

Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quy trình tải hoạt chất quercetin và rutin vào cấu trúc niosome bằng phương pháp tiêm ethanol

Nguyễn Minh Hiền^{1,*}, Đỗ Bình Minh¹, Lê Tự Mạnh Huy¹, Nguyễn Trần Phước Thuận¹, Lê Minh Trí^{1,2,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Khoa Y, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Liên hệ

Nguyễn Minh Hiền, Khoa Y, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: nmhien@medvnu.edu.vn

Liên hệ

Lê Minh Trí, Khoa Y, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: leminhtri@ump.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 03-12-2022
- Ngày chấp nhận: 28-4-2023
- Ngày đăng: 15-5-2023

DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjet.v6i1.1056>



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



TÓM TẮT

Niosome là hệ tiểu phân nano mang giá trị ứng dụng cao và phù hợp với xu hướng phát triển hệ thống dẫn truyền thuốc hiện nay với nhiều ưu điểm về khả năng kiểm soát khả năng vận chuyển, phóng thích ổn định và định hướng mục tiêu. Các hoạt chất rutin và quercetin mang tác dụng dược lý đa dạng, tuy nhiên do kích thước phân tử lớn, dạng tự do hòa tan kém trong nước, kém bền, dễ bị oxy hóa và quang phân, điều này dẫn đến kém chuyển hóa trước tuần hoàn, kém hấp thu ở ruột và sinh khả dụng toàn thân không cao gặp nhiều khó khăn khi đưa vào ứng dụng. Tuy nhiên các nhược điểm này có thể được khắc phục bằng việc sử dụng niosome. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tải hoạt chất trong quá trình tổng hợp niosome bằng phương pháp tiêm ethanol. Dựa vào quá trình khảo sát mức độ ảnh hưởng của chất điện hoạt cũng như hàm lượng rutin và quercetin để đánh giá khả năng hình thành cấu trúc và hiệu suất bắt giữ của niosome. Niosome được tạo thành có dạng hình cầu và mật độ tương đối đồng đều với công thức được sử dụng là hỗn hợp span 60 và tween 60 với tỉ lệ 6:4, công thức sử dụng tỉ lệ này có hiệu suất bắt giữ quercetin đạt 60,8% và rutin đạt 20,5% với hàm lượng từ 20-25 mg chất chuẩn. Sự kết hợp của hai chất điện hoạt span 60 và tween 60 tạo cấu trúc niosome vừa có kích thước nhỏ, vừa khó kết tụ và mang độ ổn định cao, phù hợp với mục đích cung cấp tác dụng kéo dài và lưu trữ bảo quản. Công thức kết hợp này cũng cho thấy quercetin có hiệu suất bắt giữ cao hơn gấp ba lần so với rutin.

Từ khoá: Niosome, phương pháp tiêm ethanol, span 60, tween 60, quercetin, rutin

MỞ ĐẦU

Trong nhiều năm trở lại đây, xu hướng phát triển của hệ thống dẫn truyền thuốc đang được tiếp cận theo hướng kiểm soát khả năng phóng thích liên quan đến hai khía cạnh – cường độ và mục tiêu phóng thích. Hiện nay, những tiến bộ nhanh chóng trong ứng dụng tiểu phân nano vào chẩn đoán và điều trị là phù hợp để theo kịp với xu hướng chung^{1,2}. Niosome với cấu trúc màng lipid kép, rỗng ở bên trong³ là một trong những hệ tiểu phân nano đang được quan tâm nghiên cứu ứng dụng. Niosome hình thành từ chất điện hoạt không ion hóa với đầu ưa nước hướng ra ngoài và đầu kỵ nước hướng vào trong, kết hợp với cholesterol hoặc phosphatidylcholin theo tỉ lệ thích hợp⁴. Chính cấu trúc đặc thù này giúp niosome có thể vận chuyển đồng thời phân tử hoạt chất thân dầu và thân nước tùy thuộc vào vị trí bám của phân tử đó trên cấu trúc⁵. Kích thước dao động với biên độ lớn của niosome mang lại khả năng vận chuyển theo nhiều con đường cũng như nhiều loại phân tử hoạt chất khác nhau. Trong khi những phân tử niosome với kích thước ≤ 300 nm cho phép khả năng vận chuyển xuyên

gian bào ngay tại biểu bì da⁶, các niosome kích thước lớn lại cho phép vận chuyển phân tử lớn như insulin vào hệ thống dịch tiêu hóa⁷. Chính sự đa dạng này cho phép những sản phẩm bào chế từ niosome có thể được đưa vào cơ thể thông qua nhiều con đường dung nạp khác nhau bao gồm đường uống, tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch và thẩm thấu qua da⁸.

Ngoài ra, ưu điểm lớn nhất của niosome chính là khả năng sửa đổi linh hoạt, bằng cách thay đổi thành phần và hàm lượng chất điện hoạt, chất cảm ứng tích điện cũng như cholesterol, những thông số cơ bản trong đánh giá một niosome bao gồm kích thước, chỉ số cân bằng dầu nước (hydrophilic-lipophilic balance, HLB), thông số đóng gói tối hạn (critical packing parameter, CPP) và nhiệt độ chuyển pha (transition temperature, Tc) cũng thay đổi theo. Nhờ vậy, dễ dàng điều chỉnh các đặc tính như khả năng phóng thích hoạt chất và độ ổn định để phù hợp với ứng dụng mong muốn^{9,10}. Quá trình bào chế niosome là sự tập trung của các đơn phân tử chất điện hoạt để hình thành lớp màng kép thông qua sức căng bề mặt lớn giữa phần đuôi của chất điện hoạt và pha nước, nhờ khả năng tự định hướng, các đơn phân này sẽ sắp xếp theo trật

Trích dẫn bài báo này: Hiền N M, Minh D B, Huy L T M, Thuận N T P, Trí L M. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quy trình tải hoạt chất quercetin và rutin vào cấu trúc niosome bằng phương pháp tiêm ethanol. *Sci. Tech. Dev. J. - Eng. Tech.*; 6(1):1798-1808.

tự đầu ưa nước hướng ra ngoài và đầu kỵ nước hướng vào trong, hình thành lớp màng kép bao bọc lấy hoạt chất³. Cholesterol được thêm vào để điều chỉnh tính lưu động và sự gắn kết của màng thông qua liên kết hydro¹¹. Niosome được bào chế theo nhiều phương pháp khác nhau tùy thuộc vào cách thức phối hợp thành phần và điều chỉnh điều kiện từ những phương pháp đơn giản dễ thực hiện như tiêm ethanol, hydrat hóa màng phim, lắc tay cho đến các phương pháp phức tạp hơn bao gồm siêu âm, bay hơi pha đảo hay vi hóa lỏng¹²⁻¹⁴.

Flavonoid là nhóm dẫn chất hữu cơ có nguồn gốc từ thiên nhiên, được tìm thấy rộng rãi trong các loại hoa quả, rau củ cũng như trong dược liệu. Flavonoid và dẫn xuất có trong diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunb.) được nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng có hoạt tính chống viêm, kháng khuẩn, chống oxy hóa và trung hòa các gốc tự do^{15,16}. Quercetin và rutin là hai đại diện nổi bật, ngoài việc sở hữu hoạt tính tác động có lợi đến sức khỏe nói trên, hai chất này còn mang những tác dụng dược lý có tiềm năng vô cùng lớn. Cả quercetin và rutin đều cho thấy tác động trực tiếp đối với hệ tuần hoàn, điều trị huyết áp cao, xuất huyết và xơ vữa động mạch thông qua cơ chế tăng cường độ bền mao mạch máu¹⁷, ngăn cản kết tập tiểu cầu và ức chế tích tụ chất béo¹⁸. Thêm vào đó, khả năng ức chế yếu tố phân chia, tăng trưởng cũng như hạn chế tổng hợp quá mức gốc tự do oxy hóa mang lại cho quercetin và rutin tiềm năng phổ ứng dụng rộng rãi trong điều trị, bao gồm các tình trạng liên quan đến viêm nhiễm như viêm loét dạ dày¹⁹, viêm khớp dạng thấp²⁰; những tình trạng thoái hóa thần kinh liên quan đến tuổi tác như Alzheimer, Parkinson^{21,22}; và các hội chứng liên quan đến miễn dịch như đa xơ cứng²³ cũng như kể cả ung thư²⁴⁻²⁶. Tuy nhiên, những flavonoid này lại mang những tính chất bất lợi như kích thích phân tử lớn, dạng tự do hòa tan kém trong nước, kém bền, dễ bị oxy hóa và quang phân, điều này dẫn đến kém chuyển hóa trước tuần hoàn, kém hấp thu ở ruột và sinh khả dụng toàn thân không cao^{27,28}, cá biệt hơn, rutin với thành phần chứa glycosid cho thấy độc tính trong quá trình hấp thụ do can thiệp vào các phản ứng chuyển hóa nội sinh trong cơ thể^{29,30}. Khó khăn của hướng phát triển đưa quercetin và rutin có nguồn gốc từ dược liệu vào ứng dụng trong ngành dược, mỹ phẩm có thể được khắc phục bằng việc sử dụng niosome dưới vai trò là hệ thống dẫn truyền thuốc với những đặc tính ưu việt trong sự ổn định và khả năng hướng đích.

Mục tiêu của nghiên cứu này là bào chế dạng kết hợp giữa niosome và các flavonoid có tác dụng dược lý cao là quercetin và rutin. Cụ thể, nghiên cứu tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thành phần chất điện hoạt

không ion hóa và bản thân hoạt chất flavonoid đến quá trình tải hoạt chất vào cấu trúc niosome dựa vào việc đánh giá khả năng hình thành cấu trúc và hiệu suất bắt giữ của niosome.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hóa chất, nguyên liệu và thiết bị

Hóa chất, nguyên liệu

Rutin 94% (Sigma-Aldrich, 94%), quercetin (Sigma-Aldrich, 95%), các chất điện hoạt span 60 và tween 60 (Xilong Scientific, Trung Quốc), các dung môi ethanol, methanol, acetonitril và acid formic (Merck KgaA, Đức).

Thiết bị

Kính hiển vi hai mắt quang học (Olympus, Nhật Bản), bể siêu âm và bể cách thủy (Grant, Anh), máy khuấy từ gia nhiệt (Stuart, Mỹ), máy ly tâm lạnh (Hettich, Đức), HPLC (Shimadzu, Nhật Bản), cột C₁₈ Prodigy™ ODS-3 100 Å, 150 mm × 4,6 mm, 5 μm (Phenomenex, Mỹ).

Quy trình tổng hợp niosome bằng phương pháp tiêm ethanol

Điều chế cao diếp cá: Cân 5,0 ± 0,002 g mẫu bột diếp cá và chiết siêu âm với điều kiện tối ưu hóa để thu được cao chiết diếp cá giàu flavonoid bao gồm 60 mL ethanol 80% (tỉ lệ dược liệu:dung môi là 1/60 g/L) ở 60 °C trong 38 phút³¹. Dịch chiết được lọc qua giấy lọc 11 μm, rửa bằng ethanol 80% và cô đến gần khô thu được 575 mg cao chiết toàn phần.

Quy trình tổng hợp niosome với cao diếp cá, rutin hoặc quercetin:

Điều chế pha nước:

Đối với nguyên liệu là cao diếp cá: Cân khoảng 200 mg cao diếp cá hòa tan trong 90 mL ethanol 80%. Cho hỗn hợp đi qua màng lọc 0,45 μm. Sau đó, trộn đều 5 mL dung dịch đã pha với 5 mL nước cất.

Đối với rutin và quercetin: Cân lượng rutin hoặc quercetin theo Bảng 2 và hòa tan trong 6,5 mL ethanol 80%. Sau đó, cho hỗn hợp đi qua màng lọc 0,45 μm.

Điều chế pha hữu cơ: Chuẩn bị pha hữu cơ chứa cholesterol, chất điện hoạt không ion hoá trong khoảng 90 mL ethanol 80%, khuấy đến tan. Sau đó, thêm vào hỗn hợp 1000 mg PEG 40, khuấy đều và sử dụng sóng siêu âm để hỗ trợ quá trình hoà tan các thành phần trong pha hữu cơ. Chuyển vào bình định mức 100 mL, thêm ethanol 80 % đến vạch. Hàm lượng cholesterol và các chất điện hoạt được tính toán và trình bày ở Bảng 1 và Bảng 2 tương ứng với từng loại khảo sát để tổng hợp niosome.

Phối hợp hai pha: Thêm từ từ 10 mL pha hữu cơ vào pha nước bằng kim tiêm, vừa thêm vừa khuấy trên máy khuấy từ gia nhiệt. Các thông số cố định sử dụng trong quy trình tổng hợp niosome:

- Thể tích tiêm pha hữu cơ: 10 mL
- Thể tích pha nước: 10 mL
- Tốc độ khuấy: 500 vòng/phút
- Tốc độ tiêm pha hữu cơ vào pha nước: 5 mL/phút
- Nhiệt độ tổng hợp: 50-60°C
- Thời gian tổng hợp: 60 phút
- Hàm lượng cholesterol và chất diện hoạt theo tỉ lệ 1:1

Khảo sát ảnh hưởng của chất diện hoạt

Trong quá trình khảo sát ảnh hưởng của chất diện hoạt không ion hóa để tổng hợp niosome, sử dụng cao diếp cá giàu flavonoid làm nguyên liệu trong điều chế pha nước. Đối với pha hữu cơ, tỉ lệ mol giữa cholesterol và chất diện hoạt được cố định là 1:1. Yếu tố thay đổi là tỉ lệ mol giữa span 60 (S60) và tween 60 (T60) được thể hiện qua các thông số ở Bảng 1. Dựa vào mối tương quan giữa chỉ số HLB và hình thái của niosome để xác định sự hình thành của niosome khi có sự thay đổi của chất diện hoạt.

Khảo sát ảnh hưởng của hoạt chất đến hiệu suất bắt giữ của niosome

Khảo sát sự ảnh hưởng của rutin và quercetin trong quá trình tổng hợp niosome dựa vào sự thay đổi các thông số hàm lượng rutin và quercetin trong pha nước và sự cố định các hàm lượng của cholesterol, tween 60 và span 60 trong pha hữu cơ, được thể hiện qua Bảng 2. Các khảo sát được tiến hành với công thức cho kết quả tốt nhất trong khảo sát sự ảnh hưởng của chất diện hoạt.

Hiệu suất bắt giữ được xác định bằng phương pháp định lượng gián tiếp theo quy trình sau:

Sử dụng toàn bộ dung dịch sau tổng hợp vào ống falcon 50 mL. Tiến hành ly tâm lạnh tại tốc độ 4000 vòng/phút trong 30 phút. Dịch nổi sau ly tâm được lọc qua màng 0,45 μm và tiến hành phân tích bằng phương pháp HPLC.

Điều kiện phân tích HPLC

Pha tĩnh: Cột C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm).

Chương trình rửa giải: đẳng dòng

Pha động: methanol (A): acid formic 0,1% (B) = 75:25 (v:v).

Thời gian rửa giải: 0-6 phút.

Tốc độ dòng: 0,6 mL/phút.

Phát hiện: Detector PDA ở bước sóng 355 nm

Kết quả phân tích hàm lượng flavonoid bằng HPLC được thể hiện bằng phương pháp xây dựng đường chuẩn:

Hòa tan chất chuẩn quercetin và rutin trong bình định mức 5 mL bằng methanol tiêu chuẩn HPLC với nồng độ chính xác tương ứng lần lượt cho hai chất là 200,0 và 100,0 μg/mL. Chất chuẩn sau đó sẽ được pha loãng tương ứng với sáu mức nồng độ khác nhau bao gồm rutin (5; 10; 25; 50; 100; 200 μg/mL), và quercetin (0,2; 0,5; 1; 2; 4; 8 μg/mL). Mỗi nồng độ được tiêm lặp lại ba lần với điều kiện phân tích HPLC ở trên. Đường chuẩn được xây dựng bằng cách lập phương trình hồi quy tuyến tính giữa x là trung bình diện tích pic so với y là nồng độ chất chuẩn (μg/mL). Khoảng tuyến tính và hệ số tương quan (R²) được xác định. Giới hạn định lượng (LOQ) và giới hạn phát hiện (LOD) của mỗi flavonoid được tính toán dựa trên hệ số góc và độ lệch chuẩn của đường hồi quy. Hàm lượng rutin và quercetin tự do có trong dịch ly tâm sau đó được xác định dựa trên đường chuẩn đã xây dựng.

Xác định hiệu suất bắt giữ (H %) bằng phương pháp định lượng sử dụng HPLC theo công thức sau:

$H = \frac{\text{Khối lượng chất chuẩn ban đầu} - \text{Khối lượng chất chuẩn tự do}}{\text{Khối lượng chất chuẩn ban đầu}} \times 100\%$

Cụ thể:

$$H = \frac{M - C \times V}{M} \times 100\%$$

Trong đó:

M: khối lượng chất chuẩn ban đầu (mg)

C: hàm lượng chất chuẩn có trong dịch sau ly tâm (mg/mL)

V: thể tích dịch thu được sau quá trình tổng hợp (mL)

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát ảnh hưởng của chất diện hoạt không ion đến hình thái của niosome

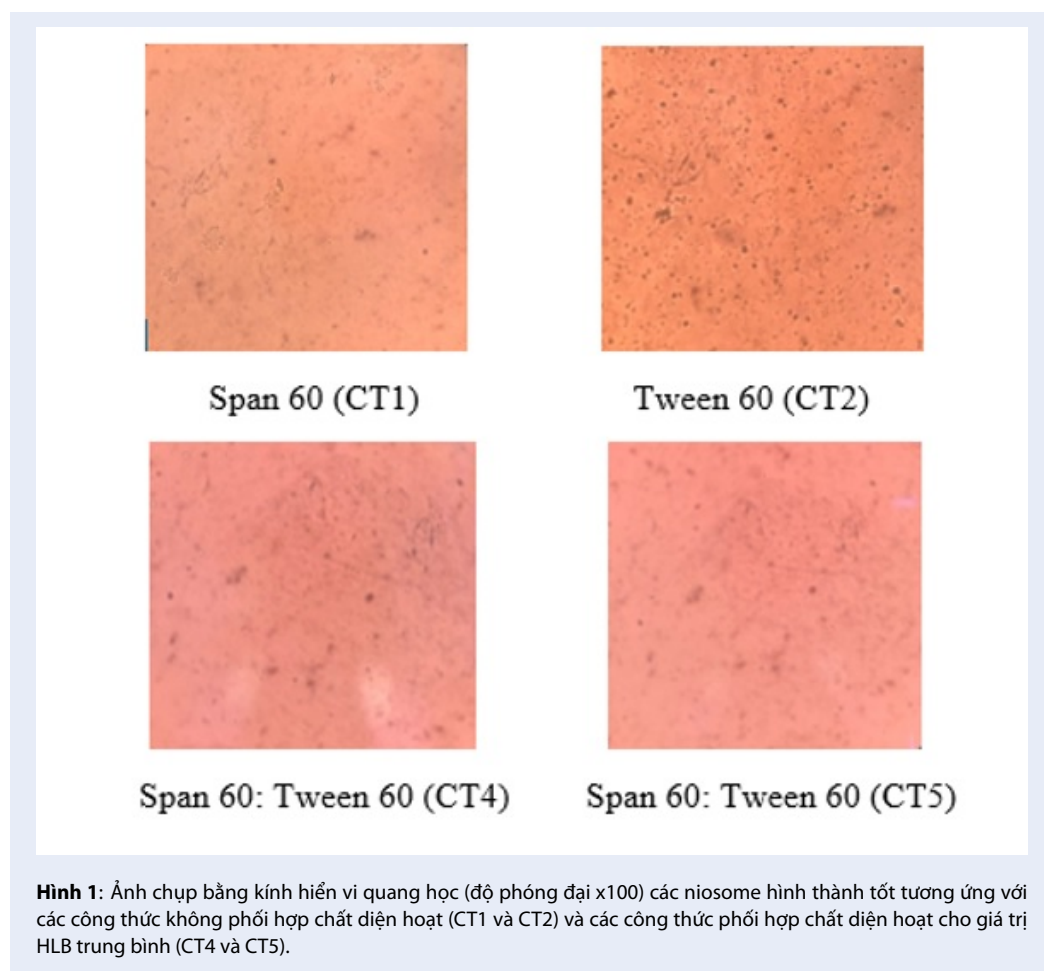
Từ kết quả khảo sát hình thái niosome hình thành tương ứng với các công thức từ CT1-CT7 được trình bày ở Bảng 3, có thể thấy chỉ số HLB là tiêu chí quan trọng khi lựa chọn thành phần chất diện hoạt cho công thức bào chế niosome. Sự kết hợp của 2 chất diện hoạt span 60 (HLB = 4,7) và tween 60 (HLB = 14,9) giúp tạo chỉ số HLB đạt vào khoảng giá trị của chất diện hoạt trung tính trong khoảng 8-10 ở CT4 (HLB = 8,78) và CT5 (HLB = 9,8). Trong khoảng giá trị này, khả năng tạo thành cấu trúc niosome là tối ưu với độ ổn định cao và mật độ dày, kết quả này tương tự so với những nghiên cứu về niosome trước

Bảng 1: Công thức khảo sát ảnh hưởng của chất điện hoạt không ion hóa

Công thức	CT1	CT2	CT3	CT4	CT5	CT6	CT7
Loại chất điện hoạt	S60	T60	S60:T60	S60:T60	S60:T60	S60:T60	S60:T60
Tỉ lệ mol	-	-	9:1	6:4	5:5	4:6	1:9
HLB	4,7	14,9	5,72	8,78	9,8	10,82	14

Bảng 2: Công thức khảo sát hàm lượng chất chuẩn rutin và quercetin với thông số cố định dựa trên CT4

Thông số	Công thức	R1	R2	R3	Q1	Q2	Q3
Cố định	Cholesterol	1160 mg					
	Tween 60	464 mg					
	Span 60	696 mg					
Khảo sát	Chất chuẩn	Rutin			Quercetin		
	Hàm lượng	20 mg	25 mg	30 mg	20 mg	25 mg	30 mg



Hình 1: Ảnh chụp bằng kính hiển vi quang học (độ phóng đại x100) các niosome hình thành tốt tương ứng với các công thức không phối hợp chất điện hoạt (CT1 và CT2) và các công thức phối hợp chất điện hoạt cho giá trị HLB trung bình (CT4 và CT5).

Bảng 3: Mô tả hình thái, cảm quan và kết quả thể chất của niosome tổng hợp ứng với từng công thức CT1-CT7

Công thức	CT1	CT2	CT3	CT4	CT5	CT6	CT7
Loại chất điện hoạt	S60	T60	S60:T60	S60:T60	S60:T60	S60:T60	S60:T60
Tỉ lệ mol	-	-	9:1	6:4	5:5	4:6	1:9
HLB	4,7	14,9	5,72	8,78	9,8	10,82	14
Thể chất	Dung dịch đục, ly tâm phần thành hai lớp: phần rắn và dịch trong	Dung dịch trong suốt, ly tâm không tách lớp	Dung dịch đục, ly tâm phần thành hai lớp: phần rắn và dịch trong	Dung dịch đục, ly tâm phần thành hai lớp: phần rắn và dịch trong	Dung dịch đục, ly tâm phần thành hai lớp: phần rắn và dịch trong	Dung dịch trong suốt, ly tâm không tách lớp	Dung dịch trong suốt, ly tâm không tách lớp
Khả năng hình thành cấu trúc niosome	Hình thành niosome tương đối tốt. Kích thước niosome khá đồng nhất, ổn định và mật độ không giảm nhiều khi quan sát trở lại sau ba ngày	Mật độ niosome dày đặc, tròn, đều. Kích thước niosome nhỏ hơn so với chất diện hoạt khác. Tuy nhiên, độ ổn định không cao, đồng tụ sau hai ngày. Vị trí niosome trong dung dịch khó xác định.	Hình thành được niosome. Tuy nhiên, có nhiều cấu trúc gần tròn, hoặc không tròn. Khả năng hình thành niosome không tốt ưu	Hình thành niosome tốt, cấu trúc tròn hoặc gần tròn. Kích thước niosome khá đồng nhất. Mật độ niosome dày	Hình thành niosome tương đối tốt. Kích thước niosome khá đồng nhất. Mật độ niosome dày nhưng không nhiều bằng CT4	Hình thành được niosome. Mật độ niosome không nhiều bằng CT4 và CT5. Kích thước niosome không đồng đều hoàn toàn.	Không hình thành được niosome

đây^{32,33}. Giá trị HLB đồng thời liên hệ mật thiết đến thông số đóng gói tới hạn CPP – là yếu tố mang ý nghĩa quyết định hình dạng phân tử niosome được tạo thành. HLB trong khoảng 8-10 tương ứng với giá trị CPP trong khoảng 0,5-1 cần thiết cho sự hình thành cấu trúc bao màng kép hình cầu đặc trưng của niosome^{4,34}.

Ngoài ra, việc kết hợp sử dụng span 60 và tween 60 giúp tận dụng được những ưu thế riêng biệt của từng chất diện hoạt. Cụ thể, khi chỉ sử dụng Span 60 sẽ cho HLB thấp, cấu trúc đầu ưa nước nhỏ và kỵ nước lớn dẫn đến niosome hình thành khó bị kết tụ nhưng kích thước tương đối lớn như ở CT1 và CT3, mặt khác, khi chỉ sử dụng tween 60 sẽ cho HLB cao, niosome hình thành dễ bị kết tụ nhưng có kích thước nhỏ và đồng nhất³⁵ như trong CT2 và CT6. Như kết quả quan sát được theo Hình 1, sự phối hợp công thức đạt hiệu quả tối đa trong CT4 và CT5, cho ra kết quả là cấu trúc niosome vừa có kích thước nhỏ, giúp cấu trúc dễ dàng xâm nhập vào màng tế bào, tăng khả năng hấp thụ thuốc của tế bào, vừa khó kết tụ và mang độ ổn định cao, phù hợp cho mục đích cung cấp tác dụng kéo dài cũng như lưu trữ bảo quản^{36,37}. Trong khảo sát tiếp theo, nhóm sử dụng công thức CT4 để đánh giá ảnh hưởng của hoạt chất đến hiệu suất tổng hợp niosome.

Khảo sát ảnh hưởng của hoạt chất đến hiệu suất tổng hợp niosome

Đường chuẩn quercetin và rutin

Các thông số về phương trình đường chuẩn, hệ số tương quan R^2 và khoảng tuyến tính của rutin và quercetin được thể hiện trong Bảng 4. Biểu đồ của hai đường chuẩn thể hiện mối quan hệ tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chất chuẩn có hệ số tương quan $R^2 \geq 0,9997$ (Hình 2 và 3). Các giá trị giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng cho từng đường chuẩn cũng được ghi nhận. Các phương trình được lược bỏ hệ số b do sự khác biệt về phương sai và độ lệch chuẩn không đáng kể so với khi không lược bỏ. Nói cách khác, hệ số b không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Kết quả hiệu suất tổng hợp của niosome

Trong phần khảo sát hiệu suất tổng hợp niosome, nhóm nghiên cứu thay thế hoạt chất tải vào niosome bằng chất chuẩn rutin và quercetin thay vì cao điệp cá. Hạn chế trong khả năng tải cao điệp cá vào niosome được khắc phục thông qua việc sử dụng hoạt chất có độ tinh khiết cao. Đồng thời, thiết kế quy trình khảo sát một yếu tố với việc thay đổi hoạt chất chuẩn trên công thức CT4 cho kết quả cho phép đơn giản hóa khả năng đánh giá hiệu suất bắt giữ bằng phương pháp HPLC (Bảng 5).

Hiệu suất bắt giữ (H%) thể hiện lượng hoạt chất thực tế được bao bọc thành công trong các túi niosome trên tổng lượng hoạt chất được sử dụng trong quá trình bào chế. Hàm lượng và cấu trúc hoạt chất khác nhau trong công thức bào chế ảnh hưởng khác nhau đến hiệu suất bắt giữ. Dựa vào kết quả hiệu suất tổng hợp được trình bày ở Bảng 5, hiệu suất bắt giữ cao nhất rutin và quercetin đạt được lần lượt là 20,5% và 60,8% tương ứng với hàm lượng hoạt chất 25 mg (công thức R2) và 20 mg (công thức Q1). Điều này cho thấy quercetin cần khối lượng nhỏ hơn để cho ra hiệu suất bắt giữ lớn hơn.

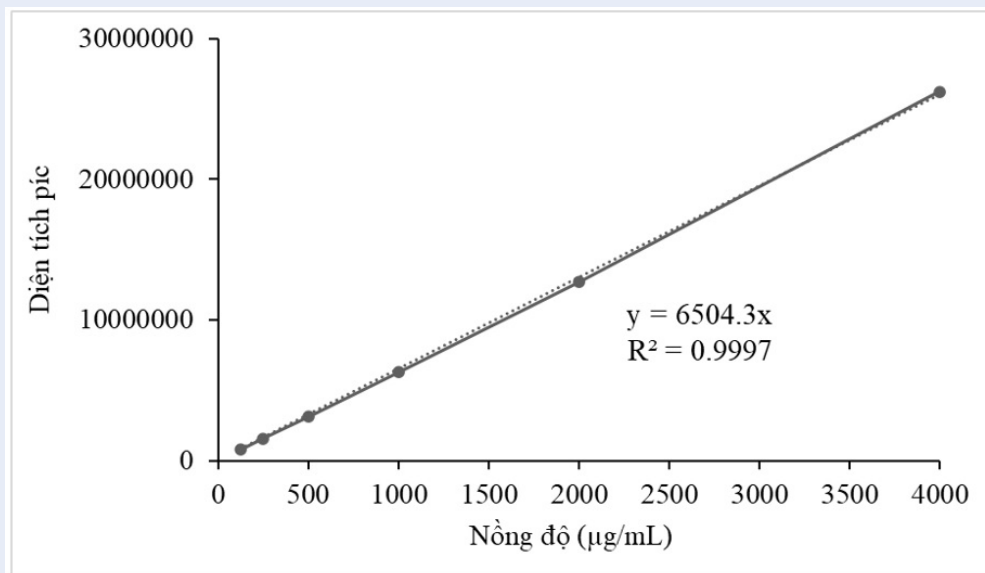
Sự thay đổi hàm lượng hoạt chất ảnh hưởng đến khả năng tải hoạt chất vào cấu trúc niosome. Khi hoạt chất được tải vào niosome, hàm lượng hoạt chất được bắt giữ vào niosome tăng lên, nhưng sự gia tăng này có giới hạn, vượt quá mức giới hạn bão hòa này thì hoạt chất sẽ tách ra và kết tinh trở lại và làm hiệu suất bắt giữ bị giảm³⁸. Theo như kết quả khảo sát, các công thức sử dụng hàm lượng flavonoid cao nhất là R3 và Q3 đều không mang lại hiệu suất tối ưu. Khi so sánh tương quan giữa hai nhóm công thức có thể nhận thấy quercetin có hiệu suất bắt giữ cao hơn so với rutin. Điều này có thể giải thích bởi sự khác biệt trong cấu trúc hóa học của hai flavonoid. Quá trình xâm nhập của quercetin và rutin vào cấu trúc niosome đều dựa trên liên kết hydro, nhưng về mặt kích thước phân tử như Hình 4, quercetin ít công kênh hơn nên dễ dàng đi vào trong phân tử niosome vì rutin có nhóm glycosid ở vị trí C3 tạo ra hiệu ứng cản trở không gian. Đáng chú ý là dạng phối hợp niosome-quercetin có tác dụng giải phóng kéo dài làm giảm thời gian sử dụng thuốc, giảm độc tính và duy trì nồng độ thuốc hiệu quả. Không chỉ thế, khi quercetin liên kết với niosome sẽ cho kích thước nhỏ hơn so với niosome chưa tải hoạt chất³⁹, điều này thể hiện quercetin là phân tử có ái lực cao với các chất diện hoạt không ion hóa cấu thành nên niosome, làm giảm kích thước túi và ổn định lớp màng kép⁴⁰. Mặt khác, sự tương tác của quercetin với phần đầu ưa nước của chất diện hoạt làm trung hòa điện tích âm trên bề mặt niosome nhờ đó làm ổn định cấu trúc niosome^{41,42}.

KẾT LUẬN

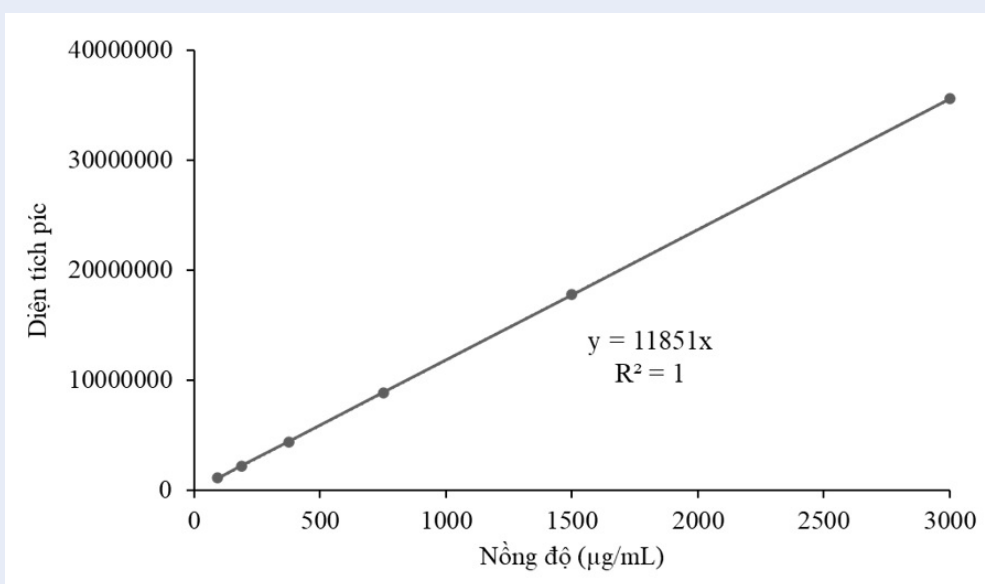
Nghiên cứu đã thực hiện bào chế thành công niosome chứa quercetin và rutin bằng phương pháp tiêm ethanol. Sau khi tiến hành khảo sát, niosome được tạo thành có dạng tròn và mật độ tương đối đồng đều tại giá trị HLB trong khoảng 8-10 với công thức được sử dụng là hỗn hợp span 60 và tween 60 với tỉ lệ 6:4. Thêm vào đó, nghiên cứu còn cho thấy rằng công thức sử dụng tỉ lệ này có hiệu suất bắt giữ quercetin (60,8%) tốt hơn khoảng ba lần so với rutin (20,5%) với hàm

Bảng 4: Đường chuẩn biểu diễn tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chất chuẩn của quercetin và rutin

Chất chuẩn	Đường chuẩn	R ²	Khoảng tuyến tính (µg/mL)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	SD
Rutin	y = 6504.3x	0,9997	5-200	1,41	5,26	15299.58
Quercetin	y = 11851x	1,0000	0,2-8	0,09	0,22	389,53



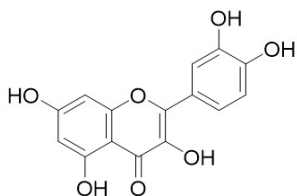
Hình 2: Biểu đồ đường chuẩn rutin có phương trình tuyến tính là: $y = 6504.3x$, với x là nồng độ rutin (µg/mL) và y là diện tích pic.



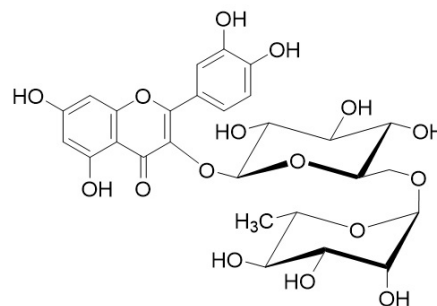
Hình 3: Biểu đồ đường chuẩn quercetin có phương trình tuyến tính là: $y = 11851x$, với x là nồng độ rutin (µg/mL) và y là diện tích pic.

Bảng 5: Kết quả hiệu suất tổng hợp niosome chứa rutin và quercetin dựa trên công thức khảo sát hàm lượng chất chuẩn.

Công thức	R1	R2	R3	Q1	Q2	Q3
M (mg)	20	25	30	20	25	30
C (mg/mL)	0,994	1,086	1,557	0,426	0,605	0,721
V (mL)	18,5	18,3	18,4	18,4	18,2	18,4
H%	8,05	20,5	4,50	60,8	55,9	55,7



Hình 4.a



Hình 4.b

Hình 4: Cấu trúc hóa học của quercetin (hình 4.a) và rutin (hình 4.b)

lượng từ 20-25 mg chất chuẩn. Độ hòa tan tương đồng của quercetin trong những môi trường hydrat hóa khác nhau là tiền đề cho khả năng kiểm soát và nâng cao hiệu suất tải cao chiết điệp cá vào niosome.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số DN2022-44-01.

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

CPP: Thông số đóng gói tới hạn (Critical packing parameter)

HLB: Chỉ số cân bằng dầu nước (Hydrophilic-lipophilic balance)

HPLC: Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High-performance liquid chromatography)

R2: Hệ số xác định (Coefficient of determination)

SD: Độ lệch chuẩn (Standard Deviation)

LOD: Giới hạn phát hiện (Limit of detection)

LOQ: Giới hạn định lượng (Limit of quantification)

PEG: Polyethyleneglycol

PDA: Dây di-ốt quang (Photodiode array)

Tc : Nhiệt độ chuyển pha (Transition temperature)

S60: Span 60

T60: Tween 60

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Nhóm tác giả cam kết rằng không có xung đột lợi ích khi thực hiện nghiên cứu này.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Lê Minh Trí và Nguyễn Minh Hiền đưa ra ý tưởng, hình thành và thiết kế tất cả các thí nghiệm. Đỗ Bình Minh và Nguyễn Minh Hiền tiến hành các thí nghiệm. Nguyễn Minh Hiền, Lê Tự Mạnh Huy, Nguyễn Trần Phước Thuận chịu trách nhiệm thu thập, phân tích và xử lý số liệu. Lê Minh Trí, Nguyễn Minh Hiền, Lê Tự Mạnh Huy, Nguyễn Trần Phước Thuận tham gia viết bản thảo và chỉnh sửa nội dung bản thảo. Tất cả các tác giả đã đọc và duyệt bản thảo cuối cùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Allen TM. Liposomal Drug Formulations. *Drugs*. 1998;56(5):747-756; Available from: <https://doi.org/10.2165/00003495-199856050-00001>.
- Din FU, Aman W, Ullah I, Qureshi OS, Mustapha O, Shafique S, et al. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *International journal of nanomedicine*. 2017;12:7291-7309; Available from: <https://doi.org/10.2147/IJN.S146315>.
- Kazi KM, Mandal AS, Biswas N, Guha A, Chatterjee S, Behera M, et al. Niosome: A future of targeted drug delivery systems. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2010;1(4):374-380; Available from: <https://doi.org/10.4103/01110-5558.76435>.

4. Gharbavi M, Amani J, Kheiri-Manjili H, Danafar H, Sharafi A. Niosome: A Promising Nanocarrier for Natural Drug Delivery through Blood-Brain Barrier. *Advances in pharmacological sciences*. 2018;2018:6847971; Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/6847971>.
5. Kapuścińska A, Olejnik A, Nowak I. Chapter 8 - Nanocapsules as carriers of active substances. In: Grumezescu AM, editor. *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*: William Andrew Publishing; 2016. p. 175-199; Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42868-2.00008-5>.
6. Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International journal of pharmaceutics*. 2003;258(1-2):141-151; PMID: 12753761. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00183-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00183-2).
7. Pardakhty A, Moazeni E, Varshosaz J, Hajhashemi V, Rouholamini Najafabadi A. Pharmacokinetic study of niosome-loaded insulin in diabetic rats. *Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. 2011;19(6):404-411;.
8. Khoei S, Yaghoobian M. Chapter 6 - Niosomes: a novel approach in modern drug delivery systems. In: Andronescu E, Grumezescu AM, editors. *Nanostructures for Drug Delivery*: Elsevier; 2017. p. 207-237; Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46143-6.00006-3>.
9. Guan L, Liu X, Xiao F, Zeng M, Chen Y. Characterization of Elastic Niosomes Prepared with Various Nonionic Surfactants for Lidocaine Hydrochloride Transdermal Delivery. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*. 2016;8(12):1033-1039; Available from: <https://doi.org/10.1166/nl.2016.2274>.
10. Nematollahi MH, Pardakhty A, Torkezadeh-Mahanai M, Mehra-bani M, Asadikaram G. Changes in physical and chemical properties of niosome membrane induced by cholesterol: a promising approach for niosome bilayer intervention. *RSC Advances*. 2017;7(78):49463-49472; Available from: <https://doi.org/10.1039/C7RA07834J>.
11. Nasser B. Effect of cholesterol and temperature on the elastic properties of niosomal membranes. *International journal of pharmaceutics*. 2005;300(1):95-101; PMID: 16006080. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.009>.
12. Zarei M, Norouzian D, Honarvar B, Mohammadi M, Ebrahimi H, Akbarzadeh A. Paclitaxel Loaded Niosome Nanoparticle Formulation Prepared via Reverse Phase Evaporation Method: An in vitro Evaluation. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 2013;16:295-298; PMID: 24498794. Available from: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.295.298>.
13. Yeo PL, Lim CL, Chye SM, Kiong Ling AP, Koh RY. Niosomes: a review of their structure, properties, methods of preparation, and medical applications. *Asian Biomedicine*. 2017;11(4):301-314; Available from: <https://doi.org/10.1515/abm-2018-0002>.
14. Ag Seleci D, Maurer V, Stahl F, Scheper T, Garnweitner G. Rapid Microfluidic Preparation of Niosomes for Targeted Drug Delivery. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(19); PMID: 31546717. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms20194696>.
15. Fu J, Dai L, Lin Z, Lu H. *Houttuynia cordata* Thunb.: A Review of Phytochemistry and Pharmacology and Quality Control. *Chinese Medicine*. 2013;04:101-123; Available from: <https://doi.org/10.4236/cm.2013.43015>.
16. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*. 2016;5:e47; PMID: 28620474. Available from: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
17. Patel K, Patel DK. Chapter 26 - The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. In: Watson RR, Preedy VR, editors. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases (Second Edition)*: Academic Press; 2019. p. 457-479; PMID: 31126730. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00026-X>.
18. Anand David AV, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacognosy reviews*. 2016;10(20):84-89; PMID: 28082789. Available from: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>.
19. Alarcón de la Lastra C, Martín MJ, Motilva V. Anticancer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. *Pharmacology*. 1994;48(1):56-62; PMID: 8309988. Available from: <https://doi.org/10.1159/000139162>.
20. Iang P, Burczynski F, Campbell C, Pierce G, Austria JA, Briggs CJ. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*. 2007;40(3):356-364; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.009>.
21. Choi GN, Kim JH, Kwak JH, Jeong C-H, Jeong HR, Lee U, et al. Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. *Food Chemistry*. 2012;132(2):1019-1024; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.089>.
22. Nassiri-Asl M, Zamansoltani F, Javadi A, Ganjvar M. The effects of rutin on a passive avoidance test in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2010;34(1):204-207; PMID: 19914327. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2009.11.006>.
23. Salvamani S, Gunasekaran B, Shaharuddin NA, Ahmad SA, Shukor MY. Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *BioMed research international*. 2014;2014:480258; PMID: 24971331. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014/480258>.
24. Akan Z, Garip AI. Antioxidants may protect cancer cells from apoptosis signals and enhance cell viability. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2013;14(8):4611-4614; PMID: 24083712. Available from: <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.8.4611>.
25. Vásquez-Garzón VR, Arellanes-Robledo J, García-Román R, Aparicio-Rautista DI, Villa-Treviño S. Inhibition of reactive oxygen species and pre-neoplastic lesions by quercetin through an antioxidant defense mechanism. *Free radical research*. 2009;43(2):128-137; PMID: 19115120. Available from: <https://doi.org/10.1080/10715760802626535>.
26. Caparica R, Júlio A, Araújo MEM, Baby AR, Fonte P, Costa JG, et al. Anticancer Activity of Rutin and Its Combination with Ionic Liquids on Renal Cells. *Biomolecules*. 2020;10(2); PMID: 32033222. Available from: <https://doi.org/10.3390/biom10020233>.
27. Elmowafy E, El-Deirany MO, Biondo F, Tiboni M, Casettari L, Soliman ME. Quercetin Loaded Monolaurate Sugar Esters-Based Niosomes: Sustained Release and Mutual Antioxidant-Hepatoprotective Interplay. *Pharmaceutics*. 2020;12(2); PMID: 32050489. Available from: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020143>.
28. Carbonaro M, Grant G. Absorption of quercetin and rutin in rat small intestine. *Annals of nutrition & metabolism*. 2005;49(3):178-182; Available from: <https://doi.org/10.1159/000086882>.
29. Guruvayoorappan C, Girija K. Antiangiogenic Effect of Rutin and its Regulatory Effect on the Production of VEGF, IL-1 β and TNF- α in Tumor Associated Macrophages. *Journal of Biological Sciences*. 2007;7; Available from: <https://doi.org/10.3923/jbs.2007.1511.1519>.
30. Cai EP, Lin JK. Epigallocatechin gallate (EGCG) and rutin suppress the glucotoxicity through activating IRS2 and AMPK signaling in rat pancreatic beta cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(20):9817-9827; PMID: 19803520. Available from: <https://doi.org/10.1021/jf902618v>.
31. Nguyen M, Hien, Truc Chi H, City M, Hien N, Huong T, et al. Application of response surface methodology to optimize the ultrasound-assisted flavonoid-rich extraction of fish mint (*Houttuynia cordata* Thunb.). 2021:1994-2003; Available from: <http://dx.doi.org/10.32508/stdj.v24i3.2535>.
32. Kumar GP, Rajeshwarrao P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery-an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2011;1(4):208-219; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actph.2011.04.001>.

- org/10.1016/j.apsb.2011.09.002.
33. Nowroozi F, Almasi A, Javidi J, Haeri A, Dadashzadeh S. Effect of Surfactant Type, Cholesterol Content and Various Downsizing Methods on the Particle Size of Niosomes. Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR. 2018;17(Suppl2):1-11;
 34. Rodríguez-Abreu C. On the Relationships between the Hydrophilic-Lipophilic Balance and the Nanoarchitecture of Nonionic Surfactant Systems. Journal of Surfactants and Detergents. 2019;22;Available from: <https://doi.org/10.1002/jsde.12258>.
 35. Basiri L, Rajabzadeh G, Bostan A. Physicochemical properties and release behavior of Span 60/Tween 60 niosomes as vehicle for α -Tocopherol delivery. LWT. 2017;84:471-478;Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.009>.
 36. Verma S, Singh S, Syan N, Mathur P, Valecha V. Nanoparticle vesicular systems: A versatile tool for drug delivery. J Chem Pharm Res. 2010;2:496-509;
 37. Gupta M, Vaidya B, Mishra N, Vyas SP. Effect of Surfactants on the Characteristics of Fluconazole Niosomes for Enhanced Cutaneous Delivery. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology. 2011;39(6):376-384;PMID: 21951195. Available from: <https://doi.org/10.3109/10731199.2011.611476>.
 38. Balakrishnan P, Shanmugam S, Lee WS, Lee WM, Kim JO, Oh DH, et al. Formulation and in vitro assessment of minoxidil niosomes for enhanced skin delivery. International journal of pharmaceuticals. 2009;377(1-2):1-8;PMID: 19394413. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.020>.
 39. Lu B, Huang Y, Chen Z, Ye J, Xu H, Chen W, et al. Niosomal Nanocarriers for Enhanced Skin Delivery of Quercetin with Functions of Anti-Tyrosinase and Antioxidant. Molecules (Basel, Switzerland). 2019;24(12);PMID: 31238562. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules24122322>.
 40. Kumar N, Goindi S. Statistically designed nonionic surfactant vesicles for dermal delivery of itraconazole: Characterization and in vivo evaluation using a standardized Tinea pedis infection model. International journal of pharmaceuticals. 2014;472(1):224-240;PMID: 24954723. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.030>.
 41. Mukherjee B, Patra B, Layek B, Mukherjee A. Sustained release of acyclovir from nano-liposomes and nano-niosomes: an in vitro study. International journal of nanomedicine. 2007;2(2):213-225;
 42. Elmi N, Ghanbarzadeh B, Ayaseh A, Sahraee S, Heshmati MK, Hoseini M, et al. Physical properties and stability of quercetin loaded niosomes: Stabilizing effects of phytosterol and polyethylene glycol in orange juice model. Journal of Food Engineering. 2021;296:110463;Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110463>.

Evaluating some factors affecting the loading process of quercetin and rutin into the niosome by ethanol injection method

Nguyen Minh Hien^{1,*}, Do Binh Minh¹, Le Tu Manh Huy¹, Nguyen Tran Phuoc Thuan¹, Le Minh Tri^{1,2,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

Niosome is a nanoparticle system with high application value and suitable for the current trend of drug delivery system development with many advantages in controllability, stable release, and target orientation. The active compounds rutin and quercetin have diverse pharmacological effects, although there are many challenges in application. This study aims to investigate the factors affecting the loading capacity of the bioactive compounds in the synthesis of niosomes by the ethanol injection method. Based on the investigation of the influence of surfactants as well as rutin and quercetin content to evaluate the ability to form structure and entrapment efficiency of niosomes. The resulting niosome has a round shape and a relatively uniform density, with the formula used, being a mixture of span 60 and tween 60 with a ratio of 6:4. The optimized niosomes using this ratio have a quercetin entrapment efficiency of 60.8% and rutin reached 20.5% with the content of 20-25 mg of the standards. The combination of two surfactants, span 60 and tween 60, creates a niosomal structure that is both small in size, difficult to agglomerate and has high stability, suitable for providing prolonged action and storage. This formulation shows that quercetin had more than three times higher capture efficiency than rutin.

Key words: Niosome, ethanol injection, span 60, tween 60, quercetin, rutin

¹School of Medicine, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam

²Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam

Correspondence

Nguyen Minh Hien, School of Medicine, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam

Email: nmhien@medvnu.edu.vn

Correspondence

Le Minh Tri, School of Medicine, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam

Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, Vietnam

Email: leminhtri@ump.edu.vn

History

- Received: 03-12-2022
- Accepted: 28-4-2023
- Published: 15-5-2023

DOI : <https://doi.org/10.32508/stdjet.v6i1.1056>



Cite this article : Hien N M, Minh D B, Huy L T M, Thuan N T P, Tri L M. Evaluating some factors affecting the loading process of quercetin and rutin into the niosome by ethanol injection method. *Sci. Tech. Dev. J. – Engineering and Technology*; 2023, 6(1):1798-1808.