

Nghiên cứu điều chế vi cầu chứa bovine serum albumin từ alginat và chitosan

Lê Minh Quân*, Trần Thanh Hải, Đỗ Hoàng Hân, Trần Lê Tuyết Châu

Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 41 Đinh Tiên Hoàng, phường Bến Nghé, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/4/2024; ngày chuyển phân biện 6/4/2024; ngày nhận phân biện 24/5/2024; ngày chấp nhận đăng 27/5/2024

Tóm tắt:

Vi cầu là hệ thống phân phối có khả năng kiểm soát giải phóng dược chất kích thước micron, có polymer trong cấu trúc. Trong đó, alginat và chitosan là hai polymer tương thích sinh học có ứng dụng điều chế vi cầu đa dạng trong dược phẩm. Tuy nhiên, ở Việt Nam hiện vẫn chưa có nhiều công bố về vi cầu từ alginat và chitosan. Vì vậy, nghiên cứu được tiến hành để xây dựng và tối ưu hóa quy trình điều chế vi cầu lõi alginat chứa protein mô hình bovine serum albumin (BSA), sau đó xây dựng phương pháp bao phủ chitosan. Quy trình điều chế vi cầu lõi được xây dựng gồm alginat, BSA, isooctan, span 80, tween 80 và calci clorid. Các yếu tố công thức và thông số quy trình được khảo sát bằng phần mềm Design Expert v12.0. Vi cầu lõi alginat chứa BSA được bao phủ bằng 1% chitosan trong acid acetic 1% và có khả năng giải phóng kiểm soát BSA trong 24 giờ. Vi cầu alginat bao phủ chitosan có kích thước trung bình 178 μm , tỷ lệ tải BSA đạt 12,7%. Nghiên cứu đã điều chế thành công vi cầu chứa BSA từ hai polymer alginat và chitosan có khả năng giải phóng dược chất có kiểm soát.

Từ khóa: alginat, bovine serum albumin, chitosan, giải phóng kiểm soát, vi cầu.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.9, 3.4

Research on the preparation of microspheres containing bovine serum albumin microspheres from alginate and chitosan

Minh Quan Le*, Thanh Hai Tran, Hoang Han Do, Le Tuyen Chau Tran

University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, 41 Dinh Tien Hoang Street, Ben Nghe Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 3 April 2024; revised 24 May 2024; accepted 27 May 2024

Abstract:

Microspheres are controlled-release drug delivery systems with a micron diameter with a polymeric structure. Alginate and chitosan are two pharmaceutical biodegradable polymers applied for various microsphere preparation techniques. However, there is very limited research on microspheres from alginate and chitosan in Vietnam. Thus, the goal of this research was to prepare and optimise the alginate microspheres containing the model protein bovine serum albumin (BSA) preparation process and then develop a chitosan coating method. The developed method of alginate microspheres containing BSA includes alginate, BSA, isooctane, span 80, tween 80, and calcium chloride. Formulations and process parameters influencing the alginate microsphere properties were optimised using Design Expert v12.0 software. Alginate microspheres containing BSA were coated with 1% chitosan in 1% acetic acid and achieved the controlled release of BSA from microspheres in 24 hours. Chitosan-coated alginate microspheres containing BSA had an average particle diameter of 178 μm , in which the drug loading rate was 12.7%. This study successfully prepared the controlled-release microspheres containing BSA from alginate and chitosan polymers.

Keywords: alginate, bovine serum albumin, chitosan, controlled release, microspheres.

Classification numbers: 1.6, 2.9, 3.4

*Tác giả liên hệ: Email: leminhquan@ump.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, các hệ trị liệu giải phóng có kiểm soát chứa dược chất phân tử lượng lớn (ví dụ như các peptid, protein) ngày càng được quan tâm do xu thế sử dụng các dược chất sinh học trong điều trị. Tuy nhiên, các dược chất này có cấu trúc phức tạp, độ ổn định thấp, hấp thu kém và dễ bị enzyme phân giải nên việc bào chế dạng giải phóng có kiểm soát còn gặp nhiều thử thách [1]. Hệ thống phân phối thuốc cấu trúc vi cầu có nhiều tiềm năng để giải quyết các khó khăn này, kết hợp sử dụng loại polymer thích hợp để kiểm soát khả năng giải phóng dược chất [2, 3].

Alginate và chitosan là hai polymer phân hủy sinh học, an toàn, đang được sử dụng phổ biến để điều chế vi cầu có khả năng tải và kiểm soát giải phóng nhiều loại dược chất khác nhau [4-6]. Khi alginate và chitosan kết hợp sẽ hình thành một cấu trúc màng tổ hợp nhờ vào tương tác lưỡng cực và liên kết hydro. Quá trình hình thành màng tổ hợp phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nồng độ polymer, pH, nhiệt độ, trình tự phối hợp, độ linh hoạt của polymer, thành phần hóa học của polymer [7]. Vi cầu từ alginate được bao phủ chitosan đã báo cáo có sự giảm độ xốp và rò rỉ dược chất so với vi cầu alginate riêng lẻ. Bên cạnh đó, lớp bao chitosan có độ bền cơ học cao hơn khi có mặt alginate, do vậy có khả năng cải thiện đặc tính giải phóng hoạt chất có kiểm soát theo pH [8]. Mặc dù có nhiều ưu điểm nhưng vi cầu từ alginate và chitosan vẫn chưa được quan tâm nghiên cứu nhiều ở Việt Nam.

Nghiên cứu này được tiến hành để điều chế vi cầu từ alginate và chitosan chứa dược chất phân tử lượng lớn và kiểm soát sự giải phóng dược chất trong khoảng 24 giờ. BSA được lựa chọn làm dược chất mô hình trong nghiên cứu này vì có tính tương đồng với albumin huyết thanh người, đồng thời có giá rẻ hơn, dễ bảo quản và tinh chế mẫu trong quá trình sử dụng [9]. Nghiên cứu sử dụng thiết kế thực nghiệm để xác định các yếu tố công thức và quy trình ảnh hưởng đến tính chất của vi cầu tạo thành.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Vi cầu alginate-chitosan hoàn thiện (CA-MS-BSA).

2.2. Nguyên vật liệu

BSA có nguồn gốc từ Ấn Độ. Natri alginate (Nhật Bản) có phân tử lượng trung bình, độ nhớt dung dịch 1% khoảng 300-400 cps. Chitosan (Canada) có phân tử lượng 10-20 KDa, tỷ lệ deacetyl hóa >90% đạt tiêu chuẩn nhà sản xuất. Các tá dược, dung môi dùng trong quá trình điều chế bao gồm isooctan, span 80, tween 80, calci clorid, aceton và acid acetic (Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn dược dụng.

2.3. Phương pháp điều chế

Sử dụng phương pháp điều chế vi cầu hai giai đoạn. Vi cầu lõi alginate chứa BSA (A-MS-BSA) được tổng hợp

từ polymer alginate bằng phương pháp tách loại dung môi thông qua tạo nhũ tương nước (N) trong dầu (D). Sau đó tiến hành bao phủ một lớp chitosan lên A-MS-BSA hình thành CA-MS-BSA [10, 11].

Xây dựng và tối ưu hóa phương pháp điều chế A-MS-BSA: Hòa tan một lượng xác định BSA trong dung dịch alginate có nồng độ xác định tạo nên N. Đồng nhất hóa pha N vào D gồm 30 g isooctan và 3,8 g chất nhũ hóa span 80 để tạo nhũ tương N/D. Hỗn hợp gồm tween 80 30% và CaCl₂ với nồng độ xác định được bổ sung vào nhũ tương, tiếp tục khuấy để gel hóa alginate. Thêm aceton để hóa rắn A-MS-BSA. Lọc và rửa, để ổn định A-MS-BSA thu được.

Để xác định các thành phần công thức và quy trình có khả năng ảnh hưởng đến tính chất của A-MS-BSA, thiết kế thực nghiệm được tiến hành bằng phần mềm Design Expert v12.0 (Mỹ). Không gian thực nghiệm được thiết kế gồm 22 thí nghiệm thông qua mô hình yếu tố từng phần, độ phân giải IV.

Mười biến đầu vào được xác lập với hai mức cao - thấp bao gồm: (X₁) nồng độ BSA (giá trị khảo sát 0,5%; 1,5%), (X₂) nồng độ alginate (2%; 4%), (X₃) tỷ lệ pha nước của nhũ tương (30%; 50%), (X₄) tốc độ nhũ hóa (6000 vòng/phút; 9000 vòng/phút), (X₅) thời gian khuấy tạo liên kết chéo (5 phút; 15 phút), (X₆) tốc độ khuấy tạo liên kết chéo (4000 vòng/phút; 6000 vòng/phút), (X₇) nồng độ dung dịch CaCl₂ (5%; 10%), (X₈) thể tích dung dịch CaCl₂ (1:1; 3:1), (X₉) thể tích tween 80 (5%; 10%), (X₁₀) tỷ lệ span 80 (5%; 15%). Tiến hành tuần tự thí nghiệm, phân tích và ghi nhận kết quả dựa trên 5 biến đầu ra lần lượt: (Y₁) tỷ lệ tải dược chất (%), (Y₂) kích thước A-MS-BSA trung bình (μm), (Y₃, Y₄, Y₅) tỷ lệ giải phóng dược chất sau 1, 2, 4 giờ (%).

Xây dựng phương pháp bao phủ A-MS-BSA bằng chitosan: Ở giai đoạn tiếp theo, lượng xác định A-MS-BSA được phân tán trong dung dịch chitosan bằng phương pháp khuấy trong thời gian phù hợp. Ly tâm, lọc, rửa và sấy CA-MS-BSA ở 37°C trong 24 giờ. Bảo quản CA-MS-BSA trong bình kín trong tủ mát cho các thử nghiệm tiếp theo.

Các A-MS-BSA đã tối ưu hóa được sử dụng để khảo sát quá trình bao phủ chitosan, nhằm mục tiêu kéo dài khả năng tỷ lệ giải phóng dược chất ở môi trường đệm phosphate (PBS) pH 7,4 trong 24 giờ. Đồng thời, xác định sơ bộ ảnh hưởng của nồng độ chitosan và một số thông số khác như tỷ lệ A-MS-BSA và thể tích dung dịch chitosan, nồng độ acid hữu cơ, thời gian khuấy đến khả năng giải phóng BSA của CA-MS-BSA.

2.4. Phân tích đặc tính vi cầu

Xác định tỷ lệ tải dược chất: Cân chính xác khoảng 250 mg A-MS-BSA (hoặc CA-MS-BSA) vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 20 ml dung dịch đệm PBS pH 7,4, siêu âm trong 15 phút, định mức với cùng dung môi. Ly tâm với tốc độ 10000 vòng/phút, trong 5 phút. Lọc hỗn hợp qua màng

lọc millipore 0,45 µm dưới áp suất giảm. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 278 nm, mẫu trắng được tiến hành tương tự nhưng với vi cầu lõi alginate không chứa hoạt chất hoặc vi cầu alginate-chitosan không chứa hoạt chất. Hàm lượng BSA trong mẫu thử được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ tải (\%)} = \frac{\text{Lượng chất trong vi cầu}}{\text{Lượng vi cầu}} \times 100$$

Đánh giá kích thước vi cầu: Bằng thực nghiệm trên thiết bị phân tích cỡ hạt Malvern Mastersizer MS 3000. Hình thái bề mặt, hình dạng tiểu phân, độ xốp của vi cầu được quan sát và đánh giá thông qua phân tích hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Đánh giá khả năng giải phóng protein: Cân chính xác khoảng 250 mg A-MS-BSA (hoặc CA-MS-BSA), phân tán trong 40 ml đệm PBS pH 7,4 ở 37,0±0,5°C trên máy khuấy từ với tốc độ khuấy 100 vòng/phút. Tại các thời điểm xác định 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24 giờ, lấy 5 ml dịch thử và bổ sung 5 ml đệm. Lọc mẫu thử qua màng lọc millipore 0,45 µm, xác định lượng BSA phóng thích bằng phương pháp đo quang phổ UV ở bước sóng 278 nm.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng thành phần công thức và thông số điều chế vi cầu lõi alginate chứa bovine serum albumin

Bảng 1 trình bày không gian thực nghiệm và kết quả phân tích đặc tính A-MS-BSA.

Kết quả cho thấy, tỷ lệ tải dược chất (Y_1) nằm trong khoảng 4,5-23,3% và phù hợp với hàm nghịch đảo Inverse ($R^2=0,9919$, $F=75,4$, có ý nghĩa thống kê với $p<0,0001$).

Kích thước trung bình của A-MS-BSA (Y_2) thu được dao động khá lớn, trong khoảng 14,6-308,5 µm, ảnh hưởng theo hàm căn bậc hai (Square Root) với $R^2=0,9468$, có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$.

Tỷ lệ giải phóng dược chất của A-MS-BSA (Y_3, Y_4, Y_5) được phân tích các ảnh hưởng và phù hợp với hàm lũy thừa (Power) với tỷ lệ giải phóng dược chất sau 1, 2 và 4 giờ có R^2 lần lượt là 0,9849, 0,9776, 0,9878 có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$. Bảng 2 cho thấy ảnh hưởng của biến độc lập đến các tính chất của A-MS-BSA.

Bảng 1. Không gian thực nghiệm và kết quả đánh giá vi cầu tạo thành.

Thứ tự	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
1	0,5	4	50	6000	5	6000	5	3	10	15	8,30	55,0	14,46	21,17	48,0
2	1,5	4	50	6000	15	6000	10	3	10	5	6,50	46,4	10,40	29,50	75,8
3	0,5	4	30	6000	15	4000	5	3	5	5	9,54	43,3	24,00	32,70	41,0
4	1,5	2	50	6000	5	4000	5	1	5	5	15,9	308,5	37,20	39,00	39,4
5	1,5	2	50	9000	15	6000	5	3	5	15	7,00	44,5	40,50	49,70	48,8
6	0,5	2	50	9000	5	4000	5	3	10	5	12,3	86,0	93,60	94,50	94,4
7	0,5	2	30	6000	5	6000	10	3	5	5	6,20	14,8	28,30	30,50	32,8
8	1,5	2	30	9000	15	4000	10	1	5	5	6,50	145,0	61,60	78,30	87,5
9	0,5	4	30	9000	15	6000	10	3	10	15	4,53	27,3	21,70	20,60	24,4
10	0,5	2	50	6000	15	4000	10	3	10	15	7,20	55,7	27,50	25,20	39,9
11	1,5	4	50	9000	15	4000	5	1	10	15	20,4	29,6	27,50	33,80	67,7
12	1,5	2	30	6000	5	4000	5	3	10	15	8,75	161,0	37,80	38,50	43,1
13	0,5	2	50	6000	5	6000	10	1	5	15	6,20	19,1	23,60	24,80	22,0
14	0,5	2	30	9000	5	4000	5	1	5	15	14,97	244,0	26,20	26,10	87,0
15	0,5	4	50	9000	15	6000	10	1	5	5	9,35	25,8	56,30	53,30	53,2
16	1,5	2	50	9000	5	6000	10	1	10	15	8,30	22,7	19,60	68,10	93,3
17	0,5	2	30	6000	15	6000	5	1	10	5	17,65	14,6	45,70	60,20	65,5
18	1,5	4	50	9000	5	4000	10	3	5	15	8,30	28,6	12,70	15,30	24,5
19	1,5	4	30	9000	5	6000	5	1	5	5	23,34	63,0	31,80	34,30	34,1
20	1,5	4	30	9000	15	4000	5	3	10	5	18,25	26,8	35,80	53,10	56,9
21	1,5	4	30	6000	15	6000	10	1	5	15	8,60	32,3	33,70	35,20	62,9
22	0,5	4	30	6000	5	4000	10	1	10	5	6,73	26,8	74,90	78,60	82,2

X₁: nồng độ bovine serum albumin; X₂: nồng độ alginate; X₃: tỷ lệ pha nước của nhũ tương; X₄: tốc độ nhũ hóa; X₅: thời gian khuấy tạo liên kết chéo; X₆: tốc độ khuấy tạo liên kết chéo; X₇: nồng độ dung dịch CaCl₂; X₈: thể tích dung dịch CaCl₂; X₉: thể tích tween 80; X₁₀: tỷ lệ span 80; Y₁: tỷ lệ tải dược chất (%); Y₂: kích thước A-MS-BSA trung bình (µm); Y₃, Y₄, Y₅: tỷ lệ giải phóng dược chất sau 1, 2 và 4 giờ (%).

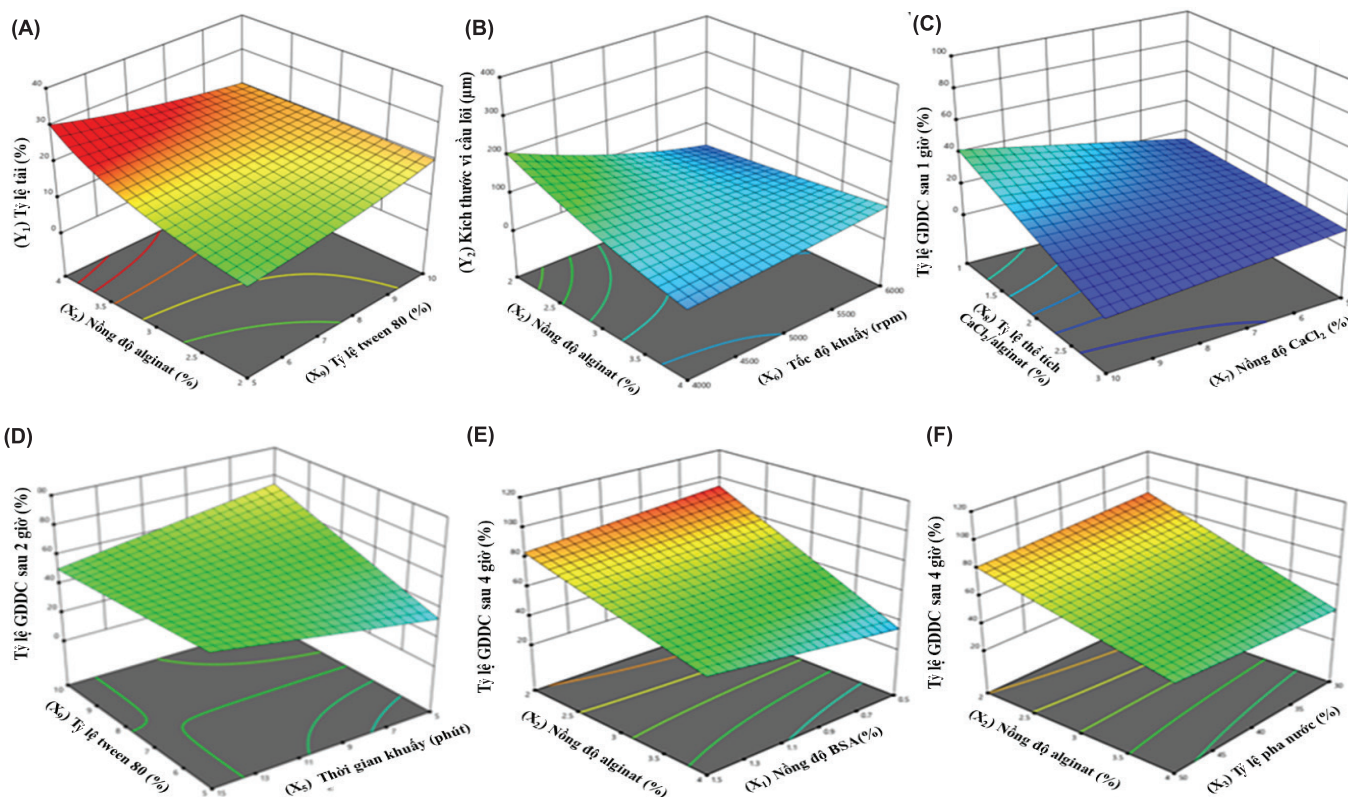
Bảng 2. Phân tích các biến độc lập ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) đến các đặc tính chất lượng của vi cầu.

Biến độc lập	Biến phụ thuộc (Hàm)	Tỷ lệ tải được chất (Nghịch đảo)	Kích thước trung bình A-MS-BSA (Căn bậc hai)	Tỷ lệ giải phóng được chất sau 1 giờ (Lũy thừa)	Tỷ lệ giải phóng được chất sau 2 giờ (Lũy thừa)	Tỷ lệ giải phóng được chất sau 4 giờ (Lũy thừa)
X_1		0,0326		0,0145		
X_2		0,0017	0,0049	0,0060	<0,0001	0,0082
X_3				0,0253		
X_6		<0,0001	0,0004	0,0163		0,0183
X_7		<0,0001	0,0061			
X_8		<0,0001		0,0128	0,0010	0,0009
X_9			0,0246	0,0427	<0,0001	0,0002
X_{10}		0,0023		0,0004	<0,0001	0,0068
X_1, X_9				0,0062		
X_2, X_6			<0,0001			
X_2, X_9		<0,0001				
X_3, X_9					<0,0001	
X_7, X_8				0,0009		
X_1, X_2, X_3		<0,0001				

X_1 : nồng độ bovine serum albumin; X_2 : nồng độ alginat; X_3 : tỷ lệ pha nước của nhũ tương; X_5 : thời gian khuấy tạo liên kết chéo; X_6 : tốc độ khuấy; X_7 : nồng độ dung dịch $CaCl_2$; X_8 : thể tích dung dịch $CaCl_2$; X_9 : thể tích tween 80; X_{10} : tỷ lệ span 80.

Từ phân tích này đã xác định được liên quan nhân quả giữa các biến số và đặc tính của vi cầu lõi tạo thành (hình 1). Tỷ lệ tải được chất (Y_1) có xu hướng tăng khi X_2 tăng và X_9 giảm (hình 1A). Kích thước trung bình của A-MS-BSA (Y_2) khi X_2 và X_6 đồng thời giảm (hình 1B).

Tỷ lệ giải phóng được chất sau 1 giờ (Y_3) tăng khi X_7 tăng và X_8 giảm (hình 1C). Tỷ lệ giải phóng được chất sau 2 giờ (Y_4) tăng khi X_5 giảm và X_9 tăng (hình 1D). Tỷ lệ giải phóng được chất sau 4 giờ (Y_5) tăng khi các biến X_1, X_2, X_3 đồng thời giảm (hình 1E và 1F).



Hình 1. Biến thiên các đặc tính vi cầu lõi alginat chứa bovine serum albumin (Y) theo tương tác giữa các biến số (X).

3.2. Tối ưu hóa công thức và quy trình điều chế vi cầu lõi alginate chứa bovine serum albumin

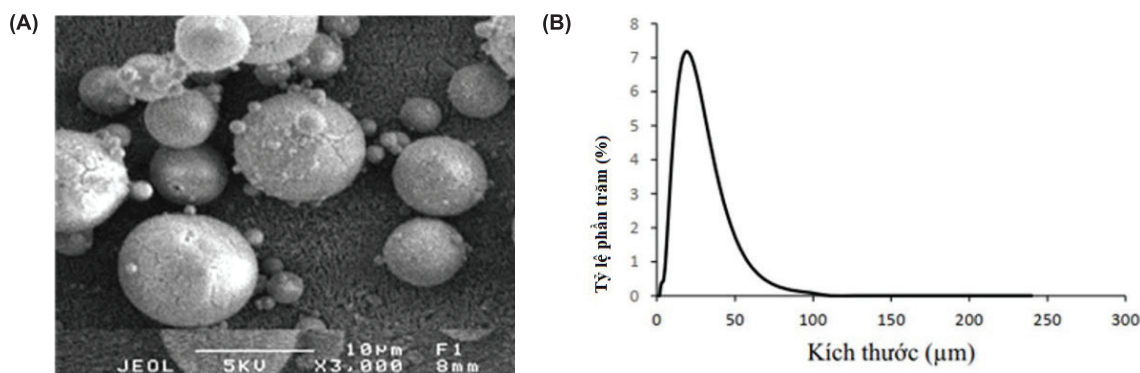
Từ các kết quả và mô hình liên quan nhân quả đã xây dựng, tiến hành tối ưu hóa thực nghiệm để xác định quy trình điều chế phù hợp cho vi cầu lõi có các đặc tính mong đợi như tỷ lệ tải >15%, kích thước trong khoảng 20-60 μm, tỷ lệ giải phóng dược chất đạt khoảng 90% sau 4 giờ. Đề xuất các thông số quy trình điều chế A-MS-BSA tối ưu trong bảng 3.

Bảng 3. Dữ liệu mô hình tối ưu hóa vi cầu lõi alginate chứa bovine serum albumin.

Ký hiệu biến	Tên biến	Đề xuất bởi phần mềm	Dự đoán bởi phần mềm	Kết quả thực nghiệm
X ₁	Nồng độ BSA	1,5%		
X ₂	Nồng độ polymer	4%		
X ₃	Tỷ lệ pha nước của nhũ tương	32,5%		
X ₄	Tốc độ nhũ hóa	6000 vòng/phút		
X ₅	Thời gian khuấy tạo liên kết chéo	15 phút		
X ₆	Tốc độ khuấy tạo liên kết chéo	4000 vòng/phút		
X ₇	Nồng độ CaCl ₂	7,6%		
X ₈	Tỷ lệ thể tích CaCl ₂	1:1		
X ₉	Tỷ lệ tween 80	9,8%		
X ₁₀	Tỷ lệ span 80	11,3%		
Y ₁	Tỷ lệ tải		15,7%	17,0±0,2%
Y ₂	Kích thước vi cầu lõi		20,3 μm	21,7±2,0 μm
Y ₃	Tỷ lệ giải phóng dược chất sau 1 giờ		29,6%	19,8±0,7%
Y ₄	Tỷ lệ giải phóng dược chất sau 2 giờ		34,4%	38,7±1,5%
Y ₅	Tỷ lệ giải phóng dược chất sau 4 giờ		94,6%	92,3±0,8%

X₁: nồng độ bovine serum albumin; X₂: nồng độ alginate; X₃: tỷ lệ pha nước của nhũ tương; X₄: tốc độ nhũ hóa; X₅: thời gian khuấy tạo liên kết chéo; X₆: tốc độ khuấy tạo liên kết chéo; X₇: nồng độ dung dịch CaCl₂; X₈: thể tích dung dịch CaCl₂; X₉: thể tích tween 80; X₁₀: tỷ lệ span 80; Y₁: tỷ lệ tải dược chất (%); Y₂: kích thước A-MS-BSA trung bình (μm); Y₃, Y₄, Y₅: tỷ lệ giải phóng dược chất sau 1, 2 và 4 giờ (%).

Kết quả xử lý thống kê cho thấy, A-MS-BSA được điều chế theo các thông số tối ưu đề xuất có đặc tính giống như được dự đoán bởi phần mềm (t-Test, p=0,69>0,05). Bên cạnh đó, phân tích bề mặt mẫu tối ưu cho thấy A-MS-BSA có dạng hình cầu, khá đồng nhất, phân bố kích thước hạt hẹp (hình 2).



Hình 2. (A) Hình kính hiển vi điện tử quét ở độ phóng đại 3000x, (B) Dải phân bố kích thước của vi cầu lõi alginate chứa bovine serum albumin tối ưu.

3.3. Kết quả bao phủ vi cầu lõi alginate chứa bovine serum albumin bằng chitosan

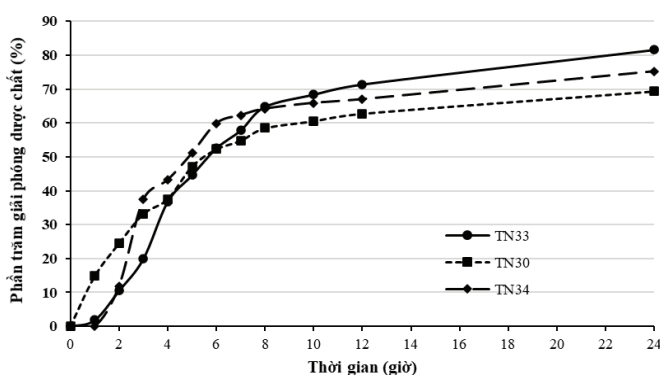
Kết quả khảo sát các thông số trong quá trình bao phủ chitosan lên A-MS-BSA được ghi nhận dựa trên đặc tính của sản phẩm CA-MS-BSA về kích thước trung bình, tỷ lệ tải dược chất được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát các đặc tính của vi cầu alginate-chitosan hoàn thiện.

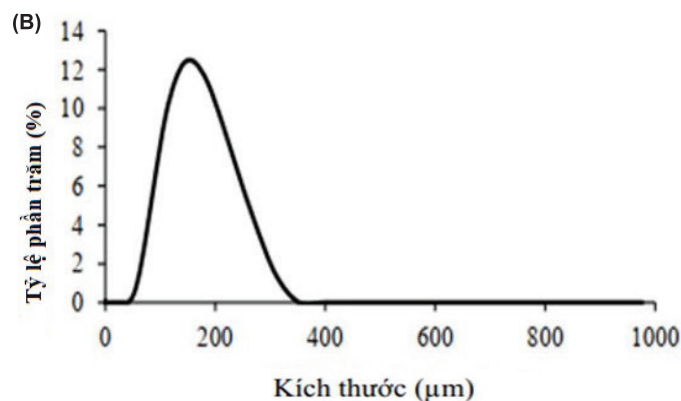
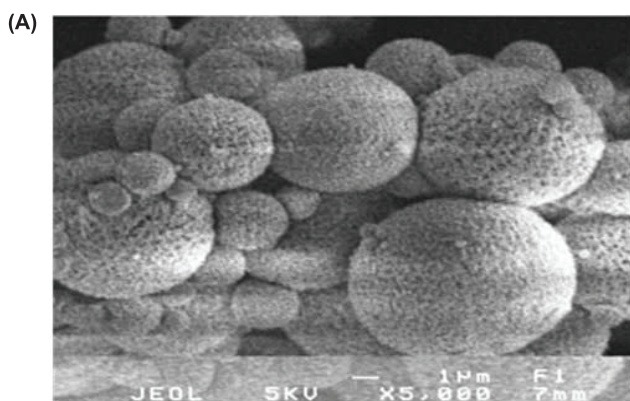
Thứ tự	Tỷ lệ vi cầu alginate/ chitosan (g/ml)	Nồng độ acid acetic (%)	Thời gian khuấy (phút)	Nồng độ chitosan (%)	Kích thước (μm)	Tỷ lệ tải dược chất (%)
TN29	1,5/50	1	10	0,5		
TN30	1,5/100	1	10	0,5	156	12,7
TN31	1,5/100	5	10	0,5	272	9,8
TN32	1,5/100	1	30	0,5	242	11,9
TN33	1,5/100	1	10	1,0	178	12,5
TN34	1,5/100	1	10	2,0	388	11,3

TN29-TN34: các thí nghiệm của giai đoạn 2 (tạo vi cầu alginate-chitosan hoàn thiện).

Kết quả cho thấy, tỷ lệ A-MS-BSA và thể tích dung dịch chitosan cần đủ lớn để không ảnh hưởng đến khả năng phân tán của A-MS-BSA trong dung dịch, tránh hiện tượng bị vón trong quá trình bao phủ. Khi nồng độ acid acetic tăng, CA-MS-BSA tăng kích thước trung bình nhưng tỷ lệ tải dược chất bị giảm. Thời gian khuấy tỷ lệ thuận với kích thước CA-MS-BSA và ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê đến tỷ lệ tải dược chất. Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy nồng độ chitosan trong dung dịch là thông số quan trọng trong giai đoạn bao phủ A-MS-BSA. Ba mức nồng độ chitosan được khảo sát là 0,5%, 1,0% và 2,0% (TN30, TN33, TN34). Khi nồng độ chitosan tăng làm kích thước CA-MS-BSA tăng mạnh và tỷ lệ tải dược chất giảm nhẹ. Thêm nữa, khi thử nghiệm tỷ lệ giải phóng dược chất của CA-MS-BSA (hình 3), TN30 đã phóng thích đáng kể dược chất ngay từ những thời điểm đầu tiên, trong khi TN33, TN34 có tiềm thời trong khoảng 2 giờ (tỷ lệ giải phóng dược chất xấp xỉ 10%). Khi kết thúc thử nghiệm ở thời điểm 24 giờ, TN33 có tỷ lệ giải phóng dược chất cao nhất, đạt 81,6%.



Hình 3. Tỷ lệ giải phóng dược chất vi cầu alginat-chitosan hoàn thiện với nồng độ chitosan khác nhau. Điều kiện thực nghiệm: tỷ lệ vi cầu alginat/chitosan (1,5 g/100 ml), nồng độ acid acetic (1%), thời gian khuấy (10 phút), nồng độ chitosan thay đổi của thí nghiệm 30, 33, 34 lần lượt là 0,5, 1 và 2%.



Hình 4. (A) Hình kính hiển vi điện tử quét ở độ phóng đại 5000x, (B) Phân bố kích thước hạt của vi cầu alginat-chitosan hoàn thiện.

Như vậy, quy trình điều chế CA-MS-BSA đã được xây dựng hoàn chỉnh theo điều kiện thử nghiệm TN33, tạo thành CA-MS-BSA có kích thước trung bình 178 µm và tỷ lệ tải BSA là 12,7%. Về mặt hình thái, hình ảnh SEM cho thấy CA-MS-BSA có dạng hình cầu, bề mặt khá xốp, dải phân bố kích thước tiểu phân tương đối hẹp (hình 4).

Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (phổ FTIR) (hình 5) của A-MS-BSA cho thấy có sự liên kết chéo giữa natri alginat với Ca²⁺, thể hiện qua các dải quang phổ ở số sóng 1613 cm⁻¹ và 1417 cm⁻¹ có liên quan đến sự kéo dài nhóm -COO- được liên kết với Ca²⁺ để tạo thành mạng lưới hydrogel liên kết chéo ba chiều. Các số sóng 3376 cm⁻¹ của nhóm N-H, 1659 cm⁻¹ của nhóm amin bậc I của BSA vẫn tồn tại trong phổ FTIR của A-MS-BSA, điều này chứng tỏ sự hiện diện của BSA trong cấu trúc vi cầu. Phổ FTIR của CA-MS-BSA cho thấy sự dịch chuyển và thay đổi đỉnh sóng của nhóm carboxyl (1613 cm⁻¹) trong natri alginat chứng tỏ có sự liên kết chéo giữa NH₃⁺ trong chitosan và nhóm carboxyl trong natri alginat thông qua tương tác tĩnh điện.

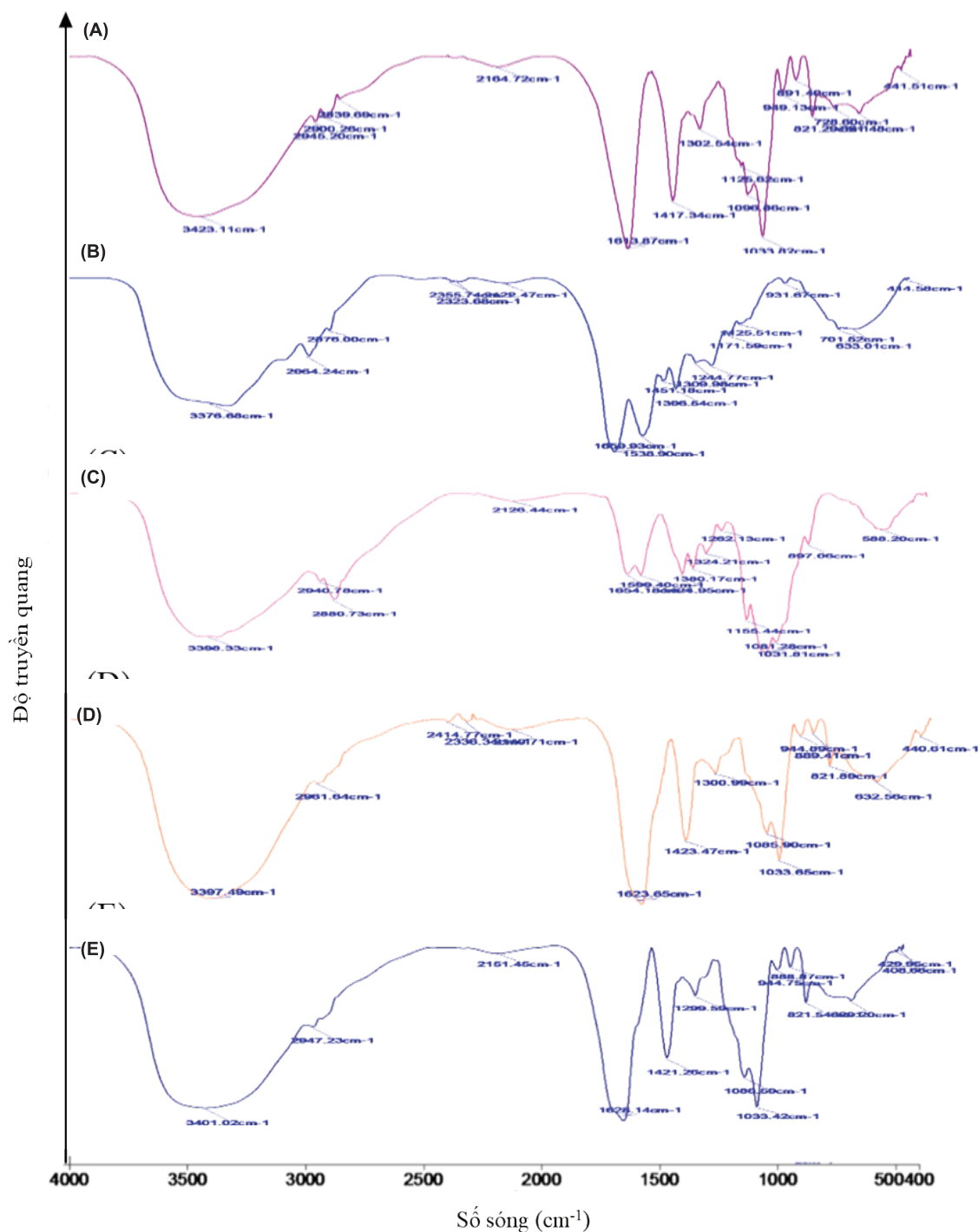
Đồng thời, có sự biến mất hoặc dịch chuyển của một số đỉnh sóng tương ứng với nhóm chức N-H, -OH, acetylamino bậc II, -C=O trong cấu trúc BSA. Điều này chứng tỏ lớp vỏ chitosan đã bao phủ toàn bộ bề mặt CA-MS-BSA.

Quá trình điều chế AC-MS-BSA đã được xây dựng hoàn thiện. Ở giai đoạn điều chế A-MS-BSA, xác định được 6 biến độc lập có ảnh hưởng nhiều đến các đặc tính của A-MS-BSA gồm nồng độ BSA, nồng độ polymer, tốc độ khuấy tạo liên kết chéo, thể tích dung dịch CaCl₂, tỷ lệ tween 80, tỷ lệ span 80, giúp giảm bớt các thí nghiệm khảo sát về sau khi tiến hành nâng cấp cỡ lô.

Nồng độ polymer alginat là thông số ảnh hưởng mạnh nhất, có tương tác với nhiều yếu tố công thức và thông số

quy trình khác cùng tác động lên đặc tính A-MS-BSA. Điều này phù hợp với nghiên cứu của S.F. Lin và cs (2016) [12] đã báo cáo ảnh hưởng của nồng độ natri alginat đến kích thước hạt và hiệu suất bắt giữ dược chất, do sự gia tăng nồng độ polymer làm tăng độ nhớt của dung dịch nên sức căng bề mặt giữa các giọt alginat và pha dầu tăng làm vi cầu có kích thước trung bình lớn hơn.

Nồng độ BSA có ảnh hưởng đến tỷ lệ tải dược chất, tỷ lệ giải phóng dược chất sau 1 giờ và có tương tác với nhiều yếu tố khác làm thay đổi đặc tính của A-MS-BSA. Tốc độ khuấy tạo liên kết chéo ảnh hưởng có ý nghĩa đến kích thước trung bình, tỷ lệ tải và tỷ lệ giải phóng dược chất của A-MS-BSA. Khi tốc độ khuấy tạo liên kết chéo thay đổi mức độ tiếp xúc và tương tác giữa các ion Ca²⁺ và polymer, dẫn đến thay đổi tính chất của A-MS-BSA. Thể tích dung dịch CaCl₂ cũng làm tăng tỷ lệ liên kết giữa Ca²⁺ và natri alginat, sự hóa rắn của A-MS-BSA cũng diễn ra nhanh hơn. Điều này đã được R. Rastogi và cs (2007) [13] nhấn mạnh trong nghiên cứu điều chế vi cầu tải isoniazid, tăng nồng độ Ca²⁺ thì hiệu suất



Hình 5. Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier của natri alginate (A), bovine serum albumin (B), chitosan (C), vi cầu lõi alginate chứa bovine serum albumin (D), vi cầu alginate-chitosan hoàn thiện (E).

bắt giữ thuốc có thể giảm do quá trình gel hóa xảy ra nhanh và đột ngột làm thất thoát dược chất ra khỏi mạng gel. Thể tích tween 80, tỷ lệ span 80 cũng có ảnh hưởng rất rõ đến các đặc tính của vi cầu bao gồm kích thước và tỷ lệ giải phóng dược chất, tương tự như công bố của A.L. Márquez và cs (2010) [14], trong đó kích thước hạt nhỏ hơn được tạo ra với nồng độ chất hoạt động bề mặt cao hơn.

Đối với mục tiêu bao phủ vi cầu alginate bằng chitosan, nghiên cứu đã chọn phương pháp khuấy vi cầu alginate trong dung dịch chitosan vì quy trình thực hiện đơn giản [15, 16]. Với phương pháp này, các yếu tố cần phải khảo sát là: (i) nồng độ acid acetic, (ii) nồng độ chitosan; (iii) thời gian bao phủ chitosan. Trong đó, yếu tố nồng độ chitosan có vai trò quan trọng. Khi nồng độ chitosan tăng thì kích thước trung

binh CA-MS-BSA tăng tương ứng, điều này phù hợp với nghiên cứu của Y. Misirli và cs (2005) [17]. Hiện tượng này có thể là do sự tương tác của các nhóm amin của chitosan và các nhóm cacboxyl của natri alginat trong quá trình hình thành màng phức hợp.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được các yếu tố ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến đặc tính của A-MS-BSA; xác định mức độ và xu hướng ảnh hưởng của các yếu tố đến tỷ lệ tải dược chất, kích thước trung bình, tỷ lệ giải phóng dược chất của A-MS-BSA điều chế bằng phương pháp tách loại dung môi. CA-MS-BSA được điều chế theo quy trình tối ưu có kích thước trung bình 178 μm và tỷ lệ tải BSA là 12,7%. Dược chất được giải phóng hoàn toàn với tốc độ giải phóng được kiểm soát trong 24 giờ. Như vậy, vi cầu alginat bao phủ chitosan chứa protein mô hình là BSA cung cấp thêm dữ liệu và tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trên hệ thuốc trị liệu giải phóng kiểm soát chứa dược chất phân tử lượng lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] V.R. Sinha, A. Trehan (2003), "Biodegradable microspheres for protein delivery", *Control Release*, **90(3)**, pp.261-280, DOI: 10.1016/s0168-3659(03)00194-9.

[2] D.S. Kshirsagar, R.B. Saudagar (2016), "Microsphere: A review", *RJTCS*, **7(1)**, pp.27-37, DOI: 10.5958/2321-5844.2016.00006.6.

[3] S. Saini, S. Kumar, M. Choudhary, et al. (2018), "Microspheres as controlled drug delivery system: An updated review", *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **9**, pp.1760-1768, DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9(5).1760-68.

[4] N.K. Sachan, S. Pushkar, A. Jha, et al. (2009), "Sodium alginate: The wonder polymer for controlled drug delivery", *J. Pharm. Res.*, **2(8)**, pp.1191-1199.

[5] L. Xing, J. Sun, H. Tan, et al. (2019), "Covalently polysaccharide-based alginate/chitosan hydrogel embedded alginate microspheres for BSA encapsulation and soft tissue engineering", *Int. J. Biol. Macromol.*, **127**, pp.340-348, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.065.

[6] J.L. Mendoza, W.M.A Monal, F.M.G Valencia (2016), "Chapter 1 - Chemical characteristics and functional properties of chitosan", *Chitosan in The Preservation of Agricultural Commodities*, pp.3-31, DOI: 10.1016/B978-0-12-802735-6.00001-X.

[7] D. Kulig, A.Z. Korzycka, A. Jarmoluk, et al. (2016), "Study on alginate-chitosan complex formed with different polymers ratio", *Polymers (Basel)*, **8(5)**, DOI: 10.3390/polym8050167.

[8] L.A. Nnamonu, R.S. Ato, I. Onyido (2012), "Alginate reinforced chitosan and starch beads in slow release formulation of imazaquin herbicide - preparation and characterization", *Materials Sciences and Applications*, **3(8)**, pp.566-574, DOI: 10.4236/msa.2012.38081.

[9] S. Kettrat, D. Japrun, P. Pongprayoon (2020), "Exploring how structural and dynamic properties of bovine and canine serum albumins differ from human serum albumin", *J. Mol. Graph. Model.*, **98**, DOI: 10.1016/j.jmgm.2020.107601.

[10] Y. Luo, Q. Wang (2014), "Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery", *Int. J. Biol. Macromol.*, **64**, pp.353-367, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.12.017.

[11] H.V. Sæther, H.K. Holme, G. Maurstad, et al. (2008), "Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan", *Carbohydr. Polym.*, **74(4)**, pp.813-821, DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.04.048.

[12] S.F. Lin, Y.C. Chen, R.N. Chen, et al. (2016), "Improving the stability of astaxanthin by microencapsulation in calcium alginate beads", *PLOS ONE*, **11(4)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0153685.

[13] R. Rastogi, Y. Sultana, M. Aqil, et al. (2007), "Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery", *Int. J. Pharm.*, **334(1-2)**, pp.71-77, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.10.024.

[14] A.L. Márquez, A. Medrano, L.A. Panizzolo, et al. (2010), "Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleate", *J. Colloid. Interface. Sci.*, **341(1)**, pp.101-108, DOI: 10.1016/j.jcis.2009.09.020.

[15] F. Maestrelli, M. Jug, M. Cirri, et al. (2018), "Characterisation and microbiological evaluation of chitosan-alginate microspheres for cefixime vaginal administration", *Carbohydr. Polym.*, **192**, pp.176-183, DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.03.054.

[16] C.H. Zheng, W.Q. Liang, F. Li, et al. (2005), "Optimisation and characterisation of chitosan-coated alginate microcapsules containing albumin", *Pharmazie*, **60(6)**, pp.434-438.

[17] Y. Misirli, E. Oztürk, H. Kuşaklıoğlu, et al. (2005), "Preparation and characterization of mitomycin-C loaded chitosan-coated alginate microspheres for chemoembolization", *J. Microencapsul.*, **22(2)**, pp.167-178, DOI: 10.1080/02652040400026368.