

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA CỦA NHỮNG TƯƠNG NANO DIHYDROQUERCETIN

Đến tòa soạn 16-03-2023

Nguyễn Thị Mai Hương*, Lê Thị Thu Hương, Phan Thị Thủy, Lê Thị Hương,
Nguyễn Thanh Bình, Bạch Thành Sơn, Nguyễn Trọng Tĩnh

Viện Vật Lý, Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam,

18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

*Email: maihuong@iop.vast.vn

SUMMARY

INVESTIGATION OF *in vitro* ANTI-OXIDATION ACTIVITY OF DIHYDROQUERCETIN NANOEMULSION

*Dihydroquercetin (DHQ), also known as taxifolin, is a flavonoid and commonly found in many plants. DHQ has been documented to have powerful antioxidant activity and many beneficial properties for human health. However, its low solubility and bioavailability are major obstacles to biomedical applications. In the present study, a DHQ nanoemulsion formulation was prepared by self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) technique to overcome these disadvantages. The obtained nanoemulsion system was also evaluated for its microscopic properties, and *in vitro* antioxidant activity against artificial radical ABTS* (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), protect cells. Measurement results showed that the DHQ nanoemulsion was successfully synthesized with typical mean droplet sizes from 9 to 11 nm. The *in vitro* experiments on antioxidant activities against ABTS radical indicated that both DHQ unencapsulated form and its nanoemulsion effectively inhibit the development of ABTS* free radical, however, DHQ nanoemulsion inhibits better than the control Trolox with the IC₅₀ values (μg/ml) of DHQ unencapsulated form, its nanoemulsion and Trolox are respectively 474,2; 238,5; 331. The results of this study provide useful information on the potential use of DHQ nanoemulsion as a promising agent in the tumor treatment caused by free radicals and the development of a drug for the beings' aims.*

Keywords: dihydroquercetin, nanoemulsion, antioxidant, *in vitro*, solubility

1. GIỚI THIỆU

Trong vài thập kỉ gần đây, các hợp chất có hoạt tính sinh học có vai trò then chốt trong việc ức chế, làm giảm triệu chứng bệnh như ung thư, viêm, bệnh tim mạch và thoái hóa thần kinh [1]. Trong số đó, flavonoid đã được xác định là hợp chất có ích lợi đối với sức khỏe con người. Đây là hợp chất phenolic được hydroxyl hóa gồm một vòng bezo-γ-pyrone [2].

Dihydroquercetin (DHQ), còn được gọi là taxifolin (5,7,3',4'-flavanonol), thuộc phân lớp flavanonols của flavonoids, có hoạt tính chống oxy hóa và kháng viêm nhờ có các gốc hydroxyl trong cấu trúc [3]. Hoạt tính chống oxy hóa làm giảm quá trình thoái hóa ban đầu của tế bào gây ra bởi các gốc tự do và các loại oxy phản ứng (reactive oxygen species – ROS), từ đó bảo vệ chống lại sự phá hủy tế bào [4-7] là một trong những lý do hình thành khối

u ác tính. DHQ có nguồn gốc từ tự nhiên hoặc tổng hợp, nhưng ngày nay, nhu cầu sử dụng các sản phẩm từ tự nhiên ngày càng lớn do sự lo ngại khi lạm dụng các chất phụ gia tổng hợp sẽ ảnh hưởng tới cơ thể. Hoạt chất DHQ có nhiều trong các loại thực vật như cam quýt, hành tây, cây kế sữa, vỏ thông [8, 9], trong đó hoạt chất được tách chiết với hàm lượng cao (lên đến 4,5%) từ cây tùng Siberia (*Larix sibirica*) hoặc cây tùng *L. gmelinii* [10]. Chúng được xem là nguồn cung cấp quan trọng để tạo nên những sản phẩm dược liệu và nguyên liệu làm thuốc chống oxy hóa.

Mặc dù có nhiều tác dụng sinh học và đặc tính dược lý nhưng việc sử dụng DHQ trong dược phẩm và các sản phẩm tăng cường sức khỏe phần lớn bị hạn chế do sinh khả dụng thấp liên quan tới khả năng hòa tan trong nước của DHQ kém (0,1% tại nhiệt độ phòng) [11]. Trở ngại này có thể được giải quyết bằng cách giảm kích thước hạt của hoạt chất hoặc đưa về dạng nano. Trong những năm gần đây, việc điều chế nhũ tương nano sử dụng hệ phân phối thuốc tự tạo nhũ tương (self-nanoemulsifying drug delivery system - SNEDDS) được coi là một kỹ thuật lý tưởng để tăng cường hấp thu hoạt chất qua đường uống và tăng sinh khả dụng của nhiều loại thuốc khó tan trong nước [12, 13].

Dựa trên một số tài liệu tham khảo và hiểu biết của chúng tôi, sinh khả dụng liên quan tới độ tan của nhũ tương nano DHQ và hoạt tính chống oxy hóa của nó chưa được nghiên cứu chuyên sâu trong nước. Mục đích của bài báo này là tạo quy trình chế tạo hệ nhũ tương nano chứa DHQ có chiết xuất tự nhiên từ cây tùng Siberia (*Larix sibirica*), đánh giá một số tính chất vi mô và đặc tính chống oxy hóa *in vitro*. Các tá dược như dầu đậu tương, polysorbate và polyethylene glycol được dùng để làm tăng độ hòa tan và sinh khả dụng đường uống của hoạt chất. Bên cạnh đó, phương pháp đánh giá khả năng chống gốc oxy hóa thông qua năng lực khử gốc ABTS* (ABTS - 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)

giúp khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của bột DHQ và nhũ tương nano của nó.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU, THỰC NGHIỆM

2.1. Vật liệu

Bột DHQ (hàm lượng DHQ $\geq 95\%$, tên thương mại: flavitol) được chiết xuất từ cây tùng Siberia (*Larix sibirica*) của nước Nga; lecithin đậu tương 99% loại dược phẩm của Parul Trading Co., Ấn Độ. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) của Sigma-Aldrich, $K_2S_2O_8$ của Fisher. Các dung môi: polyethylene glycol 400 (PEG-400), cồn ethanol 99,5% và polysorbate 80 (Tween 80).

2.2. Chế tạo hệ nhũ tương nano DHQ

Quy trình tạo hệ nhũ tương nano chứa hoạt chất DHQ (dihydroquercetin loaded self-nano-emulsifying drug delivery systems - SNEDDS) được tiến hành theo ba bước:

Bước 1: lấy 10,5g bột DHQ hòa tan trong 200mL cồn tuyệt đối, đun trong cốc 500 mL, gia nhiệt $60^{\circ}C$, khuấy đều trên máy khuấy từ trong 60 phút đến khi tan hết. Tiếp theo bổ sung 15g lecithin đậu tương vào dung dịch trên, khuấy đều trong 60 phút, hỗn hợp được tiếp tục rung siêu âm trong 60 phút, ta được dung dịch A.

Bước 2: pha 85g hỗn hợp gồm Tween 80: PEG 400: nước cất theo tỉ lệ 2:1:1, gia nhiệt lên $60^{\circ}C$ khuấy đều trên máy khuấy từ trong 30 phút, tạo hệ đồng nhất, ta có dung dịch B.

Bước 3: nhỏ giọt từ từ dung dịch B vào dung dịch A, gia nhiệt từ từ lên $80^{\circ}C$ (tốc độ nâng nhiệt $2^{\circ}C/phút$), khi đạt nhiệt độ tiếp tục khuấy trong 4 giờ cho đến khi tạo thành hệ đồng nhất dạng gel có màu nâu.

2.3. Đánh giá trực quan

Để đánh giá các đặc tính tự nhũ hóa, hỗn hợp nhũ tương DHQ sau khi được chế tạo sẽ được pha loãng với nước cất đựng trong bình thủy tinh ở nhiệt độ phòng, dung dịch được khuấy nhẹ bằng tay. Các quan sát quang học được thực hiện để xác nhận việc chế tạo hệ truyền

dẫn thuốc tự nhũ hóa nano (SNEDDS). Các thông số gồm độ trong suốt quang học và tính đồng nhất của dung dịch nhũ tương nano khi không có sự tách pha và lắng đọng cho thấy tính đồng nhất của kích thước hạt đảm bảo sự phân bố DHQ đồng đều trong sản phẩm và quá trình điều chế được hoàn thiện.

2.4. Phân tích kích thước hạt và phương pháp hấp thụ UV-Vis

Kích thước giọt trung bình, sự phân bố và chỉ số đa phân tán (polydispersity index - PDI) của nhũ tương nano được xác định bằng kỹ thuật tán xạ ánh sáng động (dynamic light scattering - DLS) thông qua máy phân tích kích thước hạt (máy Zetasizer Nano-S90 của Malvern Instruments, Vương quốc Anh). Đối với phép đo, pha loãng hỗn hợp nhũ tương bằng nước cất (tỉ lệ 1:200) cho đến khi dung dịch đồng nhất rồi cho vào cuvet polystyrene (loại dùng một lần). Các nghiên cứu kích thước hạt được tiến hành ở nhiệt độ 25°C. Tất cả các phép đo được thực hiện với độ nhớt là 0,8872 cP, chỉ số khúc xạ của nước là 1,330, mỗi phép đo được đo 3 lần đã được cài đặt trước trong phần mềm đo.

Phổ hấp thụ đặc trưng của DHQ được đo trên máy quang phổ UV-Vis model AvaSpec-ULS2048x16 với dải bước sóng từ 200 đến 1150 nm và độ phân giải 1 nm.

2.5. Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*

Đánh giá khả năng chống gốc tự do ABTS* là phương pháp dựa trên khả năng làm giảm độ hấp thụ của gốc tự do cation ABTS* bởi các hoạt chất có hoạt tính chống oxy hóa ở bước sóng 734 nm. Cường độ màu của ABTS* tỷ lệ nghịch với nồng độ chất chống oxy hóa và thời gian phản ứng.

Pha dung dịch thuốc thử như sau: lấy 5 mL dung dịch ABTS có nồng độ 7 mM cho phản ứng với 5 mL dung dịch K₂S₂O₈ nồng độ 2,45 mM (tỉ lệ 1:1 theo thể tích), phản ứng diễn ra trong bóng tối trong 12-16 giờ ở nhiệt độ phòng, thu được dung dịch hoạt hóa ABTS* (dung dịch Stock). Pha loãng dung dịch Stock

bằng nước cất đạt đến độ hấp thụ 0,7±0,02 ở 734 nm.

Bột DHQ 95% và nhũ tương nano DHQ được pha loãng ở những nồng độ thích hợp, sau đó hút 20 µL từng mẫu cho phản ứng với 2 mL thuốc thử ABTS* và để trong bóng tối trong 5 phút, đo độ hấp thụ quang học ở 734 nm. Mẫu blank được thay bằng 20 µL nước cất. Mẫu chứng dương được sử dụng để so sánh là Trolox (một chất tương tự tan trong nước của vitamin E được thương mại hóa bởi Sigma-Aldrich).

Hoạt tính chống oxy hóa được xác định theo công thức:

$$IC(\%) = \left(1 - \frac{A_{sample}}{A_{blank}}\right) \times 100$$

Trong đó: IC (%): hoạt tính ức chế gốc tự do ABTS*; *A_{sample}*: độ hấp thụ quang của mẫu thử (n=3) (mẫu đối chứng dương, bột DHQ và nhũ tương nano DHQ) tại bước sóng 734 nm; *A_{blank}*: độ hấp thụ quang của mẫu nước cất (n=3) tại bước sóng 734 nm.

Từ giá trị IC (%) và nồng độ mẫu được vẽ đường hồi quy tuyến tính, từ đó tính được IC₅₀ (khả năng ức chế được 50% gốc ABTS* của mẫu). Giá trị IC₅₀ càng thấp tương ứng với hoạt tính chống oxy hóa của mẫu thử càng cao và ngược lại.

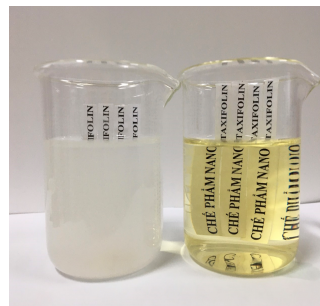
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chế tạo hệ nhũ tương nano

Để đánh giá khả năng hòa tan của bột DHQ cũng như quá trình chế tạo nhũ tương nano DHQ, trước tiên chúng tôi tiến hành đánh giá trực quan bằng quan sát quang học dung dịch (hình 1). Mẫu nano DHQ thu được sau khi chế tạo có màu nâu sẫm (hình 1A), khi pha loãng mẫu trong nước tinh khiết, chỉ cần khuấy nhẹ, mẫu phân tán rất nhanh và tạo ra các giọt dầu trong nước có màu nâu nhạt trong suốt (hình 1B, phải). Ngược lại, DHQ tự do cho độ hòa tan thấp thể hiện thông qua độ trong suốt kém trong nước (hình 1B, trái).



A



B

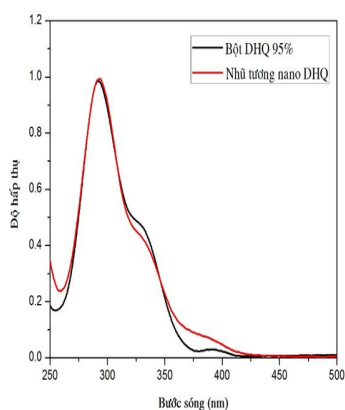
Hình 1. Màu sắc của nhũ tương nano (A) và khả năng phân tán trong nước của nó (B, phải) so với DHQ tự do phân tán trong nước (B, trái)

3.2. Hàm lượng hoạt chất DHQ trong hệ nhũ tương nano

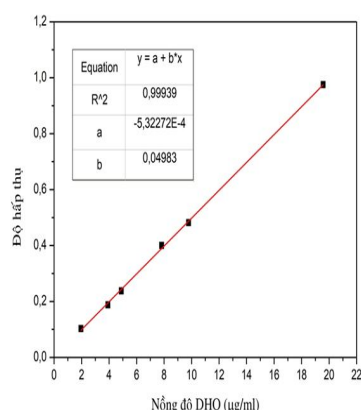
Dựa vào phương trình phụ thuộc tuyến tính giữa cường độ hấp thụ và nồng độ của bột DHQ 95% (Hình 2B), chúng tôi tính toán được hàm lượng hoạt chất DHQ trong nhũ tương nano là 9%.

Trên phổ hấp thụ của hai mẫu bột DHQ 95% và nhũ tương nano của nó được pha loãng với

ethanol tuyệt đối có cùng nồng độ DHQ là 19,57 $\mu\text{g/mL}$, đáng phổ và cực đại hấp thụ tại 289 nm tương tự nhau và đặc trưng cho hợp chất DHQ (Hình 2A). Kết quả này cho thấy tính chất hóa học của hợp chất DHQ không bị thay đổi trong quá trình chế tạo, và cũng không có ảnh hưởng của dung môi, tá dược.



A



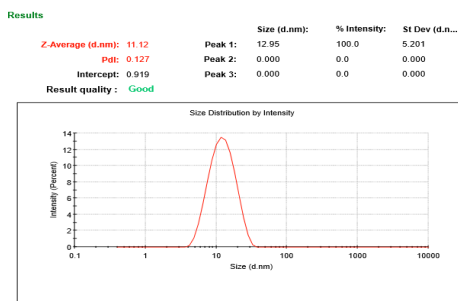
B

Hình 2. Phổ hấp thụ của bột DHQ 95% và nhũ tương nano của nó ở cùng nồng độ (A), và sự phụ thuộc tuyến tính của cường độ hấp thụ tại 289 nm theo nồng độ DHQ (B)

3.3. Kích thước tiểu phân nhũ tương nano

Đường kính giọt trung bình điển hình của DHQ-SNEDDS phân tán trong môi trường nước khoảng 9-11 nm với chỉ số đa phân tán

(poly dispersities index - PDI) nhỏ (Hình 3B). Kích thước hạt dưới 50 nm dẫn tới sự hình thành nhũ tương nano ổn định, đẳng hướng và phân tán rõ ràng.



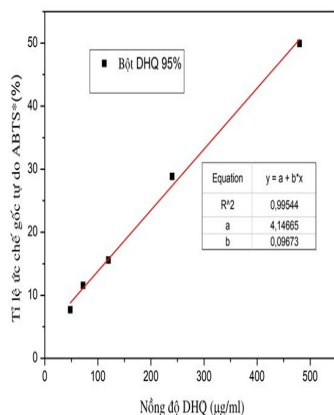
Hình 3. Kích thước hạt và chỉ số PDI của nhũ tương nano DHQ

3.4. Hoạt tính chống oxy hóa của nhũ tương nano DHQ

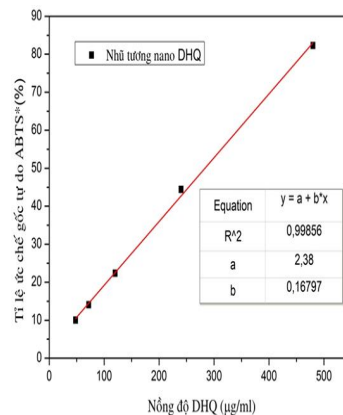
Bảng 1. Thông số thử hoạt tính ức chế gốc tự do ABTS* của mẫu bột DHQ, nhũ tương nano DHQ

Ống	Nồng độ (µg/ml)	A _b	A _n	IC _b (%)	IC _n (%)
Chứng âm		0,689	0,689		
1	48	0,637	0,620	7,692	10,015
2	72	0,609	0,592	11,563	14,078
3	120	0,582	0,535	15,578	22,351
4	240	0,490	0,383	28,834	44,412
5	480	0,345	0,122	49,927	82,293

Trong đó: A_b, A_n – tương ứng với độ hấp thụ trung bình của mẫu bột, nhũ tương nano DHQ; IC_b, IC_n – tương ứng với tỉ lệ ức chế gốc tự do ABTS* của mẫu bột, nhũ tương nano.



A



B

Hình 4. Sự phụ thuộc giữa hoạt tính ức chế gốc tự do IC (%) và nồng độ chất ức chế DHQ của mẫu bột (A), nhũ tương nano DHQ (B)

Giá trị IC₅₀ (µg/mL) về khả năng ức chế gốc tự do ABTS* của bột DHQ 95%, nhũ tương nano lần lượt là 474,2 và 283,5 cho thấy nhũ tương nano DHQ có hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn so với DHQ tự do. Nồng độ này còn thấp hơn so với IC₅₀ của chất đối chứng Trolox là 331 µg/mL, chứng tỏ nhũ tương nano có hoạt tính chống oxy hóa hiệu quả.

Hoạt tính chống oxy hóa, ức chế gốc tự do mạnh của DHQ được tách chiết từ các loại thực vật khác nhau đã được nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới khẳng định. Nhóm nghiên cứu Trung Quốc, Zhou và cộng sự [14] sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao – khối phổ (high performance liquid chromatography-mass spectrum/mass spectrum (HPLC-

MS/MS) để xác định hàm lượng DHQ (92,07%) được tách chiết từ *Larix olgensis* Henry var. Korean Nakai (phân bố nhiều ở miền Bắc Trung Quốc). DHQ thu được thể hiện hoạt tính chống gốc tự do ABTS* mạnh hơn chất đối chứng dương là butylated hydroxytoluene (BHT) với giá trị EC₅₀ (µg/mL) lần lượt là $7,49 \pm 1,11$; $12,38 \pm 2,63$. Giá trị EC₅₀ là nồng độ hiệu quả cần thiết để đạt được 50% khả năng ức chế gốc tự do. Một nhóm nghiên cứu khác cho thấy hoạt tính ức chế gốc tự do ABTS* của DHQ so với chất đối chứng dương butylated hydroxyanisole (BHA) với giá trị IC₅₀ (g/mL) lần lượt là 0,83 và 12,30 [14]. Dựa trên mối quan hệ cấu trúc-hoạt tính, nhóm tác giả đã chứng minh rằng hoạt tính

chống oxy hóa/chống gốc tự do phụ thuộc vào sự có mặt của các nhóm -OH. Cùng với đó, sự gia tăng số lượng nhóm -OH và đặc biệt là ở vị trí para của vòng thơm giúp làm tăng hoạt tính. Bên cạnh đó, nhóm nghiên cứu Trung Quốc, Li và các đồng nghiệp đã báo cáo hoạt tính ức chế một số gốc tự do đáng kể của DHQ [14]. Trong đó, hoạt tính ức chế gốc ABTS* của DHQ so với chất chuẩn Trolox có giá trị IC₅₀ (µg/mL) tương ứng là 4,6 và 11,4. Một nghiên cứu khác cho thấy hoạt tính ức chế một số gốc tự do khác nhau, trong đó giá trị IC₅₀ (µg/mL) để ức chế 50% gốc ABTS* là 66,37 [14].

4. KẾT LUẬN

Từ mục tiêu đề ra trong bài nghiên cứu này, chúng tôi đã đạt được các kết quả sau:

- Nhũ tương nano được điều chế thành công bằng phương pháp tự nhũ hóa nano.

- Các đặc tính cấu trúc vi mô, hoạt tính ức chế gốc tự do, chống oxy hóa cũng được khảo sát:

+ Kích thước tiểu phân trung bình trong nhũ tương nano từ 9 – 11 nm, khả năng phân tán trong nước tăng đáng kể.

+ Nhũ tương nano DHQ thể hiện khả năng ức chế gốc tự do ABTS* mạnh hơn so với dạng bột tự do của nó và chất chuẩn Trolox thông qua giá trị IC₅₀.

Lời cảm ơn: công bố này được hỗ trợ bởi Dự án cấp Viện Hàn lâm KHCN VN mã số: UDSPTM.04/22-23.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A. Ahmadi, A. Shadboorestan, S.F. Nabavi, W.N. Setzer, S.M. Nabavi, (2015). The role of hesperidin in cell signal transduction pathway for the prevention or treatment of cancer. *Curr. Med. Chem.*, **22**, 3462–3471.

[2] M. F. Mahomoodally, A. Gurib-Fakim, A. H. Subratty, (2005). Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius. *Pharm. Biol.*, **43**, 237–242.

[3] Chobot V., Hadacek F., Bachmann G., Weckwerth W., and Kubicova L., (2016). Pro- and Antioxidant Activity of Three Selected Flavan Type Flavonoids: Catechin, Eriodictyol and Taxifolin. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**, 17.

[4] Gursoy R. N., and Benita S., (2004). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **3**, **58**, 173–182.

[5] Jain S., Jain A. K., Pohekar M., and Thanki K., (2013). Novel self-emulsifying formulation of quercetin for improved in vivo antioxidant

potential: implications for drug-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Free Radical Biology & Medicine*, **65**, 117–130.

[6] Khlupova M., Vasil'eva I., Shumakovich G., Morozova O., Chertkov V., Shestakova A., Yaropolov A., Yaropolov A., (2016). Laccase-mediated biotransformation of dihydroquercetin (taxifolin). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **123**, 62–66.

[7] Li J., Hu L., Zhou T., Gong X., Jiang R., Li H., Kuang G., Wan J., and Li H., (2019). Taxifolin inhibits breast cancer cells proliferation, migration and invasion by promoting mesenchymal to epithelial transition via β -catenin signaling. *Life Sciences*, **232**, 116617.

[8] Nguyen T. B., Nguyen T. M. H., Le T. T. H., Phan T. T., Nguyen T. T., Melnikova G., Chizhik S. A., and Le H. D., (2020). Curcumin Nanoemulsion: Evaluation of Stability and Anti-Cancer Activity In Vitro. *Journal of Nano Research*, **64**, 21–37.

[9] Orlova S. V., Tatarinov V. V., Nikitina E. A., Sheremeta A. V., Ivlev V. A., Vasil'ev V. G., Paliy K. V., and Goryainov S. V., (2022). Bioavailability and Safety of Dihydroquercetin (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **11**, **55**, 1133–1137.

[10] Procházková D., Boušová I., and Wilhelmová N., (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, **4**, **82**, 513–523.

[11] Das A., Baidya R., Chakraborty T., Samanta A. K., and Roy S., (2021). Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **142**.

[12] Tshweu L., Katata L., Kalombo L., Chiappetta D. A., Hocht C., Sosnik A., and Swai H., (2014). Enhanced oral bioavailability of the antiretroviral efavirenz encapsulated in poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles by a spray-drying method. *Nanomedicine (London, England)*, **12**, **9**, 1821–1833.

[13] Walstra P., (1993). Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*, **2**, **48**, 333–349.

[14] Shweta Jaina, Ankur Vaidya, (2023). Medicine Comprehensive review on pharmacological effects and mechanism of actions of taxifolin: A bioactive flavonoid. *Pharmacological Research – Modern Chinese*, **7**.