



(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)



2-0003226

(51) **A61K 9/107**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00007

(22) 20/11/2019

(67) 1-2019-06477

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/05/2021 398

(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 TAXIFOLIN

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano taxifolin, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị pha dầu;

b) chuẩn bị hỗn hợp chất nhũ hóa PEG/span 80/lexithin;

c) tạo hỗn hợp tiền nhũ tương; và

d) đồng hóa hỗn hợp nhũ tương nano taxifolin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

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

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Taxifolin (5,7,3',4'-flavan-on-ol, hay dehydroquercetin) là một loại polyphenol thuộc họ flavonoid. Taxifolin được tìm thấy trong một số loại thực phẩm như hành, cây khế sữa, hạt me, trà, ca cao, và đặc biệt trong cây lá kim như cây thông Siberia. Các nghiên cứu cho thấy taxifolin có rất nhiều tính chất sinh học đáng quý như chống oxy hóa, bảo vệ tế bào thần kinh, ngăn ngừa thiếu máu não, suy nhược thần kinh, chống viêm, v.v. Vì vậy, việc sử dụng chất chống oxy hóa tự nhiên không gây độc như hydroquercetin sẽ mang lại hiệu quả trong hỗ trợ điều trị các bệnh mãn tính.

Hyang Dok-Go và các cộng sự đã tiến hành thí nghiệm đánh giá tác động bảo vệ tế bào thần kinh trong quá trình oxy hóa của quercetin và taxifolin trên chuột. Kết quả trên bài báo: *“Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-taxifolin and quercetin 3-methyl ether, isolated from Opuntia ficus-indica var. saboten”* cho thấy hai chất này đều có khả năng bảo vệ tế bào thần kinh bằng cách ức chế phản ứng peroxid hóa lipid và loại bỏ các gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

Luo và các cộng sự đã công bố trong bài báo: *“Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids”* về khả năng ngăn chặn sự phát triển của tế bào ung thư vú (OVCAR-3) bằng cách biểu hiện sản xuất VEGF có vai trò ngăn chặn sự phát triển các mạch máu để tế bào ung thư.

Igarashi và các cộng sự đã nghiên cứu tác dụng giảm mỡ máu và mỡ gan của taxifolin trong thí nghiệm *in-vivo*. Kết quả trên bài báo: *“Effect of astilbin in tea processed from leaves of Engelhard tiachry sole psison the serum and liver lipid concentrations and on the erythrocyte and liver antioxidant enzyme activities of rats”* cho thấy ngoài việc giảm cholesterol toàn phần, taxifolin cũng làm giảm nồng độ chất phản ứng axit thiobarbituric (TBARS) trong huyết thanh và gan. TBARS là một chỉ số

của peroxit hóa lipid và stress oxy hóa hữu ích trong việc xác định tiềm năng chống oxy hóa của các hợp chất.

Các nghiên cứu cho thấy taxifolin là hợp chất thiên nhiên có nhiều hoạt tính sinh học đáng quý và đã được ứng dụng nhiều trong các sản phẩm thực phẩm và mỹ phẩm với tác dụng chống oxy hóa, ngăn ngừa thiếu máu não, suy nhược thần kinh, giảm mỡ máu, v.v. Các sản phẩm chủ yếu được dùng dưới dạng uống, nhưng taxifolin là một chất ít tan trong nước nên khả năng chuyển hóa của nó thấp. Do đó, cần cải thiện khả năng hòa tan của taxifolin trong các chế phẩm để tăng tính sinh khả dụng của hợp chất này. Shuchong Zu và các cộng sự đã dùng phương pháp kết tủa siêu tới hạn để tạo ra bột taxifolin có kích thước micro. Trong bài báo: “*Micronization of Taxifolin by Supercritical Antisolvent Process and Evaluation of Radical Scavenging Activity*” tác giả đã sử dụng etanol làm dung môi và cacbon dioxit được sử dụng làm chất chống phá hủy. Quá trình được thực hiện ở nhiệt độ (35-65°C), áp suất (10-25 MPa), tốc độ dòng dung dịch (3-6 mL/phút) và nồng độ của dung dịch lỏng (5-20 mg/mL). Với nhiệt độ thấp, áp suất cao và nồng độ dung dịch lỏng thấp hơn, kích thước của các tinh thể giảm. Kết quả tạo ra các hạt taxifolin có kích thước từ 2-10 μm . Ưu điểm của phương pháp này là hiệu suất sản phẩm cao, thiết bị đơn giản nhưng kích thước hạt khá to nên khả năng chuyển hóa taxifolin chưa cao.

Roman Terekhov và các cộng sự đã dùng phương pháp đông khô với các dung môi khác nhau để tạo ra các tinh thể taxifolin có kích thước bé làm tăng khả năng hòa tan trong nước. Kết quả trên bài báo: “*Fractal Aggregation of Taxifolin After Lyophilization*” công bố đã tạo ra tinh thể taxifolin hòa tan tốt trong nước. Hiệu suất của phương pháp này cao nhưng đòi hỏi thiết bị đắt tiền và kích thước hạt tạo thành chỉ ở mức micro.

Tác giả Kim Ju Ho đã thực hiện phương pháp bao gói taxifolin trong hạt nano silica. Sáng chế “*Lipophilic nanocapsule powder containing Taxifolin and its cosmetic compositions*” đã tạo ra sản phẩm nano taxifolin có tính sinh khả dụng cao nhưng phương pháp bao gói thường có hạn chế về thời gian khuếch tán của chế phẩm kéo dài.

Từ tài liệu tổng hợp được có thể thấy có rất nhiều phương pháp chuyển hóa taxifolin 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 taxifolin 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 taxifolin dạng các tiểu phần nano có kích thước nhỏ hơn (dưới 50 nm). Quy trình được sử dụng trong sáng chế là tạo hệ vi nhũ tương taxifolin. Vi nhũ tương là một hệ phân tán có kích thước hạt từ 10 nm đến 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 taxifolin. Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano taxifolin. Quy trình này bao gồm các bước:

- a) chuẩn bị pha dầu bằng cách cho taxifolin hòa tan trong dầu đậu nành;
- b) chuẩn bị hỗn hợp chất nhũ hóa PEG/span 80/lexithin 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; và
- d) đồng hóa hỗn hợp nhũ tương: Hỗn hợp trên được để qua đêm rồi thực hiện đồng hóa bằng thiết bị đồng hóa.

Kết quả thu được hệ vi nhũ tương nano taxifolin dạng lỏng.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) của hệ vi nhũ tương nano taxifolin.

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 taxifolin hòa tan trong dầu đậu nành theo tỷ lệ là 1:16 (g/mL) bằng máy khuấy có gia nhiệt trong khoảng 50°C với tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 giờ cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, thu được pha phân tán.

Mục đích ban đầu là tạo ra các hạt taxifolin với kích thước nano và ổn định trong hệ, trong sáng chế, dầu đậu nành được sử dụng để hòa tan taxifolin. Dầu đậu nành có nguồn gốc từ tự nhiên đã được sử dụng nhiều trong lĩnh vực thực phẩm chức năng, với liều lượng được khuyến cáo là không quá 0,75 mL/kg/giờ. Vì vậy, sáng chế đã nghiên cứu và đưa ra tỉ lệ phù hợp như trên.

b) chuẩn bị hỗn hợp chất nhũ hóa PEG/span 80/lexithin theo tỷ lệ 2:2:1 (g/mL/mL) được phân tán đều trên máy khuấy trong thời gian 3 tiếng ở nhiệt độ phòng với tốc độ 300 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.

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 như polyme thiên nhiên ưa nước như protein (gelatin, albumin), polysacarit (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 được 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.

Tuy PEG là các chất mang polyme đã được sử dụng trong các lĩnh vực dược phẩm và y tế, nhưng hệ vi nhũ tương thu được bằng cách sử dụng riêng lẻ PEG này có độ ổn định chưa cao vì trong quá trình tạo hệ vi nhũ tương có sự đứt gãy về liên kết mạch polyme, thêm vào đó việc sử dụng phối hợp PEG với span 80, lexithin theo các nghiên cứu hiện nay là khá thông dụng để cân bằng chỉ số HLB và giảm độ sa lắng của các hạt tiểu phân nano.

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) theo tỷ lệ 3:2 (g/g), với tốc độ khuấy 800 vòng/phút, nhiệt độ phòng, sau đó tăng tốc độ khuấy lên 800 vòng/ phút trong 4 giờ; và

d) để hỗn hợp thu được ở bước c) qua đêm ở nhiệt độ phòng, sau đó hỗn hợp được chạy trong thiết bị đồng hóa với áp suất 100 MP, lặp lại 3 chu kỳ thu được hệ vi nhũ tương nano taxifolin.

Hỗn hợp thu được ở bước c) có thể vẫn còn lẫn một lượng taxifolin dư nhất định do bám trên thành thiết bị hoặc cánh khuấy mà không được hòa tan trong dung môi, lượng taxifolin này có thể sa lắng sau khi để qua đêm và làm hỗn hợp trở nên không đồng nhất. Do đó hỗn hợp thu được ở bước c) cần được chạy trong thiết bị đồng hóa có áp suất để giảm kích thước của các hạt này lại đồng thời làm hỗn hợp cuối cùng trở nên đồng nhất.

Ví dụ thực tế cho sáng chế.

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

a) chuẩn bị pha dầu bằng cách cho 4g taxifolin hòa tan trong 64 mL dầu đậu nành bằng máy khuấy có gia nhiệt trong khoảng 50°C với tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 giờ cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, thu được pha phân tán.

b) chuẩn bị hỗn hợp chất nhũ hóa bằng cách trộn 20 g PEG với 20 mL span 80 và 10 mL lexithin được phân tán đều trên máy khuấy trong thời gian 3 tiếng ở nhiệt độ phòng với tốc độ 300 vòng/phút.

c) tạo hỗn hợp tiền nhũ tương bằng cách nhỏ từ từ 68 g hỗn hợp thu được ở bước a) vào 45 g hỗn hợp thu được ở bước b) với tốc độ khuấy 800 vòng/phút, nhiệt độ phòng, Sau đó tăng tốc độ khuấy lên 800 vòng/ phút trong 4 giờ; và

d) để hỗn hợp thu được ở bước c) qua đêm ở nhiệt độ phòng, sau đó hỗn hợp được chạy trong thiết bị đồng hóa với áp suất 100 MPa, lặp lại 3 chu kỳ thu được hệ vi nhũ tương nano taxifolin.

Tiến hành thí nghiệm như phần mô tả chi tiết sáng chế ở trên. Sản phẩm tạo thành được tiến hành kiểm tra với các phương pháp phân tích hiện đại. Kết quả phân tích như sau:

1. Kết quả phân tích hàm lượng

Hàm lượng của taxifolin trong mẫu được đo bằng HPLC. Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng taxifolin trong mẫu phân tích đạt 3,02 %.

2. Kết quả đo HR-TEM

Dung dịch taxifolin phân tán tốt trong nước, có chứa các hạt nano taxifolin hình cầu có đường kính khoảng 10-20 nm

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

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

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
9.1	Tổng vi sinh vật hiếu khí	CFU/mL	ISO 4833-1:2013	KPH (LOD:1 CFU/mL)
9.2	<i>Cl. Perfringens</i>	CFU/mL	TCVN 4991:2005	KPH (LOD:1 CFU/mL)
9.3	Coliforms	CFU/mL	TCVN 6848:2007	KPH (LOD:1 CFU/mL)

9.4	<i>E. coli</i>	CFU/mL	TCVN 7924 -2:2008	KPH (LOD:1CFU/mL)
9.5	Tổng số bào tử mầm men-mốc	CFU/mL	TCVN 8275-1:2010	KPH (LOD:1 CFU/mL)
9.6	Hàm lượng Cadmi	mg/L	NIFC.03.M.45(ICP-MS)	KPH (LOD:0,004 mg/kg)
9.7	Hàm lượng Chì	mg/L	NIFC.03.M.45(ICP-MS)	0,053
9.8	Hàm lượng Thủy ngân	mg/L	NIFC.03.M.45(ICP-MS)	KPH (LOD:0,003 mg/kg)
9.9	pH	-	NIFC.05.M.196	6,75
9.10	Tỷ trọng	-	NIFC.05.M.197	1,142

KPH: Không phát hiện

LOD: Giới hạn phát hiện

Kết quả cho thấy, mẫu taxifolin điều chế được đạt các chỉ tiêu về an toàn thực phẩm.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Đã điều chế thành công hệ vi nhũ tương nano taxifolin tan tốt trong nước, có chứa các tiểu phân taxifolin kích thước khoảng 10-20 nm, hàm lượng là 3,02 mg/100g, đáp ứng yêu cầu của quá trình vận chuyển các hạt tiểu phân taxifolin tới đích mong muốn. Độ tan và khả năng hấp thu cũng như thời gian tồn tại của hạt Taxifolin tăng lên khi ở dạng kích thước nano.

Yêu cầu bảo hộ

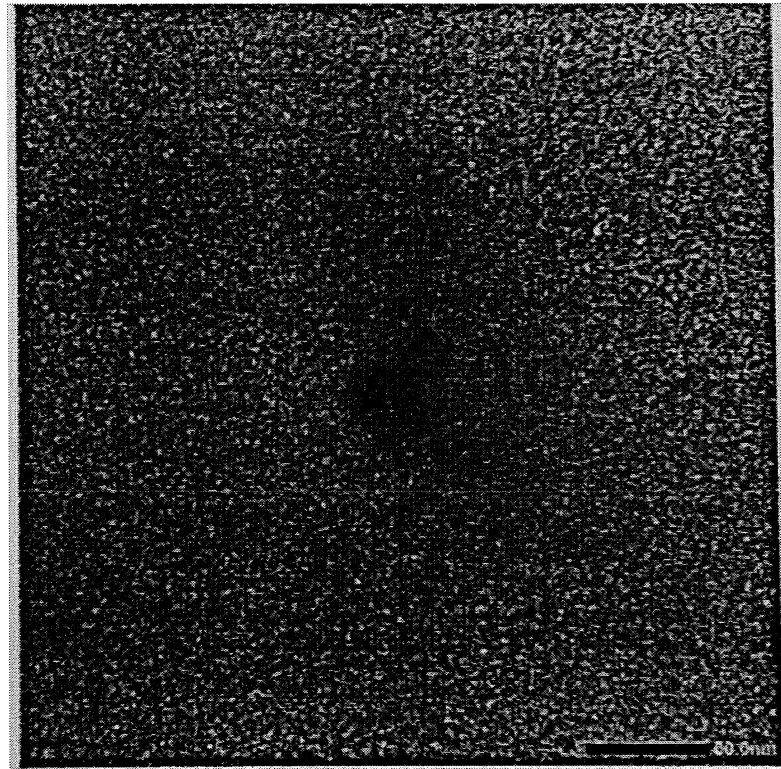
1. Quy trình điều chế hệ vi nhũ tương taxifolin bao gồm các bước sau:

a) chuẩn bị pha dầu bằng cách cho taxifolin hòa tan trong dầu đậu nành theo tỷ lệ là 1:16 (g/mL) bằng máy khuấy có gia nhiệt đến khoảng 50°C với tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 giờ cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, thu được pha phân tán;

b) chuẩn bị hỗn hợp chất nhũ hóa PEG/span 80/lexithin theo tỷ lệ 2:2:1 (g/mL/mL) được phân tán đều trên máy khuấy trong thời gian 3 tiếng ở nhiệt độ phòng với tốc độ 300 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) theo tỷ lệ 3:2 (g/g), với tốc độ khuấy 800 vòng/phút, nhiệt độ phòng, sau đó tăng tốc độ khuấy lên 800 vòng/ phút trong 4 giờ; và

d) để hỗn hợp thu được ở bước c) qua đêm ở nhiệt độ phòng, sau đó hỗn hợp được chạy trong thiết bị đồng hóa với áp suất 100 MPa, lặp lại 3 chu kỳ thu được hệ vi nhũ tương nano taxifolin.



Hình 1