



(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)



1-0053031

(51)^{2022.01} A61K 9/00; C07H 17/00; A61P 9/12; (13) B
A61K 9/10; A61P 9/00

(21) 1-2023-09169

(22) 22/12/2023

(45) 25/11/2025 452

(43) 26/02/2024 431

(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); VŨ THÙY LÂM (VN); LƯU HẢI LÂN (VN); LƯU HẢI LONG (VN); BẠCH THỊ NHƯ QUỲNH (VN); PHẠM TUẤN ANH (VN).

(54) QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ HỆ NHŨ TƯƠNG NANOLIPOSOM RUTIN DÙNG ĐỂ HẠ HUYẾT ÁP

(21) 1-2023-09169

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế hệ vi nhũ nanoliposom rutin dùng để hạ huyết áp bao gồm các bước: i) chuẩn bị hỗn hợp chất mang; ii) tạo hỗn hợp đồng nhất chứa rutin; iii) tạo màng lipit; iv) hydrat hóa màng lipit; v) tạo hệ nhũ tương liposom; vi) đồng hóa tốc độ cao để tạo hệ nhũ tương nanoliposom rutin, trong đó điều kiện thực hiện mỗi bước là như được mô tả trong bản mô tả.

Quy trình theo sáng chế sử dụng các chất phân tán tốt trong nước có độ an toàn cao, không độc hại và ít tác dụng phụ, nên hệ nhũ tương nanoliposom rutin thu được từ quy trình theo sáng chế có độ an toàn cao khi sử dụng. Ngoài ra, quy trình theo sáng chế cho phép tạo hệ nhũ tương nanoliposom rutin bao gồm tiểu phân tử hình cầu có kích thước nano với kích thước khoảng 22,8 nm này, có lõi chứa các hoạt chất, được bao bọc phía ngoài bởi một hoặc nhiều lớp màng phospholipit kép. Các dược chất được bao trong lớp phospholipit nên khả năng hòa tan tốt, thời gian lưu lại trong cơ thể được kéo dài, tránh được sự đào thải, nhờ đó độ sinh khả dụng được cải thiện. Hệ nhũ tương nano (NR) theo sáng chế có thể dùng qua đường miệng chứa các hạt vi nhũ, phân tán tốt trong nước, đó đó làm tăng sự hấp thụ thuốc ở đường tiêu hóa. Thử nghiệm đã cho thấy tác dụng hạ huyết áp trên chuột cống trắng, ở các liều dùng 280 mg/kg và 560 mg/kg, mà không ảnh hưởng đến nhịp tim của chuột, đồng thời làm tăng nồng độ 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. Các tác dụng này của NR ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với thuốc losartan 25mg/kg.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế hệ vi nhũ nanoliposom rutin, thích hợp dùng cho hạ huyết áp, trong đó quy trình sử dụng các chất phân tán tốt trong nước có độ an toàn cao, không độc hại và ít tác dụng phụ, nên hệ nhũ tương nanoliposom rutin thu được từ quy trình theo sáng chế có độ an toàn cao khi sử dụng. Ngoài ra, quy trình này cho phép tạo hệ nhũ tương nanoliposom rutin bao gồm tiểu phân tử hình cầu có kích thước nano với kích thước khoảng 22,8 nm này, có lõi chứa các hoạt chất, được bao bọc phía ngoài bởi một hoặc nhiều lớp màng phospholipit kép. Các dược chất được bao trong lớp phospholipit nên khả năng hòa tan tốt, thời gian lưu lại trong cơ thể được kéo dài, tránh được sự đào thải, nhờ đó độ sinh khả dụng được cải thiện. Hệ nhũ tương nano (NR) theo sáng chế có thể dùng qua đường miệng chứa các hạt vi nhũ, phân tán tốt trong nước, đó đó làm tăng sự hấp thụ thuốc ở đường tiêu hóa.

Thử nghiệm đã cho thấy tác dụng hạ huyết áp trên chuột cống trắng, ở các liều dùng 280 mg/kg và 560 mg/kg, mà không ảnh hưởng đến nhịp tim của chuột, đồng thời làm tăng nồng độ NO trong huyết tương của chuột, tăng tác dụng chống oxy hóa trên chuột thể hiện qua chỉ số làm tăng Superoxit Dismutaza (Superoxide Dismutase – SOD), Glutathion (GSH) và giảm Malondialdehyd (Malondialdehyde – MDA) trong huyết tương của chuột. Các tác dụng này của NR ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với thuốc losartan 25mg/kg, một thuốc nằm trong danh sách các loại thuốc thiết yếu của Tổ chức Y tế Thế giới, tuy nhiên lại có nguy cơ gây các phản ứng nghiêm trọng bao gồm nhịp tim chậm/không đều. Rutin còn là hoạt chất có nguồn gốc tự nhiên, sẵn dụng với giá thành rẻ, hoàn toàn có thể dùng làm liệu pháp thay thế losartan.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thuốc losartan và bệnh tăng huyết áp

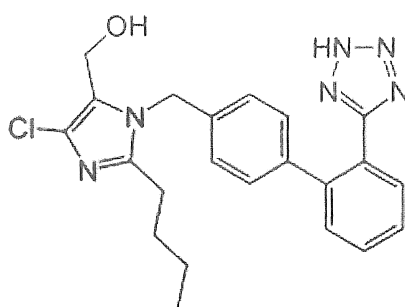
Tại Việt Nam, năm 2000 có khoảng 16,3% người lớn bị tăng huyết áp, đến năm 2009 tỷ lệ tăng huyết áp ở người lớn là 25,4% và năm 2016 tỷ lệ người lớn mắc bệnh ở mức báo động là 48%. Cho đến thời điểm hiện tại, số lượng người bị huyết áp cao vẫn đang tăng lên và có dấu hiệu giảm dần về độ

tuổi người mắc bệnh. Tỷ lệ tăng huyết áp ở Việt Nam ngày càng gia tăng, Bộ Y tế đã đưa bệnh tăng huyết áp vào chương trình phòng chống các bệnh không lây nhiễm giai đoạn 2015-2025.

Bệnh tăng huyết áp được coi là “kẻ giết người thầm lặng” bởi bệnh không có những triệu chứng điển hình. Không phải lúc nào người mắc bệnh tăng huyết áp cũng thấy khó chịu. Một số người bệnh tăng huyết áp có triệu chứng lâm sàng như chóng mặt, đau đầu, ù tai. Tuy nhiên, rất nhiều người bệnh tăng huyết áp lại không có biểu hiện này. Bệnh dẫn tới nhiều biến chứng nguy hiểm như bệnh tim, phình tách động mạch chủ, mắt, não, thận, tai biến mạch não. Nhiều người không biết mình bị bệnh tăng huyết áp, do đó nhiều trường hợp đột tử nhưng trước đó họ vẫn nói chuyện bình thường và cảm thấy khỏe mạnh.

Để phòng ngừa cũng như hạn chế tác hại từ căn bệnh tăng huyết áp, nên đo huyết áp vào những thời điểm nhất định trong ngày. Bên cạnh đó cần có chế độ dinh dưỡng như không ăn mặn, giảm bớt thực phẩm có axit béo, mỡ động vật. Bên cạnh đó, để điều trị tăng huyết áp, thuốc Losartan thường được khuyến nghị để sử dụng.

Losartan có tên gọi tiếng Anh theo hệ thống IUPAC là: [2-butyl-5-chloro-3-[[4-[2-(2H-tetrazol-5-yl)phenyl]phenyl]methyl]imidazol-4-yl]methanol, hợp chất này có công thức hóa học là $C_{22}H_{23}ClN_6O$, với công thức cấu tạo sau đây:



Losartan

Losartan (còn có tên thương mại là Cozaar, cùng một số tên khác) là một loại thuốc chẹn thụ thể angiotensin II (angiotensin II receptor blocker - ARB), giúp ngăn chặn các thụ thể hormone angiotensin II hoạt động. Hormon này làm tăng huyết áp bằng cách co thắt các mạch máu và khiến cơ thể giữ

muối và nước. Vì vậy, bằng cách hạn chế hoạt động của hormon này, Losartan giúp giảm huyết áp.

Losartan đã được chấp thuận cho sử dụng y tế tại Hoa Kỳ vào năm 1995. Nó nằm trong danh sách các loại thuốc thiết yếu của Tổ chức Y tế Thế giới, tức là nhóm các thuốc hiệu quả và an toàn nhất cần thiết trong một hệ thống y tế.

Tuy nhiên, cũng tương tự như nhiều loại thuốc khác, Losartan cũng có thể có một số tác dụng phụ, đặc biệt phải kể đến là có nguy cơ gây các phản ứng nghiêm trọng bao gồm nhịp tim chậm/không đều.

Do đó, có nhu cầu đối với thuốc hoặc sản phẩm tương đương khác có thể thay thế Losartan, tốt hơn nếu chúng có nguồn gốc thiên nhiên và dễ tiếp cận hơn.

Hoa hòe và rutin

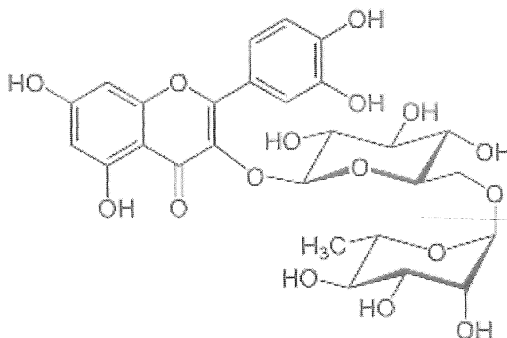
Hoa hòe được coi là một vị thuốc nam quý được sử dụng rộng rãi trong Y Học Cổ Truyền. Vị thuốc này có vị đắng, tính bình, mát mà không độc. Nó có mặt hầu hết trong các bài thuốc chữa nhiều loại bệnh như bệnh trĩ, cao huyết áp hay chứng mất ngủ. Cây hoa hòe hay còn được biết đến với những tên gọi khác như hòe hoa, hòe mẽ, hòe hoa mẽ và có tên gọi khoa học là *Sophora japonica L.* - thuộc họ Cánh bướm Fabaceae (Papilionaceae).

Hòe được trồng rộng rãi ở các tỉnh phía bắc hiện nay vốn là cây nhập nội, chưa rõ nguồn gốc. Cây phân bố ở Sơn La, Lạng Sơn, Quảng Ninh, Bắc Giang, Bắc Ninh, Hà Nội, Hải Dương, Hải Phòng, Thái Bình, Hà Nam, Nam Định, Ninh Bình, Nghệ An, Quảng Nam, Lâm Đồng. Hòe thuộc loại cây gỗ trung sinh, ưa sáng và ưa ẩm, thường được trồng ở vườn gia đình xen với cây ăn quả. Vài năm trở lại đây, cây được trồng có kết quả tốt ở cả vùng đồi, đất cao nguyên ở Mộc Châu, Điện Biên, Đắc Lắc, hoặc ở đất mới khai hoang vùng Tam Điệp, Ninh Bình. Nhiệt độ không khí trung bình khoảng 23 đến 26°C.

Hoa hòe là dược liệu giàu rutin - hợp chất hữu cơ thiên nhiên với nhiều đặc tính dược lý hữu dụng.

Rutin, hay còn gọi là vitamin P, là một flavonoid tự nhiên, phân bố rộng rãi trong thực vật, đặc biệt có nhiều trong cây hòe rất phổ biến ở Việt Nam và hàm lượng rutin trong hoa hòe ở Việt Nam cao hơn nhiều lần so với các nước

khác. Rutin có tên khác là quercetin-3-rutosit, eldrin, oquerutin, quercetin-3-rhamnoglucosit, có danh pháp tiếng anh IUPAC: 3',4',5,7-Tetrahydroxy-3-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranosyloxy]flavone, có công thức phân tử $C_{27}H_{30}O_{16}$ với công thức cấu trúc dưới đây:



Rutin

Rutin có nhiều đặc tính dược lý đã được khai thác trong Y học của con người và dinh dưỡng. Thông thường, nó được sử dụng như một kháng sinh, kháng nấm, và chất chống dị ứng. Tuy nhiên, nghiên cứu hiện nay đã cho thấy tác dụng dược lý của nó trong điều trị các bệnh mãn tính khác nhau, chẳng hạn như ung thư, tiểu đường, cao huyết áp và tăng cholesterol. Trong y học, rutin được dùng phòng và chống những biến cố của xơ vữa động mạch, các trường hợp suy yếu tĩnh mạch, xuất huyết như tử cung xuất huyết, ho ra máu, đại tiện ra máu, chảy máu cam. Là thuốc điều trị trĩ, chống dị ứng, thấp khớp. Ngoài ra còn dùng trong các trường hợp tổn thương về da do bị nhiễm bức xạ, làm cho vết thương chóng lành sẹo. Trong khoa mắt, rutin có thể được dùng cho các trường hợp viêm võng mạc có xuất hiện xuất huyết, chảy máu ở đáy mắt. Rutin có thể sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với các thuốc khác để nâng cao điều trị như vitamin C, làm tăng cường tác dụng của vitamin C, đặc biệt là khả năng hấp thụ thuốc vào các cơ quan khác nhau. Thường được dùng trong biểu hiện tổn thương mao mạch, xuất huyết dưới da và tăng (cao) huyết áp.

Bên cạnh đó, rutin có giá thành rẻ do có thể được chiết xuất, phân tách từ hoa hòe, một loài thực vật rất sẵn dụng, phân bố rộng rãi ở nhiều nơi.

Tuy nhiên, rutin có kích thước phân tử lớn và kém tan trong nước, nên khó được hấp thu vào cơ thể, làm hạn chế rất nhiều các ứng dụng của nó. Vì vậy, để cải thiện khả năng hấp thu rutin là một vấn đề đặt ra để tăng hiệu quả tác dụng của rutin.

Có nhiều phương pháp để làm tăng khả năng hấp thu rutin trong cơ thể, tuy nhiên với sự phát triển của nền khoa học thế giới thì việc nano hóa các hợp chất tự nhiên có hoạt tính cao kết hợp các thiết bị máy móc hiện đại là một bước tiến vượt bậc trong công nghệ.

Bằng độc quyền giải pháp hữu ích số VN 2-0002490 của chính chủ đơn đề cập đến quy trình điều chế hệ vi nhũ tương nano rutin, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị pha phân tán; b) chuẩn bị hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/etylen glycol; c) tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang polyetylen glycol/etylen glycol và chất nhũ hóa lexitin; và d) tạo hệ vi nhũ tương nano rutin.

Bằng độc quyền giải pháp hữu ích số VN 2-0003039 đề cập đến chế phẩm nano lipit rắn ba thành phần bao gồm curcumin, oleoresin gừng, rutin có đặc tính diệt tế bào ung thư và phương pháp bào chế chế phẩm này.

Công bố đơn số VN 89155A (26/09/2022) đề cập đến chế phẩm chứa các phức hợp nano ba thành phần bao gồm curcuminoid, rutin và vitamin C được sản xuất theo công nghệ hạt nano thuốc rắn (Solid Drug Nanoparticles - SDN). Chế phẩm theo sáng chế được thông báo là có độc tính thấp và độ sinh khả dụng cao, có tác dụng chống viêm, kích thích quá trình tiêu hóa, tạo điều kiện duy trì giá trị dinh dưỡng với kích hoạt giải phóng theo thời gian, ngăn chặn phản ứng miễn dịch tự nhiên từ chối chất dinh dưỡng và giảm nhanh các triệu chứng của con trào ngược.

Công bố đơn số VN70007A (25/05/2020) đề cập đến quy trình sản xuất hệ vi nhũ tương nano rutin bao gồm các bước: (i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho rutin hòa tan trong dung môi etanol bằng máy khuấy và kết hợp gia nhiệt và giữ nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ; (ii) chuẩn bị chất mang bằng cách gia nhiệt PEG (polyetylen glycol) dạng lỏng đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy đều; (iii) bổ sung chất mang vào pha phân tán, tiếp tục giữ nhiệt hỗn hợp chất mang và pha phân tán ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C, khuấy với tốc độ nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút, trong môi trường hút chân không; (iv) nhũ hóa bằng cách: khi nhiệt độ đạt 60°C, bổ sung ACRYCOL K-140 và Tween vào hỗn hợp chất mang và pha phân tán đã thu được ở bước (iii), tiếp tục khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút, ở nhiệt độ nằm trong khoảng 60 đến 80°C, trong môi trường

chân không, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 80°C trong thời gian từ 3 đến 5h, kiểm soát chất lượng sản phẩm tạo thành bằng cách hòa tan vào nước và đo độ trong suốt, dừng phản ứng, hạ nhiệt độ từ từ cho đến khi nhiệt độ còn trong khoảng từ 40 đến 60°C; tiến hành nhũ toàn bộ hỗn hợp trong 30 phút, ở tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 400 đến 800 vòng/phút; (v) hỗn hợp thu được được làm lạnh đến 25°C và được bơm bằng cách sử dụng vòi phun siêu âm, lọc sản phẩm bằng cách bơm qua hệ thống lọc nano trước khi chiết rót đóng gói.

Công bố đơn số VN 66896A (25/11/2019) đề cập đến hệ nano niosom rutin, hệ này có chứa tiểu phân nano niosom rutin hình cầu, có cấu trúc lõi - vỏ, lõi chỉ chứa nước; vỏ có thể đơn lớp hoặc đa lớp; trong đó mỗi lớp vỏ là lớp màng kép cấu tạo bởi rutin, chất hoạt động bề mặt không ion hóa và chất ổn định màng, trong đó rutin sử dụng với lượng là 30,9% khối lượng của vỏ, chất hoạt động bề mặt là sorbitan monostearat với lượng là 50,6% khối lượng vỏ, chất ổn định màng là vitamin E với lượng là 18,5% khối lượng vỏ, đường kính tiểu phân niosom rutin từ 100 đến 250 nm.

Có thể thấy rằng mặc dù cho tới nay có rất nhiều nghiên cứu về hệ mang thuốc có kích thước nano, đặc biệt là ra chế phẩm, hệ vi nhũ nano rutin, tuy nhiên nanoliposom rutin chưa được nghiên cứu, phát triển và ứng dụng rộng rãi. Đây là hệ mang thuốc có nhiều ưu điểm trong quá trình vận chuyển, phân bố, kiểm soát giải phóng và tăng sinh khả dụng của dạng thuốc.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là làm tăng hơn nữa độ sinh khả dụng của dược chất rutin.

Mục đích khác của sáng chế là tận dụng rutin, hoạt chất có nguồn gốc tự nhiên, sẵn dụng với giá thành rẻ, thay thế losartan ứng dụng để hạ huyết áp.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất giải pháp để điều chế hệ vi nhũ nanoliposom rutin, thích hợp dùng cho hạ huyết áp, trong đó quy trình sử dụng các chất phân tán tốt trong nước có độ an toàn cao, không độc hại và ít tác dụng phụ, nên hệ nhũ tương nanoliposom rutin thu được từ quy trình theo sáng chế có độ an toàn cao khi sử dụng. Ngoài ra, quy trình này cho phép tạo hệ nhũ tương nanoliposom rutin bao gồm tiểu phân tử hình cầu có kích thước nano với kích thước khoảng 22,8 nm này, có lõi chứa các hoạt chất, được bao bọc phía ngoài bởi một hoặc nhiều lớp màng phospholipit kép. Các dược chất được bao trong lớp phospholipit nên khả năng hòa tan tốt, thời gian lưu lại

trong cơ thể được kéo dài, tránh được sự đào thải, nhờ đó độ sinh khả dụng được cải thiện. Hệ nhũ tương nanoliposom rutin (NR) có thể dùng qua đường miệng chứa các hạt vi nhũ, phân tán tốt trong nước, đó đó làm tăng sự hấp thụ thuốc ở đường tiêu hóa. Thử nghiệm đã cho thấy tác dụng hạ huyết áp trên chuột cống trắng, ở các liều dùng 280 mg/kg và 560 mg/kg, mà không ảnh hưởng đến nhịp tim của chuột, đồng thời làm tăng nồng độ 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. Các tác dụng này của NR ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với thuốc losartan 25mg/kg, một thuốc nằm trong danh sách các loại thuốc thiết yếu của Tổ chức Y tế Thế giới, tuy nhiên lại có nguy cơ gây các phản ứng nghiêm trọng bao gồm nhịp tim chậm/không đều.

Để đạt được các mục đích trên đây, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hệ nhũ tương nanoliposom rutin bao gồm các bước:

i) chuẩn bị hỗn hợp chất mang bao gồm lexitin, glyxerol và dầu hướng dương, trong đó:

tính theo tổng khối lượng của hỗn hợp chất mang:

- lexitin có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 20%,
- glyxerol có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 60%,
- dầu hướng dương có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 25 đến 35%; và

hỗn hợp chất mang được chuẩn bị bằng cách trộn lẫn lexitin, glyxerol, dầu hướng dương vào dung môi được chọn từ nhóm bao gồm etanol theo tỷ lệ khối lượng/thể tích của hỗn hợp chất mang/etanol nằm trong khoảng từ (0,8-1,2)/1;

ii) tạo hỗn hợp đồng nhất chứa rutin, trong đó rutin được bổ sung vào hỗn hợp chất mang ở bước i) dưới điều kiện khuấy, theo tỷ lệ khối lượng của rutin/hỗn hợp chất mang nằm trong khoảng từ (1-2,5)/100;

iii) tạo màng lipit, trong đó hỗn hợp ở bước ii) được cô chân không để loại bỏ dung môi;

iv) hydrat hóa màng lipit, trong đó dung dịch nước axit xitric vào hỗn hợp ở bước iii) trong thiết bị cô quay chân theo tỷ lệ khối lượng của hỗn hợp chất mang trong bước i)/axit xitric khoảng (0,8-1,2)/1;

v) phân tán hỗn hợp sau khi hydrat hóa trong dung dịch nước natri hydrocacbonat để tạo nhũ tương liposom theo tỷ lệ khối lượng của chất mang trong bước i)/dung dịch natri hydrocacbonat khoảng từ (0,8-1,2)/1;

vi) đồng hóa tốc độ cao để thu được hệ nhũ tương nanoliposom rutin, trong đó hệ nhũ tương liposom ở bước v) được đồng hóa ở tốc độ cao nằm trong khoảng từ 10000 đến 11000 vòng/phút, lặp lại 5 đến 7 chu kỳ.

Theo một phương án, trong bước i) tính theo tổng khối lượng của hỗn hợp chất mang:

lexitin có mặt với lượng khoảng 15%;

glyxerol có mặt với lượng khoảng 55%,

dầu hướng dương có mặt với lượng khoảng 30%.

Theo phương án khác, trong bước i) tỷ lệ khối lượng/thể tích của hỗn hợp chất mang/etanol là khoảng 1/1.

Theo phương án khác, trong bước i) hỗn hợp được khuấy trộn trong thời gian khoảng từ 30 đến 50 phút với tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 300 đến 400 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng 50 đến 60°C.

Theo phương án khác, trong bước ii) tỷ lệ khối lượng của rutin/hỗn hợp chất mang là khoảng 1/100.

Theo phương án khác, trong bước ii) hỗn hợp được đồng nhất bằng cách khuấy trộn trong thời gian khoảng từ 1 đến 2 giờ với tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 300 đến 400 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng 40 đến 50°C.

Theo phương án khác, trong bước iii) việc cô loại bỏ dung môi được thực hiện trong thiết bị cô kiểu quay chân không.

Theo phương án khác, trong bước iii) tạo màng lipid được thực hiện trong thiết bị cô kiểu quay chân không ở nhiệt độ khoảng 40°C, áp suất khoảng 0,01867 MPa, mỗi chu kỳ khoảng 1 giờ, lặp lại 5 đến 7 chu kỳ. Việc cô loại bỏ dung môi tốt hơn là về cơ bản loại bỏ hết dung môi.

Theo phương án khác, trong bước iv) dung dịch nước axit xitric có nồng độ khoảng 3% khối lượng.

Theo phương án khác, trong bước iv) tỷ lệ của hỗn hợp chất mang/axit xitric là khoảng 1/1.

Theo phương án khác, trong bước v) dung dịch nước natri hydrocacbonat có nồng độ khoảng 3% khối lượng.

Theo phương án khác, trong bước v) tỷ lệ khối lượng của chất mang/dung dịch natri hydrocacbonat là khoảng 1/1.

Theo phương án khác, trong bước vi) đồng hóa hệ nhũ tương liposom trong thiết bị đồng hóa tốc độ cao với tốc độ nằm trong khoảng từ 10000 đến 11000 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C, mỗi chu kỳ 30 phút lặp lại 5 đến 7 chu kỳ để thu được hệ nhũ tương nanoliposom rutin.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là sự phân bố kích thước theo cường độ của mẫu nano theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết phương án cụ thể chế tạo hệ nhũ tương nanoliposom rutin, tuy nhiên phương án này chỉ nhằm mục đích minh họa cho sáng chế, mà không làm giới hạn sáng chế.

Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế hệ vi nhũ nanoliposom rutin. Đây là hệ mang thuốc có nhiều ưu điểm trong quá trình vận chuyển, phân bố, kiểm soát giải phóng và tăng sinh khả dụng của dạng thuốc.

Trong bản mô tả này, “nanoliposom” (nanoliposome) là biến thể của liposom có kích thước nano, mà là một trong những hệ bao và giải phóng có kiểm soát. Thuật ngữ “liposom” bắt nguồn từ hai từ tiếng Hy Lạp, lipo (chất béo) và som (cấu trúc), có nghĩa là một cấu trúc, trong đó lớp vỏ béo bao bọc (các) khoang chứa nước bên trong. Liposom (còn được gọi là bong bóng hoặc hình cầu (vesicle) lipid hai lớp) là mô hình lý tưởng của tế bào và màng sinh học. Sự giống với màng sinh học khiến chúng trở thành một hệ lý tưởng, không chỉ cho nghiên cứu về màng sinh học hiện đại, mà còn cho các nghiên cứu về sự xuất hiện, chức năng và sự tiến hóa của màng tế bào nguyên thủy. Hơn nữa, chúng đang được sử dụng trong các ngành công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm, nông nghiệp và dược phẩm làm hệ vận chuyển để bảo vệ và phân phối các vật liệu khác nhau bao gồm thuốc, dược phẩm, dinh dưỡng và vật liệu di truyền. Liposom bao gồm một hoặc nhiều lớp lipid và/hoặc phospholipid đồng tâm hoặc không đồng tâm và có thể chứa các phân tử khác trong cấu trúc của chúng. Chúng có thể ở dạng đơn hoặc đa lớp, tùy theo số

lượng lớp kép mà chúng chứa, và có thể chứa các hợp chất ưa nước, ưa mỡ và lưỡng tính trong ngăn chứa nước và/hoặc ngăn chứa lipid của chúng.

Thuật ngữ “nanoliposom” được dùng để chỉ các bong bóng hoặc hình cầu lipid hai lớp có kích thước nano vì liposome là một thuật ngữ chung bao gồm nhiều loại túi có đường kính từ hàng chục nanomet (nm) đến vài micromet (μm). Theo nghĩa rộng, liposom và nanoliposom có chung đặc tính hóa học, cấu trúc và nhiệt động. Tuy nhiên, so với liposom, nanoliposom có diện tích bề mặt lớn hơn và có khả năng làm tăng độ hòa tan, tăng cường độ sinh khả dụng, cải thiện khả năng giải phóng có kiểm soát và cho phép nhắm mục tiêu chính xác của vật chất được bao ở mức độ lớn hơn.

Quy trình điều chế hệ vi nhũ nanoliposom rutin, thích hợp dùng để hạ huyết áp, theo sáng chế về cơ bản bao gồm các bước:

- i) chuẩn bị hỗn hợp chất mang;
- ii) tạo hỗn hợp đồng nhất chứa rutin;
- iii) tạo màng lipid;
- iv) hydrat hóa màng lipid;
- v) tạo hệ nhũ tương liposom;
- vi) đồng hóa tốc độ cao để tạo hệ nhũ tương nanoliposom rutin.

Sau đây, mỗi bước nêu trên sẽ được mô tả một cách chi tiết.

Bước i) chuẩn bị hỗn hợp chất mang

Hỗn hợp chất mang được sử dụng theo sáng chế bao gồm dầu thực vật được chọn là dầu hướng dương, lexitin (lecithin) và glyxerol (glycerol). Trong đó, do đặc tính cấu trúc của các axit béo không bão hòa cao trong dầu hướng dương, sáng chế sử dụng dầu hướng dương làm thành phần lipid cùng với lexitin trong điều chế nanoliposom, trong đó lexitin có thể hòa tan hoàn toàn trong dầu hướng dương, và glyxerol như là chất hòa tan giúp tăng độ ổn định của nanoliposom.

Glyxerol hay glyxerin là một rượu đa chức, gồm 3 nhóm -OH gắn vào gốc hydrocacbon C_3H_5 , có công thức hóa học là $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$ hay $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$.

Lexitin, ví dụ, lexitin nguồn gốc từ đậu nành có công thức phân tử là $\text{C}_{35}\text{H}_{66}\text{NO}_7\text{P}$, đây là một phụ gia được sử dụng nhiều trong dược phẩm làm tăng khả năng hấp thụ và chống oxy hóa các dược chất.

Dầu hướng dương là loại dầu thu được từ hạt hướng dương bằng phương pháp ép, ép lạnh hoặc chiết xuất với dung môi thích hợp như hexan. Thành phần của dầu hướng dương là axit linoleic (66%), axit oleic (21,3%), axit palmitic (6,4%), axit arachidonic (4%), axit stearic (1,3%) và axit behenic (0,8%), Alpha-tocopherol nồng độ 609 mg/kg.

Theo một số phương án, hỗn hợp chất mang được chuẩn bị bằng cách trộn lẫn lexitin, glyxerin, dầu hướng dương vào dung môi hữu cơ etanol mà cho phép phân tán hòa tan chất phân tán rutin, trong đó tính theo tổng khối lượng của hỗn hợp chất mang:

lexitin có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 20%,

glyxerol có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 60%,

dầu hướng dương có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 25 đến 35%;

và hỗn hợp chất mang được chuẩn bị bằng cách trộn lẫn lexitin, glyxerol, dầu hướng dương vào dung môi được chọn từ nhóm bao gồm etanol theo tỷ lệ khối lượng/thể tích của hỗn hợp chất mang/etanol nằm trong khoảng từ (0,8-1,2)/1.

Theo phương án cụ thể:

lexitin có mặt với lượng khoảng 15%;

glyxerol có mặt với lượng khoảng 55%,

dầu hướng dương có mặt với lượng khoảng 30%.

Theo phương án cụ thể khác, tỷ lệ khối lượng/thể tích của hỗn hợp chất mang/etanol là khoảng 1/1.

Theo phương án cụ thể, trong bước này, hỗn hợp được khuấy trộn trong thời gian khoảng từ 30 đến 50 phút với tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 300 đến 400 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng 50 đến 60°C để gia tăng hiệu quả trộn lẫn, phân tán.

Bước ii) tạo hỗn hợp đồng nhất chứa rutin

Trong bước tiếp theo, chất phân tán rutin được trộn lẫn vào hỗn hợp hỗn hợp chất mang ở bước i) dưới điều kiện khuấy, theo tỷ lệ khối lượng của rutin/hỗn hợp chất mang tốt hơn là nằm trong khoảng từ (1-2,5)/100.

Theo phương án cụ thể, tỷ lệ khối lượng của rutin/hỗn hợp chất mang là khoảng 1/100.

Hỗn hợp sau đó được đồng nhất bằng cách khuấy trộn trong thời gian khoảng từ 1 đến 2 giờ với tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 300 đến 400 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng 40 đến 50°C để thu được hỗn hợp đồng nhất.

Cần lưu ý rằng, rutin và các hóa chất sử dụng theo sáng chế là thông dụng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể thu được từ các nguồn thương mại sẵn có, hoặc có thể tổng hợp, tách chiết sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, rutin có thể thu được từ cây hoa Hòe tỉnh Thái Bình, tốt hơn là hoa do chứa rutin với hàm lượng cao hơn cả.

Bước iii) tạo màng lipit

Việc sản xuất nanoliposom từ lexitin làm chất mang thuốc được thực hiện bằng phương pháp hydrat hóa màng mỏng lipit. Theo đó, hỗn hợp ở bước ii) được cô chân không để loại bỏ dung môi sử dụng thiết bị cô kiểu quay chân không.

Theo phương án cụ thể, để tạo màng lipit được thực hiện trong thiết bị cô kiểu quay chân không ở nhiệt độ khoảng 40°C, áp suất khoảng 0,01867 MPa, mỗi chu kỳ khoảng 1 giờ, lặp lại 5 đến 7 chu kỳ. Việc cô chậm để dung môi bay hơi từ từ cho phép đảm bảo việc cô về cơ bản loại bỏ hết dung môi và tạo thành lớp lipit.

Bước iv) hydrat hóa màng lipit

Tiếp theo, màng lipit được hydrat hóa bằng cách thêm dung dịch nước axit xitric (citric acid) để tạo bề mặt bên trong. Hydrat hóa màng là một trong các phương pháp được sử dụng phổ biến nhất để điều chế liposom. Theo một số phương án, dung dịch nước axit xitric được bổ sung theo tỷ lệ khối lượng của hỗn hợp chất mang trong bước i)/axit xitric khoảng (0,8-1,2)/1.

Theo phương án cụ thể, dung dịch nước axit xitric có nồng độ khoảng 3% khối lượng.

Theo phương án cụ thể, tỷ lệ của hỗn hợp chất mang/axit xitric là khoảng 1/1.

Bước v) tạo hệ nhũ tương liposom

Để tạo hệ nhũ tương liposom, hỗn hợp sau khi hydrat hóa được phân tán trong dung dịch nước natri hydrocacbonat. Trong trường hợp này, nanoliposom được điều chế bằng dung dịch nước axit xitric như trên, độ pH của dung dịch được điều chỉnh bằng cách sử dụng dung dịch đệm natri bicacbonat để tạo ra gradient giữa bên trong và bên ngoài của nanoliposom cho mục đích phân tán hiệu quả.

Theo một số phương án, để tạo nhũ tương liposom, tỷ lệ khối lượng của chất mang trong bước i)/dung dịch natri hydrocacbonat khoảng từ (0,8-1,2)/1

Theo phương án cụ thể, dung dịch nước natri hydrocacbonat có nồng độ khoảng 3% khối lượng.

Theo phương án cụ thể, tỷ lệ khối lượng của chất mang/dung dịch natri hydrocacbonat là khoảng 1/1.

Bước vi) đồng hóa tốc độ cao để tạo hệ nhũ tương nanoliposom rutin

Tiếp theo, nhũ tương liposom được giảm kích thước bằng cách đồng hóa. Việc đồng hóa theo sáng chế được thực hiện ở tốc độ cao để thu được hệ nhũ tương nanoliposom rutin, trong đó hệ nhũ tương liposom được đồng hóa ở tốc độ cao nằm trong khoảng từ 10000 đến 11000 vòng/phút, lặp lại 5 đến 7 chu kỳ.

Theo phương án cụ thể, việc đồng hóa hệ nhũ tương liposom trong thiết bị đồng hóa tốc độ cao được thực hiện với tốc độ nằm trong khoảng từ 10000 đến 11000 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C, mỗi chu kỳ 30 phút lặp lại 5 đến 7 chu kỳ để thu được hệ nhũ tương nanoliposom rutin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chế tạo hệ nhũ tương nanoliposom rutin

Chuẩn bị 50 g hỗn hợp chất mang lexitin, glyxerol, dầu hướng dương bằng cách trộn 7,5 g lexitin, 27,5 glyxerol, 15 g dầu hướng dương vào 50 mL etanol. Hỗn hợp được trộn trên máy khuấy trong thời gian khoảng 30 đến 50 phút với tốc độ quay từ 300 đến 400 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng 50 đến 60°C.

Tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn 0,5 g chất phân tán rutin vào hỗn hợp chất mang thu được ở trên. Hỗn hợp đồng nhất được thực hiện trên máy

khuấy với tốc độ 300 đến 400 vòng/phút, ở nhiệt độ 40 đến 50°C, trong khoảng thời gian 1 đến 2 giờ.

Tiếp theo, tạo màng lipit bằng cách cô hỗn hợp đồng nhất thu được ở trên trong thiết bị cô quay chân không để loại bỏ hết dung môi. Việc cô được thực hiện để dung môi bay hơi từ từ ở nhiệt độ 40°C, áp suất 0,01867 MPa, mỗi chu kỳ khoảng 1 giờ, lặp lại 5 đến 7 chu kỳ.

Hydrat hóa màng lipit bằng cách thêm 50 g dung dịch nước axit xitric 3% vào hỗn hợp sau khi cô trong thiết bị cô quay chân.

Phân tán hỗn hợp sau khi hydrat hóa trong 50 g dung dịch natri nước hydrocacbonat (NaHCO_3) 3% để tạo nhũ tương liposom.

Đồng hóa hệ nhũ tương liposom trong thiết bị đồng hóa với tốc độ từ 10000 đến 11000 vòng/phút ở nhiệt độ 30 đến 40°C, mỗi chu kỳ 30 phút lặp lại 5 đến 7 chu kỳ.

Ví dụ 2: Xác định đặc tính của nanoliposom rutin (NR)

Trong ví dụ này, đặc tính kích thước của hệ vi nhũ thu được theo sáng chế được xác định bằng sự phân bố cỡ hạt theo cường độ (Size Distribution Report by Intensity). Cụ thể, mẫu được cho thử nghiệm trên hệ thống thiết bị Zetasizer (Malvern Instruments Ltd) Ver. 5.10, trong đó chất phân tán là nước, nhiệt độ hệ thống là 24,9°C, tốc độ đếm 237,3 kcps, vị trí đo 4,65 mm.

Kết quả được thể hiện trên Hình 1 cho thấy hệ nano có kích thước tiêu phân trung bình nhỏ khoảng 22,88 nm, với hai đỉnh: đỉnh thứ nhất (19,48 nm, cường độ 86,2%) đỉnh thứ hai (106,2 nm, cường độ 13,8%).

Ví dụ 3: Nghiên cứu tác dụng của nano rutin trên tim mạch

Ví dụ 3-1: Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

Chế phẩm nghiên cứu

Mẫu nano rutin (NR) do chủ đơn (Công ty Cổ phần Công nghệ mới Nhật Hải) bào chế và cung cấp. Liều dùng dự kiến trên người của NR là 2000 mg/người/ngày. Với quy ước cân nặng của người 50kg, liều dùng của NR là 40 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 chuột cống (hệ số quy đổi là 7) là 280 mg/kg/ngày. Đây là liều cơ sở (liều 1) được dùng để đánh giá tác dụng của NR dạng viên nang. Mức liều cao (liều 2) được dùng trong nghiên cứu gấp đôi liều 1, tức 560 mg/kg/ngày.

2. Động vật nghiên cứu

Trong ví dụ này, chuột cống trắng chủng Wistar được nghiên cứu với số lượng được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1 - Số lượng động vật thực nghiệm

Động vật	N	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 NR
Chuột cống trắng chủng Wistar	60	Giống đực, khỏe mạnh, trọng lượng 200 - 220g	Đánh giá tác dụng chống vữa xơ mạch

Các chuột khỏe mạnh được đánh giá 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 2 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.

3. Hóa chất nghiên cứu

- Hóa chất: L-NAME (N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester) của Sigma - Mỹ gây tăng huyết áp;
- Kit xét nghiệm Griess Reaction System kit (Promega, Madison, WI, USA)
- Các kit xét nghiệm Superoxit Dismutaza (Superoxide Dismutase – SOD), Glutathion (GSH), Malondialdehyd (Malondialdehyde – MDA) của Sigma - Mỹ.
- Các hóa chất triglycerit (TG), cholesterol toàn phần (TC), lipoprotein

tỷ trọng cao (high-density lipoproteins - HDL-C), lipoprotein tỷ trọng thấp (Low density lipoprotein - LDL-C).

4. 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 uống thuốc.
- Các dụng cụ thí nghiệm khác.

Ví dụ 3-2: Phương pháp nghiên cứu

1. Đánh giá tác dụng hạ huyết áp của NR

Đánh giá tác dụng hạ huyết áp của NR 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, Dzeufiet PDD, Kouakep L, Aboubakar BFO, Tedong L, Kamtchouing P, Dimo T. *Bidens pilosa*: “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: Không gây tăng huyết áp + uống nước cất.
- Lô chứng bệnh: Gây tăng huyết áp + uống nước cất.
- Lô losartan 25: Gây tăng huyết áp + uống losartan 25mg/kg/ngày.
- Lô NR 280: Gây tăng huyết áp + uống NR liều 280 mg/kg/ngày.
- Lô NR 560: Gây tăng huyết áp + uống NR liều 560 mg/kg/ngày.

Chuột được gây tăng huyết áp bằng cách cho uống L-NAME (0,5% w/v trong nước cất), liều 50mg/kg/ngày trong 4 tuần liên tục. Chuột được uống nước cất, thuốc tham chiếu hoặc thuốc thử (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 10-20 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 (the 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 của E. Meaney và cộng sự (E. Meaney, F. Alva, R. Moguel, A. Meaney, J. Alva, and R. Webel, “*Formula and nomogram for the sphygmomanometric calculation of the mean arterial pressure*”, Heart, vol. 84, no. 1, p. 64, 2000):

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

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, Grisham MB: “*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 kit Griess Reaction System Kit (Promega, Madison, WI, USA). Đánh giá một số chỉ số oxy hóa bao gồm SOD, Glutathion, MDA.

Ví dụ 3-3: Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý theo các phương pháp thống kê y sinh học, so sánh bằng anova test, 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 4: Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Ví dụ 4-1: Kết quả đánh giá tác dụng hạ huyết áp của NR

1. Ảnh hưởng của NR lên huyết áp và nhịp tim chuột

Kết quả về ảnh hưởng của NR lên huyết áp và nhịp tim chuột được thể hiện ở các bảng 2 đến 5 sau đây

Bảng 2 - Kết quả huyết áp tâm thu của chuột trong nghiên cứu NR

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 (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 (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 (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
NR 280 (4)	120,65 $\pm$ 15,18	127,21 $\pm$ 26,36	130,42 $\pm$ 26,61	135,20 [#] $\pm$ 20,21	137,01 [#] $\pm$ 26,24
NR 560 (5)	120,84 $\pm$ 13,55	126,22 $\pm$ 25,84	129,44 $\pm$ 26,70	132,74 [#] $\pm$ 21,42	134,45 [#] $\pm$ 25,25

* $p < 0,05$ 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 uống 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 uống 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 NR (lô 4, 5) giảm hơn so có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh bắt đầu tại các thời điểm T3, T4 ($p < 0,05$).

- So với lô 3 (dùng Losartan 25mg/kg), huyết áp tâm thu của chuột ở các lô dùng NR (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Như vậy, NR ở các liều dùng 280 mg/kg và 560 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 NR ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với Losartan 25mg/kg.

Bảng 3 - Kết quả huyết áp tâm trương của chuột trong nghiên cứu NR

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 (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 (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 (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
NR 280 (4)	100,84 $\pm$ 12,72	104,98 $\pm$ 20,41	109,04 $\pm$ 22,24	112,99 [#] $\pm$ 17,20	113,69 [#] $\pm$ 20,83
NR 560 (5)	101,16 $\pm$ 11,72	104,69 $\pm$ 20,62	108,49 $\pm$ 20,84	110,81 [#] $\pm$ 17,52	111,34 [#] $\pm$ 20,24

* $p < 0,05$ 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 uống 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 uống 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 NR (lô 4, 5) giảm hơn so có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh tại các thời điểm T3, T4 ($p < 0,05$ và $p < 0,01$).

- So với lô 3 (dùng Losartan 25mg/kg), huyết áp tâm trương của chuột ở các lô dùng NR (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Như vậy, NR ở các liều dùng 280 mg/kg và 560 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 NR ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với Losartan 25mg/kg.

Bảng 4 - Kết quả huyết áp trung bình của chuột trong nghiên cứu NR

Lô chuột	Huyết áp trung bình của chuột (mmHg), n= 12, Mean $\pm$ SD				
	T0 (a)	T1 (b)	T2 (c)	T3 (d)	T4 (e)
Chứng sinh lý (1)	109,33 $\pm$ 15,10	110,05 $\pm$ 29,25	110,62 $\pm$ 22,08	110,96 $\pm$ 21,89	110,24 $\pm$ 22,87
Chứng bệnh (2)	109,42 $\pm$ 13,14	125,89 $\pm$ 21,69	131,88* $\pm$ 22,86	139,93** $\pm$ 19,71	147,19** $\pm$ 25,34
Losartan 25 (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
NR280 (4)	109,00 $\pm$ 13,69	114,13 $\pm$ 22,82	117,85 $\pm$ 23,89	122,14 [#] $\pm$ 18,30	123,30 [#] $\pm$ 17,49
NR 560 (5)	109,27 $\pm$ 12,46	113,56 $\pm$ 22,67	117,12 $\pm$ 23,10	119,84 [#] $\pm$ 19,01	120,86 [#] $\pm$ 20,84

* $p < 0,05$ 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 uống 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 uống 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 NR (lô 4, 5) giảm hơn so có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh tại các thời điểm T3 và T4 ($p < 0,05$ và $p < 0,01$).

- So với lô 3 (dùng Losartan 25mg/kg), huyết áp trung bình của chuột ở các lô dùng NR (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt ($p > 0,05$).

Như vậy, NR ở các liều dùng 280 mg/kg và 560 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 NR ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với Losartan 25mg/kg.

Bảng 5 - Kết quả đánh giá nhịp tim của chuột trong nghiên cứu NR

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 (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 (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 (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
NR 280 (4)	429,81 $\pm$ 30,54	429,33 $\pm$ 31,85	426,45 $\pm$ 32,02	427,63 $\pm$ 34,16	428,96 $\pm$ 33,14
NR 560 (5)	430,41 $\pm$ 32,76	429,67 $\pm$ 33,62	427,56 $\pm$ 31,93	428,58 $\pm$ 32,09	429,94 $\pm$ 30,88

Nhận xét

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 mẫu thử không ảnh hưởng đến nhịp tim chuột.

2. Ảnh hưởng của NR lên nồng độ NO và các chỉ số đánh giá khả năng chống oxy hóa (SOD, GSH, MDA) trong huyết tương chuột

Kết quả về ảnh hưởng của NR lên nồng độ NO và các chỉ số đánh giá khả năng chống oxy hóa (SOD, GSH, MDA) trong huyết tương chuột được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6 - Kết quả đánh giá nồng độ NO, SOD, GSH, MDA trong huyết tương chuột gây tăng huyết áp trong nghiên cứu NR

Lô chuột	Nồng độ NO	SOD	GSH	MDA
----------	------------	-----	-----	-----

	(μ M/ml)	(U/ml)	(μ mol/ml)	(nmol/ml)
Chứng sinh lý (1)	20,81 $\pm 3,27$	119,66 $\pm 29,86$	82,69 $\pm 19,21$	5,24 $\pm 0,92$
Chứng bệnh (2)	15,83** $\pm 3,22$	60,27** $\pm 13,17$	39,13** $\pm 7,24$	11,09** $\pm 2,35$
Losartan 25 (3)	19,12 ^{##} $\pm 2,36$	92,97 ^{##} $\pm 20,77$	68,33 ^{##} $\pm 12,20$	8,81 ^{##} $\pm 1,49$
NR280 (4)	19,04 ^{##} $\pm 3,80$	96,62 ^{##} $\pm 20,30$	71,90 ^{##} $\pm 11,33$	8,96 ^{##} $\pm 1,02$
NR560 (5)	19,09 ^{##} $\pm 2,89$	105,48 ^{##} $\pm 16,05$	74,40 ^{##} $\pm 10,13$	8,65 ^{##} $\pm 1,14$

Số liệu trình bày dưới dạng Mean $\pm$ 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 NR (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 NR (lô 4, 5) tại cùng thời điểm đánh giá không thấy có sự khác biệt (p > 0,05).

Như vậy, NR ở các liều dùng 280 mg/kg và 560 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 NR ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với Losartan 25mg/kg.

Kết luận

Tác dụng hạ huyết áp của NR

Trên chuột cống trắng gây tăng huyết áp bằng cho uống L-NAME, NR ở các liều dùng 280 mg/kg và 560 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 NR ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với Losartan 25mg/kg.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề xuất thành công quy trình điều chế hệ nhũ tương nanoliposom rutin, thích hợp dùng để hạ huyết áp, sử dụng các chất phân tán tốt trong nước có độ an toàn cao, không độc hại và ít tác dụng phụ, nên hệ nhũ tương nanoliposom rutin thu được từ quy trình theo sáng chế có độ an toàn cao khi sử dụng. Ngoài ra, quy trình theo sáng chế cho phép tạo hệ nhũ tương nanoliposom rutin bao gồm tiểu phân tử hình cầu có kích thước nano với kích thước khoảng 22,8 nm này, có lõi chứa các hoạt chất, được bao bọc phía ngoài bởi một hoặc nhiều lớp màng phospholipit kép. Các dược chất được bao trong lớp phospholipit nên khả năng hòa tan tốt, thời gian lưu lại trong cơ thể được kéo dài, tránh được sự đào thải, nhờ đó độ sinh khả dụng được cải thiện. Hệ nhũ tương nano theo sáng chế có thể dùng qua đường miệng chứa các hạt vi nhũ, phân tán tốt trong nước, đó đó làm tăng sự hấp thụ thuốc ở đường tiêu hóa.

Thử nghiệm đã cho thấy tác dụng hạ huyết áp trên chuột cống trắng, ở các liều dùng 280 mg/kg và 560 mg/kg, mà không ảnh hưởng đến nhịp tim của chuột, đồng thời làm tăng nồng độ 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. Các tác dụng này của NR ở các liều đã thử nghiệm tương đương so với thuốc losartan 25mg/kg.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình điều chế hệ nhũ tương nanoliposom rutin dùng để hạ huyết áp, quy trình bao gồm các bước:

i) chuẩn bị hỗn hợp chất mang bao gồm lexitin, glyxerol và dầu hướng dương, trong đó:

tính theo tổng khối lượng của hỗn hợp chất mang:

- lexitin có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 20%,
- glyxerol có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 60%,
- dầu hướng dương có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 25 đến 35%; và

hỗn hợp chất mang được chuẩn bị bằng cách trộn lẫn lexitin, glyxerol, dầu hướng dương vào dung môi được chọn từ nhóm bao gồm etanol theo tỷ lệ khối lượng/thể tích của hỗn hợp chất mang/etanol nằm trong khoảng từ (0,8-1,2)/1;

ii) tạo hỗn hợp đồng nhất chứa rutin, trong đó rutin được bổ sung vào hỗn hợp chất mang ở bước i) dưới điều kiện khuấy, theo tỷ lệ khối lượng của rutin/hỗn hợp chất mang nằm trong khoảng từ (1-2,5)/100;

iii) tạo màng lipit, trong đó hỗn hợp ở bước ii) được cô chân không để loại bỏ dung môi;

iv) hydrat hóa màng lipit, trong đó dung dịch nước axit xitric vào hỗn hợp ở bước iii) trong thiết bị cô quay chân theo tỷ lệ khối lượng của hỗn hợp chất mang trong bước i)/axit xitric khoảng (0,8-1,2)/1;

v) phân tán hỗn hợp sau khi hydrat hóa trong dung dịch nước natri hydrocacbonat để tạo nhũ tương liposom theo tỷ lệ khối lượng của chất mang trong bước i)/dung dịch natri hydrocacbonat khoảng từ (0,8-1,2)/1;

vi) đồng hóa tốc độ cao để thu được hệ nhũ tương nanoliposom rutin, trong đó hệ nhũ tương liposom ở bước v) được đồng hóa ở tốc độ cao nằm trong khoảng từ 10000 đến 11000 vòng/phút, lặp lại 5 đến 7 chu kỳ.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó trong bước i) tính theo tổng khối lượng của hỗn hợp chất mang:

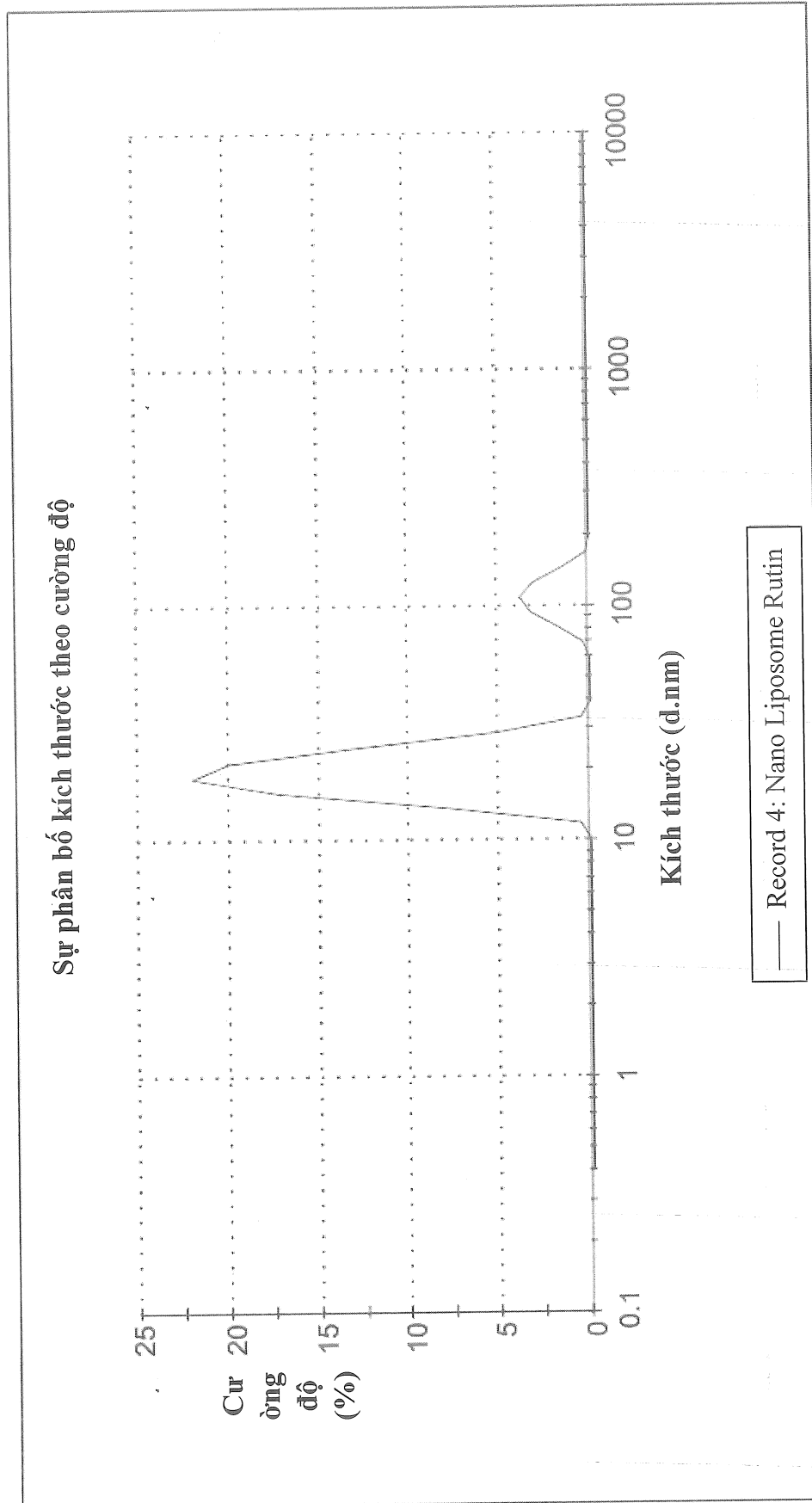
lexitin có mặt với lượng khoảng 15%;

glyxerol có mặt với lượng khoảng 55%,

dầu hướng dương có mặt với lượng khoảng 30%.

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó trong bước i) tỷ lệ khối lượng/thể tích của hỗn hợp chất mang/etanol là khoảng 1/1.
4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước i) hỗn hợp được khuấy trộn trong thời gian khoảng từ 30 đến 50 phút với tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 300 đến 400 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng 50 đến 60°C.
5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước ii) tỷ lệ khối lượng của rutin/hỗn hợp chất mang là khoảng 1/100.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước ii) hỗn hợp được đồng nhất bằng cách khuấy trộn trong thời gian khoảng từ 1 đến 2 giờ với tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 300 đến 400 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng 40 đến 50°C.
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước iii) việc cô loại bỏ dung môi được thực hiện trong thiết bị cô kiểu quay chân không.
8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước iii) tạo màng lipit được thực hiện trong thiết bị cô kiểu quay chân không ở nhiệt độ khoảng 40°C, áp suất khoảng 0,01867 MPa, mỗi chu kỳ khoảng 1 giờ, lặp lại 5 đến 7 chu kỳ.
9. Quy trình theo điểm 8, trong đó việc cô loại bỏ dung môi về cơ bản loại bỏ hết dung môi.
10. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước iv) dung dịch nước axit xitric có nồng độ khoảng 3% khối lượng.
11. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước iv) tỷ lệ của hỗn hợp chất mang/axit xitric là khoảng 1/1.
12. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước v) dung dịch nước natri hydrocacbonat có nồng độ khoảng 3% khối lượng.
13. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước v) tỷ lệ khối lượng của chất mang/dung dịch natri hydrocacbonat là khoảng 1/1.

14. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trong bước vi) đồng hóa hệ nhũ tương liposom trong thiết bị đồng hóa tốc độ cao với tốc độ nằm trong khoảng từ 10000 đến 11000 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C, mỗi chu kỳ 30 phút lặp lại 5 đến 7 chu kỳ để thu được hệ nhũ tương nanoliposom rutin.

**Hình 1**