



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0039395

(51)^{2020.01} A61K 31/00; A61K 9/10; A61K 9/14; (13) B
A61K 9/00

(21) 1-2020-06982

(22) 02/12/2020

(45) 25/04/2024 433

(43) 27/06/2022 411

(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 HỆ TỰ VI NHŨ NANO FISETIN

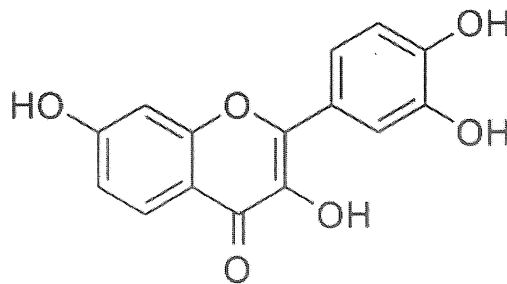
(57) Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế hệ tự vi nhũ nano fisetin, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị dung dịch fisetin; b) chuẩn bị hỗn hợp chất mang pluronic/gelucire; c) tạo hỗn hợp chất mang và chất tan fisetin/pluronic/gelucire; d) loại dung môi etanol bằng thiết bị hút chân không; e) tạo hỗn hợp đồng nhất giữa hỗn hợp chất mang pluronic/gelucire, chất tan fisetin với chất tạo nhũ lexitin; f) đồng hóa tạo hỗn hợp tự vi nhũ nano fisetin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế hệ tự vi nhũ nano fisetin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavon) là một loại flavonoid tự nhiên, được tìm thấy trong một số loại rau, quả, hạt như nho, táo, dâu tây, dưa chuột, v.v.



Fisetin

Các nghiên cứu cho thấy fisetin có rất nhiều tính chất sinh học đáng quý như chống oxy hóa, chống viêm, ức chế tế bào ung thư. Một nghiên cứu về tác dụng chống oxy hóa của fisetin ở gan chuột bị tiểu đường đã được Gopalan Sriram Prasath và các cộng sự thực hiện. Công bố trên bài “Fisetin, a tetra hydroxy flavone recuperates antioxidant status and protects hepatocellular ultrastructure from hyperglycemia mediated oxidative stress in streptozotocin induced experimental diabetes in rats” (2013) đã chứng tỏ fisetin có tác dụng chống oxy hóa ở tế bào gan giúp giảm lượng đường và tăng lượng insulin trong huyết tương của chuột bị tiểu đường. Liều thí nghiệm đã được thử nghiệm là 10 mg/1kg khối lượng cơ thể/1 ngày.

J.Sathiyapriya và các cộng sự đã nghiên cứu tác dụng của fisetin trong quá trình ức chế tế bào ung thư da trên chuột. Kết quả trên bài “Chemopreventive and antioxidant efficacy of fisetin in experimental oral carcinogenesis” (2013) công bố fisetin với liều dùng 10mg/1kg trọng lượng cơ thể/1 ngày đã ngăn chặn sự phát triển khối u.

Tác dụng chống ung thư của fisetin cũng đã được nghiên cứu nhiều trong các thí nghiệm *in-vitro*. Trong đó, thí nghiệm chống phá hủy tế bào phổi của fisetin dưới tác động của tia gamma và các chất oxy hóa như H₂O₂ đã được Kang và các cộng sự công bố trên bài “Fisetin attenuates hydrogen peroxide-induced cell damage by scavenging reactive oxygen species and activating protective functions of cellular glutathione system (2014). Nghiên cứu đã làm sáng tỏ khả năng của fisetin là chống lại sự peroxy hóa màng lipid, bảo vệ sự tổn thương DNA và quá trình cacbon hóa protein dưới tác động phá hủy của H₂O₂ và tia gamma.

Từ các tài liệu nghiên cứu tổng hợp được có thể thấy fisetin là một hợp chất thiên nhiên quý giá, có khả năng hỗ trợ điều trị một số bệnh như ung thư, tiểu đường, các bệnh liên qua đến sự rối loạn do lão hóa dây thần kinh và sự tổn thương não. Tuy nhiên, nếu sử dụng fisetin qua đường uống thì khả năng sinh khả dụng của nó rất thấp do tính tan trong nước kém (10,45 µg/mL). Chính vì vậy, để giải quyết vấn đề hóa tan kém của fisetin đã có nhiều nghiên cứu chuyển hóa fistein thành dạng chế phẩm tan tốt trong nước. Hiện nay, các nghiên cứu thường tập trung chuyển hóa các dược chất kém tan thành các dạng nano. Dưới kích thước nano các dược chất có khả năng tan tốt trong nước, độ đồng nhất, phân tán cao, khả năng phân bố trong tĩnh mạch tốt.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu công bố quy trình chuyển hóa fisetin thành các dạng nano khác nhau. Trong đó, tác giả Park Sang-Jae đã đưa ra quy trình tạo bột nano polysaccharid fistein bằng phương pháp kết tủa và sấy chân không. Giải pháp này đã được công bố trong sáng chế “Method for producing an extract of rhus verniciflua stokes containing a high concentration of nano sized fisetin with enhanced water solubility and anti-cancer drug composition thereof” (2018). Ưu điểm của phương pháp này là đơn giản, tạo được chế phẩm fisetin có hàm lượng cao, tuy nhiên thời gian chuyển hóa fisetin trong hệ thống tuần hoàn chậm.

Tác giả Merio Sechi và các cộng sự đã sử dụng phương pháp tạo hạt nano polymer để bao gói fisetin. Trong bài “Nanoencapsulation of dietary flavonoid fisetin: Formulation

and *in vitro* antioxidant and α -glucosidase inhibition activities” fisetin được giữ trong các hạt nano polymer Poly-(ϵ -caprolactone) (PCL) và PLGA-PEG-COOH. Phương pháp này tạo ra các hạt polymer có kích thước từ 140 nm đến 200 nm, chứa 70-80% fisetin. Các hạt nano polymer bao bọc fisetin bảo vệ khỏi các tác nhân oxy hóa làm biến đổi hoạt tính sinh học của nó, làm tăng khả năng hấp thụ qua thành ruột. Tuy nhiên, do bị bao gói trong các hạt nano polymer, nên thời gian phân giải fisetin lâu với hàm lượng thấp.

Một phương pháp khác nhằm tăng khả năng hòa tan của fisetin đã được NoratiqahMohtar và các cộng sự thực hiện đó là tạo phức hợp fisetin với Sulfobutylether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD). Kết quả đã được công bố trên bài “Novel water-soluble fisetin/cyclodextrins inclusion complexes: Preparation, characterization, molecular docking and bioavailability” (2015). Với phương pháp này, chế phẩm tạo thành có hàm lượng fisetin cao, có khả năng tan tốt trong nước nhưng hoạt tính của chế phẩm sẽ bị ảnh hưởng, thời gian hấp thụ chậm.

Theo tìm hiểu của tác giả, hiện nay có rất nhiều phương pháp tạo các chế phẩm fisetin dạng nano có khả năng hấp thụ tốt qua đường tiêu hóa. Các nghiên cứu đã nêu trên đều có những ưu nhược điểm riêng và điểm hạn chế chung của các nghiên cứu trên là khả năng phân bố và hấp thụ của các chế phẩm tạo thành còn thấp. Vì vậy, sáng chế này sẽ đưa ra quy trình tạo chế phẩm nano fisetin đơn giản mà tính sinh khả dụng của chế phẩm cao. Hơn nữa, ở Việt Nam hiện chưa có nghiên cứu tạo chế phẩm fisetin dạng nano được công bố. Nên quy trình được đề cập trong sáng chế là tạo ra hệ tự vi nhũ nano fisetin có độ tan cao, cải thiện tính thấm qua màng tế bào, hoạt tính ổn định, độ bền hệ vi nhũ tương cao. Vi nhũ tương là một hệ phân tán có kích thước hạt từ 10 nm đến 100 nm, có độ trong suốt cao, bền nhiệt động học, phân tán tốt trong nước và dầu, đồng thời giữ được hoạt tính của chất phân tán trong thời gian khá dài. Với những ưu điểm trên, phương pháp điều chế hệ tự vi nhũ hiện đang được ứng dụng trong công nghệ thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế đề xuất quy trình chế tạo sản phẩm fisetin có độ tan cao, cải thiện tính thấm qua màng tế bào, hoạt tính ổn định, độ bền hệ vi nhũ tương cao.

Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hệ tự vi nhũ nano fisetin như sau:

a) chuẩn bị dung dịch fisetin bằng cách hòa tan một lượng fisetin vào dung môi etanol theo tỷ lệ là 1:20 (g/mL) kết hợp rung siêu âm cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất;

b) chuẩn bị hỗn hợp chất mang pluronic/gelucire bằng cách trộn pluronic[®]L 62 với gelucire 48/16 với tỷ lệ pluronic:gelucire là 2:3 (g/g) trên máy khuấy với tốc độ 400 vòng/phút, ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 30 phút;

c) tạo hỗn hợp chất mang và chất tan bằng cách cho từ từ dung dịch fisetin vào hỗn hợp chất mang pluronic/gelucire theo tỷ lệ chất tan/chất mang là 1:3 (mL/g) trên máy khuấy với tốc độ 600 vòng/phút, ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 60 phút;

d) loại bỏ dung môi etanol trong hỗn hợp fisetin/pluronic/gelucire bằng thiết bị cô quay chân không ở nhiệt độ 60°C, trong 60 phút;

e) tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn hỗn hợp fisetin/pluronic/gelucire với chất tạo nhũ lexitin sao cho các chất tạo thành hỗn hợp đồng nhất với tỷ lệ hỗn hợp chất mang, chất tan fisetin/pluronic/gelucire với chất tạo nhũ là 3:1 (g/g) trên máy khuấy với tốc độ 600 vòng/phút, ở nhiệt độ 40°C, trong thời gian 90 phút; và

f) hỗn hợp thu được ở bước e được để qua đêm, ở nhiệt độ phòng, sau đó được đồng hóa với tốc độ 2000 vòng/ phút và lặp lại 5 lần để thu được hệ tự vi nhũ nano fisetin.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh và kích thước tiểu phân fisetin chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua có độ phân giải cao (HR-TEM).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết các phương án cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết sáng chế, chứ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế hệ tự vi nhũ nano fisetin, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị dung dịch fisetin bằng cách hòa tan một lượng fisetin vào dung môi etanol theo tỷ lệ là 1:20 (g/mL) kết hợp rung siêu âm cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất.

Dung môi etanol là một chất dễ bay hơi, hòa tan tốt fisetin và đã được sử dụng nhiều trong ngành thực phẩm, dược phẩm. Vì vậy, đây là dung môi an toàn thích hợp để tạo dung dịch fisetin. Tỷ lệ hòa tan phù hợp theo tính toán để đạt được chế phẩm có hàm lượng mong muốn là 1 g fisetin trong 20 g etanol;

b) chuẩn bị hỗn hợp chất mang pluronic/gelucire bằng cách trộn pluronic[®]L 62 với gelucire 48/16 với tỷ lệ pluronic:gelucire là 2:3 (g/g) trên máy khuấy với tốc độ 400 vòng/phút, ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 30 phút.

Pluronic là polyme đồng trùng hợp PEO – PPO – PEO của poly (ethylene oxide) (PEO) và poly (propylene oxide) (PPO). Đây là một polyme tổng hợp không độc, không thể hiện tính kháng nguyên, có hệ số phân bố dầu nước thích hợp. Pluronic đã được được điển các nước công nhận làm tá dược cho nhiều dạng thuốc khác nhau như dạng uống và dùng trên da. Gelucire là hợp chất có nguồn gốc từ hỗn hợp mono , di và triglyceride với các este PEG với axit béo. Gelucire có rất nhiều ứng dụng ở dạng uống và dạng bôi. Các ứng dụng của công thức thuốc uống bao gồm tăng cường khả năng hòa tan và sinh khả dụng, giải phóng thuốc duy trì, che mùi vị và bảo vệ thành phần dược hoạt tính (API) khỏi oxy, ánh sáng và độ ẩm. Tỷ lệ pluronic/gelucire đã được thử nghiệm để tạt ra hỗn hợp chất mang có chỉ số HLB thích hợp;

c) tạo hỗn hợp chất mang và chất tan bằng cách cho từ từ dung dịch fisetin vào hỗn hợp chất mang pluronic/gelucire theo tỷ lệ chất tan/chất mang là 1:3 (mL/g) trên máy khuấy với tốc độ 600 vòng/phút, ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 60 phút.

Để tạo hỗn hợp chất tan và chất mang với tỷ lệ thích hợp, các thí nghiệm đã được thực hiện. Kết quả với tỷ lệ chất tan fisetin và hỗn hợp chất mang là 1:3 hỗn hợp được chất có khả năng hòa tan tốt trong nước và có tính ổn định cao;

d) loại bỏ dung môi etanol trong hỗn hợp fisetin/pluronic/gelucire bằng thiết bị cô quay chân không ở nhiệt độ 60°C, trong 60 phút;

e) tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn hỗn hợp fisetin/pluronic/gelucire với chất tạo nhũ lexitin sao cho các chất tạo thành hỗn hợp đồng nhất với tỷ lệ hỗn hợp chất mang và chất tan fisetin/pluronic/gelucire với chất tạo nhũ là 3:1 (g/g) trên máy khuấy với tốc độ 600 vòng/phút, ở nhiệt độ 40°C, trong thời gian 90 phút.

Lexitin được tinh chế từ đậu nành có chứa một lượng lớn phospholipid, có tính chống oxy hóa cao. Ngoài ra, lexitin còn có tác dụng tăng cường quá trình hấp thụ các chất béo, môi trường hòa tan tốt các vitamin; và

f) hỗn hợp thu được ở bước e được để qua đêm, ở nhiệt độ phòng, sau đó được đồng hóa với tốc độ 2000 vòng/ phút và lặp lại 5 lần để thu được hệ tự vi nhũ nano fisetin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chế tạo 100 g hệ tự vi nhũ nano fisetin

Chuẩn bị dung dịch fisetin bằng cách hòa tan 2 g fisetin vào 40 mL dung môi etanol kết hợp rung siêu âm cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất;

Chuẩn bị hỗn hợp chất mang pluronic/gelucire bằng cách trộn 50 g pluronic[®]L 62 với 75g gelucire 48/16 trên máy khuấy với tốc độ 400 vòng/phút, ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 30 phút;

Tạo hỗn hợp chất mang và chất tan bằng cách cho từ từ 40 mL dung dịch fisetin vào 120 g hỗn hợp chất mang pluronic/gelucire trên máy khuấy với tốc độ 600 vòng/phút, ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 60 phút;

Loại bỏ dung môi etanol trong hỗn hợp fisetin/pluronic/gelucire bằng thiết bị cô quay chân không ở nhiệt độ 60°C, trong 60 phút;

Tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn 90 g hỗn hợp fisetin/pluronic/gelucire với 10g chất tạo nhũ lexitin sao cho các chất tạo thành hỗn hợp đồng nhất trên máy khuấy với tốc độ 600 vòng/phút, ở nhiệt độ 40°C, trong thời gian 90 phút; và

Hỗn hợp đồng nhất được để qua đêm, ở nhiệt độ phòng, sau đó được đồng hóa với tốc độ 2000 vòng/ phút và lặp lại 5 lần để thu được hệ tự vi nhũ nano fisetin.

Ví dụ 2: Đặc tính của hệ tự vi nhũ nano fisetin

Tiến hành thí nghiệm như phần mô tả chi tiết sáng chế ở trên. Sản phẩm tạo thành được tiến hành kiểm tra với các phương pháp phân tích hiện đại. Kết quả phân tích như sau:

1. Kết quả đo HR-TEM

Ảnh đo TEM với độ phân giải cao cho thấy các tiểu phân hạt nano fisetin tồn tại ở dạng tập hợp khối kích thước khoảng 10-20 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.

2. Kết quả phân tích hàm lượng

Hàm lượng của fisetin trong mẫu được đo bằng HPLC. Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng fisetin trong mẫu phân tích đạt 6,96 %.

3. Kết quả phân tích chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật

Mẫu nano fisetin sau khi chế tạo được đi kiểm nghiệm các tiêu chuẩn về vi sinh vật và hóa lý. Kết quả kiểm nghiệm được thể hiện trong bảng dưới đây:

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
10.1	Tổng vi sinh vật hiếu khí	CFU/mL	ISO 4833-1:2013	KPH (LOD:1 CFU/mL)
10.2	<i>Cl. Perfringens</i>	CFU/mL	TCVN 4991:2005	KPH (LOD:1 CFU/mL)
10.3	Coliforms	CFU/mL	TCVN 6848:2007	KPH (LOD:1 CFU/mL)
10.4	<i>E. coli</i>	CFU/mL	TCVN 7924 -2:2008	KPH (LOD:1CFU/mL)
10.5	Tổng số bào tử nấm men-mốc		TCVN 8275-1:2010	KPH (LOD:1 CFU/mL)
10.6	Hàm lượng Cadmi	mg/kg	H.HD.QT.429(ICP-MS)	KPH (LOD:0,004 mg/kg)
10.7	Hàm lượng Chì	mg/kg	H.HD.QT.429(ICP-MS)	0.037
10.8	Độ pH	-	H.HD.QT.070	7,29
10.9	Tỷ trọng	g/mL	NIFC.05.M.197	1,076

Kết quả cho thấy, mẫu fisetin chế tạo được đạt các chỉ tiêu về an toàn thực phẩm.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình điều chế hệ tự vi nhũ nano fisetin đã thành công trong việc điều chế hệ vi nhũ tương có chứa các tiểu phân nano fisetin có kích thước 10-20 nm, đồng đều và khả năng hòa tan tốt trong nước.

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

Quy trình theo sáng chế đơn giản, dễ thực hiện và phù hợp với các điều kiện thực tế hiện nay của nước ta.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình điều chế hệ tự vi nhũ nano fisetin, đặc trưng ở chỗ, quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị dung dịch fisetin bằng cách hòa tan một lượng fisetin vào dung môi etanol theo tỷ lệ là 1:20 (g/mL) kết hợp rung siêu âm cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất;

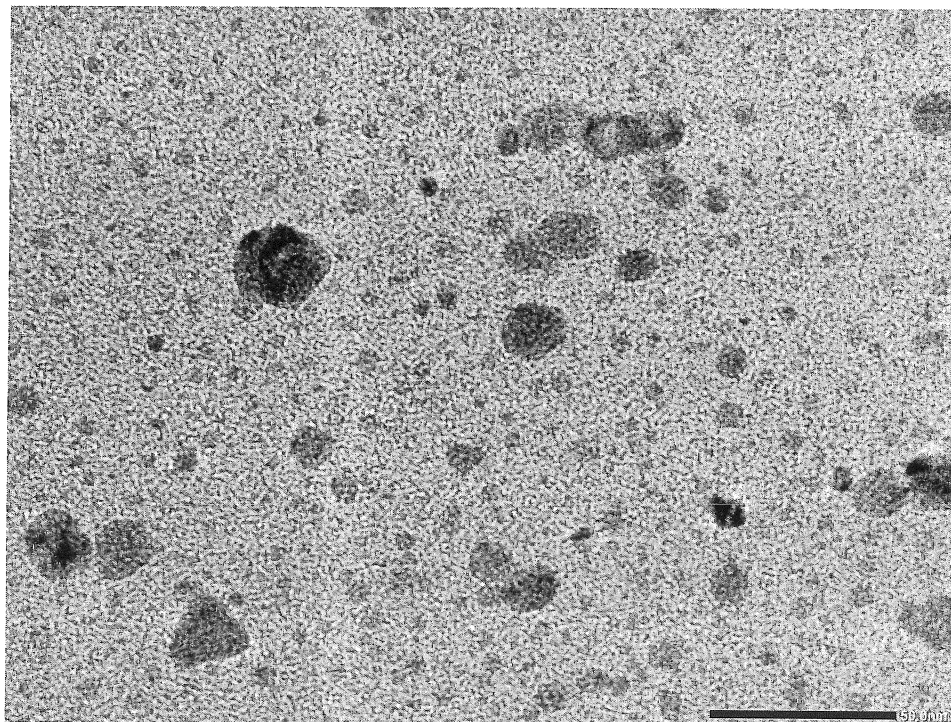
b) chuẩn bị hỗn hợp chất mang pluronic/gelucire bằng cách trộn pluronic®L 62 với gelucire 48/16 với tỷ lệ pluronic:gelucire là 2:3 (g/g) trên máy khuấy với tốc độ 400 vòng/phút, ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 30 phút;

c) tạo hỗn hợp chất mang và chất tan bằng cách cho từ từ dung dịch fisetin vào hỗn hợp chất mang pluronic/gelucire theo tỷ lệ chất tan/chất mang là 1:3 (mL/g) trên máy khuấy với tốc độ 600 vòng/phút, ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 60 phút;

d) loại bỏ dung môi etanol trong hỗn hợp fisetin/pluronic/gelucire bằng thiết bị cô quay chân không ở nhiệt độ 60°C, trong 60 phút;

e) tạo hỗn hợp đồng nhất bằng cách trộn hỗn hợp fisetin/pluronic/gelucire với chất tạo nhũ lexitin sao cho các chất tạo thành hỗn hợp đồng nhất với tỷ lệ hỗn hợp chất mang, chất tan fisetin/pluronic/gelucire với chất tạo nhũ là 3:1 (g/g) trên máy khuấy với tốc độ 600 vòng/phút, ở nhiệt độ 40°C, trong thời gian 90 phút; và

f) để hỗn hợp thu được ở bước e) qua đêm, ở nhiệt độ phòng, sau đó tiến hành đồng hóa với tốc độ 2000 vòng/ phút và lặp lại 5 lần để thu được hệ tự vi nhũ nano fisetin.



Hình 1