



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0004498

(51) **A61K 31/00; A61P 31/04**
2024.01

(13) **Y**

(21) 2-2025-00417

(22) 11/08/2023

(67) 1-2023-05378

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/12/2023 429A

(73) Trường Đại học Phenikaa (VN)

Phổ Nguyễn Trác, phường Yên Nghĩa, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

(72) Tô Đạo Cường (VN); Trần Quang Huy (VN); Lê Anh Tuấn (VN); Hoàng Lê Minh (VN); Nguyễn Thị Hoa (VN); Nguyễn Thị Huế (VN); Nguyễn Phi Hùng (VN); Trương Thị Thùy Nhung (VN); Trương Thị Việt Hòa (VN); Vũ Thị Hà (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM TỪ CAO CHIẾT NƯỚC LÁ TRÀ HOA VÀNG (CAMELLIA CHRYSANTHA) CÓ TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN**

(21) 2-2025-00417

(57) Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn từ cao chiết nước lá Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) bằng phương pháp điện hóa, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) thu cao chiết nước; c) tạo hệ dung dịch điện hóa; và d) thu chế phẩm. Quy trình này tạo ra chế phẩm chứa các hạt nano bạc có kích thước đồng nhất, độ ổn định cao và có tác dụng kháng khuẩn. Chế phẩm được tổng hợp từ các nguồn nguyên liệu thiên nhiên, sẵn có, không sử dụng hóa chất độc hại với quy trình sản xuất đơn giản.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực khoa học vật liệu và hợp chất thiên nhiên, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm từ cao chiết nước lá Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) bằng phương pháp điện hóa có tác dụng kháng khuẩn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hàng ngày chúng ta tiếp xúc với hàng nghìn tế bào vi khuẩn bao gồm các vi khuẩn có lợi và có hại. Một số loại vi khuẩn gây bệnh thường gặp như *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*. *S. aureus* là vi khuẩn Gram dương gây ra nhiều mầm bệnh truyền nhiễm ở người như: nhiễm trùng da, nhiễm khuẩn huyết, viêm nội tâm mạc, viêm phổi và ngộ độc thực phẩm (H. F. L. Wertheim et al., “The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections,” *Lancet Infect. Dis.*, 5(12), 751–762, 2005; R. Coates et al., “Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin,” *Future Microbiol.*, 9(1), 75–91, 2014; P. O. Verhoeven et al., “Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update,” *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 12(1), 75–89, 2014). Vi khuẩn *S. aureus* sẽ gắn kết vào mô và tránh phản ứng miễn dịch của vật chủ để tạo điều kiện thuận lợi cho sự lây nhiễm (H. F. L. Wertheim et al., “The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections,” *Lancet Infect. Dis.*, 5(12), 751–762, 2005). *S. aureus* thể hiện khả năng kháng nhiều loại kháng sinh khiến chúng trở thành mầm bệnh khó điều trị. Thêm một loại vi khuẩn gram âm gây bệnh phổ biến là *E. coli*. *E. coli* là vi khuẩn cộng sinh tồn tại trong hệ sinh thái của con người và động vật máu nóng (N. A. Campbell et al., “Biology San Francisco.” *Pearson Education Inc. Benjamin Cummings*, 2002). *E. coli* là một mầm bệnh gây ra các bệnh như nhiễm trùng đường tiết niệu, bệnh tiêu chảy, viêm màng não sơ sinh, viêm phổi và nhiễm khuẩn huyết (A. G. Torres et al., “Overview of *Escherichia coli*,” *Pathog. Escherichia coli Lat. Am.*, 1–7, 2010). Ngày càng có nhiều phát hiện về việc kháng kháng sinh của cả *S. aureus* và *E. coli*, từ đó việc nghiên cứu các phương pháp mới để chống và tiêu diệt hai chủng vi khuẩn này được đưa ra.

Các hạt nano được phát triển với các đặc tính độc đáo, khiến chúng trở lên hấp dẫn trong khoa học vật liệu và sinh học (P. Kesharwani et al., “Nanotechnology based approaches for anti-diabetic drugs delivery,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 136, 52–77, 2018). Các hạt nano bạc đã nhận được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học trong những năm gần đây (M. Saravanan et al., “Synthesis of silver nanoparticles from *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria,” *Microb. Pathog.*, 116, 221–226, 2018). Với lợi thế về tỉ lệ bề mặt trên diện tích lớn nên các hạt nano bạc thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh ngay ở nồng độ thấp (M. Oves et al., “Antimicrobial and anticancer activities of silver nanoparticles synthesized from the root hair extract of *Phoenix dactylifera*,” *Mater. Sci. Eng. C*, 89, 429–443, 2018). Ngoài ra, nano Ag còn có nhiều ưu điểm như quy trình tổng hợp đơn giản, chi phí sản xuất thấp, khả năng gây ngộ độc tế bào thấp và khả năng đáp ứng miễn dịch tốt (M. S. Samuel et al., “Biosynthesized silver nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens*; Application for cytotoxicity effect on A549 cell line and photocatalytic degradation of p-nitrophenol,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 202, 111642, 2020). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra hiệu quả của các hạt nano bạc với các chủng vi khuẩn khác nhau như *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* và *E. coli* (H. Singh et al., “Extracellular synthesis of silver nanoparticles by *Pseudomonas* sp. THG-LS1. 4 and their antimicrobial application,” *J. Pharm. Anal.*, 8(4), 258–264, 2018). Các hạt nano bạc sẽ liên tục giải phóng các ion bạc vào môi trường nước vì mô (C.-N. Lok et al., “Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities,” *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, 12, 527–534, 2007). Do lực hút tĩnh điện và ái lực với protein lưu huỳnh của vi khuẩn, các ion bạc có thể bám vào thành tế bào và màng tế bào chất. Các ion bạc sinh ra các phản ứng oxi hóa và các gốc tự do làm hỏng thành tế bào và ức chế enzym hô hấp từ đó làm gián đoạn sự sao chép DNA và tiêu diệt tế bào (Y. Y. Loo et al., “In vitro antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected gram-negative foodborne pathogens,” *Front. Microbiol.*, 9, 1555, 2018). Các hạt nano bạc có khả năng kháng khuẩn mạnh được ứng dụng trong nhiều sản phẩm như vải kháng khuẩn, lớp phủ thiết bị y tế, sản phẩm đồ gia dụng (N. M. El-Deeb et al., “Biogenically synthesized polysaccharides-capped silver nanoparticles: Immunomodulatory and antibacterial potentialities against resistant *Pseudomonas aeruginosa*,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 8, 643, 2020). Trước đây, các hạt nano Ag được điều chế và ổn định bằng

các phương pháp vật lý và hóa học. Nhưng các phương pháp này rất tốn kém và yêu cầu sử dụng các hóa chất độc hại (A. D. Dwivedi et al., “Fate of engineered nanoparticles: implications in the environment,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 287, pp. 64–78, 2015; N. Abdel-Raouf et al., “Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Galaxaura elongata* and characterization of their antibacterial activity,” *Arab. J. Chem.*, 10, S3029–S3039, 2018). Vì vậy, các phương pháp tổng hợp nhanh và xanh sử dụng chiết xuất sinh học đã cho thấy tiềm năng lớn trong tổng hợp các hạt nano. Quy trình tổng hợp xanh các hạt nano an toàn hơn do việc áp dụng các yêu cầu cơ bản của hóa học xanh như môi trường dung môi, chất khử tốt và chất ổn định không độc hại (V. Venkatpurwar et al., “Green synthesis of silver nanoparticles using marine polysaccharide: study of in-vitro antibacterial activity,” *Mater. Lett.*, 65(6), 999–1002, 2011; G. M. Nazeruddin et al., “Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using *Azadirachta indica* leaf extract and its anti-microbial activity,” *J. Alloys Compd.*, 583, 272–277, 2014). Ngoài ra, việc kết hợp giữa phương pháp tổng hợp xanh và phương pháp điện hóa sẽ tạo ra nhiều ưu điểm hơn như có thể điều chỉnh được kích thước hạt bằng cách kiểm soát các thông số phản ứng như nồng độ điện phân và mật độ dòng điện (R. Singaravelan et al., “Electrochemical synthesis, characterisation and phytogenic properties of silver nanoparticles,” *Appl. Nanosci.*, 5, 983–991, 2015).

Một số sinh vật sống đã được biết đến với việc tạo ra các vật liệu tổng hợp có cấu trúc nano như vi khuẩn lam, vi khuẩn, nấm, tảo và các chiết xuất khác nhau từ thực vật (N. Asmathunisha et al., “A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 103, 283–287, 2013; V. S. Kotakadi et al., “Simple and rapid biosynthesis of stable silver nanoparticles using dried leaves of *Catharanthus roseus*. Linn. G. Donn and its anti microbial activity,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 105, 194–198, 2013). Khả năng tổng hợp nano bạc từ dịch chiết thực vật đã được biết đến từ đầu những năm 1900. Việc sử dụng các chiết xuất thực vật để khử muối kim loại để tạo thành các hạt nano đã thu hút sự chú ý đáng kể trong vòng 30 năm qua (A. Tamta et al., “A 28-days sub-acute toxicity study in swiss albino mice to evaluate toxicity profile of neurotol plus (mannitol and glycerol combination),” *Int. J. Biomed. Sci. IJBS*, 5(4), 428, 2009). Các dịch chiết thực vật có thể hoạt động như các chất khử và các chất ổn định trong quá trình tổng hợp các hạt nano (A. Traore et al., “The acute toxicity in mice and the in vitro anthelmintic effects on *Haemonchus*

contortus of the extracts from three plants (*Cassia sieberiana*, *Guiera senegalensis* and *Sapium grahamii*) used in traditional medicine in Burkina Faso,” *Ann Biol Res*, 5(2), 41–46, 2014). Nguồn gốc của dịch chiết thực vật ảnh hưởng đến đặc tính của các hạt nano (D. Yeo et al., “Acute and subacute toxic study of aqueous leaf extract of *Combretum molle*,” *Trop. J. Pharm. Res.*, 11(2), 217–223, 2012). Điều này là do các dịch chiết khác nhau có chứa nồng độ khác nhau và sự kết hợp của các chất khử hữu cơ cũng khác nhau (E. Chinedu et al., “A new method for determining acute toxicity in animal models,” *Toxicol. Int.*, 20(3), 224, 2013). Hơn nữa, chiết xuất thực vật có nguồn gốc từ các loài khác nhau được coi là một hệ thống có lợi cho quá trình tổng hợp hạt nano do khả năng to lớn của chúng trong việc tạo ra nhiều loại hợp chất thực vật có tác dụng quan trọng cũng như khả năng khử (F. Ameen et al., “Soil bacteria *Cupriavidus* sp. mediates the extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles,” *J. Mol. Struct.*, 1202, 127233, 2020). Các chất chuyển hóa thực vật như đường, terpenoid, polyphenol, alkaloid, axit phenolic và protein đóng vai trò quan trọng trong việc khử các ion kim loại thành các hạt nano. Những hợp chất hóa học này cũng chịu trách nhiệm ổn định các hạt nano trong quá trình tổng hợp (K. Parveen et al., “Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages,” in AIP conference proceedings, 1724(1), 2016).

Một trong số các loại cây giàu hoạt tính sinh học là cây Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*), vốn là một thảo dược quý trong dân gian đã được sử dụng nhằm bồi bổ cơ thể, kháng viêm, giảm béo, điều trị bệnh tiểu đường và ngăn ngừa bệnh ung thư. Ở phía Bắc Việt Nam, lá Trà hoa vàng thường được người dân địa phương sử dụng để pha trà vì những đặc tính có lợi của nó. Nghiên cứu đã chứng minh rằng các chất chiết xuất từ lá Trà hoa vàng có hoạt tính chống oxy hóa với các gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), anion superoxide và gốc tự do hydroxyl (X. M. Qin et al., “Antioxidative properties of extracts from the leaves of *Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama,” *Food Sci Technol*, 2, 24–27, 2018). Nhiều bằng chứng cho thấy vai trò quan trọng của các gốc oxy tự do trong việc điều trị ung thư, thu nhận các đặc tính ác tính (D. Dreher et al., “Role of oxygen free radicals in cancer development,” *Eur. J. Cancer*, 32(1), 30–38, 1996) và phát triển chứng tăng lipid máu (R.-L. Yang et al., “Increasing oxidative stress with progressive hyperlipidemia in human: relation between malondialdehyde and atherogenic index,” *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 43(3), 154–158,

2008). Các hợp chất có trong lá Trà hoa vàng hứa hẹn sẽ là những chất khử và chất ổn định tuyệt vời cho quá trình tổng hợp các hạt nano.

Mặc dù có nhiều sản phẩm nano bạc được tổng hợp có nguồn gốc từ thiên nhiên bằng phương pháp điện hóa, tuy nhiên cho đến thời điểm này vẫn chưa có sản phẩm nano bạc được sản xuất từ các chiết xuất của lá Trà hoa vàng có tác dụng kháng khuẩn. Trong khi các tác dụng quý báu của Trà hoa vàng đã được biết đến và đóng vai trò là chất khử và chất ổn định, từ đó kết hợp với phương pháp điện hóa để tạo ra chế phẩm (nano bạc) có tác dụng kháng khuẩn tốt.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm khắc phục các nhược điểm nêu trên, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn từ cao chiết nước lá Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) bằng phương pháp điện hóa. Quy trình theo sáng chế cho phép tạo ra chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn bằng phương pháp điện hóa có kích thước nano mét, độ ổn định và hình thái thích hợp để có thể hoạt động ổn định trong thời gian dài.

Theo đó, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn từ cao chiết nước lá Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) bằng phương pháp điện hóa, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hái lá Trà hoa vàng, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, cắt nhỏ, sau đó sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng 40-50°C và xay nhỏ thành bột đến kích thước 2-3mm thu được nguyên liệu dạng bột;

b) thu cao chiết nước bằng cách bổ sung phần bột thu được ở bước a) vào nước cất theo tỷ lệ 1/10 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết hồi lưu với thời gian chiết từ 50 đến 60 phút, sau đó dịch chiết được lọc để loại bỏ cặn, thu dịch chiết, cô quay loại bỏ nước rồi sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng 50-60°C để thu cao chiết nước sao cho có nồng độ nằm trong khoảng 29,5-30,5 g/L;

c) tạo hệ dung dịch điện phân bằng cách lắp hệ điện phân với hai thanh bạc có kích thước 1.5×15cm tại hai điện cực đặt cách nhau 3-5cm trong cốc thủy tinh chứa 200 mL nước cất thu được hệ dung dịch điện phân; và

d) thu chế phẩm bằng cách bổ sung 9-11 mL cao chiết nước thu được ở bước b) vào hệ dung dịch điện phân thu được ở bước c), để phản ứng diễn ra trong khoảng 50-

60 phút, hiệu điện thế 13-16V, nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng 35-45°C thu được chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn dạng dung dịch có màu nâu đậm.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn thu được từ quy trình theo sáng chế, trong đó các hạt có kích thước đồng đều, phân tán đồng đều trong dung dịch và đặc biệt không sử dụng bất kỳ hóa chất nào để tạo chế phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp kính hiển vi điện tử truyền qua của chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn được sản xuất bằng phương pháp điện hóa sử dụng cao chiết nước lá Trà hoa vàng làm chất khử và chất ổn định.

Hình 2 là giản đồ UV-Vis của chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn được sản xuất bằng phương pháp điện hóa sử dụng cao chiết nước lá Trà hoa vàng làm chất khử và chất ổn định.

Hình 3 là giản đồ nhiễu xạ tia X của chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn được sản xuất bằng phương pháp điện hóa sử dụng cao chiết nước lá Trà hoa vàng làm chất khử và chất ổn định.

Hình 4 là nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt tối thiểu (MBC) vi khuẩn của chế phẩm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể, tuy nhiên các phương án và các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và làm rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Sáng chế nhằm sản xuất chế phẩm bằng phương pháp điện hóa sử dụng cao chiết nước lá Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) làm chất khử và chất ổn định nhằm tạo ra chế phẩm có độ ổn định cao, thân thiện với môi trường với khả năng kháng khuẩn mạnh.

Theo đó, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) thu cao chiết nước; c) tạo hệ dung dịch điện phân; và d) thu chế phẩm.

Bản chất của phương pháp sản xuất chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn theo sáng chế là tổng hợp nano bạc trực tiếp bằng cách sử dụng cao chiết nước lá Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) làm chất khử và chất ổn định bằng phương pháp điện hóa, việc này cho phép tạo ra các hạt nano bạc có kích thước đồng đều và phân tán đều trong dung dịch, đồng thời cho phép điều chỉnh linh hoạt nồng độ nano bạc mong muốn bằng cách

thay đổi nồng độ cao chiết ban đầu và hiệu điện thế của hệ dung dịch điện phân, có thể áp dụng đồng nhất mà không phải điều chỉnh các điều kiện khác. Quy trình cho phép linh hoạt trong quá trình tạo chế phẩm.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, lá Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) được thu hái, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, cắt nhỏ, sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng 40-50°C (để tránh biến tính các chất khử và chất ổn định có trong lá Trà) và sau đó xay nhỏ thành bột đến kích thước 2-3mm thu được nguyên liệu dạng bột.

Trong bước thu cao chiết nước, bổ sung phần bột vào nước cất theo tỷ lệ 1/10 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết bột bằng thiết bị chiết hồi lưu với thời gian chiết từ 50 đến 60 phút, sau đó dịch chiết được lọc để loại bỏ cặn, thu dịch chiết, cô quay loại bỏ nước rồi sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng 50-60°C để thu được cao chiết nước sao cho có nồng độ nằm trong khoảng 29,5-30,5g/L.

Trong bước tạo hệ dung dịch điện phân, lắp hệ điện phân với hai thanh bạc có kích thước 1,5×15cm tại hai điện cực đặt cách nhau 3-5cm trong cốc thủy tinh chứa 200 mL nước cất để thu được hệ dung dịch điện phân.

Trong bước thu chế phẩm, bổ sung 9-11 mL cao chiết nước lá Trà hoa vàng vào hệ dung dịch điện phân, để phản ứng diễn ra trong khoảng 50-60 phút, hiệu điện thế 13-16V, nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng 35-45°C thu được chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn dạng dung dịch có màu nâu đậm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất chế phẩm từ cao chiết nước lá Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) bằng phương pháp điện hóa

Lá Trà hoa vàng tươi (1kg) được thu hái, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, cắt nhỏ, sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 45°C, sau đó xay nhỏ thành bột đến kích thước 2mm và thu được nguyên liệu dạng bột (300g). Phần bột này được chiết hồi lưu với 3000 mL nước cất với thời gian chiết là 60 phút. Sau khi chiết xong, dịch chiết được lọc để loại bỏ cặn, thu dịch chiết, cô quay loại bỏ nước rồi sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng 50-60°C và thu được cao chiết nước sao cho có nồng độ 30g/L. Sau đó, lắp hệ điện phân với 2 thanh bạc có kích thước 1,5×15cm đặt song song tại 2 điện cực cách nhau 4cm. Hệ điện phân được đặt trong cốc thủy tinh 500mL chứa 200mL nước cất rồi bổ sung 10mL cao chiết nước (có nồng độ 30g/L) và để phản ứng diễn ra trong 60 phút, hiệu

điện thế 15V, nhiệt độ phản ứng 40°C thu được chế phẩm dạng dung dịch có màu nâu đậm.

Ví dụ 2. Xác định đặc tính chế phẩm thu được

Để xác định đặc tính hình thái vi cấu trúc của chế phẩm thu được, tiến hành chụp ảnh hiển vi điện tử truyền qua (TEM) cho chế phẩm được sản xuất theo Ví dụ 1. Kết quả trên Hình 1 cho thấy chế phẩm chứa các hạt có dạng hình cầu với kích thước hạt trung bình là 6,00 nm.

Quá trình tổng hợp chế phẩm bằng cao chiết nước lá Trà hoa vàng được quan sát bằng phổ hấp thụ khả kiến UV-Vis trong vùng bước sóng từ 300-800nm. Cụ thể, màu sắc và phổ UV-Vis ở Hình 2 cho thấy cao chiết nước có màu vàng, chế phẩm sau tổng hợp có màu nâu đậm. Bên cạnh đó, phổ UV-Vis của cao chiết nước không có pic cực đại nằm trong vùng 300-800nm, còn trên phổ UV-Vis của chế phẩm thì có pic cực đại ở 422 nm là pic đặc trưng của hạt nano bạc.

Vì vậy dựa trên sự thay đổi màu sắc và sự xuất hiện pic đặc trưng của chế phẩm sau khi tổng hợp được có thể kết luận quy trình theo sáng chế đã tổng hợp được chế phẩm từ cao chiết nước lá Trà hoa vàng bằng phương pháp điện hóa. Các hạt nano bạc được tạo thành sẽ cộng hưởng với tần số trong vùng UV-Vis (cộng hưởng plasmon bề mặt) dẫn đến sự thay đổi màu sắc của dung dịch, đồng thời hấp thụ bước sóng cực đại trong vùng đó. Các hạt nano sẽ thể hiện một hoặc nhiều dải plasmon bề mặt tùy thuộc vào kích thước và dạng dị hướng của chúng. Các hạt nano hình cầu nhỏ thể hiện một dải plasmon bề mặt duy nhất ở bước sóng nhỏ. Trong khi các hạt nano dị hướng lớn thể hiện hai hoặc ba dải plasmon ở bước sóng dài hơn. Như vậy, sự có mặt của một cực đại hấp thụ mạnh ở 422 nm của dung dịch hạt nano bạc là do kích thước nhỏ của các hạt nano bạc hình cầu.

Để xác định cấu trúc tinh thể của chế phẩm, tiến hành xác định nhiễu xạ tia X cho chế phẩm thu được từ Ví dụ 1. Cụ thể, Hình 3 là giản đồ nhiễu xạ tia X của chế phẩm thu được từ Ví dụ 1. Các kết quả nhiễu xạ tia X trên cho thấy các pic đặc trưng xuất hiện tại các vị trí 2 θ lần lượt là 38,19°, 44,95°, 64,57° và 77,07° tương ứng với các hằng số mạng lần lượt là (110) (200), (220) và (311) là hằng số mạng tinh thể lập phương tâm mặt của nano bạc. Điều đó một lần nữa chứng tỏ rằng chế phẩm tổng hợp từ cao chiết nước lá Trà hoa vàng đã hình thành tinh thể bạc. Ngoài ra, dựa vào các hằng số mạng có thể tính được kích thước tinh thể trung bình của chế phẩm là 9,82 nm. Kết quả

nhiều xạ tia X này cũng cho thấy chế phẩm tổng hợp được không có lẫn pha tinh thể nào khác ngoài pha tinh thể của bạc và các đỉnh có cường độ rõ ràng, sắc nét. Đây là một ưu điểm lớn của quy trình khi không tạo ra vật liệu mà các pha tinh thể bị kết tụ, hay lẫn tạp chất, nghĩa là có sự tối ưu về ổn định pha tinh thể nano bạc trong dung dịch tổng hợp.

Ví dụ 3. Đánh giá hiệu quả kháng khuẩn của chế phẩm

Nguyên liệu và hóa chất

- Cao chiết nước lá Trà hoa vàng;
- Chế phẩm được tổng hợp từ Ví dụ 1;
- Các chủng vi khuẩn: tụ cầu (*Staphylococcus aureus* - ATCC 25922), vi khuẩn gây bệnh đường ruột (*Escherichia coli* - ATCC 25923);
- Thạch và canh thang dinh dưỡng;
- Đĩa petri và phiến nuôi cấy 96 giếng đã được khử trùng;
- Các vật liệu và hóa chất khác đảm bảo điều kiện phân tích.

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Thử nghiệm kháng khuẩn được thực hiện trên đĩa 96 giếng (như minh họa trong Hình 4). Đối chứng âm (không có vi khuẩn và có mẫu xét nghiệm) được sử dụng trong các giếng ở hàng A (A1-A6) và đối chứng âm tính (không có vi khuẩn và không có mẫu xét nghiệm) được sử dụng trong các giếng ở hàng A (A7-A12). Đối chứng dương (nuôi cấy vi khuẩn và không có mẫu xét nghiệm) được sử dụng trong các giếng ở hàng H (H1-H12). Mỗi giếng chứa 100 μL canh thang dinh dưỡng. 100 μL chế phẩm ở 6 nồng độ khác nhau (được đánh dấu là 2^{-2} , 2^{-3} , 2^{-4} , 2^{-5} , 2^{-6} , 2^{-7}) được thêm vào các giếng ở hàng B đến hàng D, tương ứng với độ lặp lại của thí nghiệm 3 lần. Ngoài ra, dịch chiết nước có nồng độ giảm dần được đánh dấu 2^{-2} , 2^{-3} , 2^{-4} , 2^{-5} , 2^{-6} và 2^{-7} được thêm vào các giếng ở các hàng từ E đến G. Tiếp tục thêm 100 μL 10^6 CFU/mL dung dịch vi khuẩn cho tất cả các giếng trong cột 1-12 (hàng B-H). Đĩa được ủ trong 24 giờ ở 37°C . Điểm cuối MIC là nồng độ của chế phẩm mà tại đó không thể quan sát thấy sự phát triển của vi khuẩn trong giếng. Để xác nhận giá trị MIC, độ đục trực quan của giếng được đánh giá cả trước và sau khi ủ.

Xác định nồng độ diệt tối thiểu (MBC)

Tại 3 giếng về phía trái của giếng xác định được giá trị MIC (gồm cả giếng xác định MIC), lấy 5 μ L dung dịch/giếng sau đó cấy nhỏ giọt trên bề mặt thạch được chuẩn bị trong đĩa petri (20 mL thạch/đĩa). Đánh dấu vị trí nhỏ dung dịch tương ứng với nồng độ hoạt chất đã pha loãng trong giếng của vi khuẩn. Ủ đĩa tại 37 °C và quan sát khuẩn lạc mọc sau 24 giờ để xác định giá trị MBC.

Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết nước và chế phẩm

Đối với cao chiết nước lá Trà hoa vàng, khi thử nghiệm với cả hai chủng vi khuẩn *S. aureus* - ATCC 25922 và *E. coli* - ATCC 25923 với các nồng độ tổng và pha loãng cho thấy vi khuẩn vẫn mọc bình thường sau 24 giờ nuôi cấy. Tuy nhiên, với các giếng chứng âm có cao chiết nước nhưng không cấy vi khuẩn, vẫn có độ đục và vi khuẩn vẫn mọc, trong khi chứng âm với mẫu có chế phẩm và chỉ có môi trường (không cấy vi khuẩn) vi khuẩn không mọc. Như vậy, có thể thấy rằng với mẫu cao chiết nước không có khả năng kháng khuẩn ở tất cả các nồng độ thử nghiệm.

Bảng 1. Kết quả kháng khuẩn của chế phẩm trên hai chủng vi khuẩn *S. aureus* - ATCC 25922 và *E. coli* - ATCC 25923.

STT	<i>S. aureus</i> - ATCC 25922		<i>E. coli</i> - ATCC 25923	
	MIC (μ g/mL)	MBC (μ g/mL)	MIC (μ g/mL)	MBC (μ g/mL)
Chế phẩm	89,7	358,78	44,84	89,7

Giá trị MIC được xác định tại nồng độ mẫu thử pha loãng là 89,7 μ g/mL đối với chủng vi khuẩn *S. aureus* - ATCC 25922 và 44,84 μ g/mL đối với chủng *E. coli* - ATCC 25923. Các giá trị này tương đồng ở cả 3 giếng thử nghiệm độ lặp lại. Từ giá trị MIC xác định được trên vi khuẩn, sau khi cấy trên đĩa thạch, giá trị MBC của chế phẩm nano bạc là 358,78 μ g/mL đối với chủng vi khuẩn *S. aureus* - ATCC 25922 và xác định được là 89,7 μ g/mL đối với chủng *E. coli* - ATCC 25923. Như vậy, chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn đối với 02 chủng vi khuẩn *S. aureus* - ATCC 25922 và *E. coli* - ATCC 25923.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình sản xuất chế phẩm theo sáng chế cho phép tạo ra chế phẩm chứa các hạt nano bạc có độ ổn định và kích thước là 6,00 nm. Quy trình theo sáng chế đơn giản, dễ thực hiện. Bằng kỹ thuật điện hóa, việc sử dụng cao chiết nước lá Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) làm chất khử và chất ổn định cho phép tổng hợp chế phẩm chứa các hạt nano bạc hình thành đồng đều và phân bố ổn định.

Quy trình theo sáng chế cho phép tận dụng các nguồn nguyên liệu có sẵn trong tự nhiên, tiết kiệm chi phí sản xuất, giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

Quy trình theo sáng chế cho phép dễ dàng điều chỉnh được nồng độ chế phẩm thu được bằng cách điều chỉnh nồng độ cao chiết và hiệu điện thế đặt vào hệ dung dịch điện hóa. Chế phẩm thu được được xác định có độ đồng đều về hình thái và tính chất hóa lý bề mặt để ứng dụng làm chất kháng khuẩn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn từ cao chiết nước lá Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) bằng phương pháp điện hóa, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hái lá Trà hoa vàng, loại bỏ tạp chất, rửa sạch, cắt nhỏ, sau đó sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ nằm trong khoảng 40-50°C và xay nhỏ thành bột đến kích thước 2-3mm thu được nguyên liệu dạng bột;

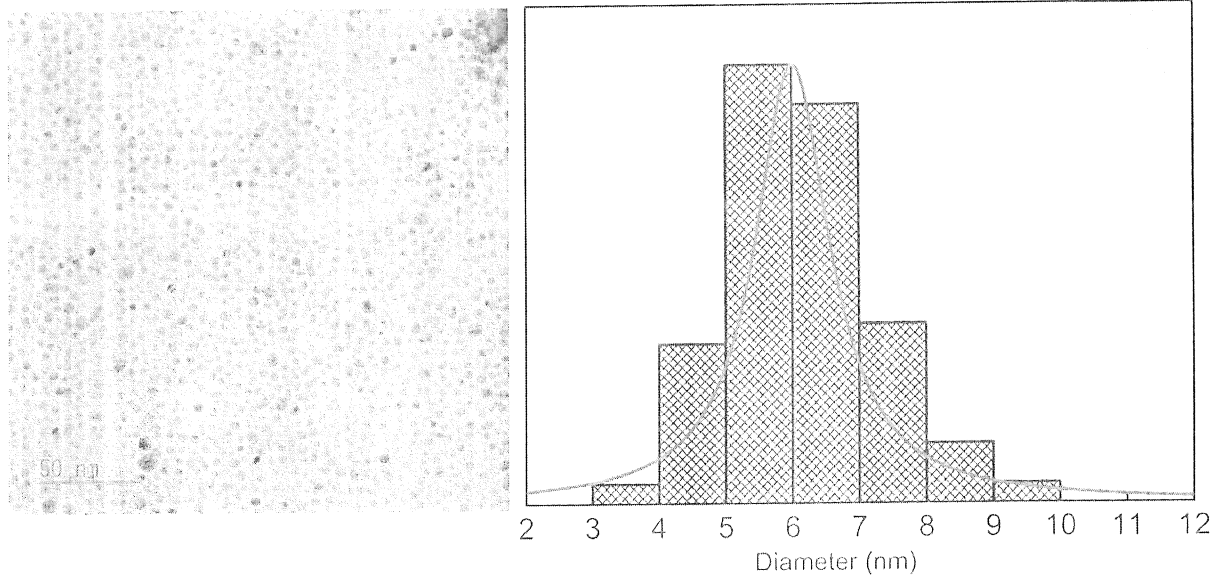
b) thu dịch chiết nước bằng cách bổ sung phần bột thu được ở bước a) vào nước cất theo tỷ lệ 1/10 (khối lượng/thể tích) và tiến hành chiết hồi lưu với thời gian chiết từ 50 đến 60 phút, sau đó dịch chiết được lọc để loại bỏ cặn, thu dịch chiết. cô quay loại bỏ nước rồi sấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng 50-60°C để thu được cao chiết nước sao cho có nồng độ nằm trong khoảng 29,5-30,5 g/L;

c) tạo hệ dung dịch điện phân bằng cách lắp hệ điện phân với hai thanh bạc có kích thước 1,5×15 cm tại hai điện cực đặt cách nhau 3-5 cm trong cốc thủy tinh chứa 200 mL nước cất thu được hệ dung dịch điện phân; và

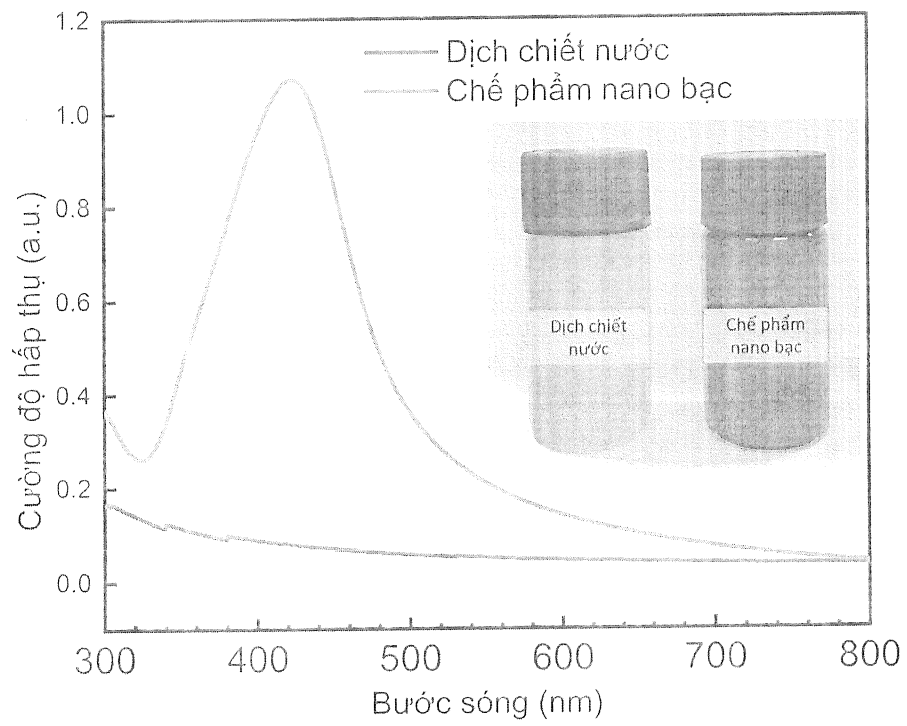
d) thu chế phẩm bằng cách bổ sung 9-11 mL dịch chiết nước thu được ở bước b) vào hệ dung dịch điện phân thu được ở bước c), để phản ứng diễn ra trong khoảng 50-60 phút, hiệu điện thế 13-16 V, nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng 35-45°C thu được chế phẩm có tác dụng kháng khuẩn dạng dung dịch có màu nâu đậm.

1/4

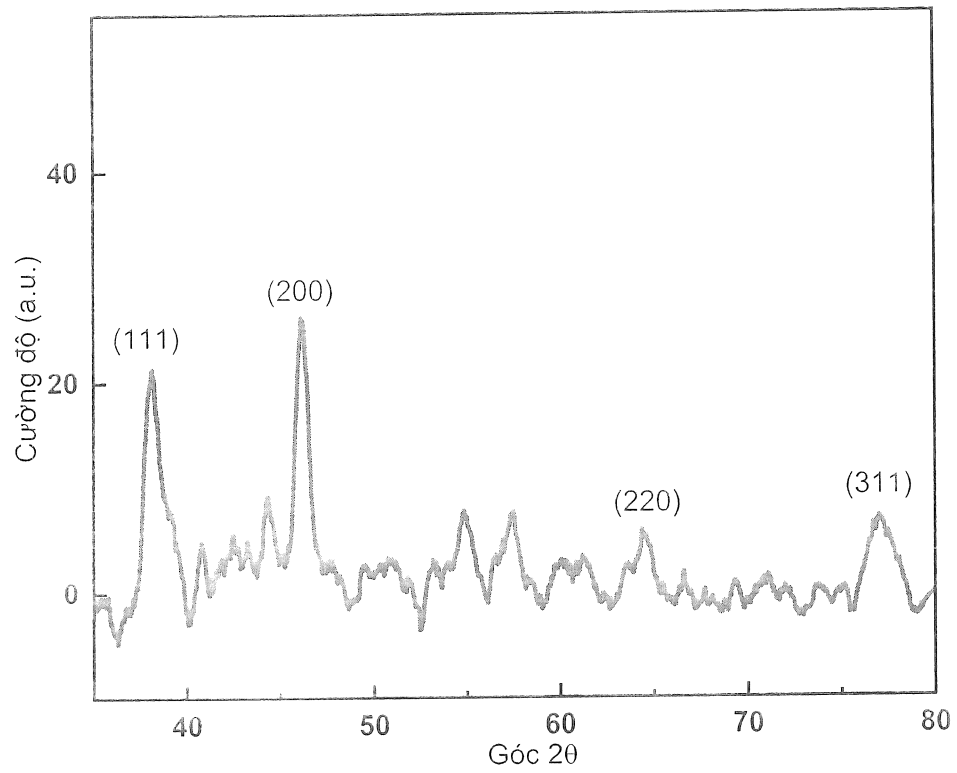
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3



4/4

HÌNH 4

