



(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)** (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



2-0003274

(51) **A61K 31/00; A61K 9/127; B82Y 5/00; A61K** (13) **Y**
2021.01 9/10

(21) 2-2022-00246 (22) 03/01/2020
(67) 1-2020-00059
(45) 25/08/2023 425 (43) 27/04/2020 385ASC
(73) Lại Nam Hải (VN)
25A đường 5, khu phố 1, phường Linh Đông, quận Thủ Đức, TP. Hồ Chí Minh
(72) Đặng Thị Hồng Ngọc (VN); Lại Nam Hải (VN).
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ PADEMARK (PADEMARK CO.,LTD.)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT HỆ LIPOSOM NANO TANSINON IIA DÙNG CHO THỰC PHẨM VÀ DƯỢC PHẨM

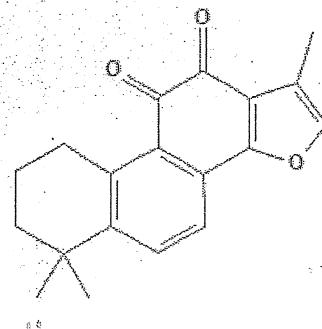
(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hệ liposom nano Tanshinon IIA dùng cho thực phẩm và dược phẩm bao gồm các bước: (i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho Tanshinon IIA hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ khối lượng Tanshinon IIA: dung môi etanol là 8:10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 8 giờ; (ii) chuẩn bị chất mang liposom gồm lexitin và dầu ôliu với tỷ lệ 1:3 theo khối lượng được trộn trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C để đảm bảo lexitin hòa tan hoàn toàn trong dầu, khuấy đều; (iii) bổ sung chất mang vào pha phân tán theo tỷ lệ 40:60 theo khối lượng, tiếp tục gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 800 đến 1000 vòng/phút trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ; (iv) làm lạnh hỗn hợp thu được đến 25°C và bơm hỗn hợp đã lạnh bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm ở tần số 60Hz, có kích thước giọt nằm trong khoảng từ 10 đến 20µm, vào một thể tích nước cất nằm trong khoảng từ 1 đến 1,5 lít, với nhiệt độ nước cất nằm trong khoảng từ 23 đến 26°C, thu được huyền phù liposom - nước; (v) đồng hóa hỗn hợp huyền phù liposom - nước bằng cách bơm qua hệ thống đồng hóa áp lực cao 30Mpa để thu được hệ liposom nano Tanshinon IIA là hỗn hợp đồng nhất, ổn định, đảm bảo kích thước hạt <200nm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hệ liposom nano Tanshinon IIA dùng cho thực phẩm và dược phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Tanshinon IIA (1,6,6-trimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[1,2-g][1]benzofuran-10,11-dione) được chiết xuất từ rễ của cây đan sâm hay *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen) thuộc họ Labiatae. Đan sâm đã được sử dụng rộng rãi ở các nước phương Đông, đặc biệt là Trung Quốc, để điều trị bệnh rối loạn liên quan đến tuần hoàn khác nhau do tác dụng dược lý đặc biệt của nó, bao gồm giãn mạch, thuốc chống đông máu, chống viêm, và làm giảm gốc tự do. Tanshinon IIA giúp điều chỉnh hoặc ngăn ngừa sự di căn của tế bào ung thư bằng cách điều chỉnh các phân tử bám dính. Ngoài ra các nghiên cứu khác đã chứng minh Tanshinon IIA có khả năng chống viêm và chống oxi hóa mạnh. Tuy nhiên, Tanshinon IIA có sinh khả dụng thấp, nghiên cứu của Lu Xing và các cộng sự năm 2017 đã chứng minh sinh khả dụng của Tanshinon IIA qua đường uống thấp ảnh hưởng đến khả năng ứng dụng lâm sàng của chất.



Do đó cải thiện khả năng hấp thu, tăng sinh khả dụng của chất này là rất cần thiết. Áp dụng công nghệ nano là một ứng dụng công nghệ mới để tạo hệ dẫn thuốc và tăng sinh khả dụng của chất. Đặc biệt là ứng dụng hệ liposom là hệ mới với cấu trúc bao gồm những tiểu phân tử hình cầu và kích thước rất nhỏ (nano), lõi của nó chứa các hoạt chất dinh dưỡng và được bao bọc phía ngoài bởi một hoặc nhiều lớp màng photpholipit kép, có khả năng chứa, bảo vệ, vận chuyển và giải phóng những hoạt chất đến những vị trí

mong muốn trong cơ thể một cách chính xác và đúng liều lượng. Tanshinon IIA được gói trong hệ dẫn thuốc nano giúp vận chuyển chất đến đích một cách chọn lọc, hiệu quả và tiết kiệm dược chất. Ở nước ta, công nghệ nano trong y sinh học vẫn còn mới, chưa có nhiều ứng dụng nhưng đã thu hút rất nhiều sự quan tâm nghiên cứu. Các nghiên cứu phổ biến nhất hiện nay là về ứng dụng của nano curumin và các hệ vận chuyển thuốc đến tế bào đích, chưa có nghiên cứu về chế tạo nano Tanshinon IIA. Sử dụng hệ liposom tạo hạt nano để mang thuốc và nhả thuốc là hướng mới để điều trị bệnh và ứng dụng trong các sản phẩm khác.

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN104352438A công bố ngày 18/2/2015 với tên là “Dược phẩm kết hợp liposom Tanshinon IIA, cũng như quy trình sản xuất công nghiệp quy mô lớn và ứng dụng của dược phẩm này (Tanshinone II A liposome combination drug, as well as large-scale industrial production process and application thereof) đã đề cập đến quy trình sản xuất liposom Tanshinon IIA sử dụng dung môi etanol, chất mang là lexitin tạo ra các hạt có kích thước từ 50nm đến 150nm, đây là quy trình về tạo hệ liposom Tanshinon IIA dùng trong dược phẩm. Quy trình chuẩn hóa để điều chế lipid tanshinone IIA của thuốc gồm 7 bước: (1) 10% xylitol được hòa tan trong dung dịch đệm photphat, khử trùng bằng hơi nước, 121 độ C, 20 phút, khi dung dịch nhiệt độ là 20-25 độ C, lọc qua màng siêu lọc phân tử cắt 1000D; ở nhiệt độ phòng, dung dịch gạn qua siêu lọc thu được chia thành dung dịch A, B, lần lượt được dùng natri hydroxit tinh khiết phân tích điều chỉnh pH, màng có độ mở nhỏ hơn 0,05 μm , loại bỏ kết tủa hạt không tan, sau đó điều chỉnh pH 5,0-8,0 chỉnh bằng dung dịch axit clohydric tinh khiết, (2) dung dịch A trong máy sấy phun khô, nhiệt độ phòng, trộn phun, nhiệt độ nhập, thu bột khô dạng hạt xốp; Khô hoàn toàn, (3) khuấy và hòa tan trong thuốc thô hòa tan trong tanshinone IIA, phospholipid, phospholipid phân tán dimercaprol vào ethanol được thêm lần lượt, tạo thành dung dịch tỷ lệ 1,0 đến 1,2, qua màng siêu lọc của phân tử cắt 1000D, lỗ lọc màng 0,05 μm , loại bỏ pyrogen, khuẩn, hạt không hòa tan; (4) chế phẩm làm khô hạt của dung dịch A (2) đưa vào máy tráng hạt đang sôi, bằng cách tráng sôi và làm khô thoáng khí, đầu tiên chia ba phần bằng dung dịch ethanol

phospholipid bằng nhau. Mẫu ở bước 3 đưa vào được biến đổi thành dạng khan trong đáy thiết bị, vô trùng, không chứa dầu, ở nhiệt độ phòng luồng không khí nitơ tinh khiết, hạt có đường kính hạt lớn hơn 0,001 μm , ở 40 độ C / 65 độ C, lớp phủ ở trạng thái sôi được thực hiện đến khi hạt khô của xyloza, hỗn hợp khí nitơ tinh khiết sạch được nén trong vòi phủ ở phần giữa của máy bơm, được phun lên đun sôi trong máy, dòng xylitol vật liệu 400mm-450mm, ở hạt vật liệu sôi lớp phủ bề mặt, khi đun sôi trộn và phân tán hạt đều nhau, và làm cho dung môi bay hơi nhanh, lớp phủ dung dịch còn chất lỏng của monophosphatide đầu tiên hoàn thành, khô thoáng trong 15 phút, dung dịch B được chuẩn bị bước đầu tiên được chia làm ba phần, 1/3 dung dịch của thể tích phần thứ nhất của dung dịch B khan, vô trùng, không chứa dầu, ở điều kiện nitơ tinh khiết không có hạt đường kính lớn hơn 0,001 μm , sau khi phủ, để khô 20 phút, thực hiện quy trình làm khô, thực hiện quá trình làm khô lớp phủ luân phiên của chất lỏng phospholipid và dung dịch B, coatin lớp ngoài cùng là lớp nitrua khô của vi hạt xylitol, lần thứ ba sau khi phủ, và độ ẩm còn lại $\leq 1,0\%$ trong vật liệu đã làm khô của lớp phủ thu được, dimercaprol còn lại $\leq 0,2\%$, (5) trong bể chứa hợp chất vật liệu, thêm isopyknic để phun dung dịch muối axit photpho phun ở bước đầu tiên, bơm cân bằng nitơ và áp suất bên ngoài bể duy trì ở mức bằng nhau và tốc độ trộn dưới 100 vòng / phút, được làm nóng đến 60 ± 5 độ C; Tốc độ điều chỉnh của máy khuấy là 500-700 vòng / phút, trong bể được bơm hơi bằng nitơ, trong 30 phút đến 60 phút; Sau khi thêm chất khô của lớp phủ, trong bể được bơm hơi với môi trường nitơ, giữ nhiệt độ $60 \pm 5^\circ\text{C}$, và giữ 60-120 phút trong điều kiện khuấy ở tốc độ 100 vòng / phút; Trong điều kiện khuấy ở tốc độ 100 vòng / phút, thuốc dạng lỏng bên trong bể được làm lạnh đến 30-40 độ C; Khi khuấy lại ở 100 vòng / phút, thêm glutathion chống oxy hóa và natri dehydrocholat tương ứng và hòa tan hoàn toàn, và điều chỉnh pH của chất lỏng thuốc 5,0-8,0; (6) giữ nhiệt độ chất lỏng trong phạm vi 30 ± 5 độ C, dưới áp suất nitơ 0,1-0,2Mpa, chất lỏng thu được của bước 5 lọc màng 0,15 μm , thu được chất lỏng liposome có đường kính hạt 150nm; Thực hiện tiêm đông khô kích thước hạt nanomet. (7) lọc hạt Lipid lớn hơn 150nm bằng màng lọc (6) các chất giữ lại ở bước lọc được rửa sạch xử lý lại bằng thao tác bước 1. Với các bước thực hiện và chất nêu trên

trong 7 bước thực hiện. Quy trình thực hiện phức tạp cần xử lý lạnh nito lỏng liên tục kết hợp nghiền, lọc,... khó thực hiện ở mô hình sản xuất thực tế với nito.

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN102697664A với tên là “Lipidosom Tanshinon và phương pháp điều chế của chúng (Tanshinone lipidosome and preparation method thereof) đề cập đến quy trình tạo ra các hạt liposom nhỏ hơn 200nm, đây là quy trình ứng dụng trong sản phẩm mỹ phẩm sử dụng các chất hoạt động bề mặt, không dùng được cho thực phẩm và dược phẩm.

Tác giả LIU JIANPING và cộng sự trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN1215839C đã đề cập đến phương pháp điều chế hạt nano lipid rắn của tanshinon, đã tạo ra đường kính trung bình của các hạt nano lipid rắn tanshinon là 119,7nm, kích thước hạt 95% dưới 130nm. Với sáng chế này hạt tạo ra vẫn lớn hơn 100nm, và hiệu suất đóng gói chỉ đạt 81,60%.

Tác giả XINGMU GUO và cộng sự trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN102688151B đã đề cập đến phương pháp điều chế hệ vi nhũ micro của tanshinon, đã tạo ra kích thước hạt dưới 100nm nhưng quy trình phức tạp không thể áp dụng trong sản xuất công nghiệp.

Công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Việt Nam số 63898 A (tương ứng với đơn số 1-2019-00610) ngày 25/6/2019 đã đề cập đến quy trình sản xuất hệ liposom chứa canabidiol (CBD) bao gồm các bước: (i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho CBD hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ khối lượng CBD: thể tích dung môi etanol là 8:10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 8 giờ; (ii) chuẩn bị chất mang gồm lexitin và dầu ôliu với tỉ lệ 1:3 theo khối lượng được trộn trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C để đảm bảo lexitin hòa tan hoàn toàn trong dầu, khuấy đều; (iii) bổ sung chất mang vào pha phân tán theo tỷ lệ 40:60 theo khối lượng, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 800 đến 1000 vòng/phút trong thời gian

nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ; (iv) làm lạnh hỗn hợp thu được đến 25°C và phun bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm ở tần số 60 Hz, có kích thước giọt nằm trong khoảng từ 10 đến 20 μm , công suất phun 10 ml/ phút, vào một thể tích nước cất nằm trong khoảng từ 1 đến 1,5 lít, với nhiệt độ nước cất ở 25°C, thu được huyền phù liposom - nước; (v) đồng hóa hỗn hợp huyền phù liposom - nước bằng cách bơm qua hệ thống đồng hóa áp lực cao 30 Mpa để thu được hệ liposom nano CBD là hỗn hợp đồng nhất, ổn định, đảm bảo kích thước hạt < 200nm. Tuy nhiên Công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế số 63898 A này không đề cập đến quy trình sản xuất hệ liposom nano Tanshinon IIA.

Tài liệu “MỘT SỐ CHUYÊN ĐỀ VỀ BẢO CHẾ HIỆN ĐẠI, Nhà xuất bản Y học, 2005” đã đề cập đến phương pháp bào chế hệ liposom trong đó đề cập đến chất mang lexitin, dung môi etanol cũng như đặc điểm về tính tan của dược chất (tan trong nước và dầu). Tuy nhiên Tài liệu này không đề cập đến quy trình sản xuất hệ liposom nano Tanshinon IIA.

Do đó có nhu cầu về quy trình sản xuất hệ liposom nano Tanshinon IIA dùng cho thực phẩm và dược phẩm có các hạt tiểu phân liposom có kích thước nhỏ hơn 200nm, đồng đều, khả năng hòa tan tốt hơn trong nước và vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính Tanshinon IIA 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 liposom nano Tanshinon IIA dùng cho thực phẩm và dược phẩm nhằm khắc phục các nhược điểm của quy trình đã biết để tạo các hạt có kích thước nhỏ hơn 200nm, 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 Tanshinon IIA, 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 liposom nano Tanshinon IIA dùng cho thực phẩm và dược phẩm theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

(i) Bước 1: chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho Tanshinon IIA hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ khối lượng Tanshinon IIA: dung môi etanol là 8:10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 8 giờ;

(ii) Bước 2: chuẩn bị chất mang liposom gồm lexitin và dầu ôliu với tỉ lệ 1:3 theo khối lượng được trộn trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C để đảm bảo lexitin hòa tan hoàn toàn trong dầu, khuấy đều.

(iii) Bước 3: bổ sung chất mang liposom vào pha phân tán theo tỷ lệ 40:60 theo khối lượng, tiếp tục gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 800 đến 1000 vòng/phút trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ.

(iv) Bước 4: làm lạnh hỗn hợp thu được đến 25°C và bơm hỗn hợp đã làm lạnh bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm ở tần số 60 Hz, có kích thước giọt nằm trong khoảng từ 10 đến 20 μ m, vào một thể tích nước cất nằm trong khoảng từ 1 đến 1,5 lít, với nhiệt độ nước cất nằm trong khoảng từ 23 đến 26°C, thu được hỗn hợp huyền phù liposom - nước;

(v) Bước 5: đồng hóa hỗn hợp huyền phù liposom - nước bằng cách bơm qua hệ thống đồng hóa áp lực cao 30Mpa để thu được hệ liposom nano Tanshinon IIA.

Mô tả các văn tắt hình vẽ

Hình 1 là ảnh so sánh khả năng phân tán trong nước giữa Tanshinon IIA đã biết và nano Tanshinon IIA thu được bằng quy trình sản xuất hệ liposom nano Tanshinon IIA dùng cho thực phẩm và dược phẩm theo giải pháp hữu ích.

Hình 2 là ảnh phổ đo TEM kích thước hạt liposom nano Tanshinon IIA thu được bằng quy trình sản xuất hệ liposom nano Tanshinon IIA dùng cho thực phẩm và dược phẩm theo giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất hệ liposom nano Tanshinon IIA dùng cho thực phẩm và dược phẩm theo giải pháp hữu ích được thực hiện như sau:

(i) Bước thứ nhất: chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho Tanshinon IIA hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ khối lượng Tanshinon IIA: dung môi etanol là 8:10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 8 giờ. Tác giả giải pháp hữu ích sử dụng etanol là dung môi có khả năng hòa tan tốt Tanshinon IIA, giúp tạo pha phân tán tốt hơn và tạo điều kiện để pha phân tán có thể kết hợp với chất mang PEG tốt hơn. Việc sử dụng dung môi etanol có gốc hydroxyl (OH-) tạo liên kết với nước, nên có tác dụng ổn định cấu trúc hệ liposom dầu trong nước. Bằng các thử nghiệm, các tác giả giải pháp hữu ích xác định được với tỷ lệ Tanshinon IIA: etanol là 8:10 (theo khối lượng) Tanshinon IIA đạt được độ hòa tan lớn nhất và tránh dư thừa dung môi etanol gây lãng phí. Việc sử dụng khuấy và gia nhiệt để tạo Tanshinon IIA phân tán tốt hơn, khi tác giả thử nghiệm với nhiều điều kiện khuấy và nhiệt độ khác nhau cho thấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C thì pha phân tán Tanshinon IIA là tốt hơn và kết hợp với chất mang PEG tốt hơn.

(ii) Bước thứ hai: chuẩn bị chất mang liposom gồm lexitin và dầu ôliu với tỉ lệ 1:3 theo khối lượng được trộn trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C để đảm bảo lexitin hòa tan hoàn toàn trong dầu, khuấy đều.

Khi sử dụng Tanshinon IIA thường bị phá hủy trong đường tiêu hóa, một phần được hấp thu vào máu, còn lại đa số bị đào thải. Vì vậy cần quy trình sản xuất hạt tiểu phân chứa hoạt chất Tanshinon IIA, với kích thước nhỏ có màng bao sinh học, cấu trúc có độ ổn định, không kết dính và độ hòa tan cao. Bởi vì hệ liposom nano Tanshinon IIA theo giải pháp hữu ích được sử dụng trong các ngành công nghiệp mỹ 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.

Chất hoạt động bề mặt được sử dụng nhằm tạo sự ổn định và đồng nhất cho hệ, ngăn cản sự keo tụ, kết dính của các chất trong hệ, ở đây các tác giả sử dụng lexitin (các phospholipit). Trong quy trình này, các tác giả giải pháp hữu ích sử dụng lexitin từ đậu nành, an toàn cho người sử dụng và có giá thành hợp lý. Công thức phân tử của lexitin theo công bố của Willstatter năm 1918 gồm có axit glyxerophosphoric, axit béo và cholin, 3 thành phần này có thể ghép với nhau theo nhiều cách tạo ra nhiều loại lexitin. Hai phân tử axit béo hấp dẫn nhau nên chúng xếp trên cùng hướng, đầu của axit béo chứa gốc kỵ nước tạo nên phần kỵ nước của lexitin. Liên kết của C₂-C₃ ở gốc glyxerin có thể bị quay vặn đi một góc 180⁰ làm cho nhóm P phân cực nằm về chiều ngược lại với chuỗi axit béo, hình thành đầu ưa nước của lexitin. Do cấu trúc đặc biệt đó mà phân tử lexitin vừa ưa nước vừa kỵ nước (ưa dầu). Đó là ưu điểm để ứng dụng lexitin tạo hệ liposom. Hệ liposom có thể nhốt các hoạt chất hòa tan trong nước (ưa nước) trong khoang chứa nước bên trong và các hoạt chất không tan trong nước (kỵ nước) trong màng hai lớp của chúng. Đặc tính thứ hai làm cho nó có thể sử dụng liposom để tạo thành hạt nano Tanshinon IIA tương thích với nước. Sau nhiều thử nghiệm tác giả chọn lexitin, dầu ôliu với tỉ lệ 1:3 theo khối lượng để tạo được hệ ổn định nhất.

(iii) Bước thứ ba: bổ sung chất mang vào pha phân tán theo tỷ lệ 40:60 theo khối lượng, tiếp tục gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 800 đến 1000 vòng/phút từ 1 đến 2 giờ.

(iv) Bước thứ tư: 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 60 Hz (kích thước giọt từ 10 µm đến 20 µm, công suất phun 10 ml/phút), vào 1 đến 1,5 lít nước cất (nhiệt độ nước cất nằm trong khoảng từ 23 đến 26°C). Hỗn hợp huyền phù liposom - nước được

cô đặc bằng cách cô quay bay hơi ở áp suất nằm trong khoảng từ 20 đến 30mm Hg và nhiệt độ dưới 55°C.

Hạt nano có xu hướng kết tụ để phân tán hạt nano cần phải cung cấp đủ năng lượng để tách các lực liên kết. Sử dụng vòi phun siêu âm là một phương tiện hiệu quả trong việc phân tán hạt nano và giảm kích thước hạt nano, tạo ra các hạt có kích thước nhỏ hơn và kích thước đồng đều hơn. Sự phân tán và phá vỡ sự kết tụ của hạt nano là kết quả của hiện tượng xâm khí thực do sóng siêu âm. Khi siêu âm lan truyền vào trong dung môi, sẽ liên tục tạo ra các chu kỳ xen kẽ giữa áp suất cao và áp suất thấp, điều này tác động lên lực liên kết của hạt nano. Đồng thời, khi hàng loạt các bọt khí vỡ tung sẽ tạo ra một áp lực rất lớn tác động lên chùm hạt nano khiến chúng tách ra khỏi nhau dễ dàng.

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

Sử dụng đánh sóng siêu âm (ultrasonic) giúp tác động lên các hạt nano, làm cho chúng không kết dính lại với nhau, tuy nhiên phương pháp này có nhược điểm là đầu ultrasonic bằng kim loại nên khi siêu âm ở cường độ cao có thể làm sản phẩm nhiễm titan. Để đảm bảo an toàn cho sản phẩm nhóm tác giả đã thử nghiệm và chọn ra tần số 60hz để phân tách hạt nano mà vẫn đảm bảo an toàn cho sản phẩm. Tuy nhiên ở tần số này, sản phẩm nano không duy trì độ ổn định hạt lâu dài, hạn sử dụng của sản phẩm ngắn. Để tăng tuổi thọ và độ ổn định nhóm tác giả tiến hành bơm dung dịch đã thu được ở bước thứ tư qua hệ thống đồng hóa áp lực cao (high pressure homogenizers) 30Mpa để đảm bảo độ đồng đều, ổn định của dung dịch, tăng tuổi thọ cho sản phẩm.

Hệ liposom thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích có độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 7,5. Với giá trị độ pH này, các hạt tiểu phân tồn tại ổn định do trong môi trường trung tính này liên kết giữa Tanshinon IIA và chất mang được giữ trong quá trình

phân tán, trong khi hệ nano liposom có độ pH <7 thì liên kết này suy yếu dẫn đến hạt nano Tanshinon IIA sẽ bị phá hủy trong đường tiêu hóa.

Hệ liposom nano Tanshinon IIA thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích có HLB (hydrophilic lipophilic balance - là độ cân bằng ưa kị nước có giá trị từ 0 đến 40) nằm trong khoảng từ 13 đến 18 là hệ liposom thân nước. Hệ liposom này có các hạt tiểu phân chứa Tanshinon IIA thân nước, không kết dính, kích thước của các hạt ổn định nằm trong khoảng từ 10 đến 200nm, nên có thể thâm nhập dễ dàng qua màng tế bào để phát huy hiệu quả và tăng độ hòa tan của Tanshinon IIA trong nước, từ đó làm tăng tính sinh khả dụng của chất.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ: Sản xuất 1000g hệ liposom nano Tanshinon IIA

Chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho 80g Tanshinon IIA hòa tan trong 100g dung môi etanol bằng máy khuấy từ gia nhiệt KIA – Đức C-MAG HS 4/7/10 với tốc độ 400 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt đến nhiệt độ 50°C trong thời gian 6 giờ thu được 180g pha phân tán.

Chuẩn bị chất mang liposom gồm 30g lexitin và 90 g dầu ôliu được trộn trong bể ổn nhiệt Labtech LWB-106D, 1200 W, ở nhiệt độ 50°C để đảm bảo lexitin hòa tan hoàn toàn trong dầu ôliu, khuấy đều trong 30 phút thu được 120g dung dịch chất mang.

Bổ sung 120g chất mang vào 180g pha phân tán, tiếp tục gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đến nhiệt độ 50°C, khuấy với tốc độ 900 vòng/phút trong thời gian 2 giờ bằng máy khuấy từ gia nhiệt KIA – Đức C-MAG HS 4/7/10.

Hỗn hợp thu được được làm lạnh đến 25°C và được bơm bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm (Ultrasonic Atomizer Nozzle, 100W, 30Khz) ở tần số 60 Hz (vòi phun siêu âm có kích thước giọt nằm trong khoảng từ 10 đến 20µm, công suất phun 10ml/phút) vào 1 lít nước cất (ở 25°C), thu được hỗn hợp huyền phù liposom - nước. Hỗn hợp huyền phù liposom - nước được cô đặc bằng cách cô quay bay hơi ở áp suất 25mm Hg và nhiệt độ dưới 55°C cho đến khi còn 1000g hỗn hợp huyền phù.

Đồng hóa hỗn hợp hỗn hợp huyền phù liposom - nước bằng cách bơm qua hệ thống đồng hóa áp lực cao 30Mpa bằng máy high pressure homogenizer có áp suất đồng hóa tối đa 60 Mpa. Thu được 1000g hệ liposom nano Tanshinon IIA là hỗn hợp đồng nhất, ổn định, đảm bảo kích thước hạt <200nm.

Bằng phương pháp đo phổ bằng UV-vis các tác giả giải pháp hữu ích đã nhận thấy là vị trí các pick của Tanshinon IIA nguyên liệu và hệ liposom nano Tanshinon IIA hoàn toàn trùng khớp. Điều này cho thấy hệ liposom thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính Tanshinon IIA trong quá trình nano hóa. Sử dụng phương pháp đo phổ bằng UV-Vis để định lượng hàm lượng Tanshinon IIA trong hệ liposom. Kết quả cho thấy nồng độ Tanshinon IIA trong hệ liposom nano Tanshinon IIA nằm trong khoảng từ 8 đến 10%.

Tiến hành đo kích thước hạt nano Tanshinon IIA 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 10 đến 200nm chiếm tỉ lệ 81,3% trong dung dịch.

Kích thước hạt được đo bằng DLS: Các hạt lơ lửng trong một chất lỏng liên tục trải qua chuyển động ngẫu nhiên, và kích thước của các hạt trực tiếp ảnh hưởng đến tốc độ của chúng. Hạt nhỏ di chuyển nhanh hơn so với những hạt lớn hơn. Trong DLS, ánh sáng đi qua mẫu, và ánh sáng tán xạ được phát hiện và ghi nhận ở một góc độ nhất định.

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

Kích thước (nm, theo TEM)	Kích thước (nm, theo DLS)	Thế zeta (mV)	Độ ổn định (tháng)	Tính tan trong nước
------------------------------	------------------------------	------------------	-----------------------	---------------------

10-200	10-200	-40	> 12	Tan tốt trong nước, sau khi hoà tan trong nước hệ ổn định > 30 ngày
--------	--------	-----	------	---

Từ kết quả trên thấy rằng, hệ liposom có các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ hơn 200nm, có ổn định cao (>12 tháng), tan tốt trong nước và sau khi hoà tan trong nước hệ ổn định > 30 ngày.

Theo Hình 1, là ảnh so sánh khả năng phân tán trong nước giữa Tanshinon IIA 95% đã biết và nano Tanshinon IIA thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó bình A thể hiện Tanshinon IIA 95% phân tán trong nước đã biết, bình B thể hiện nano Tanshinon IIA phân tán trong nước thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích. Hình 1 cho thấy Tanshinon IIA 95% đã biết không tan trong nước, tạo hạt lơ lửng trong nước, dung dịch đục, để thêm một thời gian đóng lại dưới đáy bình (B); nano Tanshinon IIA thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích phân tán hoàn toàn trong nước tạo dung dịch trong suốt, đồng nhất (A)

Theo Hình 2, là kết quả ảnh phổ đo TEM kích thước hạt nano Tanshinon IIA thu được bằng quy trình giải pháp hữu ích, ta thấy kích thước hạt trung bình dao động trong khoảng 10 đến 200nm

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất hệ liposom nano Tanshinon IIA dùng cho thực phẩm và dược phẩm theo giải pháp hữu ích đã thành công trong việc sản xuất hệ liposom có các hạt tiểu phân nano Tanshinon IIA có kích thước nhỏ hơn 200nm, đồng đều và khả năng hòa tan tốt trong nước mà vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính Tanshinon IIA trong quá trình nano hóa.

Các chất được sử dụng trong quy trình sản xuất nano Tanshinon IIA phân tán tốt trong nước có độ an toàn cao, không độc hại và ít tác dụng phụ, nên hệ liposom nano Tanshinon IIA 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 liposom nano Tanshinon IIA dùng cho thực phẩm và dược phẩm bao gồm các bước:

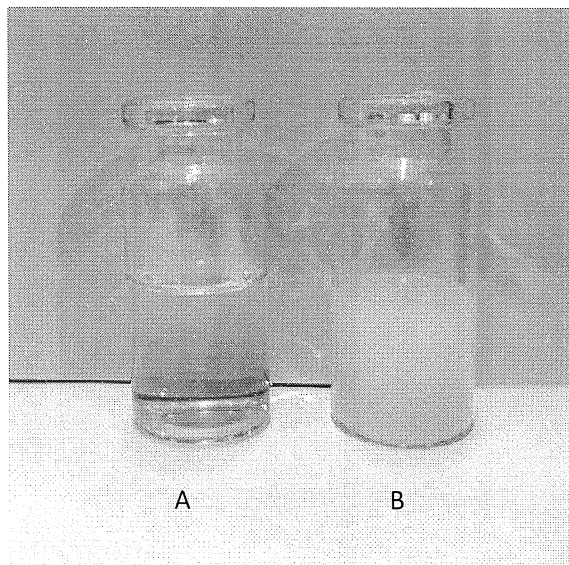
(i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho Tanshinon IIA hòa tan trong dung môi etanol với tỷ lệ khối lượng Tanshinon IIA: dung môi etanol là 8:10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 300 đến 500 vòng/phút và kết hợp gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 8 giờ;

(ii) chuẩn bị chất mang liposom gồm lexitin và dầu ôliu với tỉ lệ 1:3 theo khối lượng được trộn trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C để đảm bảo lexitin hòa tan hoàn toàn trong dầu, khuấy đều;

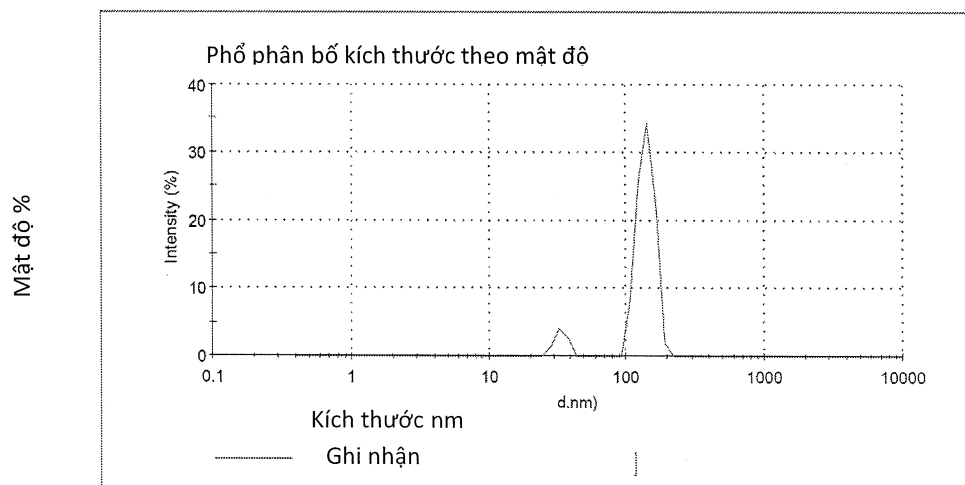
(iii) bổ sung chất mang liposom vào pha phân tán theo tỷ lệ 40:60 theo khối lượng, tiếp tục gia nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 800 đến 1000 vòng/phút trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ;

(iv) làm lạnh hỗn hợp thu được đến 25°C và bơm hỗn hợp đã làm lạnh này bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm ở tần số 60 Hz, có kích thước giọt nằm trong khoảng từ 10 đến 20µm, vào một thể tích nước cất nằm trong khoảng từ 1 đến 1,5 lít, với nhiệt độ nước cất nằm trong khoảng từ 23 đến 26°C, thu được hỗn hợp huyền phù liposom - nước;

(v) đồng hóa hỗn hợp huyền phù liposom - nước bằng cách bơm qua hệ thống đồng hóa áp lực cao 30Mpa để thu được hệ liposom nano Tanshinon IIA.



Hình 1



Hình 2