

Cơ chế hình thành liposome berberin từ proliposome berberin bằng phương pháp hydrat hóa

Mechanism of formation of berberine-loaded liposomes from berberine-loaded proliposomes by hydration method

Dương Thị Thuấn^a, Nguyễn Trọng Nghĩa^b, Trần Thị Hải Yên^c, Phan Thị Thảo Trang^f,
Nguyễn Thanh Hải^d, Jyrki Heinämäki^e, Phạm Thị Minh Huệ^{c*}
Duong Thi Thuan^a, Nguyen Trong Nghia^b, Tran Thi Hai Yen^c, Phan Thi Thao Trang^f,
Nguyen Thanh Hai^d, Jyrki Heinämäki^e, Pham Thi Minh Hue^{c*}

^aKhoa Dược, Khối Y Dược, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

^aFaculty of Pharmacy, Medicine & Pharmacy Division, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Vietnam

^bViện Vật lý, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ, 10 Đào Tấn, 10000, Hà Nội, Việt Nam

^bInstitute of Physics, Vietnam Academy of Science and Technology, 10 Daotian, 10000, Hanoi, Vietnam

^cTrường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, 110403, Hà Nội, Việt Nam

^cHanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong street, Hoan Kiem district, 110403, Hanoi, Vietnam

^dTrường Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

^dVNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

^eViện Dược, Khoa Y, Đại học Tartu, Estonia, số 1, phố Nooruse, 50411, Tartu, Estonia

^eInstitute of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tartu, Nooruse street 1, 50411 Tartu, Estonia

^fK25YDH3, Khoa Dược, Khối Y Dược, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

^fK25YDH3, Faculty of Pharmacy, Medicine & Pharmacy Division, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Vietnam

(Ngày nhận bài: 11/10/2024, ngày phản biện xong: 28/10/2024, ngày chấp nhận đăng: 20/11/2024)

Tóm tắt

Berberin, một alkaloid isoquinolin bậc 4 có nguồn gốc từ thực vật, có nhiều tác dụng dược lý như làm giảm cholesterol máu, giảm đường huyết, kháng khuẩn, v.v. Tuy nhiên, berberin có sinh khả dụng thấp (dưới 10%) do bị chuyển hóa lần đầu, bài tiết ngay tại ruột non bởi bơm tổng thuốc Glyco-protein, và có tính thấm kém. Nanoliposome có thể khắc phục được hạn chế này. Theo các công bố trước đây, proliposomes ổn định hơn và dễ nâng cấp quy mô hơn liposome. Proliposome có thể tự tạo thành liposome bằng hydrat hóa trong nước hoặc dịch sinh học. Nghiên cứu này chứng minh quá trình hydrat hóa từ proliposome berberin thành liposome berberin ở trong các môi trường khác nhau để hiểu rõ hơn về đặc tính của proliposome dùng qua đường uống. Proliposome berberin được bào chế bằng phương pháp bao hạt theo phương pháp ở các nghiên cứu trước rồi được hydrat hóa trong các môi trường khác nhau bao gồm môi trường acid hydrochloric 0,1N (pH=1,2), môi trường đệm phosphat pH 4,5 và môi trường đệm phosphat pH 6,8 trong đĩa 4 giếng có nắp đậy. Đĩa 4 giếng này được cho vào đĩa petri chứa nước được gia nhiệt lên 43°C bằng dòng điện 8,6 volt, cường độ dòng điện 2,01 ampere để duy trì nhiệt độ ở trong giếng từ 36 - 38°C. Hình ảnh quá trình hydrat hóa được ghi lại bằng kính hiển vi điện tử quét lase (Confocal C1 si, Nikon, Nhật). Kích thước và hình thái của liposome tạo thành được đo bằng máy đo kích thước tiểu phân và kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM, Jeol-Jem 1100, Nhật). Kết quả cho thấy proliposome berberin được tạo thành là những tiểu phân micro do màng film phủ lên chất mang manitol. Hình thái của

*Tác giả liên hệ: Phạm Thị Minh Huệ

Email: hueptm@hup.edu.vn

tiểu phân proliposome berberin biến đổi trong quá trình hydrat hóa ở 3 môi trường khác nhau cho thấy cơ chế hình thành liposome berberin bằng hydrat hóa màng film. Proliposome BBR không thể hydrat hóa được trong môi trường acid hydrochloric 0,1N. Liposome BBR tạo thành qua quá trình hydrat hóa ở hai môi trường đệm phosphate pH 4,5 và đệm phosphate pH 6,8 có hình cầu. Kích thước tiểu phân và phân bố kích thước tiểu phân của liposome BBR tạo thành ở hai môi trường trên lần lượt là $354,73 \pm 64,75$ nm, $0,465 \pm 0,0072$ và $269,27 \pm 97,89$ nm, $0,423 \pm 0,0867$. Như vậy, proliposome BBR có thể hydrat hóa để tạo thành liposome BBR ở hai môi trường đệm phosphate pH 4,5 và đệm phosphate pH 6,8 nhưng không thể hydrat hóa được ở môi trường acid hydrochloric 0,1N. Liposome BBR tạo thành có kích thước tiểu phân trung bình nhỏ hơn 500 nm và phân bố kích thước tiểu phân nhỏ hơn 0,5. Kết quả chứng minh proliposome bền vững trong môi trường dạ dày, có thể chuyển thành liposome trong môi trường ruột nhằm tăng hấp thu và tăng sinh khả dụng.

Từ khóa: proliposome berberin; liposome berberin; hydrat hóa; liposome; proliposome.

Abstract

Berberine (BBR) is a plant-origin quaternary isoquinoline alkaloid presenting many pharmacological activities such as cholesterol lowering, anti-hyperlipidemia, antibacteria, etc. Unfortunately, berberine has low bioavailability (<10%) due to a first-pass metabolism effect in the intestinal tract, poor intestinal permeability, P-glycoprotein mediated efflux. Liposomes are nanocarriers which can overcome this limit. In the literature, proliposomes are more stable and easier to scale up than liposomes. Proliposomes can spontaneously form liposomes by hydrating in water or biological fluids. The aim of this study is to supply evidence of the hydration process of BBR-loaded proliposomes to form BBR-loaded liposomes in different mediums to understand more clearly the characters of proliposomes for oral administration. BBR-loaded proliposomes were fabricated using the granulation method from our previous publish and then they were hydrated in three mediums, including hydrochloric acid 0.1N solution (pH = 1.2), phosphate buffer saline (pH 4.5), and phosphate buffer saline (pH 6.8) in a 4-well plate with a lid. This 4-well plate was previously put in a petri dish that already had water heated to 40 - 43°C by an electric current with a voltage of 8.6 volts, and a current of 2.01 amperes in order to maintain the temperature in 4-well plate from 36 - 38°C. The images of the hydration process were taken by confocal laser scanning microscope. The size, distribution size, and morphology of the final reconstituted liposomes were assessed by Zetasizer Nano S90, and transmission electron microscope (TEM, Jeol-Jem 1100, Japan), respectively. Results demonstrated that the BBR-loaded PLs presented a smooth BBR-embedded thin film around micron-scale carrier particles (mannitol). The modification of morphology of BBR-loaded PLs in the hydration process in three mediums illustrated the mechanism of BBR-loaded liposomes formation by hydrating thin film of BBR-loaded PLs. BBR-loaded proliposomes could not be hydrated in the hydrochloric acid 0.1N (pH 1.2). The reconstituted BBR-loaded liposomes in two mediums including phosphate buffer saline (pH 4.5) and phosphate buffer saline (pH 6.8) had sphere morphology. The average size and distribution size in these two mediums are 354.73 ± 64.75 nm, with polydispersity index of 0.465 ± 0.0072 and 269.27 ± 97.89 nm, with polydispersity index of 0.423 ± 0.0867 , respectively. In brief, BBR-loaded proliposome can be reconstituted to BBR-loaded liposomes in phosphate buffer saline (pH 4.5) and phosphate buffer saline (pH 6.8). They cannot be reversed to liposome BBR in hydrochloric acid 0.1N. The reconstituted BBR-loaded liposomes was sphere with average size smaller than 500 nm, and the distribution size smaller than 0.5. The results demonstrate that proliposomes are stable in gastric media, and they can spontaneously form liposomes in intestinal tract.

Keywords: berberine-loaded proliposomes; berberine-loaded liposomes; hydration; liposomes; proliposomes.

1. Giới thiệu

Berberin (BBR) là một alkaloid isoquinolin bậc 4 có nguồn gốc từ thực vật, được chiết xuất từ rễ thân rễ hoặc thân vỏ của một số loài thuộc họ Hoàng liên hoặc thuộc họ Mỡm sói [10], [19]. Theo các công bố trước đây, berberin có nhiều tác dụng dược lý như chống thoái hóa thần kinh, bảo vệ tim, bảo vệ gan, chống oxy hóa, chống lipid máu cao, làm giảm glucose máu và chống viêm khớp, kháng khuẩn [6], [8], [10], [17]. Tuy nhiên, các tác dụng này của berberin chỉ đạt được khi berberin được hấp thu vào máu. Mặc dù, BBR có nhiều tác dụng dược lý tiềm năng,

nhưng berberin lại có sinh khả dụng thấp (dưới 10%) do tính thấm kém, bị chuyển hóa lần đầu tại ruột, bị kết tụ ngay tại ruột, bị tác động của chu trình gan mật và là cơ chất của bơm tổng thuốc glyco-protein [7], [16], [20], [21]. Vì vậy, để BBR phát huy tác dụng dược lý tiềm năng qua đường uống thì phải uống liều cao, nhưng khi dùng liều cao trên người bằng đường uống (500 mg/lần, 2-3 lần/ngày) lại gây tác dụng phụ là táo bón [1], [6]. Sinh khả dụng đường uống thấp của BBR có thể được cải thiện bằng hệ mang thuốc tiểu phân nano như nanolipid rắn [18], liposome [11].

Liposome ngoài ưu điểm là cải thiện độ tan của dược chất khó tan trong nước, làm tăng sinh khả dụng của thuốc còn có tính tương thích sinh học cao. Hơn nữa, liposome là một hệ mang dược chất, có khả năng mang cả dược chất thân nước và dược chất thân dầu do cấu trúc đặc biệt của liposome gồm nhân nước bên trong và màng phospholipid bao quanh [3], [4]. Mặc dù, liposome có nhiều ưu điểm nhưng cũng có những hạn chế như kém độ ổn định, dễ rò rỉ dược chất, và khó nâng cấp quy mô [4], [9]. Những hạn chế này được cải thiện bằng bào chế hệ mang dược chất proliposome. Proliposome là những tiểu phân dạng khô, trơn chảy tốt, (được hình thành bằng sự kết tụ các tiểu phân liposome đơn lẻ với chất mang hoặc được tạo thành bằng bao 1 lớp film mỏng lên chất mang, hoặc tạo vi cầu với thành phần cấu tạo của liposome), khi được hydrat hóa bởi nước hoặc dịch sinh học của cơ thể thì tạo thành liposome [12], [15]. Proliposome được bào chế bằng các phương pháp như phun sấy, bao hỗn dịch, kháng dung môi siêu tới hạn [9], [14].

Mục tiêu của nghiên cứu này là chứng minh quá trình hydrat hóa từ proliposome berberin thành liposome berberin ở trong các môi trường khác nhau để hiểu rõ hơn về đặc tính của proliposome dùng qua đường uống.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

BBR dạng base $C_{20}H_{18}NO_4^+$ (Mw 336,36 g/mol, độ tinh khiết > 98%) (Sichuan Weikeqi Biological Technology Co., Ltd., Chengdu, Trung Quốc), hydrogenated soy phosphatidyl choline, HSPC (> 98%) (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Đức), distearoylphosphatidyl glycerol, DSPG (> 98%) (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Đức), alpha-tocopherol, α -TP (CISME Italy s.r.l., Milano, Italy), sodium deoxycholate, SDC (> 98%) (Thermo Fisher, Georgia, USA), và manitol (Xilong, Trung Quốc). Một số dung môi đạt tiêu chuẩn phân tích

gồm methanol và chloroform (Công ty Đức Giang, Hà Nội, Việt Nam).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bào chế proliposome berberin theo phương pháp bao hạt

Proliposome berberin đã được bào chế bằng phương pháp bao hạt theo như nghiên cứu trước của chúng tôi [2]. Tóm tắt quy trình bào chế như sau: các thành phần tạo liposome (berberin, HSPC, DSPG, SDC và α -TP) được hòa tan trong hỗn hợp dung môi methanol và chloroform (tỉ lệ 2,5:1 v/v). Dung dịch tạo liposome được phun lên tiểu phân chất mang manitol trong máy phun sấy tầng sôi (Glatt GmbH, Binzen, Đức) với nhiệt gió vào 45°C , tốc độ thổi gió $10 \text{ m}^3/\text{giờ}$, tốc độ phun $0,7 \text{ prm}$, áp suất đầu súng phun $0,7 \text{ bar}$. Proliposome sau khi tạo thành được tiếp tục sấy 60 phút trong buồng sấy của máy phun sấy tầng sôi và sấy qua đêm trong tủ sấy áp suất giảm (Daihan Labtech Co., Ltd, Hàn Quốc) ở 40°C áp suất $-0,06 \text{ mPa}$ trong 24 giờ để loại dung môi tồn dư.

2.2.2. Quan sát hình thái của proliposomes berberin

Hình thái của proliposome BBR được quan sát bằng sử dụng kính hiển vi điện tử quét (Regulus 8100, Hitachi, Nhật) [5]. Mẫu được trải lên tấm carbon dính sẵn trên đế kim loại rồi tiếp tục phủ một lớp platin lên mẫu để tăng độ tương phản. Mẫu được chiếu dòng điện từ trường 3 kV trong buồng soi mẫu và hình thái của proliposome BBR được chụp lại với các độ phóng đại khác nhau.

2.2.3. Nghiên cứu cơ chế hình thành liposome berberin từ proliposome berberin

Phương pháp được cải tiến từ nghiên cứu của Janga 2012 [5] để mô tả được cơ chế hình thành liposome từ proliposome bằng phương pháp hydrat hóa. Một đĩa 4 giếng có nắp đậy được chuẩn bị và cho 03 môi trường thử khác nhau vào 3 giếng, mỗi giếng 1 ml . Các môi trường thử là dung dịch mô phỏng dịch dạ dày (dung dịch

HCl 0,1N, pH 1,2), dung dịch mô phỏng dịch tá tràng (dung dịch đệm phosphat pH 4,5) và dung dịch mô phỏng dịch ruột (dung dịch đệm phosphat pH 6,8). Tiếp theo, đĩa 4 giếng được cho vào đĩa petri đã chứa sẵn nước cất được làm ấm lên 40 – 43°C bằng dòng điện với hiệu điện thế 8,6 vôn, cường độ dòng điện 2,01 ampe để nhiệt độ môi trường trong giếng duy trì ở 36 – 38°C. Các tiểu phân proliposome BBR được rắc vào mỗi giếng và quan sát sự biến đổi hình thái của proliposome dưới kính hiển vi điện tử quét laser (Confocal C1 si, Nikon, Nhật).

2.2.4. Đánh giá liposome tạo thành từ proliposome berberin

Sau khi hydrat hóa hoàn toàn proliposome BBR (quan sát dưới kính hiển vi điện tử laser đồng tiêu (Confocal C1 si, Nikon, Nhật) không tìm thấy các tiểu phân proliposome nữa), hỗn dịch được rút ra và đem chụp hình thái, kích thước của liposome tạo thành theo như phương pháp của Rouzi và cộng sự [13] có cải tiến như trình bày ở nghiên cứu trước của chúng tôi [2]. Tóm tắt phương pháp như sau:

Phương pháp quan sát hình thái của liposome: Hình thái liposome được quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM, Jeol, Jem-1010, Tokyo, Nhật). Hỗn dịch liposome BBR tạo thành từ quá trình hydrat hóa

proliposome BBR được nhỏ phủ khắp lên đĩa lưới của thiết bị đã được phủ một lớp carbon mỏng. Mẫu được nhuộm bằng dung dịch uranyl acetat 1% trong 5 phút. Dùng giấy thấm đặt cạnh mép lưới để thấm chất nhuộm thừa. Để mẫu khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng (không còn chất lỏng trên bề mặt đĩa lưới) rồi quan sát hình thái và đo kích thước liposome dưới kính hiển vi điện tử truyền qua. Đặt thang đo của hệ kính hiển vi lên mẫu để lấy kích thước tiểu phân liposome BBR.

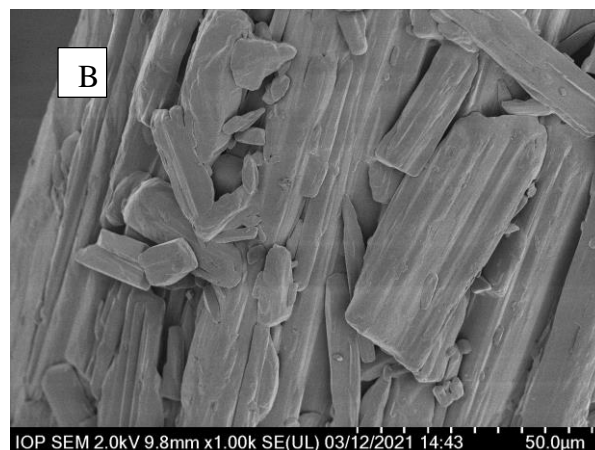
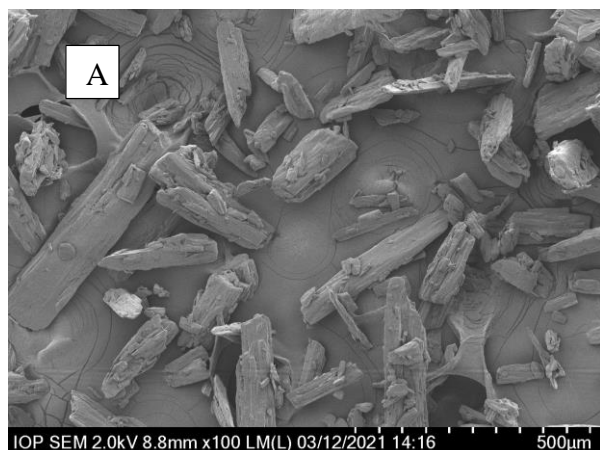
Phương pháp tán xạ ánh sáng động để đo kích thước và phân bố kích thước hạt liposome:

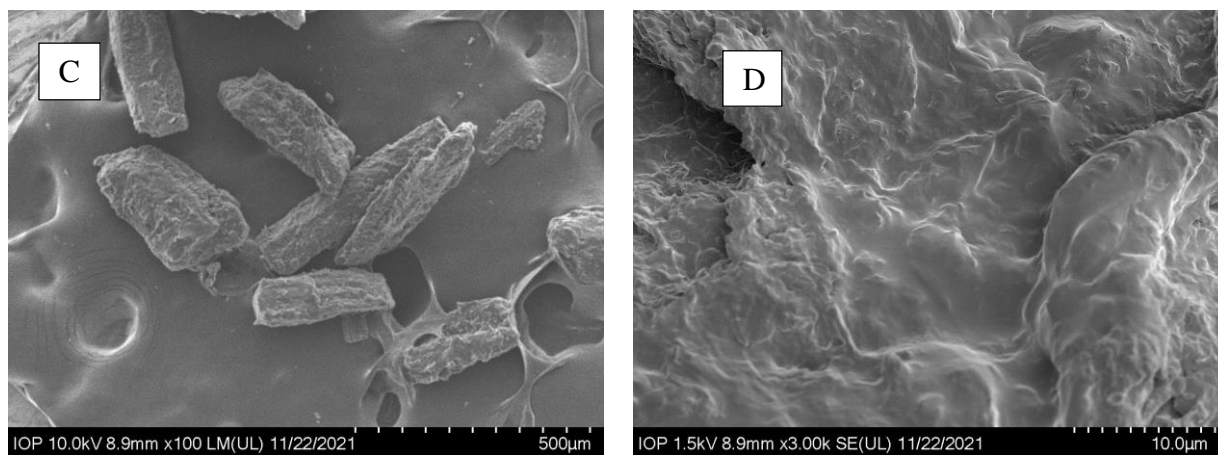
Pha loãng mẫu với số lần thích hợp rồi cho vào cốc đo khoảng 1 ml hỗn dịch liposome BBR. Tiến hành đo mẫu với góc tán xạ 90°, hệ số tán xạ của 1,58 trên thiết bị đo kích thước hạt nano (Zetasizer 90, Malvern, Anh). Mẫu được đo lặp lại 3 lần và tính giá trị trung bình.

3. Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1. Hình thái của proliposome berberin tạo thành

Hình 1 cho thấy chất mang manitol là những tiểu phân có bề mặt trơn nhẵn, có kích thước từ 50-500 µm. Sau khi bao 1 lớp màng mỏng chứa thành phần tạo liposome BBR lên bề mặt chất mang thì proliposome BBR tạo ra có bề mặt bông, mượt.

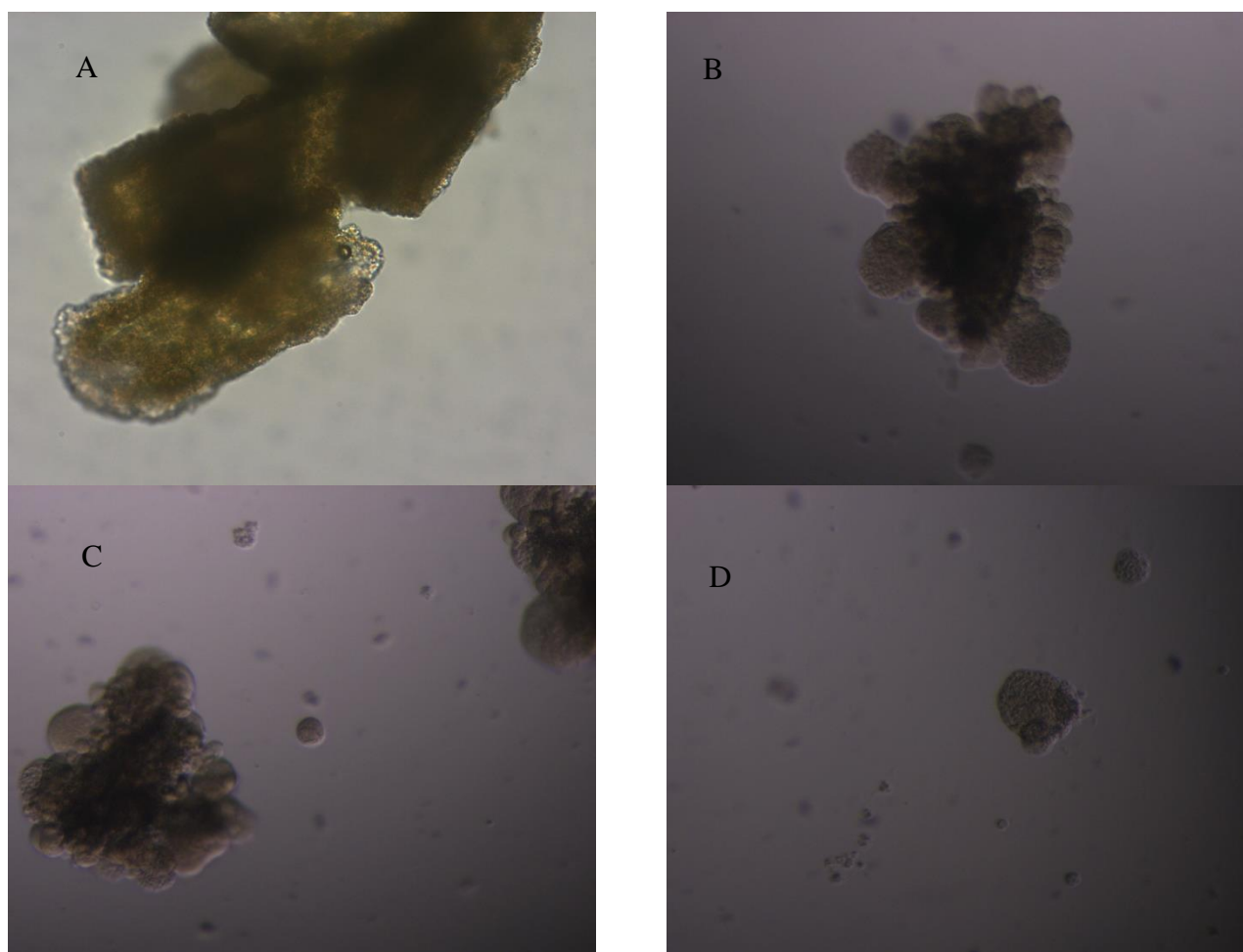


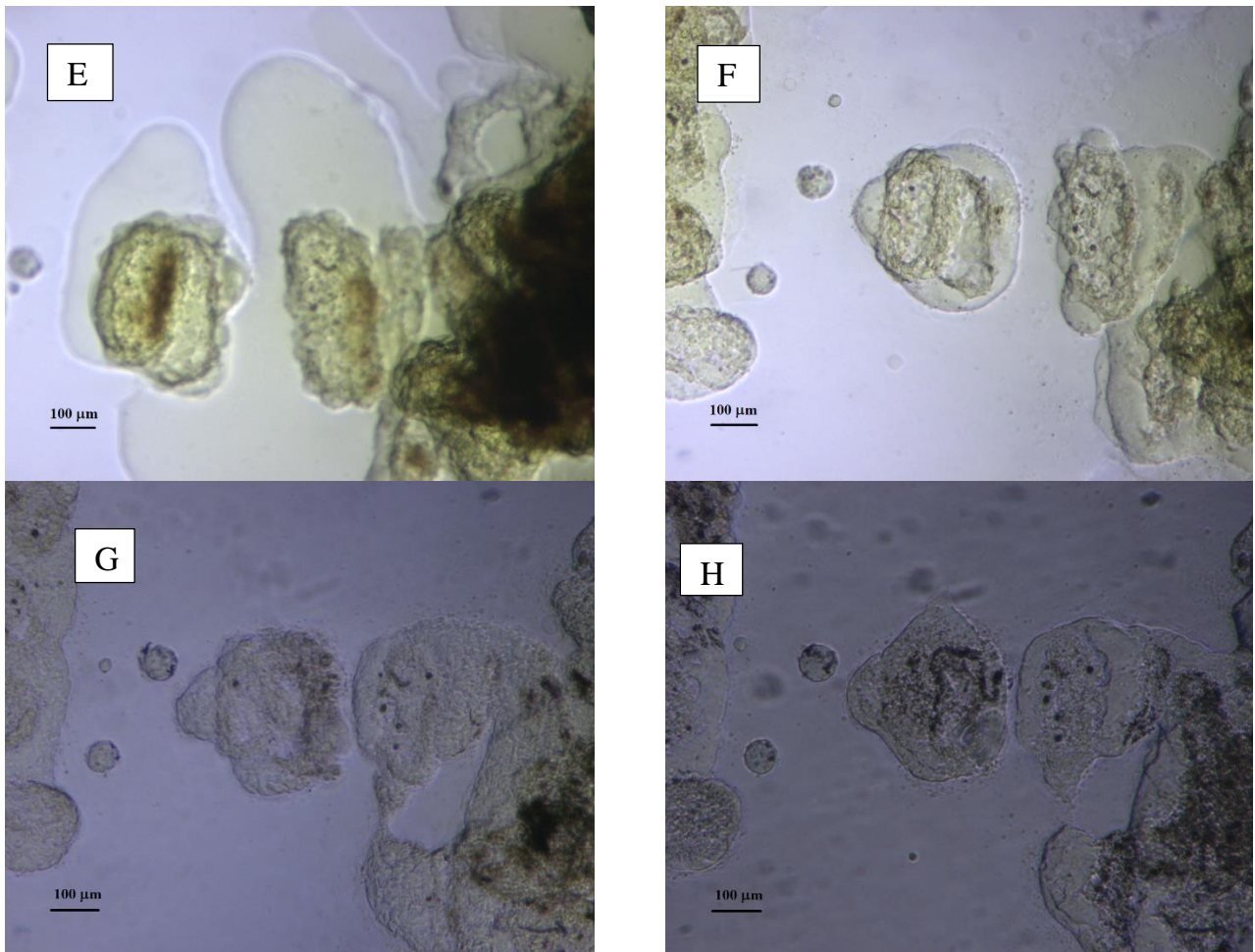


Hình 1. Chất mang manitol và proliposome berberin tạo thành bằng phương pháp bao hạt: A. Chất mang manitol; B. Bề mặt chất mang manitol; C. Proliposome berberin; D. Bề mặt proliposome berberin

3.2. Cơ chế hình thành liposome berberin từ proliposome berberin

Tiến hành đánh giá khả năng hydrat hóa của proliposome BBR trong 3 môi trường: dung dịch acid hydrochloric 0,1N (pH 1,2), đệm phosphat pH 4,5, đệm phosphat pH 6,8 như mô tả ở mục 2.2.3. Kết quả được thể hiện ở Hình 2, Hình 3 và Hình 4.

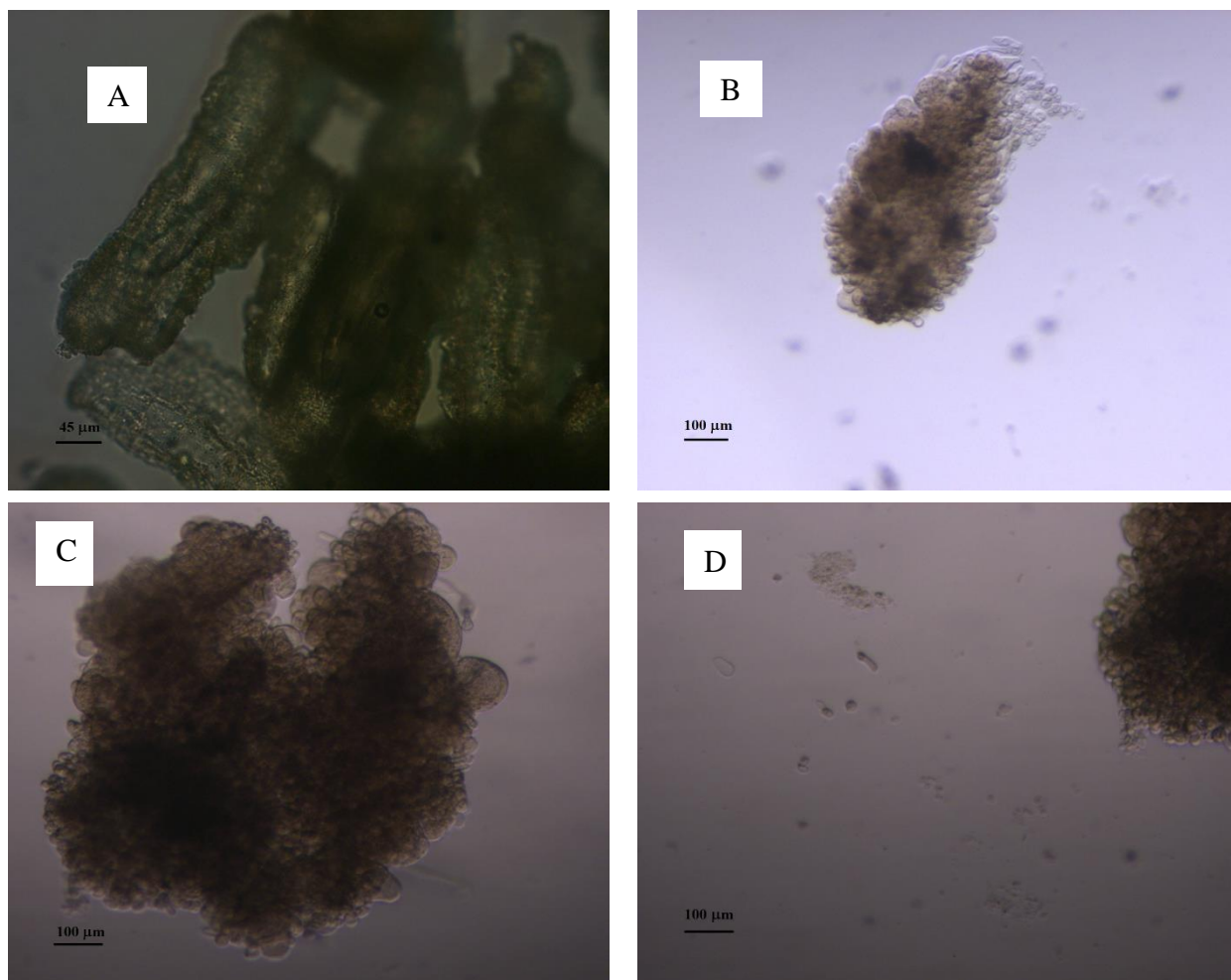




Hình 2. Hình ảnh quá trình hydrat hóa màng film của proliposome BBR trong môi trường mô phỏng dịch dạ dày (pH 1,2) được chụp bằng kính hiển vi điện tử quét laser (CLSM): A. Ngay khi proliposome BBR được đưa vào môi trường; B, C, D, E. Proliposome BBR sau vài giây ở trong môi trường; F. Proliposome BBR sau 2 phút ở trong môi trường; G. Sau 10 phút; H. Sau 30 phút

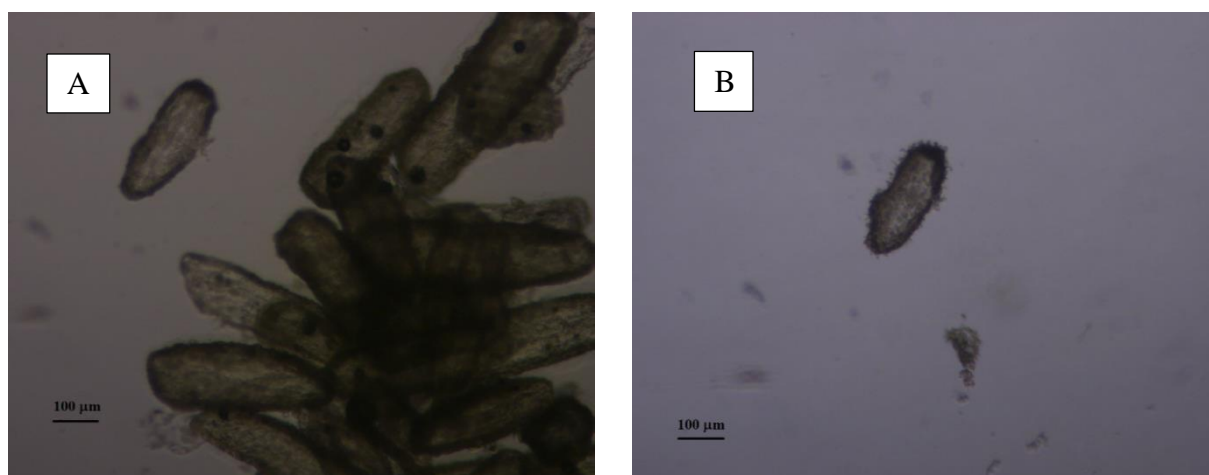
Kết quả ở Hình 2 cho thấy trong môi trường mô phỏng dịch dạ dày pH 1,2, lớp màng film bao quanh chất mang ngay lập tức được thấm nhanh môi trường và trương phồng lên thành các túi bóng bao bọc quanh chất mang (Hình 2 B, C, D, E). Lớp này sau đó bị xẹp xuống và bao thành

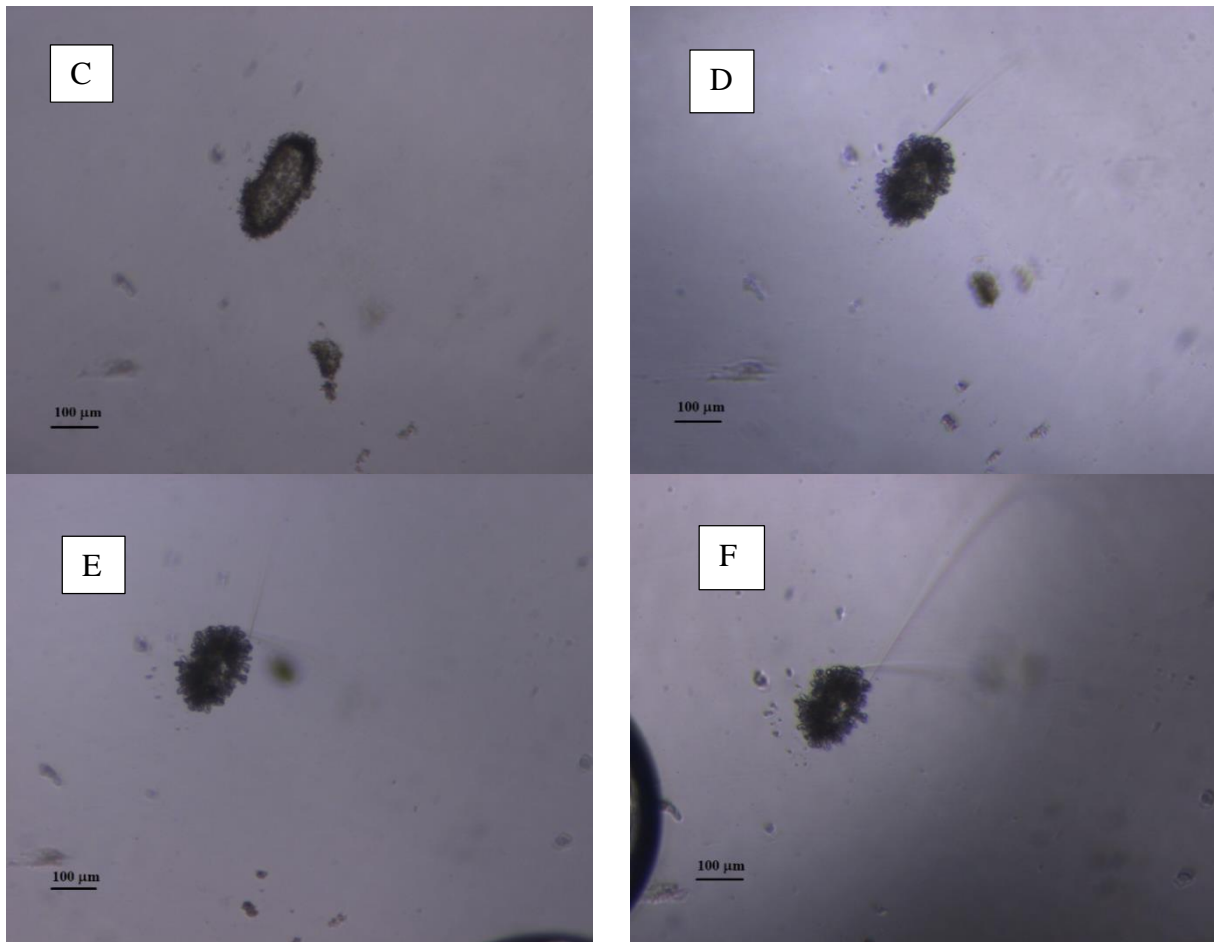
một lớp chắc chắn trên bề mặt tiểu phân và không tiếp tục quá trình hydrat hóa được hoặc bị hydrat hóa rất chậm (Hình 2 F, G, H) do lớp màng bị thụ động hóa không cho thấm nước hay dịch đệm để hydrat hóa và do đó không hình thành các túi bóng nhỏ để tạo liposome.



Hình 3. Hình ảnh quá trình màng film bao quanh chất mang của tiểu phân proliposome BBR được hydrat hóa trong môi trường mô phỏng dịch tá tràng (pH 4,5) chụp bằng kính hiển vi điện tử quét laser (CLSM): A. ngay khi tiểu phân proliposome BBR tiếp xúc môi trường (vật kính 10x); B và C. Màng film trở thành những túi bóng nhỏ sau khi bị hydrat hóa (vật kính 4x); D. các túi bóng trên bề mặt tiểu phân proliposome BBR bị bong ra thành những túi nhỏ hơn và phát tán ra môi trường (vật kính 4x)

Trong môi trường mô phỏng dịch tá tràng, lớp film được hydrat hóa nhanh và hình thành những túi bóng nhỏ đều đặn (Hình 3 A, B). Các túi bóng này lại tiếp tục được hydrat hóa để tạo ra những túi bóng nhỏ hơn. Sau 30 phút hydrat hóa, các túi bóng nhỏ này bị bứt ra khỏi bề mặt tiểu phân proliposome rồi phân tán ra môi trường (Hình 3 B, D).





Hình 4. Hình ảnh quá trình màng film bao quanh chất mang của tiểu phân proliposome BBR được hydrat hóa trong môi trường mô phỏng dịch ruột (pH 6,8) chụp bằng kính hiển vi điện tử quét laser (CLSM): A. Proliposome BBR ngay khi tiếp xúc môi trường hydrat hóa; B và C. Các vi nhung mao được hình thành trên bề mặt tiểu phân proliposome BBR; D, E, F. Các túi bóng nhỏ được tạo ra trên bề mặt tiểu phân proliposome BBR sau khi các vi nhung mao được hydrat hóa rồi phân tán ra môi trường.

Trong môi trường mô phỏng dịch ruột (pH 6,8), lớp film bao quanh chất mang manitol được hydrat hóa nhanh để tạo trên bề mặt proliposome các vi nhung mao. Trong thời gian 30 phút, các vi nhung mao lại tiếp tục được hydrat hóa để tạo ra những túi bóng nhỏ và phân tán ra môi trường (Hình 4 D, E, F).

Do hạn chế về độ phân giải của kính hiển vi điện tử quét laser (Confocal C1 si, Nikon, Nhật), các quá trình hydrat hóa tiếp theo của những bóng nhỏ trên không tiếp tục quan sát được. Tuy nhiên, với phương pháp và thiết bị quan sát này, quá trình hydrat hóa màng film bao quanh tiểu phân chất mang manitol được quan sát kỹ càng và rõ nét hơn, chứng minh được chi tiết hơn cơ chế hydrat hóa của proliposome trong các môi trường khác nhau mô phỏng dịch dạ dày, dịch tá

tràng và dịch tiêu hóa theo thời gian so với kết quả nghiên cứu của Janga và cộng sự [5]. Nghiên cứu của Janga và cộng sự chỉ mô tả được một giai đoạn đơn lẻ sau khi màng film được hydrat hóa trong môi trường nước cất và tạo thành bóng nhỏ bao quanh tiểu phân proliposome chứ không mô tả được chi tiết quá trình của proliposome dịch chuyển trong đường tiêu hóa.

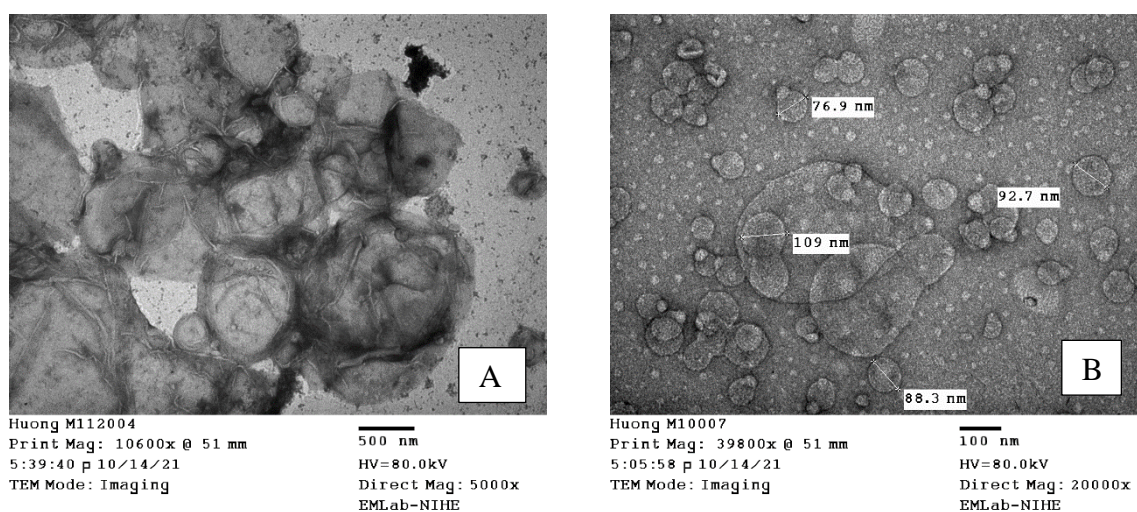
3.3. Hình thái, kích thước, phân bố kích thước tiểu phân của liposome berberin tạo thành từ proliposome berberin

3.3.1. Hình thái, kích thước của liposome quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua

Tiến hành quan sát hình thái của liposome BBR tạo thành sau khi hydrat hóa proliposome BBR ở hai môi trường đệm phosphat pH 4,5 và

pH 6,8 bằng kính hiển vi điện tử truyền qua như phương pháp trình bày ở mục 2.2.4. Proliposome BBR không hydrat hóa được ở môi trường acid clohydric 0,1N nên không lấy mẫu quan sát. Kết quả ở Hình 5 cho thấy liposome tạo thành có hình cầu. Trong môi trường đệm phosphat pH 4,5 (Hình 5.A), hình ảnh liposome hình thành được quan sát có kích thước tập trung chủ yếu ở khoảng 300-400 nm (tính theo đường kính liposome). Ngoài ra có các liposome khác to hơn 500 nm trong môi trường đệm phosphat pH 6,8 (Hình 5.B), liposome hình thành được quan sát có 2 quần thể rõ rệt, quần thể có kích thước dưới 50 nm (tính theo đường kính) và quần thể có kích

thước trung bình khoảng 100 nm (tính theo đường kính). Ngoài ra còn có các tiểu phân liposome có kích thước khá lớn. Kết quả này có thể được giải thích bằng hình ảnh hydrat hóa của proliposome BBR trong 2 môi trường như trình bày ở Hình 3 và Hình 4. Ở Hình 3, lớp film được hydrat hóa và phồng thành những túi bóng to trong môi trường đệm phosphat pH 4,5. Trong lúc đó, trong môi trường đệm phosphat pH 6,8, lớp film được hydrat hóa và tạo thành các vi nhung mao trên bề mặt tiểu phân proliposome BBR. Các vi nhung mao lại tiếp tục được hydrat hóa để tạo thành các liposome với kích thước nhỏ.



Hình 5. Liposome berberin hình thành từ hydrat hóa proliposome berberin quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua TEM (Jeol – Jem 1010, Nhật): A. Liposome hình thành khi hydrat hóa proliposome BBR trong môi trường đệm phosphat pH 4,5, độ phóng đại 5000 lần; B. Liposome hình thành khi hydrat hóa proliposome BBR trong môi trường đệm phosphat pH 6,8, độ phóng đại 20.000 lần.

3.3.2. Kích thước và phân bố kích thước liposome đo bằng phương pháp nhiễu xạ ánh sáng động

Kích thước và phân bố kích thước tiểu phân liposome BBR được đo bằng phương pháp như trình bày ở mục 2.2.4. Kết quả đo được trình bày ở Bảng 1 và Hình 6. Số liệu ở Bảng 1 cho thấy

liposome BBR được hình thành từ quá trình hydrat hóa proliposome BBR ở môi trường đệm phosphat pH 4,5 có kích thước tiểu phân trung bình là $354,73 \pm 64,75$, lớn hơn so với liposome BBR được hình thành trong môi trường đệm phosphat pH 6,8. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả chụp SEM như trình bày ở Hình 5.

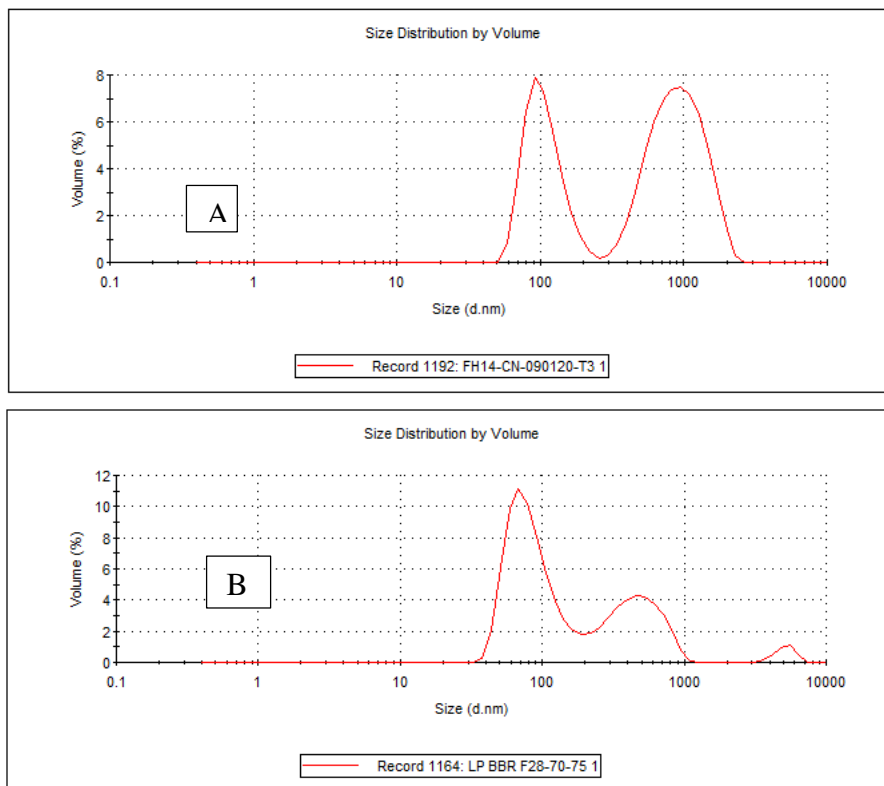
Bảng 1. Kích thước tiểu phân trung bình theo tỉ trọng và phân bố kích thước tiểu phân của liposome BBR được hình thành từ proliposome BBR theo phương pháp hydrat hóa.

(Số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình \pm SD)

Môi trường hydrat hóa	Kích thước tiểu phân trung bình (Z-average) (nm)	Phân bố kích thước tiểu phân (PDI)
Dung dịch đệm phosphat pH 4,5	354,73 \pm 64,75	0,465 \pm 0,072
Dung dịch đệm phosphat pH 6,8	269,27 \pm 97,90	0,423 \pm 0,087

Phân bố kích thước của liposome berberin tương đối hẹp, dưới 0,5. Hình 6 cho thấy, khi hydrat hóa, trong mỗi môi trường đệm phosphat pH 4,5 và 6,8 đều hình thành hai quần thể liposome berberin. Một quần thể có kích thước dưới 20 nm và quần thể khác có kích thước từ 200 nm đến 1000 nm. Kết quả này là khác với kết quả của nghiên cứu trước của chúng tôi [2] về kích thước tiểu phân trung bình và phân bố kích thước tiểu phân. Trong nghiên cứu trước [2], liposome berberin tạo thành có kích thước tiểu phân trung bình theo tỉ trọng là 116,6 \pm 5,8, phân bố kích thước tiểu phân hẹp 0,269 \pm 0,038. Sự khác biệt này có thể được giải thích là do môi

trường hydrat hóa và kỹ thuật hydrat hóa. Trong nghiên cứu trước, môi trường hydrat hóa là nước cất và quá trình hydrat hóa có sử dụng sóng siêu âm 5 phút, ở nhiệt 37 \pm 1°C trong bể giữ nhiệt từ 5-20 phút. Ở nghiên cứu này, mẫu được cho tự do vào đĩa 4 giếng có chứa các dung dịch đệm là mô phỏng dịch đường tiêu hóa và được gia nhiệt lên 37 \pm 1°C, không có tác động của siêu âm và ủ nhiệt. Sau khi quan sát thấy quá trình hydrat hóa hết, mẫu được rút và đem chụp TEM. Như vậy, kích thước tiểu phân của liposome BBR được hình thành là giống với điều kiện sinh học hơn so với nghiên cứu trước.



Hình 6. Kích thước và phân bố kích thước tiểu phân của liposome berberin tạo thành sau khi hydrat hóa proliposome berberin: A. Liposome berberin hình thành trong môi trường đệm phosphat pH 4,5; B. Liposome berberin hình thành trong môi trường đệm phosphat pH 6,8

4. Kết luận

Proliposome BBR được bào chế bằng phương pháp bao hạt có cấu tạo gồm chất mang (mannitol) và thành phần tạo lớp film (BBR) bao gồm (HSPC, DSPG, α -TP, SDC) bao quanh chất mang có thể được hydrat hóa để tạo thành liposome BBR ở hai môi trường mô phỏng dịch tá tràng (hệ đệm phosphat pH 4,5) và dịch ruột (hệ đệm phosphat pH 6,8). Trong môi trường mô phỏng dịch dạ dày (dung dịch acid hydrochloric 0,1N), proliposome không hydrat hóa được do màng film bị thụ động hóa và trở nên cứng nhắc. Cơ chế hình thành liposome berberin từ proliposome berberin là màng film chứa các thành phần tạo liposome berberin sau khi được hydrat hóa bởi dịch mô phỏng tá tràng và dịch ruột thì phồng lên thành túi bóng bao quanh chất mang. Các túi bóng này lại tiếp tục hydrat hóa để tạo thành túi bóng nhỏ hơn và phân tán ra môi trường rồi tiếp tục lại được hydrat hóa để tạo thành liposome berberin có kích thước trung bình từ $354,73 \pm 64,75$, có chỉ số đa phân tán $0,465 \pm 0,072$ trong môi trường dịch mô phỏng dịch tá tràng và $269,27 \pm 97,90$, có chỉ số đa phân tán $0,423 \pm 0,087$ trong môi trường mô phỏng dịch ruột.

Tài liệu tham khảo

- [1] Cicero, A. F., Rovati, L. C, et al. (2007). "Eulipidemic effects of berberine administered alone or in combination with other natural cholesterol-lowering agents", *Arzneimittelforschung*, 57(01), pp. 26-30.
- [2] Duong, T.T, Yen, T.T.H, et al. (2022). "Berberine-loaded liposomes for oral delivery: Preparation, physicochemical characterization and in-vivo evaluation in an endogenous hyperlipidemic animal model". *International Journal of Pharmaceutics*, 616, pp. 121525.
- [3] He, H., Lu, Y., et al. (2019). "Adapting liposomes for oral drug delivery". *Acta pharmaceutica sinica B*, 9(1), pp. 36-48.
- [4] Huệ, P.T.M.; Hải, N.T. (2017). *Liposome, phytosome phỏng sinh học trong bào chế*. Hà Nội: Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội, tr. 1-84.
- [5] Janga, K.Y, Jukanti R., et al. (2012). "Bioavailability enhancement of zaleplon via proliposomes: Role of surface charge". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(2), pp. 347-357.
- [6] Kong W., Wei J., et al. (2004). "Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins". *Nat Med*, 10(12), pp. 1344-51.
- [7] Liu, Y-T., Hao, H-P., et al. (2010). "Extensive intestinal first-pass elimination and predominant hepatic distribution of berberine explain its low plasma levels in rats". *Drug metabolism disposition*, 38(10), pp. 1779-1784.
- [8] Lợi, Đ.T. (2015). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Hà Nội: Nxb Y học, tr. 195.
- [9] Muneer, S., Masood, Z., et al. (2017). "Proliposomes as pharmaceutical drug delivery system: a brief review". *J. Nanomed. Nanotechnol*, 8(3), pp. 1-5.
- [10] Neag, M. A, Mocan, A., et al. (2018). "Berberine: Botanical occurrence, traditional uses, extraction methods, and relevance in cardiovascular, metabolic, hepatic, and renal disorders". *Frontiers in pharmacology*, 9, pp. 557.
- [11] Nguyen, T. X., Huang L., et al. (2014). "Chitosan-coated nano-liposomes for the oral delivery of berberine hydrochloride". *Journal of Materials Chemistry B*, 2(41), pp. 7149-7159.
- [12] Payne, N. I., Ambrose, C. V., et al. (1986). "Proliposomes: a novel solution to an old problem". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(4), pp. 325-329.
- [13] Ruozi, B., Belletti, D., et al. (2011). "AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study". *International journal of nanomedicine*, 6, pp. 557.
- [14] Shruthi, M.V, Parthiban, S., et al. (2014). "Proliposomes as a novel drug delivery system for the improvement of vesicular stability". *Int. J. Res. Pharm. Nano Sci*, 3, pp. 326-336.
- [15] Singh, N., Kushwaha, P., et al. (2019). "Proliposomes: an approach for the development of stable liposome". *Ars Pharmaceutica*, 60(4), pp. 231-240.
- [16] Tsai, P-L., Tsai, T-H. (2004). "Hepatobiliary excretion of berberine". *Drug Metabolism and Disposition*, 32(4), pp. 405-412.
- [17] Wang, Y., Yi, X., et al. (2014). "Berberine decreases cholesterol levels in rats through multiple mechanisms, including inhibition of cholesterol absorption". *Metabolism*, 63(9), pp. 1167-77.
- [18] Xue, M., Yang, M-x., et al. (2013). "Characterization, pharmacokinetics, and hypoglycemic effect of berberine loaded solid lipid nanoparticles". *International Journal of Nanomedicine*, 8, pp. 4677.
- [19] Yuan, N-N, Cai, C-Z., et al. (2019). "Neuroprotective effects of berberine in animal models of Alzheimer's disease: a systematic review of pre-clinical studies". *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19(1), pp. 1-10.
- [20] Zhang, Q., Xiao, X., et al. (2010). "Berberine moderates glucose and lipid metabolism through multipathway mechanism". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, eCAM* 2011.
- [21] Zhang, X., Qiu, F., et al. (2011). "Intestinal absorption mechanisms of berberine, palmatine, jateorhizine, and coptisine: involvement of P-glycoprotein". *Xenobiotica*, 41(4), pp. 290-296.