Tổng hợp nano artesunate ứng dụng trong y sinh học

The application of nano artesunate mixture in biomedicine

Phạm Thị Hồng Tân^{1*}¹Trường Cao đẳng Cộng đồng - Đồng Tháp, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: pthtan@gmail.com

THÔNG TIN	TÓM TẮT
<p>DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.14.1.446.2019</p> <p>Ngày nhận: 01/11/2018 Ngày nhận lại: 12/12/2018 Duyệt đăng: 10/04/2019</p> <p><i>Từ khóa:</i> β-cyclodextrin, alginate, điều trị sốt rét, hạt nano, nano β-cyclodextrin-alginate-artesunate</p> <p><i>Keywords:</i> β-cyclodextrin, alginate, malaria treatment, nano β-cyclodextrin-alginate-artesunate, nanoparticle</p>	<p>Trong bài báo này, hạt nano β-cyclodextrin-alginate-artesunate đã được tổng hợp với kích thước từ 20nm - 80nm, kích thước hạt khá đồng đều ứng dụng làm tăng khả năng dẫn truyền thuốc. Đặc điểm hình thái và cấu trúc của hạt nano được xác định bằng SEM và TEM. Bằng phương pháp sắc ký bản mỏng TLC, vị trí vết của mẫu chuẩn artesunate và mẫu thử nano β-cyclodextrin-alginate-artesunate ngang bằng nhau, chứng tỏ được sự có mặt của artesunate trong mẫu nano tổng hợp được.</p> <p>ABSTRACT</p> <p>In this paper, nano β-cyclodextrin-alginate-artesunate nanoparticles ranging from 20nm to 80nm were synthesized, the fairly uniform diameters of particles were applied to enhance drug delivery. Morphological and structural characteristics of nanoparticles were determined by SEM and TEM. By TLC thin plate chromatography, the spot location of the artesunate standard specimen equated with the nano β-cyclodextrin-alginate-artesunate testing specimen, indicating that the presence of artesunate in the nanoparticle mixture.</p>

1. Tổng quan

Bệnh sốt rét (SR) là một bệnh truyền nhiễm lây truyền từ người này sang người khác khi những người này bị muỗi đốt. Có 4 loài ký sinh trùng sốt rét (KSTSR) gây bệnh ở người gồm: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* và *Plasmodium ovale*, trong số đó *P. falciparum* và *P. vivax* là 2 loài thường gặp nhất. Ở Việt Nam có mặt cả 4 loài KSTSR, trong đó *P. falciparum* là loài có tỷ lệ cao nhất 80-85%, sau đó đến *P. vivax*, loài *P. malariae* và *P. ovale* chỉ một tỷ lệ nhỏ (WHO, 2006).

Tình trạng KSTSR *P. falciparum* kháng thuốc nghiêm trọng trên thế giới và khu vực Đông Nam Á là một khó khăn lớn cho việc lựa chọn các thuốc điều trị sốt rét (Trieu et al., 2001). Ở Việt Nam *P. falciparum* kháng cao với chloroquine, fansidar, mefloquine và giảm đáp ứng với nhiều loại thuốc chống sốt rét hiện dùng (Vu, Trinh, Nguyen, & Nguyen, 1979). Do

đó, các nhà khoa học vẫn không ngừng nghiên cứu nhằm tìm ra các loại thuốc sốt rét có hiệu quả điều trị tốt và khắc phục tình trạng đa kháng thuốc của *P. falciparum* là hết sức cần thiết.

Từ năm 1990, thuốc chống sốt rét artemisinin và dẫn chất artesunate được tiến hành thử nghiệm lâm sàng và chính thức đưa vào sử dụng rộng rãi trong chương trình quốc gia phòng chống sốt rét ở nước ta. Mặc dù, với liệu trình 5 ngày hoặc 7 ngày, tỷ lệ khỏi bệnh do sốt rét *P. falciparum* đến 80-90%, nhưng nhược điểm lớn nhất của Artemisinin/Artesunate đơn trị liệu là tỷ lệ tái phát sớm quá cao (35-50%). Vì vậy, tổ chức y tế thế giới đề nghị chuyển sang dùng phác đồ điều trị bệnh bằng thuốc phối hợp dựa trên chất nền kết hợp với gốc artemisinin hoặc dẫn xuất artesunate (Trieu & Nguyen, 1995).

Artesunate là dẫn chất bán tổng hợp của artemisinin, một sesquiterpen lacton được phân lập từ cây Thanh cao hoa vàng (*Artemisia annua* L.), họ Cúc (*Asteracea*). Artesunate là muối natri của ester hemisuccinat của dihydroartemisinin, tan tốt trong nước nhưng không ổn định ở môi trường trung tính hoặc môi trường acid nên phải pha thuốc ngay tại chỗ và dùng ngay. Thuốc có tác dụng mạnh và nhanh diệt thể phân liệt trong máu đối với *Plasmodium vivax* và *P. falciparum* nhạy cảm và kháng cloroquin (Bộ Y tế, 2018).

Với sự phát triển mạnh mẽ của cách mạng công nghiệp lần thứ 4, đã thúc đẩy sự phát triển trong mọi lĩnh vực của toàn xã hội đặc biệt là y sinh học. Các hạt nano có đặc tính sinh học có thể dùng để hỗ trợ chẩn đoán bệnh, dẫn truyền thuốc, làm tăng hiệu lực và sinh khả dụng của những thuốc hòa tan kém (Feng, 2006). Gần đây, cyclodextrin được phát hiện là một vật liệu sinh học giúp làm tăng khả năng dẫn thuốc cho các hạt nano. Chẳng hạn, nghiên cứu tổng hợp nano bọt biển của cyclodextrin liên kết ngang với nhóm carbonate cải thiện độ tan của itraconazole (Swaminathan, Vavia, Trotta, 2007); nghiên cứu sự phân hủy sinh học và quá trình giải phóng thuốc *in vitro* từ chất mang chitosan gắn hoạt chất artesunate (L. D. Tran, Nguyen, Vu, & Tran, 2006); nghiên cứu và ứng dụng β -cyclodextrin làm chất mang thuốc ketoprofen (N. T. H. Tran, 2010).

Với những triển vọng như vậy, trong bài viết này tôi xin giới thiệu các kết quả thu được qua việc nghiên cứu tổng hợp nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate bằng phương pháp khuấy từ. Kích thước hạt được xác định bằng phân tích SEM và TEM.

2. Cơ sở lý thuyết

Cyclodextrin là những oligosaccharit mạch vòng được tạo nên bởi các glucopyranoza nối với nhau bằng liên kết -1,4-glycoside. Cyclodextrin được sản xuất từ tinh bột bằng phản ứng vòng hóa các chuỗi glucopyranoza mạch thẳng nhờ enzyme cyclodextrin glucozyltransferaza. Sản phẩm thu được thường là hỗn hợp của ba loại cyclodextrin chủ yếu là α -, β - và γ -cyclodextrin với tỷ lệ phụ thuộc vào nguồn gốc enzyme và thời gian phản ứng. Cấu trúc vòng của cyclodextrin cho phép nó tạo phức bao dạng khách thể - chủ thể với nhiều hợp chất hữu cơ. Sự tạo phức bao này dẫn đến làm thay đổi tính chất lý hóa của phân tử chất khách thể (Lezcano, Ai-Soufi, Novo, Rodriguez-Nunez, & Tato, 2002). Nhờ đó, cyclodextrin được ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau, đặc biệt trong công nghệ dược phẩm, cyclodextrin được dùng để ổn định các hoạt chất, làm tăng khả năng hòa tan và khả năng

hấp thụ thuốc đồng thời làm giảm tác dụng phụ của thuốc. Trong đó, dạng β -cyclodextrin thường được chọn sử dụng trong nghiên cứu dược phẩm vì ít làm rát hơn so với dạng α -cyclodextrin sau khi tiêm bắp, giảm sự rát của thuốc đối với dạ dày, ngăn cản sự tương tác giữa thuốc - thuốc và thuốc - tá dược (Munoz-Botella, Castillo, & Martyn, 1995).

Alginate là một polysaccharide không có độc tính, dễ phân hủy sinh học. Alginate có trong vách tế bào tảo nâu (*Phacophyceae*) dưới dạng muối calcium, magnesium hoặc sodium của acid alginic. Alginate được phát hiện bởi Edward Stanford vào năm 1883 và bắt đầu sản xuất thương mại vào năm 1927. Alginate có khả năng tan trong nước tạo thành dạng sệt. Ngoài ra, alginate còn có tính chất keo nên trong công nghệ bào chế thuốc, alginate được dùng làm chất ổn định, nhũ tương hóa hay chất tạo đặc cho dung dịch, làm vỏ bọc thuốc (Silva, Ribeiro, Figueiredo, Goncalves, & Veiga, 2006).

Như vậy việc nghiên cứu kết hợp phức β -cyclodextrin- alginate dưới dạng hạt nano làm chất mang thuốc artesunate sẽ tăng sinh khả dụng của thuốc đồng thời nâng cao hiệu quả điều trị bệnh.

3. Nguyên liệu và phương pháp

3.1. Nguyên liệu

Các hóa chất được sử dụng để tổng hợp nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate gồm β -Cyclodextrin, artesunate, sodium alginate, natri chloride, ethanol được mua của hãng Merck và Aldrich.

Quang phổ hồng ngoại (IR) được đo trên máy Equinox 55 IR - Bruker (Đức) tại Khoa Hóa học, Trường Đại học Sư Phạm Thành phố Hồ Chí Minh.

Hàm lượng artesunate có trong mẫu nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate được xác định bằng phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC Agilent 1100 series), đo tại Phòng Công nghệ Hóa dược, Viện Công nghệ Hóa học Thành phố Hồ Chí Minh.

Kích thước và hình thái của các hạt nano được phân tích bởi SEM (JEOL-JSM-7401F, Field Emission Scanning Electron Microscope) đo tại Viện Công nghệ Hóa học Thành phố Hồ Chí Minh và TEM (JEM-1400, kính hiển vi Hitachi H8100 có thể gia tốc 200kV, nguồn phát electron LaB6, độ phân giải 0,14nm, gửi mẫu phân tích tại Phòng thí nghiệm TEM Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại Học Quốc Gia Hà Nội.

3.2. Phương pháp

Dựa vào kết quả khảo sát tỷ lệ β -cyclodextrin:alginate (N. T. H. Tran, 2010), chọn tỷ lệ tối ưu của β -cyclodextrin: alginate là 1:10 để tiến hành thí nghiệm điều chế nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate.

Quy trình tổng hợp nano β -cyclodextrin - alginate-artesunate:

Nhỏ từ từ lượng không đổi dung dịch artesunate (3mg artesunate/mL pha với hỗn hợp ethanol: nước tỉ lệ 1:1) vào dung dịch NaCl (6,7mg NaCl/mL nước). Sau đó, cho hỗn hợp trên vào dung dịch sodium alginate (6,0mg alginate/mL nước), khuấy trên máy khuấy từ 60 phút

(tốc độ 1200 vòng/phút). Nhỏ tiếp dung dịch β -cyclodextrin (1,6mg β -cyclodextrin /mL nước) vào hỗn hợp trên, tiếp tục khuấy thêm 90 phút (tốc độ 1200 vòng/phút), thu được dung dịch có dạng gel, màu trắng. Mẫu này được để yên qua đêm sau đó tiến hành tách ly tâm và đông khô thu được sản phẩm nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate.

Lấy mẫu thu được đem phân tích SEM và TEM.

Định tính artesunate trong mẫu nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate thu được bằng phương pháp sắc ký bản mỏng TLC (Phan, 2011).

Chuẩn bị mẫu chạy sắc ký:

- Mẫu dung dịch artesunate chuẩn: pha dung dịch artesunate(1mg/mL) trong methanol làm mẫu chuẩn;
- Dung dịch mẫu thử: pha dung dịch mẫu thử bằng cách thêm 100mg mẫu nano artesunate vào 5mL methanol. Sau đó lọc lấy dịch chiết làm mẫu thử;
- Hệ dung môi giải ly là chloroform: methanol = 5:0,4. Dung dịch acid hiện hình (acid sunfuric 96%:ethanol với tỷ lệ 1:1).

So sánh các vết chấm của dung dịch mẫu nano tổng hợp được với vết chấm của dung dịch artesunate chuẩn.

4. Kết quả và thảo luận

4.1. Kích thước và hình thái của hạt nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate

Sản phẩm nano β -cyclodextrin–alginate–artesunate thu được là chất xốp, nhẹ, màu trắng.

Hình 1. Sản phẩm nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate

Kết quả đo SEM cho thấy β -cyclodextrin và alginate đều có kích thước micromet (m) (Hình 2a, 2b) nhưng khi kết hợp với nhau thì tạo thành sản phẩm có kích thước nanomet (nm).

Hạt nano-cyclodextrin-alginate thu được có kích thước hạt 100nm và kích thước của các hạt nano thu được khá đồng đều (Hình 3a).

Kết quả đo SEM cho thấy hạt nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate tổng hợp được (Hình 3b) cũng giống như các hạt nano β -cyclodextrin-alginate có kích thước hạt khá đồng đều và kích thước hạt đo được là 80nm.

Hình 2. Ảnh SEM của β -cyclodextrin (a) và alginate (b)

Hình 3. Ảnh SEM của nano β -cyclodextrin-alginate (a) và nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate (b)

Ảnh chụp TEM của mẫu nano β -cyclodextrin-alginate cho thấy hạt có kích thước 100nm (Hình 4a) và nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate tổng hợp được có kích thước 20nm (Hình 4b).

Hình 4. Ảnh TEM của nano β -cyclodextrin-alginate (a) và nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate (b)

Như vậy, từ kết quả đo SEM và TEM cho thấy mẫu β -cyclodextrin-alginate-artesunate tổng hợp được có kích thước trong khoảng từ 20nm - 80nm, kích thước này phù hợp dùng trong y sinh học (Duong, Vo, Phan, & Nguyen, 2011).

4.2. Kết quả định tính artesunate trong nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate thu được bằng phương pháp sắc ký bản mỏng TLC

Hình 5. TLC của mẫu artesunate chuẩn (1) và mẫu thử nano

Kết quả chạy sắc ký bản mỏng của dung dịch artesunate chuẩn (1) (Hình 5) và mẫu dung dịch nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate tổng hợp được (nano) (Hình 5) cho thấy vị trí 2 vết ngang bằng nhau trên bản mỏng. Điều này chứng tỏ rằng trong mẫu nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate tổng hợp được có sự hiện diện của artesunate.

So sánh với kết quả định tính nicotine trong mẫu nano β -cyclodextrin-alginate-nicotine (Phan, 2011):

Hình 6. TLC của mẫu thử nano (1) và mẫu nicotine chuẩn (2)

Kết quả sắc ký bản mỏng của dung dịch mẫu thử nano (1) (Hình 6) và dung dịch nicotine chuẩn (2) (Hình 6) cho thấy vết của dung dịch mẫu thử nano (1) xuất hiện ngang bằng với vết của dung dịch mẫu nicotine chuẩn trên bản mỏng. Tác giả Phan (2011) đã kết luận rằng trong mẫu nano β -cyclodextrin-alginate-nicotine tổng hợp được có sự hiện diện của nicotine.

Như vậy, qua kết quả sắc ký bản mỏng mẫu nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate chứng tỏ có sự hiện diện của artesunate trong mẫu nano tổng hợp được.

5. Kết luận

Kết quả đạt được sau thí nghiệm đã thu được hạt nano mới β -cyclodextrin-alginate-artesunate với kích thước hạt nano từ 20nm - 80nm và kích thước hạt tương đối đồng đều (được đo bằng SEM và TEM). Tác giả cũng chứng minh được sự có mặt của artesunate trong mẫu nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate tổng hợp được bằng phương pháp sắc ký bản mỏng TLC.

Hướng nghiên cứu tiếp theo là cần xác định tỷ lệ thu nạp artesunate trong mẫu nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate, khảo sát độ tan và khả năng phóng thích thuốc của nano β -cyclodextrin-alginate-artesunate ở các môi trường pH thích hợp.

Tài liệu tham khảo

- Bộ Y tế. (2018). *Dược thư quốc gia Việt Nam [National pharmacopoeia of Vietnam]*. Hanoi, Vietnam: Nhà xuất bản Y học.
- Duong, T. T. A., Vo, K. Q., Phan, P. H., & Nguyen, P. T. P. (2011). Nghiên cứu chế tạo vật liệu nano chitosan làm chất hấp phụ protein ứng dụng trong dẫn truyền thuốc [Study on fabrication of chitosan nanomaterial as a protein adsorbent for drug transmission]. *Tạp chí phát triển KH&CN*, 14(6), 54-61.
- Feng, S. S. (2006). New-concept chemotherapy by nanoparticles of biodegradable polymers - Where are we now? *Nanomedicine*, 1(3), 297-309.
- Lezcano, M., Ai-Soufi, W., Novo, M., Rodriguez-Nunez, E., & Tato, J. V. (2002). Complexation of several benzimidazole-type fungicides with alpha and beta-cyclodextrins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 108-112.
- Munoz-Botella, S., Castillo, B. D., & Martyn, M. A. (1995). Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation. *Ars Pharmaceutica*, 36, 187-198.
- Phan, D. A. (2011). *Nghiên cứu tổng hợp nano-cyclodextrin-alginate-nicotine [Study on synthesis of nano-cyclodextrin-alginate-nicotine]*. (Master's thesis). Trường Đại học Cần Thơ, Can Tho, Vietnam.
- Silva, C. M., Ribeiro, A. J., Figueiredo, I. V., Goncalves, A. R., & Veiga, F. (2006). Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 311, 1-10.
- Silveira, A. M. D., Ponchel, G., Puisieux, F., & Duchene, D. (1998). Combined poly (isobutylcyanoacrylate) and cyclodextrins nanoparticles for enhancing the encapsulation of lipophilic drugs. *Pharmaceutical Research*, 15(7), 1051-1055.
- Swaminathan, S., Vavia, P. R., & Trotta, F. (2007). Formulation of betacyclodextrin based nanosponges of itraconazole. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 89-94. doi:10.1007/s10847-006-9216-9
- Tran, L. D., Nguyen, N. T. T., Vu, H. D., & Tran, H. V. (2006). Nghiên cứu sự phân hủy sinh học và quá trình giải phóng thuốc in vitro từ chất mang nano chitosan gắn hoạt chất artesunate [Research on the biological degradation and the in vitro release of the drug from the chitosan nano-carrier with artesunate attached]. *Tạp chí Phân tích hóa lý và sinh học*, 11(1).
- Tran, N. T. H. (2010). *Nghiên cứu và ứng dụng -cyclodextrin làm chất mang thuốc ketoprofen [Research and application-cyclodextrin as a carrier drug ketoprofen]*. (Master's thesis). Trường Đại học Cần Thơ, Can Tho, Vietnam.
- Trieu, T. N., & Nguyen, S. N. (1995). Hiệu lực Artemisinin và Artesunate trong điều trị sốt rét do P.falciparum tại khu vực miền Trung-Tây Nguyên [Effectiveness of Artemisinin and Artesunate in the treatment of P. falciparum malaria in the Central-Central Highlands region]. *KYCTNCKH Viện Sốt rét KST-CT TU*, 1991-1996, 122-131.

- Trieu, T. N., Davis, T. M. E., Hewitt, S., Le, T. K., Huynh, Q. H., Cao, A. V., ... Luu, G. T. H. (2001). Treatment of falciparum malaria in Vietnamese children: The need for combination therapy and optimised dosage regimes. *Annals of Tropical Paediatrics*, 21(4), 307-312.
- Vu, P. T., Trinh, A. K., Nguyen, M. T. N., & Nguyen, K. V. (1979). P.falciparum kháng chloroquine và biện pháp giải quyết ở Việt Nam [P. falciparum is resistant to chloroquine and remedial measures in Vietnam]. *Kỷ yếu công trình NCKH Viện Sốt rét-KST-CT*, 5-15.
- WHO. (2006). Falciparum malaria treatment. In *WHO guidelines of treatment for malaria* (pp. 26-146).
- Wongmekiat, A., Yoshimatsu, S., Tozuka, Y., Moribe, K., & Yamamoto, K. (2006). Investigation of drug nanoparticle formation by co-grinding with Cyclodextrins: Studies for Indomethacin, Furosemide and Naproxen. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 56, 29-32.