



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

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

(11)



2-0003220

(51) **A61K 31/12; A61K 47/44; A61K 47/14**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00436

(22) 21/11/2018

(67) 1-2018-05195

(45) 25/07/2023 424

(43) 30/01/2020 382A

(73) Viện Vật lý - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 10 Đào Tấn, phường Cống Vị, quận Ba Đình, Hà Nội

(72) Nguyễn Thanh Bình (VN); Nguyễn Trọng Tĩnh (VN); Nguyễn Thị Mai Hương (VN);
Lê Thị Thu Hương (VN); Đoàn Xuân Thanh (VN).

(54) **QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ DUNG DỊCH NANO CHỨA CURCUMIN VÀ PIPERIN**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế dung dịch nano chứa curcumin và piperin nhằm gia tăng sinh khả dụng của curcumin, đặc biệt là gia tăng khả năng ức chế chuyển hóa nhanh curcumin bởi các enzym. Cụ thể hơn, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế dung dịch nano nhưng không sử dụng các dung môi hữu cơ phân tử lượng thấp độc hại làm môi trường phân tán, mà sử dụng năng lượng phân tán siêu âm công suất cao với đầu phát siêu âm có biên độ dao động lớn nằm trong khoảng từ 20 đến 100 micromet, kết hợp với các chất ổn định là các chất hoạt động bề mặt, chất nhũ hóa và các polyme dạng lỏng ưu tiên được chọn từ nhóm các chất được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ nano y sinh, cụ thể là đề cập đến quy trình điều chế dung dịch tổ hợp chứa đồng thời các hạt nano của piperin và curcuminoid như curcumin, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin nhằm gia tăng sinh khả dụng của curcuminoid. Cụ thể giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế dung dịch nano bằng cách kết hợp sử dụng năng lượng phân tán siêu âm và các chất ổn định là các chất hoạt động bề mặt và các polyme dạng lỏng. Ngoài ra giải pháp hữu ích đề cập đến tác dụng ức chế và tiêu diệt tế bào ung thư của sản phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Từ hàng ngàn năm nay, củ nghệ không những được sử dụng làm gia vị thức ăn, mà nó còn là một dược phẩm dân gian truyền thống chữa nhiều loại bệnh, không tác dụng phụ. Đến năm 1815 lần đầu tiên các nhà khoa học đã chiết tách riêng được một hợp chất có màu vàng từ củ nghệ gọi là curcumin, sau đó đến năm 1910 cấu trúc hóa học của hợp chất curcuminoid đã được sáng tỏ, gồm curcumin, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin (gọi chung là curcumin). Curcumin cũng được tìm thấy trong một số loài cây khác thuộc chi *Curcuma*, tuy nhiên curcumin có nhiều nhất trong cây và củ nghệ (*Curcuma longa*) chiếm từ 3-8%. Với các nghiên cứu trong hơn nửa thế kỷ nay, người ta đã biết rõ curcumin chính là thành phần tạo nên dược tính của củ nghệ. Curcumin là hợp chất loại polyphenol có hoạt tính kháng viêm, có khả năng chống oxy hóa mạnh giúp ức chế các chất trung gian gây viêm và tác nhân tiền viêm bao gồm cả các enzym Lipoxygenaza và Cyclooxygenaza-2 (Cox-2). Tới nay, đã có rất nhiều thử nghiệm lâm sàng trên người nghiên cứu về hiệu quả của curcumin trong việc phòng ngừa và hỗ trợ điều trị hầu hết các bệnh mạn tính như: viêm loét dạ dày, tá tràng, bệnh gan mật, bệnh tiểu đường, bệnh viêm khớp, bệnh tim mạch, phòng ngừa điều trị ung bướu, bệnh sa sút trí tuệ (Alzheimer), làm đẹp da và phục hồi sức khỏe cho phụ nữ sau sinh, và

cả khả năng ức chế tiêu diệt tế bào ung thư. Một đặc điểm đáng thú vị nữa của curcumin, một chế phẩm từ tự nhiên chiết xuất từ củ nghệ, đã được minh chứng qua thực tế sử dụng hàng ngày cũng như qua nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy nó không có tác dụng phụ, không gây độc đối với các tế bào lành.

Tuy nhiên, do cấu trúc hóa học của curcumin làm cho các lực liên kết nội phân tử của chúng khá lớn, nên chúng khó bị tách ra khỏi nhau dưới tác dụng của các phân tử nước. Curcumin là loại polyphenol kỵ nước (lipophilic), nó rất khó phân tán và khó tan trong nước, độ tan tối đa cỡ 0,001%, nên khi thử nghiệm lâm sàng trên cơ thể người cho sinh khả dụng rất thấp. Ngoài ra, khi các phân tử curcumin được đưa vào trong cơ thể chúng sẽ bị mất hoạt tính nhanh chóng, như do kết hợp với axit đường (Glucuronic axit), do quá trình sulphat hóa dưới tác dụng của một số enzym, đồng thời chúng rất nhanh chóng bị chuyển hóa sang các dạng phân tử khác và thải trừ khỏi cơ thể. Một số nghiên cứu sử dụng curcumin dưới dạng sản phẩm bột uống thông thường đã cho thấy dưới tác dụng gây bất hoạt bởi microsome enzym làm cho hàm lượng curcumin xuất hiện trong huyết tương là rất nhỏ không đáng kể, ngay cả khi sử dụng liều lượng lớn cỡ 12 gam cho 1 người. Chính vì vậy sử dụng theo cách thông thường, lượng curcumin được hấp thu vào máu và huyết tương rất thấp, điều này đồng nghĩa với hàm lượng curcumin có thể đến được đích tại các mô tế bào của cơ quan nội tạng trong cơ thể là rất ít.

Các nghiên cứu về curcumin đã cho thấy tác dụng chữa bệnh của chúng bị hạn chế bởi sinh khả dụng thấp do 2 nguyên nhân chính là bị chuyển hóa nhanh trong hệ tiêu hóa, dạ dày, ruột... và khả năng hòa tan trong nước thấp. Chính do các nhược điểm này nên việc sử dụng curcumin như một dược phẩm trong điều trị một số bệnh liên quan đến nội tạng cơ thể là rất hạn chế. Cho đến hiện nay, curcumin phần lớn được dùng để điều trị một số bệnh do nhiễm khuẩn, viêm loét... ở các mô, tế bào xuất hiện tại các bề mặt hở bên ngoài như: ngoài da, bề mặt các niêm mạc dạ dày, đại tràng, ruột...

Trong các nghiên cứu nhằm khắc phục hạn nhược điểm của curcumin do bị chuyển hóa nhanh trong hệ tiêu hóa nói trên, một số tác giả đã thấy rằng việc uống đồng thời curcumin và piperin đã làm tăng sinh khả dụng của curcumin theo

đường uống lên 2000% so với việc sử dụng curcumin riêng lẻ (Shoba G và cộng sự, *Planta Medica* 64 (1998) 353 – 356). Ở đây piperin, một hợp chất alkaloit chiết xuất từ hạt tiêu đen (*Piper nigrum*), đã được biết đến với vai trò chất ức chế quá trình glucuronic hóa tại gan và ruột. Như vậy sử dụng theo đường uống, với sự phối hợp của curcumin và piperin sẽ làm tăng khả năng đưa curcumin đến các cơ quan nội tạng của cơ thể, điều này là đặc biệt quan trọng khi sử dụng curcumin như là một hoạt chất ức chế sự phát triển của tế bào ung thư trong cơ thể.

Về phương diện khác, để làm tăng khả năng hòa tan trong nước của curcumin người ta có thể điều chế bằng cách biến tính, đính các nhóm thế trên nhóm chức phenyl của phân tử curcumin để tạo ra các dẫn xuất có khả năng hòa tan tốt hơn. Tuy nhiên các phương pháp hóa học này sẽ không đảm bảo có thể giữ được hoạt tính sinh học quý báu ban đầu vốn có của curcumin.

Một cách khác, để làm tăng khả năng phân tán trong nước và tăng độ hấp thu curcumin của cơ thể, bằng phương pháp vật lý người ta cũng có thể tạo ra các tiểu phân curcumin ổn định, có kích thước ở vùng nanomet sao cho kích thước của chúng là đủ nhỏ hơn khe hở các màng sinh học tế bào (cỡ 200-300 nm), nhờ đó curcumin có thể thâm thấu được qua màng tế bào.

Nói chung, phương pháp nano hóa bằng kỹ thuật vật lý nhằm đưa kích thước tiểu phân curcumin về vùng nanomet có ưu điểm so với phương pháp biến đổi hóa học là hầu như không làm thay đổi cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của phân tử curcumin. Để tạo ra hệ nano curcumin ổn định, trong quá trình nano hóa thường bao gồm 2 bước chính: Bước 1 là quá trình phá vỡ các khối kết tập curcumin để tạo thành các tiểu phân nhỏ ở kích thước nanomet, đồng đều; bước tiếp theo là quá trình bọc và cách ly các tiểu phân này một cách ổn định không cho chúng kết tập lại với nhau thành các hạt lớn hơn. Các lớp vỏ bọc nano thường là các chất hoạt động bề mặt, chất nhũ hóa, polyme...thân nước, có khả năng thấm ướt và cho phép phân tán tốt các tiểu phân nano curcumin trong nước.

Để điều chế được các hệ nano curcumin có hàm lượng cao từ 10 đến 20%, trong quá trình phân tán bột curcumin chiết xuất thành dạng dung dịch ở cấp độ nanomet, người ta thường phải sử dụng các dung môi hữu cơ phân tử lượng thấp

có khả năng hòa tan tốt curcumin như: Etanol, Dimetin Sulfoxit (DMSO), Axeton, Etylen Glycol, Propylen Glycol... Bước tiếp theo, để ngăn cản quá trình kết tập lại của các tiểu phân nano curcumin người ta thường bổ sung các chất tạo vỏ bọc là chất hoạt động bề mặt, chất nhũ hóa, polyme... Tuy nhiên, do các dung môi hữu cơ phân tử lượng thấp sử dụng trong quá trình hòa tan, phân tán nano nói trên thường có độc tính cao và tồn dư lại trong sản phẩm cuối cùng, nên chúng thường phải được loại bỏ bằng phương pháp chưng cất, sấy đông khô, phun sấy. Nhược điểm của các phương pháp có sử dụng dung môi hữu cơ này là tiêu tốn lượng dung môi lớn, cần thêm các thiết bị phụ trợ đắt tiền, tiêu tốn thêm nhiều năng lượng để loại dung môi hữu cơ, nhiều công đoạn, thời gian dài giảm năng suất, ngoài ra độ tinh khiết của sản phẩm còn bị giảm đi do khó loại bỏ hoàn toàn dung môi hữu cơ và các tạp chất ban đầu kèm theo các dung môi này.

Theo một phương pháp khác, để có được các sản phẩm nano curcumin cuối cùng dưới dạng bột hoặc viên ép, trước hết người ta phải điều chế nano curcumin ở dạng bột rắn. Quy trình điều chế thường bắt đầu bằng quá trình phân tán bột chiết xuất curcumin thành dạng dung dịch ở cấp độ nanomet, người ta thường phải sử dụng các dung môi hữu cơ phân tử lượng thấp có độ hòa tan curcumin tốt như: Etanol, Dimetin Sulfoxit (DMSO), Axeton, Etylen Glycol, Propylen Glycol... Bước tiếp theo, để ngăn cản quá trình kết tập lại của các tiểu phân nano curcumin người ta thường bổ sung các chất tạo vỏ bọc các chất hoạt động bề mặt, chất nhũ hóa, polyme... Để thu được sản phẩm nano curcumin ở dạng bột rắn thì các chất tạo vỏ bọc này phải là chất rắn, ví dụ như các polyme có phân tử lượng cao như dextrin, PEG. Quá trình phân tán curcumin sử dụng các chất bọc rắn cũng bắt buộc phải sử dụng dung môi hữu cơ loại này. Vì vậy phương pháp này cũng có các nhược điểm đã nêu trên. Ngoài ra quy trình điều chế nano curcumin dạng bột phải tiến hành theo trình tự luân phiên chuyển đổi từ pha rắn của nguyên liệu đầu sang pha lỏng trong quá trình phân tán nano, tiếp đến là quá trình bay hơi dung môi cô đặc chuyển từ pha lỏng sang pha rắn (bột). Trong quá trình sử dụng sản phẩm loại này, để có thể hấp thụ vào cơ thể, sản phẩm nano curcumin dạng bột, cần được pha hoặc uống với nước để một lần nữa chuyển từ pha rắn trở lại pha lỏng dưới dạng

các tiểu phân nano trong dung dịch. Vì vậy, các tiểu phân nano này thường có kích thước lớn do quá trình chuyển đổi pha lỏng – rắn và rắn – lỏng là không thuận nghịch 100%, điều này có nghĩa là trong quá trình sử dụng, kích thước tiểu phân phá vào dung dịch nước từ sản phẩm bột sẽ không còn nhỏ như kích thước ban đầu của chúng sau khi điều chế, do vậy sinh khả dụng của sản phẩm dạng bột sẽ bị giảm đi. Bên cạnh đó, việc điều chế nano curcumin dạng bột có giá thành sản phẩm cao do quy trình phức tạp và thường bắt buộc phải có công đoạn loại bỏ dung môi.

Đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số US 2012/0003177 A1 đề cập đến quy trình điều chế các dẫn xuất curcumin được mang bởi các polyme tạo ra các cấu trúc nano làm gia tăng khả năng hòa tan của curcumin trong nước.

Đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số US 2015/0104503 A1 đề cập đến phương pháp điều chế dạng phức của curcumin với phospholipit nhằm mục đích tăng sinh khả dụng của curcumin.

Patent Mỹ số US 9.474.727 B2 đề cập đến sản phẩm dung dịch curcumin lỏng sử dụng làm dược phẩm chữa bệnh, với hàm lượng curcumin là từ 2 đến 20% trọng lượng môi trường phân tán là các dầu thực vật, chất hoạt động bề mặt, các dung môi hữu cơ, polyme PEG.

Đơn yêu cầu cấp Patent châu Âu số EP 2 228 062 A1 đề cập đến chế phẩm dùng làm thuốc chữa bệnh có chứa đồng thời curcumin và piperin với mục đích gia tăng sinh khả dụng và tăng nồng độ curcumin được hấp thu vào huyết tương nhờ ức chế quá trình chuyển hóa nhanh của curcumin khi có mặt piperin.

Patent châu Âu số EP 3 142 702 B1 đề cập đến phương pháp phun phủ điện tử để tạo các hạt nano cấu trúc lớp kép chứa đồng thời curcuminoit và piperin.

Các quy trình điều chế nano curcumin có kích thước tiểu phân nhỏ hơn 50 micromet hoặc có hàm lượng curcumin lớn hơn 10% theo trọng lượng thường phải sử dụng các dung môi hữu cơ độc hại làm môi trường phân tán. Ngoài ra, việc ức chế chuyển hóa gây mất hoạt tính của curcumin nhờ sự có mặt của piperin đạt hiệu quả cao hơn với hàm lượng piperin thấp hơn khi chúng có mặt đồng thời trong các tiểu phân có kích thước nano càng nhỏ và luôn đi song hành với nhau.

Do đó, cần có một quy trình điều chế dạng dung dịch nano chứa cả piperin và curcuminoit (ví dụ curcumin, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin) có kích thước các tiểu phân nano đủ nhỏ, bền vững theo thời gian, có khả năng phân tán tốt hơn trong nước, đồng thời các phân tử curcuminoit không bị thay đổi và suy giảm hoạt tính bởi tác động hóa học trong quá trình điều chế. Hơn nữa, cần có quy trình điều chế không dùng các dung môi hữu cơ phân tử lượng thấp độc hại làm môi trường phân tán nano để tránh nguy cơ gây ra tác dụng phụ cho người sử dụng.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Nhằm khắc phục tất cả các vấn đề nêu trên, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế dung dịch nano chứa đồng thời curcumin và piperin. Quy trình điều chế không sử dụng các dung môi hữu cơ phân tử lượng thấp độc hại làm môi trường phân tán. Việc gia tăng khả năng phân tán đồng đều của hệ nano được thực hiện bằng cách kết hợp năng lượng siêu âm công suất cao với các chất có tác dụng trợ phân tán, bọc cách ly và làm môi trường phân tán như: chất hoạt động bề mặt, chất nhũ hóa và polyme, các chất này được ưu tiên lựa chọn trong số các chất dạng lỏng, và thuộc nhóm chất được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm. Trong phạm vi giải pháp hữu ích, các chất nhũ hóa, chất hoạt động bề mặt và polyme ở dạng “lỏng” đề cập đến các chất có trọng lượng phân tử (m.w.) trung bình sao cho các chất này ở trạng thái lỏng ở áp suất và nhiệt độ trong phòng.

Dung dịch nano điều chế được chứa curcumin và piperin có độ ổn định lâu dài theo thời gian và có khả năng hòa tan tốt trong nước dưới dạng các tiểu phân nano với hoạt tính và cấu trúc được giữ nguyên như curcumin đưa vào ban đầu quy trình điều chế.

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề cập đến việc phối hợp đồng thời piperin với curcuminoit gồm cả 3 thành phần hoặc riêng lẻ từng thành phần của curcumin, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin (gọi chung là curcumin), trong đó tỉ lệ theo trọng lượng piperin:curcumin nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,1%, tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,7 đến 0,9%.

Theo một khía cạnh khác, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế dung dịch nano đồng nhất có hai thành phần curcumin và piperin không sử dụng dung môi hữu cơ phân tử lượng thấp độc hại làm môi trường phân tán.

Theo một khía cạnh khác nữa, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế dung dịch nano đồng nhất có hai thành phần curcumin và piperin, trong đó sử dụng thiết bị đồng nhất bằng năng lượng siêu âm công suất cao với đầu phát siêu âm có biên độ dao động nằm trong khoảng từ 20 đến 100 micromet, kết hợp sử dụng các chất trợ phân tán, bọc cách ly và làm môi trường phân tán, các chất này được lựa chọn trong số các chất nhũ hóa, chất hoạt động bề mặt và polyme ở dạng lỏng, ưu tiên thuộc nhóm các chất được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm gồm các dẫn xuất của dầu thầu dầu polyoxyetylen (như Cremophor®), dầu thực vật glyxero-phospholipit (như dầu đậu nành lexitin), các este của axit béo với sorbitan (như span 20, span 80), với polyoxyetylen sorbitan (polysorbate 40, polysorbate 80), polyme thân nước loại polyetylen glycol (như PEG 200, PEG 400, PEG 600, PEG 800), quy trình điều chế này bao gồm:

Theo một phương án, quy trình điều chế bao gồm các bước:

a) tạo pha phân tán sơ bộ curcumin trong hỗn hợp dung dịch có tỉ lệ theo trọng lượng Cremophor®):lexitin là 9:1, tỉ lệ theo trọng lượng curcumin:[hỗn hợp dung dịch] nằm trong khoảng từ 2:10 đến 4:10, thực hiện bằng cách kết hợp gia nhiệt tới nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 90°C, và khuấy ở tốc độ vòng quay nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút, duy trì trong thời gian 120 phút, thu được pha phân tán sơ bộ của curcumin;

b) tạo pha phân tán sơ bộ piperin trong hỗn hợp gồm Cremophor®), lexitin với tỉ lệ theo trọng lượng piperin: Cremophor®):lexitin là 2:9:1 bằng cách kết hợp gia nhiệt tới nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C, và khuấy ở tốc độ vòng quay nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút, duy trì trong thời gian 60 phút, thu được pha phân tán sơ bộ của piperin;

c) tạo pha phân tán tăng cường ở cấp độ nanomet đối với dung dịch curcumin thu được ở bước a) dưới tác động của năng lượng siêu âm công suất cao của thiết bị đồng nhất hóa siêu âm có công suất nằm trong khoảng từ 500 đến

1.500W, tần số 20kHz, sử dụng đầu phát siêu âm có biên độ dao động nằm trong khoảng từ 20 đến 100 micromet, thời gian duy trì 120 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C ; tiếp theo nhỏ giọt từ từ vào bình phản ứng dung dịch piperin thu được ở bước b) với một lượng sao cho tỉ lệ theo trọng lượng piperin:curcumin nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,1%, tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,7 đến 0,9%, thời gian duy trì 60 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C ;

d) tạo vỏ bọc cho các tiểu phân nano trong dung dịch chứa curcumin và piperin bằng cách nhỏ từ từ hỗn hợp dung dịch có tỉ lệ theo trọng lượng PEG:sorbitan là 9:1 với một lượng bằng 80% trọng lượng dung dịch có trong bình phản ứng ở bước trên; tiếp tục trộn đồng nhất hóa trong thiết bị siêu âm công suất cao, thời gian duy trì 180 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C ;

e) bình phản ứng được chuyển sang thiết bị khuấy với tốc độ quay 300 vòng/phút cho đến khi nguội đến nhiệt độ trong phòng, thu được dung dịch nano chứa curcumin và piperin.

Theo một phương án khác, quy trình điều chế bao gồm các bước:

a) tạo pha phân tán sơ bộ curcumin trong hỗn hợp dung dịch có tỉ lệ theo trọng lượng polysorbat:lexitin là 9:1, tỉ lệ theo trọng lượng curcumin:[hỗn hợp dung dịch] nằm trong khoảng từ 2:10 đến 4:10, thực hiện bằng cách kết hợp gia nhiệt tới nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 90°C , và khuấy ở tốc độ vòng quay nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút, duy trì trong thời gian 120 phút, thu được pha phân tán sơ bộ của curcumin;

b) tạo pha phân tán sơ bộ piperin trong hỗn hợp gồm polysorbat, lexitin với tỉ lệ theo trọng lượng piperin:polysorbat:lexitin là 2:9:1 bằng cách kết hợp gia nhiệt tới nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C , và khuấy ở tốc độ vòng quay nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút, duy trì trong thời gian 60 phút, thu được pha phân tán sơ bộ của piperin;

c) tạo pha phân tán tăng cường ở cấp độ nanomet đối với dung dịch curcumin thu được ở bước a) dưới tác động của năng lượng siêu âm công suất cao

của thiết bị đồng nhất hóa siêu âm có công suất nằm trong khoảng từ 500 đến 1.500W, tần số 20kHz, sử dụng đầu phát siêu âm có biên độ dao động nằm trong khoảng từ 20 đến 100 micromet, thời gian duy trì 120 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C; tiếp tục nhỏ giọt từ từ vào bình phản ứng dung dịch piperin thu được ở bước b) với một lượng sao cho tỉ lệ theo trọng lượng piperin:curcumin nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,1%, tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,7 đến 0,9%, thời gian duy trì 60 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C;

d) tạo vỏ bọc cho các tiểu phân nano trong dung dịch chứa curcumin và piperin bằng cách nhỏ từ từ hỗn hợp dung dịch có tỉ lệ theo trọng lượng PEG:sorbitan là 9:1 với một lượng bằng 80% trọng lượng dung dịch trong bình phản ứng ở bước trên; tiếp tục trộn đồng nhất hóa trong thiết bị siêu âm công suất cao, thời gian duy trì 180 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C;

e) bình phản ứng được chuyển sang thiết bị khuấy với tốc độ quay 300 vòng/phút cho đến khi nguội đến nhiệt độ trong phòng, thu được dung dịch nano chứa curcumin và piperin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. là ảnh hiển vi quang học hình thái tế bào ung thư cổ tử cung Hela dưới tác dụng của dung dịch nano curcumin và piperin của giải pháp hữu ích với nồng độ curcumin là 125 micro gam /ml.

Hình 2. là ảnh hiển vi quang học hình thái tế bào ung thư cổ tử cung Hela đối chứng không có tác nhân gây độc.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình điều chế dung dịch nano chứa đồng thời curcumin và piperin không sử dụng các dung môi hữu cơ phân tử lượng thấp độc hại làm môi trường phân tán. Việc gia tăng khả năng phân tán đồng đều của hệ nano được thực hiện bằng cách kết hợp năng lượng siêu âm công suất cao, sử dụng đầu phát siêu âm có biên độ dao động nằm trong khoảng từ 20 đến 100 micromet, với các chất có tác

dụng trợ phân tán, bọc cách ly và làm môi trường phân tán như: chất hoạt động bề mặt, chất nhũ hóa và polyme, các chất này được ưu tiên lựa chọn trong số các chất dạng lỏng, và thuộc nhóm chất được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.

Quy trình điều chế dung dịch nano chứa đồng thời curcumin và piperin được trình bày một cách chi tiết dưới đây.

Theo một phương án, quy trình điều chế bao gồm các bước:

a) tạo pha phân tán sơ bộ curcumin trong hỗn hợp dung dịch có tỉ lệ theo trọng lượng Cremophor®):lexitin là 9:1, tỉ lệ theo trọng lượng curcumin:[hỗn hợp dung dịch] nằm trong khoảng từ 2:10 đến 4:10, thực hiện bằng cách kết hợp gia nhiệt tới nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 90°C, và khuấy ở tốc độ vòng quay nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút, duy trì trong thời gian 120 phút, thu được pha phân tán sơ bộ của curcumin.

Với mục đích không sử dụng các dung môi phân tử lượng thấp độc hại thường dùng trong quá trình phân tán curcumin như Etanol, Dimetin Sulfoxit (DMSO), Axeton, Etylen Glycol, Propylen Glycol..., các tác giả giải pháp hữu ích đã lựa chọn hệ dung môi là Cremophor®) và lexitin có độ hòa tan khá tốt curcumin, các chất này ở dạng lỏng và thuộc nhóm chất được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm, nhờ vậy quy trình điều chế sẽ không cần thiết có thêm công đoạn loại bỏ dung môi làm tăng chi phí sản xuất.

Tỉ lệ theo trọng lượng Cremophor®):lexitin là 9:1 đã được lựa chọn để đảm bảo có tính tương thích tốt và khả năng hòa tan tốt tối ưu đối với curcumin. Tỉ lệ curcumin/[hỗn hợp dung dịch] đã được tính toán tối ưu từ thực nghiệm, khi tăng tỉ lệ curcumin lên thì khó phân tán hoàn toàn trong dung dịch, tăng tỉ lệ dung môi lên sẽ dễ dàng phân tán hơn nhưng sẽ làm giảm tỉ lệ phần trăm curcumin cuối cùng trong sản phẩm.

Bước phân tán sơ bộ curcumin trong dung dịch được thực hiện nhằm phân tán bột curcumin trong dung dịch đạt mức độ đồng đều ở cấp độ micromet. Nhiệt độ khuấy trộn được chọn sao cho đủ gia tăng khả năng phân tán curcumin trong dung dịch nhưng không làm ảnh hưởng đến cấu trúc phân tử của curcumin.

b) tạo pha phân tán sơ bộ piperin trong hỗn hợp gồm Cremophor®), lexitin với tỉ lệ theo trọng lượng piperin:Cremophor®):lexitin là 2:9:1 bằng cách kết hợp gia nhiệt tới nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C, và khuấy ở tốc độ vòng quay nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút, duy trì trong thời gian 60 phút, thu được pha phân tán sơ bộ của piperin.

Piperin được đưa vào trong hệ dung dịch nhằm khắc phục nhược điểm của curcumin do bị chuyển hóa nhanh trong hệ tiêu hóa, nhờ vậy sẽ tăng nồng độ curcumin trong huyết thanh, tăng khả năng hấp thu vào cơ thể và đưa được curcumin với hàm lượng cao gấp nhiều lần đến các cơ quan nội tạng. Điều này đặc biệt quan trọng đối với khả năng ức chế phát triển tế bào ung thư của curcumin.

Hệ dung môi với tỉ lệ Cremophor®):lexitin là 9:1 được sử dụng để đảm bảo khả năng hòa tan tốt piperin và tương thích tốt với hệ dung dịch curcumin trong quá trình phối trộn ở bước sau.

c) tạo pha phân tán tăng cường ở cấp độ nanomet đối với dung dịch curcumin thu được ở bước a) dưới tác động của năng lượng siêu âm công suất cao của thiết bị đồng nhất hóa siêu âm có công suất nằm trong khoảng từ 500 đến 1.500W, tần số 20kHz, sử dụng đầu phát siêu âm có biên độ dao động nằm trong khoảng từ 20 đến 100 micromet, thời gian duy trì 120 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C; tiếp theo nhỏ giọt từ từ vào bình phản ứng dung dịch piperin thu được ở bước b) với một lượng sao cho tỉ lệ theo trọng lượng piperin:curcumin nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,1%, tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,7 đến 0,9%, thời gian duy trì 60 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C;

Thiết bị đồng nhất hóa siêu âm có công suất nằm trong khoảng từ 500 đến 1.500W, tần số 20kHz được sử dụng để gia tăng khả năng phân tán của curcumin và piperin trong dung dịch ở cấp độ nanomet. Đầu phát siêu âm được sử dụng là loại hợp kim titan có biên độ dao động lớn trong khoảng từ 20 đến 100 micromet để đảm bảo việc phân tán các tiểu phân curcumin ở cấp độ nanomet.

Trong quá trình phân tán đồng nhất bằng siêu âm năng lượng cao sẽ làm tăng nhiệt độ của bình phản ứng vì vậy cần có quá trình làm lạnh để duy trì nhiệt độ không vượt quá 70°C nhằm tránh phá hủy cấu trúc phân tử piperin.

d) tạo vỏ bọc cho các tiểu phân nano trong dung dịch chứa curcumin và piperin bằng cách nhỏ từ từ hỗn hợp dung dịch có tỉ lệ theo trọng lượng PEG:sorbitan là 9:1 với một lượng bằng 80% trọng lượng dung dịch trong bình phản ứng ở bước trên; tiếp tục trộn đồng nhất hóa trong thiết bị siêu âm công suất cao, thời gian duy trì 180 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C;

e) bình phản ứng được chuyển sang thiết bị khuấy với tốc độ quay 300 vòng/phút cho đến khi nguội đến nhiệt độ trong phòng, thu được dung dịch nano chứa curcumin và piperin.

Từ kết quả nghiên cứu thử nghiệm, hệ hỗn hợp dung dịch của PEG và sorbitan có tỉ lệ theo trọng lượng PEG:sorbitan là 9:1 được lựa chọn để bổ sung vào dung dịch nano chứa curcumin và piperin đã phân tán ở công đoạn trước đó tạo thành cấu trúc vỏ bọc 2 lớp. Với các lớp vỏ bọc này, các tiểu phân nano curcumin được cách ly với nhau chống lại quá trình co cụm, ngoài ra nhờ tính thân nước hệ dung dịch có thể phân tán tốt trong môi trường nước thành dung dịch trong suốt của các hạt nano curcumin.

Theo một phương án khác, quy trình điều chế bao gồm các bước:

a) tạo pha phân tán sơ bộ curcumin trong hỗn hợp dung dịch có tỉ lệ theo trọng lượng polysorbat:lexitin là 9:1, tỉ lệ theo trọng lượng curcumin:[hỗn hợp dung dịch] nằm trong khoảng từ 2:10 đến 4:10, thực hiện bằng cách kết hợp gia nhiệt tới nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 90°C, và khuấy ở tốc độ vòng quay nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút, duy trì trong thời gian 120 phút, thu được pha phân tán sơ bộ của curcumin.

Với mục đích không sử dụng các dung môi phân tử lượng thấp độc hại thường dùng trong quá trình phân tán curcumin như Etanol, Dimetin Sulfoxit (DMSO), Axeton, Etylen Glycol, Propylen..., các tác giả giải pháp hữu ích đã lựa chọn hệ dung môi là polysorbat và lexitin có độ hòa tan khá tốt curcumin, các chất

này ở dạng lỏng và thuộc nhóm chất được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm, nhờ vậy quy trình điều chế sẽ không cần thiết có thêm công đoạn loại bỏ dung môi làm tăng chi phí sản xuất.

Tỉ lệ theo trọng lượng polysorbat:lexitin là 9:1 đã được lựa chọn để đảm bảo có tính tương thích tốt và khả năng hòa tan tốt tối ưu đối với curcumin. Tỉ lệ curcumin/[hỗn hợp dung dịch] đã được tính toán tối ưu từ thực nghiệm, khi tăng tỉ lệ curcumin lên thì khó phân tán hoàn toàn trong dung dịch, tăng tỉ lệ dung môi lên sẽ dễ dàng phân tán hơn nhưng sẽ làm giảm tỉ lệ phần trăm curcumin cuối cùng trong sản phẩm.

Bước phân tán sơ bộ curcumin trong dung dịch được thực hiện nhằm phân tán bột curcumin trong dung dịch đạt mức độ đồng đều ở cấp độ micromet. Nhiệt độ khuấy trộn được chọn sao cho đủ gia tăng khả năng phân tán curcumin trong dung dịch nhưng không làm ảnh hưởng đến cấu trúc phân tử của curcumin.

b) tạo pha phân tán sơ bộ piperin trong hỗn hợp gồm polysorbat, lexitin với tỉ lệ theo trọng lượng piperin:polysorbat:lexitin là 2:9:1 bằng cách kết hợp gia nhiệt tới nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C, và khuấy ở tốc độ vòng quay nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút, duy trì trong thời gian 60 phút, thu được pha phân tán sơ bộ của piperin.

Piperin được đưa vào trong hệ dung dịch nhằm khắc phục nhược điểm của curcumin do bị chuyển hóa nhanh trong hệ tiêu hóa, nhờ vậy sẽ tăng nồng độ curcumin trong huyết thanh, tăng khả năng hấp thu vào cơ thể và đưa được curcumin với hàm lượng cao gấp nhiều lần đến các cơ quan nội tạng. Điều này đặc biệt quan trọng đối với khả năng ức chế phát triển tế bào ung thư của curcumin.

Hệ dung môi với tỉ lệ polysorbat:lexitin là 2:9:1 được sử dụng để đảm bảo khả năng hòa tan tốt piperin và tương thích tốt với hệ dung dịch curcumin trong quá trình phối trộn ở bước sau.

c) tạo pha phân tán tăng cường ở cấp độ nanomet đối với dung dịch curcumin thu được ở bước a) dưới tác động của năng lượng siêu âm công suất cao của thiết bị đồng nhất hóa siêu âm có công suất nằm trong khoảng từ 500 đến 1.500W, tần số 20kHz, sử dụng đầu phát siêu âm có biên độ dao động nằm trong

khoảng từ 20 đến 100 micromet, thời gian duy trì 120 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C ; tiếp theo nhỏ giọt từ từ vào bình phản ứng dung dịch piperin thu được ở bước b) với một lượng sao cho tỉ lệ theo trọng lượng piperin:curcumin nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,1%, tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,7 đến 0,9%, thời gian duy trì 60 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C ;

Thiết bị đồng nhất hóa siêu âm có công suất nằm trong khoảng từ 500 đến 1.500W, tần số 20kHz được sử dụng để gia tăng khả năng phân tán của curcumin trong dung dịch ở cấp độ nanomet. Đầu phát siêu âm được sử dụng là loại hợp kim titan có biên độ dao động lớn trong khoảng từ 20 đến 100 micromet để đảm bảo việc phân tán các tiểu phân curcumin ở cấp độ nanomet.

Trong quá trình phân tán đồng nhất bằng siêu âm năng lượng cao sẽ làm tăng nhiệt độ của bình phản ứng vì vậy cần có quá trình làm lạnh để duy trì nhiệt độ không vượt quá 70°C nhằm tránh phá hủy cấu trúc phân tử piperin.

d) tạo vỏ bọc cho các tiểu phân nano trong dung dịch chứa curcumin và piperin bằng cách nhỏ từ từ hỗn hợp dung dịch có tỉ lệ theo trọng lượng PEG:sorbitan là 9:1 với một lượng bằng 80% trọng lượng dung dịch trong bình phản ứng ở bước trên; tiếp tục trộn đồng nhất hóa trong thiết bị siêu âm công suất cao, thời gian duy trì 180 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C ;

e) bình phản ứng được chuyển sang thiết bị khuấy với tốc độ quay 300 vòng/phút cho đến khi nguội đến nhiệt độ trong phòng, thu được dung dịch nano chứa curcumin và piperin.

Từ kết quả nghiên cứu thử nghiệm, hệ hỗn hợp dung dịch của PEG và sorbitan có tỉ lệ theo trọng lượng PEG:sorbitan là 9:1 được lựa chọn để bổ sung vào dung dịch nano chứa curcumin và piperin đã phân tán ở công đoạn trước đó tạo thành cấu trúc vỏ bọc hai lớp. Với các lớp vỏ bọc này, các tiểu phân nano curcumin được cách ly với nhau chống lại quá trình co cụm, ngoài ra nhờ tính thân nước hệ dung dịch có thể phân tán tốt trong môi trường nước thành dung dịch trong suốt của các hạt nano curcumin.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích được mô tả rõ ràng một cách chi tiết hơn bằng các ví dụ sau đây, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa cho giải pháp hữu ích và không được xem là làm giới hạn phạm vi của giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Quy trình điều chế dung dịch nano chứa đồng thời curcumin và piperin sử dụng hệ dung môi Cremophor®) và lexitin

a) tạo pha phân tán sơ bộ curcumin trong hỗn hợp gồm Cremophor®), lexitin bằng cách:

- Trộn 20 g curcumin trong hệ dung môi gồm 90 g Cremophor®) và 10 g lexitin, sử dụng máy khuấy ở tốc độ vòng quay 400 vòng/phút, đồng thời gia nhiệt dần lên tới nhiệt độ 90°C, tiếp tục khuấy và duy trì tại nhiệt độ này trong thời gian 120 phút, thu được pha phân tán sơ bộ của curcumin;

b) tạo pha phân tán sơ bộ piperin trong hỗn hợp gồm Cremophor®), lexitin bằng cách:

- Trộn 2 g piperin trong hệ dung môi gồm 9 g Cremophor®) và 1 g lexitin, sử dụng máy khuấy con từ ở tốc độ vòng quay 400 vòng/phút, đồng thời gia nhiệt dần lên tới nhiệt độ 70°C, tiếp tục khuấy và duy trì tại nhiệt độ này trong thời gian 60 phút, thu được pha phân tán sơ bộ của piperin;

c) tạo pha phân tán tăng cường ở cấp độ nanomet như sau:

- Đặt bình chứa 120 g dung dịch thu được ở bước a) vào bình ổn nhiệt đặt ở nhiệt độ 70°C. Dung dịch được trộn và phân tán sử dụng thiết bị đồng nhất hóa siêu âm BSP-1200 có công suất 1.200W ở tần số 20kHz.

- Đặt chế độ rung với đầu phát siêu âm với biên độ dao động là 90 micromet, thời gian 120 phút. Trong quá trình phân tán, nhiệt độ bình phản ứng tăng dần lên, cho thiết bị tạm ngừng nếu nhiệt độ bình cao hơn 70°C, sau đó cho thiết bị chạy tiếp tục sao cho đủ 120 phút.

- Tiếp theo, đặt chế độ rung với đầu phát siêu âm với biên độ dao động là 30 micromet, thời gian 60 phút. Lấy 1,2 g dung dịch piperin đã chuẩn bị ở bước b) nhỏ giọt từ từ vào bình phản ứng. Trong quá trình phân tán, nhiệt độ bình phản ứng

tăng dần lên, cho thiết bị tạm ngừng nếu nhiệt độ bình cao hơn 70°C, sau đó cho thiết bị chạy tiếp tục sao cho đủ 60 phút.

d) tạo vỏ bọc cho các tiểu phân nano trong dung dịch chứa curcumin và piperin dùng hỗn hợp dung dịch của PEG và sorbitan:

- Pha trộn hỗn hợp dung dịch gồm 86,4 g PEG 400 và 9,6 g span 20 khuấy trong cốc thủy tinh, sau đó nhỏ từ từ hỗn hợp dung dịch này vào bình phản ứng ở công đoạn trên.

- Đặt chế độ rung cho đầu phát siêu âm với biên độ dao động là 30 micromet, thời gian 180 phút. Trong quá trình phân tán, nhiệt độ bình phản ứng tăng dần lên, cho thiết bị tạm ngừng nếu nhiệt độ bình cao hơn 70°C, sau đó cho thiết bị chạy tiếp tục sao cho đủ 180 phút.

e) ổn định hỗn hợp dung dịch:

- Tiếp theo, bình phản ứng được chuyển sang thiết bị khuấy với tốc độ quay 300 vòng/phút cho đến khi nguội đến nhiệt độ trong phòng, thu được dung dịch nano chứa curcumin và piperin.

Ví dụ 2: Quy trình điều chế dung dịch nano chứa đồng thời curcumin và piperin sử dụng hệ dung môi polysorbat và lexitin

Quy trình được thực hiện tương tự ví dụ 1 nhưng công đoạn phân tán sơ bộ a) và b) sử dụng hệ dung môi gồm polysorbat 40 và lexitin, còn công đoạn d) sử dụng hệ dung môi gồm PEG 800 và span 80.

Ví dụ 3: Quy trình điều chế hệ dung dịch nano chứa đồng thời curcumin và piperin sử dụng hệ dung môi Cremophor®) và lexitin

Quy trình được thực hiện tương tự như ví dụ 1 nhưng với hàm lượng curcumin tăng thêm, trong công đoạn phân tán sơ bộ a) sử dụng tỉ lệ trộn 26 g curcumin trong hệ dung môi gồm 90 g Cremophor®) và 10 g lexitin.

Ví dụ 4: Thử nghiệm về đặc tính của dung dịch nano chứa curcumin và piperin

Các mẫu dung dịch nano chứa curcumin và piperin được pha vào trong nước để đo kích thước hạt nano bằng phương pháp DLS (Dynamic Laser Scattering) sử dụng thiết bị đo Zetasizer Nano S90 của hãng Malvern, kết quả cho trong bảng 1.

Tỉ lệ phần trăm theo trọng lượng của thành phần curcumin nằm trong khoảng từ 9 đến 12%, tỉ lệ trăm theo trọng lượng của thành phần piperin/curcumin nằm trong khoảng 0,8 đến 1,0%. Kích thước trung bình của các tiểu phân nano thu được nằm trong khoảng từ 10 đến 60 nanomet

Bảng 1. Kích thước tiểu phân nano của các mẫu thu được trong các ví dụ

Mẫu đo	Hàm lượng curcumin (% trọng lượng)	Tỉ lệ piperin/curcumin (% trọng lượng)	Kích thước trung bình (nm)
Ví dụ 1	9,2	1,0	10,5
Ví dụ 2	9,2	1,0	12,5
Ví dụ 3	12,0	0,8	55,3

Dung dịch nano chứa hai thành phần curcumin và piperin có khả năng ổn định cao duy trì trạng thái phân bố của các tiểu phân có kích thước nano sau thời gian bảo quản hàng năm ở điều kiện trong phòng. Pha dung dịch nano vào nước thu được dung dịch trong suốt có màu vàng đặc trưng của curcumin. Khi đo trên thiết bị quang phổ hấp thụ UV-VIS, dung dịch nano curcumin có đỉnh hấp thụ tại vùng 420 nm với dạng phổ hấp thụ không bị thay đổi, như vậy curcumin tồn tại trong các tiểu phân nano không bị biến đổi cấu trúc phân tử bởi quá trình điều chế.

Các tiểu phân nano có thể tồn tại bền vững nhiều giờ sau khi pha trong dung dịch nước, kết quả đo kích thước hạt theo phương pháp DLS như được nêu trong bảng 2.

Bảng 2. Độ ổn định các hạt nano pha trong dung dịch nước theo thời gian

Thời gian (giờ)	0	12	24	48	168
Kích thước trung bình (nm)	10,5	10,8	12,9	13,9	37,7

Thử độc tính của dung dịch nano chứa curcumin và piperin trên các dòng tế bào ung thư nuôi cấy đơn lớp bằng cách sử dụng bộ kit CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay của hãng Promega (gọi tắt là phương pháp MTT). Trong đó, các chủng tế bào ung thư được thử nghiệm gồm tế bào ung thư cổ tử cung Hela, tế bào ung thư gan HepG2 và tế bào ung thư phổi H460.

Hình thái các tế bào nuôi cấy được ủ sau 48 giờ với chất thử nghiệm của giải pháp hữu ích (curcumin) có sự khác biệt rõ rệt với đối chứng, các giếng tế bào được ủ với curcumin thể hiện sự gây độc mạnh lên tế bào, ở những nồng độ cao tế bào có hình dạng teo, co lại, các mối liên kết tế bào với tế bào không còn quan sát thấy. Kết quả này được thể hiện trên hình 1 và hình 2 đối với thử nghiệm gây độc cho tế bào ung thư cổ tử cung Hela. Các thử nghiệm tác dụng gây độc đối với các tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư phổi H460 của dung dịch nano 2 thành phần của giải pháp hữu ích đều cho thấy hiệu quả tương tự như trên.

Đánh giá định lượng độc tính của chất thử nghiệm đối với các tế bào ung thư được tiến hành theo phương pháp MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide). Nguyên tắc của phương pháp này dựa vào sự khử hợp chất MTT màu vàng thành dạng tinh thể formazan màu tím trong tế bào sống. Nồng độ formazan hình thành được đo bằng máy quang phổ ở bước sóng 500-600 nm. Quá trình khử xảy ra dưới sự xúc tác của enzym trong ty thể trong tế bào sống, theo đó hàm lượng của chất tạo ra tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống tham gia phản ứng.

Phép đo mật độ quang học của dung dịch trong giếng tế bào được thực hiện bằng máy Microplate Reader ở bước sóng 490 nm. Dựa vào giá trị mật độ quang học, ta xác định được % tỷ số tăng sinh (A) của tế bào, từ đó đánh giá được độ độc đối với tế bào của chế phẩm curcumin. A được tính theo công thức:

$$A(\%) = \frac{T}{V_H} \times 100$$

V_H : giá trị trung bình của mật độ quang học ở các giếng thử với dung môi pha thuốc thử.

T : giá trị trung bình của mật độ quang học ở các giếng thử với thuốc.

Nếu $A = 50\%$ có nghĩa là thuốc thử có tác dụng gây độc và làm chết 50% tế bào. Nồng độ thuốc mà tại đó giá trị A đạt 50% gọi là liều gây chết 50% tế bào, ký hiệu là IC_{50} . Đây là giá trị để đánh giá độc tính của thuốc đối với tế bào, giá trị này càng nhỏ thì tác động của thuốc thử càng mạnh.

Bảng 3: Giá trị mật độ quang học (OD), tỷ số tăng sinh ($A\%$) và giá trị IC_{50} của curcumin đối với các dòng tế bào Hela, HepG2 và H460.

Nồng độ Curcumin ($\mu\text{g/ml}$)	Dòng tế bào					
	Hela		HepG2		H460	
	OD	$A\%$	OD	$A\%$	OD	$A\%$
125,00	0,02	1,73	0,30	29,04	0,35	31,35
62,50	0,12	10,66	0,34	32,82	0,36	31,71
31,25	0,38	33,02	0,34	33,24	0,37	32,59
15,63	0,50	36,25	0,55	53,19	0,40	35,48
7,81	0,83	54,29	1,02	99,13	0,55	48,45
3,91	1,22	105,18	1,19	114,87	0,81	71,86
1,95	1,24	106,56	1,13	109,65	1,04	88,93
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	12,6		21,4		7,76	

Kết quả đo đặc định lượng khả năng ức chế tế bào ung thư được thể hiện trong bảng 3. Đối với tất cả 3 dòng ung thư thử nghiệm đều cho thấy khả năng ức chế tế bào ung thư mạnh lên khi nồng độ curcumin tăng lên, và ngược lại. Tiến hành đo đặc định lượng theo phương pháp đo mật độ quang nói trên bước sóng tại 490 nm (OD) với các nồng độ curcumin thay đổi từ 1,95 đến 125 $\mu\text{g/ml}$ đã thu được giá trị tỉ số tăng sinh ($A\%$), từ đó xác định được chỉ số IC_{50} đối với 3 loại tế bào ung thư Hela, HepG2 và H460 lần lượt là 12,6 $\mu\text{g/ml}$, 21,4 $\mu\text{g/ml}$ và 7,76 $\mu\text{g/ml}$.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình điều chế hệ nano có đồng thời hai thành phần curcumin và piperin dưới dạng dung dịch theo giải pháp hữu ích đã thu được các tiểu phân nano có kích thước rất nhỏ từ 10 đến 60 nm, nhờ đó gia tăng được động học quá trình hấp thu vào tế bào. Với sự có mặt đồng thời piperin và curcumin trong các tiểu phân nano cho phép ức chế được quá trình chuyển hóa nhanh curcumin dưới tác dụng của một số enzym gây mất hoạt tính của chúng, nhờ vậy hàm lượng curcumin đến đích tại các tế bào nội tạng cơ thể tăng lên mạnh mẽ, về mặt lý thuyết có thể tăng lên gấp 20 lần so với trường hợp không có sự bảo vệ của của piperin.

Quy trình điều chế dung dịch nano theo giải pháp hữu ích thực hiện theo phương pháp nano hóa bằng kỹ thuật vật lý, không sử dụng các dung môi hữu cơ có phân tử lượng thấp độc hại, do đó đem lại nhiều ưu điểm như đảm bảo độ sạch và an toàn của sản phẩm đối với người sử dụng, không gây ô nhiễm môi trường và không làm gia tăng chi phí khi áp dụng vào sản xuất công nghiệp.

Thử nghiệm khả năng gây độc cho tế bào ung thư cho thấy các mẫu sản phẩm của giải pháp hữu ích có khả năng gây ức chế và tiêu diệt mạnh các tế bào ung thư ở nồng độ rất thấp, do đó chúng có khả năng ứng dụng trong phòng ngừa và điều trị bệnh trên cơ sở sử dụng các chế phẩm có nguồn gốc chiết xuất từ tự nhiên không tác dụng phụ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình điều chế dung dịch nano chứa curcumin và piperin bao gồm các bước:

a) tạo pha phân tán sơ bộ curcumin trong hỗn hợp dung dịch có tỉ lệ theo trọng lượng polysorbat:lexitin là 9:1, tỉ lệ theo trọng lượng curcumin:[hỗn hợp dung dịch] nằm trong khoảng từ 2:10 đến 4:10, kết hợp gia nhiệt tới nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 90°C, và khuấy ở tốc độ vòng quay nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút, duy trì trong thời gian 120 phút;

b) tạo pha phân tán sơ bộ piperin trong hỗn hợp gồm polysorbat, lexitin với tỉ lệ theo trọng lượng piperin:polysorbat:lexitin là 2:9:1, kết hợp gia nhiệt tới nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C, và khuấy ở tốc độ vòng quay nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút, duy trì trong thời gian 60 phút, thu được pha phân tán sơ bộ của piperin;

c) tạo pha phân tán tăng cường ở cấp độ nanomet đối với dung dịch curcumin thu được ở bước a) dưới tác động của năng lượng siêu âm công suất cao của thiết bị đồng nhất hóa siêu âm có công suất nằm trong khoảng từ 500 đến 1.500W, tần số 20kHz, sử dụng đầu phát siêu âm có biên độ dao động nằm trong khoảng từ 20 đến 100 micromet, thời gian duy trì 120 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C; tiếp theo nhỏ giọt từ từ vào bình phản ứng dung dịch piperin thu được ở bước b) với một lượng sao cho tỉ lệ theo trọng lượng piperin:curcumin nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,1%, tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,7 đến 0,9%, thời gian duy trì 60 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C;

d) tạo vỏ bọc cho các tiểu phân nano trong dung dịch chứa curcumin và piperin bằng cách nhỏ từ từ hỗn hợp dung dịch có tỉ lệ theo trọng lượng PEG:sorbitan là 9:1 với một lượng bằng 80% trọng lượng dung dịch trong bình phản ứng ở bước trên; tiếp tục trộn đồng nhất hóa trong thiết bị siêu âm công suất cao, thời gian duy trì 180 phút, đồng thời làm lạnh bình phản ứng giữ cho nhiệt độ không vượt quá 70°C;

e) bình phản ứng được chuyển sang thiết bị khuấy với tốc độ quay 300 vòng/phút cho đến khi nguội đến nhiệt độ trong phòng, thu được dung dịch nano chứa curcumin và piperin.

Hình 1. Ảnh hình thái tế bào Hela bị gây độc bởi curcumin



Hình 2. Ảnh hình thái tế bào Hela đối chứng không có tác nhân gây độc

