



(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)



2-0003268

(51) **A61K 9/107; B82Y 5/00**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00193

(22) 14/01/2020

(67) 1-2020-00267

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/05/2020 386ASC

(73) Công ty cổ phần Wakamono (VN)

95 Trần Trọng Cung, phường Tân Thuận Đông, Quận 7, TP. Hồ Chí Minh.

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

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

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

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano rutin bao gồm các bước: (i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho rutin hòa tan trong dung môi etanol bằng máy khuấy và kết hợp gia nhiệt và giữ nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ; (ii) chuẩn bị chất mang bằng cách gia nhiệt PEG (polyetylen glycol) dạng lỏng đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C, khuấy đều; (iii) bổ sung chất mang vào pha phân tán, tiếp tục giữ nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút, trong môi trường hút chân không; (iv) nhũ hóa bằng cách: khi nhiệt độ đạt 60°C, bổ sung dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 và Tween vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu được ở bước (iii), tiếp tục khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút, ở nhiệt độ nằm trong khoảng 60°C đến 80°C, trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C trong thời gian từ 3 giờ đến 5 giờ, kiểm soát chất lượng sản phẩm tạo thành bằng cách hòa tan vào nước và đo độ trong suốt, dừng phản ứng, hạ nhiệt độ từ từ cho đến khi nhiệt độ còn trong khoảng từ 40°C đến 60°C; tiến hành nhũ toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút; (v) hỗn hợp thu được được làm lạnh đến 25°C và được bơm bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm, lọc sản phẩm bằng cách bơm qua hệ thống lọc nano trước khi chiết rót đóng gói.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

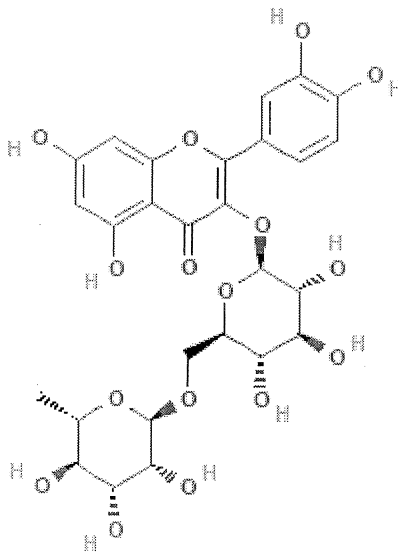
Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano rutin

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cộng đồng khoa học đương đại đã công nhận flavonoid là một loại phân tử trị liệu độc đáo do tính chất trị liệu đa dạng của chúng. Trong số này, rutin, còn được gọi là vitamin P hoặc rutosit, quercetin-3-rutinosit, sophorin, đã được khám phá cho thấy một số tác dụng dược lý (Aditya G. và cộng sự, 2017).

Rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon-3-rhamnoglucosit) là một flavonol, được tìm thấy nhiều trong thực vật, như hoa lạc tiên, kiêu mạch (tam giác mạch), trà và táo, là thành phần dinh dưỡng quan trọng của thực phẩm (Harborne, 1986).

Rutin có công thức phân tử là $C_{27}H_{30}O_{16}$, phân tử lượng là 610,521 g/mol và có cấu trúc hóa học như sau:



Tên “rutin”, xuất phát từ cây *Ruta graveolens* (vân hương), cũng chứa rutin. Về mặt hóa học, nó là một glycosit bao gồm flavonolic aglycon quercetin cùng với disacarit rutinoza. Nó đã được chứng minh có một số hoạt động dược lý, bao gồm chống oxy hóa, bảo vệ tế bào, vận mạch, chống ung thư, bảo vệ thần kinh và bảo vệ tim mạch (Javed và

cộng sự, 2012, Richetti và cộng sự, 2011, Nassiri-Asl và cộng sự, 2010, Mellou và cộng sự, 2006, Trumbeckaite và cộng sự, 2006, Schwedhelm và cộng sự, 2003, Janbaz và cộng sự, 2002, La Casa và cộng sự, 2000).

Những tác dụng này đã được chứng minh trong thực nghiệm, tuy nhiên khi dùng cho người bệnh thì hiệu quả lại chưa thuyết phục do rutin có tính sinh khả dụng thấp, độ tan trong nước kém (0,8 mg/ml) và kích thước phân tử lớn.

Nhiều nghiên cứu khoa học đã tập trung phát triển các hệ mang thuốc nhằm nâng cao sinh khả dụng, tăng độ hòa tan và độ ổn định của rutin, như tiểu phân nano polyme, liposom, phytosom, nano lipit rắn, xyclodextrin, tranferosom, pharmacosom, nano nhũ tương.

Zahra H. và cộng sự (2015) đã tạo ra các phức hợp nanophytosom tải rutin với mục đích cải thiện đặc tính chống oxy hóa và sinh khả dụng của nó. Kết quả phân tích kích thước hạt chỉ ra rằng các tế bào nano được điều chế bằng rutin và phosphatidylcholin (PC) có kích thước hạt trong phạm vi 99-123nm và việc tăng tỷ lệ PC không làm thay đổi đáng kể kích thước của nanophytosom ($P > 0,05$). Tuy nhiên, kích thước hạt của các nanophytosom này không ổn định và kích thước nanophytosom đã tăng lên tới 14 μm trong bảy ngày của thời gian lưu trữ.

Gần đây, Ravi G.S. và cộng sự (2018) đã phát triển một phức hợp nano lipit-thuốc của rutin: egg phosphatidylcholin (EPC) để tăng khả năng hấp thụ và sinh khả dụng rutin trong nghiên cứu tác động của phức hợp lên hoạt động chống oxy hóa và bảo vệ gan. Kết quả cho thấy các phức hợp nano rutin đã cải thiện đáng kể khả năng hòa tan và giải phóng thuốc *in vitro*, khả năng chống oxy hóa tốt hơn *in vitro* cũng như sự ổn định *in vitro* trong môi trường pH khác nhau. Nghiên cứu *in vivo* cho thấy hoạt động bảo vệ gan tốt hơn của phức hợp nano rutin so với rutin tinh khiết ở cùng mức liều điều trị với sinh khả dụng đường uống được cải thiện. Các kết quả thu được từ khả năng hòa tan, hoạt động bảo vệ gan và nghiên cứu sinh khả dụng đường uống đã chứng minh hiệu quả tốt hơn của phức hợp nano rutin so với thuốc nguyên chất. Với giải pháp này tạo các cấu trúc hạt không đồng nhất dao động từ 50 đến 517 nm, không ổn định lâu dài, vẫn cần phải cải tiến để có thể ứng dụng thực tế.

Nguyễn và cộng sự (2018) đã nghiên cứu bào chế phytosom rutin, là phức hợp của rutin và phospholipit, có ưu điểm trong việc tăng sinh khả dụng đường uống và thẩm thấu qua da của rutin. Mặc dù hoạt tính sinh học của hạt đã đạt được nhưng kích thước lớn và độ bền của hạt thấp (kích thước tiêu phân 266,4 nm, thế zeta 82,7 mV), vẫn cần phải cải tiến để có thể ứng dụng thực tế.

Mohammad A. và cộng sự (2017) đã phát triển hệ thống nano nhũ tương rutin mới cho thấy hiệu quả đáng kể trong việc chống lại các tế bào ung thư biểu mô tuyến tiền liệt. Sau khi tối ưu hóa, các hạt nano nhũ tương rutin có kích thước lần lượt là 70,09 nm và 86,84 nm, thế zeta từ -15 mV đến -17 mV, điều này cho thấy sự ổn định của cả công thức và bề mặt mang điện tích âm của chất mang thuốc, tuy nhiên với mức điện thế này hạt chưa ổn định được lâu dài, cần phải cải tiến để có thể ứng dụng thực tế.

Đã biết Công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Việt Nam số 61560 A (tương ứng với đơn số 1-2018-03210) đã đề cập đến quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano rutin, trong đó quy trình này bao gồm các bước: chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho hoà tan rutin trong etanol theo tỷ lệ 5:100 (g/mL); chuẩn bị hỗn hợp chất mang PEG/EG theo tỷ lệ 4:10 (g/mL); và phối trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang PEG/EG và chất nhũ hóa lexitin theo tỷ lệ rutin:PEG:lexitin là 5:7:10 (g/g/mL) vào thiết bị tạo nhũ, để qua đêm và ly tâm hệ vi nhũ tương nano rutin. Tuy nhiên, quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano rutin trong sáng chế này có nhược điểm là hàm lượng rutin đưa vào chỉ đạt tối đa 5%, quy trình làm phức tạp tốn nhiều thời gian.

Tác giả Phan Nguyễn Quỳnh Anh trong Luận án tiến sỹ kỹ thuật “Nghiên cứu tạo hệ nano từ rutin”, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Trường Đại học Bách Khoa, 2017, công bố trên webside www.phucvu.thuvientphcm.gov.vn ngày 01/8/2017 đã bộc lộ quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano rutin, trong đó sử dụng etanol để hoà tan rutin, dung dịch nhũ hoá Tween, chất hoạt động bề mặt PEG để thu được hệ vi nhũ tương nano rutin. Tuy nhiên, quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano rutin trong tài liệu này chỉ tạo được huyền phù 5% rutin và hạt có kích thước trung bình 248 nm khi sử dụng điều kiện đồng hóa tương tự trong 10 chu kỳ. Để tăng độ bền sa lắng của huyền phù nano rutin, chitosan được thêm vào để bao bọc hạt. Bằng cách dùng đồng hóa cao áp APV2000 ở

700 bar trong vòng 15 chu kỳ, kết quả cho thấy kích thước hạt đạt 237 nm. Để tăng độ cứng của mạng chitosan, sodium tripolyphosphate (STPP)/ glutaraldehyde cũng được cho vào như là tác nhân liên kết ngang và kích thước đạt khoảng 190-230 nm. Toàn bộ các quy trình sáng chế đưa ra hạt thu được có kích thước lớn hơn 150nm. Hơn nữa, cả hai hệ (STPP và glutaraldehyde) độ bền sa lắng chỉ đạt được trong thời gian 6 tháng lưu trữ, chưa đảm bảo độ ổn định lâu dài của hạt.

Đã biết Công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Việt Nam số 64746 A (tương ứng với đơn số 1-2019-02608) đã đề cập đến quy trình sản xuất nano cannabidiol (CBD) cải tiến bao gồm các bước: (i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho CBD hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ khối lượng CBD: thể tích dung môi etanol là 8:10 ở tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C 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°C đến 80°C, khuấy đều; (iii) bổ sung chất mang vào pha phân tán theo tỷ lệ 60:40 theo khối lượng, tiếp tục gia nhiệt pha phân tán đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút; (iv) nhũ hóa bằng cách: khi nhiệt độ đạt 100°C, bổ sung TWEEN 80 và ACRY SOL K-140 (dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40) tỉ lệ 30:70 theo khối lượng vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu ở bước (iii) theo tỷ lệ 60: 40 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 2h, kiểm soát chất lượng sản phẩm tạo thành cho đến khi kiểm tra thấy trong suốt, dừng phản ứng, hạ nhiệt độ từ từ 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 ở 30Mpa; (vi) lọc sản phẩm bằng cách bơm qua hệ thống lọc nano trước khi chiết rót đóng gói; trong đó cỡ hạt của hệ vi nhũ tương nằm trong khoảng từ 15 đến 40nm. Tuy nhiên, Công bố đơn yêu

cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế này chỉ bộc lộ việc áp dụng cho sản xuất nano cannabidiol mà không đề cập đến việc sản xuất hệ vi nhũ tương nano rutin.

Vì vậy, cần thiết có quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương có các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ hơn 50nm, đồng đều, khả năng hòa tan tốt hơn trong nước và vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính rutin trong quá trình nano hóa.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano rutin tạo các hạt có kích thước nhỏ hơn 50nm, 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 rutin, cụ thể là tăng khả năng hấp thu và tăng sinh khả dụng.

Để đạt được mục đích nêu trên, quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano rutin theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

(i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho rutin hòa tan trong dung môi ethanol với tỷ lệ khối lượng rutin: thể tích dung môi ethanol (g/ml) là 8:10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt và giữ nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ;

(ii) chuẩn bị chất mang bằng cách gia nhiệt PEG (polyetylen glycol) dạng lỏng đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C, khuấy đều;

(iii) bổ sung chất mang vào pha phân tán theo tỷ lệ 3:1 theo khối lượng, tiếp tục giữ nhiệt độ hỗn hợp chất mang và pha phân tán nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút trong môi trường hút chân không;

(iv) nhũ hóa bằng cách: gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu ở bước (iii) cho đến khi nhiệt độ đạt 60°C, bổ sung dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 (PEG-40 Hydrogenated Castor Oil) và Tween theo tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 3:1,5 đến 4:1 vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán theo tỷ lệ 6:4 theo khối lượng, tiếp tục khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C, trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 giờ đến 5 giờ,

kiểm soát chất lượng sản phẩm được tạo thành 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 thời gian từ 30 đến 60 phút cho đến khi nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C; tiến hành nhũ hóa trong thiết bị tạo nhũ toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút;

(v) Hỗn hợp thu được được làm lạnh đến 25°C và được bơm bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm (Ultrasonic Atomizer Nozzle) ở tần số 60Hz, 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 nano rutin thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích (A) và rutin đã biết (B);

Hình 2 là ảnh kết quả phổ đo TEM kích thước hạt nano rutin thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano rutin theo giải pháp hữu ích được thực hiện như sau:

(i) Bước thứ nhất: chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho rutin hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ khối lượng rutin: thể tích dung môi etanol (tính theo g/ml) là 8:10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt và giữ nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ.

Việc gia nhiệt tạo điều kiện để pha phân tán có thể kết hợp với chất mang PEG tốt hơn. Việc sử dụng khuấy và gia nhiệt để tạo rutin phân tán tốt hơn, khi tác giả thử nghiệm với nhiều điều kiện khuấy và nhiệt độ khác nhau cho thấy với 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°C đến 60°C thì pha phân tán rutin là tốt hơn và kết hợp với chất mang PEG tốt hơn.

(ii) Bước thứ hai: chuẩn bị chất mang bằng cách gia nhiệt PEG (polyetylen glycol) dạng lỏng, trong đó PEG chiếm từ 40 đến 60% khối lượng hỗn hợp PEG và nước, đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C, khuấy đều.

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các quá trình vận chuyển thuốc có thể được nâng cao hiệu quả nhờ những hệ dẫn thuốc có nguồn gốc từ các loại polyme: polyme thiên nhiên ưa nước như protein (gelatin, albumin), polysacarit (alginat, dextran, chitosan), polyme tổng hợp kỵ nước như polyeste (poly (ϵ -capprolacton), poly axit lactic, poly axit lactic-cô-glycolic, cũng như 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 3:1 theo khối lượng), tiếp tục giữ nhiệt độ hỗn hợp chất mang và pha phân tán nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút trong môi trường hút chân không.

(iv) Bước thứ tư: nhũ hóa bằng cách: gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu được ở bước (iii) cho đến khi nhiệt độ đạt 60°C, bổ sung dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 và Tween theo tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 3:1,5 đến 4:1 vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán theo tỷ lệ 6:4 theo khối lượng, tiếp tục khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 giờ đến 5 giờ, kiểm soát chất lượng sản phẩm được tạo thành bằng cách 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 từ từ trong thời gian từ 30 đến 60 phút cho đến khi nhiệt độ còn 40°C đến 60°C. Sau đó tiến hành nhũ hóa trong thiết bị tạo

nhũ toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút.

Bằng các nghiên cứu lý thuyết và thực nghiệm, các tác giả giải pháp hữu ích nhận thấy rằng để sản xuất nano rutin tan tốt trong nước, thì hệ vi 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 giải pháp hữu ích đã lựa chọn chất nhũ hóa là dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40, bởi vì dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 là chất thân nước, không có độc tính và có độ an toàn cao. Các tác giả giải pháp hữu ích đã tiến hành rất nhiều thử nghiệm để xác định được với tỷ lệ hỗn hợp chất mang và pha phân tán PEG: dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 là 4:6 để hình thành các mạch polyme bền vững.

Do chất nhũ hóa 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 rutin và hỗn hợp chất mang. Phần thân dầu của dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 tạo liên kết với rutin và phần thân nước của dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 tạo liên kết với phần thân nước của hỗn hợp chất mang PEG, nên đã tạo ra các hạt tiểu phân nano rutin và với cấu trúc này bảo vệ tốt hoạt tính rutin.

Như vậy, việc tạo hệ vi nhũ tương nano rutin bằng cách thực hiện kết hợp khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 giờ đến 5 giờ, sau đó tiến hành nhũ hóa trong thiết bị nhũ toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, với tốc độ khuấy nằm trong khoảng 400 đến 800 vòng/phút.

Hệ vi nhũ tương thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích có độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 7,4. Với giá trị độ pH này, các hạt tiểu phân tồn tại ổn định do trong môi trường trung tính này liên kết giữa rutin và vật liệu mang được giữ trong quá trình phân tán, trong khi hệ vi nhũ có độ pH <7 thì liên kết này suy yếu dẫn đến hạt nano rutin sẽ bị phá hủy trong đường tiêu hóa.

Hệ vi nhũ tương nano rutin thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích có chỉ số cân bằng ưa nước – ưa béo viết tắt là HLB, nằm trong khoảng từ 13 đến 18 là hệ vi

nhũ tương thân nước. Hệ vi nhũ tương này có các hạt tiểu phân chứa rutin thân nước, không kết dính, kích thước của các hạt ổn định nằm trong khoảng từ 10 đến 50nm, nên có thể thâm nhập dễ dàng qua màng tế bào để phát huy hiệu quả và tăng độ hòa tan của rutin trong nước, từ đó làm tăng tính sinh khả dụng của chất.

(v) Bước thứ năm: Hỗn hợp thu được được làm lạnh đến 25°C và được bơm bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm (Ultrasonic Atomizer Nozzle) ở tần số 60Hz, 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 giải pháp hữu ích

Ví dụ: Sản xuất 150g hệ vi nhũ tương nano rutin

Chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho 8g rutin hòa tan trong 10g dung môi etanol 96° bằng máy khuấy có tốc độ 400 vòng/phút, kết hợp gia nhiệt và giữ nhiệt ở nhiệt độ 40°C 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 (dung môi etanol 96° bay hơi một phần trong quá trình khuấy gia nhiệt).

Chuẩn bị chất mang: 45g PEG dạng lỏng, trong đó gồm 20g PEG và 25g nước, được gia nhiệt đến 60°C, khuấy đều bằng máy khuấy từ gia nhiệt IKA C-MAG HS 7 công suất 1000 W.

Bổ sung 45g chất mang vào 15g pha phân tán đã chuẩn bị ở trên (tỷ lệ chất mang: pha phân tán là 3:1 theo khối lượng), tiếp tục gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đến 60°C, khuấy với tốc độ 600 vòng/phút trong môi trường hút chân không bằng máy khuấy từ gia nhiệt IKA C-MAG HS 7 công suất 1000 W. Thu được 60g hỗn hợp chất mang và pha phân tán.

Sau đó, gia nhiệt 60g hỗn hợp chất mang và pha phân tán thu được cho đến khi nhiệt độ đạt 80°C, bổ sung 90g ACRY SOL K-140 và Tween (trong đó gồm 70g ACRY SOL K-140 và 20g Tween) vào 60g 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 80°C trong thời gian trong 5 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 từ từ trong thời gian nằm trong khoảng từ 30 phút đến 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 nhũ IKA T25 DIGITAL ULTRA- TURRAX công suất 800W.

Hỗn hợp thu được được làm lạnh đến 25°C và được bơm bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm (Ultrasonic Atomizer Nozzle) ở tần số 60Hz. Trước khi chiết rót, sản phẩm được bơm qua hệ thống lọc nano (gồm màng lọc đường kính lỗ 1µm, kết hợp bơm áp xuất cao *Leybold*, 250-600bar (từ 25 đến 60MPa), lưu lượng bơm nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10ml/phút) nhằm mục đích loại bỏ lượng rutin dư không tạo thành hạt tiểu phân, thu được hệ vi nhũ tương nano rutin phân tán tốt trong nước.

Bằng phương pháp đo phổ bằng UV-vis các tác giả giải pháp hữu ích đã nhận thấy là vị trí các pick của rutin nguyên liệu và hệ vi nhũ tương nano rutin hoàn toàn trùng khớp. Điều này cho thấy hệ vi nhũ tương thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính rutin trong quá trình nano hóa. Sử dụng phương pháp đo phổ bằng UV-Vis để định lượng hàm lượng rutin trong hệ vi nhũ. Kết quả cho thấy nồng độ rutin trong hệ vi nhũ tương nano rutin nằm trong khoảng từ 19% đến 19,5%.

Tiến hành đo kích thước hạt nano rutin bằng kính hiển vi điện tử quét TEM (**Kính hiển vi điện tử truyền qua** - *transmission electron microscopy*, viết tắt: TEM) được thể hiện theo Hình 2 cho thấy kích thước hạt dao động từ nằm trong khoảng từ 10nm đến 50nm chiếm tỉ lệ gần như tối đa 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. Hạt nano rutin được xác định điện tích bề mặt và đo độ phân bố hạt bằng cách sử dụng máy Dynamic Light Scattering system (DLS, Zetasizer Ver. 6.20, Malvern Instruments, Hoa Kỳ).

Trong DLS, ánh sáng đi qua mẫu, và ánh sáng tán xạ được phát hiện và ghi nhận ở một góc độ nhất định. Kết quả đo trên máy DLS cho thấy hạt nano rutin thu được có kích thước chủ yếu đạt 10-50 nm.

Như vậy, các kết quả kích thước hạt nano rutin sử dụng DLS là phù hợp với kết quả TEM.

Thế zeta hay điện thế động: Độ tích điện bề mặt của hạt nano ảnh hưởng đến độ bền của hạt trong dung dịch cũng như sự tương tác của hạt với tế bào. Về mặt lý thuyết, thế zeta được sử dụng như một tiêu chí để đánh giá độ bền. Thế zeta là điện thế giữa pha phân tán và môi trường phân tán. Hạt nano rutin được xác định điện tích bề mặt và đo độ phân bố hạt bằng cách sử dụng máy DLS. Theo lý thuyết, các hạt có thế zeta > -40 mV được xem là bền (Qiu và cộng sự, 2016). Trong quy trình này, thế zeta của nano rutin đạt ≥ -40 mV, cho thấy hạt nano rutin thu được có độ bền tốt.

Kích thước (nm, theo TEM)	Kích thước (nm, theo DLS)	Thế zeta (mV)	Độ ổn định (tháng)	Tính tan trong nước
10-80	10-80	-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, thu được hệ vi nhũ tương có các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ (từ 10nm đến 50 nm), 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 rutin đã biết và nano rutin thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó bình A thể hiện nano rutin phân tán trong nước thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích, bình B thể hiện rutin đã biết phân tán trong nước. Nano rutin thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích phân tán hoàn toàn trong nước tạo dung dịch màu vàng trong suốt, đồng nhất.

Theo Hình 2, là kết quả ảnh phổ đo TEM kích thước hạt nano rutin thu được bằng quy trình giải pháp hữu ích, ta thấy kích thước hạt trung bình dao động trong khoảng 10-50nm

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano rutin theo giải pháp hữu ích đã thành công trong việc sản xuất hệ vi nhũ tương có các hạt tiểu phân nano rutin có kích thước nhỏ, từ 10 đến 50nm, đồng đều và khả năng hòa tan tốt trong nước mà vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính rutin trong quá trình nano hóa.

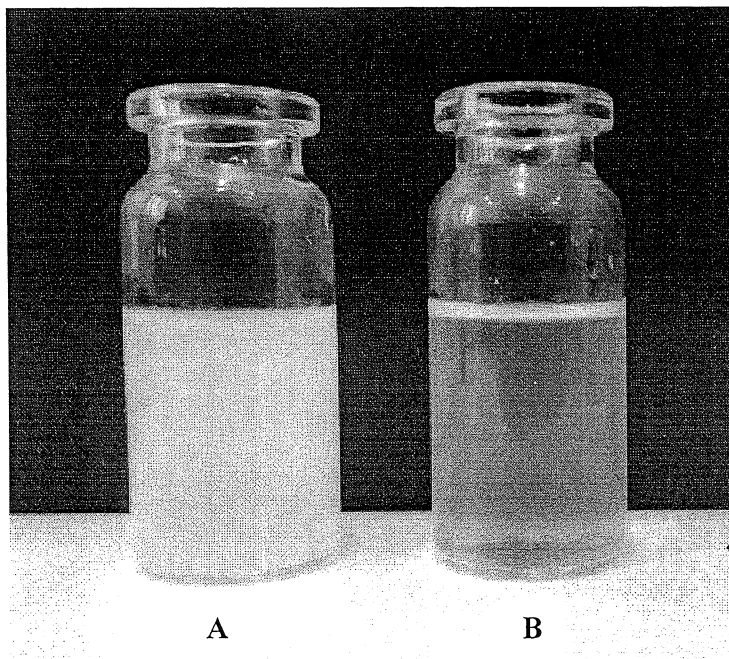
Các chất được sử dụng trong quy trình sản xuất nano rutin phân tán tốt trong nước có độ an toàn cao, không độc hại và ít tác dụng phụ, nên hệ vi nhũ tương nano rutin thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích có độ an toàn cao khi sử dụng.

Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản, dễ thực hiện và phù hợp với các điều kiện thực tế hiện nay của nước ta.

Yêu cầu bảo hộ

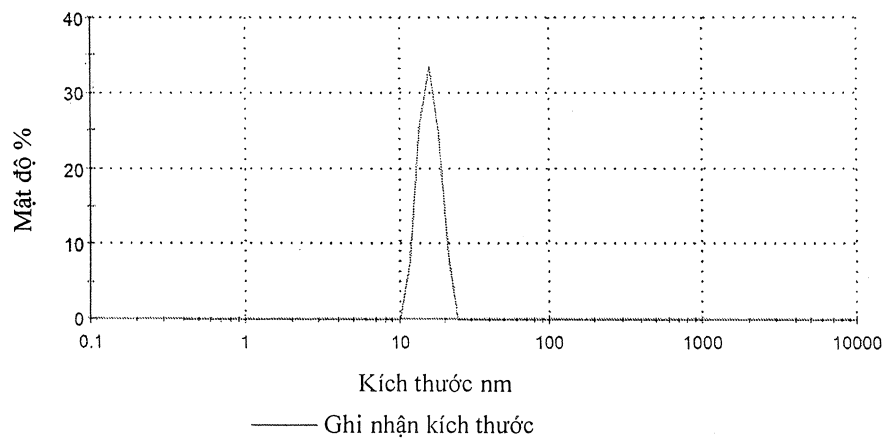
1. Quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano rutin bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho rutin hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ khối lượng rutin: thể tích dung môi etanol (g/ml) là 8:10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt và giữ nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ;
- (ii) chuẩn bị chất mang bằng cách gia nhiệt PEG (polyetylen glycol) dạng lỏng đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C, khuấy đều;
- (iii) bổ sung chất mang vào pha phân tán theo tỷ lệ 3:1 theo khối lượng, tiếp tục giữ nhiệt độ hỗn hợp chất mang và pha phân tán nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút trong môi trường hút chân không;
- (iv) nhũ hóa bằng cách: gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu được ở bước (iii) cho đến khi nhiệt độ đạt 60°C, bổ sung dầu thầu dầu hydro hóa PEG-40 (PEG-40 Hydrogenated Castor Oil) và Tween theo tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 3:1,5 đến 4:1 vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán theo tỷ lệ 6:4 theo khối lượng, tiếp tục khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C, trong môi trường chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 80°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 giờ đến 5 giờ, kiểm soát chất lượng sản phẩm tạo thành 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 thời gian từ 30 đến 60 phút cho đến khi nhiệt độ còn nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C; tiến hành nhũ hóa trong thiết bị tạo nhũ toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút;
- (v) hỗn hợp thu được được làm lạnh đến 25°C và được bơm bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm ở tần số 60Hz, lọc sản phẩm bằng cách bơm qua hệ thống lọc nano trước khi chiết rót đóng gói.



Hình 1

Phổ phân bố kích thước theo mật độ



Hình 2