

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI**

**BỘ Y TẾ**



**DƯƠNG THỊ THUẤN**

**NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ LIPOSOME  
BERBERIN ỨNG DỤNG DÙNG ĐƯỜNG UỐNG**

**CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ DƯỢC PHẨM  
& BÀO CHẾ THUỐC  
MÃ SỐ: 9720202**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC**

**HÀ NỘI – 2022**

**Công trình được hoàn thành tại:**

- Bộ môn Bào chế - Trường Đại học Dược Hà Nội
- Bộ môn Công nghiệp Dược - Trường Đại học Dược Hà Nội
- Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia - Trường Đại học Dược Hà Nội
- Viện nghiên cứu Dược - Đại học Tartu – Estonia
- Trung tâm Sinh học – Đại học Helsinki – Phần Lan
- Khoa Y sinh - Đại học Helsinki – Phần Lan
- Viện Vật lý - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
- Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
- Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương
- Trung tâm đánh giá tương đương sinh học- Viện Kiểm nghiệm thuốc TW

**Người hướng dẫn khoa học:** GS.TS. Phạm Thị Minh Huệ

GS.TS. Jyrki Tapio Heinämäki

Phản biện 1: PGS. TS. Trần Việt Hùng- Viện Kiểm nghiệm Thuốc thành phố Hồ Chí Minh.

Phản biện 2: PGS. TS. Vũ Bình Dương - Trung tâm nghiên cứu ứng dụng sản xuất thuốc, Học viện Quân Y.

Phản biện 3: TS. Đào Danh Sơn - Công ty cổ phần tập đoàn MERAP.

Luận án đã được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá Luận án cấp trường họp tại: Phòng Hội đồng, trường Đại học Dược Hà Nội

Vào hồi: 13 giờ 30 ngày 09 tháng 9 năm 2022.

**Có thể tìm hiểu luận án tại:**

Thư viện Quốc gia Việt Nam

Thư viện trường Đại Học Dược Hà Nội

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN  
ĐẾN LUẬN ÁN TIẾN SĨ ĐƯỢC HỌC**

1. **Duong, T.T.**; Isomäki, A.; Paaver, U.; Laidmäe, I.; Tõnisoo, A.; Yen, T.T.H.; Kogermann, K.; Raal, A.; Heinämäki, J.; Pham, T.-M.-H. (2021), “Nanof ormulation and Evaluation of Oral Berberine-Loaded Liposomes”, *Molecules* (IF=3,267), 26, 2591. <https://doi.org/10.3390/molecules26092591>
2. **Duong, T.T.**; Yen, T.T.H; Nguyen, T.L.; Nguyen, T.-D.; Nguyen, T.-Q.-T.; Nghiem, T.-H.-L.; Pham, T.H., Raal, A.; Heinämäki, J.; Pham, T.-M.-H. (2022), “Berberine-loaded liposomes for oral delivery: Preparation, physicochemical characterization and in-vivo evaluation in an endogenous hyperlipidemic animal model”, *International Journal of Pharmaceutics* (IF=5,875), 616, 121525. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121525>

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

### Chữ viết tắt

### Chữ viết đầy đủ

AUC	Area under the curve (Diện tích dưới đường cong)
$\alpha$ -TP	$\alpha$ -tocopherol
BBR	Berberin
$C_{max}$	Nồng độ đỉnh trong huyết tương
Cryo-EM	Cryogenic electron microscopy (Kính hiển vi điện tử đông lạnh)
DLS	Dynamic light scattering (Nhiều xạ ánh sáng động)
DSPG	Distearoyl phosphatidylglycerol
EMA	European Medicines Agency (Cơ quan Y tế Châu Âu)
FDA	Food and Drug Administration (Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ)
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy (Phổ hồng ngoại Fourier)
HDL-C	High density lipoprotein cholesterol (Cholesterol tỉ trọng cao)
HSPC	Hydrogenated soy phosphatidylcholin
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High performance liquid chromatography)
KTTP	Kích thước tiểu phân
LC-MS/MS	Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (Sắc ký lỏng kết hợp hai lần khối phổ)
LDL-C	Low density lipoprotein cholesterol (Cholesterol tỉ trọng thấp)
MRT	Mean retention time (Thời gian lưu trú trung bình)
NaDC	Natri deoxycholat
NTA	Nanoparticle tracking analysis (Phân tích vết hạt nano)

PDI	Polydispersity index (Chỉ số đa phân tán)
RSD	Relative standard deviation (Độ lệch chuẩn tương đối)
SEM	Scanning electron microscopy (Kính hiển vi điện tử quét)
SKD	Sinh khả dụng
TC	Total cholesterol (Cholesterol toàn phần)
TEM	Transmission electron microscopy (Kính hiển vi điện tử truyền qua)
TG	Triglycerid
T <sub>max</sub>	Thời gian đạt nồng độ đỉnh trong huyết tương

# MỞ ĐẦU

## 1. Tính cấp thiết của luận án

Sử dụng thuốc qua đường uống cho đến nay vẫn là sự lựa chọn hàng đầu cho bệnh nhân bởi dễ sử dụng, dễ kiểm soát liều, thuận lợi trong điều trị các bệnh mạn tính. Tuy nhiên, một số thuốc không thể sử dụng được đường uống bởi tính thấm kém, độ tan thấp, không ổn định trong đường tiêu hóa và bị cơ chế bơm ngược thuốc. Có nhiều biện pháp được nghiên cứu để tăng SKD đường uống, trong đó có liposome, được biết đến như là một hệ mang thuốc, tương đồng sinh học, làm tăng sinh khả dụng cho nhiều dược chất.

Berberin (BBR) là một dược chất đã được sử dụng từ lâu để điều trị tại chỗ một số bệnh đường tiêu hóa. Gần đây, nhiều nghiên cứu mới cho thấy BBR có tiềm năng cao trong điều trị một số bệnh như: tăng lipid máu, tiểu đường,... Tuy nhiên, để có tác dụng này, BBR cần được hấp thu vào tuần hoàn. Trong khi đó, BBR có tính thấm kém, chỉ có dưới 10% BBR được hấp thu qua niêm mạc ruột. Những hạn chế về sinh khả dụng đường uống của BBR có thể được khắc phục bằng sử dụng hệ mang dược chất liposome. Hiện nay chưa có nghiên cứu nào về sử dụng hệ mang dược chất liposome để bào chế liposome BBR ứng dụng cho điều trị tăng lipid máu. Vì vậy, nghiên cứu bào chế liposome BBR, đánh giá sinh khả dụng và tác dụng hạ lipid máu dùng đường uống là vấn đề cần thiết nhằm phát triển dạng bào chế mới, có tiềm năng tăng giá trị sử dụng cho BBR.

## 2. Mục tiêu của luận án

- Xây dựng được công thức và quy trình bào chế liposome berberin và proliposome berberin ở quy mô phòng thí nghiệm.

- Đánh giá được sinh khả dụng đường uống của liposome berberin và tác dụng hạ lipid máu nội sinh của liposome berberin trên động vật thực nghiệm.

### **3. Những đóng góp mới của luận án**

Xây dựng được công thức và quy trình bào chế liposome BBR bằng 2 phương pháp tiêm ethanol và hydrat hóa film. Xác định được cấu trúc và một số đặc tính của liposome BBR như: KTTP nhỏ (KTTP trung bình < 200 nm) và phân bố KTTP hẹp (PDI < 0,3), hiệu suất liposome hóa cao (>85%), giải phóng dược chất kéo dài trong môi trường đệm phosphat pH 6,8 trên 12 giờ.

Xây dựng được công thức và quy trình bào chế proliposome BBR bằng phương pháp bao hạt trên thiết bị bao tầng sôi nhằm tăng độ ổn định, thuận lợi trong mở rộng quy mô và hướng tới ứng dụng vào dạng thuốc dùng qua đường uống. Proliposome BBR sau khi phân tán vào nước tạo thành liposome có đặc tính tương tự như liposome BBR bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film, nhưng có hàm lượng dược chất cao hơn, khắc phục được nhược điểm kém ổn định của liposome.

Xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng BBR trong huyết tương chuột cống. Phương pháp có tính khả thi, có thể áp dụng cho nghiên cứu SKD của BBR và đã chứng minh được liposome BBR với liều tương ứng BBR 100 mg/kg có khả năng cải thiện SKD của BBR dùng đường uống trên chuột cống ( $C_{max}$  cao gấp 2,46 lần,  $AUC_{0-36h}$  cao gấp 6,28 lần so với hỗn dịch quy ước BBR).

Đã chứng minh được liposome BBR có khả năng làm hạ lipid máu nội sinh trên chuột nhắt tốt hơn so với BBR tự do. Liposome BBR liều tương ứng với BBR 50 mg/kg và 100 mg/kg làm giảm cholesterol tỉ trọng thấp (LDL-C) lần lượt ở mức 54,11% và 57,0%

so với lô chứng bệnh ( $p < 0,001$ ), giảm triglycerid (TG) lần lượt ở mức 37,7% và 38,2% ( $p < 0,05$ ).

#### **4. Cấu trúc của luận án**

- Luận án gồm 155 trang, 46 bảng, 46 hình, 165 tài liệu tham khảo. Bố cục gồm: Đặt vấn đề (2 trang); tổng quan (28 trang); nguyên liệu, trang thiết bị, nội dung và phương pháp nghiên cứu (25 trang); kết quả nghiên cứu (71 trang); bàn luận (27 trang); kết luận và đề xuất (2 trang); danh mục các công trình đã công bố liên quan đến luận án (1 trang); tài liệu tham khảo (15 trang); phụ lục (50 trang).

#### **Chương 1. TỔNG QUAN**

Phần tổng quan trình bày các nội dung: Khái quát chung về berberin, liposome, proliposome; các nghiên cứu về bào chế liposome berberin và proliposome berberin; các nghiên cứu đánh giá SKD và tác dụng hạ lipid máu *in-vivo* của BBR, liposome BBR và proliposome BBR dùng đường uống.

#### **Chương 2. NGUYÊN LIỆU, TRANG THIẾT BỊ, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

##### **2.1 NGUYÊN VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU**

###### **2.1.1. Nguyên vật liệu**

- Nguyên liệu, hóa chất, tá dược sử dụng trong nghiên cứu đạt tiêu chuẩn Dược Điển Việt Nam V, BP, USP hoặc tinh khiết phân tích hoặc dùng cho HPLC và LC-MS/MS.

###### **2.1.2. Thiết bị**

Sử dụng các thiết bị bào chế và đánh giá: máy cắt quay R-300, thiết bị đùn tay mini extruder, máy bao tâng sôi Mini-Glatt, máy bao tâng sôi Diosna-Minilab, máy khuấy từ, bể siêu âm, bể điều nhiệt, tủ vi khí hậu Binder KBF P, tủ sấy chân không, máy đo KTTP Zetasizer, thiết bị thử độ hòa tan Erweka-DT, kính hiển vi điện tử



đông lạnh cryo-EM FEI Talos Artica, kính hiển vi điện tử quét Regulus 8100, kính hiển vi điện tử truyền qua Jeol-Jem1010, kính hiển vi điện tử huỳnh quang 2 photon Leica TCS SP8, máy đo nhiễu xạ tia X Equinox 5000, máy quang phổ hồng ngoại FTIR Spectrum Two™, máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent HPLC 1200, máy sinh hóa TC 3300 plus Teco Diagnosis, hệ thống sắc ký lỏng Acquity H-class kết hợp khối phổ Xevo TQD-Waters và một số thiết bị khác.

## **2.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU**

- Thẩm định phương pháp định lượng berberin bằng quang phổ UV-Vis, sắc ký lỏng hiệu năng cao và sắc ký lỏng kết hợp khối phổ.
- Nghiên cứu tiền công thức.
- Nghiên cứu bào chế và đánh giá một số đặc tính của liposome berberin.
- Xây dựng công thức và quy trình bào chế proliposome berberin, nghiên cứu nâng cấp quy mô bào chế proliposome berberin từ 25 g/mẻ lên 200 g/mẻ, đánh giá một số đặc tính của proliposome và liposome tạo thành từ proliposome, theo dõi độ ổn định và xây dựng một số chỉ tiêu chất lượng của proliposome berberin.
- Đánh giá sinh khả dụng *in-vivo* trên động vật thí nghiệm của liposome berberin tạo thành từ proliposome berberin.
- Đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh trên động vật thí nghiệm của liposome berberin tạo thành từ proliposome berberin.

## **2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.3.1. Thẩm định phương pháp định lượng**

#### **2.3.1.1. Thẩm định khoảng nồng độ tuyến tính của phương pháp định lượng berberin bằng quang phổ hấp thụ UV-Vis**

Xác định bước sóng cực đại hấp thụ, xây dựng đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ BBR.

### ***2.3.1.2. Thẩm định phương pháp định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao***

Phương pháp định lượng BBR bằng HPLC được lựa chọn với các điều kiện sắc ký: cột sắc ký Inertsil®-ODS3, 250 x 4,6 mm, kích thước hạt nhỏ 5 µm. Pha động là hỗn hợp acetonitril : dung dịch đệm KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,033M = 48:52, được lọc qua màng lọc kích thước lỗ lọc 0,45 µm. Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu: 10 µl. Detector UV-Vis phát hiện ở bước sóng 350 nm.

Thẩm định phương pháp định lượng dựa vào các chỉ tiêu: tính thích hợp của hệ thống, tính chọn lọc-độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng và độ chính xác.

### ***2.3.1.3. Thẩm định phương pháp định lượng berberin trong huyết tương chuột cống***

Phương pháp kết tủa protein được sử dụng để chiết BBR trong huyết tương. Chuẩn nội là glibenclamid. Định lượng BBR trong huyết tương bằng phương pháp LC-MS/MS. Điều kiện sắc ký gồm có cột C18 với kích thước cột 50 x 2,1 mm, kích thước hạt nhỏ 1,7 µm, nhiệt độ cột 40°C. Pha động là hỗn hợp acetonitril : acid formic 0,1% (60:40). Tốc độ dòng 0,2 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu 5 µl.

*Thẩm định phương pháp định lượng:* tiến hành theo hướng dẫn của EMA và FDA về định lượng dược chất trong dịch sinh học dựa trên các tiêu chí: sự phù hợp của hệ thống, tính chọn lọc - đặc hiệu của phương pháp, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày, độ chính xác khi pha loãng, tỉ lệ thu hồi, ảnh hưởng của nền mẫu, độ ổn định.

### **2.3.2. Phương pháp nghiên cứu tiền công thức**

#### **2.3.2.1. Nghiên cứu tính chất của dược chất và tá dược**

a. *Đánh giá hình thái và kích thước tiểu phân*: sử dụng kính hiển vi điện tử quét.

b. *Phương pháp nhiễu xạ tia X*

c. *Phương pháp đo phổ hồng ngoại FTIR*

d. *Phương pháp đo phổ huỳnh quang*

e. *Phương pháp chụp hình ảnh phát quang*

#### **2.3.2.2. Nghiên cứu tương tác giữa dược chất với tá dược**

Dược chất và tá dược được phối hợp với nhau theo các tỉ lệ nhất định để tạo thành hỗn hợp vật lý, bảo quản ở nhiệt độ  $40 \pm 2$  °C và độ ẩm  $75 \pm 5\%$ , đánh giá hình thức và hàm lượng BBR trong mẫu trước và sau khi lưu ở điều kiện trên bằng phương pháp HPLC.

### **2.3.3. Phương pháp bào chế liposome berberin**

#### **2.3.3.1. Phương pháp tiêm ethanol**

BBR và các tá dược HSPC, DSPG, NaDC  $\alpha$ -tocopherol được hòa tan trong 40 ml ethanol tuyệt đối bằng siêu âm, gia nhiệt đến 45°C. Tiêm dung dịch thu được vào 120 ml nước cất ở nhiệt độ từ 45-65 °C, tốc độ tiêm 1 ml/phút, khuấy từ với tốc độ 500 vòng/phút, sử dụng kim tiêm 27G x 0,5". Sau khi tiêm hết dung dịch tạo liposome, tiếp tục khuấy từ và duy trì nhiệt độ từ 45-65 °C trong khoảng 30 phút. Hỗn hợp thu được cho vào bình cầu dung tích 1 lít rồi tiến hành loại bỏ dung môi ethanol trong máy cất quay áp suất giảm ở điều kiện khảo sát: nhiệt độ 60 – 65 °C, áp suất 130-200 mbar, tốc độ vòng quay 150 vòng/phút trong thời gian từ 45-60 phút để thu được 60 ml liposome. Hỗn dịch liposome tạo ra được bảo quản ở nhiệt độ 2-8 °C cho các phân tích tiếp theo.

### **2.3.3.2. Phương pháp hydrat hóa film**

Được chất và các tá dược HSPC, DSPG, NaDC,  $\alpha$ -tocopherol được hòa tan trong hỗn hợp dung môi methanol và cloroform với tỉ lệ 2,5:1 (v/v). Dung dịch thu được cho vào bình cầu dung tích 1 lít, thêm 3g bi thủy tinh, cất quay áp ở điều kiện khảo sát: nhiệt độ từ 41 - 55 °C; áp suất giảm 280-330 mbar; tốc độ quay của bình cầu 150 vòng/phút để tạo ra màng film. Tiếp tục cất quay cho đến khi loại bỏ hết các vết dung môi trên thành bình. Hydrat hóa film bằng 60 ml nước cất ở nhiệt độ 65 °C, tốc độ quay 200 vòng/phút trong 60 phút. Hỗn dịch liposome tạo thành được làm giảm kích thước tiểu phân bằng phương pháp đùn từ 20 - 60 lần qua màng polycarbonat có kích thước lỗ lọc 400 nm. Liposome sau khi làm giảm KTTT được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 – 8 °C cho các phân tích tiếp theo.

### **2.3.4. Phương pháp bào chế proliposome**

Thành phần tạo liposome gồm BBR, HSPC, DSPG, NaDC và  $\alpha$ -tocopherol được hòa tan trong hỗn hợp dung môi methanol và cloroform với tỉ lệ 2,5:1 (v/v). Manitol (chất mang) được cho vào buồng tạo hạt của máy bao tầng sôi. Khảo sát tỉ lệ khối lượng giữa thành phần tạo liposome và chất mang, một số thông số quy trình gồm nhiệt khí vào, tốc độ thổi khí. Sau khi nhiệt độ buồng sấy đạt đến nhiệt độ yêu cầu, tiến hành phun dung dịch tạo liposome lên trên chất mang theo thông số khảo sát. Sau khi phun hết dung dịch, tiếp tục thổi khí nóng trong thời gian 1 giờ để loại bỏ dung môi và sấy khô proliposome.

### **2.3.5. Phương pháp đánh giá một số đặc tính của liposome berberin**

Liposome berberin được đánh giá hình thái-cấu trúc, trạng thái vật lý bằng sử dụng kính hiển vi điện tử đông lạnh, kính hiển vi

huỳnh quang, máy đo nhiễu xạ tia X. Kích thước tiểu phân và phân bố kích thước tiểu phân được đánh giá bằng phương pháp nhiễu xạ ánh sáng động, phân tích vết hạt. Hiệu suất liposome hóa được đánh giá bằng phương pháp siêu lọc. Khả năng giải phóng dược chất qua màng thẩm tích được đánh giá bằng thiết bị máy thử độ hòa tan Erweka.

### **2.3.6. Phương pháp đánh giá một số đặc tính của proliposome berberin**

Proliposome BBR được đánh giá hình thái, cấu trúc, trạng thái, khả năng giải phóng dược chất *in-vitro*. Mất khối lượng do làm khô được xác định bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi, khối lượng riêng biểu kiến được xác định bằng phương pháp gõ. Định lượng hàm lượng BBR bằng HPLC. Độ ổn định được đánh giá dựa theo quy định của ASEAN về điều kiện bảo quản chung. KTTP và phân bố KTTP, hiệu suất nạp dược chất của liposome tạo thành từ proliposome được đánh giá tương tự như phương pháp đánh giá liposome BBR. Hình thái của liposome tạo thành từ proliposome BBR được đánh giá bằng chụp TEM.

### **2.3.7. Đánh giá sinh khả dụng *in-vivo* của liposome berberin trên chuột cống**

*Đối tượng thử:* 14 chuột cống giống đực trưởng thành khỏe mạnh, được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm, mỗi nhóm 7 động vật.

*Liều thử:* chuột nhóm chứng được cho uống hỗn dịch quy ước BBR với liều BBR 100mg/kg cân nặng. Chuột nhóm thử được cho uống liposome BBR tạo thành từ proliposome tương đương với liều BBR 100 mg/kg.

*Phương pháp lấy mẫu:* Lấy máu tĩnh mạch đuôi 14 thời điểm, mỗi thời điểm 0,25 ml bắt đầu từ thời điểm 5 phút, 15 phút, 30 phút, 1;

1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 24 và 36 giờ. Ngay sau khi lấy máu, chuột được tiêm màng bụng nước muối sinh lý để bổ sung thể tích tuần hoàn.

*Xử lý mẫu:* Mẫu máu được cho vào ống Eppendorf 2ml đã chứa sẵn heparin (20 IU/ống), ly tâm với tốc độ 3500 vòng/phút trong 15 phút. Tách lấy phần huyết tương. Bảo quản ở nhiệt độ  $-35^{\circ}\text{C}$  cho đến ngày phân tích.

*Định lượng nồng độ BBR trong huyết tương chuột:* như phương pháp trình bày ở mục 2.3.1.3.

*Phương pháp phân tích các thông số dược động học:* Các thông số dược động học được phân tích bằng phần mềm Phoenix WinNolin 8.3, sử dụng mô hình không ngăn để tính toán các thông số dược động học như  $C_{\max}$ ,  $T_{\max}$ ,  $\text{AUC}_{0-t}$ ,  $\text{AUC}_{0-\infty}$ ,  $\text{MRT}_{0-t}$ ,  $\text{MRT}_{0-\infty}$ . Các giá trị  $C_{\max}$ ,  $T_{\max}$ ,  $\text{AUC}$ ,  $\text{MRT}$  được so sánh bằng sử dụng 2 phép thống kê t-test một phía với khoảng tin cậy 90%. Các giá trị  $T_{\max}$  giữa 2 nhóm được so sánh bằng sử dụng phép kiểm tra tổng xếp hạng phi tham số Wilcoxon rank sum test.

### **2.3.8. Đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh của liposome BBR trên chuột nhắt**

*Đối tượng thử và liều thử:* Chuột nhắt trắng giống đực trưởng thành khỏe mạnh, được chia ngẫu nhiên thành 6 nhóm (mỗi nhóm từ 8-9 động vật). Trong vòng 10 ngày, mỗi ngày chuột được uống như sau: nhóm 1: nhóm chứng sinh lý (uống nước cất), nhóm 2: chứng bệnh lý (uống nước cất), nhóm 3: chứng dương (uống atorvastatin liều 20 mg/kg), nhóm 4: đối chiếu (uống BBR liều 100 mg/kg), nhóm 5: nhóm thử 1 (uống liposome BBR liều tương ứng BBR 50mg/kg) và nhóm 6: nhóm thử 2 (uống liposome BBR liều tương ứng BBR 100 mg/kg).

*Mô hình gây tăng lipid máu nội sinh:* Vào ngày thứ 10, chuột ở nhóm 1 được tiêm phúc mạc bằng nước muối sinh lý, chuột ở 5 nhóm còn lại được tiêm bằng dung dịch poloxame 407 2% trong nước muối sinh lý với liều 200 mg/kg cân nặng.

*Phương pháp lấy mẫu và xử lý mẫu:* lấy 0,25 ml máu tĩnh mạch xoang mắt cho vào ống Eppendorf 2ml, để lắng 30 phút rồi ly tâm ở 3500 vòng/phút trong thời gian 15 phút ở 4 °C, lấy huyết thanh chuyển sang ống Eppendorf khác và bảo quản ở 2 – 8 °C trong quá trình phân tích các thông số lipid máu.

*Phương pháp định lượng:* Nồng độ TC, LDL-C, HDL-C và TG được định lượng bằng sử dụng bộ kit enzym với thiết bị phân tích hóa sinh bán tự động TC-3300 Plus.

*Phương pháp phân tích số liệu:* Số liệu nồng độ TC, LDL-C, HDL-C và TG trong huyết thanh được phân tích bằng phần mềm Microsoft excel, SPSS 20.0. So sánh sự khác biệt giữa các lô thử so với lô chứng bằng kiểm định student t-test. Các giá trị  $p < 0,05$  được coi là khác nhau có ý nghĩa thống kê.

### **Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

#### **3.1. KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG**

##### **3.1.1. Thẩm định khoảng nồng độ tuyến tính của phương pháp định lượng berberin bằng quang phổ hấp thụ UV-Vis**

Kết quả thẩm định cho thấy có sự phụ thuộc tuyến tính giữa mật độ quang và nồng độ BBR tại bước sóng 350 nm (dung môi ethanol 96%) và bước sóng 343 nm (dung môi nước cất) trong khoảng nồng độ đã khảo sát với hệ số tương quan  $r = 0,995$  cho cả 2 dung môi. Như vậy, có thể sử dụng phương pháp UV-Vis để định lượng nhanh nồng độ BBR trong nghiên cứu bào chế.

### **3.1.2. Thẩm định phương pháp định lượng berberin bằng phương pháp HPLC**

Kết quả thẩm định phương pháp định lượng BBR bằng HPLC cho thấy phương pháp có tính thích hợp hệ thống và độ đặc hiệu với BBR. Trong khoảng nồng độ khảo sát, có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ BBR. Phương pháp có độ đúng cao (phần trăm tìm lại từ 100,0% -101,1%) độ chính xác với RSD < 2%. Như vậy, phương pháp HPLC có thể sử dụng để định lượng hàm lượng BBR trong mẫu nghiên cứu, xây dựng tiêu chuẩn và đánh giá độ ổn định.

### **3.1.3. Thẩm định phương pháp định lượng berberin trong huyết tương chuột bằng phương pháp sắc ký lỏng kết hợp khối phổ (LC-MS/MS)**

Phương pháp định lượng BBR trong huyết tương chuột bằng LC-MS/MS có tính thích hợp, tính chọn lọc-độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính (0,2 -25 ng/ml), giới hạn định lượng dưới, độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày, độ chính xác khi pha loãng, tỷ lệ thu hồi, ảnh hưởng của nền mẫu, độ ổn định đáp ứng các yêu cầu của một phương pháp phân tích nồng độ thuốc trong dịch sinh học.

## **3.2. NGHIÊN CỨU TIỀN CÔNG THỨC**

### **3.2.1. Kết quả đánh giá một số đặc tính của dược chất**

BBR tồn tại ở dạng tinh thể, gây ra các nhiễu xạ đặc trưng với các vạch nhiễu xạ sắc nhọn, cường độ từ trung bình đến rất mạnh ở các vị trí 9,1°; 9,7°; 13,4°; 16,7°; 25,8° 2 $\theta$ . Phổ hồng ngoại của BBR thể hiện các dao động đặc trưng chủ yếu của 3 nhóm chức oxyd thơm, vòng ni-tơ 6 cạnh và ether oxyd. BBR có khả năng phát huỳnh quang với phổ phát quang trong môi trường nước ở bước sóng từ 460 nm đến 800 nm và trong môi trường ethanol từ 470 nm-670 nm.



### **3.2.2. Kết quả nghiên cứu tương tác giữa dược chất với tá dược**

Sau 1 tháng bảo quản ở điều kiện theo dõi, chưa có tương kỵ nào ảnh hưởng đến độ ổn định của dược chất BBR với các tá dược HSPC, DSPG, alpha-tocopherol, NaDC, manitol.

## **3.3. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ LIPOSOME BERBERIN**

### **3.3.1. Thiết kế công thức**

Công thức bào chế liposome được thiết kế bằng cách phối hợp dược chất BBR với các tá dược theo các tỉ lệ mol khác nhau BBR : lipid : NaDC :  $\alpha$ -tocopherol (9 : 9 : 2 : 0; 9 : 9 : 0 : 3; 8 : 9 : 2 : 2; 8 : 9 : 2 : 0; 6 : 9 : 2 : 0; và 9 : 9 : 0 : 3). Trong đó thành phần lipid gồm HSPC và DSPG với tỉ lệ mol thay đổi từ 7:3 đến 6:4.

### **3.3.2. Bào chế liposome berberin bằng phương pháp tiêm ethanol**

Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng thuộc về quy trình bào chế đã lựa chọn được thông số bào chế như sau: nhiệt độ phối hợp 2 pha 65°C, loại bỏ dung môi với khoảng nhiệt độ cất quay từ 60-65°C, áp suất cất quay 180 mbar.

Kết quả khảo sát các yếu tố thuộc về công thức cho thấy, mẫu có sự tham gia của NaDC và  $\alpha$ -tocopherol thì hiệu suất nạp có xu hướng tăng, KTTTP nhỏ, phân bố KTTTP hẹp. Tỉ lệ mol BBR càng tăng thì hiệu suất nạp dược chất giảm từ 64,9% đến 55,9%. Tỉ lệ mol HSPC:DSPG có ảnh hưởng đến hiệu suất nạp dược chất, tỉ lệ cho hiệu suất nạp cao nhất là HSPC:DSPG = 4:6.

### **3.3.3. Bào chế liposome berberin bằng phương pháp hydrat hóa film**

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thành phần cấu tạo liposome cũng cho kết quả tương tự như ở phương pháp tiêm ethanol: sự tham gia của NaDC và  $\alpha$ -tocopherol làm giảm KTTTP của liposome. Tuy nhiên KTTTP và phân bố KTTTP của liposome bào chế bằng phương

pháp hydrat hóa film lớn hơn so với phương pháp tiêm ethanol nên nghiên cứu đã lựa chọn biện pháp làm giảm KTTP bằng đun 60 lần qua màng lọc polycarbonat kích cỡ lỗ lọc 400 nm (sau khi đun KTTP < 250nm và phân bố KTTP < 0,3).

Về ảnh hưởng của tỉ lệ mol dược chất, hiệu suất nạp dược chất có xu hướng tăng dần từ 60,5% lên 78% khi giảm dần tỉ lệ mol dược chất từ 9 xuống 6 trong công thức.

Về ảnh hưởng của tỉ lệ mol HSPC:DSPG: hiệu suất liposome hóa tối ưu (87%) khi tỉ lệ HSPC : DSPG = 4 : 6.

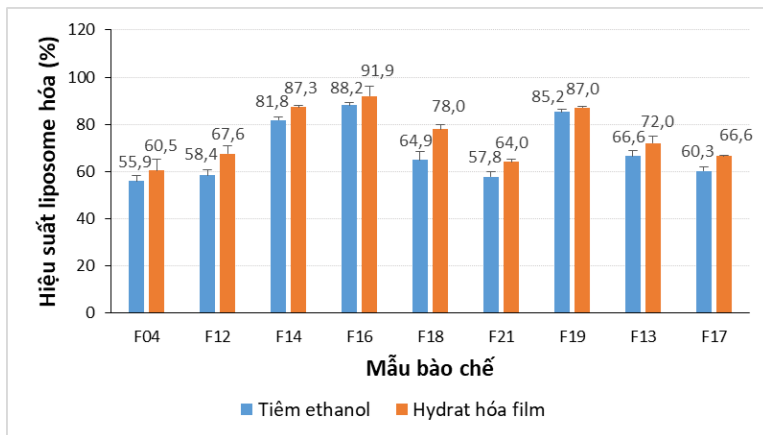
### 3.3.4. So sánh ảnh hưởng của phương pháp bào chế lên đặc tính của liposome berberin

Về ảnh hưởng của phương pháp bào chế lên KTTP và phân bố KTTP được trình bày ở bảng 3.15. Kết quả ở bảng trên cho thấy phương pháp tiêm ethanol tạo liposome có KTTP và phân bố KTTP nhỏ hơn phương pháp hydrat hóa film.

*Bảng 3.15. Ảnh hưởng của phương pháp bào chế lên KTTP và phân bố KTTP (n=3-5, TB ± SD)*

Ký hiệu mẫu	Phương pháp tiêm ethanol		Phương pháp hydrat hóa film (Sau khi đun qua màng polycarbonat)	
	KTTP TB (d.nm)	PDI	KTTP TB (d.nm)	PDI
F04	133,6 ± 1,1	0,209 ± 0,008	248,7 ± 3,3	0,272 ± 0,053
F12	120,4 ± 1,1	0,243 ± 0,001	292,0 ± 3,9	0,181 ± 0,033
F18	50,9 ± 1,2	0,259 ± 0,009	239,2 ± 2,4	0,243 ± 0,009
F21	117,3 ± 1,3	0,209 ± 0,008	236,0 ± 2,0	0,248 ± 0,009
F14	243,6 ± 4,1	0,195 ± 0,012	208,2 ± 3,2	0,312 ± 0,031
F16	91,2 ± 2,0	0,232 ± 0,015	448,5 ± 6,6	0,276 ± 0,016
F17	82,3 ± 1,3	0,113 ± 0,004	220,5 ± 1,4	0,237 ± 0,009
F13	149,1 ± 0,8	0,220 ± 0,008	182,8 ± 2,6	0,297 ± 0,022
F19	146,5 ± 2,7	0,186 ± 0,007	111,5 ± 3,7	0,285 ± 0,011

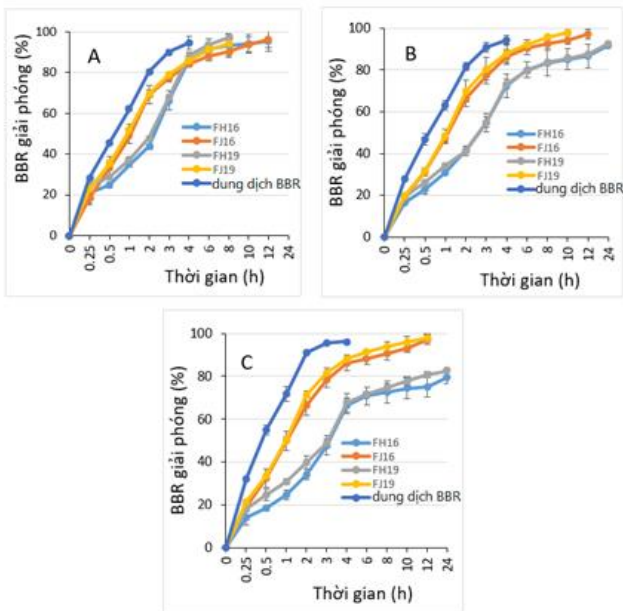
Hiệu suất liposome hóa của liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film cao hơn so với liposome bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol (hình 3.11).



Hình 3.11. Hiệu suất liposome hóa của các mẫu liposome BBR bào chế theo hai phương pháp tiêm ethanol và hydrat hóa film

Tiến hành đánh giá giải phóng dược chất từ liposome bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol (ký hiệu mẫu FJ) và phương pháp hydrat hóa film (ký hiệu mẫu FH) của 2 công thức có hiệu suất liposome hóa cao gồm F16 và F19. Trong đó công thức F16 và F19 có thành phần theo tỉ lệ mol BBR : lipid : NaDC :  $\alpha$ -tocopherol lần lượt là 6 : 9 : 2 : 0 và 8 : 9 : 2 : 2. Lipid sử dụng gồm HSPC : DSPG = 4 : 6 (tỉ lệ mol) trong cả hai công thức. Kết quả đánh giá giải phóng dược chất *in vitro* (hình 3.13) cho thấy tốc độ giải phóng dược chất từ liposome bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol nhanh hơn từ liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film trong cả 3 môi trường giải phóng: acid hydrochloric pH 1,2, đệm phosphat pH 4,5 và đệm phosphat pH 6,8. Trong môi trường đệm phosphat 6,8, khả năng

kéo dài giải phóng của các mẫu tiêm ethanol (FJ16, FJ19) và các mẫu hydrat hóa film (FH16, FH19) lần lượt là trên 12 giờ và trên 24 giờ. Mẫu F19 có hiệu suất nạp cao, kéo dài thời gian giải phóng dược chất tương đương với mẫu F16. Hơn nữa, mẫu F19 lại có tỉ lệ mol dược chất cao nên công thức của mẫu F19 được chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.13. Phần trăm giải phóng qua màng thẩm tích của dược chất từ liposome BBR bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol và hydrat hóa film ở 3 môi trường giải phóng ở 37 °C. A. Môi trường dung dịch acid hydrochloric 0,1N (pH = 1,2); B. Môi trường đệm phosphat pH4,5; C. Môi trường đệm phosphat pH 6,8.

### **3.4. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ PROLIPOSOME BERBERIN**

Kết quả ở mục 3.3.4 cho thấy liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film cho hiệu suất liposome hóa cao, kéo dài thời gian giải phóng dược chất *in vitro*. Proliposome BBR bằng phương pháp bao hạt, khi hoàn nguyên, lớp bao được hydrat hóa để tạo thành liposome cũng tương tự nguyên lý hydrat hóa film. Do đó, đề tài tiếp tục nghiên cứu bào chế proliposome BBR ở dạng rắn để khắc phục nhược điểm của liposome (kém ổn định, khó nâng cấp quy mô), đồng thời tăng hiệu suất nạp, kéo dài khả năng giải phóng dược chất của liposome pha lại từ proliposome trong đường tiêu hóa.

Công thức F19 vừa có tỉ lệ mol dược chất cao, vừa có hiệu suất liposome hóa cao và kéo dài giải phóng dược chất nên được lựa chọn để bào chế proliposome BBR với chất mang là manitol.

#### **3.4.1. Đánh giá ảnh hưởng một số yếu tố về công thức và thông số trong quy trình đến đặc tính proliposome berberin**

Kết quả đánh giá về mặt hình thức cho thấy thông số tối ưu để bào chế proliposome BBR quy mô 25 g/m<sup>2</sup> là nhiệt độ khí vào 45 °C, tốc độ thổi khí 10 m<sup>3</sup>/h, áp suất phun 0,7 bar, tốc độ phun dịch 1,5 ml/phút. Proliposome BBR tạo ra có KTTTP đều đặn, bề mặt chất mang manitol được tráng đều lớp film của các thành phần tạo liposome.

Kết quả về hàm lượng dược chất của mẫu có tỉ lệ khối lượng giữa thành phần tạo liposome (BBR, lipid, NaDC và  $\alpha$ -TP) : manitol = 2:1 đạt  $14,7 \pm 1,0\%$ .

Kết quả về đánh giá KTTTP và phân bố KTTTP của liposome tạo thành từ proliposome BBR của mẫu bào chế với thông số nhiệt khí vào 45 °C, tốc độ thổi khí 10 m<sup>3</sup>/h có hiệu suất nạp  $87,3 \pm 1,5\%$  -  $87,8 \pm 1,0\%$ , KTTTP từ  $116,6 \pm 5,8$  nm đến  $123,5 \pm 10,8$  nm.

### **3.4.2. Đánh giá một số đặc tính của proliposome berberin**

#### **3.4.2.1. Đặc tính lý hóa**

Phổ nhiễu xạ tia X cho thấy, mẫu proliposome BBR bị mất pic nhiễu xạ đặc trưng của BBR. Chứng tỏ BBR đã chuyển sang trạng thái vô định hình.

Phổ hồng ngoại của proliposome BBR có một số tín hiệu bị biến mất hoặc xuất hiện với cường độ thấp. Điều này chứng tỏ BBR đã tương tác với các nhóm chức của các phần khác trong công thức làm giảm sự giao động của các nhóm chức đặc trưng.

#### **3.4.2.2. Hiệu suất quá trình, khối lượng riêng biểu kiến**

Ba mẻ proliposome berberin có hiệu suất trung bình đạt  $83,6 \pm 2,7\%$ , khối lượng riêng biểu kiến trung bình  $0,459 \pm 0,01$  g/ml.

#### **3.4.2.3. Khả năng hydrat hóa**

Trong môi trường acid hydrocloric 0,1N (pH 1,2), lớp film của proliposome BBR rất khó hydrat hóa để tạo liposome. Trong môi trường đệm phosphat pH 4,5 và pH 6,8, lớp màng film được hydrat hóa nhanh, tạo ra những túi nhỏ và phân tán ra môi trường.

#### **3.4.2.4. Khả năng giải phóng dược chất**

Trong vòng 4 giờ đầu, phần trăm giải phóng dược chất của proliposome BBR ở môi trường acid hydrocloric pH 1,2, đệm phosphat pH 4,5 và pH 6,8 lần lượt là 24,98%, 70,28% và 60,81%. Trong vòng 12 giờ, tỉ lệ này ở 3 môi trường lần lượt là 50,90%, 87,62% và 81,51%. Trong môi trường pH 6,8, dược chất kéo dài giải phóng đến 24 giờ với phần trăm giải phóng 83,64%.

### **3.4.3. Xây dựng công thức và quy trình bào chế proliposome berberin quy mô phòng thí nghiệm**

Quy trình bào chế proliposome BBR quy mô 25 g/mẻ trên máy bao tâng sôi Mini-Glatt được thực hiện với các thành phần tạo

liposome gồm BBR,  $\alpha$ -TP, NaDC, HSPC, DSPG được hòa tan trong dung môi (MeOH: CHCl<sub>3</sub>) tỉ lệ (2,5:1). Chất mang manitol được cho vào buồng tạo hạt. Các thông số quy trình được cài đặt như sau: nhiệt độ khí vào 45 °C, tốc độ thổi khí 10 m<sup>3</sup>/h, tốc độ phun dịch 1,5ml/phút, áp suất phun 0,7 bar. Sau khi phun hết dịch phun lên chất mang, tiếp tục thổi khí nóng 10 m<sup>3</sup>/h với nhiệt khí vào 45 °C trong 1 giờ để sấy khô proliposome BBR. Sấy tiếp trong tủ sấy chân không ở 40°C trong 8 giờ để loại dung môi.

#### **3.4.4. Nghiên cứu nâng cấp quy mô bào chế proliposome berberin 200 g/m<sup>2</sup>**

Thành phần công thức và các bước quy trình ở quy mô 200 g/m<sup>2</sup> trên thiết bị Diosna-Minilab được thực hiện tương tự như quy mô 25 g/m<sup>2</sup>, chỉ khác nhau về thông số quy trình. Thông số quy trình ở hai quy mô như ở bảng 3.23.

*Bảng 3.23. Các thông số quy trình bao hạt khi nâng cấp quy mô*

<b>Thông số</b>	<b>Quy mô 25 g/m<sup>2</sup></b>	<b>Quy mô 200 g/m<sup>2</sup></b>
Nhiệt gió vào (°C)	45	45
Áp suất phun (bar)	0,7	1,2
Tốc độ phun dịch (ml/phút)	1,5	4,5
Tốc độ thổi khí (m <sup>3</sup> /h)	10	
Tốc độ thổi khí (%)		45

#### **Đặc tính proliposome bào chế ở quy mô 200 g/m<sup>2</sup>**

Proliposome BBR tạo ra có bề mặt được tráng lớp film đồng nhất, KTTTP đều đặn. Hiệu suất quá trình trên 80%, khối lượng riêng biểu kiến của proliposome berberin xấp xỉ 0,46 g/ml, mất khối lượng do làm khô dưới 5%, hàm lượng BBR từ 14-15%. Giải phóng dược chất từ proliposome BBR trong môi trường acid hydrochloric pH 1,2, môi

trường đệm phosphat pH 4,5 và đệm phosphat pH 6,8 trong 24 giờ lần lượt là  $48,52 \pm 0,93\%$ ,  $97,11 \pm 0,29\%$  và  $86,06 \pm 2,35\%$ .

Liposome tạo thành từ proliposome BBR có KTTP trung bình < 200 nm, phân bố KTTP < 0,5, hiệu suất liposome hóa > 85%.

**Đề xuất một số tiêu chuẩn chất lượng**

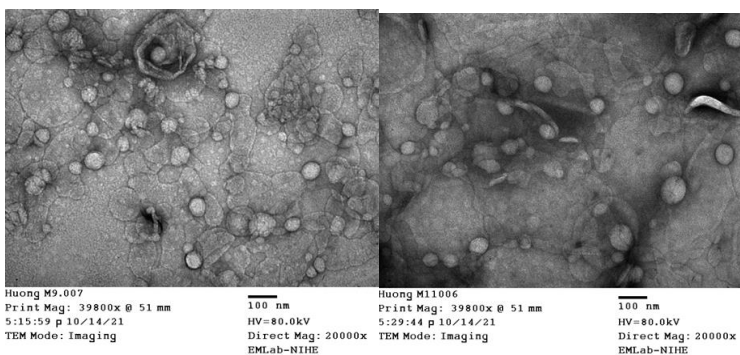
*Bảng 3.27. Dự kiến tiêu chuẩn chất lượng của proliposome BBR dựa trên kết quả 3 lô liên tiếp*

<b>Chỉ tiêu</b>	<b>Dự kiến tiêu chuẩn</b>	<b>Phương pháp thử</b>
Hình thức	Hạt màu vàng.	Cảm quan
Mất khối lượng do làm khô (%)	$\leq 5,0$	Theo Dược điển Việt nam V, phụ lục 9.6
Khối lượng riêng biểu kiến (g/ml)	$\geq 0,350$	Theo Dược điển Việt nam V, phụ lục 9.13
Định tính	Sắc ký đồ của mẫu thử phải có 1 pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic BBR chuẩn	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
Hàm lượng BBR trong proliposome (%)	13,5 – 16,5	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
Phần trăm giải phóng dược chất trong môi trường pH 6,8	Trong 1 giờ đầu: < 40% Trong 4 giờ đầu: 50-65% Sau 10 giờ: $\geq 70\%$	Phép thử giải phóng dược chất qua màng thấm tích
Liposome BBR hoàn nguyên từ proliposome BBR: + KTTP trung bình + PDI + Hiệu suất liposome hóa (%)	$\leq 500$ (d.nm) $\leq 0,5$ $\geq 70$	Tán xạ ánh sáng động Phương pháp siêu lọc kết hợp với ly tâm



### 3.4.5. Nghiên cứu độ ổn định của proliposome berberin

Sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện thực và điều kiện lão hóa cấp tốc, proliposome BBR vẫn giữ được hình thái và cấu trúc bề mặt. Trạng thái lý hóa, mất khối lượng do làm khô hầu như không thay đổi. Hàm lượng BBR có thay đổi nhưng vẫn nằm trong giới hạn cho phép. Giải phóng dược chất, KTTP và hiệu suất liposome hóa của liposome tạo thành hầu như không thay đổi so với ban đầu.



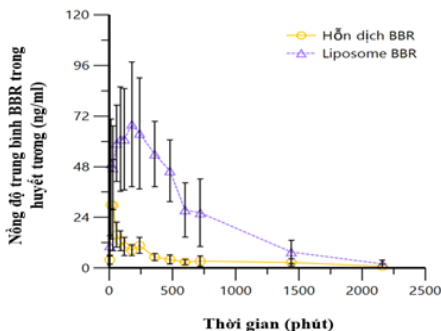
A

B

Hình 3.34. Hình thái của liposome tạo thành từ proliposome BBR sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện thực (A) và điều kiện LHCT (B) quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), độ phóng đại 20.000 lần

### 3.5. ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG *IN VIVO* CỦA LIPOSOME BERBERIN

Kết quả về đánh giá SKD *in-vivo* cho thấy giá trị các thông số dược động học ở giai đoạn hấp thu ở nhóm uống liposome BBR cao hơn đáng kể so với nhóm uống hỗn dịch quy ước BBR ( $C_{max}$  cao gấp 2,46 lần,  $AUC_{0-36h}$  cao gấp 6,28 lần,  $AUC_{0-\infty}$  cao gấp 5,53 lần).



Hình 3.35. Đường biểu diễn nồng độ trung bình BBR trong huyết tương chuột theo thời gian của nhóm uống hỗn dịch quy ước BBR và nhóm uống liposome BBR liều tương đương 100 mg/kg

### 3.6. ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG HẠ LIPID MÁU NỘI SINH CỦA LIPOSOME BERBERIN

Kết quả đánh giá tác dụng làm giảm lipid máu nội sinh của liposome BBR cho thấy liposome BBR với liều tương ứng BBR 50 mg/kg cân nặng có tác dụng làm giảm 2 chỉ số lipid máu trên chuột nhất với LDL-C giảm 54,1% ( $p < 0,01$ ) và TG giảm 37,6% ( $p < 0,05$ ) so với lô chứng bệnh. Liposome BBR với liều tương đương BBR 100 mg/kg làm giảm cả 3 chỉ số TC, LDL-C và TG với mức giảm lần lượt là 15,8 % ( $p < 0,05$ ), 57,0% ( $p < 0,01$ ), 38,2% ( $p < 0,05$ ). BBR nguyên liệu với liều 100 mg/kg chưa làm giảm các chỉ số lipid một cách có ý nghĩa thống kê.

## Chương 4. BÀN LUẬN

### 4.1. VỀ NGHIÊN CỨU TIỀN CÔNG THỨC

Kết quả nghiên cứu cho thấy BBR tồn tại ở dạng kết tinh, có các dao động của các nhóm chức đặc trưng, có tính phát huỳnh quang tự nhiên và có đỉnh hấp thụ UV-Vis cực đại trong môi trường nước và

ethanol lần lượt ở bước sóng 343 nm và 350 nm. BBR không tương kỵ với tác dược trong điều kiện bảo quản. Các kết quả này giúp xây dựng được phương pháp phù hợp trong đánh giá sản phẩm bào chế.

#### **4.2. VỀ BÀO CHẾ VÀ ĐÁNH GIÁ LIPOSOME BERBERIN**

Điểm mới của trong thiết kế công thức liposome BBR là sử dụng 2 loại lipid có nhiệt chuyển pha cao hơn nhiệt độ cơ thể HSPC và DSPG với tỉ lệ 4:6 để vừa làm tăng độ ổn định của liposome trong đường tiêu hóa, vừa tăng hiệu suất nạp dược chất. Ngoài ra, trong công thức còn sử dụng NaDC và  $\alpha$ -tocopherol nhằm làm giảm KTTP, tăng hiệu suất nạp, đồng thời chống rò rỉ dược chất và tránh sự tác động của muối mật trong đường tiêu hóa.

KTTP của liposome BBR được đánh giá bằng kỹ thuật tán xạ ánh sáng động và phân tích vết hạt giúp đánh giá nhanh và chi phí thấp. Hệ kính hiển vi cũng được sử dụng để đánh giá đồng thời kích thước, hình thái và cấu trúc của liposome. Hiệu suất nạp được đánh giá bằng kỹ thuật siêu lọc là biện pháp nhanh và có độ lặp lại cao.

#### **4.3. VỀ BÀO CHẾ VÀ ĐÁNH GIÁ PROLIPOSOME BERBERIN**

Công thức bào chế liposome BBR tối ưu F19 được chọn để bào chế proliposome BBR. Chất mang manitol dễ tan trong nước để dễ tạo hỗn dịch liposome. Proliposome được bào chế bằng phương pháp bao hạt là phương pháp mới, chưa từng được công bố dùng bào chế proliposome BBR, thuận lợi cho mở rộng quy mô.

Kết quả đánh giá khả năng hydrat hóa và giải phóng dược chất từ proliposome cho thấy trong môi trường acid dạ dày, khả năng hydrat hóa kém, tỉ lệ dược chất được giải phóng rất thấp, chúng tồn tại trong môi trường này và khắc phục được nhược điểm của liposome dễ bị phá vỡ cấu trúc trong môi trường dạ dày.

#### **4.4. VỀ ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG *IN-VIVO* CỦA LIPOSOME BERBERIN**

Kết quả đánh giá SKD của liposome BBR trên chuột cống cho thấy nồng độ  $C_{max}$  và  $AUC_{0-36h}$  của nhóm chuột uống liposome BBR cao hơn nhóm chuột uống BBR tự do, chứng tỏ BBR khi nạp vào liposome được hấp thu tốt hơn so với dạng tự do vì kéo dài giải phóng dược chất, tăng tính thấm qua niêm mạc ruột.

#### **4.5. VỀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG HẠ LIPID MÁU NỘI SINH**

Kết quả đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh trên chuột nhắt cho thấy liposome BBR có khả năng làm giảm lipid máu tốt hơn so với BBR tự do. Sự khác biệt này do liposome BBR có SKD cao hơn nên đạt được nồng độ BBR đủ để làm đảo ngược quá trình ức chế biểu hiện của thụ thể LDL gây ra bởi poloxamer 407. Do đó, liposome BBR làm tăng quá trình thực bào LDL.

### **KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT**

#### **KẾT LUẬN**

##### **1. Đã xây dựng công thức và quy trình bào chế liposome BBR và proliposome berberin ở quy mô phòng thí nghiệm**

Trong nội dung thực nghiệm của luận án, liposome BBR đã được bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol và hydrat hóa film. Thành phần công thức cấu tạo nên liposome gồm BBR,  $\alpha$ -TP, NaDC và lipid với tỉ lệ mol BBR :  $\alpha$ -TP : NaDC : lipid = 8 : 2 : 2 : 9. Trong đó lipid gồm HSPC và DSPG với tỉ lệ mol HSPC : DSPG = 4 : 6. Cấu trúc và đặc tính của liposome BBR đã được đánh giá. Liposome BBR bào chế được có KTTP nhỏ (KTTP trung bình < 200 nm), phân bố KTTP hẹp (PDI < 0,3), hiệu suất liposome hóa cao (>85%), kéo dài giải phóng dược chất trong môi trường pH 6,8 trên 24 giờ (đối với liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film).

Công thức và quy trình bào chế proliposome BBR bằng phương pháp bao hạt trên thiết bị bao tầng sôi đã được xây dựng nhằm tăng độ ổn định, thuận lợi trong mở rộng quy mô và hướng tới ứng dụng vào dạng thuốc dùng qua đường uống. Thông số quy trình bào chế proliposome BBR quy mô 200 g/mẻ trên thiết bị bao tầng sôi được lựa chọn gồm nhiệt gió vào 45 °C, áp suất đầu súng phun 1,2 bar, tốc độ phun 4,5 ml, tốc độ thổi khí 45%. Sản phẩm bào chế đạt yêu cầu về độ ổn định các đặc tính như hình thức, hàm lượng, giải phóng dược chất khả năng tạo thành liposome sau thời gian bảo quản 6 tháng ở điều kiện thực và lão hóa cấp tốc. Proliposome BBR sau khi phân tán vào nước tạo ra liposome BBR có đặc tính tương tự như liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film nhưng có hàm lượng dược chất cao hơn và khắc phục được nhược điểm kém ổn định của liposome.

## **2. Đã đánh giá được sinh khả dụng đường uống của liposome berberin và tác dụng hạ lipid máu nội sinh của liposome BBR trên động vật thực nghiệm**

Kết quả đánh giá SKD của liposome BBR trên chuột cống cho thấy rằng hệ mang dược chất liposome có khả năng cải thiện SKD của BBR dùng đường uống ( $C_{max}$  tăng 2,46 lần,  $AUC_{0-36h}$  tăng 6,28 lần,  $AUC_{0-\infty}$  tăng 5,53 lần).

Liposome BBR tạo thành từ proliposome BBR với liều tương ứng BBR 50 mg/kg cân nặng có tác dụng làm giảm 2 chỉ số lipid máu trên chuột nhắt được gây tăng cholesterol máu nội sinh với LDL-C giảm 54,1% ( $p < 0,01$ ) và TG giảm 37,6% ( $p < 0,05$ ) so với lô chứng bệnh. Liposome BBR với liều tương đương BBR 100 mg/kg chuột làm giảm cả 3 chỉ số TC, LDL-C và TG với mức giảm lần lượt là 15,8 % ( $p < 0,05$ ), 57,0% ( $p < 0,01$ ), 38,2% ( $p < 0,05$ ). Trong khi đó, BBR tự do với liều 100 mg/kg không làm giảm các chỉ số cholesterol và triglycerid một cách có ý nghĩa thống kê.

### **ĐỀ XUẤT**

- Tiếp tục nâng cấp quy mô bào chế proliposome BBR
- Nghiên cứu đưa proliposome BBR vào dạng bào chế.