

Bước đầu nghiên cứu điều chế và các yếu tố ảnh hưởng đến đặc tính liposome resveratrol

Nguyễn Thị Lập*, Nguyễn Hải Nam

Trường Đại học Dược Hà Nội

*E-mail. lvknlap@yahoo.com

Summary

Regarding that resveratrol displays many health-beneficial properties and possesses a remarkably strong antioxidant activity; but its positive effects are restricted due to its poor water solubility, low absorption by oral administration, unstableness (easily converting to the less active cis-form, particularly on exposure to UV light); and to overcome these limitations, encapsulation using liposome is a good option; in this concern, liposomes are optimal carrier for the entrapment and cellular delivery of drugs as they can incorporate a lipophilic drug within the membrane bilayers to protect it from light and other degradative processes; in this study, liposomal resveratrol was prepared by reverse-phase evaporation. After preparation, liposomes were probe sonicated and then characterized by size and encapsulation efficacy. The effect of different formulation factors on the encapsulation efficiency and the particle sizes were investigated. These factors included the mole ratio of the drug to soybean phosphatidylcholine (drug/SPC), the mole ratio of cholesterol to soybean phosphatidylcholine (chol/SPC). The encapsulation efficiency of 95.66 % was obtained when using drug/SPC (1:12 mol ratio), Chol/SPC (1:5 mol ratio).

Keywords: Resveratrol, liposomes, nanotechnology, sonication.

Đặt vấn đề

Resveratrol (RES) là một polyphenol kháng độc tố tự nhiên có trong nhiều loại thực vật như: nho, dâu, đậu tương, cốt khí củ... Nhiều nghiên cứu cho thấy RES có tác dụng chống oxy hóa mạnh hơn cả vitamin E và C, bảo vệ thần kinh, chống viêm, chống ung thư...^[1]. Tuy nhiên cũng như nhiều polyphenol tự nhiên khác, RES tự do có sinh khả dụng bị hạn chế bởi độ hòa tan kém trong dịch sinh học ($< 0,001$ mol/L), khả năng hấp thu qua đường uống thấp, không ổn định và chuyển hóa thành dạng ít có hoạt tính sinh học do tác động của tia UV. Do vậy, liposome là được coi là chất mang thích hợp để khắc phục những hạn chế này do có tính thích ứng sinh học, phân hủy sinh học hoàn toàn và có thể mang cả được chất thân dầu và được chất thân nước. Hiện nay, trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu cũng như sản xuất chế phẩm liposome RES. Tuy nhiên, ở Việt Nam mới chỉ nghiên cứu tổng hợp RES bằng phương pháp hóa học, hay phân lập từ cây cốt khí củ, hiện chưa có công trình khoa học được công bố về ứng dụng liposome để làm chất mang RES. Do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục đích nhằm tạo được và

khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dược chất, tá dược trong công thức đến các đặc tính của liposome resveratrol.

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu và thiết bị

Nguyên liệu

Trans-Resveratrol được sản xuất bởi Công ty DSM Nutritional Products Ltd (Thụy Sĩ). Phosphatidylcholin đậu nành (soy phosphatidylcholin-SPC) do Công ty Avanti polar Lipids (Mỹ), cholesterol (chol) do Merck (Đức) cung cấp. Triton X-100, diethyl ether và một số hóa chất khác đạt tiêu chuẩn dùng cho phân tích.

Thiết bị

Màng polycarbonat kích thước lỗ lọc 0,4 μ m và 0,08 μ m (Whatman, Mỹ). Tủ thẩm tích MWCO: 12000-14000 Da (Spectrum Labs-Mỹ). Thiết bị siêu âm đầu dò Labsonic tần số 30 kHz (Nhật Bản). Máy quang phổ Spectro UV-VIS Double, Labomed, Inc. (Mỹ). Máy cất quay BUCHI R-210 (Thụy Sĩ). Kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) JEOL 1010 (Nhật Bản).

Phương pháp nghiên cứu

Tạo tiểu phân liposome resveratrol

Tạo các tiểu phân liposome resveratrol theo phương pháp phương pháp bốc hơi pha đảo [5], tóm tắt như sau: Hòa tan hỗn hợp phospholipid, cholesterol, RES vào diethyl ether. Bổ sung thêm đệm PBS pH 7,4, sau đó siêu âm liên tục bằng máy siêu âm cầm tay trong 5 phút, cường độ 100% để tạo nhũ tương mịn nước/dầu. Toàn bộ dịch được cất quay chân không ở 40 °C, tốc độ quay 100 vòng/phút trong 30 phút. Sau khi lớp màng mỏng lipid được tạo thành cất quay thêm 60 phút để làm bay hơi hết dung môi hữu cơ. Hỗn dịch liposome tạo thành được siêu âm gián đoạn bằng siêu âm cầm tay, cường độ 100 %, nhịp phát xung 0,6s, trong điều kiện nhiệt độ thấp (< 50° C), thời gian 5 phút. Hỗn dịch liposome sau khi siêu âm được loại RES tự do bằng phương pháp thẩm tách với màng lọc kích cỡ lỗ: COMW = 12000 – 14000 Da, trong đệm PBS pH 7,4 thẩm tách trong 18 giờ trong điều kiện nhiệt độ thấp (2 – 8 °C), thay đệm sau 2 giờ, 4 giờ và tiếp tục để thẩm tách qua đêm (lưu ý bọc giấy nhôm để tránh ánh sáng trong quá trình thẩm tách).

Khi khảo sát tỉ lệ mol RES/SPC, giữ nguyên tỉ lệ mol chol/SPC, thay đổi tỉ lệ RES/SPC còn các thông số khác thuộc quy trình bào chế không thay đổi. Tương tự, khi khảo sát tỉ lệ mol chol/SPC, giữ nguyên tỉ lệ mol RES/SPC, thay đổi tỉ lệ chol/SPC còn các thông số khác không thay đổi.

Đánh giá liposome resveratrol tạo thành

Kích thước tiểu phân, phân bố kích thước tiểu phân

Kích thước tiểu phân (KTTT), phân bố kích thước tiểu phân được xác định bằng thiết bị Zetasizer ZS90 (Anh) sau khi pha loãng hỗn dịch 200 lần bằng dung dịch NaCl 0,9 % đã lọc qua màng lọc 0,2 µm.

Đánh giá hiệu suất liposome hóa resveratrol

Nguyên tắc: Phá vỡ màng liposome bằng chất hoạt động bề mặt Triton X-100, sau đó pha loãng và tiến hành định lượng RES bằng phương pháp quang phổ UV-VIS.

Hiệu suất liposome hóa (EE %) được tính theo công thức:

$$EE \% = \frac{\text{Lượng RES được liposome hóa}}{\text{Tổng lượng RES}} \times 100 \% = \frac{A_s}{A_t} \times 100\%$$

Trong đó: Lượng RES được liposome hóa là lượng RES có trong liposome sau khi đã thẩm tách loại RES tự do. Tổng lượng RES là lượng RES có trong hỗn dịch liposome trước khi thẩm tách. A_s : Độ hấp thụ quang của mẫu sau khi thẩm tách; A_t : Độ hấp thụ quang của mẫu trước khi thẩm tách.

Định lượng RES bằng phương pháp quang phổ UV-VIS: Hòa tan 0,01 g RES trong dung dịch Triton X-100 (1%). Quét phổ hấp thụ của RES trong môi trường đệm PBS và Triton để tìm ra bước sóng hấp thụ cực đại của RES trong môi trường này (λ_{max}). Khảo sát mối tương quan giữa nồng độ RES với mật độ quang và đánh giá độ lặp lại của phương pháp. Đánh giá ảnh hưởng của tá dược đến phép định lượng.

Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft office Excel 2007 để tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn SD. Sử dụng kiểm định t-test để đánh giá sự khác nhau giữa các kết quả. Sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Kết quả

Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ mol RES/SPC trong công thức đến KTTT, PDI và hiệu suất liposome hóa

Tiến hành tạo liposome RES, trong đó có định tỉ lệ mol chol/SPC = 1/5, tỉ lệ mol RES/SPC lần lượt là 1/6; 1/9; 1/12 và 1/15 (bảng 1). Thể tích diethyl ether để hòa tan các thành phần là 30 ml, thể tích đệm PBS pH 7,4 là 10 ml. Tiến hành đánh giá KTTT, phân bố KTTT và hiệu suất liposome hóa của các mẫu. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 1: Thành phần công thức bào chế các mẫu khảo sát tỉ lệ mol RES/SPC

Tỉ lệ RES/SPC	1/6	1/9	1/12	1/15
m_{RES} (g)	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100
m_{SPC} (g)	0,2036	0,3054	0,4072	0,5090
m_{Chol} (g)	0,0203	0,0305	0,0406	0,0508

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Bảng 2: Ảnh hưởng của tỉ lệ RES/SPC đến kích thước tiểu phân (KTPP), phân bố KTPP liposome

RES/SPC	PDI	KTPP trung bình của hệ (d.nm)	Pic	KTPP trung bình mỗi pic (d.nm)	% theo thể tích	Độ rộng pic (d.nm)	Hiệu suất (EE% ± SD)
1/6	0,371	233,2	1	199,0	16,8	93,50	81,15 ± 1,29
			2	3629,0	83,2	1446,00	
			3	0,0	0,0	0,00	
1/9	0,457	256,7	1	155,9	18,4	106,40	88,11 ± 0,98
			2	3306,0	81,6	1485,0	
			3	0,0	0,0	0,00	
1/12	0,405	237,9	1	77,4	17,4	31,23	95,66 ± 1,07
			2	348,8	9,9	142,60	
			3	4922,0	72,8	888,60	
1/15	0,436	251,9	1	177,2	12,9	63,02	94,81 ± 0,91
			2	2602,0	87,1	889,50	
			3	0,0	0,0	0,00	

Kết quả thu được từ bảng 2 cho thấy khi thay đổi tỉ lệ RES/SPC và giữ nguyên tỉ lệ chol/SPC thì các mẫu thu được có kích thước tiểu phân liposome khá lớn, phân bố KTPP rộng (PDI ~ 0,4), hệ kém đồng nhất. Cả 4 tỉ lệ đều cho hiệu suất liposome hóa trên 80 %, trong đó, 2 mẫu cho hiệu suất trên 90 % (1/12 và 1/15). Tuy nhiên, khi giảm tỉ lệ RES/SPC, hiệu suất tải thuốc tăng lên từ 81,15 % (1/6) đến 88,11 % (1/9) và 95,66 % (1/12) (cao hơn có ý nghĩa thống kê so với mẫu tỉ lệ 1/9, $p < 0,05$), nhưng khi giảm xuống còn 1/15 thì hiệu suất lại giảm nhẹ còn 94,81 % (không có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$). Do đó, chúng tôi lựa

chọn tỉ lệ RES/SPC = 1/12 cho hiệu suất tải thuốc cao nhất, kích thước và PDI khá nhỏ để áp dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ mol chol/SPC trong công thức đến KTPP, PDI và hiệu suất liposome hóa

Tiếp theo, khi tạo liposome RES cố định tỉ lệ mol RES/SPC = 1/12, thay đổi tỉ lệ mol chol/SPC lần lượt là 1/2; 1/3; 1/4; 1/5 (bảng 3). Thể tích diethyl ether để hòa tan các thành phần là 30 ml, thể tích đệm PBS pH 7,4 là 10 ml. Kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 3: Thành phần công thức bào chế các mẫu khảo sát tỉ lệ mol chol/SPC

Tỉ lệ chol/SPC	1/2	1/3	1/4	1/5
$m_{\text{RES}} \text{ (g)}$	0,01	0,01	0,01	0,01
$m_{\text{SPC}} \text{ (g)}$	0,4072	0,4072	0,4072	0,4072
$m_{\text{chol}} \text{ (g)}$	0,1016	0,0677	0,0508	0,0406

Bảng 4: Ảnh hưởng của tỉ lệ chol/SPC đến kích thước tiểu phân (KTPP), phân bố KTPP liposome và hiệu suất tạo liposome

Chol/SPC	PDI	KTPP trung bình của hệ (d.nm)	Pic	KTPP trung bình mỗi pic (d.nm)	% theo thể tích	Độ rộng pic (d.nm)	Hiệu suất (EE% ± SD)
1/2	0,397	237,8	1	92,5	26,7	37,16	85,85 ± 1,74
			2	444,8	17,8	198,90	
			3	5302,0	55,5	705,10	
1/3	0,383	235,6	1	62,8	32,9	24,02	89,58 ± 0,71
			2	417,0	19,1	204,50	
			3	5103,0	48,0	843,20	
1/4	0,433	234,1	1	83,2	32,2	35,42	93,55 ± 0,74
			2	494,0	20,3	221,70	
			3	5269,0	47,4	718,30	
1/5	0,405	237,9	1	77,4	17,4	31,23	95,66 ± 1,07
			2	348,8	9,9	142,60	
			3	4922,0	72,8	888,60	

Kết quả thu được bảng 4 cho thấy liposome có kích thước khá lớn và không có sự khác biệt nhiều giữa các mẫu, phân bố KTTT chưa thật đồng đều, PDI còn khá lớn (khoảng 0,4), các mẫu đều có hiệu suất liposome hóa cao, từ hơn 85 đến hơn 95 %. Tuy nhiên, khi giảm tỉ lệ cholesterol trong mẫu, hiệu suất liposome hóa tăng khá nhiều. Mẫu có tỉ lệ cholesterol cao nhất cho hiệu suất liposome hóa thấp nhất (85,85 %). Mẫu có tỉ lệ cholesterol thấp nhất (1/5) cho hiệu suất liposome hóa cao nhất (95,66 %), cao hơn có ý nghĩa so với mẫu có tỉ lệ 1/4 ($p < 0,05$). Do đó, từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi lựa chọn công thức có tỉ lệ mol cholesterol/SPC = 1/5 cho hiệu suất liposome hóa cao nhất để dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

Bàn luận

Về phương pháp tạo liposome resveratrol

Trong số các phương pháp tạo tiểu phân liposome, bốc hơi pha đảo là một trong những phương pháp đơn giản và cho hiệu suất cao ^[5]. Phương pháp nghiên cứu này cho hiệu suất liposome hóa cao, mẫu cao nhất cho hiệu suất 95,66 % (bảng 2). So sánh với nghiên cứu của Xin Y. L. và cộng sự ^[6], cũng sử dụng phương pháp bốc hơi pha đảo cũng như phương pháp làm nhỏ kích thước tiểu phân, hiệu suất thu được là tương đồng (95 %). Trong khi đó, các phương pháp hydrat hóa màng film cho hiệu suất thấp hơn (khoảng 50%) ^[2,3]. Điều này có thể được giải thích do khi tiến hành chúng tôi đã cải tiến quy trình, tiến hành cất quay thêm 1 giờ sau khi ether bay hơi hết, vì theo Cortesi R. ether tồn dư trong chế phẩm vừa độc vừa có thể gây rò rỉ dược chất, ngoài ra chúng tôi còn tiến hành làm lạnh mẫu bằng nước đá khi siêu âm để tránh hiện tượng quá nhiệt gây oxy hóa RES ^[4]. RES rất dễ bị phân hủy bởi ánh sáng, do đó toàn bộ quá trình được tránh ánh sáng.

Về phương pháp làm nhỏ kích thước tiểu phân, chúng tôi sử dụng phương pháp siêu âm trong nghiên cứu, bởi phương pháp này đơn giản, thời gian tiến hành nhanh và không cần thiết bị quá phức tạp. Tuy nhiên, liposome thu được có kích thước tiểu phân khá lớn, phân bố kích thước tiểu phân rộng và không có sự khác biệt nhiều giữa các mẫu (bảng 2). Điều này có

thể giải thích do năng lượng siêu âm phân tán không đồng đều giữa các vị trí, trong đó các tiểu phân nằm càng gần que siêu âm thì chịu tác động lực càng lớn dẫn đến bị làm nhỏ ở mức độ lớn hơn những tiểu phân nằm xa hơn. Do vậy, cần bổ sung thêm các nghiên cứu tiếp theo so sánh phương pháp siêu âm với các phương pháp làm nhỏ kích thước tiểu phân khác như phương pháp đẩy qua màng. Tuy nhiên, giai đoạn tạo nhũ tương nước/dầu rất quan trọng. Khi thêm pha nước vào pha dung môi hữu cơ, do không trộn lẫn với nước, nên pha dung môi hữu cơ tồn tại tách riêng với pha nước, do đó cần sử dụng năng lượng siêu âm đủ lớn để tạo nhũ tương ổn định. Do vậy, chúng tôi dùng siêu âm cầm tay và siêu âm liên tục để tạo được nhũ tương đồng nhất. Nhiệt độ khi siêu âm nên được kiểm soát dưới nhiệt độ chuyển pha của lipid, vì khi ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ chuyển pha của SPC, SPC tồn tại dạng vô định hình, liên kết lỏng lẻo. Do đó, dưới năng lượng siêu âm cao có thể đẩy RES ra khỏi màng SPC kép. Ngoài ra, cả SPC và RES đều dễ bị oxy hóa, đặc biệt ở nhiệt độ cao mà quá trình siêu âm dễ gây quá nhiệt cục bộ, nên cần làm lạnh trong khi siêu âm cũng như chỉ siêu âm ngắt quãng.

Về ảnh hưởng của các yếu tố công thức bào chế tới tính chất hệ liposome tạo thành và hiệu suất tạo liposome

Phospholipid là thành phần cơ bản cấu tạo liposome, nghiên cứu này sử dụng loại phospholipid là SPC, cholesterol được thêm vào đóng vai trò ổn định màng. Khi giảm tỉ lệ RES/SPC, hiệu suất liposome hóa tăng lên, có thể giải thích do RES nằm trong màng phospholipid kép, nếu tỉ lệ RES cao vượt quá khả năng tải thuốc của liposome thì RES không được bao hết dẫn đến dư thừa và tồn tại dưới dạng hòa tan hoặc kết tủa trong môi trường nước và sẽ bị loại đi khi thẩm tách, do đó tỉ lệ thuốc được tải vào liposome so với tổng lượng RES sử dụng sẽ thấp. Khi giảm tỉ lệ RES so với SPC thì lượng RES được SPC bao gói cũng sẽ tăng đến khi toàn bộ RES được bao trong liposome thì hiệu suất này sẽ không tăng nữa, việc tăng SPC không giúp làm tăng hiệu suất liposome hóa, hơn nữa việc tăng SPC trong khi không giúp tăng hiệu suất liposome hóa cũng gây tổn kém nguyên liệu khi sản xuất quy mô lớn. Nghiên cứu này cho thấy tỉ lệ 1/12 là phù hợp

nhất, kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu trước^[5].

Khi giảm tỉ lệ chol/SPC, hiệu suất liposome hóa tăng đáng kể. Công thức có tỉ lệ chol cao (chol/SPC = 1/2) cho hiệu suất liposome hóa thấp nhất. Nguyên nhân là do cả chol và RES cùng nằm trong màng SPC, mà SPC chỉ có một giới hạn nhất định, khi tỉ lệ chol cao, nó sẽ cạnh tranh vị trí trong màng với RES và đẩy RES ra khỏi màng dẫn đến giảm hiệu suất liposome hóa. Khi tỉ lệ chol giảm, không gian trong màng được bảo vệ bởi SPC tăng lên làm cho lượng RES được vào bên trong màng liposome tăng, do đó tăng hiệu suất liposome hóa. Tuy nhiên, chol có vai trò ổn định màng, làm tăng độ cứng của màng, tăng sức chịu đựng của liposome dưới áp lực thẩm thấu và bảo vệ liposome khỏi tương tác với protein trong dịch sinh học, khi tỉ lệ chol quá thấp có thể gây tách pha và làm chol phân bố không đồng đều trong màng. Do vậy chúng tôi chỉ dừng nghiên cứu ở tỉ lệ chol/SPC = 1/5.

Kết luận

Nghiên cứu đã tạo được liposome RES bằng phương pháp bốc hơi pha đảo và khảo sát,

đánh giá ảnh hưởng của tỉ lệ các thành phần trong công thức đến hiệu suất liposome hóa RES. Kết quả cho thấy KTTTP thu được khoảng 200 nm, PDI khoảng 0,4. Tỉ lệ mol RES/SPC/ chol phù hợp nhất là 1/12/2,4.

Tài liệu tham khảo

1. Baur J. A., Sinclair D. A. (2006), "Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence", *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6), 493-506
2. Bojana D. I., Ivana T. K., Zvonar A. *et al.* (2013), "Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 181-198.
3. Bonechi C., Martini S., Ciani L., Lamponi S., Rebmann H. *et al.* (2012) "Using liposomes as carriers for polyphenolic compounds: The case of trans-resveratrol", *PLoS ONE*, 7(8), 1 - 11.
4. Cortesi R., Esposito E., Gambarin S. *et al.* (1999), "Preparation of liposomes by reverse-phase evaporation using alternative organic solvents", *Journal of Microencapsulation*, 16(2), 251 - 256.
5. Lu X. Y., Hu S., Jin Y. and Qiu L. Y. (2012), "Application of liposome encapsulation technique to improve anti-carcinoma effect of resveratrol", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 38(3), 314 - 322.

(Ngày nhận bài: 30/06/2014 - Ngày duyệt đăng: 06/08/2014)

✓ Nghiên cứu tác dụng ức chế tế bào ung thư đại tràng của dịch chiết tỏi đen và S-allyl-L-cystein phân lập từ tỏi đen

Hồ Anh Sơn, Vũ Bình Dương*

Học viện Quân y – Bộ Quốc phòng

* E-mail: vbduong2978@gmail.com

Summary

The anti-cancer effect of S-allyl-L-cysteine (SAC) and black garlic extracts on the HT-29 cell line was investigated. The HT-29 colon cancer cells were inhibited at 50 mM, 100 mM of SAC and 0.25 mM, 0.5 mM, 1.0 mM of black garlic extracts.

Keywords: Black garlic, SAC, HT-29, anticancer.