



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0039583

(51)^{2020.01} A61K 33/04; A61P 9/00

(13) B

(21) 1-2021-07714

(22) 30/11/2021

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/01/2022 406

(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); LƯU HẢI LÂN (VN); LƯU HẢI LONG (VN); NGUYỄN VĂN NGUYÊN (VN); BÙI THỊ THU HƯƠNG (VN); ĐỒNG HUY GIỚI (VN).

(54) CHẾ PHẨM NANO TĂNG CƯỜNG HIỆU QUẢ TỔNG HỢP TẠO NO (NANO NO PLUS) CÓ TÁC DỤNG ĐIỀU TRỊ, NGĂN NGỪA BỆNH XƠ VỮA ĐỘNG MẠCH, HUYẾT ÁP VÀ QUY TRÌNH BẢO CHẾ CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm nano (Nano NO Plus) có tác dụng điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, xơ vữa động mạch, huyết áp và bệnh tim mạch, với hiệu quả điều trị và/hoặc ngăn ngừa vượt trội so với đối chứng nhờ hiệu quả hiệp đồng giữa các hoạt chất trong việc tổng hợp tạo NO, một phân tử tín hiệu quan trọng có tác dụng làm giãn mạch máu, giúp máu lưu thông, ngăn chặn sự hình thành xơ vữa động mạch và giúp kiểm soát huyết áp của cơ thể. Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, sáng chế đề xuất chế phẩm về cơ bản bao gồm các thành phần sau:

- a) L-arginin;
- b) L-citrullin;
- c) glutathion;
- d) L-selenomethionin;

Theo phương án khác, chế phẩm này còn có thể chứa một hoặc các thành phần sau:

- e) coenzym Q10;
- f) curcumin;
- g) resveratrol;
- h) quercetin; và
- i) berberin;
- j) vitamin D.

Chế phẩm theo sáng chế có tính sinh khả dụng, độ thấm và độ hấp thụ được cải thiện đáng kể thông qua các nghiên cứu sâu rộng liên quan đến cấu trúc, tỷ lệ và tương tác giữa các hoạt chất. Chế phẩm này còn có phổ tác dụng phụ được giảm thiểu so với các chế phẩm chứa thành phần hoạt chất riêng rẽ.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất quy trình bào chế chế phẩm trên đây, trong đó các hoạt chất được phân tán dưới dạng nano bền vững, giúp tăng độ tan, sự hướng đích trong cơ thể, tính sinh khả dụng và thời gian tồn tại của các hoạt chất, nhờ đó nâng cao độ hấp thụ, độ thấm, hiệu quả điều trị và tính bền vững của chế phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất chế phẩm nano (Nano NO Plus) có tác dụng điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, xơ vữa động mạch, huyết áp và bệnh tim mạch, với hiệu quả điều trị và/hoặc ngăn ngừa vượt trội so với đối chứng nhờ hiệu quả hiệp đồng giữa các hoạt chất trong việc tổng hợp tạo nitơ monooxit (nitric oxide - NO), một phân tử tín hiệu quan trọng có tác dụng làm giãn mạch máu, giúp máu lưu thông, ngăn chặn sự hình thành xơ vữa động mạch và giúp kiểm soát huyết áp của cơ thể. Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, sáng chế đề xuất chế phẩm về cơ bản bao gồm các thành phần sau:

- a) L-arginin;
- b) L-citrullin;
- c) glutathion;
- d) L-selenomethionin.

Theo phương án khác, chế phẩm này có thể còn chứa một hoặc các thành phần sau:

- e) coenzym Q10;
- f) curcumin;
- g) resveratrol;
- h) quercetin;
- i) berberin;
- j) vitamin D.

Cần lưu ý rằng, chế phẩm chứa hỗn hợp các thành phần như trên đây là chưa được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Hơn nữa, chế phẩm này còn thể hiện có tính sinh khả dụng, độ thấm và độ hấp thụ được cải thiện đáng kể thông qua các nghiên cứu sâu rộng liên quan đến cấu trúc, tỷ lệ và tương tác giữa các hoạt chất. Chế phẩm này còn có phổ tác dụng phụ được giảm thiểu so với các chế phẩm chứa thành phần hoạt chất riêng rẽ.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất quy trình bào chế chế phẩm trên đây, trong đó các hoạt chất được phân tán dưới dạng nano bền vững, giúp tăng độ tan, sự hướng đích trong cơ thể, tính sinh khả dụng và thời gian tồn tại của các hoạt chất, nhờ đó nâng cao độ hấp thụ, độ thấm, hiệu quả điều trị và tính bền vững của chế phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tình hình bệnh tim mạch và huyết áp trên thế giới và tại Việt Nam

Bệnh tim mạch là tên gọi chung của một nhóm bệnh liên quan đến các rối loạn về tim và mạch máu bao gồm bệnh mạch vành (đau tim), xơ vữa động mạch, tăng huyết áp (huyết áp cao), huyết áp thấp, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh mạch máu não (đột quy), suy tim, bệnh tim bẩm sinh, và bệnh cơ tim.

Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới WHO, bệnh tim mạch là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên thế giới. Năm 2016, trên thế giới có khoảng 17,9 triệu người chết vì bệnh này, trong đó số người tử vong do đau tim và đột quy chiếm 85%. Theo dự báo đến năm 2030, trên thế giới sẽ có khoảng 23,6 người chết vì đau tim và đột quy.

Ở các nước phát triển, điển hình là ở Mỹ, cứ mỗi 36 giây có một người chết vì bệnh tim mạch. Mỗi năm, có khoảng 655.000 chết Mỹ chết do mắc bệnh tim mạch và cứ 4 người thì có một người chết vì bệnh này. Bệnh tim mạch gây thiệt hại cho Mỹ khoảng 219 tỷ đô la mỗi năm từ năm 2014 đến năm 2015. Chi phí này bao gồm dịch vụ chăm sóc sức khỏe, thuốc men và mất năng suất lao động do bệnh nhân tử vong.

Tăng huyết áp là hiện tượng áp lực trong lòng mạch tác động lên thành mạch cao làm tổn thương lớp nội mô, làm mất tính toàn vẹn của tế bào nên dễ bị các phân tử lipoprotein bám dính vào thành mạch, tạo thành các mảng xơ vữa. Các mảng xơ vữa động mạch khi bị nứt vỡ sẽ khiến máu không lưu thông được và tụ lại thành các cục máu đông gây tắc động mạch vành và nhồi máu cơ tim gây nguy hiểm cho tính mạng người bệnh. Tại Việt Nam, theo thống kê của Bộ Y tế mỗi năm có khoảng 200.000 người tử vong vì bệnh tim mạch, chiếm 33% các ca tử vong. Theo thống kê của Viện Tim Mạch năm 2015, tỷ lệ tăng huyết áp ở người trưởng thành trong độ tuổi 18 đến 65 chiếm 25%, tức là cứ 4 người trưởng thành thì có một người mắc bệnh tăng huyết áp. Tăng huyết áp làm tăng nguy cơ tử vong do đột quy lên gấp 4 lần và tăng nguy cơ tử vong do bệnh lý tim mạch lên gấp 3 lần so với người không mắc bệnh.

Các bệnh tim mạch thường gặp ở người lớn tuổi, tuy nhiên, trên thực tế tỷ lệ mắc bệnh ở người trẻ và trung niên ngày càng tăng. Một số nguyên nhân chính gây ra các bệnh tim mạch ở người trung niên và trưởng thành bao gồm rượu bia, hút thuốc, béo phì, ít vận động, căng thẳng, chế độ ăn nhiều muối, tăng cholesterol máu và tiểu đường. Ở trẻ em, nguyên nhân gây ra bệnh tim mạch là do béo phì và một số trường hợp do bị bệnh tim bẩm sinh.

Để phòng tránh được bệnh tim mạch hiệu quả cần phải có chế độ dinh dưỡng hợp lý, kiểm soát cân nặng, vận động và tập thể dục. Cùng với sự phát triển của y học hiện đại, nhiều loại thuốc mới đã được phát triển dựa trên các thành tựu nghiên cứu khoa học giúp phòng và điều trị bệnh tim mạch, trong đó nổi bật là các loại thuốc và thực phẩm chức năng có tác dụng trợ giúp cơ thể sản xuất ra nitơ monooxit (nitric oxide - NO), một phân tử tín hiệu quan trọng có tác

dụng làm giãn mạch máu, giúp máu lưu thông, ngăn chặn sự hình thành xơ vữa động mạch và giúp kiểm soát huyết áp của cơ thể.

Xơ vữa động mạch

Xơ vữa động mạch là tình trạng thành mạch bị xơ cứng kèm thu hẹp lòng mạch do các mảng xơ vữa làm dòng máu lưu thông hạn chế, gây thiếu máu nuôi đến cơ quan. Quá trình gây xơ vữa động mạch bắt đầu khi cholesterol LDL (Low Density Lipoprotein - LDL), hay lipoprotein cholesterol tỷ trọng thấp, dư thừa tích tụ ở dưới lớp nội mạc mạch máu và do LDL bị oxy hóa thành ox-LDL (LDL bị oxy hoá) gây tổn thương tế bào nội mô dẫn đến làm giảm tổng hợp NO, phân tử tín hiệu làm giãn mạch khiến cho mạch máu đàn hồi kém. Khi LDL tích tụ lớp nội mạc ngày càng nhiều cùng với sự lắng đọng của canxi làm cho thành mạch dày lên gây tắc nghẽn mạch máu và gây ra triệu chứng đau ngực trái. Ngoài ra, tăng huyết cũng là một trong các nguyên nhân gây ra xơ vữa động mạch. Tăng huyết áp là hiện tượng áp lực trong lòng mạch tác động lên thành mạch cao làm tổn thương lớp nội mô, làm mất tính toàn vẹn của tế bào nên dễ bị các phân tử lipoprotein bám dính vào thành mạch, tạo thành các mảng xơ vữa. Các mảng xơ vữa động mạch khi bị nứt vỡ sẽ khiến máu không lưu thông được và tụ lại thành các cục máu đông gây tắc động mạch vành và nhồi máu cơ tim gây nguy hiểm cho tính mạng người bệnh.

Tổng quan về phân tử NO và cơ chế sinh tổng hợp NO trong cơ thể

Nitơ monooxit (Nitric oxide - NO) là chất khí không màu, không mùi hòa tan trong nước và trong dung môi hữu cơ. NO là sản phẩm phân hủy của các hợp chất chứa nitơ và nitroso không bền. Trong không khí, khí NO bị oxy hóa nhanh chóng thành khí NO₂ màu nâu và mùi hắc. Trong dung dịch, NO bị oxy hóa nhanh thành NO₂⁻ (nitrit) và NO₃⁻ (nitrat).

Trước đây, NO được biết đến là một chất gây ô nhiễm không khí thông thường, là thành phần của khói thuốc lá và khí độc xuất hiện trong khí thải của ô tô và máy bay gây ra mưa axit và phá hủy tầng ozon. Tuy nhiên, từ những năm 1980 các nhà khoa học đã khám phá ra NO là một phân tử tín hiệu quan trọng liên quan đến nhiều quá trình sinh lý và bệnh lý của cơ thể người và động vật có vú. NO có tác dụng sinh học đặc biệt và là trung tâm của một số cơ chế điều hòa phức tạp trong não, hệ thống miễn dịch và tim mạch. Do đó, năm 1992, NO được tạp chí Science công nhận là “phân tử của năm” (molecular of the year)¹.

Đặc biệt, năm 1998, giải Nobel Sinh lý học hoặc Y học (Nobel Prize in Physiology or Medicine) đã được trao cho ba nhà khoa học Mỹ gồm Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro và Ferid Murad cho những khám phá của họ về vai trò NO như một phân tử tín hiệu trong hệ thống tim mạch².

Trong cơ thể người và động vật có vú, NO được tổng hợp theo con đường enzym và con đường không do enzym xúc tác. Theo con đường enzym, đầu tiên,

axit amin L-arginin được hấp thụ vào tế bào nội mô thông qua hệ thống vận chuyển axit amin cation CAT (cationic amino acid transporter). Dưới sự xúc tác của nhóm enzym tổng hợp NO (nitric oxide synthase) phụ thuộc Ca^{2+} -calmodulin, NO và L-citrullin được tổng hợp từ cơ chất chính là L-arginin và O_2 cùng với chất vận chuyển điện tử NADH. Sau đó, L-citrullin sinh ra được biến đổi thành L-arginin sau một số phản ứng để làm cơ chất đầu vào tiếp tục chu trình sinh tổng hợp NO trong tế bào nội mô của cơ thể³.

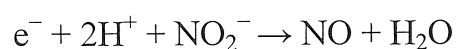
Ở người và động vật có vú, enzym xúc tác tổng hợp NO (NOS) có 3 dạng đồng đẳng (isoform) bao gồm NOS thần kinh (nNOS hay NOS1), và NOS dễ cảm ứng (iNOS hay NOS2) và NOS tế bào nội mô (eNOS hay NOS3). Enzym NOS ở 3 dạng đồng đẳng đều có những điểm tương đồng về cấu trúc và cơ chế xúc tác gần giống nhau. Cả 3 enzym này đều cần có các đồng yếu tố (heme, calmodulin, BH4) và các coenzym (FAD, FMN) cho hoạt tính xúc tác của chúng. Cấu trúc của các dạng isoform này giống nhau ở vị trí bắt đầu đầu C có:

- i) miền reductaza (miền xúc tác phản ứng khử),
- ii) miền liên kết calmodulin và
- iii) miền oxygenaza (miền xúc tác phản ứng oxy hóa) nằm ở đầu N.

Miền reductaza chứa các gốc FAD và FMN, và giống vùng axit amin kéo dài của vùng reductaza của phân tử cytochrome P-450. Vùng này có vai trò chuyển các điện tử từ NADPH sang vùng oxygenaza. Vùng oxygenaza là vùng chứa vị trí gắn với nhóm heme, BH4 và arginin, là vùng xúc tác phản ứng biến đổi arginin thành citrullin và NO. Vùng gắn với calmodulin cần thiết cho hoạt tính xúc tác của tất cả các dạng isoform của NOS. Calmodulin là đồng yếu tố (cofactor) có chức năng như là cảm biến (sensor) nồng độ Ca^{2+} nội bào đặc biệt là khi nồng độ Ca^{2+} nội bào tăng⁴.

Enzym eNOS được biểu hiện trong tế bào nội mô và chịu trách nhiệm xúc tác cho phản ứng sinh NO ở các mạch máu khỏe mạnh. nNOS là dạng đặc biệt của eNOS và được biểu hiện ở hệ thống thần kinh trung ương. iNOS là dạng isoform được biểu hiện ở các tế bào cơ, đại thực bào và tế bào nội mô⁵. Enzym eNOS và nNOS được hoạt hóa bởi Ca^{2+} liên kết phụ thuộc calmodulin, trong khi đó enzym iNOS được cảm ứng bởi các xytokin liên kết với calmodulin độc lập⁶.

Theo con đường không do enzym xúc tác, NO được tổng hợp từ NO_2^- theo phản ứng:



Phản ứng này xảy ra chủ yếu ở nhiều mô trong cơ thể trong môi trường axit khi cơ thể thiếu máu cục bộ. Trong điều kiện thiếu máu cục bộ kèm theo nhiễm toan, hoạt tính của enzym NOS bị suy yếu dẫn đến lượng NO sinh ra không đủ thì

con đường sản xuất NO không do enzym xúc tác là một giải pháp thay thế của cơ thể⁷.

NO là một phân tử khí đặc biệt do trên nguyên tử N của phân tử NO có chứa 1 electron tự do chưa ghép đôi nên NO được coi là gốc tự do ($\bullet$ NO) hoạt động và là chất oxy hóa yếu. Giống các chất khí O_2 và CO_2 , NO có khả năng hòa tan trong lipid. Thời gian tồn tại trung bình của NO trong cơ thể rất ngắn với chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) khoảng 2 đến 6 giây. Tuy nhiên, thời gian này đủ để NO thực hiện các chức năng sinh lý quan trọng trong cơ thể. NO góp phần làm cân bằng nội mô của mạch máu và có tác dụng làm giãn mạch máu giúp máu lưu thông, ức chế sự co cơ trơn, ức chế sự ngưng tập của tiểu cầu và ngăn chặn sự kết dính bạch cầu – nội mô. NO còn hoạt động như một chất dẫn truyền thần kinh ở hệ thần kinh trung ương và ngoại vi. Ngoài ra, NO cũng tham gia vào quá trình bảo vệ miễn dịch, NO tiêu diệt vi khuẩn bằng hoạt tính gốc tự do của nó⁸.

Nhu cầu đối với chế phẩm tạo NO

Như được mô tả trên đây, bệnh tim mạch, xơ vữa động mạch và huyết áp là các căn bệnh nguy hiểm nhất hiện nay mà con người phải đối mặt, và chiếm tỷ lệ tử vong rất cao.

Để góp phần vào việc giúp ngăn ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh tim mạch, tăng huyết áp và xơ vữa động mạch, các tác giả sáng chế đã tiến hành thực hiện nghiên cứu bào chế sản phẩm (Nano NO plus) hỗ trợ điều trị xơ vữa động mạch, bệnh tim và huyết áp. Giải pháp theo sáng chế được xây dựng, nghiên cứu và cải tiến dựa trên kết quả của các nghiên cứu đã công bố về hoạt tính của một số hợp chất có lợi cho sức khỏe tim mạch và huyết áp và thành tựu của giải Nobel Sinh lý học hoặc Y học năm 1988 về vai trò và tác dụng của phân tử NO đối với hệ thống tim mạch của nhóm tác giả Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro và Ferid Murad.

Tài liệu trích dẫn

1. Culotta E, Koshland DE Jr: “*NO news is good news*”, Science. 1992 Dec 18; 258(5090):1862-5
2. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1998/press-release/>
3. Toda N, Okamura T: “*The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels*”, Pharmacol Rev. 2003 Jun; 55(2):271-324
4. <https://www.rndsystems.com/resources/articles/nitric-oxide-synthases-nos>
5. Raddino R, Caretta G, Teli M, et al: “*Nitric oxide and cardiovascular risk factors*”, Heart Int. 2007; 3(1):18
6. Ghosh DK* et al: “*Inducible nitric oxide synthase: role of the N-terminal beta-hairpin hook and pterin-binding segment in dimerization and tetrahydrobiopterin interaction*”, EMBO J. 1999; 18:6260–6270

7. Li H, Cui H, Kundu TK, et al: “*Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in the blood: critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase*”, J Biol Chem. 2008; 283:17855–63
8. Edwards AD (1995): “*The pharmacology of inhaled nitric oxide*”, Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 1995; 72(2):F127-F130
9. Bilanda DC* et al: “*Ethylene acetate extract can protect against L-NAME-induced hypertension on rats*”, BMC Complement Altern Med. 2017 Oct 10;17(1):479 (doi: 10.1186/s12906-017-1972-0). PMID: 29017485; PMCID: PMC5633871
10. E. Meaney* et al: “*Formula and nomogram for the sphygmomanometric calculation of the mean arterial pressure*”, Heart, vol. 84, no. 1, p. 64, 2000
11. Bryan NS* et al: “*Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples*”, Free Radic Biol Med. 2007 Sep 1; 43(5):645-57 (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026). Epub 2007 Apr 29. PMID: 17664129; PMCID: PMC2041919.
12. Yurina, Valentina* et al: “*Prolonged-heated High-Fat Diet Increase the Serum LDL Cholesterol Level and Induce the Early Atherosclerotic Plaque Development in Wistar Rats*”, Journal of Tropical Life Science. 9. 2019. 9-14 (10.11594/jtls.09.01.02)
13. Wu, Y.* et al: “*Acute myocardial infarction in rats*”, Journal of visualized experiments : JoVE, (48), (2001), 2464 (<https://doi.org/10.3791/2464>)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm nano (Nano NO Plus) có tác dụng điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, xơ vữa động mạch, huyết áp và bệnh tim mạch. Chế phẩm này tốt hơn là có hiệu quả điều trị và/hoặc ngăn ngừa vượt trội so với đối chứng nhờ hiệu quả hiệp đồng giữa các hoạt chất trong việc tổng hợp tạo NO, một phân tử tín hiệu quan trọng có tác dụng làm giãn mạch máu, giúp máu lưu thông, ngăn chặn sự hình thành xơ vữa động mạch và giúp kiểm soát huyết áp của cơ thể.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm tạo NO có tính sinh khả dụng, độ thấm và độ hấp thụ được cải thiện đáng kể, đồng thời có phổ tác dụng phụ được giảm thiểu so với các chế phẩm chứa thành phần hoạt chất riêng rẽ thông qua các nghiên cứu về tương tác thuốc hoặc hoạt chất, tỷ lệ phù hợp, để tối ưu tác dụng hiệp đồng giữa chúng.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất quy trình bào chế chế phẩm trên đây, trong đó các hoạt chất được phân tán dưới dạng nano bền vững, độ ổn định, và được kết hợp theo cách tối ưu với thành phần chất mang phù hợp giúp tăng độ tan, sự hướng đích trong cơ thể, tính sinh khả dụng và thời gian tồn tại của các

hoạt chất, nhờ đó nâng cao độ hấp thụ, độ thấm, hiệu quả điều trị và tính bền vững của chế phẩm.

Cách thức giải quyết vấn đề

Để đạt được các mục đích trên đây, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm nano (Nano NO Plus) điều trị bệnh xơ vữa động mạch, huyết áp và bệnh tim mạch, đặc trưng ở chỗ, chế phẩm này chứa:

- a) L-arginin;
- b) L-citrullin;
- c) glutathion;
- d) vi chất chứa Se được chọn từ nhóm bao gồm L-selenomethionin và L-selenocystein.

Theo một phương án, chế phẩm này còn chứa e) coenzym Q10.

Theo phương án khác, chế phẩm này còn chứa f) curcumin.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này còn chứa g) resveratrol.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này còn chứa h) quercetin.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này còn chứa i) berberin.

Theo phương án khác nữa, d) vi chất chứa Se là L-selenomethionin.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này là chế phẩm chứa:

- a) L-arginin;
- b) L-citrullin;
- c) glutathion;
- d) L-selenomethionin;
- e) coenzym Q10;
- f) curcumin;
- g) resveratrol;
- h) quercetin; và
- i) berberin.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này là chế phẩm chứa:

- a) L-arginin;
- b) L-citrullin;
- c) glutathion;
- d) L-selenomethionin;
- e) coenzym Q10;
- f) curcumin;
- g) resveratrol;
- h) quercetin;

- i) berberin; và
- j) vitamin D.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này còn chứa chất mang giúp làm ổn định các hoạt chất.

Theo phương án khác nữa, chất mang được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol (PEG), tween 20, tween 40, tween 60 và tween 80.

Theo phương án khác nữa, chất mang được chọn từ nhóm bao gồm PEG và tween 40.

Theo phương án khác nữa, e) coenzym Q10 ở dạng hạt nano có kích thước tối đa 100 nm.

Theo phương án khác nữa, f) curcumin ở dạng hạt nano có kích thước nằm trong khoảng từ 20 đến 50 nm.

Theo phương án khác nữa, g) resveratrol ở dạng hạt nano có kích thước nằm trong khoảng từ 20 đến 30 nm.

Theo phương án khác nữa, h) quercetin ở dạng hạt nano có kích thước nằm trong khoảng từ 20 đến 50 nm.

Theo phương án khác nữa, i) berberin dạng hạt nano có kích thước siêu nhỏ nằm trong khoảng từ 5 đến 10 nm.

Theo phương án khác nữa, tỷ lệ khối lượng của a) L-arginin nằm trong khoảng từ 25 đến 30% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa, tỷ lệ khối lượng của b) L-citrullin nằm trong khoảng từ 50 đến 60% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa, tỷ lệ khối lượng của c) glutathion nằm trong khoảng từ 5 đến 10% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa, tỷ lệ khối lượng của d) L-selenomethionin nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,05% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa, tỷ lệ khối lượng của e) coenzym Q10 nằm trong khoảng từ 1 đến 5% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa, tỷ lệ khối lượng của f) curcumin nằm trong khoảng từ 1 đến 5% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa, tỷ lệ khối lượng của g) resveratrol nằm trong khoảng từ 1 đến 5% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa, tỷ lệ khối lượng của h) quercetin nằm trong khoảng từ 1 đến 5% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa, tỷ lệ khối lượng của i) berberin nằm trong khoảng từ 1 đến 5% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này là chế phẩm chứa:

- a) L-arginin;
- b) L-citrullin;
- c) glutathion;
- d) L-selenomethionin;
- e) coenzym Q10;
- f) curcumin;
- g) resveratrol;
- h) quercetin;
- i) berberin; và

khối lượng, tính theo tổng trọng lượng của chế phẩm cho một viên nang cứng, của các thành phần là như sau đây:

- a) L-arginin với lượng khoảng 150mg;
- b) L-citrullin với lượng khoảng 300mg;
- c) glutathion với lượng khoảng 50mg;
- d) L-selenomethionin với lượng khoảng 0,15mg;
- e) coenzym Q10 với lượng khoảng 10mg;
- f) curcumin với lượng khoảng 10mg;
- g) resveratrol với lượng khoảng 10mg;
- h) quercetin với lượng khoảng 10mg;
- i) berberin với lượng khoảng 10mg.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này là chế phẩm chứa:

- a) L-arginin;
- b) L-citrullin;
- c) glutathion;
- d) L-selenomethionin;
- e) coenzym Q10;
- f) curcumin;
- g) resveratrol;
- h) quercetin;
- i) berberin;
- j) vitamin D; và

khối lượng, tính theo tổng trọng lượng của chế phẩm cho một viên nang cứng, của các thành phần là như sau đây:

- j) L-arginin với lượng khoảng 150mg;
- k) L-citrullin với lượng khoảng 300mg;

- l) glutathion với lượng khoảng 50mg;
- m) L-selenomethionin với lượng khoảng 0,15mg;
- n) coenzym Q10 với lượng khoảng 10mg;
- o) curcumin với lượng khoảng 10mg;
- p) resveratrol với lượng khoảng 10mg;
- q) quercetin với lượng khoảng 10mg;
- r) berberin với lượng khoảng 10mg;
- s) vitamin D với lượng khoảng 0,15mg.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm theo sáng chế được bào chế dưới dạng dược phẩm, thuốc, thực phẩm, thực phẩm chức năng, thực phẩm bổ sung và các dạng tương đương bất kỳ khác. Cần lưu ý rằng, thuốc là hóa chất dùng để điều trị, chữa lành, ngăn ngừa hoặc để chẩn đoán bệnh, hoặc dùng để nâng cao thể lực và trí lực”. Các sinh chất vốn có trong cơ thể nhưng được đưa thêm từ ngoài vào cũng được gọi là thuốc, ví dụ hormone insulin, steroid, chiết xuất chất đạm, chiết xuất nhau thai. Trái lại, “thực phẩm là vật chất được cơ thể thu nhận để phát triển, bù đắp, sinh sản, hoạt động và thỏa mãn bao gồm đói, hài lòng, v.v.”. Theo đó, thực phẩm là cung cấp chất dinh dưỡng và sau đó có thêm các chức năng khác như phòng chống bệnh tật, tăng cường sức khỏe nhờ có các vitamin, các chất chống oxy hóa, các chất xơ.

Theo một phương cụ thể được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế được bào chế dưới dạng thực phẩm chức năng. Cần lưu ý rằng, khác với thuốc, việc bào chế dưới dạng thực phẩm chức năng cho phép giảm tác dụng phụ do thuốc gây ra mà vẫn đảm bảo tác dụng chữa bệnh theo sáng chế bởi thực phẩm chức năng có tính an toàn còn cao hơn, ít gây tác dụng phụ và khó gây ngộ độc (trừ trường hợp dị ứng do mẫn cảm với một thành phần nào đó có trong sản phẩm). Hơn nữa, về công dụng, thực phẩm chức năng thường tạo ra công dụng gián tiếp và không có liệu trình phòng, chữa bệnh cụ thể như thuốc (chủ yếu là tác dụng hỗ trợ chức năng, tăng sức đề kháng và từ đó giảm thiểu các triệu chứng, hội chứng).

Theo phương án cụ thể, chế phẩm này được bào chế ở dạng viên nang cứng.

Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm này được bào chế dưới dạng thuốc, thực phẩm, thực phẩm chức năng hoặc thực phẩm bổ sung.

Theo phương án cụ thể khác nữa, chế phẩm này được bào chế ở dạng thực phẩm chức năng dạng viên nang cứng.

Theo phương án cụ thể khác nữa, chế phẩm này được bào chế thành thực phẩm chức năng dạng viên nang với lượng khoảng 550mg/viên nang.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế còn đề xuất quy trình bào chế chế phẩm theo khía cạnh thứ nhất hoặc phương án bất kỳ của nó, quy trình này bao gồm

bước trộn các thành phần hoạt chất với tỷ lệ khối lượng mong muốn như được mô tả trên đây.

Theo một phương án khác của khía cạnh thứ hai, quy bao gồm bước trộn các thành phần hoạt chất với tỷ lệ khối lượng mong muốn như được mô tả trên đây.

Theo một phương án khác nữa của khía cạnh thứ hai, quy trình này còn bao gồm bước phối trộn thành phần hoạt chất với chất mang giúp làm ổn định hoạt chất.

Theo một phương án khác nữa của khía cạnh thứ hai, chất mang được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol (PEG), tween 20, tween 40, tween 60 và tween 80.

Theo một phương án khác nữa của khía cạnh thứ hai, trong đó chất mang được chọn từ nhóm bao gồm PEG và tween 40.

Theo một phương án khác nữa, chất mang được trộn lẫn với a) L-arginin và b) L-citrullin để tạo thể liên kết bền vững, đồng thời tạo thuận lợi cho quá trình sản xuất chế phẩm trước khi được trộn với các thành phần khác.

Theo một phương án khác nữa, các thành phần còn được phân tán dưới dạng hạt nano để tăng độ hoà tan và độ thấm trước khi được phối trộn.

Theo một phương án khác nữa, e) coenzym Q10 được phân tán ở dạng nano lyposom với kích thước hạt tối đa 100 nm.

Theo một phương án khác nữa, f) curcumin được phân tán ở dạng vi nhũ tương nano với kích thước hạt nằm trong khoảng từ 20 đến 50 nm.

Theo một phương án khác nữa, g) resveratrol được phân tán ở dạng dung dịch Resveratrol tan trong nước với kích thước hạt nằm trong khoảng từ 20 đến 30 nm.

Theo một phương án khác nữa, h) quercetin được phân tán ở dạng nhũ tương nano với kích thước hạt nằm trong khoảng từ 20 đến 50 nm.

Theo một phương án khác nữa, i) berberin được phân tán ở dạng dung dịch berberin dạng nano tan trong nước với kích thước hạt nano siêu nhỏ nằm trong khoảng từ 5 đến 10 nm.

Theo một phương án khác nữa, chế phẩm được bào chế ở dạng viên nang.

Theo một phương án khác nữa, quy trình bao gồm các bước sau đây:

i) chuẩn bị hệ bột bao gồm L-arginin, vi chất chứa Se, vitamin D;

ii) chuẩn bị hệ bột bao gồm các thành phần còn lại của chế phẩm với syloid;

iii) phối trộn hệ bột của bước i) với hệ bột của bước ii).

Theo một phương án khác nữa, trong đó quy trình bao gồm các bước sau đây:

i) chuẩn bị hệ bột bao gồm L-arginin, vi chất chứa Se, vitamin D và L-citrullin;

ii) chuẩn bị hệ bột bao gồm các thành phần còn lại của chế phẩm với syloid;

iii) phối trộn hệ bột của bước i) với hệ bột của bước ii).

Theo một phương án khác nữa, Syloid được sử dụng được chọn từ nhóm bao gồm syloid FP 244 silica và syloid AL-1 FP.

Theo một phương án khác nữa, syloid được sử dụng là syloid FP 244 silica.

Theo một phương án khác nữa, trong bước ii), các thành phần còn lại được trộn lẫn với tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 1/(0,6-1,4).

Theo một phương án khác nữa, trong bước ii), các thành phần còn lại được trộn lẫn với tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 1/(0,8-1,2).

Theo một phương án khác nữa, chế phẩm thu được ở dạng viên nang cứng.

Hiệu quả kỹ thuật đạt được

Sáng chế đề xuất chế phẩm có tác dụng điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, xơ vữa động mạch, huyết áp và bệnh tim mạch, với hiệu quả điều trị và/hoặc ngăn ngừa vượt trội so với đối chứng nhờ hiệu quả hiệp đồng giữa các hoạt chất trong việc tổng hợp tạo NO, một phân tử tín hiệu quan trọng có tác dụng làm giãn mạch máu, giúp máu lưu thông, ngăn chặn sự hình thành xơ vữa động mạch và giúp kiểm soát huyết áp của cơ thể và tính sinh khả dụng của nó, thông qua các nghiên cứu sâu rộng liên quan đến cấu trúc, tỷ lệ và tương tác giữa các hoạt chất.

Chế phẩm theo sáng chế còn có phổ tác dụng phụ được giảm thiểu so với các chế phẩm chứa thành phần hoạt chất riêng rẽ thông qua tương tác giữa các hoạt chất mà sẽ được mô tả cụ thể hơn dưới đây và trong bản mô tả này.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất quy trình bào chế chế phẩm, trong đó các hoạt chất được phân tán dưới dạng nano và/hoặc được phân tán trước trong các chất mang phù hợp, bền vững, giúp tăng độ tan, sự hướng đích trong cơ thể, tính sinh khả dụng và thời gian tồn tại của các hoạt chất, nhờ đó nâng cao độ hấp thụ, độ thấm, hiệu quả điều trị và tính bền vững của chế phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sau đây, sáng chế còn được mô tả thông qua các phương án cụ thể với sự tham chiếu đến các hình vẽ, trong đó:

Hình 1 thể hiện hình ảnh đại thể gan chuột, trong đó:

- lô chứng sinh lý
- lô chứng bệnh
- lô tham chiếu simvastatin
- lô chế phẩm Nano NO⁺ liều 1
- lô chế phẩm Nano NO⁺ liều 2;

Hình 2 thể hiện hình ảnh vi thể gan chuột nhuộm HE (x 400), trong đó:

- lô chứng sinh lý
- lô chứng bệnh
- lô tham chiếu simvastatin
- lô chế phẩm Nano NO⁺ liều 1
- lô chế phẩm Nano NO⁺ liều 2;

Hình 3 thể hiện hình ảnh vi thể động mạch chủ bụng chuột (HE x 400), trong đó:

- lô chứng sinh lý
- lô chứng bệnh
- lô tham chiếu simvastatin
- lô chế phẩm Nano NO⁺ liều 1
- lô chế phẩm Nano NO⁺ liều 2;

Hình 4 thể hiện sự phân bố kích thước hạt của chế phẩm theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả thông qua các phương án cụ thể được ưu tiên chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế. Do đó, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án này. Ngoài ra, cần phải hiểu rằng, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trên cơ sở thông tin được mô tả và/hoặc gợi ý trong bản mô tả này, có thể thực hiện các biến đổi, thay đổi tương đương với các phương án cụ thể được mô tả.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng” trước giá trị số được dùng để chỉ chính giá trị số đó, cũng như các giá trị nằm trong khoảng $\pm 10\%$, tốt hơn là $\pm 5\%$ giá trị số đó. Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, tốt hơn nếu thuật ngữ này được dùng để chỉ chính giá trị số đó.

Ngoài ra, trong bản mô tả này, thuật ngữ “kích thước nano” hay “nano” được dùng để chỉ các hạt có kích thước nhỏ nằm trong khoảng từ 1 tới 100 nm

(nanomet), tốt hơn là từ 20 đến 80 nm, tốt hơn nữa là từ 30 đến 70 nm. Trong công nghệ nano, một hạt được xác định là một đối tượng nhỏ có thuộc tính như một đơn vị toàn bộ. Các hạt được phân loại tiếp theo đường kính. Các hạt siêu mịn cũng giống như các hạt nano và kích thước từ 1 đến 100 nm, hạt mịn có kích cỡ từ 100 đến 2500 nm, và các hạt thô từ 2500 tới 10000 nm. Nghiên cứu khoa học trên các hạt nano đang rất phát triển do các hạt này có nhiều ứng dụng tiềm năng trong y học, quang học và điện tử.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “Chế phẩm nano tăng cường hiệu quả tổng hợp tạo NO”, “công thức NO Plus”, “chế phẩm Nano NO Plus”, “Nano NO Plus”, hay đơn giản là “Nano NO+” được dùng thay thế cho nhau và được dùng để chỉ chế phẩm ở dạng nano có tác dụng tăng cường hiệu quả tổng hợp NO trong cơ thể, từ đó tạo ra các tác dụng điều trị mong muốn.

Cần lưu ý rằng, sáng chế được mô tả với sự ưu tiên đối với nhóm bệnh bao gồm bệnh xơ vữa động mạch, huyết áp và bệnh tim mạch. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở các bệnh này. Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh bao gồm tăng cholesterol trong máu, chứng nghiện hút thuốc lá, tăng huyết áp, tiểu đường, béo phì, kháng insulin và lão hóa hoặc các bệnh liên quan đến rối loạn tim mạch bao gồm bệnh mạch vành và ngoại vi, tổn thương thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, suy tim và rối loạn cương dương bởi chế phẩm theo sáng chế được tạo ra trên cơ sở nhiều thành phần hoạt chất với tương tác hiệp đồng, thông qua các tổng hợp, nghiên cứu sâu rộng về cấu trúc và tương tác giữa các thành phần này mà sẽ được mô tả chi tiết hơn sau đây.

Chế phẩm nano NO Plus

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm nano (Nano NO Plus) điều trị bệnh xơ vữa động mạch, huyết áp và bệnh tim mạch, đặc trưng ở chỗ, chế phẩm này chứa:

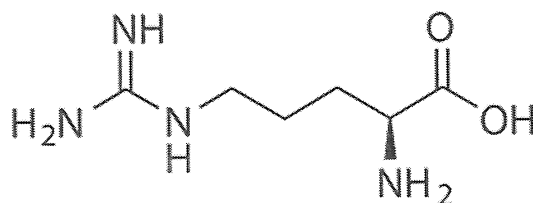
- a) L-arginin;
- b) L-citrullin;
- c) Glutathion;
- d) Vi chất chứa Se được chọn từ nhóm bao gồm L-selenomethionin và L-selenocystein.

Theo sáng chế, các tác giả đã nghiên cứu để xây dựng công thức NO Plus dựa trên cơ chế điều hòa sinh tổng hợp NO trong cơ thể và tác dụng của một số chất giúp tăng tổng hợp và truyền tín hiệu NO trong cơ thể.

L-arginin và L-citrullin được xác định là hai tiền chất quan trọng để tổng hợp NO ở tế bào nội mô.

- a) L-Arginin

L-Arginin, danh pháp tiếng Anh: L-Arginine, được ký hiệu là Arg hoặc R, là một axit α -amin được sử dụng trong quá trình sinh tổng hợp protein. Hợp chất này có công thức phân tử là $C_6H_{14}N_4O_2$ với công thức cấu tạo sau đây.



L-Arginin

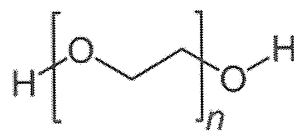
L-Arginin chứa một nhóm α -amino, một nhóm axit α -carboxylic, và một chuỗi bên gồm một chuỗi thẳng bao gồm 3 cacbon kết thúc bằng một nhóm guanidino. Ở pH sinh lý, gốc carboxyl trong axit bị giảm proton hóa (tức là ở dạng $-\text{COO}^-$), nhóm amin được proton hóa ($-\text{NH}_3^+$), và nhóm guanidino cũng được proton hóa để tạo ra dạng guanidini ($\text{C}-(\text{NH}_2)_2^+$). Điều này khiến hợp chất này là một axit mạch thẳng và tích điện.

NO được xác định là được sinh tổng hợp ở nhiều tế bào khác nhau trong cơ thể bao gồm tế bào thần kinh, tế bào miễn dịch và tế bào nội mô. Theo con đường enzym, NO được tổng hợp từ tiền chất L-arginin dưới sự xúc tác của các enzym eNOS, nNOS và iNOS. Các tác động của việc sản xuất NO bị rối loạn ở các bệnh là khác nhau và phụ thuộc vào việc sản xuất NO xảy ra thiếu hay thừa. Lượng NO tổng hợp do xúc tác của enzym eNOS ở tế bào nội mô thiếu liên quan đến nhóm bệnh về tim mạch bao gồm cao huyết áp, thiếu máu và xơ vữa động mạch. Ngược lại, lượng NO tổng hợp do xúc tác của enzym iNOS ở đại thực bào và một số loại tế bào khác bị dư thừa góp phần vào sự mất ổn định đường huyết và tổn thương mô thường gặp ở các bệnh nhân sốc nhiễm khuẩn hoặc xuất huyết. Tương tự, lượng NO tổng hợp bởi nNOS ở các tế bào thần kinh bị thừa góp phần gây ra ngộ độc và thoái hóa thần kinh. Do đó, cần điều chỉnh phù hợp nhằm làm tăng tổng hợp NO ở nhóm bệnh tim mạch và loại bỏ NO dư thừa và/hoặc làm giảm biểu hiện hoặc ức chế hoạt tính của enzym iNOS ở nhóm bệnh sốc nhiễm khuẩn hoặc xuất huyết.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng sự có mặt của L-arginin trong chế phẩm theo sáng chế không chỉ là cơ chất của enzym eNOS mà còn có tác dụng làm tăng tổng hợp cofactor BH4 ở tế bào nội mô và làm tăng hoạt tính và biểu hiện của của eNOS. Ngoài ra, L-arginin còn có tác dụng ức chế con đường tổng hợp glucosamin và ROS (các dạng oxy hoạt động) và do đó sự có mặt của L-arginin giúp làm tăng giãn nội mô ở những bệnh nhân có các yếu tố nguy cơ bệnh tim mạch chính bao gồm tăng cholesterol trong máu, hút thuốc lá, tăng huyết áp, tiểu đường, béo phì, kháng insulin và lão hóa hoặc các bệnh nhân bị rối loạn tim mạch bao gồm bệnh mạch vành và ngoại vi, tổn thương thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, suy tim và rối loạn cương dương.

Theo một phương án được ưu tiên, trên cơ sở nghiên cứu tương tương thuốc, tác giả sáng chế còn xác định được rằng việc bổ sung chất mang làm ổn định phù hợp, nhằm tạo liên kết giữa L-arginin với chất mang để tạo thành thể liên kết giữa hoạt chất này với chất mang giúp tăng thời gian tồn tại trong cơ thể. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, polyetylen glycol (PEG) và Tween, bao gồm Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, trong số chúng tốt hơn là Tween 40, được chọn làm chất mang để L-arginin liên kết với chúng nhằm tạo thể liên kết giúp tăng thời gian tồn tại trong cơ thể.

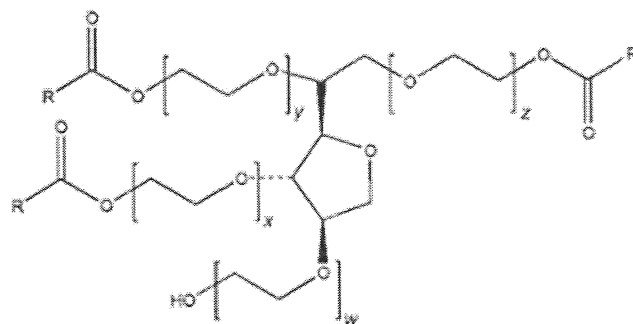
Polyetylen glycol (Polyethylen glycol - PEG) hoặc polyoxyethylen (POE), tùy thuộc vào trọng lượng của phân tử. Cấu trúc của PEG thường được mô tả là $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ với công thức cấu tạo sau đây:



PEG

PEG được chọn làm chất mang bởi hợp chất này có thể tạo liên kết với L-arginin để tạo thành ADI-PEG (Pegylated arginin deiminase) giúp tăng thời gian tồn tại trong cơ thể.

Tween 40, hay polysorbat 40 (polysorbate 40), theo cách tương tự, được xác định là chất mang có khả năng tăng cường quá trình sản xuất L-arginin cũng như L-citrullin trong thử nghiệm tế bào (*Corynebacterium crenatum* argB-M4 ΔproB).



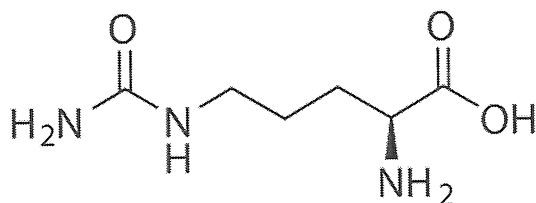
Tween 40

Do đó, theo một phương án được ưu tiên, a) L-Arginin được phối trộn với các chất mang để tạo thể liên kết bền vững, đồng thời tạo thuận lợi cho quá trình sản xuất chế phẩm, trước khi được trộn với các thành phần khác.

Các hoá chất này là thông dụng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và do đó việc mô tả thêm là không cần thiết.

b) L-citrullin

L-citrullin, danh pháp tiếng Anh: L-Citrulline, là một axit α -amin. Tên của nó có nguồn gốc từ *citrullus*, một từ Latin chỉ dưa hấu, vì nó được phân lập từ loại quả này lần đầu tiên vào năm 1914 bởi Koga và Otake. Citrullin cuối cùng được xác định bởi Wada vào năm 1930. Hợp chất amino axit này có công thức $\text{H}_2\text{NC(O)NH(CH}_2)_3\text{CH(NH}_2\text{)CO}_2\text{H}$ ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$) với công thức cấu tạo sau đây.



L-citrullin

Cần lưu ý rằng, việc bổ sung thêm L-citrullin được xác định là có tác dụng làm tăng nồng độ L-arginin trong cơ thể nhiều hơn so với việc chỉ bổ sung một mình L-arginine. Điều này là do một phần lớn L-arginin bị phân hủy trước khi được hấp thụ vào máu. Ngoài ra, L-citrullin còn được xác định là có tác dụng làm tăng lưu lượng máu, cải thiện hiệu suất tập thể dục và giảm huyết áp. L-citrullin được coi là tương đối an toàn và có ít có nguy cơ tác dụng phụ ngay cả khi dùng liều cao.

Ngoài ra, L-citrullin còn được xác định là sản phẩm phụ của phản ứng tổng hợp NO bởi enzyme NOS từ cơ chất L-arginin. Sau đó, L-citrullin có thể được tái chế để tạo ra L-arginin sau một số phản ứng hóa sinh và được sử dụng để tăng tổng hợp NO tự nhiên trong cơ thể. Việc L-citrullin có mặt trong công thức thành phần chế phẩm theo sáng chế có tác dụng làm tăng nồng độ L-arginin trong cơ thể nhiều hơn so với việc chỉ sử dụng riêng rẽ L-arginin do một phần lớn L-arginin bị phân hủy trước khi được hấp thụ vào máu và bị phân hủy bởi enzyme arginaza.

Theo một phương án được ưu tiên, tương tự như đã mô tả cho thành phần a), L-citrullin cũng được phối trộn với chất mang làm ổn định phù hợp, nhằm tạo thể liên kết giữa hoạt chất này với chất mang giúp làm ổn định và tăng thời gian tồn tại trong cơ thể. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, polyetylen glycol (PEG) và Tween 40, được chọn làm chất mang tạo thể liên kết giúp ổn định và tăng thời gian tồn tại trong cơ thể.

Theo một phương án khác, L-citrullin được tạo hệ vi nhũ nano lyposom trước khi bổ sung vào chế phẩm theo sáng chế, trong đó hệ vi nhũ nano lyposom L-citrullin được điều chế theo quy trình bao gồm các bước sau đây.

Bước i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách hòa tan một lượng L-citrullin vào etanol theo tỷ lệ khối lượng/khối lượng là khoảng 1/4 dưới điều kiện khuấy, tốt hơn là sử dụng máy khuấy, trong thời gian khoảng 40 phút, với tốc độ khuấy khoảng 500 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng 40°C thu được dung dịch L-citrullin.

Bằng nhiều phân tích, thử nghiệm, các tác giả sáng chế đã lựa chọn được dung môi hoà tan tốt L-citrullin để tạo pha phân tán là etanol. Etanol là một dung môi dễ bay hơi, độc tính thấp. Tỷ lệ khối lượng của L-citrullin/etanol là khoảng 1/4 là tỷ lệ tối ưu để tạo hệ vi nhũ bền vững, ổn định.

Bước ii) chuẩn bị hỗn hợp chất mang bao gồm phytosolve và transcuto P bằng cách trộn phytosolve và transcuto P với tỷ lệ khối lượng của phytosolve/transcuto P là khoảng 3:1 (g/g), dưới điều kiện khuấy trong thời gian khoảng 1 giờ, tốt hơn sử dụng máy khuấy với tốc độ khoảng 500 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng 40°C.

Phytosolve, hay phytoSolve[®], là thành phần quan trọng để tạo nên lớp vỏ lipid kép của hạt nano liposom. Thành phần chính của phytosolve bao gồm glycerin, caprylic/capric triglycerit, lexitin và D,L- α -tocopherol. Hóa chất này có bán sẵn trên thị trường. Phytosolve được ứng dụng nhiều trong dược phẩm. Nó có tác dụng tăng tính sinh khả dụng của các dược chất ưa dầu. Các nghiên cứu cho thấy phytosolve làm tăng cường tính thấm thấu của dược chất ở các niêm mạc ruột kết gấp 10 lần, kéo dài thời gian tồn tại của dược chất trong máu đến 14 giờ.

Transcuto P, hay transcuto[®] P (Danh pháp tiếng Anh khác: Diethylene glycol monoethyl ether) là hợp chất được sản xuất dựa vào quá trình ngưng tụ etylen oxit và etanol. Cũng giống như phytosolve, transcuto P là một tá dược được sử dụng nhiều trong dược phẩm nhằm tăng sự hấp thụ các dược chất. Transcuto P có độ tinh khiết cao đảm bảo an toàn khi sử dụng trong bào chế thuốc. Tỷ lệ phytosolve/transcuto P theo sáng chế đã được nghiên cứu thử nghiệm để tạo ra chỉ số cân bằng dầu - nước (HLB) thích hợp nhằm tạo sự ổn định cho hệ chất tan và chất mang.

Bước iii) tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn pha phân tán chứa L-citrullin, hỗn hợp chất mang phytosolve/transcuto P và chất tạo nhũ lexitin sao cho các chất tạo thành hỗn hợp đồng nhất có tỷ lệ khối lượng của pha phân tán/hỗn hợp chất mang/lexitin là khoảng 2/5/1, dưới điều kiện khuấy, tốt hơn là sử dụng máy khuấy, trong 5 giờ với tốc độ khuấy khoảng 1000 vòng/phút, ở nhiệt độ khoảng 40°C.

Lexitin (lecithin) là một thuật ngữ chung mô tả các nhóm chất béo tự nhiên có màu nâu vàng. Lexitin có trong các mô thực vật và động vật cũng như trong cơ thể con người. Lexitin được tạo thành từ các axit béo là hỗn hợp các diglycerit của axit stearic, palmitic và oleic, liên kết với este cholin của axit photphoric. Hợp chất này có thể thu mua từ các nguồn/nhà cung cấp sẵn trên thị trường.

Tỷ lệ chất tan/chất mang/lexitin đã được các tác giả nghiên cứu thử nghiệm để đảm bảo hỗn hợp thu được là đồng nhất, không xảy ra hiện tượng tách pha. Bằng nhiều nghiên cứu thí nghiệm, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra tỷ lệ khối

lượng của pha phân tán/hỗn hợp chất mang/lexitin là khoảng 2/5/1 được lựa chọn để tạo hỗn hợp đồng nhất và ổn định.

Bước iv) loại bỏ dung môi bằng cách cô hỗn hợp chất phân tán và chất mang, tốt hơn là sử dụng thiết bị cô quay chân không, ở nhiệt độ khoảng 50°C, trong thời gian khoảng 5 giờ.

Cần lưu ý rằng, quá trình loại dung môi được thực hiện, tốt hơn là trong máy cô quay chân không, như nêu trên với mục đích loại dung môi trong thời gian ngắn mà không cần tăng nhiệt độ đảm bảo hoạt tính của dược chất không bị biến đổi.

Bước v) đồng nhất hỗn hợp thu được ở bước iv), sau khi được để qua đêm, tốt hơn là sử dụng thiết bị khuấy đồng hóa, trong khoảng 1 giờ, với tốc độ khoảng 3000 vòng/phút và lặp lại 5 lần.

Cần lưu ý rằng, với việc đồng hóa với chu kỳ lặp lại nhiều lần, dược chất được phân tán đồng đều trong chất mang tạo hỗn hợp đồng nhất và tính ổn định cao.

Bước vi) lọc hỗn hợp nhũ tương sau khi đồng hóa, tốt hơn là sử dụng hệ thống lọc nano, để đồng nhất ổn định sản phẩm và thu hệ vi nhũ nano lyposom L-citrullin.

Sau khi đồng hóa, hỗn hợp được lọc để loại bỏ các tạp chất, tạo sự ổn định đồng nhất cho sản phẩm.

Sản phẩm thu được được tiến hành kiểm tra để xác định các đặc trưng.

Kết quả đo HR-TEM

Mẫu nano L-citrullin dạng dung dịch phân tán trong dung môi nước được tiến hành phân tích bằng kính hiển vi điện tử truyền qua có độ phân giải cao (HR-TEM) JEM 2100. Kết quả HR-TEM cho thấy hệ vi nhũ L-citrullin phân tán tốt trong nước, có chứa các hạt nano L-citrullin hình cầu có đường kính nằm trong khoảng từ 5 đến 10 nm.

Kết quả phân tích hàm lượng

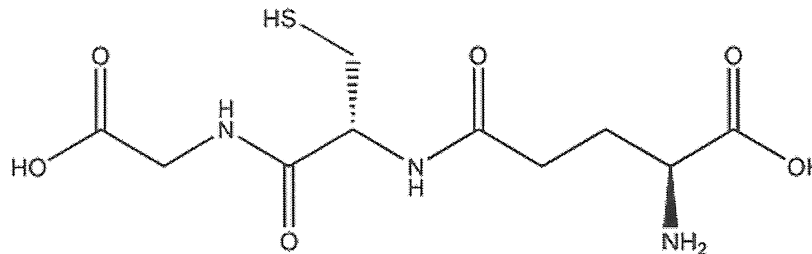
Hàm lượng của L-citrullin trong mẫu được đo bằng sắc ký hiệu năng cao (HPLC). Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng L-citrullin trong mẫu phân tích đạt khoảng 9,76 %.

Do đó, theo một phương án cụ thể, L-citrullin được tạo hệ vi nhũ nano lyposom trước khi bổ sung vào chế phẩm theo sáng chế, trong đó hệ vi nhũ nano lyposom L-citrullin phân tán tốt trong nước, có chứa các hạt nano L-citrullin hình cầu có đường kính nằm trong khoảng từ 5 đến 10 nm và hàm lượng L-citrullin trong mẫu khoảng 9,76 %.

c) Glutathion

Chế phẩm theo sáng chế còn chứa thành phần c) Glutathion.

Glutathion, danh pháp tiếng Anh: Glutathione (GSH), là một tripeptit dễ hòa tan, được cấu tạo bởi 3 loại axit amin bao gồm xystein, glyxin và axit glutamic, có công thức phân tử là $C_{10}H_{17}N_3O_6S$, với công thức cấu tạo sau đây.



Glutathion

Glutathion (GSH) được xác định một chất chống oxy hóa quan trọng của cơ thể, có tác dụng loại bỏ lipid peroxid và các gốc tự do. Việc có mặt GSH trong chế phẩm theo sáng chế có tác dụng kích thích quá trình mất và bù L-arginin tổng, tăng hoạt tính của enzym eNOS dẫn đến tăng tổng hợp N.

Ngoài ra, GSH còn được xác định là có tác dụng bảo vệ NO không bị tấn công bởi các gốc tự do, do đó làm tăng tính sinh khả dụng của phân tử truyền tín hiệu NO. Việc bổ sung (có mặt) của GSH kết hợp với L-citrullin không những có tác dụng làm tăng tổng hợp NO ở tế bào nội mô mà còn có tác dụng làm tăng tổng hợp nitrit và phân tử quan trọng cGMP có tác dụng làm giãn mạch theo con đường truyền tín hiệu NO-sGC/cGM. Ngoài ra, GSH còn tham gia vào con đường truyền tín hiệu SNO trong điều kiện thiếu O_2 .

Do đó, có thể cho rằng, chế phẩm theo sáng chế với sự có mặt của các thành phần có tương tác thuốc theo hướng hiệp đồng, phù hợp lẫn nhau, nhờ đó tạo ra các đặc tính mong muốn.

d) Vi chất chứa Se

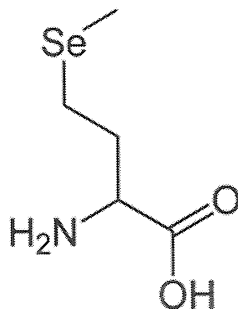
Chế phẩm theo sáng chế còn bao gồm thành phần d) Vi chất chứa Se, tốt hơn nếu vi chất chứa Se này được chọn từ nhóm bao gồm L-selenomethionin và L-selenocystein.

Mặc dù chỉ cần một lượng nhỏ nhưng khoáng chất vi lượng selen (Se) rất cần thiết đối với sức khỏe của con người. Tác các giả còn xác định được rằng Se không chỉ có tác dụng giúp ngăn ngừa bệnh tim mạch mà còn giúp cải thiện sức khỏe và giảm tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân mắc bệnh tim mạch. Một số nguồn chứa Se thường được bổ sung vào cơ thể bao gồm Se tồn tại ở dạng vô cơ bao gồm K_2SeO_3 , Na_2SeO_3 và Li_2SeO_3 , Se hữu cơ bao gồm L-selenomethionin và L-selenocystein.

Tuy nhiên, Se vô cơ có tính sinh khả dụng thấp hơn Se hữu cơ nên, theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, Se hữu cơ được chọn để có mặt trong chế phẩm theo sáng chế dưới dạng thành phần d) để tạo ra các đặc tính và tác dụng như nêu trên đây.

L-selenomethionin

L-selenomethionin, danh pháp tiếng Anh: L-Selenomethionine, là một axit amin tự nhiên có công thức phân tử $C_5H_{11}NO_2Se$ với công thức cấu tạo sau đây.

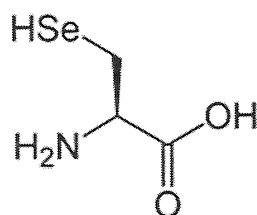


L-selenomethionin

Selenomethionine là một dạng axit amin methionin trong đó lưu huỳnh (S) được thế bởi selen (Se). L-selenomethionin enantiome là dạng chính của selen được tìm thấy trong các loại hạt Brazil, hạt ngũ cốc, đậu nành và các loại đậu trên đồng cỏ, trong khi Se-methylselenocystein, hoặc dẫn xuất-glutamyl của nó, là dạng chính của selenium.

L-Selenocystein

L-Selenocystein, danh pháp tiếng Anh: L-Selenocysteine (Ký hiệu là Sec hoặc U, hoặc Se-Cys), là amino axit tạo nên protein thứ 21. L-Selenocystein có công thức phân tử $C_3H_6NO_2Se$ với công thức cấu tạo sau đây:



L-Selenocystein

Hợp chất này là chất tương tự xystein nhưng lại có một nhóm selenol chứa selen (Se) thay cho nhóm thiol chứa lưu huỳnh (S).

Se là thành phần cấu tạo của hơn 20 loại selenoprotein trong cơ thể và đóng vai trò quan trọng trong sinh sản, trong quá trình chuyển hóa nhiều loại hormon đặc biệt là hormon tuyến giáp (thyroid), tổng hợp ADN, chống oxy hóa, bảo vệ tế bào khỏi tổn thương oxy hóa, kháng viêm và chống nhiễm khuẩn. Do đó, chế

phẩm theo sáng chế chứa nguồn chứa Se sẽ có tác dụng cung cấp Se mà làm tăng khả năng miễn dịch của cơ thể, giảm nguy cơ mắc bệnh ung thư và các bệnh về tim mạch. Hơn nữa, trong cơ thể, một số enzym phụ thuộc Se như glutathion peroxidaza có tác dụng duy trì NO ở dạng khử và chống lại gốc tự do và stress oxy hóa. Bổ sung Se có tác dụng ngăn chặn sự hình thành các dạng oxy hoạt động (ROS) trong quá trình thiếu máu cục bộ và tổn thương cơ tim do tái tưới máu bằng cách tăng hoạt tính của enzym glutathion peroxidaza.

Do đó, chế phẩm chứa Se theo sáng chế sẽ tạo ra nồng độ Se cao trong cơ thể là yếu tố bảo vệ cơ thể tránh nguy cơ mắc bệnh tim mạch và giảm tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân bị bệnh tim mạch.

Theo một phương án khác, L-selenomethionin được sử dụng theo sáng chế có nguồn gốc từ nấm và thực vật, trong khi đó L-selenocystein có nguồn gốc từ động vật.

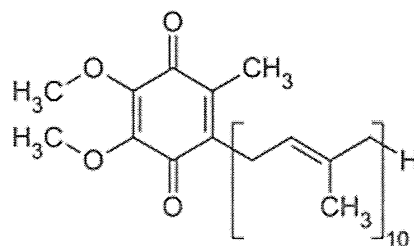
Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế còn chứa các thành phần e) coenzym Q10, f) curcumin, g) resveratrol, h) quercetin và i) berberin. Các hợp chất (thành phần) này đóng vai trò làm các hợp chất có tác dụng chống oxy hóa, kháng viêm, giúp tăng tổng hợp NO, giảm LDL và glucoza trong máu, ngăn ngừa xơ vữa động mạch và hạ huyết áp.

Tuy nhiên, các hợp chất này đều có nhược điểm là ít tan trong nước, do đó khi vào cơ thể chúng dễ bị đào thải qua hệ tiêu hóa. Để tăng khả năng hấp thụ vào cơ thể, các hợp chất này cần được nghiên cứu để tăng độ sinh khả dụng, độ hoà tan và ổn định so với hợp chất gốc. Theo sáng chế, tốt hơn nếu các hợp chất này được nano hóa để tăng các đặc tính mong muốn này so với hợp chất gốc ở dạng nguyên trạng.

e) Coenzym Q10

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế còn chứa e) Coenzym Q10.

Coenzym Q10, danh pháp tiếng Anh: Coenzym Q10 (CoQ10), hay ubiquinone, là chất chống oxy hóa nội sinh của cơ thể hòa tan trong lipid. Hợp chất này có công thức phân tử $C_{59}H_{90}O_4$ với công thức cấu tạo sau đây.



Coenzym Q10

Các tác giả sáng chế đã xác định được rằng việc có mặt CoQ10 trong chế phẩm theo sáng chế có tác dụng loại bỏ các gốc tự do làm giảm sự hình thành ox-LDL, làm tăng cường sự biểu hiện của enzym eNOS, nhờ đó làm tăng khả năng tổng hợp NO ở tế bào nội mô và làm giảm biểu hiện của iNOS. CoQ10 còn có tác dụng ngăn chặn và làm giảm tiến trình phát triển của bệnh xơ vữa động mạch.

Tuy nhiên, tính sinh khả dụng của CoQ10 thấp đã cản trở sự phân phối của nó vào hệ thống tuần hoàn. Các nguyên nhân cơ bản của sinh khả dụng thấp là do trọng lượng phân tử lớn, tính ưa béo cao ($\log P = 21$) và khả năng hòa tan trong nước kém (0,7 ng/mL ở 37°C). Tốc độ hòa tan chậm của CoQ10 do quá trình hydrat hóa kém. Hơn nữa, CoQ 10 còn dễ bị biến đổi dưới tác động của nhiệt độ, ánh sáng và dịch men tiêu hóa làm giảm sự hấp thụ của nó.

Sáng chế, theo cách tối ưu, đã nâng cao hiệu quả của CoQ10 so với nguyên liệu CoQ10 ban đầu bằng cách phân bố hợp chất này dưới dạng các hạt nano có kích thước dưới 100 nm có khả năng phân bố tốt trong hệ tuần hoàn đồng tránh được sự đào thải của gan và thận nên kéo dài thời gian tác dụng trong cơ thể. Các hạt nano có kích thước nhỏ hơn 100 nm, tốc độ đào thải được xác định là giảm 2 lần so với các hạt có kích thước lớn hơn. Theo phương án cụ thể được ưu tiên, sản phẩm của OIC nano liposom CoQ10, do chính tác giả sáng chế tạo ra trong các nghiên cứu trước đây với hệ dẫn thuốc là lớp kép, tốt hơn là lớp lipid kép, có kích thước trung bình khoảng 97 nm, tốt hơn nữa là chứa 5 đến 6,5%, tốt hơn nữa nếu là 5,86% của CoQ10 sẽ có tính sinh khả dụng cao. Hơn nữa, CoQ10 lại được bao bọc bởi lớp vỏ kép có cấu trúc tương đồng với màng tế bào. Nhờ cấu trúc tương đồng này, quá trình vận chuyển thuốc vào trong tế bào sẽ được gia tăng.

Theo một phương án cụ thể, nhũ tương nano liposom Coenzym Q10 được chuẩn bị theo quy trình bao gồm các bước:

Bước i) chuẩn bị pha dầu bằng cách gia nhiệt một lượng CoQ10 trong thời gian từ 15 đến 25 phút với tốc độ quay từ 350 đến 450 vòng/phút ở nhiệt độ từ 35 đến 45°C. Theo phương án cụ thể được ưu tiên, tốt hơn nếu bước i) chuẩn bị pha dầu được thực hiện bằng cách gia nhiệt một lượng CoQ10 trên máy khuấy trong thời gian 20 phút với tốc độ quay 400 vòng/phút ở 40°C.

Bằng các nghiên cứu và thử nghiệm sâu rộng, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, CoQ10 có bản chất là 1,4-benzoquinon nên tan trong các chất béo và việc gia nhiệt dưới điều kiện như trên đây cho phép CoQ10 tạo thuận lợi cho sự kết hợp của pha dầu với hỗn hợp chất mang và chất trợ hoạt động bề mặt tốt hơn.

Bước ii) chuẩn bị hỗn hợp chất mang bao gồm tween 80 và phytosolve bằng cách trộn hỗn hợp tween 80 và phytosolve với tỷ lệ theo khối lượng của tween 80/phytosolve khoảng 1:1 trong thời gian từ 25 đến 35 phút với tốc độ quay từ 350 đến 450 vòng/phút ở nhiệt độ từ 35 đến 45°C. Theo phương án cụ thể được

ưu tiên, tốt hơn nếu bước ii) chuẩn bị hỗn hợp chất mang bao gồm tween 80 và phytosolve được thực hiện bằng cách trộn hỗn hợp tween 80 và phytosolve với tỷ lệ 1:1 (g/g) trên máy khuấy trong thời gian 30 phút với tốc độ quay 400 vòng/phút ở 40°C.

Polysorbat 80 (polysorbate 80) hay còn gọi là Tween 80, ngoài ra nó còn có những tên gọi khác như PS 80, Alkest TW80, danh pháp IUPAC: poly oxyetylen (20) monooleat sorbitan, có công thức hóa học là $C_{64}H_{124}O_{26}$. Hóa chất này có bán sẵn trên thị trường.

Phytosolve, hay phytoSolve[®], là thành phần quan trọng để tạo nên lớp vỏ lipid kép của hạt nano liposom. Thành phần chính của phytosolve bao gồm glycerin, caprylic/capric triglycerit, lexitin và D,L- α -tocopherol. Hóa chất này có bán sẵn trên thị trường.

Theo cách tối ưu tương tự, tỷ lệ các chất được nghiên cứu, tính toán và thử nghiệm để tạo ra hỗn hợp chất mang có chỉ số cân bằng ưa nước - ưa béo (Hydrophilic-lipophilic balance - HLB) thích hợp. Theo một phương án, các hóa chất và điều kiện thực hiện là như trên đây để tạo ra hỗn hợp chất mang có HLB >12 để thích hợp với pha phân tán.

Bước iii) tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn pha dầu, hỗn hợp chất mang và chất trợ hoạt động bề mặt propylen glycol sao cho các chất trong hỗn hợp đồng nhất có tỷ lệ theo khối lượng của CoQ10/tween 80/propylen glycol khoảng 3:60:37 trong 1,5 đến 2,5 giờ với tốc độ quay từ 350 đến 450 vòng/phút, ở nhiệt độ từ 35 đến 45°C. Theo phương án cụ thể được ưu tiên, tốt hơn nếu bước iii) tạo hỗn hợp đồng nhất được thực hiện bằng cách trộn pha dầu, hỗn hợp chất mang và chất trợ hoạt động bề mặt propylen glycol sao cho các chất trong hỗn hợp đồng nhất có tỷ lệ CoQ10: tween 80: propylen glycol là 3:60:37 (g/g/g) vào thiết bị tạo nhũ trong 2 giờ ở 40°C.

Propylen glycol (PG) là một chất ổn định giúp hệ nhũ tương liposom CoQ10 đồng nhất tăng độ bền và thời gian tuần hoàn của các hạt liposom trong cơ thể. PG được Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) công nhận là an toàn cho người tiêu dùng. Bằng nhiều nghiên cứu sâu rộng, như được mô tả trên đây, các tác giả sáng chế đã tối ưu hóa hàm lượng CoQ10, tween 80 và PG trong hỗn hợp và điều kiện thực hiện để tạo ra hệ nhũ tương có kích thước hạt nano mong muốn theo sáng chế.

Bước iv) tạo hệ vi nhũ bằng cách để hỗn hợp đồng nhất thu được ở bước iii) qua đêm, ở nhiệt độ phòng, sau đó đồng hóa với tốc độ từ 2500 đến 3500 vòng/phút và lặp lại từ 4 đến 6 lần. Quá trình đồng hóa cần được lặp lại nhiều lần để cho hệ được đồng nhất, tính hóa lý ổn định và do đó theo phương án cụ thể được ưu tiên, tốt hơn nếu bước iv) tạo hệ vi nhũ được thực hiện bằng cách để hỗn

hợp đồng nhất thu được ở bước c) qua đêm, ở nhiệt độ phòng, sau đó đồng hóa với tốc độ 3000 vòng/phút và lặp lại 5 lần, thu được hệ vi nhũ CoQ10.

Bước v) lọc hệ vi nhũ sau khi đồng hóa qua màng lọc có kích thước từ 40 đến 60 μm để thu được hệ nhũ tương liposom CoQ10 dạng lỏng có kích thước nano. Theo phương án cụ thể được ưu tiên, tốt hơn nếu bước v) lọc hệ vi nhũ sau khi đồng hóa được thực hiện qua màng lọc có kích thước 40 đến 60 μm để loại bỏ các tạp chất rắn làm sạch nhũ tương, tăng sự ổn định và đồng nhất hệ vi nhũ. Kết quả thu được hệ nhũ tương liposom CoQ10 dạng lỏng có kích thước nano.

Mẫu nhũ tương nano CoQ10 dạng dung dịch phân tán trong dung môi nước thu được theo sáng chế được tiến hành phân tích bằng thiết bị tán xạ ánh sáng động (Dynamic Light Scattering - DLS). Kết quả phân tích DLS cho thấy hệ nhũ tương nano CoQ10 có các hạt nano phân tán đồng đều trong hệ, hoàn toàn không có sự kết khối, kích thước hạt trung bình khoảng 97 nm.

Ngoài ra, kết quả phân tích hàm lượng của nano liposom CoQ10 trong mẫu bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (High-performance liquid chromatography – HPLC) còn cho thấy hàm lượng CoQ10 trong mẫu phân tích đạt 5,86%.

Theo một phương án cụ thể khác, nhũ tương nano liposom Coenzym Q10 được chuẩn bị theo quy trình bao gồm các bước:

i) chuẩn bị pha dầu bằng cách gia nhiệt một lượng CoQ10 trên máy khuấy trong thời gian 20 phút với tốc độ quay 400 vòng/phút ở 40°C;

ii) chuẩn bị hỗn hợp chất mang bao gồm tween 80 và phytosolve bằng cách trộn hỗn hợp tween 80 và phytosolve với tỷ lệ khối lượng (g/g) là 1:1 trên máy khuấy trong thời gian 30 phút với tốc độ quay 400 vòng/phút ở 40°C;

iii) tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn pha dầu, hỗn hợp chất mang và chất trợ hoạt động bề mặt propylen glycol sao cho các chất trong hỗn hợp đồng nhất có tỷ lệ khối lượng của CoQ10/tween 80/propylen glycol là 3:60:37 (g/g/g) vào thiết bị tạo nhũ trong 2 giờ với tốc độ quay 400 vòng/phút ở 40°C;

iv) tạo hệ vi nhũ bằng cách để hỗn hợp đồng nhất thu được ở bước c) qua đêm, ở nhiệt độ phòng, sau đó đồng hóa với tốc độ 3000 vòng/phút và lặp lại 5 lần; và

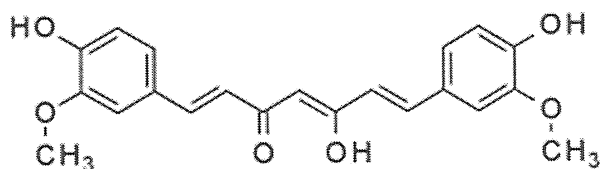
v) lọc hệ vi nhũ sau khi đồng hóa qua màng lọc có kích thước từ 40 đến 60 μm để thu được hệ nhũ tương liposom CoQ10 dạng lỏng có kích thước nano.

Sản phẩm nano liposom CoQ10 thu được với hệ dẫn thuốc là lớp kép, tốt hơn là lớp lipid kép, có kích thước trung bình khoảng 97 nm, chứa 5,86% CoQ10 sẽ có tính sinh khả dụng cao. Hơn nữa, CoQ10 lại được bao bọc bởi lớp vỏ kép có cấu trúc tương đồng với màng tế bào. Nhờ cấu trúc tương đồng này, quá trình vận chuyển thuốc vào trong tế bào sẽ được gia tăng.

f) Curcumin

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế còn chứa f) Curcumin.

Curcumin, danh pháp tiếng Anh theo IPAC: (1E,6E)-1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, có công thức phân tử $C_{21}H_{20}O_6$ với công thức cấu tạo sau đây.



Curcumin dạng enol

Curcumin, hợp chất polyphenol tự nhiên, được xác định là có tác dụng chống oxy hóa, kháng viêm, kháng nấm, ức chế tế bào ung thư và có nhiều tác dụng có lợi cho tim mạch và huyết áp. Do đó, với sự có mặt của hợp chất này, chế phẩm theo sáng chế có tác dụng bảo vệ NO khỏi các gốc tự do dẫn đến làm tăng tính sinh khả dụng của NO trong con đường truyền tín hiệu NO làm giãn mạch máu và tăng lưu lượng máu giúp lưu thông máu. Nhờ đó, chế phẩm theo sáng chế rất có lợi cho sức khỏe tim mạch và huyết áp.

Tuy nhiên, cũng giống như e) CoQ10, sinh khả dụng đường uống của curcumin tương đối thấp. Khả năng hấp thụ curcumin qua đường tiêu hóa đạt ở mức tối đa là 11ng/mL trong dung dịch đệm pH 5,0. Độ hòa tan của curcumin trong nước là khoảng 0,0004 mg/ml ở pH 7,3. Ngoài ra, khả năng hấp thụ chuyển hóa curcumin trong cơ thể còn được xác định là rất thấp.

Các tác giả sáng chế đã khắc phục nhược điểm này bằng các nghiên cứu sử dụng công nghệ hạt nano. Theo một phương án cụ thể được ưu tiên theo sáng chế, hợp chất này được phân tán ở dạng vi nhũ tương nano curcumin có kích thước hạt bé, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20 đến 50 nm, tốt hơn nữa là từ 30 đến 35 nm, và có hàm lượng nằm trong khoảng 10 đến 15%, tốt hơn là khoảng 11,2%, để tạo ra hoạt tính vượt trội cho chế phẩm. Kiểu phân tán này giúp cải thiện khả năng hoà tan, nâng cao độ sinh khả dụng (lên đến 5 lần) so với bột curcumin ở dạng tự do và khả năng hấp thụ cao hơn (từ 10 lần, lên đến 14 lần) so với cùng một liều lượng uống curcumin tự do. Ngoài ra, các thử nghiệm nghiên cứu tính sinh khả dụng của chế phẩm nano curcumin trên chuột kết quả cho thấy nồng độ curcumin trong gan và huyết tương cao hơn tối đa 5 lần so với động vật đối chứng.

Cụ thể, theo một phương án cụ thể được ưu tiên, vi nhũ tương nano curcumin theo sáng chế được điều chế bằng quy trình bao gồm các bước sau đây.

Bước i) chuẩn bị pha phân tán có chứa curcumin, trong đó curcumin được phân tán trong dung môi thích hợp mà có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng

không chỉ giới hạn ở, diclometan (CH_2Cl_2), etyl axetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), dung môi tương tự và hỗn hợp bất kỳ của chúng, dưới điều kiện khuấy, tốt hơn là sử dụng máy khuấy từ, trong thời gian khoảng 6 giờ, với tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 400 đến 500 vòng/phút, kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 50°C đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất.

Bước ii) chuẩn bị hỗn hợp chất mang PEG 1000 (Polyetylen Glycol) và EG (Etylen glycol) mà được phân tán đều trong nước dưới điều kiện rung, tốt hơn là sử dụng máy rung siêu âm, trong thời gian khoảng 2 tiếng, ở nhiệt độ phòng.

Bước iii) tạo hỗn hợp vi nhũ tương bằng cách phối trộn pha phân tán chứa curcumin/hỗn hợp chất mang PEG 1000 và EG/lexitin/ H_2O theo tỷ lệ mong muốn, tốt hơn nếu bước này được thực hiện trên thiết bị tạo nhũ trong thời gian khoảng 3 tiếng, ở nhiệt độ phòng.

Sau đó sản phẩm để qua đêm và được đem đi ly tâm 6 lần ở tốc độ khoảng 5000 vòng/phút trong thời gian khoảng 10 phút. Sản phẩm là hỗn hợp đồng nhất ở dạng lỏng.

Theo một phương án cụ thể hơn, vi nhũ tương nano curcumin theo sáng chế được điều chế từ nguyên liệu và tỷ lệ tương ứng như được thể hiện trong bảng dưới đây.

TT	Thành phần	Tỷ lệ	Khối lượng/thể tích
1	Curcumin		8 g
2	PEG 100/EG	2,5 g/10 mL	7,5 g/30 mL
3	Etanol	96°	100 mL
4	Lexitin		10 mL
5	Nước		Vừa đủ 100%

Sản phẩm thu được sau đó được đem phân tích để xác định các đặc trưng.

Kết quả phân tích kích thước hạt (DLS) cho một pic duy nhất, cho phép khẳng định hoàn toàn không có sự kết khối, tạo ra các tập hợp hạt ở vùng kích thước lớn hơn, khẳng định các tiểu phân nano phân tán đồng đều, kích thước hạt tập trung trong khoảng từ 30 đến 35 nm.

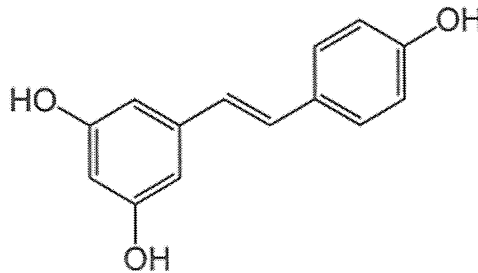
Ngoài ra, trong hệ vi nhũ tương, thế zeta thường được sử dụng như là một ngưỡng để đánh giá cho sự ổn định vì với thế zeta trong khoảng ± 30 mV, các hạt sẽ có xu hướng kết tụ do lực đẩy giữa các hạt không đủ lớn, trong khi đó nếu zeta ngoài khoảng ± 40 mV, tập hợp hạt cũng mất sự ổn định của tập hợp hạt do khoảng cách quá xa giữa các hạt.

Thế zeta đo được của mẫu đạt ~ -38 mV. Như vậy, với kết quả đo được thì thế zeta đạt được là khá tối ưu và khẳng định tính bền vững, ổn định của hệ theo sáng chế.

g) Resveratrol

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế còn chứa g) Resveratrol.

Resveratrol là một stilbenoit, một loại phenol tự nhiên, và một phytoalexin được tạo ra bởi một số loài thực vật để phản ứng với tổn thương hoặc khi cây bị tấn công bởi mầm bệnh như vi khuẩn hoặc nấm. Resveratrol có công thức phân tử $C_{14}H_{12}O_3$ với công thức cấu tạo sau đây.



Resveratrol

Resveratrol là hợp chất nhóm polyphenol phytoalexin có tác dụng chống oxy hóa mạnh và có nhiều tác dụng có lợi đối với sức khỏe tim mạch. Nghiên cứu tiền lâm sàng trên mô hình động vật cho thấy resveratrol có khả năng loại bỏ các gốc tự do hoạt động và làm tăng tổng hợp đồng yếu tố (cofactor) BH₄, do đó chế phẩm theo sáng chế chứa thành phần này được xem là làm tăng hoạt tính của enzym eNOS (enzym trong tế bào nội mô tổng hợp NO), dẫn đến làm tăng tổng hợp NO ở tế bào nội mô. Ngoài ra, Resveratrol có tác dụng tăng cường biểu hiện enzym eNOS ở tế bào nội mô bằng cách kích hoạt promoter của gen mã hóa enzym eNOS hoạt động. Hơn nữa, resveratrol còn có tác dụng kích hoạt phản ứng phosphoryl hóa enzym eNOS tại vị trí Ser1177 làm tăng hoạt tính của enzym eNOS.

Tuy nhiên, do tính chất kỵ nước của resveratrol cùng với sự ổn định kém và tính sinh khả dụng thấp nên việc bổ sung resveratrol vào cơ thể theo đường uống đạt hiệu quả rất thấp. Các tác dụng của resveratrol cho hiệu quả phản ứng tăng sinh NO vì thế cũng chưa đạt hiệu quả cao.

Chính vì vậy, theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, thay vì sử dụng resveratrol ở dạng tự do thông thường, hợp chất này được phân tán ở dạng dung dịch resveratrol tan trong nước (hệ vi nhũ tương nano resveratrol), với kích thước hạt của resveratrol ở dạng nano tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20 đến 30 nm, cùng với sự ổn định bởi lớp vỏ chất nhũ hóa nên khả năng hấp thụ resveratrol được cải thiện nhiều hơn khi ở dạng thông thường. Nano chứa resveratrol dạng dung dịch theo sáng chế có chỉ tiêu hóa lý hoàn toàn phù hợp cho sản phẩm bổ trợ sức khỏe và tăng cường sinh tổng hợp NO.

Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, dung dịch nano resveratrol tan trong nước (hay, hệ vi nhũ tương nano resveratrol) được chuẩn bị theo quy trình bao gồm các bước sau đây:

Bước i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho resveratrol hòa tan trong dung môi etanol theo tỷ lệ khối lượng/thể tích, mà theo một phương án là tỷ lệ g/mL, của resveratrol/dung môi etanol là khoảng 8/10 dưới điều kiện khuấy, tốt hơn là sử dụng máy khuấy từ, với tốc độ từ 500 đến 600 vòng/phút, và kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ phòng trong thời gian khoảng 24 giờ đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất để thu được pha phân tán

Với mục đích tạo ra các hạt tiểu phân chứa resveratrol có kích thước nano và ổn định, các tác giả giả nghiên cứu, phát hiện việc sử dụng etanol làm dung môi có khả năng hòa tan resveratrol cao, đã giúp tạo pha phân tán tốt hơn và tạo điều kiện để pha phân tán này có thể kết hợp với hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/etylen glycol tốt hơn.

Ngoài ra, việc sử dụng dung môi etanol có gốc hydroxyl (OH⁻) tạo liên kết với nước, nên có tác dụng ổn định cấu trúc hệ vi nhũ tương dầu trong nước. Bằng các thử nghiệm, các tác giả xác định được với tỷ lệ resveratrol/dung môi etanol như được mô tả trên đây thì resveratrol đạt được độ hòa tan lớn nhất và tránh việc sử dụng dư thừa dung môi etanol gây lãng phí nguyên liệu.

Bước ii) chuẩn bị hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/etylen glycol bằng cách trộn hỗn hợp polyetylen glycol và etylen glycol theo tỷ lệ khối lượng/thể tích, mà theo một phương án tỷ lệ g/mL, là khoảng 3:100 và phân tán đều, tốt hơn là sử dụng máy rung siêu âm, trong thời gian khoảng 3 tiếng ở nhiệt độ phòng.

Khi resveratrol được đưa vào cơ thể qua đường miệng, resveratrol thường bị phá hủy trong đường tiêu hóa, một phần được hấp thu vào máu thông qua quá trình tiêu hóa, còn lại đa số resveratrol bị đào thải ra môi trường. Vì vậy, quy trình điều chế hệ vi nhũ tương này tạo ra các hạt tiểu phân chứa hoạt chất resveratrol, trong đó resveratrol với kích thước nhỏ có màng bao sinh học, nên cấu trúc resveratrol có độ ổn định cao, không kết dính và có độ hòa tan cao.

Hệ vi nhũ tương này 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 chỉ ra rằng các quá trình vận chuyển thuốc được nâng cao hiệu quả nhờ những hệ dẫn thuốc có nguồn gốc từ các loại polyme như polyme thiên nhiên ưa nước, polyme tổng hợp kỵ nước, poly axit lactic, poly axit lactic-co-glycolic. Các chất mang polyme với hàm lượng tải dược chất khá cao có thể đem đến nhiều thuận lợi về mặt dược động học như dược chất được giữ ổn định, có thể sử dụng điều trị trong thời gian dài bằng cách nhả chậm thuốc theo sự phân hủy polyme.

Tuy PEG (polyetylen glycol) là các chất mang polyme đã được sử dụng trong 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. Thông qua việc nghiên cứu, tác giả sáng chế phát hiện ra việc kết hợp chất mang PEG và EG (etylen glycol) cho phép tạo hệ vi nhũ tương bền vững ổn định, nếu có sự đứt gãy về liên kết mạch thì EG sẽ tự điền đầy.

Bước iii) tạo ra hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/etylen glycol và chất nhũ hóa lexitin, sao cho các chất resveratrol/polyetylen glycol/lexitin trong hỗn hợp đồng nhất này có tỷ lệ khối lượng/khối lượng/thể tích, mà theo một phương án là tỷ lệ g/g/mL, của resveratrol/polyetylen glycol/lexitin là khoảng 8/3/100. Theo một phương án, thiết bị tạo nhũ được sử dụng và việc tạo hỗn hợp đồng nhất được thực hiện trong khoảng 5 giờ ở nhiệt độ phòng.

Giá trị tỷ lệ cụ thể pha phân tán, hỗn hợp chất mang PEG/EG và chất nhũ hóa lexitin và các điều kiện cụ thể được thực hiện tạo nhũ là kết quả của quá trình nghiên cứu thử nghiệm nhằm tối ưu hóa quá trình này để tạo ra hỗn hợp đồng nhất bền vững và ổn định.

Bước iv) tạo hệ vi nhũ tương nano resveratrol bằng cách để qua đêm hỗn hợp đồng nhất thu được ở bước iii) ở nhiệt độ phòng, sau đó ly tâm với tốc độ khoảng 200 vòng/phút và lặp lại ly tâm 5 lần để thu được hệ vi nhũ tương nano resveratrol.

Việc tạo hỗn hợp đồng nhất thu được ở bước iii) có thể phát sinh lượng resveratrol dư là resveratrol không được tạo thành hạt tiểu phân resveratrol. Lượng resveratrol này có thể lắng xuống trong hỗn hợp đồng nhất sau khi để hỗn hợp này qua đêm ở nhiệt độ phòng, nên bằng cách ly tâm có thể cho phép loại bỏ lượng resveratrol dư này.

Việc tiến hành ly tâm với tốc độ khoảng 200 vòng/phút và lặp lại 5 lần nhằm để loại bỏ hoàn toàn lượng resveratrol dư và thu được hệ vi nhũ tương nano resveratrol chứa các hạt tiểu phân resveratrol ổn định nằm trong khoảng từ 20 đến 30 nm.

Sản phẩm thu được sau đó được cho tiến hành nghiên cứu đặc trưng và kết quả đạt được như sau

Kết quả đo TEM

Ảnh đo TEM với độ phân giải cao cho thấy các tiểu phân hạt nano resveratrol tồn tại ở dạng tập hợp khối kích thước khoảng từ 20 đến 30 nm. Sự phân bố các hạt khá đều, kích thước đồng nhất. Điều này giúp cho quá trình khuếch tán và hấp thu vào cơ thể được dễ dàng hơn.

Kết quả phân tích chỉ tiêu kỹ thuật được thể hiện sau đây.

Các chỉ tiêu cảm quan

TT	Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1	Trạng thái	Dạng dung dịch sệt, trong đồng nhất, không tách lớp
2	Màu sắc	Màu vàng nâu đậm
3	Mùi, vị	Không hôi mốc, vị đắng

Chỉ tiêu chất lượng chủ yếu

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
1	pH		H.HD.QT.070	6,74
2	Hàm lượng carbohydrat	g/100g	H.HD.QT.336	79,5
3	Tỷ trọng	g/mL	H.HD.QT.084	1,077

Các chỉ tiêu vi sinh vật

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
1	Tổng số VSV hiếu khí	CFU/g	ISO 4833-1:2013	< 1 CFU/g
2	<i>Cl. perfringens</i>	CFU/g	TCVN 4991:2005	< 1 CFU/g
3	Coliforms	CFU/g	TCVN 6848:2007	< 1 CFU/g
4	<i>E.coli</i>	CFU/g	TCVN 7924-2:2008	< 1 CFU/g

Hàm lượng kim loại nặng

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
1	Hàm lượng cadimi	mg/kg	H.HD.QT.429 (ICP-MS)	<0,004
2	Hàm lượng chì	mg/kg	H.HD.QT.429	0,023

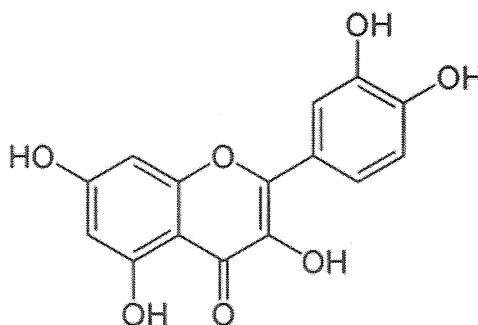
			(ICP-MS)	
--	--	--	----------	--

Các kết quả về chỉ tiêu cảm quan, chỉ tiêu chất lượng, chỉ tiêu vi sinh vật và hàm lượng kim loại nặng cho thấy hệ vi nhũ tương thu được bằng quy trình theo giải pháp đạt các chỉ tiêu về an toàn thực phẩm.

h) Quercetin

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế còn chứa h) Quercetin.

Quercetin là hợp chất thuộc nhóm flavonoid có công thức phân tử $C_{15}H_{10}O_7$ với công thức cấu tạo sau đây.



Quercetin

Các tác giả sáng chế xác định được rằng quercetin có tác dụng làm giảm cholesterol LDL trong máu và ngăn chặn sự tạo thành ox-LDL ở những người thừa cân có nguy cơ cao về tim mạch. Do tác dụng loại bỏ gốc tự do và ức chế ox-LDL nên quercetin sẽ bảo vệ eNOS khỏi sự tấn công của các gốc tự do, làm tăng nồng độ Ca^{2+} ở tế bào nội mô và làm tăng hoạt tính của enzym eNOS dẫn đến tăng tổng hợp NO ở tế bào nội mô. Ngoài ra, quercetin còn được xác định là có tác dụng tăng tổng hợp cGMP – phân tử quan trọng trong con đường truyền tín hiệu NO-sGC-cGMP giúp làm giãn mạch máu và tăng lưu lượng máu. Hơn nữa, hợp chất này còn có tác dụng kháng viêm bằng cách làm giảm nồng độ CRP (C-reactive protein) trong máu dẫn đến ngăn ngừa và làm giảm xơ vữa động mạch.

Tuy nhiên, tương tự như trên đây, việc bổ sung quercetin vào công thức thành phần thường gặp khó khăn do khả năng hòa tan trong nước và sinh khả dụng thấp, không ổn định hóa học và thời gian bán hủy sinh học ngắn, có thể làm giảm hiệu quả của hợp chất khi được sử dụng trong lĩnh vực thực phẩm và dược phẩm.

Quercetin là một hợp chất ưa béo và nó hòa tan vừa phải trong ethanol (4,0 mg/mL, 37°C) và hòa tan tốt trong dimetyl sulfoxit (150 mg/mL, 25°C). Tuy nhiên, độ hòa tan của nó trong nước chỉ xấp xỉ 0,01 mg/mL (ở 25°C).

Theo sáng chế, theo một phương án được ưu tiên, để cải thiện sinh khả dụng của quercetin, hợp chất này được phân tán ở dạng (vi) nhũ tương nano

quercetin của OIC (sản phẩm của chính các tác giả sáng chế) tốt hơn là có kích thước hạt nằm trong khoảng từ 20 đến 50 nm, tốt hơn nữa nếu hàm lượng quercetin 8 đến 9,5%, tốt hơn nếu là khoảng 8,7% sẽ có độ sinh khả dụng cao.

Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, (vi) nhũ tương nano quercetin được điều chế bằng quy trình bao gồm các bước sau đây.

Bước i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho quercetin hòa tan trong dung môi etanol theo tỷ lệ khối lượng/thể tích, tốt hơn nếu là tỷ lệ g/mL, là khoảng 1:25 dưới điều kiện khuấy, tốt hơn là bằng máy khuấy, có gia nhiệt trong khoảng 70°C với tốc độ từ 1000 đến 1500 vòng/phút trong khoảng 15 giờ cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất để thu được pha phân tán.

Mục đích của bước này là tạo ra các hạt quercetin với kích thước nano và ổn định trọng hệ. Để đạt được mục đích này các tác giả đã nghiên cứu và phát hiện việc sử dụng dung môi etanol cho phép hòa tan quercetin dưới dạng pha phân tán, ngoài ra cũng tạo điều kiện để cho pha phân tán này có thể phân tán tốt hơn trong hỗn hợp PEG/Polysorbate 80 (hay Tween 80). Ngoài ra, bằng nhiều nghiên cứu thí nghiệm, các tác giả đã xác định được tỷ lệ hòa tan của quercetin và etanol là 1:25 (g/mL) là tỷ lệ hòa tan thích hợp, vừa cho phép phân tán tốt vừa tránh được lượng dung môi dư thừa không cần thiết.

Bước ii) chuẩn bị hỗn hợp chất mang PEG/Polysorbate 80 bằng cách trộn hỗn hợp PEG 400 và Polysorbate 80 theo tỷ lệ khối lượng/thể tích, theo một phương án là tỷ lệ g/mL, là khoảng 2:1 dưới điều kiện khuấy, theo một phương án là trên máy khuấy, trong thời gian khoảng 4 tiếng ở nhiệt độ phòng với tốc độ khoảng 300 vòng/phút để tiến hành phân tán đều.

PEG là các chất mang polyme đã được sử dụng trong các lĩnh vực dược phẩm và y tế, nhưng bằng các nghiên cứu tác giả sáng chế nhận thấy rằng 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. Với việc bổ sung sử dụng phối hợp PEG với Polysorbate 80 (Tween 80) theo các nghiên cứu cho phép cân bằng chỉ số HLB và giảm độ sa lắng của các hạt tiểu phân nano. Bằng nhiều thực nghiệm, các tác giả đã tìm ra tỷ lệ khối lượng/thể tích của PEG/ Polysorbate 80 là khoảng 2:1 là tỷ lệ tối ưu của chất mang giúp cho hệ được ổn định nhất.

Bước iii) tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang PEG/ Polysorbate 80 và chất nhũ hóa lexitin sao cho các chất quercetin PEG/Polysorbate 80 và lexitin trong hỗn hợp đồng nhất có tỷ lệ khối lượng/khối lượng/thể tích, mà theo một phương án là tỷ lệ g/g/mL, của Quercetin/hỗn hợp chất mang PEG và Polysorbate 80/lexitin là khoảng 10/50/50 trong khoảng 12 tiếng ở nhiệt độ phòng, dưới điều kiện khuấy với tốc độ khuấy từ 400 đến 600 vòng/phút, nhiệt độ khoảng 60°C. Sau đó tăng tốc độ khuấy lên khoảng 800

vòng/phút và nhiệt độ 120°C trong 4 giờ. Theo một phương án, bước tạo hỗn hợp đồng nhất này được thực hiện trên thiết bị tạo nhũ.

Giá trị cụ thể của tỷ lệ các chất trong hỗn hợp chất mang cũng như các chất nhũ hóa lexitin và các điều kiện như tốc độ khuấy, nhiệt độ, thời gian là kết quả của các quá trình nghiên cứu thử nghiệm nhằm tối ưu hóa quy trình này để tạo ra hỗn hợp có độ đồng đều và đồng nhất.

Bước iv) tạo hệ vi nhũ tương nano quercetin bằng cách để hỗn hợp thu được ở bước iii) qua đêm ở nhiệt độ phòng, sau đó đồng hóa hỗn hợp, tốt hơn là sử dụng thiết bị đồng hóa, với áp suất khoảng 150 bar (15MPa), lặp lại 5 chu kỳ để thu được hệ vi nhũ tương nano quercetin.

Cần lưu ý rằng, hỗn hợp thu được ở bước iii) có thể vẫn còn lẫn một lượng quercetin dư nhất định do bám trên thành thiết bị hoặc cánh khuấy mà không được hòa tan trong dung môi, lượng quercetin 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 iii) cần được đồng hóa trong thiết bị đồng hóa có áp suất để giảm kích thước của các hạt này, đồng thời làm hỗn hợp cuối cùng trở nên đồng nhất.

Kết quả đo HPLC

Dung dịch sản phẩm nano quercetin thu được được thử tính hòa tan bằng cách lấy mẫu khoảng 1 ml dung dịch hòa tan trong 250 ml nước thu được dung dịch trong, có màu vàng nhạt, không lắng cặn. Hàm lượng quercetin của sản phẩm được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) thu được kết quả 8,7 mg/mL.

Kết quả đo HR-TEM

Kích thước của các tiểu phân được chứng minh bằng ảnh dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) và phổ phân tích kích thước hạt (DLS) đo kích thước hạt, kết quả cho thấy các hạt nano quercetin có hình cầu và kích thước trung bình khoảng từ 20 đến 50 nm.

Do đó, sản phẩm cuối thu được là hệ vi nhũ tương có các hạt nano quercetin phân tán tốt trong nước với kích thước các hạt nano trung bình trong khoảng từ 20 đến 50 nm. Hàm lượng quercetin trong hệ là 8,7%.

Hệ nano này giúp bảo vệ hợp chất không bị chuyển hóa bằng enzym và phân hủy do nhiệt hoặc ánh sáng, do đó, làm tăng tính ổn định của nó. Hơn nữa, việc sử dụng các hệ phân phối theo sáng chế trên đây có khả năng làm giảm các tác dụng phụ và kiểm soát việc giải phóng các hợp chất có hoạt tính sinh học.

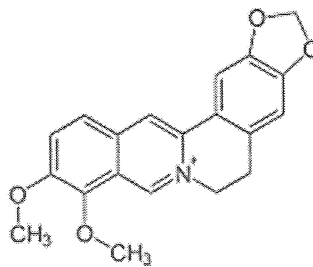
Độ hòa tan của nano quercetin trong nhũ tương được xác định đã tăng lên đáng kể trong nước, và tác dụng tăng cường hấp thu đáng kể. Các hạt nano lipid chứa quercetin đã giúp tăng cường hấp thu quercetin qua đường tiêu hóa. Nano

quercetin còn có thể thúc đẩy sự thẩm thấu của quercetin vào tế bào, tăng mức độ lưu giữ quercetin trong lớp biểu bì và hạ bì, đồng thời tăng cường chức năng chống oxy hóa và chống viêm.

i) Berberin

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế còn chứa i) Berberin.

Berberin, danh pháp tiếng Anh: Berberine, là muối ammoni bậc bốn từ nhóm protoberberin của alkaloit benzyloquinolin, có công thức phân tử $C_{20}H_{18}NO_4^+$ với công thức cấu tạo sau đây.



Berberin

Hợp chất này có màu vàng và có vị đắng đặc trưng của alkaloit.

Chế phẩm theo sáng chế chứa berberin được xác định là có tác dụng kích thích tế bào nội mô giải phóng NO và cGMP – hai phân tử quan trọng trong con đường truyền tín hiệu NO giúp làm giãn mạch máu và lưu thông máu. Ngoài ra, berberin còn có khả năng ức chế hoạt tính của enzym ACE, enzym xúc tác chuyển hóa angiotensin-I thành angiotensin-II làm thu hẹp mạch máu gây ra huyết áp cao và khiến tim phải làm việc nhiều hơn.

Thông qua các nghiên cứu thử nghiệm, tác giả sáng chế còn xác định được rằng chế phẩm chứa berberin rất an toàn và có hiệu quả cao với cả bệnh nhân mắc bệnh cao huyết áp, tiểu đường type 2 và bệnh nhân bị mỡ máu (LDL) cao, trong đó các hạt cholesterol LDL tích tụ trong máu và LDL bị oxy hóa thành ox-LDL là các yếu tố gây lên bệnh xơ vữa động mạch.

Chế phẩm chứa berberine còn được chứng minh là có tác dụng ngăn chặn sự hình thành xơ vữa động mạch bằng cách làm giảm lượng LDL, triglycerit và làm tăng HDL trong máu. Ngoài ra, berberine còn có tác dụng kháng viêm và ngăn chặn các giọt LDL tích tụ không bị nuốt bởi đại thực bào dẫn đến ngăn chặn sự tạo thành các tế bào bong bóng và phòng ngừa giảm được nguy cơ gây xơ vữa động mạch.

Do tác dụng ức chế phản ứng oxy hóa LDL thành ox-LDL và loại bỏ các gốc tự do hoạt động, nên chế phẩm chứa berberin theo sáng chế còn có tác dụng bảo vệ chức năng của tế bào nội mô bằng cách làm tăng cường sự biểu hiện

enzym eNOS và tăng hoạt tính của eNOS dẫn đến làm tăng tổng hợp NO ở tế bào nội mô và tăng tính sinh khả dụng của NO ở tế bào cơ trơn của mạch máu do khi đó, các tế bào bạch cầu đơn nhân không có khả năng tích tụ và bám dính vào thành mạch đồng thời lòng mạch máu được mở rộng và giúp máu lưu thông dễ dàng.

Tuy nhiên, tương tự như trên, berberin cũng là hợp chất có khả năng tan trong nước hạn chế nên sinh khả dụng của berberin khá thấp (dưới 5%). Do đó, tác dụng của nó trong việc hỗ trợ sinh tổng hợp NO cũng chưa đạt hiệu quả cao. Vì vậy, việc cải thiện khả năng hấp thu hợp chất này là vấn đề rất lớn.

Hiện nay có nhiều quy trình làm tăng khả năng hấp thu của các hợp chất tan trong nước nhưng có rất ít nghiên cứu tăng độ tan của berberin. Tuy nhiên, theo các tác giả sáng chế, khi các phân tử có kích thước nhỏ tới hạn (hệ dẫn thuốc nano), do hiệu ứng tăng cường độ thâm nhập và khả năng lưu trữ (Enhanced Permeability Retention – EPR), các phân tử này sẽ có khả năng tích tụ và lưu trữ tại các khối u nhiều hơn là tại các mô bình thường do tế bào của vách huyết quản trong vùng mô bình thường có sự liên kết rất chặt chẽ, trong khi đó ở vách huyết quản của các tổ chức tế bào ung thư có các kẽ hở khá lớn với đường kính khoảng 500nm. Những kẽ hở này cho phép hệ dẫn thuốc nano mang thuốc đi vào trong tế bào. Phân tử hợp chất tự do, khi không được bao bọc bởi polyme có thể đi xuyên vách qua sự thẩm thấu và khuếch tán tự nhiên, nhưng khi hoạt chất (thuốc) bị bao (gói) trong các hệ dẫn thuốc nano, độ lớn của hạt không cho nó đi qua vách huyết quản, nhưng có thể đi qua những kẽ hở để vào trong để thực hiện chức năng của hoạt chất (thuốc). Như vậy, nhờ hiệu ứng EPR các hệ dẫn thuốc nano được vận chuyển một cách hướng đích một cách chọn lọc, hiệu quả và tiết kiệm được chất.

Do đó, trên cơ sở phát hiện này, theo một phương án cụ thể được ưu tiên theo sáng chế, berberin được phân tán ở dạng “dung dịch berberin dạng nano tan trong nước” hay “vi nhũ tương nano berberin”, với kích thước hạt nano siêu nhỏ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 10 nm, tốt hơn nữa nếu hàm lượng berberin là khoảng 6,96%, sẽ giúp phân bố đồng đều, khả năng hòa tan tốt hơn trong nước sẽ có tiềm năng cao tăng cường các hoạt tính sinh tổng hợp NO của berberin.

Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, dung dịch berberin dạng nano tan trong nước (hay, vi nhũ tương nano berberin) được điều chế theo quy trình bao gồm các bước:

Bước i) chuẩn bị pha phân tán chứa berberin bằng cách hòa tan berberin trong dung môi etanol theo tỷ lệ khối lượng/thể tích của berberin/etanol là khoảng 6/10, sau đó khuấy với tốc độ không đổi từ 500 đến 600 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong thời gian khoảng 12 tiếng tạo thành dung dịch đồng nhất.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, việc sử dụng dung môi etanol có gốc (OH-) tạo liên kết với nước, kết hợp với tỷ lệ phối trộn như trên, sẽ có tác dụng ổn định cấu trúc hệ vi nhũ tương dầu trong nước.

Thuật ngữ “nhiệt độ phòng” được dùng để chỉ nhiệt độ môi trường xung quanh, tốt hơn là nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 37°C, tốt hơn nữa là khoảng 30°C.

Bước ii) chuẩn bị hỗn hợp chất mang bằng cách phân tán đều lactit vào PEG 1000 (polyetylen glycol) theo tỷ lệ khối lượng của lactit/PEG 1000 là khoảng 3/1 với sự có mặt xúc tác Sn(II)₂-etylhexanoat (Tin(II)2-etylhexanoat).

Bước iii) phối trộn để tạo ra vi nhũ tương nano berberin bằng cách trộn lẫn pha phân tán, hỗn hợp chất mang, Tween 80 và nước theo tỷ lệ khối lượng của berberin/hỗn hợp chất mang/Tween 80/nước là khoảng 10/70/20/10 dưới điều kiện khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong thời gian 5 giờ, sau đó để qua đêm. Tiếp theo, tiến hành ly tâm ở tốc độ khoảng 400 vòng/phút trong thời gian 20 phút, lặp lại ly tâm khoảng 5 lần thu vi nhũ tương nano berberin (dung dịch berberin dạng nano tan trong nước) theo sáng chế.

Cần lưu ý rằng, vi nhũ tương nano berberin thu được có độ pH nằm trong khoảng từ 9 đến 9,6. Với giá trị độ pH này, liên kết giữa berberin và vật liệu mang được giữ vững ổn định trong quá trình phân tán. Nếu vi nhũ tương có độ pH <7 thì liên kết này suy yếu dẫn đến berberin sẽ bị phá hủy ngay trong đường tiêu hóa.

Vi nhũ tương nano berberin thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích có các hạt tiểu phân chứa berberin thân nước, không kết dính, kích thước của các hạt tiểu phân berberin ổn định nằm trong khoảng từ 5 đến 10 nm, nên có thể thâm nhập dễ dàng qua màng tế bào để phát huy hiệu quả và tăng độ hòa tan của berberin trong nước, từ đó làm tăng tính sinh khả dụng của hoạt tính berberin.

Đặc tính của vi nhũ tương nano berberin được thể hiện trong bảng sau.

Đặc tính của vi nhũ tương nano berberin

Đặc tính	Đơn vị	Giá trị
Dạng tồn tại		Dạng dung dịch màu vàng
Tỷ trọng	g/mL	≥1,0
Kích thước tiểu phân	nm	5 đến 10
Hàm lượng berberin	% (g/100g)	6,96

Tá dược, phụ gia dược dụng

Theo phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa tá dược và/hoặc phụ gia dược dụng. Theo một phương án khác, tá dược và/hoặc phụ gia dược dụng bao gồm các chất được chọn trong nhóm bao gồm chất mang, chất hoạt động bề mặt, chất làm ổn định, chất màu, chất làm trơn, chất che vị, chất độn và chất dẫn thuốc thích hợp bất kỳ mà thông dụng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Có thể thấy rằng, chế phẩm theo sáng chế đã được nghiên cứu, xây dựng trên cơ sở tổng hợp, phân tích, thử nghiệm liên quan đến cấu trúc, mức độ tương tác, tỷ lệ nhằm tạo ra chế phẩm có tác dụng điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh xơ vữa động mạch, huyết áp và bệnh tim mạch, với hiệu quả điều trị và/hoặc ngăn ngừa vượt trội so với đối chứng nhờ hiệu quả hiệp đồng giữa các hoạt chất trong việc tổng hợp tạo NO, một phân tử tín hiệu quan trọng có tác dụng làm giãn mạch máu, giúp máu lưu thông, ngăn chặn sự hình thành xơ vữa động mạch và giúp kiểm soát huyết áp của cơ thể. Chế phẩm này còn được xác định là có tính sinh khả dụng, độ thấm và độ hấp thụ được cải thiện đáng kể với phổ tác dụng phụ được giảm thiểu so với các chế phẩm chứa thành phần hoạt chất riêng rẽ.

Hơn nữa, chế phẩm trên đây chứa các hoạt chất được phân tán dưới dạng nano bền vững, giúp tăng độ tan, sự hướng đích trong cơ thể, tính sinh khả dụng và thời gian tồn tại của các hoạt chất, nhờ đó nâng cao độ hấp thụ, độ thấm, hiệu quả điều trị và tính bền vững của chế phẩm.

Theo phương án đặc biệt được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm chứa:

- a) L-arginin;
- b) L-citrullin;
- c) Glutathion;
- d) L-selenomethionin;
- e) Coenzym Q10;
- f) Curcumin;
- g) Resveratrol;
- h) Quercetin; và
- i) Berberin.

Theo một phương án của sáng chế, tỷ lệ khối lượng của a) L-arginin nằm trong khoảng từ 25 đến 30% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác của sáng chế, tỷ lệ khối lượng của b) L-citrullin nằm trong khoảng từ 50 đến 60% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, tỷ lệ khối lượng của c) Glutathion nằm trong khoảng từ 5 đến 10% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, tỷ lệ khối lượng của d) L-selenomethionin nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,05% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, tỷ lệ khối lượng của e) Coenzym Q10 nằm trong khoảng từ 1 đến 5% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, tỷ lệ khối lượng của f) Curcumin nằm trong khoảng từ 1 đến 5% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, tỷ lệ khối lượng của g) Resveratrol nằm trong khoảng từ 1 đến 5% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, tỷ lệ khối lượng của h) Quercetin nằm trong khoảng từ 1 đến 5% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa, tỷ lệ khối lượng của i) Berberin nằm trong khoảng từ 1 đến 5% tổng khối lượng của chế phẩm này.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm chứa:

- a) L-arginin;
- b) L-citrullin;
- c) Glutathion;
- d) L-selenomethionin;
- e) Coenzym Q10;
- f) Curcumin;
- g) Resveratrol;
- h) Quercetin;
- i) Berberin; và

tỷ lệ khối lượng, tính theo tổng trọng lượng của chế phẩm, của:

- a) L-arginin nằm trong khoảng từ 27 đến 28%;
- b) L-citrullin nằm trong khoảng từ 54 đến 55%;
- c) Glutathion nằm trong khoảng từ 9 đến 10%;
- d) L-selenomethionin nằm trong khoảng từ 0,02 đến 0,03%;
- e) Coenzym Q10 nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2%;
- f) Curcumin nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2%;
- g) Resveratrol nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2%;
- h) Quercetin nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2%;
- i) Berberin nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2%.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này chứa:

- a) L-arginin với lượng khoảng 150mg;
- b) L-citrullin với lượng khoảng 300mg;
- c) Glutathion với lượng khoảng 50mg;

- d) Coenzym Q10 với lượng khoảng 10mg;
- e) Curcumin với lượng khoảng 10mg;
- f) Resveratrol với lượng khoảng 10mg;
- g) Quercetin với lượng khoảng 10mg;
- h) Berberin với lượng khoảng 10mg.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này chứa:

- a) L-arginin với lượng khoảng 150mg;
- b) L-citrullin với lượng khoảng 300mg;
- c) Glutathion với lượng khoảng 50mg;
- d) L-selenomethionin với lượng khoảng 0,15mg;
- e) Coenzym Q10 với lượng khoảng 10mg;
- f) Curcumin với lượng khoảng 10mg;
- g) Resveratrol với lượng khoảng 10mg;
- h) Quercetin với lượng khoảng 10mg;
- i) Berberin với lượng khoảng 10mg.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này chứa chứa:

- a) L-arginin với lượng khoảng 150mg;
- b) L-citrullin với lượng khoảng 300mg;
- c) Glutathion với lượng khoảng 50mg;
- d) L-selenomethionin với lượng khoảng 0,15mg;
- e) Coenzym Q10 với lượng khoảng 10mg;
- f) Curcumin với lượng khoảng 10mg;
- g) Resveratrol với lượng khoảng 10mg;
- h) Quercetin với lượng khoảng 10mg;
- i) Berberin với lượng khoảng 10mg;
- j) Vitamin D với lượng khoảng 0,15mg.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này được bào chế ở dạng viên nén, viên nang, viên bao, viên ngậm, viên sủi, viên nhai, dung dịch, hỗn dịch và nhũ tương.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này ở dạng viên nang. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm này được bào chế ở dạng viên nang cứng.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm này ở dạng viên nang với lượng khoảng 550mg/viên nang.

Chế phẩm theo sáng chế có kích thước nano. Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, chế phẩm này có kích thước nằm trong khoảng từ 10 đến 100nm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 20 đến 90nm, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 30 đến 70nm, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 40 đến 60nm. Theo một

phương án cụ thể được ưu tiên, tốt hơn nếu chế phẩm này có kích thước trung bình (d.nm) là khoảng 64.50.

Quy trình bào chế chế phẩm

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế còn đề xuất quy trình bào chế chế phẩm theo khía cạnh thứ nhất hoặc phương án bất kỳ của nó, quy trình này bao gồm bước trộn các thành phần hoạt chất với tỷ lệ khối lượng mong muốn như được mô tả trên đây.

Theo một phương án của khía cạnh thứ hai và như được mô tả trên đây, quy trình này còn bao gồm bước phối trộn thành phần hoạt chất với chất mang giúp làm ổn định hoạt chất.

Theo phương án khác, chất mang được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol (PEG), Tween 20, Tween 40, Tween 60 và Tween 80.

Theo phương án khác nữa, chất mang được chọn từ nhóm bao gồm PEG và Tween 40.

Theo phương án khác nữa, chất mang được trộn lẫn với a) L-arginin và b) L-citrullin để tạo thể liên kết bền vững, đồng thời tạo thuận lợi cho quá trình sản xuất chế phẩm trước khi được trộn với các thành phần khác.

Theo phương án khác nữa, các thành phần còn được phân tán dưới dạng hạt nano để tăng độ hoà tan và độ thấm trước khi được phối trộn.

Theo phương án khác nữa, e) Coenzym Q10 được phân tán ở dạng nano lyposom với kích thước hạt tối đa 100 nm.

Theo phương án khác nữa, f) Curcumin được phân tán ở dạng vi nhũ tương nano với kích thước hạt nằm trong khoảng từ 20 đến 50 nm.

Theo phương án khác nữa, g) Resveratrol được phân tán ở dạng dung dịch Resveratrol tan trong nước với kích thước hạt nằm trong khoảng từ 20 đến 30 nm.

Theo phương án khác nữa, h) Quercetin được phân tán ở dạng nhũ tương nano với kích thước hạt nằm trong khoảng từ 50 đến 100 nm.

Theo phương án khác nữa, i) Berberin được phân tán ở dạng dung dịch berberin dạng nano tan trong nước với kích thước hạt nano siêu nhỏ nằm trong khoảng từ 5 đến 10 nm.

Theo một phương án đặc biệt được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế được bào chế bằng quy trình bao gồm các bước sau đây:

i) chuẩn bị hệ bột bao gồm L-Arginin, vi chất chứa Se, vitamin D;

ii) chuẩn bị hệ bột bao gồm các thành phần còn lại của chế phẩm như được mô tả trên đây với Syloid;

iii) phối trộn hệ bột của bước i) với hệ bột của bước ii).

Theo một phương án đặc biệt được ưu tiên khác, sản phẩm theo sáng chế được bào chế theo quy trình bao gồm các bước sau đây:

i) chuẩn bị hệ bột bao gồm L-Arginin, vi chất chứa Se, vitamin D và L-Citrullin;

ii) chuẩn bị hệ bột bao gồm các thành phần còn lại của chế phẩm như được mô tả trên đây với Syloid;

iii) phối trộn hệ bột của bước i) với hệ bột của bước ii).

Syloid, hay SYLOID[®], là silic dioxid dạng bột (Porous Silicon Dioxide) là sản phẩm có bán sẵn trên thị trường từ hành Grace (Mỹ) – sản xuất tại Đức. Theo một phương án, SYLOID được sử dụng theo sáng chế là Silica Gel dạng cầu xốp với cấu trúc độc đáo, tá dược đa chức năng bởi hợp chất này có thể giúp cải thiện độ ổn định, thời gian phóng thích hoạt chất và hạn dùng của dạng bào chế sau cùng, v.v. Ngoài ra, Syloid có sự cân bằng độc đáo giữa khả năng hấp phụ hoạt chất, tính chất xốp, kích thước hạt và cấu trúc bề mặt cho phép duy trì độ phóng thích hoạt chất ổn định và không bị giảm hàm lượng theo thời gian.

Tại thị trường Việt Nam các dòng Syloid đang được phân phối bao gồm Syloid FP Silica (Syloid 244 FP, Syloid AL-1 FP) và Syloid XDP Silica (Syloid XDP 3050, Syloid XDP 3150). Do đó, việc mô tả chi tiết hơn các hóa chất này là không cần thiết. Ngoài ra, cần lưu ý rằng, các dòng này đều có thể sử dụng một cách thích hợp theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, Syloid được sử dụng theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm Syloid FP 244 silica và Syloid AL-1 FP với mục đích để tạo ra khối bột có các đặc tính và hiệu quả sau đây.

- Tính trơn chảy tốt cho quá trình dập thẳng
- Tăng độ ổn định, độ đồng nhất, độ đồng đều khối lượng cho chế phẩm
- Khử ẩm và kiểm soát độ ẩm
- Làm tác nhân chống dính khi bao phim
- Làm giảm đáng kể sự tích tụ tĩnh điện trong quá trình chảy của khối bột
- Giúp cải thiện thời gian rã
- Giúp lưu giữ mùi hương lâu trong chế phẩm
- Tạo điều kiện giúp trộn chất lỏng với các thành phần khác
- Giúp phóng thích các hoạt chất, từ đó tăng độ hòa tan và sinh khả dụng

Cụ thể, theo một phương án, bước ii) trên đây được thực hiện bằng cách trộn các thành phần còn lại (ở dạng hệ dung dịch nano) với Syloid để tạo ra bột trước khi phối trộn với bột của bước i).

Cần lưu ý rằng, theo một phương án cụ thể, mục đích của sáng chế là tạo ra viên nang cứng. Tuy nhiên, các thành phần còn lại như mô tả trên đây khi được chuẩn bị thường ở dạng hệ dung dịch nano (lỏng) không thích hợp để tạo ra viên nang cứng (do bản chất của chúng chỉ thích hợp để tạo viên nang mềm). Các tác giả sáng chế thực hiện các nghiên cứu sâu rộng để khắc phục vấn đề này và phát hiện ra rằng việc phối trộn với Syloid cho phép đạt được mục đích trên đây đồng thời tạo ra các đặc tính và/hoặc hiệu quả thuận lợi cho các công đoạn tiếp theo và chế phẩm thành phẩm.

Theo một phương án, Syloid được sử dụng là Syloid FP 244 silica.

Theo phương án khác, tốt hơn nếu trong bước ii), các thành phần còn lại được trộn lẫn với Syloid để tạo ra bột với tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 1/(0,6-1,4). Theo phương án khác nữa, tốt hơn nếu tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 1/(0,8-1,2). Theo phương án khác nữa, tốt hơn nếu tỷ lệ này là khoảng 1/0,9. Theo phương án khác nữa, tốt hơn nếu tỷ lệ này là khoảng từ 1/1. Theo phương án khác nữa, tốt hơn nếu tỷ lệ này là khoảng từ 1/1,1. Theo phương án khác nữa, tốt hơn nếu tỷ lệ này là khoảng từ 1/1,2.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm được bào chế ở dạng viên nén, viên nang, viên bao, viên ngậm, viên sủi, viên nhai, dung dịch, hỗn dịch và nhũ tương.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm được bào chế ở dạng viên nang, tốt hơn là viên nang cứng.

Theo phương án khác nữa, chế phẩm được bào chế ở dạng thực phẩm chức năng dạng viên nang cứng với lượng khoảng 550mg/viên nang.

Phương pháp tạo ra viên nang, tốt hơn là viên nang cứng, từ bột là thông dụng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và do đó có thể sử dụng phương pháp bất kỳ tạo viên nang cứng thông dụng. Do đó, việc mô tả thêm là không cần thiết.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế còn được mô tả một cách chi tiết hơn thông qua các ví dụ chỉ mới mục đích minh họa cho sáng chế mà không làm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ 1: Các chế phẩm theo sáng chế

Các thành phần hoạt chất chính cho công thức chế phẩm NO Plus theo sáng chế được chuẩn bị như được thể hiện văn tắt dưới đây. Sau đó, chế phẩm được bào chế theo quy trình như được mô tả trên đây.

Ví dụ 1-1: Thành phần công thức NO Plus 1

Thành phần	Hàm lượng (mg)
L-arginin	150
L-citrullin	300
Glutathion	50
Nano CoQ10	10
Tổng	550

Lưu ý rằng, khối lượng của các thành phần trên được tính cho chế phẩm dạng viên nang khối lượng khoảng 550 mg/viên nang.

Ví dụ 1-2: Thành phần công thức NO Plus 2

Thành phần	Hàm lượng (mg)
L-arginin	150
L-citrullin	300
Glutathion	50
Nano CoQ10	10
Nano Curcumin	10
Tổng	550

Lưu ý rằng, khối lượng của các thành phần trên được tính cho chế phẩm dạng viên nang khối lượng khoảng 550 mg/viên nang.

Ví dụ 1-3: Thành phần công thức NO Plus 3

Thành phần	Hàm lượng (mg)
L-arginin	150
L-citrullin	300
Glutathion	50
Nano CoQ10	10
Nano Curcumin	10
Nano Resveratrol	10
Tổng	550

Lưu ý rằng, khối lượng của các thành phần trên được tính cho chế phẩm dạng viên nang khối lượng khoảng 550 mg/viên nang.

Ví dụ 1-4: Thành phần công thức NO Plus 4

Thành phần	Hàm lượng (mg)
L-arginin	150
L-citrullin	300
Glutathion	50
Nano CoQ10	10
Nano Curcumin	10
Nano Resveratrol	10
Nano Quercetin	10
Tổng	550

Lưu ý rằng, khối lượng của các thành phần trên được tính cho chế phẩm dạng viên nang khối lượng khoảng 550 mg/viên nang.

Ví dụ 1-5: Thành phần công thức NO Plus 5

Thành phần	Hàm lượng (mg)
L-arginin	150
L-citrullin	300
Glutathion	50
CoQ10	10
Curcumin	10
Resveratrol	10
Quercetin	10
Berberin	10
Tổng	550

Lưu ý rằng, khối lượng của các thành phần trên được tính cho chế phẩm dạng viên nang khối lượng khoảng 550 mg/viên nang.

Ví dụ 1-6: Thành phần công thức NO Plus 6

Thành phần	Hàm lượng (mg)
L-arginin	150

L-citrullin	300
Glutathion	50
Nano CoQ10	10
Nano Curcumin	10
Nano Resveratrol	10
Nano Quercetin	10
Nano Berberin	10
L-selenomethionin	0,15
Tổng	550,15

Ví dụ 1-7: Thành phần công thức NO Plus 7

Thành phần	Hàm lượng (mg)
L-arginin	150
L-citrullin	300
Glutathion	50
Nano CoQ10	10
Nano Curcumin	10
Nano Resveratrol	10
Nano Quercetin	10
Nano Berberin	10
L-selenomethionin	0,15
Vitamin D	0,15
Tổng	550,3

Cần phải hiểu rằng, các ví dụ về chế phẩm khác có thể được điều chế theo cách tương tự bằng cách điều chỉnh tỷ lệ các hợp chất theo mong muốn trong khoảng như đã được mô tả theo sáng chế.

Ví dụ 2: Nghiên cứu tác dụng của chế phẩm theo sáng chế

Chế phẩm, hóa chất, đối tượng nghiên cứu và phương pháp đánh giá trong ví dụ này được mô tả một cách cụ thể sau đây.

Chế phẩm nghiên cứu

Chế phẩm nano NO Plus (Nano NO⁺) trong ví dụ 1, cụ thể là chế phẩm 5-7, được bào chế ở dạng thực phẩm chức năng dạng viên nang cứng đạt tiêu chuẩn cơ sở (TCCS).

Liều dùng dự kiến trên người của Nano NO⁺ là 3000 mg/người/ngày. Với quy ước cân nặng của người 50kg, liều dùng của Nano NO⁺ là 60 mg/kg/ngày. Quy đổi theo hệ số quy đổi từ người sang động vật thực nghiệm, liều dùng dự kiến có tác dụng trên đối tượng nghiên cứu là chuột cống (hệ số quy đổi là 7) là 420 mg/kg/ngày. Đây là liều cơ sở (liều 1) được dùng để đánh giá tác dụng của chế phẩm dạng viên nang Nano NO⁺. Mức liều cao (liều 2) được dùng trong nghiên cứu gấp đôi liều 1, tức 840mg/kg/ngày.

Động vật nghiên cứu

Chuột cống trắng chủng Wistar với số lượng được mô tả trong bảng dưới đây.

Bảng số lượng động vật thực nghiệm

Động vật	Số lượng	Tiêu chuẩn	Nghiên cứu
Chuột cống trắng chủng Wistar	84	Giống đực, khỏe mạnh, trọng lượng 200 - 220g	Đánh giá tác dụng hạ huyết áp của Nano NO ⁺
Chuột cống trắng chủng Wistar	60	Giống đực, khỏe mạnh, trọng lượng 200 - 220g	Đánh giá tác dụng chống xơ vữa mạch

Các chuột khỏe mạnh được đánh giá bao gồm lông mượt, mắt trong, hậu môn khô, hoạt động, vận động bình thường, ăn uống bình thường, chất thải bình thường. Việc lựa chọn chuột nghiên cứu được tiến hành bởi hai kỹ thuật viên có nhiều kinh nghiệm. Sau khi lựa chọn xong, trực tiếp cán bộ nghiên cứu kiểm tra, đánh giá lại.

Động vật thí nghiệm do Ban chăn nuôi - Học viện Quân y cung cấp, nuôi dưỡng trong phòng nuôi động vật thí nghiệm ít nhất một tuần trước khi tiến hành thí nghiệm. Động vật ăn thức ăn theo tiêu chuẩn thức ăn cho động vật nghiên cứu, nước sạch đun sôi để nguội uống tự do.

Hóa chất nghiên cứu

- L-NAME (N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester) của Sigma - Mỹ.
- Griess Reaction System kit (Promega, Madison, WI, USA)

- Các kit xét nghiệm SOD, Glutathion, MDA của Sigma - Mỹ.
- Các hóa chất triglycerit (triglyceride - TG), cholesterol toàn phần (total cholesterol - TC), lipoprotein tỷ trọng cao (high-density lipoprotein - HDL-C), lipoprotein tỷ trọng thấp (Low density lipoprotein - LDL-C).

Dụng cụ, máy móc, thiết bị

- Hệ thống đo huyết áp đuôi chuột không xâm lấn của hãng ADInstrument (New Zealand)
- Buồng làm ấm động vật thực nghiệm của hãng Ugo – Basile (Italy)
- Bộ dụng cụ mổ động vật cỡ nhỏ, kim cho chuột sử dụng theo đường miệng thuốc.
- Các dụng cụ khác.

Phương pháp đánh giá

Đánh giá tác dụng hạ huyết áp của chế phẩm Nano NO⁺

Đánh giá tác dụng hạ huyết áp của Nano NO⁺ trên mô hình gây tăng huyết áp bởi L-NAME (N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester) theo phương pháp được mô tả bởi Bilanda và cộng sự (Bilanda DC* et. al.: "*Ethylene acetate extract can protect against L-NAME-induced hypertension on rats*", BMC Complement Altern Med. 2017 Oct 10;17(1):479. doi: 10.1186/s12906-017-1972-0. PMID: 29017485; PMCID: PMC5633871).

Chuột cống trắng, giống đực, được chia thành 5 lô, mỗi lô 12 con:

- Lô chứng sinh lý (lô 1): Không gây tăng huyết áp + uống nước cất.
- Lô chứng bệnh (lô 2): Gây tăng huyết áp + uống nước cất.
- Lô đối chứng losartan 25 (lô 3): Gây tăng huyết áp + uống losartan 25mg/kg/ngày.
- Lô Nano NO⁺ 420 (lô 4): Gây tăng huyết áp + uống Nano NO⁺ liều 420 mg/kg/ngày.
- Lô Nano NO⁺ 840 (lô 5): Gây tăng huyết áp + uống Nano NO⁺ liều 840 mg/kg/ngày.

Chuột được gây tăng huyết áp bằng cách cho dùng qua đường miệng (uống) L-NAME (0,5% khối lượng/thể tích (w/v) trong nước cất), liều 50mg/kg/ngày trong 4 tuần liên tục. Chuột được uống nước cất, mẫu tham chiếu hoặc mẫu nghiên cứu (uống cưỡng bức bằng kim cong đầu tù chuyên dụng) đồng thời với quá trình gây tăng huyết áp, trong 4 tuần liên tục.

Tiến hành đo huyết áp tâm thu, huyết áp tâm trương và nhịp tim chuột ở cả các lô bằng hệ thống đo huyết áp đuôi chuột không xâm lấn tại các thời điểm:

- T0 (trước dùng thuốc);

- T1, T2, T3, T4 (sau 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần dùng thuốc).

Chuột bị hạn chế vận động trong dụng cụ giam giữ trong vòng 10 đến 20 phút/ngày trong 5 ngày trước khi ghi huyết áp để làm quen với điều kiện ghi huyết áp. Ghi huyết áp chuột ở sát gốc đuôi chuột bằng kỹ thuật quấn đuôi (tail-cuff technique). Các chuột được sưởi ấm 30 phút ở 28°C trong tủ sưởi được kiểm soát nhiệt độ (Ugo Basille, Ý) để phát hiện tốt hơn xung động mạch đuôi, nơi mà đuôi được đưa qua vòng bút và cảm biến vòng bút ở đuôi được kết nối với bộ khuếch đại (ML 125 NIBP, AD Instruments, Australia).

Để giảm thiểu sự thay đổi huyết áp do căng thẳng gây ra, tất cả các phép đo được thực hiện bởi cùng một người trong cùng một môi trường yên tĩnh tại cùng một thời điểm trong ngày.

Huyết áp trung bình của chuột theo công thức như được mô tả bởi E. Meaney và cộng sự (E. Meaney* et.al.: "*Formula and nomogram for the sphygmomanometric calculation of the mean arterial pressure heart*", vol. 84, no. 1, p. 64, 2000) và được mô tả như sau đây:

$$HA_{\text{trung bình}} = HA_{\text{tâm trương}} + 0,412 (HA_{\text{tâm thu}} - HA_{\text{tâm trương}})$$

Kết thúc thí nghiệm, lấy máu từ buồng tim chuột vào ống chống đông, ly tâm lấy huyết tương để xét nghiệm. Nồng độ NO được đo trong các mẫu huyết tương bằng phản ứng Griess (Bryan NS* et.al.: "*Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples*", Free Radic Biol Med. 2007 Sep 1;43(5):645-57. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026. Epub 2007 Apr 29. PMID: 17664129; PMCID: PMC2041919), sử dụng Griess Reaction System kit (Promega, Madison, WI, USA). Đánh giá một số chỉ số oxy hóa: SOD, Glutathion, MDA.

Đánh giá tác dụng chống xơ vữa động mạch của chế phẩm Nano NO⁺

Việc đánh giá tác dụng của Nano NO⁺ trên chuột gây rối loạn lipid máu, xơ vữa mạch theo phương pháp được mô tả bởi Valentina Yurina và cộng sự (Yurina* et.al.: "*Prolonged-heated High-Fat Diet Increase the Serum LDL Cholesterol Level and Induce the Early Atherosclerotic Plaque Development in Wistar Rats*", Journal of Tropical Life Science. 9. 9-14. 10.11594/jtls.09.01.02).

Chuột cống trắng chủng Wistar, giống đực, đủ tiêu chuẩn thí nghiệm, được phân ngẫu nhiên vào 5 lô, mỗi lô 12 con.

- Lô chứng sinh lý: chế độ ăn bình thường, uống nước cất
- Lô chứng bệnh: chế độ ăn nhiều mỡ cháy + uống nước cất
- Lô simvastatin 3: chế độ ăn nhiều mỡ cháy + uống simvastatin 3 mg/kg/24h.
- Lô Nano NO⁺ 420: chế độ ăn nhiều mỡ cháy + uống Nano NO⁺ liều 420 mg/kg/ngày.
- Lô Nano NO⁺ 840: chế độ ăn nhiều mỡ cháy + uống Nano NO⁺ liều 840 mg/kg/ngày.

Chuột công trắng được cho ăn thức ăn nhiều mỡ cháy trong thời gian 8 tuần. Thức ăn nhiều mỡ cháy cho chuột được bào chế theo công thức sau:

- Bột ngô 42,7%,
- dầu đậu nành 7%,
- casein 20%,
- sucroza 10%,
- xenluloza 5%,
- gelatin 3%,
- mỡ lợn cháy 10% (đun nóng ở 190°C trong 24 giờ),
- axit cholic 0,3%,
- cholesterol 2%.

Thuốc được cho uống trong 28 ngày, hàng ngày vào một giờ cố định (8h sáng), bắt đầu ngay sau khi kết thúc 8 tuần cho chuột ăn chế độ ăn nhiều dầu mỡ cháy. Đánh giá cân nặng của chuột. Lấy máu tại các thời điểm NO (ngay trước uống thuốc), N14 (sau 14 ngày uống thuốc) và N28 (sau 28 ngày uống thuốc) để xét nghiệm các chỉ số lipit máu: triglyxerit (triglyceride - TG), cholesterol toàn phần (total cholesterol - TC), lipoprotein tỷ trọng cao (high-density lipoprotein - HDL-C), lipoprotein tỷ trọng thấp (Low density lipoprotein - LDL-C).

Chỉ số xơ vữa mạch (chỉ số Atherogenic index - A.I) được tính toán theo công thức sau đây:

$$A.I = (TC - HDL-C)/HDL-C$$

trong đó các ký hiệu là như được mô tả trên đây.

Kết thúc 28 ngày dùng thuốc, chuột được làm chết nhân đạo, lấy máu đánh giá một số chỉ số oxy hóa: SOD, Glutathion, MDA.

Đo NO được đo trong các mẫu huyết tương bằng phản ứng Griess trên đây, sử dụng Griess Reaction System kit (Promega, Madison, WI, USA).

Phẫu tích đánh giá các chỉ số

- Khối lượng tương đối của các tạng (tính cho 100g thể trọng chuột): gồm gan, tim, thận, mỡ bụng.
- Đánh giá hình ảnh đại thể và vi thể gan nhuộm HE.
- Lấy động mạch chủ làm tiêu bản đánh giá mức độ tổn thương xơ vữa mạch.

Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý theo các phương pháp thống kê y sinh học, so sánh bằng thử nghiệm anova (anova test), thử nghiệm post-hoc Tukey (post-hoc Tukey test), sử dụng phần mềm SPSS 16.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Ví dụ 2.1: Kết quả đánh giá tác dụng hạ huyết áp tâm thu chuột của chế phẩm Nano NO⁺ theo sáng chế

Kết quả đánh giá tác dụng hạ huyết áp tâm thu của chế phẩm theo sáng chế (chế phẩm Nano NO Plus hay Nano NO⁺) được thể hiện trong bảng 1 sau đây.

Bảng 1- Kết quả huyết áp tâm thu của chuột

Lô chuột	Huyết áp tâm thu của chuột (mmHg), n= 12, Mean $\pm$ SD				
	T0 (a)	T1 (b)	T2 (c)	T3 (d)	T4 (e)
Chứng sinh lý (lô 1)	121,26 $\pm$ 16,67	122,01 $\pm$ 32,43	122,64 $\pm$ 24,48	123,01 $\pm$ 24,23	122,22 $\pm$ 25,36
Chứng bệnh (lô 2)	121,31 $\pm$ 14,57	139,57 $\pm$ 24,05	146,21* $\pm$ 25,35	155,13** $\pm$ 21,85	163,18** $\pm$ 28,08
Losartan 25 (lô 3)	120,90 $\pm$ 14,65	125,50 $\pm$ 21,76	128,40 $\pm$ 26,58	130,43 [#] $\pm$ 22,39	132,47 ^{##} $\pm$ 24,48
Nano NO ⁺ 420 (lô 4)	120,82 $\pm$ 15,51	125,69 $\pm$ 24,52	129,17 $\pm$ 25,47	134,28 [#] $\pm$ 19,15	135,42 [#] $\pm$ 24,08
Nano NO ⁺ 840 (lô 5)	121,09 $\pm$ 14,16	124,98 $\pm$ 23,91	128,52 $\pm$ 25,47	131,90 [#] $\pm$ 19,95	132,30 ^{##} $\pm$ 23,21

* $p < 0,05$ so với chứng sinh lý

** $p < 0,01$ so với chứng sinh lý

[#] $p < 0,05$ so với chứng bệnh

^{##} $p < 0,01$ so với chứng bệnh

Nhận xét

- So với lô chứng sinh lý (lô 1), huyết áp tâm thu của chuột ở lô chứng bệnh (lô 2) tăng cao có ý nghĩa thống kê bắt đầu tại thời điểm T2 ($p < 0,05$) và tăng cao rõ rệt ($p < 0,01$) tại thời điểm T3, T4.

Như vậy sau 2 tuần cho chuột sử dụng theo đường miệng L-NAME (0,5% w/v trong nước cất), huyết áp tâm thu của chuột bắt đầu tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), và mức tăng rõ rệt ($p < 0,01$) sau 3, 4 tuần cho chuột sử dụng theo đường miệng L-NAME.

- So với lô chứng bệnh (lô 2), huyết áp tâm thu của chuột ở lô dùng Losartan (lô 3) và các lô dùng chế phẩm Nano NO⁺ (lô 4, 5) giảm hơn so có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh bắt đầu tại thời điểm T3 ($p > 0,05$) và mức độ giảm rõ rệt hơn ở thời điểm T4 ($p < 0,01$ khi so sánh lô 3 và lô 5 so với lô chứng bệnh).

- So với lô 3 (dùng Losartan 25mg/kg), huyết áp tâm thu của chuột ở các lô dùng chế phẩm Nano NO⁺ (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Như vậy, chế phẩm Nano NO⁺ theo sáng chế ở các liều dùng 420 mg/kg và 840 mg/kg đã thể hiện tác dụng hạ huyết áp tâm thu trên mô hình gây tăng huyết áp ở chuột bằng cho uống L-NAME, và có tác dụng hạ huyết áp của Nano NO⁺ ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với Losartan 25mg/kg.

Cần lưu ý rằng, chế phẩm Nano NO⁺ theo sáng chế được bào chế ở dạng thực phẩm chức năng dạng viên nang cứng, trái lại Losartan là ở dạng thuốc. Như được mô tả trên đây, thực phẩm chức năng có rất nhiều lợi ích hơn so với thuốc bởi không cần tuân theo các yêu cầu nghiêm ngặt về độ an toàn và hiệu quả như thuốc, ít gây ra tác dụng phụ hơn và mang lại nhiều lợi ích sức khỏe. Hơn nữa, do ở dạng nano, nên mức độ hướng đích cũng giúp tạo ra các dụng điều trị đối với chế phẩm theo sáng chế.

Ngoài ra, chế phẩm Nano NO⁺ 420 (lô 4) và chế phẩm Nano NO⁺ 840 (lô 5) thể hiện tác dụng về cơ bản là tương tự nhau. Do đó, theo một phương án cụ thể được ưu tiên, lượng chế phẩm Nano NO⁺ theo sáng chế được sử dụng ở liều 420 mg/kg/ngày, việc sử dụng liều cao hơn, ví dụ gấp đôi liều lượng không giúp tạo ra hiệu quả tốt hơn.

Phản thảo luận này có thể áp dụng một cách tương tự cho các nội dung sau đây.

Ví dụ 2.2: Tác dụng hạ huyết áp tâm trương của chuột

Kết quả đánh giá tác dụng hạ huyết áp tâm trương của chế phẩm theo sáng chế (Nano NO⁺) được thể hiện trong bảng 2 sau đây.

Bảng 2 - Kết quả huyết áp tâm trương của chuột

Lô chuột	Huyết áp tâm trương của chuột (mmHg), n= 12, Mean $\pm$ SD				
	T0 (a)	T1 (b)	T2 (c)	T3 (d)	T4 (e)
Chứng sinh lý (lô 1)	100,97 $\pm$ 13,99	101,67 $\pm$ 27,02	102,20 $\pm$ 20,40	102,51 $\pm$ 20,19	101,85 $\pm$ 21,13
Chứng bệnh (lô 2)	101,09 $\pm$ 12,14	116,31 $\pm$ 20,03	121,84* $\pm$ 21,12	129,28** $\pm$ 18,21	135,99** $\pm$ 23,41
Losartan 25 (lô 3)	100,83 $\pm$ 11,99	104,58 $\pm$ 18,13	107,18 $\pm$ 25,67	108,69# $\pm$ 18,66	110,39## $\pm$ 20,41
Nano NO ⁺ 420 (lô 4)	100,68 $\pm$ 12,93	104,74 $\pm$ 20,43	107,64 $\pm$ 21,22	111,90# $\pm$ 15,95	112,85# $\pm$ 20,07

Nano NO ⁺ 840 (lô 5)	100,90 ± 11,80	104,15 ± 19,91	107,53 ± 20,61	109,92# ± 16,63	110,25## ± 19,35
------------------------------------	-------------------	-------------------	-------------------	--------------------	---------------------

* $p < 0,05$ so với chứng sinh lý

** $p < 0,01$ so với chứng sinh lý

$p < 0,05$ so với chứng bệnh,

$p < 0,01$ so với chứng bệnh

Nhận xét

- So với lô chứng sinh lý (lô 1), huyết áp tâm trương của chuột ở lô chứng bệnh (lô 2) tăng cao có ý nghĩa thống kê bắt đầu tại thời điểm T2 ($p < 0,05$) và tăng cao rõ rệt ($p < 0,01$) tại thời điểm T3, T4.

Như vậy sau 2 tuần cho chuột sử dụng theo đường miệng L-NAME (0,5% w/v trong nước cất), huyết áp tâm trương của chuột bắt đầu tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), và mức tăng rõ rệt ($p < 0,01$) sau 3, 4 tuần cho chuột sử dụng theo đường miệng L-NAME.

- So với lô chứng bệnh (lô 2), huyết áp tâm trương của chuột ở lô dùng Losartan (lô 3) và các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) giảm hơn so có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh bắt đầu tại thời điểm T3 ($p > 0,05$) và mức độ giảm rõ rệt hơn ở thời điểm T4 ($p < 0,01$ khi so sánh lô 3 và lô 5 so với lô chứng bệnh).

- So với lô 3 (dùng Losartan 25mg/kg), huyết áp tâm trương của chuột ở các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Như vậy, Nano NO⁺ ở các liều dùng 420 mg/kg và 840 mg/kg đã thể hiện tác dụng hạ huyết áp tâm trương trên mô hình gây tăng huyết áp ở chuột bằng cho uống L-NAME, và có tác dụng hạ huyết áp của Nano NO⁺ ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với Losartan 25mg/kg.

Ví dụ 2.3: Tác dụng hạ huyết áp trung bình của chuột

Kết quả đáng giá tác dụng hạ huyết áp trung bình của chuột của chế phẩm theo sáng chế (Nano NO⁺) được thể hiện trong bảng 3 sau đây.

Bảng 3 - Kết quả huyết áp trung bình của chuột

Lô chuột	Huyết áp trung bình của chuột (mmHg), n= 12, Mean ± SD				
	T0 (a)	T1 (b)	T2 (c)	T3 (d)	T4 (e)
Chứng sinh lý (lô 1)	109,33 ± 15,10	110,05 ± 29,25	110,62 ± 22,08	110,96 ± 21,89	110,24 ± 22,87
Chứng bệnh	109,42	125,89	131,88*	139,93**	147,19**

(lô 2)	$\pm 13,14$	$\pm 21,69$	$\pm 22,86$	$\pm 19,71$	$\pm 25,34$
Losartan 25 (lô 3)	$109,10 \pm 13,05$	$113,20 \pm 19,62$	$115,92 \pm 25,86$	$117,65^{\#} \pm 20,20$	$119,49^{##} \pm 22,08$
Nano NO ⁺ 420 (lô 4)	$108,98 \pm 13,99$	$113,37 \pm 22,12$	$116,51 \pm 22,97$	$121,12^{\#} \pm 17,27$	$122,15^{\#} \pm 21,72$
Nano NO ⁺ 840 (lô 5)	$109,22 \pm 12,78$	$112,73 \pm 21,56$	$116,18 \pm 22,59$	$118,98^{\#} \pm 18,00$	$119,33^{##} \pm 20,94$

* $p < 0,05$ so với chứng sinh lý

** $p < 0,01$ so với chứng sinh lý

[#] $p < 0,05$ so với chứng bệnh

^{##} $p < 0,01$ so với chứng bệnh

Nhận xét

- So với lô chứng sinh lý (lô 1), huyết áp trung bình của chuột ở lô chứng bệnh (lô 2) tăng cao có ý nghĩa thống kê bắt đầu tại thời điểm T2 ($p < 0,05$) và tăng cao rõ rệt ($p < 0,01$) tại thời điểm T3, T4.

Như vậy sau 2 tuần cho chuột sử dụng theo đường miệng L-NAME (0,5% w/v trong nước cất), huyết áp trung bình của chuột bắt đầu tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), và mức tăng rõ rệt ($p < 0,01$) sau 3, 4 tuần cho chuột sử dụng theo đường miệng L-NAME.

- So với lô chứng bệnh (lô 2), huyết áp trung bình của chuột ở lô dùng Losartan (lô 3) và các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) giảm hơn so có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh bắt đầu tại thời điểm T3 ($p > 0,05$) và mức độ giảm rõ rệt hơn ở thời điểm T4 ($p < 0,01$ khi so sánh lô 3 và lô 5 so với lô chứng bệnh).

- So với lô 3 (dùng Losartan 25mg/kg), huyết áp trung bình của chuột ở các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Như vậy, chế phẩm Nano NO⁺ theo sáng chế ở các liều dùng 420 mg/kg và 840 mg/kg đã thể hiện tác dụng hạ huyết áp trung bình trên mô hình gây tăng huyết áp ở chuột bằng cho uống L-NAME, và có tác dụng hạ huyết áp của Nano NO⁺ ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với Losartan 25mg/kg.

Ví dụ 2.4: Tác dụng hạ nhịp tim của chuột

Kết quả đáng giá tác dụng đối với nhịp tim của chuột của chế phẩm theo sáng chế (Nano NO⁺) được thể hiện trong bảng 4 sau đây.

Bảng 4 - Kết quả đánh giá nhịp tim của chuột trong nghiên cứu Nano NO⁺

Lô chuột	Nhịp tim của chuột (nhịp/phút), n= 12, Mean $\pm$ SD				
	T0 (a)	T1 (b)	T2 (c)	T3 (d)	T4 (e)
Chứng sinh lý (lô 1)	431,45 $\pm$ 26,36	430,26 $\pm$ 30,85	428,92 $\pm$ 32,54	430,12 $\pm$ 33,36	431,22 $\pm$ 33,16
Chứng bệnh (lô 2)	429,96 $\pm$ 35,18	427,92 $\pm$ 32,16	426,68 $\pm$ 34,37	425,85 $\pm$ 35,18	424,94 $\pm$ 33,61
Losartan 25 (lô 3)	429,64 $\pm$ 31,55	431,14 $\pm$ 29,98	428,95 $\pm$ 32,16	429,42 $\pm$ 31,58	430,26 $\pm$ 31,72
Nano NO ⁺ 420 (lô 4)	428,92 $\pm$ 29,62	430,21 $\pm$ 32,12	427,32 $\pm$ 31,16	428,05 $\pm$ 30,82	429,69 $\pm$ 30,95
Nano NO ⁺ 840 (lô 5)	429,29 $\pm$ 31,56	432,04 $\pm$ 31,35	428,68 $\pm$ 32,09	429,25 $\pm$ 30,44	430,16 $\pm$ 31,35

Nhận xét

Như được mô tả trên đây, so sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm, cũng như so sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, nhịp tim của chuột không có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy chế phẩm theo sáng chế không ảnh hưởng đến nhịp tim chuột.

Ví dụ 2.5: Ảnh hưởng của chế phẩm Nano NO⁺ lên nồng độ NO và các chỉ số đánh giá khả năng chống oxy hóa (SOD, GSH, MDA) trong huyết tương chuột

Ảnh hưởng của chế phẩm Nano NO⁺ lên nồng độ NO và các chỉ số đánh giá khả năng chống oxy hóa trong huyết tương chuột, bao gồm các chất chống oxy hóa như superoxit dismutaza (superoxide dismutase - SOD), malondialdehyde (malondialdehyt - MDA) và glutathion (glutathione - GSH), được thể hiện trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5 - Kết quả đánh giá nồng độ NO, SOD, GSH, MDA trong huyết tương chuột gây tăng huyết áp của chế phẩm Nano NO⁺

Lô chuột	Nồng độ NO (μ M/ml)	SOD (U/ml)	GSH (μ mol/ml)	MDA (nmol/ml)
Chứng sinh lý (lô 1)	20,81 $\pm$ 3,27	119,66 $\pm$ 29,86	82,69 $\pm$ 19,21	5,24 $\pm$ 0,92
Chứng bệnh (lô 2)	15,83** $\pm$ 3,22	60,27** $\pm$ 13,17	39,13** $\pm$ 7,24	11,09** $\pm$ 2,35

Losartan 25 (lô 3)	19,12## ± 2,36	92,97## ± 20,77	68,33## ± 12,20	8,81## ± 1,49
Nano NO+ 420 (lô 4)	19,96## ± 2,74	98,01## ± 19,29	73,19## ± 11,45	7,97## ± 1,05
Nano NO+ 840 (lô 5)	20,32## ± 2,67	106,93## ± 15,46	76,92## ± 10,28	7,22## ± 1,09

Số liệu thể hiện dưới dạng Mean ± SD với n= 12;

**p < 0,01 so với chứng sinh lý; ##p < 0,01 so với chứng bệnh

Nhận xét

- So với lô chứng sinh lý (lô 1), ở lô chứng bệnh (lô 2) có nồng độ NO, SOD, GSH trong huyết tương giảm, nồng độ MDA trong huyết thanh tăng có ý nghĩa thống kê với p < 0,01.

- So với lô chứng bệnh (lô 2), ở lô dùng Losartan (lô 3) và các lô dùng Nano NO+ (lô 4, 5) có nồng độ NO, SOD, GSH trong huyết tương tăng, nồng độ MDA trong huyết thanh giảm có ý nghĩa thống kê với p < 0,01.

- So với lô 3 (dùng Losartan 25mg/kg), nồng độ NO, SOD, GSH, MDA trong huyết tương của chuột ở các lô dùng Nano NO+ (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt (p > 0,05).

Như vậy, Nano NO+ ở các liều dùng 420 mg/kg và 840 mg/kg đã thể hiện tác dụng làm tăng NO trên chuột cho uống L-NAME là chất làm giảm NO, đồng thời thể hiện tác dụng chống oxy hóa trên chuột cho uống L-NAME thể hiện qua chỉ số làm tăng SOD, GSH và giảm MDA. Các tác dụng này của Nano NO+ ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với Losartan 25mg/kg.

Ví dụ 3: Nghiên cứu tác dụng chống xơ vữa động mạch

Mô hình nghiên cứu tác dụng chống xơ vữa động mạch

Đánh giá tác dụng của chế phẩm Nano NO Plus trên chuột gây xơ vữa mạch bằng chế độ ăn.

Chuột công trắng chủng Wistar, giống đực, đủ tiêu chuẩn thí nghiệm, được phân ngẫu nhiên vào 5 lô, mỗi lô 12 con.

- Lô 1 (chứng sinh lý): chế độ ăn bình thường, uống nước cất.

- Lô 2 (chứng bệnh lý): chế độ ăn nhiều dầu mỡ cháy + uống nước cất.

- Lô 3 (đối chứng): chế độ ăn nhiều dầu mỡ cháy + uống simvastatin 3 mg/kg/24h.

- Lô 4 (lô trị 1): chế độ ăn nhiều dầu mỡ cháy + uống chế phẩm theo sáng chế NC liều 1 (Nano NO⁺ 420)

- Lô 5 (lô trị 2): chế độ ăn nhiều dầu mỡ cháy + uống chế phẩm theo sáng chế liều 2 (Nano NO⁺ 840)

Tiến hành gây rối loạn lipid máu, xơ vữa mạch theo phương pháp được mô tả bởi Valentina Yurina và cộng sự (Yurina* et.al: *"Prolonged-heated High-Fat Diet Increase the Serum LDL Cholesterol Level and Induce the Early Atherosclerotic Plaque Development in Wistar Rats"*, Journal of Tropical Life Science. 9. 9-14. 10.11594/jtls.09.01.02.). Chuột cống trắng được cho ăn thức ăn nhiều dầu mỡ cháy trong thời gian 8 tuần. Thức ăn nhiều dầu mỡ cháy cho chuột được chế biến theo công thức sau: Bột ngô 42,7%, dầu đậu nành 7%, casein 20%, sucroza 10%, xenluloza 5%, gelatin 3%, mỡ lợn cháy (đun nóng ở 190°C trong 24 giờ) 10%, axit cholic 0,3%, cholesterol 2%.

Thuốc được cho uống trong 28 ngày, hàng ngày vào một giờ cố định (8h sáng), bắt đầu ngay sau khi kết thúc 8 tuần cho chuột ăn chế độ ăn nhiều dầu mỡ cháy. Đánh giá cân nặng của chuột. Lấy máu tại các thời điểm 0, 14 và 28 ngày uống thuốc để xét nghiệm các chỉ số lipid máu: triglyxerit (triglycerid -TG), cholesterol toàn phần (TC), lipoprotein tỷ trọng cao (high-density lipoprotein - HDL-C), lipoprotein tỷ trọng thấp (Low density lipoprotein - LDL-C)

Chỉ số xơ vữa mạch (chỉ số Atherogenic index - A.I) được tính toán theo công thức:

$$A.I = (TC - HDL-C) / HDL-C$$

Kết thúc 28 ngày dùng thuốc, chuột được giết, lấy máu đánh giá một số chỉ số oxy hóa: SOD, Glutathion, MDA.

Đo NO được đo trong các mẫu huyết tương bằng phản ứng Griess¹¹, sử dụng kit Griess Reaction System Kit (Promega, Madison, WI, USA).

Ví dụ 3-1: Sự thay đổi hàm lượng cholesterol toàn phần trong máu chuột

Kết quả về sự thay đổi hàm lượng cholesterol toàn phần trong máu chuột được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6 - Hàm lượng cholesterol toàn phần trong máu chuột

Lô chuột	Hàm lượng cholesterol toàn phần (mmol/l), n= 12, Mean ± SD		
	N0	N14	N28
Chứng sinh lý (1)	1,96 ± 0,51	2,01 ± 0,60	1,93 ± 0,42

Chứng bệnh (2)	$4,19 \pm 0,94^{\Delta}$	$4,09 \pm 0,83^{\Delta}$	$3,89 \pm 0,95^{\Delta}$
Simvastatin 3 (3)	$4,16 \pm 0,84^{\Delta}$	$3,24 \pm 0,74^{\Delta\#}$	$2,98 \pm 0,61^{\Delta\#\#}$
Nano NO ⁺ 420 (4)	$4,13 \pm 0,73^{\Delta}$	$3,29 \pm 0,77^{\Delta\#}$	$3,01 \pm 0,75^{\Delta\#\#}$
Nano NO ⁺ 840 (5)	$4,15 \pm 0,57^{\Delta}$	$3,20 \pm 0,74^{\Delta\#}$	$2,94 \pm 0,77^{\Delta\#\#}$

$^{\Delta}p < 0,01$ so với chứng sinh lý; $^{\#}p < 0,05$ so với chứng bệnh, $^{\#\#}p < 0,01$ so với chứng bệnh

Nhận xét

- So với lô chứng sinh lý, lô chứng bệnh có hàm lượng cholesterol toàn phần trong máu tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh lý ($p < 0,01$).

- So với lô chứng bệnh, tại các thời điểm N14 và N28 hàm lượng cholesterol toàn phần trong máu giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$ và $p < 0,01$, tương ứng).

- So với lô dùng Simvastatin 3mg/kg, hàm lượng cholesterol toàn phần trong máu chuột ở các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Ví dụ 3-2: Sự thay đổi hàm lượng TG máu chuột

Kết quả được thể hiện ở bảng 7.

Bảng 7 - Hàm lượng TG trong máu chuột

Lô chuột	Hàm lượng TG (mmol/l), n= 12, Mean $\pm$ SD		
	N0	N14	N28
Chứng sinh lý (1)	$0,98 \pm 0,26$	$0,96 \pm 0,27$	$0,95 \pm 0,21$
Chứng bệnh (2)	$1,59 \pm 0,35^{\Delta}$	$1,53 \pm 0,37^{\Delta}$	$1,47 \pm 0,37^{\Delta}$
Simvastatin 3 (3)	$1,57 \pm 0,41^{\Delta}$	$1,19 \pm 0,35^{\Delta\#}$	$1,07 \pm 0,25^{\Delta\#\#}$
Nano NO ⁺ 420 (4)	$1,62 \pm 0,38^{\Delta}$	$1,21 \pm 0,33^{\Delta\#}$	$1,11 \pm 0,20^{\Delta\#\#}$

Nano NO ⁺ 840 (5)	1,58 ± 0,34 [▲]	1,17 ± 0,32 ^{▲#}	1,01 ± 0,31 ^{▲##}
---------------------------------	--------------------------	---------------------------	----------------------------

[▲] $p < 0,01$ so với chứng sinh lý; [#] $p < 0,05$ so với chứng bệnh, ^{##} $p < 0,01$ so với chứng bệnh

Nhận xét

- So với lô chứng sinh lý, lô chứng bệnh có hàm lượng TG trong máu tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh lý ($p < 0,01$).

- So với lô chứng bệnh, tại các thời điểm N14 và N28 hàm lượng TG trong máu giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$ và $p < 0,01$, tương ứng).

- So với lô dùng Simvastatin 3mg/kg, hàm lượng TG trong máu chuột ở các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Ví dụ 3-3: Sự thay đổi hàm lượng HDL-Cholesterol máu chuột

Kết quả được thể hiện ở bảng 8.

Bảng 8- Hàm lượng HDL-Cholesterol trong máu chuột

Lô chuột	Hàm lượng HDL-Cholesterol (mmol/l), n= 12, Mean ± SD		
	N0	N14	N28
Chứng sinh lý (1)	0,83 ± 0,22	0,82 ± 0,19	0,85 ± 0,20
Chứng bệnh (2)	0,75 ± 0,17	0,76 ± 0,16	0,76 ± 0,18
Simvastatin 3 (3)	0,79 ± 0,21	0,91 ± 0,17 [#]	0,93 ± 0,18 [#]
Nano NO ⁺ 420 (4)	0,77 ± 0,17	0,92 ± 0,19 [#]	0,94 ± 0,21 [#]
Nano NO ⁺ 840 (5)	0,80 ± 0,18	0,95 ± 0,20 [#]	0,99 ± 0,22 [#]

[#] $p < 0,05$ so với chứng bệnh

Nhận xét

- So với lô chứng sinh lý, lô chứng bệnh có HDL-Cholesterol trong máu thấp hơn không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ($p > 0,05$).

- So với lô chứng bệnh, tại các thời điểm N14 và N28 hàm lượng HDL-Cholesterol trong máu tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- So với lô dùng Simvastatin 3mg/kg, hàm lượng HDL-Cholesterol trong máu chuột ở các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Ví dụ 3-4: Sự thay đổi hàm lượng LDL-Cholesterol máu chuột

Kết quả được thể hiện ở bảng 9.

Bảng 9 - Hàm lượng LDL-Cholesterol trong máu chuột

Lô chuột	Hàm lượng LDL-Cholesterol (mmol/l), n= 12, Mean $\pm$ SD		
	N0	N14	N28
Chứng sinh lý (1)	0,82 $\pm$ 0,18	0,80 $\pm$ 0,17	0,83 $\pm$ 0,19
Chứng bệnh (2)	2,42 $\pm$ 0,55 [▲]	2,38 $\pm$ 0,48 [▲]	2,35 $\pm$ 0,41 [▲]
Simvastatin 3 (3)	2,49 $\pm$ 0,60 [▲]	1,99 $\pm$ 0,37 ^{▲#}	1,93 $\pm$ 0,24 ^{▲##}
Nano NO ⁺ 420 (4)	2,52 $\pm$ 0,57 [▲]	1,97 $\pm$ 0,28 ^{▲#}	1,91 $\pm$ 0,25 ^{▲##}
Nano NO ⁺ 840 (5)	2,42 $\pm$ 0,40 [▲]	1,94 $\pm$ 0,28 ^{▲#}	1,88 $\pm$ 0,22 ^{▲##}

[▲] $p < 0,01$ so với chứng sinh lý; [#] $p < 0,05$ so với chứng bệnh, ^{##} $p < 0,01$ so với chứng bệnh

Nhận xét

- So với lô chứng sinh lý, lô chứng bệnh có hàm lượng LDL-Cholesterol trong máu tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh lý ($p < 0,01$).

- So với lô chứng bệnh, tại các thời điểm N14 và N28 hàm lượng LDL-Cholesterol trong máu giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$ và $p < 0,01$, tương ứng).

- So với lô dùng Simvastatin 3mg/kg, hàm lượng LDL-Cholesterol trong máu chuột ở các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Ví dụ 3-5. Sự thay đổi chỉ số A.I của các lô chuột nghiên cứu

Kết quả được thể hiện ở bảng 10.

Bảng 10 - Chỉ số A.I

Lô chuột	Chỉ số A.I, n= 12, Mean $\pm$ SD		
	N0	N14	N28
Chứng sinh lý (1)	1,40 $\pm$ 0,33	1,44 $\pm$ 0,37	1,34 $\pm$ 0,71
Chứng bệnh (2)	4,57 $\pm$ 0,20 [▲]	4,47 $\pm$ 0,90 [▲]	4,32 $\pm$ 1,61 [▲]
Simvastatin 3 (3)	4,33 $\pm$ 0,54 [▲]	2,67 $\pm$ 1,04 ^{▲##}	2,27 $\pm$ 0,65 ^{▲##}
Nano NO ⁺ 420 (4)	4,57 $\pm$ 1,57 [▲]	2,66 $\pm$ 0,88 ^{▲##}	2,31 $\pm$ 1,01 ^{▲##}
Nano NO ⁺ 840 (5)	4,38 $\pm$ 1,33 [▲]	2,58 $\pm$ 1,31 ^{▲##}	2,18 $\pm$ 1,29 ^{▲##}

[▲] $p < 0,01$ so với chứng sinh lý; ^{##} $p < 0,01$ so với chứng bệnh

Nhận xét

- So với lô chứng sinh lý, lô chứng bệnh có chỉ số A.I tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh lý ($p < 0,01$).

- So với lô chứng bệnh, tại các thời điểm N14 và N28 chỉ số A.I giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$).

- So với lô dùng Simvastatin 3mg/kg, chỉ số A.I ở các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Ví dụ 3-6: Ảnh hưởng của chế phẩm Nano NO⁺ lên nồng độ NO và các chỉ số đánh giá khả năng chống oxy hóa (SOD, GSH, MDA) trên chuột gây xơ vữa mạch

Kết quả được trình bày ở bảng 11 sau đây.

Bảng 11 - Kết quả đánh giá nồng độ NO, SOD, GSH, MDA trong huyết tương chuột gây xơ vữa mạch

Lô chuột	Nồng độ NO (μ M/ml)	SOD (U/ml)	GSH (μ mol/ml)	MDA (nmol/ml)
Chứng sinh lý (1)	21,09 $\pm$ 3,98	118,93 $\pm$ 29,44	81,80 $\pm$ 18,99	5,11 $\pm$ 1,23

Chứng bệnh (2)	16,79** ± 2,46	59,58** ± 13,94	38,49** ± 7,99	10,93** ± 2,39
Simvastatin 3 (3)	19,64 ^{##} ± 2,38	91,65 ^{##} ± 19,67	67,17 ^{##} ± 10,61	8,63 ^{##} ± 1,37
Nano NO ⁺ 420 (4)	20,81 ^{##} ± 3,34	96,79 ^{##} ± 19,98	72,53 ^{##} ± 11,30	7,72 ^{##} ± 1,42
Nano NO ⁺ 840 (5)	21,53 ^{##} ± 4,71	105,32 ^{##} ± 17,65	75,93 ^{##} ± 10,11	7,34 ^{##} ± 1,85

Số liệu trình bày dưới dạng Mean ± SD với n= 12;

**p < 0,01 so với chứng sinh lý; ^{##}p < 0,01 so với chứng bệnh

Nhận xét:

- So với lô chứng sinh lý (lô 1), ở lô chứng bệnh (lô 2) có nồng độ NO, SOD, GSH trong huyết tương giảm, nồng độ MDA trong huyết thanh tăng có ý nghĩa thống kê với p < 0,01.

- So với lô chứng bệnh (lô 2), ở lô dùng Simvastatin 3 (lô 3) và các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) có nồng độ NO, SOD, GSH trong huyết tương tăng, nồng độ MDA trong huyết thanh giảm có ý nghĩa thống kê với p < 0,01.

- So với lô 3 (dùng Simvastatin 3 mg/kg), nồng độ NO, SOD, GSH, MDA trong huyết tương của chuột ở các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt (p > 0,05).

Như vậy, Nano NO⁺ ở các liều dùng 420 mg/kg và 840 mg/kg đã thể hiện tác dụng làm tăng NO, đồng thời thể hiện tác dụng chống oxy hóa trên chuột gây xơ vữa mạch thể hiện qua chỉ số làm tăng SOD, GSH và giảm MDA. Các tác dụng này của Nano NO⁺ ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với Simvastatin 3 mg/kg.

Ví dụ 3-7: Kết quả đánh giá khối lượng tương đối của các tạng chuột gây xơ vữa mạch

Kết quả đánh giá khối lượng tương đối của các tạng chuột gây xơ vữa mạch (tính cho 100g thể trọng chuột) bao gồm gan, tim, thận, mỡ bụng được thể hiện trong Bảng 12 sau đây.

Bảng 12 - Kết quả đánh giá khối lượng tương đối của các tạng chuột gây xơ vữa mạch trong nghiên cứu Nano NO⁺

Lô chuột	Gan (g/100g)	Tim (g/100g)	Thận (g/100g)	Mỡ bụng (g/100g)
----------	-----------------	-----------------	------------------	---------------------

	chuột)	chuột)	chuột)	chuột)
Chứng sinh lý (1)	2,85 ± 0,32	0,38 ± 0,05	1,39 ± 0,12	0,56 ± 0,11
Chứng bệnh (2)	3,27** ± 0,37	0,42 ± 0,06	1,43 ± 0,15	1,02** ± 0,15
Simvastatin (3)	2,97# ± 0,29	0,41 ± 0,05	1,41 ± 0,14	0,86## ± 0,11
Nano NO ⁺ 420 (4)	2,95# ± 0,39	0,40 ± 0,04	1,40 ± 0,13	0,81 ± 10,13
Nano NO ⁺ 840 (5)	2,93# ± 0,25	0,39 ± 0,05	1,44 ± 0,36	0,77## ± 0,16

Số liệu trình bày dưới dạng Mean ± SD với n= 12;

**p < 0,01 so với chứng sinh lý; #p < 0,01 so với chứng bệnh

Nhận xét

- So với lô chứng sinh lý (lô 1), ở lô chứng bệnh (lô 2) có khối lượng tương đối của gan và mỡ bụng tăng có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$; khối lượng tương đối của tim và thận biến đổi không đáng kể ($p > 0,05$).

- So với lô chứng bệnh (lô 2), ở lô dùng Losartan (lô 3) và các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) có khối lượng tương đối của gan và mỡ bụng giảm ($p < 0,05$), khối lượng tương đối của tim và thận biến đổi không đáng kể ($p > 0,05$).

- So với lô 3 (dùng Simvastatin 3 mg/kg), khối lượng tương đối của gan, tim, thận và mỡ bụng trong huyết tương của chuột ở các lô dùng Nano NO⁺ (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Như vậy chuột nuôi chế độ ăn để gây vữa mạch có khối lượng gan và mỡ bụng tăng cao so với chứng. Nano NO⁺ cho chuột uống có tác dụng làm giảm khối lượng gan và mỡ bụng. Tác dụng này của viên nang xơ vữa động mạch tương đương Simvastatin 3 mg/kg.

Ví dụ 3-8: Kết quả đánh giá hình ảnh đại thể gan và vi thể gan chuột

Hình ảnh đại thể gan chuột đại diện cho các lô chuột nghiên cứu được thể hiện ở Hình 1.

Kết quả quan sát đại thể bằng mắt thường và dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần cho thấy: Ở lô chứng sinh lý, gan sậm màu; Ở lô mô hình, gan bạc màu, màu sắc vàng sáng, thể hiện hình ảnh gan nhiễm mỡ; Các lô dùng mẫn theo sáng

chế, màu sắc của gan sậm màu hơn so với gan ở lô mô hình, về gần với màu sắc của gan ở lô chứng sinh lý.

Hình ảnh vi thể gan chuột đại diện cho các lô chuột nghiên cứu được thể hiện ở Hình 2.

Kết quả đánh giá vi thể gan nhuộm HE cho thấy:

- Mô bệnh học gan chuột của lô chứng sinh lý cho thấy các xoang mạch nan hoa và tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy bình thường. Các tế bào gan không bị thoái hóa.
- Ở lô mô hình, các tế bào gan bị thoái hóa hạt, thoái hóa rõ, một số thoái hóa mỡ. Các xoang mạch sung huyết nhẹ.
- Các lô dùng thuốc và mẫu theo sáng chế (lô 3, 4, 5), hình ảnh mô bệnh học gan chuột về gần tương đương so với lô chứng sinh lý. Thoái hóa mỡ nhẹ, rất ít, không thấy các thoái hóa nặng như thoái hóa hạt, thoái hóa rõ.

Ví dụ 3-9: Kết quả đánh giá mức độ xơ vữa của động mạch chủ bụng

Tiêu bản mô bệnh học động mạch chủ bụng chuột được thực hiện và được đọc tại khoa hình thái giải phẫu bệnh, bệnh viện 103. Hình ảnh mô bệnh học động mạch chủ bụng đại diện cho các lô chuột được thể hiện ở Hình 3.

Kết quả đánh giá vi thể động mạch chủ bụng chuột cho thấy:

- Mô bệnh học động mạch chủ bụng chuột của lô chứng sinh lý thành mạch mỏng và mịn, các tế bào cơ nằm định hướng ngang với ống động mạch chủ.
- Ở lô mô hình, Thành mạch dày, lòng thành mạch gồ ghề, các tế bào nội mô bị bong tróc, các tế bào bọt (mũi tên đen) xuất hiện ngay lớp dưới niêm mạc, là cơ sở của sự phát triển xơ vữa (mũi tên đỏ) hình thành phía trên.
- Các lô dùng thuốc và mẫu theo sáng chế (lô 3, 4, 5), hình ảnh mô bệnh học động mạch chủ bụng chuột về gần tương đương so với lô chứng sinh lý. Lòng thành mạch có gồ ghề hơn không đáng kể so với lô chứng sinh lý, không thấy biểu hiện các tế bào bọt và xơ vữa.

Kết luận

Từ kết quả nghiên cứu thực nghiệm, các tác giả sáng chế kết luận:

i) Tác dụng hạ huyết áp của Nano NO+

Trên chuột cống trắng gây tăng huyết áp bằng cho uống L-NAME, Nano NO+ ở các liều dùng 420 mg/kg và 840 mg/kg đã thể hiện các tác dụng:

- Làm hạ huyết áp tâm thu, huyết áp tâm trương và huyết áp trung bình của chuột gây tăng huyết áp.
- Không ảnh hưởng đến nhịp tim của chuột.

- Làm tăng NO trong huyết tương của chuột, tăng tác dụng chống oxy hóa trên chuột cho uống L-NAME thể hiện qua chỉ số làm tăng SOD, GSH và giảm MDA trong huyết tương của chuột.

Các tác dụng này của Nano NO⁺ ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với Losartan 25mg/kg.

ii) Tác dụng chống xơ vữa mạch của Nano NO⁺

Trên chuột cống trắng gây xơ vữa mạch bằng chế độ ăn giàu chất béo cháy, Nano NO⁺ ở các liều dùng 420 mg/kg và 840 mg/kg đã thể hiện các tác dụng:

- Làm hạ Cholesterol toàn phần, LDL- Cholesterol, tăng HDL- Cholesterol, hạ chỉ số xơ vữa mạch.

- Làm tăng NO trong huyết tương của chuột, tăng tác dụng chống oxy hóa trên chuột thể hiện qua chỉ số làm tăng SOD, GSH và giảm MDA trong huyết tương của chuột.

- Làm giảm cân nặng mỡ bụng và cân nặng của gan. Cải thiện hình ảnh đại thể và vi thể gan.

- Cải thiện hình ảnh vi thể động mạch chủ bụng chuột. Lô chuột dùng Nano NO⁺ hầu như không thấy có tổn thương xơ vữa, tiền xơ vữa mạch.

Các tác dụng này của Nano NO⁺ ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với Simvastatin 3 mg/kg.

Cần lưu ý rằng, chế phẩm Nano NO⁺ theo sáng chế được bào chế ở dạng thực phẩm chức năng dạng viên nang cứng, trái lại Losartan là ở dạng thuốc. Như được mô tả trên đây, thực phẩm chức năng có rất nhiều lợi ích hơn so với thuốc bởi không cần tuân theo các yêu cầu nghiêm ngặt về độ an toàn và hiệu quả như thuốc, ít gây ra tác dụng phụ hơn và mang lại nhiều lợi ích sức khỏe. Hơn nữa, do ở dạng nano, nên mức độ hướng đích cũng giúp tạo ra các dụng điều trị đối với chế phẩm theo sáng chế.

Ngoài ra, chế phẩm Nano NO⁺ 420 (lô 4) và chế phẩm Nano NO⁺ 840 (lô 5) thể hiện tác dụng về cơ bản là tương tự nhau. Do đó, theo một phương án cụ thể được ưu tiên, lượng chế phẩm Nano NO⁺ theo sáng chế được sử dụng ở liều 420 mg/kg/ngày, việc sử dụng liều cao hơn, ví dụ gấp đôi liều lượng không giúp tạo ra hiệu quả tốt hơn.

Ví dụ 4: Sự phân bố kích thước theo cường độ

Chế phẩm theo sáng chế còn được xác định sự phân bố kích thước hạt theo cường độ.

Kết quả về sự phân bố theo cường độ là như được thể hiện trên Hình 4 và Bảng tổng hợp kết quả sau đây.

Đỉnh	Kích thước (d.nm)	Cường độ (%)	Sai lệch chuẩn
1	58,83	72,2	21,01
2	205,1	23,3	53,03
3	21,18	4,5	2,641

Kết quả cho thấy chế phẩm theo sáng chế có kích thước trung bình (d.nm) là khoảng 64,50 với chất lượng tốt. Kích thước nhỏ, chất lượng tốt cho thấy chế phẩm theo sáng chế ổn định, dễ dàng vận chuyển hoạt chất đến đúng vị trí cần giải phóng hoạt chất hoặc đích sinh học (mô bệnh, tế bào bệnh hoặc bào quan bên trong tế bào) cải thiện vượt trội tính an toàn và hiệu quả. Ngoài ra, hoạt chất kém bền được bao bọc bên trong tiểu phân nano sẽ tránh bị ảnh hưởng bởi các tác nhân phân hủy trước khi đưa thuốc vào cơ thể như nhiệt độ, độ ẩm, oxy, không khí và ánh sáng. Nhờ đó, kích thước nano cho phép bảo vệ tốt các hoạt chất kém ổn định. Hơn nữa, dược chất được bao bọc bên trong tiểu phân nano chỉ phát huy tác dụng khi giải phóng khỏi tiểu phân tại các đích sinh học. Do đó, những hoạt chất độc tính cao và gây nhiều tác dụng phụ không có nhiều cơ hội phát huy.

Ví dụ 5: Các chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật

Chế phẩm theo sáng chế được bào chế ở dạng thực phẩm chức năng dạng viên nang cứng. Sau đó được cho thử nghiệm để xác định các chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật.

Cần lưu ý rằng, trong chất lượng thực phẩm người ta chia thành nhóm chỉ tiêu hóa lý và chỉ tiêu vi sinh vật .

- Để kiểm soát hàm lượng vi sinh có trong chế phẩm, thực phẩm, dược phẩm hoặc thuốc, kiểm nghiệm vi sinh vật trong mẫu thành phẩm này cần được thực hiện. Hoạt động này giúp giảm tình trạng ngộ độc hay nhiễm bệnh bởi vi sinh gây bệnh. Đồng thời đánh giá tình trạng ô nhiễm, tình trạng vệ sinh của mẫu kiểm nghiệm.

- Tương tự, chỉ tiêu hóa lý trong thực phẩm là nhiều chỉ tiêu quan trọng. Một số chỉ tiêu hóa lý trong thực phẩm như: độ đục, độ ẩm, pH, nitrat, nitrit, hàm lượng chì, asen, v.v. Hàm lượng kim loại nặng là chỉ tiêu hóa lý trong chất lượng thực phẩm.

Phương pháp sử dụng

- TCVN 10780-1:2017
- TCVN 4884-1:2015
- TCVN 4991:2005
- TCVN 6848:2007
- TCVN 7924-2:2008
- TCVN 8275-2:2010
- NIFC.03.M.45 (ICP-MS)

Kết quả đánh giá các chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật của mẫu thành phẩm theo sáng chế trong ví dụ này được thể hiện trong Bảng dưới đây.

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
1	<i>Salmonella</i>	/25g	TCVN 10780-1:2017	Không phát hiện
2	Tổng số vi sinh vật	CFU/g	TCVN 4884-1:2015	$1,5 \times 10^2$
3	<i>Cl. perfringens</i>	CFU/g	TCVN 4991:2005	Không phát hiện*
4	<i>Coliforms</i>	CFU/g	TCVN 6848:2007	Không phát hiện*
5	<i>E. coli</i>	CFU/g	TCVN 7924-2:2008	Không phát hiện*
6	Tổng số nấm men, nấm mốc	CFU/g	TCVN 8275-2:2010	Không phát hiện*
7	Hàm lượng Cadmi	mg/kg	NIFC.03.M.45 (ICP-MS)	0,018
8	Hàm lượng Chì	mg/kg	NIFC.03.M.45 (ICP-MS)	0,15
9	Hàm lượng Thủy ngân	mg/kg	NIFC.03.M.45 (ICP-MS)	Không phát hiện [#]

*Ngưỡng phát hiện (Limit of detection - LOD): 1 CFU/g

*Ngưỡng phát hiện (LOD): 0,004 mg/kg

[#]"Không phát hiện" nghĩa là dưới ngưỡng phát hiện theo phương pháp thử

Từ bảng trên đây, có thể thấy rằng, mẫu thành phẩm theo sáng chế đạt các chỉ tiêu về chất lượng hóa lý và vi sinh vật.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề xuất chế phẩm nano (Nano NO Plus) có tác dụng điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, xơ vữa động mạch, huyết áp và bệnh tim mạch, với hiệu quả điều trị và/hoặc ngăn ngừa vượt trội so với đối chứng nhờ hiệu quả hiệp đồng giữa các hoạt chất trong việc tổng hợp tạo NO, một phân tử tín hiệu quan trọng có tác dụng làm giãn mạch máu,

giúp máu lưu thông, ngăn chặn sự hình thành xơ vữa động mạch và giúp kiểm soát huyết áp của cơ thể.

Chế phẩm theo sáng chế có tính sinh khả dụng, độ thấm và độ hấp thụ được cải thiện đáng kể thông qua các nghiên cứu sâu rộng liên quan đến cấu trúc, tỷ lệ và tương tác giữa các hoạt chất. Chế phẩm này còn có phổ tác dụng phụ được giảm thiểu so với các chế phẩm chứa thành phần hoạt chất riêng rẽ.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất quy trình bào chế chế phẩm trên đây, trong đó các hoạt chất được phân tán dưới dạng nano bền vững, giúp tăng độ tan, sự hướng đích trong cơ thể, tính sinh khả dụng và thời gian tồn tại của các hoạt chất, nhờ đó nâng cao độ hấp thụ, độ thấm, hiệu quả điều trị và tính bền vững của chế phẩm này.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chế phẩm nano tăng cường hiệu quả tổng hợp tạo NO để điều trị bệnh xơ vữa động mạch, huyết áp và bệnh tim mạch, đặc trưng ở chỗ, chế phẩm này được chọn từ chế phẩm NO plus 6 và NO plus 7 sau đây:

chế phẩm NO plus 6:

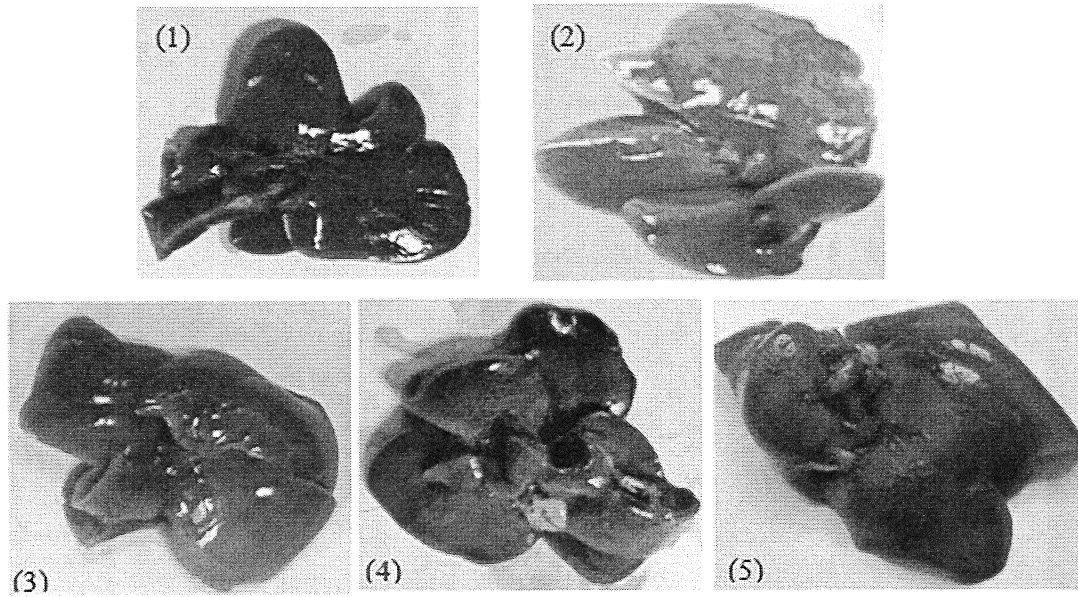
Thành phần	Hàm lượng (mg)
L-arginin	150
L-citrullin	300
glutathion	50
nano coenzym Q10 (CoQ10)	10
nano curcumin	10
nano resveratrol	10
nano quercetin	10
nano berberin	10
L-selenomethionin	0,15

chế phẩm NO plus 7:

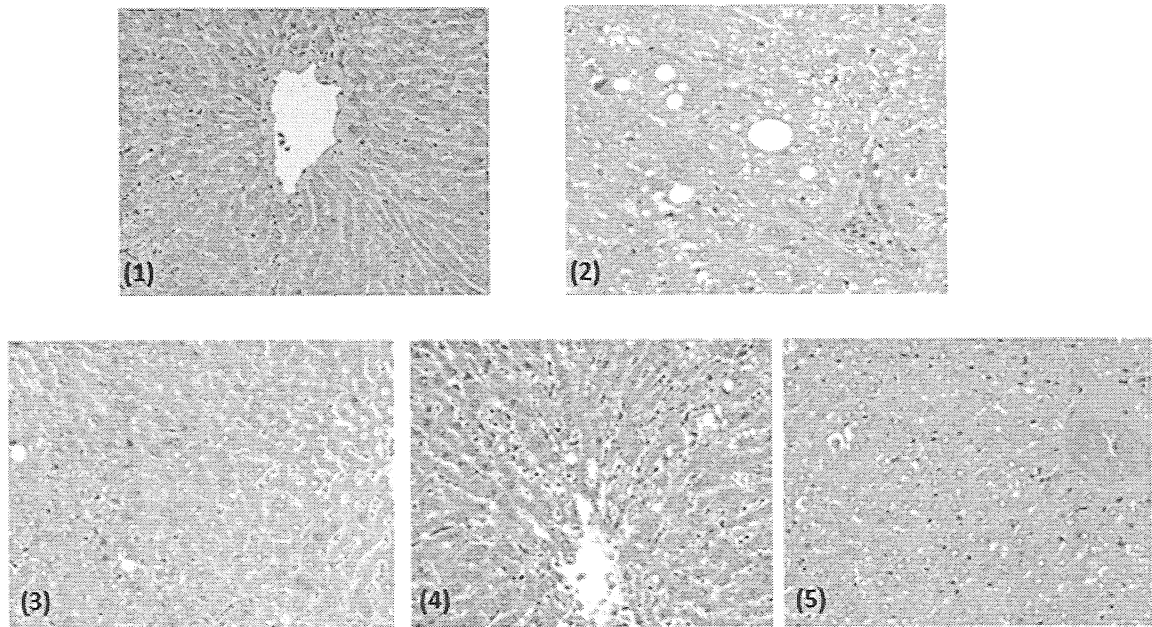
Thành phần	Hàm lượng (mg)
L-arginin	150
L-citrullin	300
glutathion	50
nano coenzym Q10 (CoQ10)	10
nano curcumin	10
nano resveratrol	10
nano quercetin	10
nano berberin	10
L-selenomethionin	0,15
vitamin D	0,15

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được bào chế ở dạng viên nang cứng.

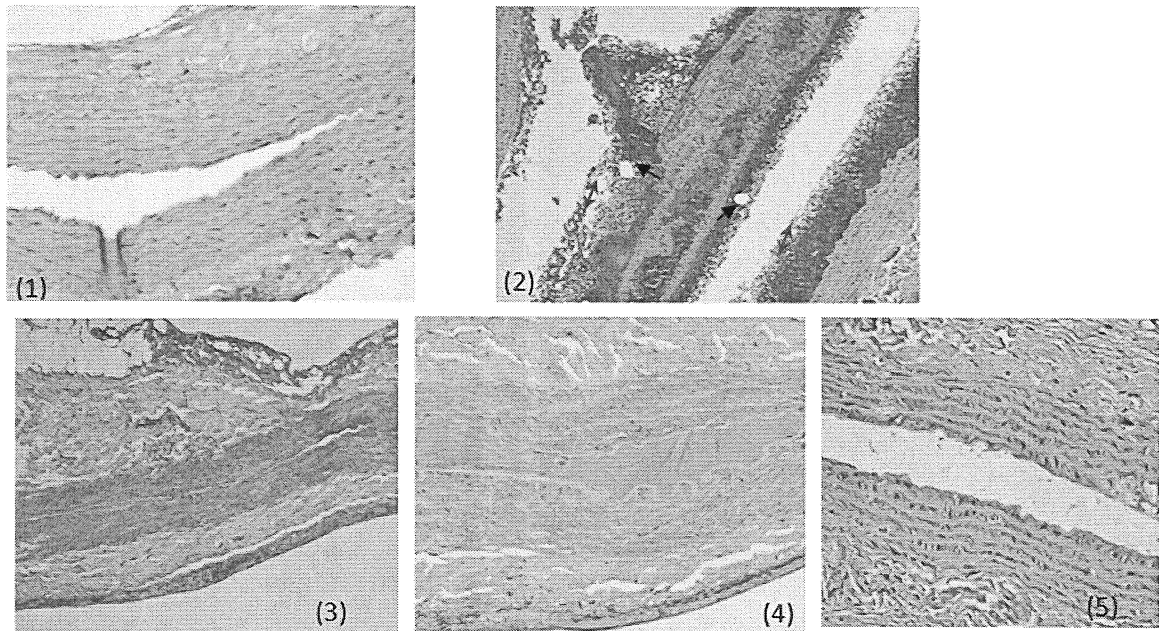
3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó coenzym Q10 ở dạng hạt nano có kích thước tối đa 100 nm.
4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó curcumin ở dạng hạt nano có kích thước nằm trong khoảng từ 20 đến 50 nm.
5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó resveratrol ở dạng hạt nano có kích thước nằm trong khoảng từ 20 đến 30 nm.
6. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó quercetin ở dạng hạt nano có kích thước nằm trong khoảng từ 20 đến 50 nm.
7. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó berberin dạng hạt nano có kích thước nằm trong khoảng từ 5 đến 10 nm.
8. Quy trình bào chế chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 bao gồm bước trộn các thành phần hoạt chất với tỷ lệ khối lượng mong muốn như được mô tả theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.
9. Quy trình theo điểm 8, trong đó chế phẩm được bào chế ở dạng viên nang cứng.
10. Quy trình theo điểm 8 hoặc 9, trong đó các thành phần còn được phân tán dưới dạng hạt nano để tăng độ hoà tan và độ thấm trước khi được phối trộn.
11. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 10, trong đó coenzym Q10 được phân tán ở dạng nano lysosom với kích thước hạt tối đa 100 nm.
12. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 11, trong đó curcumin được phân tán ở dạng vi nhũ tương nano với kích thước hạt nằm trong khoảng từ 20 đến 50 nm.
13. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 12, trong đó resveratrol được phân tán ở dạng dung dịch resveratrol tan trong nước với kích thước hạt nằm trong khoảng từ 20 đến 30 nm.
14. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 13, trong đó quercetin được phân tán ở dạng nhũ tương nano với kích thước hạt nằm trong khoảng từ 20 đến 50 nm.
15. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 14, trong đó berberin được phân tán ở dạng dung dịch berberin dạng nano tan trong nước với kích thước hạt nano nằm trong khoảng từ 5 đến 10 nm.



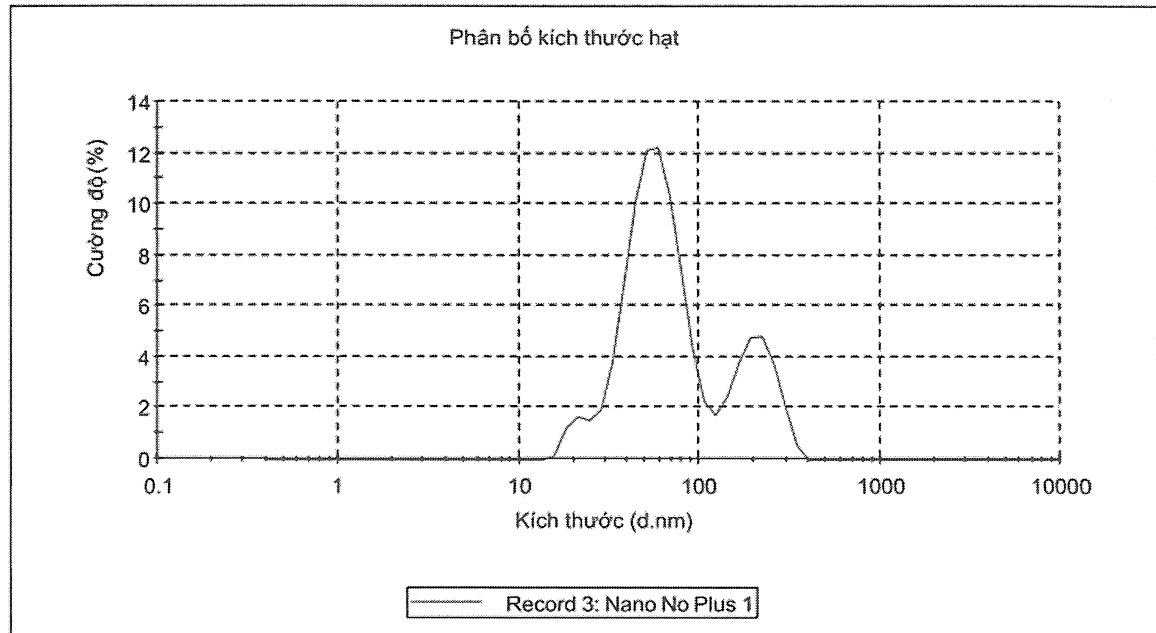
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4