước và dầu, đồng thời giữ được hoạt tính của chất phân tán trong thời gian khá dài. Với những ưu điểm trên, phương pháp điều chế hệ vi nhũ tương hiện đang được ứng dụng trong công nghệ thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

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

- a) chuẩn bị pha dầu bằng cách cho piperin hòa tan trong etyl oleat;

b) chuẩn bị hỗn hợp chất nhũ hóa span 80, tween 80, Solutol HS 15 theo tỷ lệ xác định;

c) tạo hỗn hợp tiền nhũ tương bằng cách trộn hỗn hợp thu được ở bước a) với hỗn hợp thu được ở bước b) theo tỷ lệ xác định;

d) tạo hệ vi nhũ tương bằng cách đồng hóa hỗn hợp thu được ở bước c) trong thiết bị đồng hóa ở điều kiện áp suất nhiệt độ thích hợp thu được hệ vi nhũ tương nano piperin.

Mô tả văn tắt hình vẽ.

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

Mô tả chi tiết sáng chế

Quy trình chi tiết sáng chế được mô tả như sau:

a) chuẩn bị pha dầu bằng cách cho piperin hòa tan trong etyl oleat theo tỷ lệ là 3:10 (mg/g) bằng máy khuấy có gia nhiệt trong khoảng 70°C với tốc độ 600 vòng/phút trong 2 giờ cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, thu được pha dầu.

Mục đích ban đầu là tạo ra các hạt piperin với kích thước nano và ổn định trong hệ, sáng chế này đã sử dụng etyl oleat để hòa tan piperin. Trong dược phẩm, etyl oleat thường được sử dụng làm dung môi cho các chế phẩm liên quan đến các chất lipophilic. Tính ổn định oxy hóa của nó giúp kéo dài thời hạn sử dụng của các hợp chất. Bằng nhiều thí nghiệm, sáng chế đã xác định được tỉ lệ hòa tan của piperin trong etyl oleat là 1:50 (mg/g) là tỉ lệ hòa tan thích hợp.

b) chuẩn bị hỗn hợp chất hoạt động bề mặt bằng cách trộn span 80, tween 80 và Solutol HS 15 theo tỷ lệ 2:3:1 (g/g/g) được phân tán đều trên máy khuấy trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ phòng với tốc độ 700 vòng/phút.

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. Span 80 và tween 80 là hai chất hoạt động bề mặt đã

được ứng dụng nhiều trong ngành thực phẩm và dược phẩm. Theo khuyến cáo của WHO, đây là hai chất an toàn với liều dùng là 25 mg/kg trọng lượng cơ thể.

Solutol HS 15 là este polyoxyetylen của axit 12-hydroxystearic (polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid), là chất hoạt động bề mặt không ion đã được sử dụng làm chất hòa tan trong các công thức tiêm và uống trong nhiều thập kỷ. Solutol HS 15 có những tính chất ưu việt hơn các chất hoạt động bề mặt khác là bởi nó tự lắp ráp thành các cấu trúc mixen với số lượng lớn các phân tử và có kích thước dao động trong khoảng 10 - 15nm. Nó cho phép nạp một loại thuốc kỵ nước hiệu quả vào bên trong và tạo ra một hệ thống ổn định nhiệt độ cao, là điều kiện tiên quyết để lưu thông hệ bền hơn, hấp thụ nhanh hơn và tăng cường khả dụng sinh học.

Bằng nhiều thực nghiệm, các tác giả đã tìm ra tỉ lệ span 80, tween 80 và Solutol HS 15 là 2:3:1 (g/g/g) là tỉ lệ tối ưu cho hệ được ổn định nhất.

c) tạo hỗn hợp tiền nhũ tương bằng cách nhỏ từ từ hỗn hợp thu được ở bước a) vào hỗn hợp thu được ở bước b) với tỷ lệ 3:5 trong thiết bị tạo nhũ trong 6 giờ ở nhiệt độ phòng, tốc độ khuấy của thiết bị 400 vòng/phút. Sau đó tăng tốc độ khuấy lên 800 vòng/phút và tăng nhiệt độ lên 70°C trong 4 giờ.

Giá trị cụ thể của tỉ lệ các chất trong hỗn hợp và các điều kiện như tốc độ khuấy, nhiệt độ, thời gian là kết quả của các quá trình thử nghiệm thực tế nhằm tối ưu hóa quy trình này.

d) hỗn hợp thu được ở bước c) được để qua đêm và sau đó được đồng hóa trong thiết bị đồng hóa với áp suất 80 MPa, lặp lại 3 chu kỳ thu được hệ vi nhũ tương nano piperin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế hệ vi nhũ tương nano piperin

a) chuẩn bị pha dầu bằng cách cho 15 mg piperin hòa tan trong 50 g etyl oleat bằng máy khuấy có gia nhiệt trong khoảng 70°C với tốc độ 600 vòng/phút trong 2 giờ cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, thu được pha dầu;

b) chuẩn bị hỗn hợp chất hoạt động bề mặt bằng cách trộn 30 g span 80, 45 g tween 80 và 15 g Solutol HS 15 được phân tán đều trên máy khuấy trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ phòng với tốc độ 700 vòng/phút;

c) tạo hỗn hợp tiền nhũ tương bằng cách nhỏ từ từ 45 g hỗn hợp thu được ở bước a) vào 75 g hỗn hợp thu được ở bước b) trong thiết bị tạo nhũ trong 6 giờ ở nhiệt độ phòng, tốc độ khuấy của thiết bị 400 vòng/phút. Sau đó tăng tốc độ khuấy lên 800 vòng/phút và tăng nhiệt độ lên 70°C trong 4 giờ; và

d) hỗn hợp thu được ở bước c được để qua đêm và sau đó được đồng hóa trong thiết bị với áp suất 80 MPa, lặp lại 3 chu kỳ thu được hệ vi nhũ tương nano piperin.

1. Kết quả phân tích hàm lượng

Hàm lượng của piperin trong mẫu được đo bằng HPLC. Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng piperin trong mẫu phân tích đạt 9,67 g/100g.

2. Kết quả đo HR-TEM

Dung dịch piperin phân tán tốt trong nước, có chứa các hạt piperin hình cầu có đường kính khoảng 3-5 nm.

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

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

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
10.1	Tổng vi sinh vật hiếu khí	CFU/mL	ISO 4833-1:2013	KPH (LOD: 1 CFI/mL)
10.2	<i>Cl. Perfringens</i>	CFU/mL	TCVN 4994:2005	KPH (LOD: 1 CFI/mL)
10.3	<i>Coliforms</i>	CFU/mL	TCVN 6848:2007	KPH (LOD: 1 CFI/mL)

10.4	<i>E. coli</i>	CFU/mL	TCVN 7924-2:2008	KPH (LOD: 1 CFI/mL)
10.5	Tổng số bào tử nấm men-mốc	CFU/g	TCVN 8275-1:2010	KPH (LOD: 1 CFI/mL)
10.6	pH	-	H.HD.QT.070	8,64
10.7	Hàm lượng Chì	mg/kg	H.HD.QT.429	<0,025
10.8	Hàm lượng Cadimi	mg/kg	H.HD.QT.429	KPH (LOD: 0,004 mg/kg)
10.9	Tỷ trọng	g/mL	NIFC.05.M.197	1,056

KPH: không phát hiện

LOD: giới hạn phát hiện

Yêu cầu bảo hộ

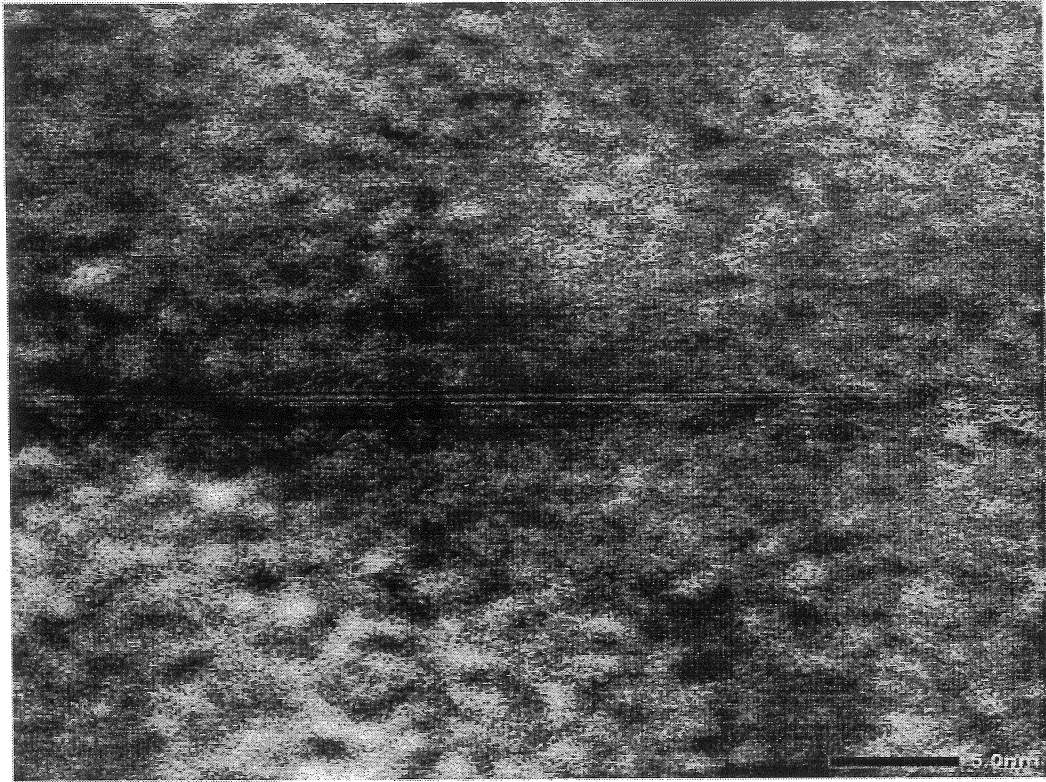
1. Quy trình điều chế hệ vi nhũ tương piperin bao gồm các bước:

a) chuẩn bị pha dầu bằng cách cho piperin hòa tan trong etyl oleat theo tỷ lệ là 3:10 (mg/g) bằng máy khuấy có gia nhiệt trong khoảng 70°C với tốc độ 600 vòng/phút trong 2 giờ cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, thu được pha dầu;

b) chuẩn bị hỗn hợp chất hoạt động bề mặt bằng cách trộn span 80, tween 80 và este polyoxyetylen của axit 12-hydroxystearic (Solutol HS 15) theo tỷ lệ 2:3:1 (g/g/g) được phân tán đều trên máy khuấy trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ phòng với tốc độ 700 vòng/phút;

c) tạo hỗn hợp tiền nhũ tương bằng cách nhỏ từ từ hỗn hợp thu được ở bước a) vào hỗn hợp thu được ở bước b) với tỷ lệ 3:5 trong thiết bị tạo nhũ trong 6 giờ ở nhiệt độ phòng, tốc độ khuấy của thiết bị 400 vòng/phút, sau đó tăng tốc độ khuấy lên 800 vòng/phút và tăng nhiệt độ lên 70°C trong 4 giờ; và

d) hỗn hợp thu được ở bước c) được để qua đêm và sau đó được đồng hóa trong thiết bị đồng hóa với áp suất 80 MPa, lặp lại 3 chu kỳ thu được hệ vi nhũ tương nano piperin.



Hình 1