



(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)



2-0002321

(51) **A61K 9/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00111

(22) 20/09/2017

(67) 1-2017-03650

(45) 25/06/2020 387

(43) 26/04/2018 361A

(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)**

(54) **QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ VI NHỮ TƯƠNG NANO BERBERIN**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế vi nhũ tương nano berberin. Quy trình này bao gồm các bước: (i) chuẩn bị pha phân tán; (ii) chuẩn bị hỗn hợp chất mang; và phối trộn thu vi nhũ tương nano berberin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực được phẩm, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế vi nhũ tương nano berberin.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Berberin là một alkaloid được chiết xuất từ cây hoàng liên gai và cây hoàng bá. Berberin có vị đắng, tính mát, có tác dụng kháng sinh và tiêu viêm. Berberin đã được nghiên cứu nhiều trên thế giới bởi các tác dụng điều trị bệnh như chống tăng huyết áp, chống nhiễm vi khuẩn/siêu vi khuẩn, chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư, làm giảm cholesterol và chống ung thư (xem Heidarian và cộng sự năm 2014, Kwon và cộng sự năm 2015, Tan và cộng sự năm 2015). Hiện nay có 17 nghiên cứu lâm sàng đã đăng ký nghiên cứu về berberin (xem www.clinicaltrials.org). Năm 2014, tại châu Âu berberin đã được đưa vào thử nghiệm lâm sàng với liều 1000 -1500 mg mỗi ngày trong việc điều trị bệnh đái tháo đường và cải thiện chuyển hóa lipid (Derosa và Maffioli năm 2014). Tác giả Seyed Hasan Ayati và các đồng tác giả trong nghiên cứu “Regulatory effects of berberine on microsome in Cancer and other conditions” đã chỉ ra tác dụng tiềm năng của berberin trong việc điều trị bệnh như bệnh u xơ, bệnh đa u xơ, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú và bệnh u não. Tuy nhiên, berberin có khả năng tan trong nước hạn chế nên sinh khả dụng của berberin khá thấp (dưới 5%). 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 với sự phát triển của nền khoa học thế giới, việc nano hóa hợp chất thiên nhiên có hoạt tính cao tạo hệ dẫn thuốc nano là bước tiến vượt bậc trong công nghệ. 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 ung thư nhiều hơn là tại các mô bình thường. Lý do là 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 ung thư. Phân tử thuốc tự do, khi không được bao bọc bởi polyme có thể đi xuyên vách qua sự thẩm thấu và khuếch tán tự nhiên, tác dụng và hủy diệt các tế bào lành lẫn tế bào ung thư. Nhưng khi thuốc bị 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 khối u ung thư thực hiện chức năng nhả thuốc, tiêu diệt tế bào ung thư. Như vậy, nhờ hiệu ứng EPR các hệ dẫn thuốc nano được vận chuyển một cách hướng đích đến tế bào ung thư và tiêu diệt chúng một cách chọn lọc, hiệu quả và tiết kiệm dược chất. Tại Việt Nam, công nghệ nano ứng dụng trong lĩnh vực sinh học và y học vẫn còn khá mới mẻ, nhưng đã thu hút được sự quan tâm nghiên cứu đặc biệt. Những nghiên cứu này tập trung phần lớn theo hướng vận chuyển thuốc đến các tế bào bệnh ở mức phân tử, trong đó, việc tận dụng hạt nano làm “vận tải” trong việc mang thuốc và nhả thuốc đúng “địa chỉ” trở thành hướng nghiên cứu “nóng” trong nghiên cứu phát triển thuốc chống ung thư thế hệ mới.

Manisha Khemani và các đồng tác giả trong nghiên cứu “Encapsulation of Berberine in Nano-Sized PLGA Synthesized by Emulsification Method” mô tả quy trình điều chế vi nhũ tương nano berberin ở dạng lỏng nhằm tăng sinh khả dụng của hoạt tính berberin.

Wen Tan và cộng sự đã nghiên cứu quy trình điều chế hạt nano berberin hydroclorit được sử dụng để điều trị bệnh ung thư.

Chandraiah Godugu và các đồng tác giả trong nghiên cứu “Approaches to Improve the Oral Bioavailability and Effects of Novel Anticancer Drugs Berberine and Betulinic Acid” mô tả phương pháp tăng tính sinh khả dụng của berberin và betulinic, đồng thời khảo sát ảnh hưởng đến tác dụng điều trị bệnh ung thư.

Các quy trình nói trên tạo ra các hạt tiểu phân berberin có kích thước lớn từ 1000 – 5000nm, nên hiệu quả hòa tan berberin trong nước chưa cao.

Vì vậy, việc nghiên cứu quy trình điều chế vi nhũ tương có các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ hơn 100nm, đồng đều, khả năng hòa tan tốt hơn trong nước và vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính của berberin là rất cần thiết.

Bản chất kỹ thuật giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là làm tăng tính sinh khả dụng của hoạt chất berberin. Để đạt được mục đích này, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình điều chế vi nhũ tương nano berberin bằng cách tạo ra các hạt tiểu phân có kích thước nhỏ hơn 100nm.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình điều chế vi nhũ tương nano berberin bao gồm các bước:

(i) Chuẩn bị pha phân tán bằng cách hòa tan berberin trong dung môi etanol theo tỷ lệ khối lượng berberin/thể tích etanol là 6/10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 600 vòng/phút và ở nhiệt độ phòng trong thời gian 12 giờ thu được pha phân tán;

(ii) Chuẩn bị hỗn hợp chất mang bằng cách phân tán đều lactit vào PEG 1000 (polyethylen glycol) theo tỷ lệ thể tích lactit/PEG 1000 là 3/1 với xúc tác Tin(II)-ethylhexanoat thu hỗn hợp chất mang; và

(iii) Phối trộn thu vi nhũ tương nano berberin bằng cách phối trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang, Tween 80 và nước theo tỷ lệ thể tích pha phân tán/hỗn hợp chất mang/Tween 80/nước là 1/7/2/1, khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong thời gian 5 giờ, để qua đêm, sau đó ly tâm ở tốc độ 400 vòng/phút trong thời gian 20 phút, lặp lại ly tâm 5 lần thu vi nhũ tương nano berberin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình vẽ công thức của berberin.

Hình 2 là hình vẽ kết quả đo HR-TEM.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết giải pháp hữu ích để làm rõ các

phương án thực hiện chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Đã biết berberin thường bị phá hủy trong đường tiêu hóa, chỉ một phần nhỏ (dưới 5%) được hấp thu vào cơ thể, phần còn lại bị đào thải ra ngoài môi trường. Chính vì thế việc điều chế hệ nhũ tương có các hạt tiểu phân có chứa hoạt chất berberin với kích thước nhỏ có màng bao sinh học, không kết dính có tính ổn định và độ hòa tan cao.

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế vi nhũ tương nano berberin bao gồm các bước:

(i) Chuẩn bị pha phân tán

Hòa tan berberin trong dung môi etanol theo tỷ lệ khối lượng berberin/thể tích etanol là 6/10, sau đó khuấy với tốc độ không đổi từ 500 đến 600 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong thời gian 12 tiếng tạo thành dung dịch đồng nhất.

Việc sử dụng dung môi etanol có gốc (OH^-) tạo liên kết với nước có tác dụng ổn định cấu trúc vi nhũ tương dầu trong nước.

(ii) Chuẩn bị hỗn hợp chất mang

Hỗn hợp chất mang thu được bằng cách phân tán đều lactit vào PEG 1000 (polyetylen glycol) theo tỷ lệ thể tích lactit/PEG 1000 là 3/1 với xúc tác Tin(II)-etylhexanoat.

(iii) Phối trộn thu vi nhũ tương nano berberin

Phối trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang, Tween 80 và nước theo tỷ lệ thể tích pha phân tán/hỗn hợp chất mang/Tween 80/nước là 1/7/2/1, khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong thời gian 5 giờ, để qua đêm, sau đó ly tâm ở tốc độ 400 vòng/phút trong thời gian 20 phút, lặp lại ly tâm 5 lần thu vi nhũ tương nano berberin.

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 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:

Bảng 1

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

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Quy trình điều chế 400 ml vi nhũ tương nano berberin được thực hiện như sau:

Hòa tan 60 gam berberin trong 100 ml dung môi etanol bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 600 vòng/phút và ở nhiệt độ phòng trong thời gian 12 giờ thu được 50ml pha phân tán. Tiếp theo, phân tán đều 300 ml lactit vào 100 ml PEG 1000 với xúc tác Tin(II)2-etylhexanoat thu được 350 ml hỗn hợp chất mang. Phối trộn 50 ml pha phân tán, 350 ml hỗn hợp chất mang, 100 ml Tween 80 và 50 ml nước, khuấy ở tốc độ từ 500 đến 700 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong thời gian 5 giờ, để qua đêm, sau đó ly tâm với tốc độ 400 vòng/phút trong thời gian 20 phút, lặp lại ly tâm 5 lần thu được 400 ml vi nhũ tương nano berberin.

Vi nhũ tương nano berberin thu được tiến hành kiểm tra với các phương pháp phân tích thu được kết quả sau:

- Kết quả đo HR-TEM

Ảnh đo HR-TEM cho thấy các tiểu phân được nano hóa có dạng hình cầu, nằm phân bố đều từng cụm nhỏ, kích thước 5 -10 nm.

- Chỉ tiêu kỹ thuật và kết quả phân tích chỉ tiêu kỹ thuật được thể hiện ở bảng 1

Bảng 1. Kết quả phân tích chỉ tiêu kỹ thuật

a. Các chỉ tiêu cảm quan:

Stt	Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1	Trạng thái	Dạng dung dịch sệt có độ nhớt cao
2	Màu sắc	Màu vàng nâu đậm sẫm
3	Mùi, vị	Không mùi ôi mốc, vị đắng

b. Chỉ tiêu chất lượng chủ yếu

Stt	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức công bố
1	pH	-	7,0 -9,0
2	Tỷ trọng	g/ml	1,0 - 1,2
3	Cacbonhydrat	g/100g	85 - 95
4	Độ ẩm	g/100g	4,0 - 5,5

c. Các chỉ tiêu vi sinh vật:

Stt	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức tối đa
1	TSVSVHK	CFU/g	0,0
2	<i>E.coli</i>	CFU/g	0,0
3	<i>Cl. Perfringens</i>	CFU/g	0,0
4	Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc	CFU/g	0,0

d. Hàm lượng kim loại nặng

Stt	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả kiểm nghiệm
1	Cd (Cadimi)	mg/kg	0,009
2	Pb (Chì)	mg/kg	0,042

e. Hàm lượng hóa chất không mong muốn

Stt	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả kiểm nghiệm
1	Hàm lượng Aflatoxin B1	µg/kg	KPH
2	Hàm lượng Aflatoxin B1B2G1G2	µg/kg	KPH

KPH – Không phát hiện (dưới ngưỡng phát hiện của phương pháp thử LOD)

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

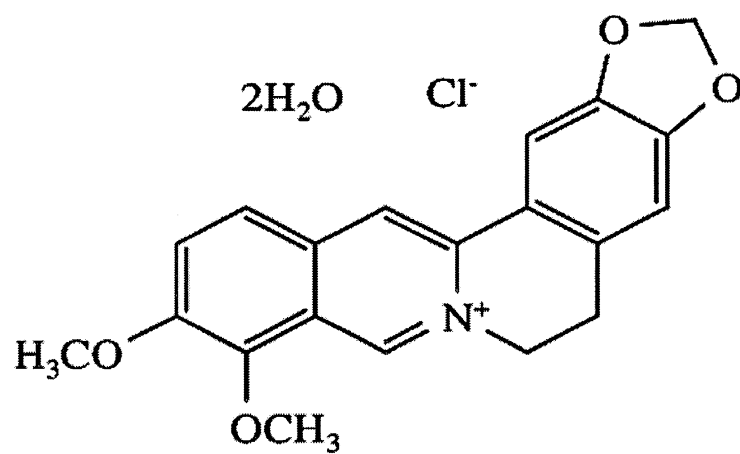
Quy trình điều chế vi nhũ tương nano berberin tạo ra vi nhũ tương nano berberin có các hạt tiểu phân chứa nano berberin có kích thước từ 5-10 nm, đồng đều và khả năng hòa tan tốt trong nước và vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính của berberin trong quá trình nano hóa.

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

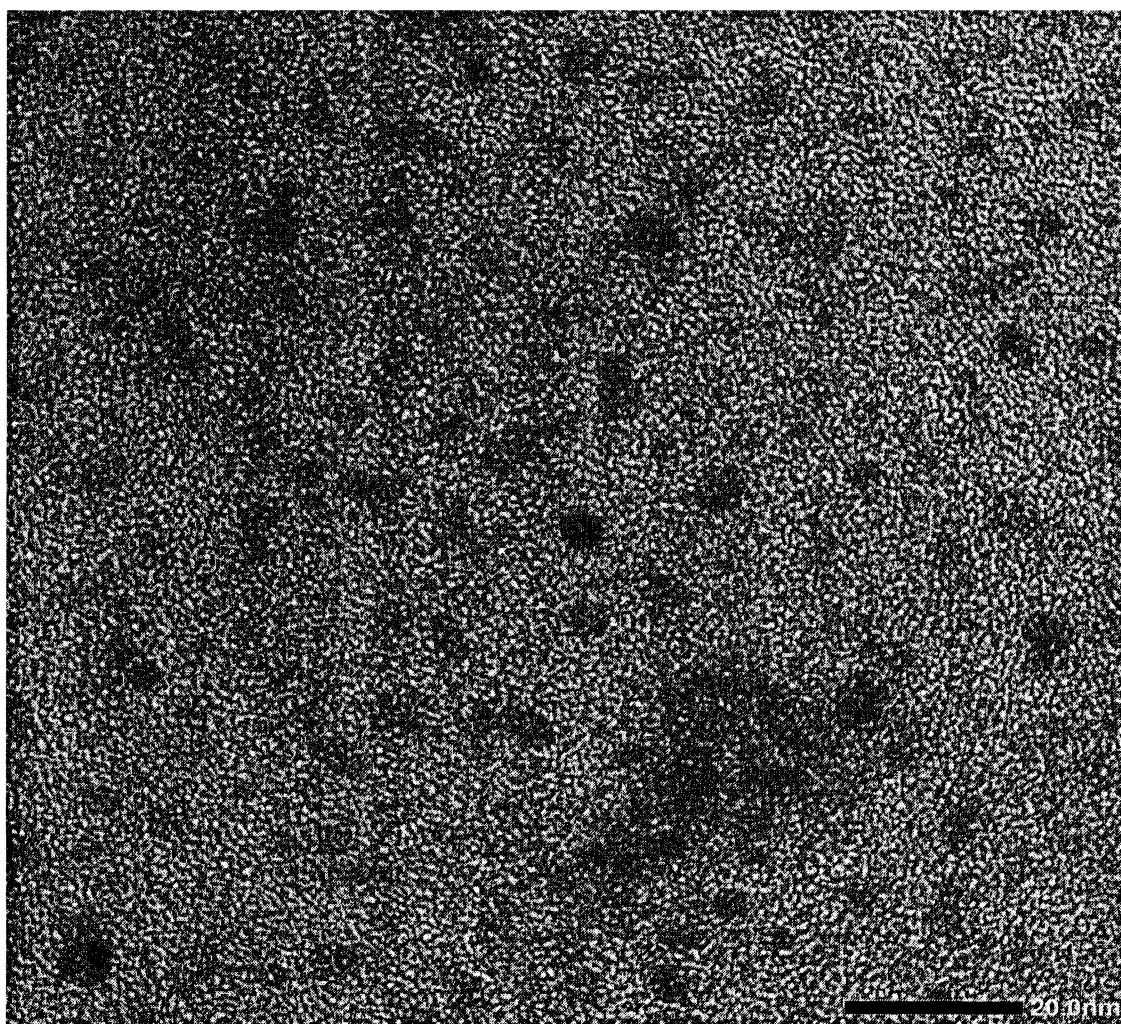
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình điều chế vi nhũ tương nano berberin bao gồm các bước:

- (i) Chuẩn bị pha phân tán bằng cách hòa tan berberin trong dung môi etanol theo tỷ lệ khối lượng berberin/thể tích etanol là 6/10 bằng máy khuấy có tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 600 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong thời gian 12 giờ thu được pha phân tán;
- (ii) Chuẩn bị hỗn hợp chất mang bằng cách phân tán đều lactit vào PEG 1000 (polyetylen glycol) theo tỷ lệ thể tích lactit/PEG 1000 là 3/1 với xúc tác Tin(II)2-ethylhexanoat thu hỗn hợp chất mang; và
- (iii) Phối trộn thu vi nhũ tương nano berberin bằng cách phối trộn pha phân tán, hỗn hợp chất mang, Tween 80 và nước theo tỷ lệ thể tích pha phân tán/hỗn hợp chất mang/Tween 80/nước là 1/7/2/1, khuấy ở tốc độ nằm trong khoảng từ 500 đến 700 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong thời gian 5 giờ, để qua đêm, sau đó ly tâm ở tốc độ 400 vòng/phút trong thời gian 20 phút, lặp lại ly tâm 5 lần thu vi nhũ tương nano berberin.



Hình 1



Hình 2