

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



DƯƠNG THỊ THUẦN

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

DƯƠNG THỊ THUẦN

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

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

Người hướng dẫn khoa học : 1. GS.TS. Phạm Thị Minh Huệ
2. GS.TS. Jyrki Tapio Heinämäki

HÀ NỘI, NĂM 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và một phần kết quả của đề tài khoa học công nghệ cấp thành phố Hà Nội mã số 01C- 06/04-2020-3 do **GS.TS. Phạm Thị Minh Huệ** chủ nhiệm và tôi là thư ký khoa học của đề tài. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai khác công bố trong bất kỳ công trình nào.

Dương Thị Thuần

LỜI CẢM ƠN

Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin chân thành cảm ơn:

GS.TS. Phạm Thị Minh Huệ
GS.TS. Jyrki Tapio Heinämäki

Là những người thầy đã nhiệt tình hướng dẫn, định hướng và truyền cảm hứng cho tôi để tôi đủ niềm tin và sức mạnh đương đầu với những thách thức trong nghiên cứu khoa học trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ***PGS.TS. Nguyễn Đăng Hòa, TS. Nguyễn Trần Linh, TS. Trần Thị Hải Yến*** đã đóng góp những ý kiến quý báu để xây dựng bản đề cương nghiên cứu đầu tiên của tôi.

Xin chân thành cảm ơn các thầy, cô và các anh chị kỹ thuật viên của bộ môn Bào chế, bộ môn Dược lý, bộ môn Vật lý – Hóa lý, bộ môn Công nghiệp Dược, Viện công nghệ dược phẩm Quốc gia - trường Đại học Dược Hà Nội đã nhiệt tình hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

Xin cảm ơn ***GS.TS. Ain Raal*** và các thầy, cô, các nhà nghiên cứu ở Viện nghiên cứu Dược- Đại học Tartu-Estonia, khoa Y Sinh - trường Đại học Helsinki - Phần Lan, Viện Vật lý - Viện hàn lâm khoa học Việt Nam đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi để thực hiện các thử nghiệm tại đây.

Cảm ơn các đồng nghiệp ở bộ môn Bào chế, khoa Dược trường Đại học Duy Tân đã tạo điều kiện thuận lợi về thời gian để tôi tập trung thực hiện đề tài.

Xin chân thành cảm ơn bạn bè thân thiết đã luôn bên tôi, động viên và cổ vũ tinh thần trong suốt thời gian tôi lưu trú tại Hà Nội để thực hiện luận án.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu trường Đại học Dược Hà Nội cùng các thầy cô phòng Đào tạo Sau đại học đã quan tâm và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn các thành viên trong gia đình đã luôn ở bên cạnh, động viên kịp thời về mặt vật chất lẫn tinh thần để tôi vượt qua những khó khăn trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, năm 2022

Dương Thị Thuần

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN

LỜI CẢM ƠN

DANH MỤC ĐỒ THỊ, HÌNH VẼ

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1. TỔNG QUAN	3
1.1. BERBERIN.....	3
1.1.1. Nguồn gốc.....	3
1.1.2. Công thức.....	3
1.1.3. Tính chất lý hóa	3
1.1.4. Định tính và định lượng.....	4
1.1.5. Độ ổn định.....	4
1.1.6. Tác dụng dược lý	4
1.1.7. Sinh khả dụng	6
1.2. LIPOSOME.....	6
1.2.1. Khái niệm, thành phần cấu tạo.....	6
1.2.2. Phân loại.....	9
1.2.3. Ưu, nhược điểm của liposome	10
1.2.4. Phương pháp bào chế liposome	12
1.2.5. Phương pháp đánh giá	13
1.2.6. Một số thách thức và biện pháp khắc phục trong bào chế liposome dùng đường uống	17
1.3. PROLIPOSOME.....	21
1.3.1. Khái niệm.....	21
1.3.2. Thành phần.....	21
1.3.3. Phương pháp bào chế.....	21
1.3.4.Đánh giá proliposome	22

1.3.5. Một số nghiên cứu proliposome dùng đường uống.....	24
1.4.1. Các nghiên cứu về bào chế liposome berberin	25
1.4.2. Các nghiên cứu về bào chế proliposome berberin.....	26
1.5. CÁC NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG VÀ TÁC DỤNG HẠ LIPID MÁU <i>IN-VIVO</i> CỦA BERBERIN, LIPOSOME BERBERIN VÀ PROLIPOSOME BERBERIN DÙNG ĐƯỜNG UỐNG	26
1.5.1. Đánh giá sinh khả dụng <i>in-vivo</i> dùng đường uống của berberin..	26
1.5.2. Đánh giá sinh khả dụng <i>in-vivo</i> đường uống của liposome berberin và proliposome berberin.....	29
1.5.3. Mô hình đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh của berberin trên động vật thực nghiệm.....	29
Chương 2. NGUYÊN LIỆU, TRANG THIẾT BỊ, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	31
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU, THIẾT BỊ, ĐỘNG VẬT NGHIÊN CỨU..	31
2.1.1. Nguyên vật liệu	31
2.1.2. Thiết bị	32
2.1.3. Động vật thí nghiệm.....	34
2.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	34
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	35
2.3.1. Thẩm định phương pháp định lượng	35
2.3.2. Phương pháp nghiên cứu tiền công thức.....	43
2.3.3. Phương pháp bào chế liposome berberin.....	45
2.3.4. Phương pháp bào chế proliposome berberin	46
2.3.5. Phương pháp đánh giá một số đặc tính của liposome BBR.....	46
2.3.6. Phương pháp đánh giá một số đặc tính của proliposome BBR	49
2.3.7. Đánh giá sinh khả dụng <i>in-vivo</i> của liposome BBR trên chuột cống	53

2.3.8. Đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh của liposome BBR trên chuột nhắt	54
2.3.9. Phương pháp xử lý số liệu	55
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	56
3.1. KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG.....	56
3.1.1. Thẩm định khoảng nồng độ tuyến tính của phương pháp định lượng berberin bằng quang phổ hấp thụ UV-Vis	56
3.1.2. Thẩm định phương pháp định lượng berberin bằng HPLC	57
3.1.3. Thẩm định phương pháp định lượng berberin trong huyết tương chuột bằng sắc ký lỏng kết hợp khối phổ (LC-MS/MS).....	58
3.2. NGHIÊN CỨU TIỀN CÔNG THỨC	63
3.2.1. Kết quả đánh giá một số đặc tính của dược chất	63
3.2.2. Kết quả nghiên cứu tương tác giữa dược chất với tá dược	65
3.3. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ LIPOSOME BERBERIN	66
3.3.1. Thiết kế công thức.....	66
3.3.2. Bào chế liposome berberin bằng phương pháp tiêm ethanol.....	67
3.3.3. Bào chế liposome berberin bằng phương pháp hydrat hóa film... 74	
3.3.4. So sánh ảnh hưởng của phương pháp bào chế lên đặc tính của liposome berberin	79
3.4. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ PROLIPOSOME BERBERIN	87
3.4.1. Xác định một số thông số quy trình và lựa chọn công thức bào chế proliposome berberin	88
3.4.2. Đánh giá ảnh hưởng một số yếu tố về công thức và thông số trong quy trình đến đặc tính proliposome berberin	89
3.4.3. Đánh giá một số đặc tính của proliposome berberin	94
3.4.4. Xây dựng công thức và quy trình bào chế proliposome berberin quy mô phòng thí nghiệm	103

3.4.5. Nghiên cứu nâng cấp quy mô bào chế proliposome berberin 200 g/mẻ	105
3.4.6. Nghiên cứu độ ổn định của proliposome berberin.....	111
3.5. ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG <i>IN VIVO</i> CỦA LIPOSOME BERBERIN	116
3.6. ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG HẠ LIPID MÁU NỘI SINH CỦA LIPOSOME BERBERIN.....	121
3.6.1. So sánh ảnh hưởng trên nồng độ cholesterol toàn phần huyết thanh của liposome BBR và hỗn dịch quy ước BBR trên chuột được gây tăng lipid máu nội sinh.....	121
3.6.2. So sánh ảnh hưởng của liposome berberin và hỗn dịch quy ước berberin trên nồng độ cholesterol tỉ trọng thấp ở chuột được gây tăng lipid máu nội sinh	123
3.6.3. So sánh ảnh hưởng của liposome berberin và hỗn dịch quy ước berberin trên nồng độ cholesterol tỉ trọng cao ở chuột được gây tăng lipid máu nội sinh	124
3.6.4. So sánh ảnh hưởng của liposome berberin và hỗn dịch quy ước berberin trên nồng độ triglycerid ở chuột được gây tăng lipid máu nội sinh	125
Chương 4. BÀN LUẬN	127
4.1. VỀ NGHIÊN CỨU TIỀN CÔNG THỨC.....	127
4.2. VỀ BÀO CHẾ VÀ ĐÁNH GIÁ LIPOSOME BERBERIN	128
4.2.1. Yếu tố công thức	128
4.2.3. Phương pháp bào chế	133
4.2.4. Phương pháp đánh giá.....	134
4.3. VỀ BÀO CHẾ VÀ ĐÁNH GIÁ PROLIPOSOME BERBERIN ..	139
4.3.1. Yếu tố công thức	139
4.3.2. Về phương pháp bào chế.....	140

4.3.3. Về thông số quy trình bào chế và độ ổn định của proliposome berberin	140
4.3.4. Về phương pháp đánh giá	142
4.4. VỀ ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG <i>IN VIVO</i> CỦA LIPOSOME BERBERIN	147
4.4.1. Phương pháp đánh giá.....	147
4.4.2. Kết quả đánh giá	149
4.5. VỀ TÁC DỤNG HẠ LIPID MÁU NỘI SINH CỦA LIPOSOME BERBERIN	150
4.5.1. Mô hình dược lý, đối tượng thử và liều thử.....	150
4.5.2. Chứng dương.....	151
4.5.3. Mẫu đối chiếu và kết quả đánh giá	151
4.6. ĐÓNG GÓP MỚI CỦA ĐỀ TÀI.....	153
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT	154
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	156
TÀI LIỆU THAM KHẢO	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ
AFM	Atomic force microscopy (Kính hiển vi lực nguyên tử)
AUC	Area under the curve (Diện tích dưới đường cong)
BBR	Berberin
Cho	Cholesterol
CI	Confidence interval (Khoảng tin cậy)
CLSM	Confocal laser scanning microscopy (Kính hiển vi quét lase đồng tiêu)
C _{max}	Nồng độ đỉnh trong huyết tương
Cryo-EM	Cryogenic electron microscopy (Kính hiển vi điện tử đông lạnh)
CV	Coefficient variation (Hệ số tương quan)
DDAB	Didodecyldimethylammonium bromid
DLS	Dynamic light scattering (Nhiều xạ ánh sáng động)
DMPG	Dimyristoyl phosphatidylglycerol
DOPE	Dioleoyl phosphatidyl ethanolamin
DQA-PEG ₂₀₀₀ -	Dequalinium and carboxyl polyethylen glycol-distearoylphosphatidylethanolamin
DSPE	
DSPC	Distearoyl phosphatidylcholin
DSPE	Distearoyl phosphatidyl ethanolamin
DSPG	Distearoyl phosphatidylglycerol
ĐV	Động vật
EE	Entrapment efficiency (Hiệu suất nạp)
EMA	European Medicines Agency (Cơ quan Y tế Châu Âu)
EPC	Egg phosphatidylcholin
ESI	Electrospray ionazation (Ion hóa phun điện trường)
FDA	Food and Drug Administration (Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ)
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy (Phổ hồng ngoại Fourier)
GUV	Giant unilamellar vesicle (Liposome 1 lớp không lỗ)
HDL-C	High density lipoprotein cholesterol (Cholesterol tỉ trọng cao)
HEPC	Hydrogenated egg phosphatidylcholin
HSPC	Hydrogenated soy phosphatidylcholin
KTTP	Kích thích tiêu 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)
LUV	Large unilamellar vesicle (Liposome 1 lớp lớn)
MLV	Multilamellar vesicle (Liposome nhiều lớp)
MF	Matrix factor (Yếu tố nền mẫu)
MRT	Mean retention time (Thời gian lưu trú trung bình)
MUV	Medium unilamellar vesicle (Liposome 1 lớp trung bình)
MVV	Multi vesicular vesicle (Liposome nhiều ngăn)
MWCO	Mole weight cut-off (Điểm cắt khối lượng phân tử)
NaCMC	Natri carboxymethyl cellulose
NaDC	Natri deoxycholat
NTA	Nanoparticle tracking analysis (Phân tích vết hạt nano)
OLV	Oligolamellar vesicle (Liposome vài lớp)
PC	Phosphatidylcholin
PDI	Polydispersity index (Chỉ số đa phân tán)
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylen glycol
PG	Phosphatidyl glycerol
PM	Physical mixture (Hỗn hợp vật lý)
PS	Phosphatidylserin
PVP	Polyvinyl pyrolidon
RSD	Relative standard deviation (Độ lệch chuẩn tương đối)
SD	Standard deviation (Độ lệch chuẩn)
SDC	Sodium deoxycholate
SEM	Scanning electron microscopy (Kính hiển vi điện tử quét)
SKD	Sinh khả dụng
SPC	Soy-phosphatidylcholin
SPM	Sphingomyelin
SUV	Small unilamellar vesicle (Liposome 1 lớp nhỏ)
TB	Trung bình
TC	Total cholesterol (Cholesterol toàn phần)
TEM	Transmission electron microscopy (Kính hiển vi điện tử truyền qua)
TG	Triglycerid
T _{max}	Thời gian đạt nồng độ đỉnh trong huyết tương
TPFM	Two-photon fluorescence microscopy (Kính hiển vi huỳnh quang 2 photon)

DANH MỤC CÁC BẢNG BIỂU

Bảng 1.1. Một số phospholipid thường sử dụng để bào chế liposome	8
Bảng 1.2. Các nghiên cứu sinh khả dụng in vivo của BBR.....	28
Bảng 2.1. Nguyên vật liệu sử dụng trong nghiên cứu.....	31
Bảng 2.2 Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu.....	32
Bảng 2.3. Điều kiện khối phổ của phương pháp LC-MS/MS định lượng BBR.....	39
Bảng 2.4. Thành phần tạo film trên chất mang manitol dùng trong khảo sát ban đầu	46
Bảng 2.5. Điều kiện bảo quản và thời điểm lấy mẫu trong nghiên cứu theo dõi độ ổn định.....	53
Bảng 3.1. Độ chính xác và độ lặp lại của phương pháp LC-MS/MS trong phân tích nồng độ BBR trong huyết tương chuột.	60
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nền mẫu trên BBR và IS ở nồng độ LQC và HQC trên 6 lô huyết tương chuột	61
Bảng 3.3. Kết quả đánh giá tương tác dược chất với tá dược sau 1 tháng bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc	66
Bảng 3.4. Thành phần liposome berberin	67
Bảng 3.5. Đặc tính của liposome BBR theo nhiệt độ phối hợp hai pha	68
Bảng 3.6. Đặc tính của liposome BBR theo nhiệt độ và áp suất cắt quay.....	69
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của thành phần công thức đến đặc tính liposome BBR bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol.....	70
Bảng 3.8. Thành phần công thức bào chế liposome BBR khi thay đổi tỉ lệ mol BBR.....	72
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của tỉ lệ mol BBR đến đặc tính của liposome BBR.....	72
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của tỉ lệ mol HSPC:DSPG đến đặc tính liposome BBR..	73

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của thành phần cấu tạo lên đặc tính liposome BBR bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film.....	75
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của số lần đun qua màng 400 nm đến KTTP của mẫu FH04.....	76
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của tỉ lệ mol BBR đến đặc tính của liposome	78
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của tỉ lệ mol HSPC:DSPG lên đặc tính của liposome BBR.....	79
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của phương pháp bào chế lên KTTP và phân bố KTTP	80
Bảng 3.16. Hiệu suất liposome hóa của các mẫu liposome BBR bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol và hydrat hóa film	83
Bảng 3.17. Tỉ lệ khối lượng và thông số quy trình bào chế proliposome BBR bằng phương pháp bao hạt trên thiết bị bao tầng sôi	89
Bảng 3.18. Mất khối lượng do làm khô và hàm lượng BBR của proliposome BBR.....	93
Bảng 3.19. KTTP, phân bố KTTP và hiệu suất nạp dược chất của liposome hoàn nguyên từ proliposome BBR.....	93
Bảng 3.20. Hiệu suất, khối lượng riêng biểu kiến của proliposome BBR bào chế trên máy Mini-Glatt	97
Bảng 3.21. Công thức bào chế proliposome BBR qui mô 25 g/mẻ bằng phương pháp bao hạt trên thiết bị tầng sôi Mini-Glatt.....	103
Bảng 3.22. Công thức bào chế proliposome BBR quy mô 200 g/mẻ trên thiết bị Diosna-minilab.....	105
Bảng 3.23. Các thông số quy trình khi nâng cấp quy mô bào chế.....	106
Bảng 3.24. Kết quả đánh giá hiệu suất quy trình, khối lượng riêng biểu kiến, mất khối lượng do làm khô, hàm lượng BBR của proliposome BBR.....	108
Bảng 3.25. Phần trăm giải phóng qua màng thẩm tích của BBR từ proliposome BBR bào chế ở 2 qui mô trong các môi trường khác nhau.....	108

Bảng 3.26. Một số đặc tính của liposome BBR hoàn nguyên	110
Bảng 3.27. Dự kiến tiêu chuẩn chất lượng của proliposome BBR dựa trên kết quả 3 mẻ liên tiếp	110
Bảng 3.28. Kết quả xác định mất khối lượng do làm khô sau bảo quản 6 tháng ở điều kiện thường và điều kiện lão hóa cấp tốc.....	112
Bảng 3.29. Phần trăm BBR trong proliposome BBR bảo quản ở điều kiện thực và lão hóa cấp tốc so với ban đầu	113
Bảng 3.30. Kích thước tiểu phân, phân bố KTTP và hiệu suất liposome hóa của liposome hoàn nguyên từ proliposome bảo quản ở điều kiện thực sau 6 tháng	115
Bảng 3.31. Kích thước tiểu phân, phân bố KTTP và hiệu suất liposome hóa của liposome hoàn nguyên từ proliposome bảo quản ở điều kiện LHCT sau 6 tháng	115
Bảng 3.32. Nồng độ BBR trong huyết tương chuột cống sau khi uống hỗn dịch quy ước BBR.....	117
Bảng 3.33. Nồng độ BBR trong huyết tương chuột cống sau khi uống liposome BBR	118
Bảng 3.34. Một số thông số dược động học của BBR trên chuột uống hỗn dịch quy ước BBR và liposome BBR với liều tương ứng 100 mg/kg cân nặng chuột	120
Bảng 3.35. Kết quả so sánh trung bình SKD giữa hỗn dịch quy ước BBR với hỗn dịch liposome BBR ở chuột cống sau khi uống 1 liều đơn BBR 100 mg/kg cân nặng.	120
Bảng 3.36. Nồng độ TC trong huyết thanh ở các nhóm chuột nhắt trắng được gây tăng lipid máu nội sinh sau 10 ngày điều trị	122
Bảng 3.37. Nồng độ LDL-C huyết thanh ở các nhóm chuột nhắt trắng được gây tăng lipid máu nội sinh sau 10 ngày điều trị	123

Bảng 3.38. Nồng độ HDL-C huyết thanh ở các nhóm chuột nhắt được gây tăng lipid máu nội sinh sau 10 ngày điều trị	124
Bảng 3.39. Nồng độ TG huyết thanh ở các nhóm chuột nhắt được gây tăng lipid máu nội sinh sau 10 ngày điều trị	125

DANH MỤC ĐỒ THỊ, HÌNH VẼ

Hình 1.1. Công thức cấu tạo của berberin.....	3
Hình 1.2. Cơ chế làm giảm lipid máu của berberin	6
Hình 1.3. Sơ đồ minh họa đại diện thành phần cấu tạo của liposome	7
Hình 1.4. Sơ đồ phân loại liposome theo kích thước và số lớp	10
Hình 1.5. Ảnh hưởng của liposome kích thước nano trong mô ung thư. Cấu trúc mô ung thư lỏng lẻo làm nano liposome dễ thâm qua.....	11
Hình 1.6. Sơ đồ quá trình tách được chất tự do bằng thẩm tích	15
Hình 1.7. Sơ đồ quá trình tách được chất tự do bằng phương pháp sắc ký cột	16
Hình 1.8. Sơ đồ biểu diễn quá trình tách được chất tự do bằng phương pháp siêu lọc.....	16
Hình 1.9. Cơ chế hấp thu thuốc từ liposome ở trong đường tiêu hóa	18
Hình 3.1. Hình thái và kích thước của tiểu phân bột nguyên liệu BBR:	63
Hình 3.2. Phổ huỳnh quang của dung dịch BBR 0,2 mg/ml trong môi trường nước và ethanol	64
Hình 3.3. Hình ảnh bột nguyên liệu BBR quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét.....	65
Hình 3.4. Phân bố kích thước tiểu phân (theo cường độ) của liposome BBR mẫu FJ04, FJ21 và FJ17.....	70
Hình 3.5. Hiệu suất liposome hóa của các mẫu bào chế.....	73
Hình 3.6. Phân bố kích thước tiểu phân (theo tỉ trọng) của các mẫu FH04, FH21, FH17 sau khi bào chế.....	75
Hình 3.7. Phân bố KTTTP liposome mẫu FH04 sau khi đun qua màng polycarbonat kích thước lỗ lọc 400 nm.....	77
Hình 3.8. Phân bố KTTTP của liposome BBR mẫu F12	80

Hình 3.9a. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi đông lạnh (cryo-EM) về hình thái và cấu trúc của liposome BBR (mẫu FJ21).....	81
Hình 3.9b. A. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi đông lạnh (cryo-EM) về hình thái và cấu trúc của liposome BBR (mẫu FJ17)	82
Hình 3.10. Hình ảnh cấu trúc của liposome BBR (mẫu FH12).	82
Hình 3.11. Hiệu suất liposome hóa của các mẫu liposome BBR bào chế theo hai phương pháp tiêm ethanol và hydrat hóa film	84
Hình 3.12. Phổ nhiễu xạ tia X của liposome BBR và nguyên liệu cấu tạo nên liposome	85
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.....	86
Hình 3.14. Hình thái của chất mang manitol quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét SEM.....	90
Hình 3.15. Hình thái của proliposome BBR mẫu FF19-1.1 quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét SEM	90
Hình 3.16. Hình thái và bề mặt của proliposome BBR mẫu FF19-1.2 dưới kính hiển vi điện tử quét SEM	91
Hình 3.17. Hình thái và bề mặt của proliposome BBR mẫu FF19-1.3 dưới kính hiển vi điện tử quét SEM	92
Hình 3.18. Hình thái và bề mặt của proliposome BBR mẫu FF19-2.1 dưới kính hiển vi điện tử quét SEM	92
Hình 3.19. Liposome BBR sau khi hoàn nguyên từ proliposome BBR mẫu FF19-2.1.	94
Hình 3.20. Phổ nhiễu xạ tia X của BBR, HSPC, DSPG, NaDC (SDC), MNT, hỗn hợp vật lý (PM) và proliposome BBR FF19-2.1	95
Hình 3.21. Phổ hồng ngoại FTIR của BBR, HSPC, DSPG, NaDC (SDC), MNT, hỗn hợp vật lý (PM) và proliposome BBR FF19-2.1	97

Hình 3.22. Hình ảnh hydrat hóa trong môi trường pH 1,2 màng film trên tiểu phân proliposome BBR chụp bằng kính hiển vi điện tử quét laser (CLSM) ...	99
Hình 3.23. Hình ảnh hydrat hóa màng film trên tiểu phân proliposome BBR trong môi trường pH 4,5 chụp bằng kính hiển vi điện tử quét laser (CLSM) 100	
Hình 3.24. Hình ảnh hydrat hóa màng film trên tiểu phân proliposome BBR trong môi trường pH 6,8 chụp bằng kính hiển vi điện tử quét laser (CLSM) 101	
Hình 3.25. Phần trăm giải phóng qua màng thẩm tích của dược chất từ proliposome BBR mẫu FF19-1.3 và FF19-2.1 bào chế bằng phương pháp bao hạt	102
Hình 3.26. Sơ đồ các bước bào chế proliposome BBR bằng máy bao tầng sôi Mini-Glatt.....	104
Hình 3.27. Hình ảnh proliposome BBR bào chế ở quy mô 200 g/mẻ quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét SEM.....	107
Hình 3.28. Phần trăm giải phóng qua màng thẩm tích của BBR từ proliposome BBR bào chế ở 2 qui mô trong các môi trường khác nhau.....	109
Hình 3.29. Hình thái của liposome BBR hoàn nguyên từ proliposome BBR qui mô 200 g/mẻ quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)	110
Hình 3.30. Hình thái của proliposome BBR bào chế qui mô 200 g/mẻ sau 6 tháng bảo quản điều kiện thực quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét.	111
Hình 3.31. Hình thái của proliposome BBR bào chế qui mô 200 g/mẻ sau 6 tháng bảo quản điều kiện lão hóa cấp tốc quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét.....	111
Hình 3.32. Phổ nhiễu xạ tia X của proliposome BBR bào chế qui mô 200 g/mẻ ở thời điểm ban đầu và sau 6 tháng bảo quản ở ĐKT và LHCT	113
Hình 3.33. Phổ hồng ngoại của proliposome BBR bào chế qui mô 200 g/mẻ ở thời điểm ban đầu và sau 6 tháng bảo quản ở ĐKT và LHCT	114

Hình 3.34. Hình thái của liposome hoàn nguyên 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)	116
Hình 3.35. Đường biểu diễn nồng độ trung bình BBR trong huyết tương chuột cống theo thời gian của nhóm uống hỗn dịch quy ước BBR và nhóm uống liposome BBR sau khi uống liều đơn tương đương với liều BBR 100 mg/kg cân nặng.....	119
Hình 4.1. Sơ đồ quá trình chuyển pha gel sang pha tinh thể lỏng của màng phospholipid kép	132
Hình 4.2. Sơ đồ nguyên tắc bao hạt	140

ĐẶT VẤN ĐỀ

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, giảm chi phí. 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. Vượt qua các rào cản đó là một trong những thách thức lớn cho hệ đưa thuốc qua đường uống [58], [157]. Một số biện pháp đã sử dụng để cải thiện sinh khả dụng 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 [4]. Kể từ khi được phát minh bởi Bangham và Horne vào năm 1964 [21] cho đến nay, liposome - hệ mang dược chất tiềm năng- đã được nghiên cứu rộng rãi qua các đường dùng khác nhau như đường uống, đường tiêm, đường xông hít, đường nhỏ mũi, mắt và hấp thu qua da [60], [141].

Berberin (BBR) là một dược chất đã được sử dụng từ lâu để điều trị tại chỗ một số bệnh đường tiêu hóa [3]. Gần đây, nhiều nghiên cứu mới cho thấy BBR có tiềm năng cao trong điều trị một số bệnh như: tăng lipid máu [82], tiểu đường [156], nhồi máu cơ tim [15]. Đặc biệt, nhiều nghiên cứu đã công bố tác dụng hạ lipid máu của BBR rất đáng chú ý trên động vật thí nghiệm [82], [149] và trên người khi sử dụng liều cao 500 mg x 2-3 lần/ngày [41], [82]. Tuy nhiên, để có tác dụng này, BBR cần được hấp thu vào tuần hoàn. Trong khi đó, BBR bị hạn chế bởi sinh khả dụng đường uống kém (dưới 10%) do BBR có tính thấm kém, bị chuyển hóa lần đầu ngay tại ruột, bị ảnh hưởng bởi bơm tổng thuốc có trên bề mặt niêm mạc ruột, bị tái bài tiết bởi chu trình gan mật [97], [142], [161]. Việc sử dụng BBR dạng thuốc truyền thống qua đường uống với liều cao để điều trị đã dẫn đến những tác dụng không mong muốn, biểu hiện trên đường ruột như: tiêu chảy, táo bón, đau bụng [156]. Những hạn chế về sinh khả dụng đường uống của BBR có thể được khắc phục bằng sử dụng hệ mang dược chất liposome.

Mặc dù BBR có tiềm năng lớn nhưng hiện nay chưa có nghiên cứu nào trong nước về bào chế liposome BBR ứng dụng đường uống để hạ lipid máu. Vì vậy, cần thiết phải nghiên cứu bào chế liposome BBR nhằm phát triển dạng bào chế mới, có

tiềm năng tăng giá trị sử dụng của BBR. Do đó, đề tài:

“Nghiên cứu bào chế liposome berberin ứng dụng dùng đường uống” được thực hiện với 2 mục tiêu sau:

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

2. *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.*

Chương 1. TỔNG QUAN

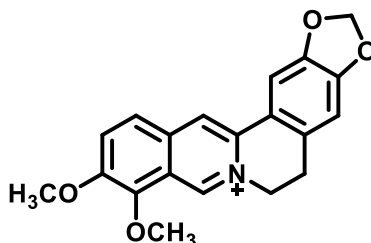
1.1. BERBERIN

1.1.1. Nguồn gốc

Berberin (BBR) là một isoquinolin alkaloid bậc 4, được chiết xuất từ rễ, thân rễ và vỏ của một số loài thuộc chi *Berberis*, họ Hoàng liên gai (Berberidaceae) hoặc một số loài khác thuộc các chi *Coptis*, *Hydrastis*, *Thalictrum*, họ Mao lương (Ranunculaceae) [3], [108], [158]. Ngày nay, BBR đã được tổng hợp và sử dụng rộng rãi trong ngành Dược.

1.1.2. Công thức

- Công thức phân tử: $C_{20}H_{18}NO_4^+$
- Khối lượng phân tử: 336,36 g/mol
- Tên khoa học: 5,6-Dihydro-9,10-dimethoxybenzo[g]1,3-benzodioxolo [5,6-a] quinolizinium [165].
- Công thức cấu tạo:



Hình 1.1. Công thức cấu tạo của berberin

- Các dạng được sử dụng: berberin base, berberin clorid, berberin sulfat.

1.1.3. Tính chất lý hóa

a. Tính chất vật lý

- Hình thức: tinh thể hay bột kết tinh màu vàng, không mùi, vị rất đắng
- Độ tan: Trong môi trường nước, BBR có độ tan 5,27 mM ở 25 °C và 8,5 mM ở 37 °C. Trong môi trường đệm phosphate pH 7,0, BBR có độ tan ở 25 °C và 37°C lần lượt là 4,05 mM và 9,69 mM. Trong môi trường dung dịch acid HCl pH 1,2 và dung dịch đệm phosphate pH 5,0, độ tan thấp hơn 20 lần so với môi trường đệm phosphate pH 7,0 [24].

- Nhiệt nóng chảy: 204 - 206 °C
- LogP: -1,5 [24].
- Log D_{ow}: - 4,2 ở pH 4,0; -1,03 ở pH 7,3; -0,09 ở pH 10,2 [128].
- Có khả năng phát quang khi kích thích ở bước sóng 350 nm [47].

b. Tính chất hóa học

- Ở vị trí N của berberin không bền trong môi trường kiềm mạnh, tham gia phản ứng mở vòng isoquinolin.
- Liên kết C=N⁺ trong cấu trúc phân tử berberin dễ bị tác nhân ái nhân tấn công để tạo các dẫn xuất ở vị trí C8 như 8-dihydroberberin hoặc 8-acetonyldihydroberberin [140].
- Có cấu trúc phân tử lưỡng cực tạo ra bởi ion N⁺ làm thuận lợi cho tương tác lưỡng cực với các phân tử khác. Vì vậy, bất cứ chất nào liên kết với BBR đều cho phổ phát xạ huỳnh quang với cường độ khác nhau [47].

1.1.4. Định tính và định lượng

Theo chuyên luận “Berberin clorid” trong Dược điển Việt nam V [2], BBR có thể định tính bằng phổ hồng ngoại hoặc phương pháp hóa học dựa trên sự xuất hiện tủa hoặc màu sắc phù hợp với thuốc thử đặc trưng. Hàm lượng BBR trong nguyên liệu hoặc trong chế phẩm bào chế có thể định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Định lượng dược chất giải phóng từ chế phẩm bào chế trong phép thử độ hòa tan bằng phương pháp đo phổ hấp thụ UV-Vis.

1.1.5. Độ ổn định

BBR khá ổn định trong các dung dịch đệm có pH khác nhau. Nghiên cứu của Battu và cộng sự cho thấy, khi bảo quản các dung dịch BBR trong các môi trường đệm với nồng độ đệm 0,2 mM (đệm borat pH 9,0, đệm phosphat pH 7,0, đệm phtalat pH 5,0 và 3,0, và dung dịch acid HCl pH 1,2) ở 2 điều kiện nhiệt độ 25 °C và 40 °C trong 6 tháng giảm ít hơn 5% hàm lượng dược chất so với ban đầu [24]. Nhưng BBR bị giáng hóa trong thời gian từ 2-6 giờ sau khi phơi nhiễm với các yếu tố môi trường khắc nghiệt như tia tử ngoại, chất oxy hóa, dung dịch HCl 1N, dung dịch NaOH 1N ở nhiệt độ 80 °C [53].

1.1.6. Tác dụng dược lý

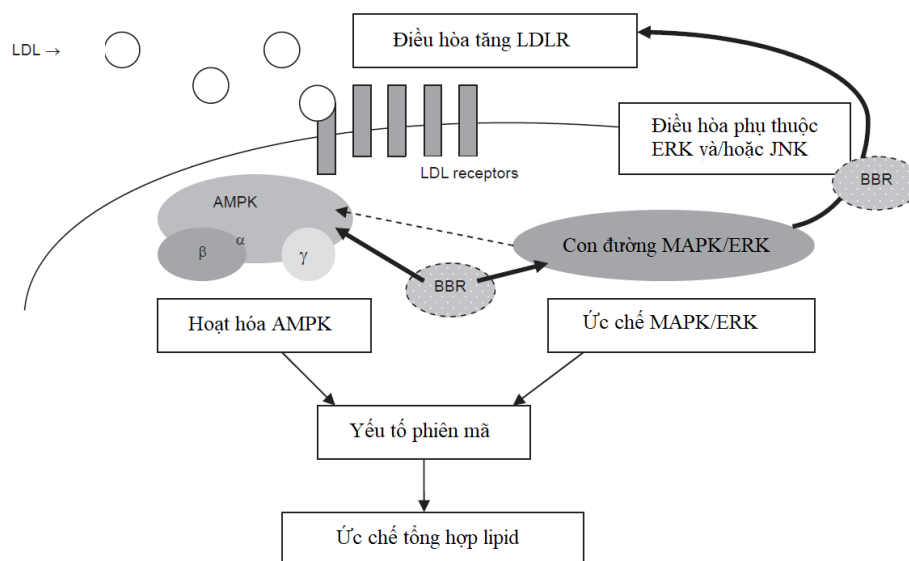
Tác dụng truyền thống của BBR là kháng khuẩn và các ký sinh trùng đường

ruột như ly amip, *E. Coli*, dùng điều trị tại chỗ các bệnh đường tiêu hóa như đau bụng, tiêu chảy [3], [140]. Ngày nay, có nhiều nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* cho thấy BBR dạng clorid có nhiều tác dụng dược lý tiềm năng như làm giảm đường huyết [14], [37], [151], [156], chống xơ vữa động mạch [38], bảo vệ nội mô [95], [147], [152], bảo vệ thận [45], [111], bảo vệ gan [48], [162], bảo vệ tim trong suy tim và thiếu máu cục bộ [34], [112], điều hòa miễn dịch [89], [96], [105], chống oxy hóa [13], [129], ức chế tế bào ung thư [93], [148], [159].

Tác dụng làm giảm lipid máu của BBR được khẳng định trong nhiều nghiên cứu trên động vật. Trên chuột cống, BBR ở cả 3 mức liều 50mg/kg, 100mg/kg và 150mg/kg làm giảm cholesterol tỉ trọng thấp (LDL-C) ở mức 31-41%, giảm cholesterol toàn phần (TC) 29-33% so với nhóm chứng sau 8 tuần điều trị. Mức giảm không có sự khác biệt giữa các liều [149]. Trong lúc đó, trên chuột hamster, tỉ lệ giảm LDL-C ở mức liều 50 mg/kg là 26% và ở mức liều 100 mg/kg là 42% so với nhóm chứng sau 10 ngày điều trị [82]. Với mức liều BBR 380mg/kg trên chuột cống sau 2 tuần điều trị, mức giảm triglycerid (TG) và TC lần lượt là 34,7% và 9% so với nhóm chứng [65]. Một nghiên cứu khác trên chuột cống ở mức liều 200mg/kg cho thấy, nồng độ TC và LDL-C trong máu cũng giảm có ý nghĩa thống kê sau thời gian điều trị 16 tuần [35]. Trên chuột nhắt ở liều 250mg/kg (tương đương với liều 125mg/kg trên chuột cống) sau 4 tuần điều trị, BBR làm giảm TC và TG lần lượt là 41,7% và 41,9% so với nhóm chứng một cách có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) [160]. Như vậy, BBR ở mức liều từ 50mg/kg có thể làm giảm đồng thời hoặc riêng lẻ nồng độ TC, LDL-C và TG trong máu chuột cống và chuột hamster.

Cơ chế làm giảm lipid máu chính nhờ làm ổn định thụ thể LDL-cholesterol (LDL-C) ở gan bằng con đường điều hòa tín hiệu ngoại bào phụ thuộc kinase, và cũng làm tăng hoạt động phiên mã của chất môi LDLR qua con đường JNK (c-Jun N terminal kinase) làm tăng biểu hiện và tuổi thọ của thụ thể LDL, do đó làm tăng quá trình thực bào LDL [9], [42], [86]. Ngoài điều chỉnh LDLR, BBR còn hoạt hóa 5'-AMP kinase (AMPK) trong khi chặn con đường hoạt hóa protein mitogen kinase (Mitogen-activated protein kinase-MAPK)/ERK (Extracellular signal-regulated kinase). Kết quả là ức chế tổng hợp lipid [30]. Cơ chế làm giảm lipid máu của BBR

được tóm tắt ở sơ đồ sau (hình 1.2).



Hình 1.2. Cơ chế làm giảm lipid máu của berberin (BBR)[42].

Ngoài cơ chế tại gan, BBR còn làm giảm lipid máu bằng cách ức chế hấp thu cholesterol ở ruột [149].

Với kết quả từ những nghiên cứu trên, có thể thấy rằng BBR có tác dụng làm giảm lipid máu một cách hiệu quả trên động vật thí nghiệm.

1.1.7. Sinh khả dụng

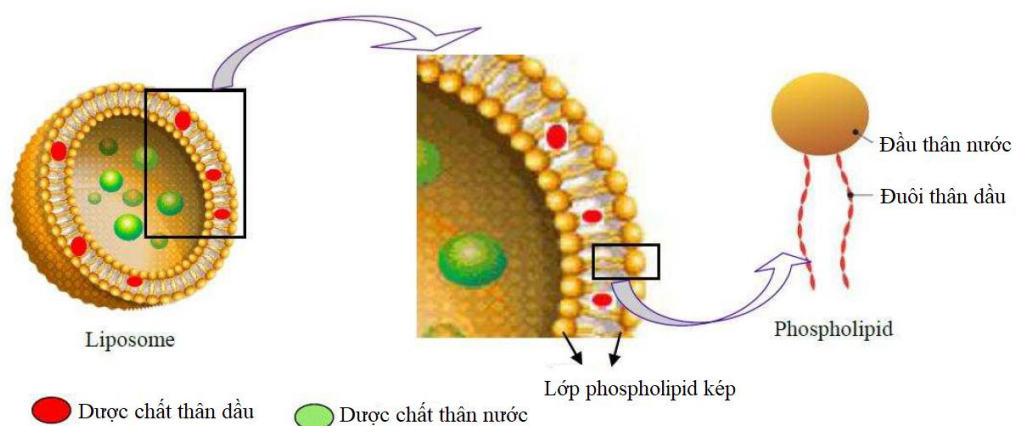
Tuy BBR có nhiều tác dụng dược lý tiềm năng, nhưng sinh khả dụng đường uống của BBR được báo cáo là thấp (dưới 10%) [161]. Trên động vật, BBR có nồng độ tối đa trong huyết tương (C_{max}) là 4 ng/ml sau khi uống liều 100mg/kg chuột cống, $AUC_{0-48h}=57,9 \pm 20,6$ ng.h/ml [97]. Cũng với liều uống này trên chuột cống, một nghiên cứu khác công bố $C_{max} = 9,48 \pm 3,40$ ng/ml, $T_{max}= 2,60 \pm 1,14$ h, $AUC_{0-36h}=56,5 \pm 12,8$ ng.h/ml [51].

1.2. LIPOSOME

1.2.1. Khái niệm, thành phần cấu tạo

Liposome là những túi nhỏ hình cầu, chứa một hoặc nhiều lớp phospholipid kép đồng tâm bao bọc ngăn nước ở giữa hoặc ngăn cách bởi các ngăn nước, có kích thước thay đổi từ hàng chục đến hàng ngàn nanomet [4], [10].

Thành phần cấu tạo của liposome bao gồm lớp vỏ phospholipid và dược chất. Ngoài ra còn có các thành phần khác [4], [64] (hình 1.3).



Hình 1.3. Sơ đồ minh họa đại diện thành phần cấu tạo của liposome [127]

Lớp vỏ liposome:

Lớp vỏ liposome được cấu tạo phổ biến nhất từ hai thành phần phospholipid và cholesterol [4], [64].

Phospholipid:

Phospholipid cũng là thành phần chính cấu tạo nên màng tế bào. Phospholipid dùng bào chế liposome chủ yếu có hai loại là glycerophosphat và sphingomyelin. Phospholipid có thể tạo thành lớp lipid kép bởi đặc tính lưỡng tính của loại phospholipid gồm đầu kỵ nước cấu tạo bởi hai chuỗi các acid béo và một đầu thân nước có chứa nhóm phosphat [12], [64]. Một số phospholipid thường dùng để bào chế liposome được trình bày ở bảng 1.1.

Bảng 1.1. Một số phospholipid thường sử dụng để bào chế liposome [4], [126]

Phospholipid	Viết tắt	Nhiệt chuyển pha T_c (°C)	Tích điện
Dimyristoyl phosphatidylcholin	DMPC	23	0
Dipalmitoyl phosphatidylcholin	DPPC	41	0
Distearoyl phosphatidylcholin	DSPC	58	0
Dilaruryl phosphatidylglycerol	DLPG	4	-1
Dimyristoyl phosphatidylglycerol	DMPG	23	-1
Dipalmitoyl phosphatidylglycerol	DPPG	41	-1
Distearoyl phosphatidylglycerol	DSPG	55	-1
Phosphatidyl ethanolamin	PE	48	0
Dimyristoyl phosphatidyl ethanolamin	DMPE	-	0
Dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamin	DPPE	60	0
Distearoyl phosphatidyl ethanolamin	DSPE	-	0
Dipalmitoyl phosphatidyl serin	DPPS	48	-
Dimyristoyl phosphatidyl serin natri	DMPS.Na	35	-1
Dipalmitoyl phosphatidyl serin natri	DPPS.Na	54	-1

Cholesterol:

Cholesterol có thể cho thêm vào lớp phospholipid kép nhằm tạo hệ đệm lỏng để điều chỉnh thể chất của lớp phospholipid kép, hạn chế sự chuyển dạng cấu trúc từ “trans” sang “gauch” của chuỗi acyl trong phân tử phospholipid [4], [126]. Ngoài ra, cholesterol còn có tác dụng làm ổn định màng đối với sự thay đổi nhiệt độ, làm giảm hệ số thấm của màng đối với glucose và các ion Na⁺, K⁺, Cl⁻, do đó cần thiết cho sự giảm tính thấm của màng [126].

Dược chất:

Nhiều dược chất được sử dụng để bào chế hệ mang thuốc liposome. Đó là những dược chất có tính thấm kém, khó tan hoặc dễ bị tác động bởi những yếu tố ngoại môi dẫn đến sinh khả dụng thấp, hoặc những dược chất cần tập trung tại đích như các thuốc điều trị ung thư, các enzym [4].

Dược chất được nạp vào liposome theo hai cách khác nhau: gắn thụ động và gắn

chủ động. Quá trình gắn được chất thụ động là quá trình mà được chất được nạp vào liposome trong quá trình liposome được hình thành. Quá trình gắn được chất chủ động là quá trình mà được chất được nạp vào liposome sau khi liposome được tạo thành thông qua việc tạo ra gradien pH xuyên màng hoặc chênh lệch điện thế màng [10], [44].

Thành phần khác

Các lipid tích điện dương tổng hợp như sterylamin, cholesteryl acetat cũng được dùng trong thành phần tạo lớp vỏ phospholipid. Các dẫn xuất sterol chiết xuất từ đậu nành như β -sitosterol, campesterol, stigmasterol và brassicasterol có cấu trúc tương tự như cholesterol nhưng làm màng phospholipid ổn định hơn [64]. Ngoài ra, một số thành phần khác cũng được sử dụng để làm thay đổi đặc tính của liposome, điển hình là chất diện hoạt không ion hóa [4].

1.2.2. Phân loại

Liposome được chia ra làm nhiều loại khác nhau dựa trên số lớp và kích thước của liposome [18]. Ngoài ra, liposome cũng được phân loại theo cơ chế hướng đích tác dụng [4], [64].

Phân loại theo số lớp phospholipid và kích thước của liposome:

Theo cách phân loại này, liposome được chia thành những loại sau (hình 1.4):

- Liposome 1 lớp (Unilamellar vesicle): chỉ có 1 lớp phospholipid kép bao bọc quanh một nhân nước trung tâm. Liposome 1 lớp cũng được chia làm 4 loại tùy theo kích thước:

- + Liposome nhỏ: SUV (small unilamellar vesicle): đường kính nhỏ hơn 100 nm, thường từ 20-100 nm.

- + Liposome trung bình: MUV (medium unilamellar vesicle), đường kính lớn hơn 100 nm.

- + Liposome to: LUV (large unilamellar vesicle), đường kính lớn hơn 200 nm

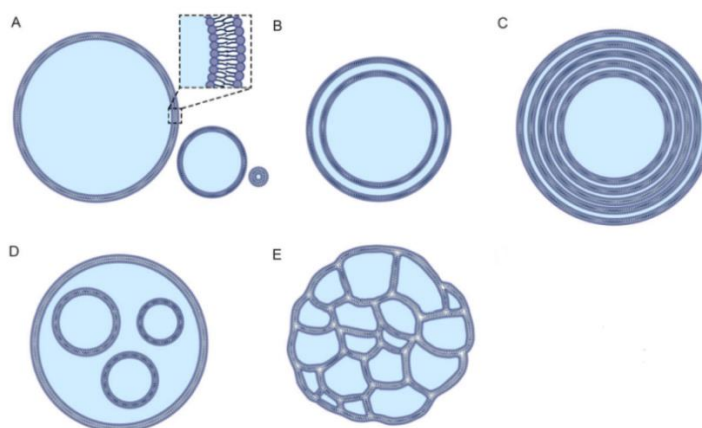
- + Liposome khổng lồ: GUV (Giant unilamellar vesicle), đường kính lớn hơn 1 micromet.

- Liposome 1 số lớp: (oligolamellar vesicle- OLV), cấu tạo khoảng dưới 5 lớp phospholipid kép xen kẽ các ngăn nước, đường kính từ 0,1-1micromet.

- Liposome nhiều lớp: MLV (multilamellar vesicle), cấu tạo từ nhiều lớp

phospholipid kép và nhiều ngấn nước xen kẽ đồng trục, thường từ 5-25 lớp, đường kính lớn hơn 0,5micromet.

- Liposome nhiều ngấn: MVV (multi vesicular vesicle), là liposome kích thước trên 1 micromet, trong chứa nhiều khoang, mỗi khoang là một liposome nhỏ.



Hình 1.4. Sơ đồ phân loại liposome theo kích thước và số lớp [46]

A. Liposome đơn lớp (lần lượt từ trái sang phải là GUV, LUV và SUV); B:

OLV; C: MLV; D: MVV gồm liposome to chứa các liposome nhỏ; E:

MVV được hình thành từ nhiều liposome nhỏ đơn lớp liên kết lại với nhau

Phân loại theo cơ chế hướng đích tác dụng:

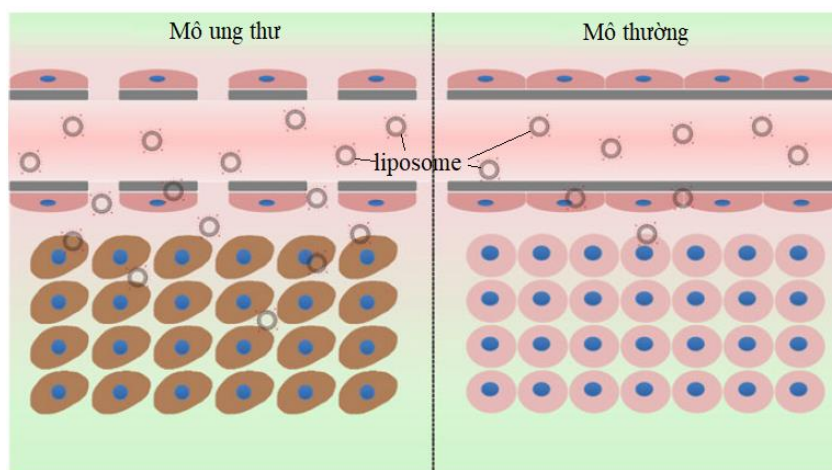
- Liposome hướng đích thụ động: là liposome không bị bắt giữ đặc hiệu bởi những mô khác nhưng có thể tích tụ ở mô đích bởi vòng tuần hoàn.
- Liposome hướng đích chủ động: liposome gắn phối tử, liposome gắn kháng thể.
- Liposome hướng đích theo đặc tính lý hóa: liposome nhạy cảm với pH, liposome nhạy cảm với nhiệt độ.
- Liposome đa chức năng: là loại liposome được bào chế để đạt được những mục đích khác nhau, trong đó một liposome có thể đạt được mục tiêu toàn diện bằng kết hợp giữa hướng đích thụ động, chủ động và hướng đích lý hóa.

1.2.3. Ưu, nhược điểm của liposome

Liposome là một hệ mang dược chất có nhiều ưu điểm độc đáo nhưng cũng tồn tại một số nhược điểm [4], [64], [102].

Ưu điểm của liposome:

- Có tính tương hợp sinh học và phân hủy sinh học cao, không gây độc và không gây đáp ứng miễn dịch do thành phần cấu tạo của liposome chủ yếu là phospholipid giống như màng tế bào người.
- Có thể bảo vệ dược chất khỏi bị phân hủy bởi các yếu tố môi trường do dược chất được bao gói trong liposome.
- Có thể mang cả dược chất thân nước, dược chất thân dầu và các tác nhân lưỡng cực do cấu trúc của liposome gồm có ngăn nước và màng phospholipid kép thân dầu.
- Làm thay đổi phân bố sinh học của thuốc trong cơ thể do liposome có tính hướng đích thụ động tự nhiên trong cơ thể người. Kích thước tiểu phân khác nhau của liposome mang dược chất gây ra sự lưu giữ cơ học khác nhau ở các mô do sự khác nhau về độ đặc của những mô này. Những mô bị tổn thương (ví dụ mô ung thư) sẽ có độ đặc thấp hơn mô thường, liposome mang dược chất sẽ lưu giữ ở mô tổn thương với nồng độ đậm đặc hơn (hình 1.5). Do đó làm thay đổi phân bố sinh học một cách tự nhiên của dược chất trong cơ thể người và nâng cao chỉ số điều trị, giảm tác dụng phụ.
- Có thể thiết kế liposome hướng đích chủ động hoặc hướng đích theo cơ chế lý hóa tự nhiên. Do đó có thể mang dược chất đến vùng điều trị mong muốn.



Hình 1.5. Ảnh hưởng của liposome kích thước nano trong mô ung thư. Cấu trúc mô ung thư lỏng lẻo làm nano liposome dễ thấm qua [64]

Nhược điểm:

- Do phospholipid không bền về mặt hóa học nên dược chất được liposome hóa có thể bị rò rỉ trong quá trình bảo quản, làm giảm tuổi thọ của thuốc.

- Khó kiểm soát độ đồng nhất giữa các lô mẻ, khó triển khai sản xuất lớn do có nhiều thông số tác động đến kích thước, chất lượng của liposome trong quá trình sản xuất.
- Thời gian bán thải ngắn do liposome quy ước dễ bị thanh thải bởi hệ đại thực bào, thời gian tuần hoàn khó kéo dài.
- Giá thành cao.

1.2.4. Phương pháp bào chế liposome

Liposome được bào chế bằng nhiều phương pháp khác nhau. Một số phương pháp tạo ra trực tiếp liposome ngay sau quá trình bào chế. Bên cạnh đó, có một số phương pháp tuy không tạo ra liposome ngay sau quá trình sản xuất, nhưng liposome sẽ được hình thành nhờ sự hydrat hóa chế phẩm trước khi sử dụng.

1.2.4.1. Phương pháp bào chế liposome trực tiếp

Phương pháp hydrat hóa film:

Phương pháp này được Bangham thực hiện từ năm 1965. Đây là phương pháp đơn giản và được sử dụng rộng rãi nhất để bào chế liposome. Trong kỹ thuật này, liposome được bào chế bằng cách hòa tan lipid vào dung môi hữu cơ, thường là cloroform hoặc hỗn hợp của cloroform với methanol. Sau đó, dung môi được bốc hơi áp suất giảm để tạo màng film lipid trên thành bình. Sau khi dung môi hữu cơ được bốc hơi hoàn toàn, màng film lipid sau đó được hydrat hóa bằng dung dịch đệm. Lớp lipid đồng thời được hydrat hóa và trương phồng lên để tạo ra liposome. Liposome tạo thành thường là những liposome nhiều lớp, có kích thước không đồng nhất, lớn hơn 1µm. Kích thước tiểu phân sau đó được làm giảm bằng siêu âm hoặc đùn [12], [18].

Phương pháp thay đổi dung môi hữu cơ bằng môi trường nước:

Phương pháp này gồm có phương pháp tiêm ethanol và phương pháp tiêm ether [12].

Phương pháp tiêm ether:

Liposome được tạo ra bằng cách hòa tan lipid trong diethyl ether hoặc hỗn hợp methanol và ether, sau đó tiêm chậm vào dung dịch trong nước đã hòa tan các thành phần khác ở 55-65°C hoặc dưới áp suất thấp. Nhược điểm chính của phương pháp này là tạo ra quần thể liposome không đồng nhất về kích thước và được chất bị phơi

nhiễm với nhiệt độ cao [4].

Phương pháp tiêm ethanol:

Trong phương pháp này, ethanol được sử dụng để hòa tan phospholipid và cholesterol. Bằng cách sử dụng một bơm xi-lanh để tiêm dung dịch lipid vào một thể tích nước xác định, vừa tiêm vừa khuấy từ. Liposome được hình thành ngay khi lipid tiếp xúc với môi trường nước. Hỗn dịch liposome sau đó được tiếp tục khuấy ở nhiệt độ phòng trong vòng 15 phút. Phương pháp này có nhiều ưu điểm như đơn giản, thực hiện nhanh chóng, và có độ lặp lại cao. Liposome tạo thành có kích thước nhỏ mà không cần tác động siêu âm hay đun. Vì vậy, lipid không bị ảnh hưởng bởi sự oxy hóa hay giáng hóa [33].

Một số phương pháp khác:

Phương pháp vi dòng chảy, phương pháp khử-bù nước, phương pháp bốc hơi pha đảo, phương pháp loại bỏ chất điện hoạt [12], [144].

1.2.4.2. Phương pháp bào chế liposome gián tiếp

Là phương pháp bào chế ra tiền liposome hay còn gọi là proliposome hoặc preliposome. Khi sử dụng, proliposome sẽ được hoàn nguyên thành liposome. Kỹ thuật bào chế proliposome sẽ được trình bày chi tiết ở mục 1.3.

1.2.5. Phương pháp đánh giá

1.2.5.1. Đánh giá kích thước tiểu phân (KTTP) và phân bố KTTP

Tán xạ ánh sáng động (Dynamic light scattering – DLS) hay còn có tên khác là quang phổ tương quan (photon correlation spectroscopy – PCS) được sử dụng để xác định KTTP, phân bố KTTP và hình dạng tiểu phân dựa trên sự chuyển động Brown và dịch chuyển Doppler gây ra bởi chùm tia laser [125].

Phương pháp phân tích vết hạt nano (Nanoparticle tracking analysis-NTA) cũng được áp dụng để đo kích thước tiểu phân nano dựa trên sự theo dõi động lực học chuyển động của hạt thông qua sự tán xạ ánh sáng từ các hạt riêng lẻ bằng cách ghi lại hình ảnh. Kỹ thuật này vượt trội so với DLS vì NTA ghi lại dấu vết của từng chuyển động đơn lẻ của từng tiểu phân do đó cung cấp thông tin về hình ảnh và độ phân giải của các chất tán xạ cao hơn DLS [154].

Bên cạnh DLS và NTA, có nhiều kỹ thuật khác để xác định kích thước tiểu phân và thậm chí có nhiều tính năng hơn phương pháp DLS, cho phép xác định hình thái

tiểu phân, số lớp của liposome.

1.2.5.2. Đánh giá hình thái cấu trúc

Hình thái bên ngoài của tiểu phân được quan sát bằng hệ kính hiển vi điện tử như kính hiển vi điện tử quét (SEM), kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), kính hiển vi điện tử đông lạnh (Cryo-EM), kính hiển vi quét laser đồng tiêu (CLSM), kính hiển vi lực nguyên tử (AFM), và kính hiển vi huỳnh quang 2 photon (TPFM). Ngoài chức năng quan sát bề mặt, một số loại kính hiển vi còn có khả năng phân tích cấu trúc bên trong như AFM, TEM, cryo-EM, TPFM, CLSM [39], [122], [154].

1.2.5.3. Đánh giá hiệu suất nạp dược chất (liposome hóa)

Hiệu suất nạp dược chất là một tiêu chí đánh giá chất lượng của liposome. Đó là tỉ số giữa lượng dược chất được nạp vào liposome với tổng lượng dược chất được sử dụng, biểu thị bằng % và được tính theo công thức sau:

$$EE (\%) = (\text{dược chất nạp trong liposome} / \text{dược chất toàn phần}) \times 100 \text{ [4]}$$

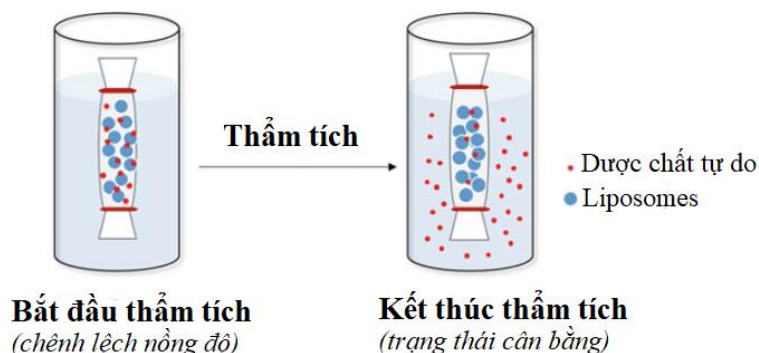
Hiệu suất nạp càng cao càng có hiệu quả trong điều trị. Đánh giá hiệu suất nạp là tách được dược chất tự do ra khỏi liposome nhưng không ảnh hưởng đến cấu trúc của liposome. Hiện nay, các kỹ thuật đánh giá hiệu suất nạp hay được sử dụng gồm: sắc ký cột gel, thẩm tích, siêu ly tâm, siêu lọc [103], [120].

Phương pháp thẩm tích (dialysis method):

Thẩm tích là kỹ thuật phổ biến để loại bỏ những phân tử nhỏ khỏi hỗn dịch liposome bằng cách sử dụng màng bán thấm có các lỗ nhỏ cho phép những phân tử nhỏ được tự do chui qua lỗ trong khi sự khuếch tán những phân tử lớn ra khỏi ngăn chứa bị hạn chế (hình 1.6). Túi thẩm tích phải cho phép các phân tử dược chất khuếch tán qua tự do nhưng không cho liposome đi qua. Môi trường thẩm tích phải là môi trường hòa tan tốt dược chất nhưng bảo vệ được cấu trúc của liposome. Vì vậy, ngoài dược chất ưa nước, dược chất kỵ nước cũng được phân lập nếu sử dụng môi trường thích hợp.

Ưu điểm của phương pháp này là đơn giản, dễ thực hiện, không yêu cầu thiết bị đắt tiền, có thể xử lý được một lượng lớn mẫu và có thể loại bỏ gần hết dược chất tự do. Kết quả thu được đáng tin cậy và có độ lặp lại. Tuy nhiên, phương pháp này cũng có một số nhược điểm như thời gian tiến hành kéo dài. Áp suất thẩm thấu của môi

trường thẩm tích phải lựa chọn để tránh sự phá hủy cấu trúc liposome gây ra hiện tượng rò rỉ dược chất dẫn đến ảnh hưởng tới độ chính xác của kết quả thu được. Hơn nữa, phương pháp định lượng dược chất tự do phải có độ nhạy phù hợp [103], [120].

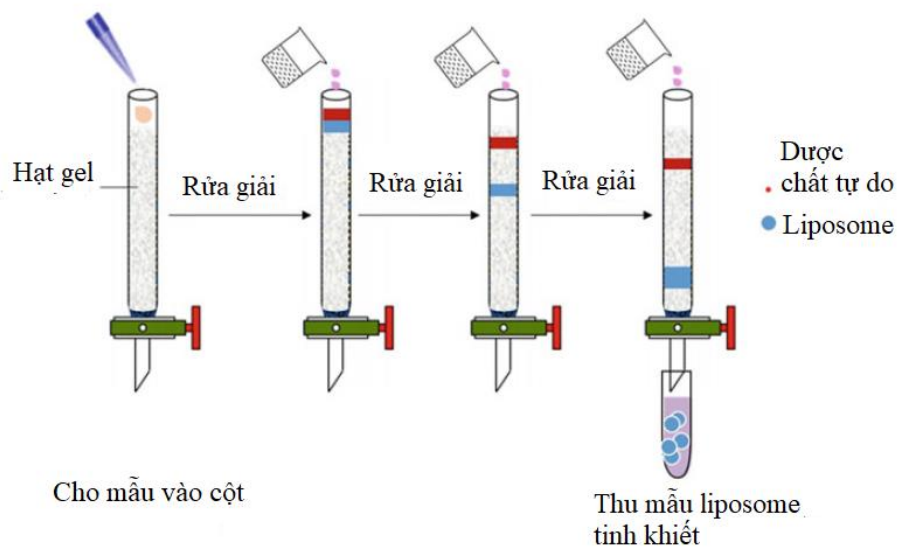


Hình 1.6. Sơ đồ quá trình tách dược chất tự do bằng thẩm tích [103]

Phương pháp tách sắc ký cột (phương pháp lọc gel):

Phương pháp này dùng cột sắc ký để tách dược chất tự do ra khỏi liposome. Cột sắc ký thường là cột Sephadex hoặc cột Sepharose. Nguyên tắc cơ bản của phương pháp này là sự khác nhau về tỉ trọng của liposome và dược chất tự do sẽ có thời gian lưu giữ khác nhau. Thường thì quá trình tách xảy ra ở trong cột được nhồi bằng những hạt xốp như hạt Sephadex, gel agarose. Trong quá trình rửa giải, những tiểu phân có khối lượng phân tử tương đối thấp (dược chất tự do) có khả năng đi vào các lỗ xốp của hạt và lưu lại lâu hơn trong những lỗ này. Trong khi đó, những tiểu phân có kích thước lớn hơn (liposome) không đi vào lỗ xốp được và bị rửa giải nhanh hơn. Tận dụng sự khác biệt về thời gian này, dược chất tự do có thể được tách ra khỏi dược chất nạp trong liposome (hình 1.7).

Ưu điểm của phương pháp này là điều kiện tách tương đối ổn định và cột có thể tái sử dụng, tiết kiệm chi phí. Nhược điểm khác của phương pháp này là không áp dụng được với dược chất thân dầu, không có khả năng rửa giải bằng chất rửa giải thân nước. Hơn nữa, việc sử dụng lượng lớn dịch rửa giải trong quá trình tách, làm loãng liposome và rò rỉ dược chất. Điều này có thể làm ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm [31], [78], [91], [103], [120].

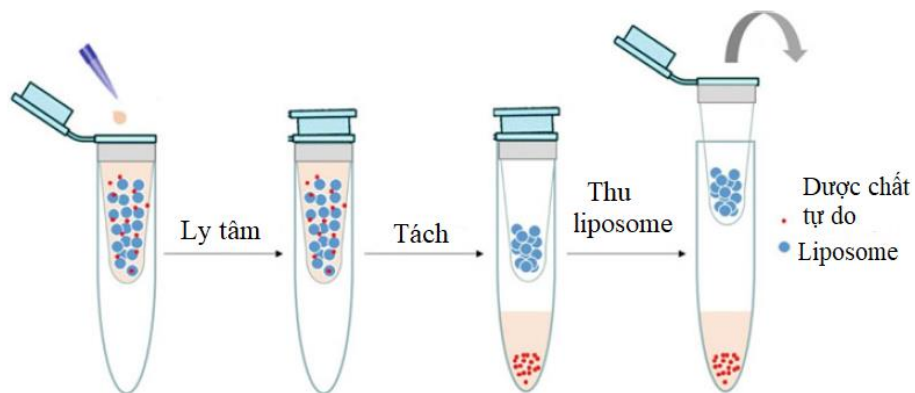


Hình 1.7. Sơ đồ quá trình tách dược chất tự do bằng phương pháp sắc ký cột [103]

Phương pháp siêu lọc (ultrafiltration) kết hợp với ly tâm:

Đây là phương pháp nhanh và đơn giản để tách dược chất tự do ra khỏi liposome, đặc biệt là áp dụng để loại bỏ dược chất thân nước. Dựa trên sự khác biệt về kích cỡ, màng bán thấm được sử dụng để giữ lại những tiểu phân có phân tử lượng cao và cho đi qua các phân tử có khối lượng thấp như nước và dược chất tự do (hình 1.8). Kích thước của lỗ màng bán thấm là yếu tố ảnh hưởng đến lượng liposome còn sót lại trong dịch lọc [146]. Nhìn chung, để đạt được hiệu quả tách thì nên sử dụng màng có kích thước lỗ màng bằng 1/10 kích thước của tiểu phân [103].

Ưu điểm của phương pháp này là giảm bớt sự rò rỉ dược chất vì liposome không bị pha loãng. Hơn nữa, quá trình tách dược chất tự do nhanh và có độ lặp lại cao [31], [120].



Hình 1.8. Sơ đồ biểu diễn quá trình tách dược chất tự do bằng phương pháp siêu lọc [103]

Phương pháp ly tâm (centrifugation):

Ly tâm là một kỹ thuật liên quan đến việc áp dụng lực ly tâm để tách tiểu phân từ dung dịch dựa vào kích thước của tiểu phân, tỉ trọng, độ nhớt của môi trường và tốc độ quay của rotor. Trong lĩnh vực nghiên cứu về hệ mang thuốc, lợi dụng sự khác nhau về tỉ trọng của liposome và dược chất tự do, ly tâm có thể sử dụng để tách dược chất tự do. Dưới tác động của lực ly tâm, liposome lắng xuống dưới đáy của ống ly tâm, trong khi đó dược chất tự do nổi ở phần trên. Bằng phân tích dược chất ở phần dịch nổi so với dược chất ban đầu trước khi ly tâm để tính được hiệu suất nạp [78]. Ưu điểm của phương pháp này là nhanh. Tuy nhiên, đôi khi sự khác biệt về tỉ trọng giữa liposome với môi trường phân tán không có ý nghĩa để tách liposome nên có thể tăng tốc độ quay lên đến 10.000 vòng/phút. Điều này có thể gây ra sự rò rỉ dược chất hoặc vỡ liposome. Do đó, để đạt được kết quả đúng, phải lựa chọn được tốc độ quay tối ưu của rotor [103].

1.2.5.4. Đánh giá khả năng giải phóng dược chất *in vitro*

Để đánh giá khả năng giải phóng dược chất *in vitro* của các chế phẩm liposome quy mô phòng thí nghiệm, phương pháp động học thẩm tích là phương pháp phổ biến nhất do nhanh, đơn giản và kinh tế [103]. Chế phẩm được cho vào túi thẩm tích với giá trị điểm cắt khối lượng phân tử là 14.000 dalton (MWCO=14.000 dalton). Túi thẩm tích chứa một lượng chế phẩm được cho vào các môi trường thử giải phóng khác nhau. Thông thường là các dung dịch đệm phosphate với các giá trị pH khác nhau [4] hoặc các môi trường mô phỏng dịch dạ dày hay dịch ruột [110]. Ngoài phương pháp thẩm tích, phương pháp siêu lọc cũng được áp dụng [146].

1.2.6. Một số thách thức và biện pháp khắc phục trong bào chế liposome dùng đường uống

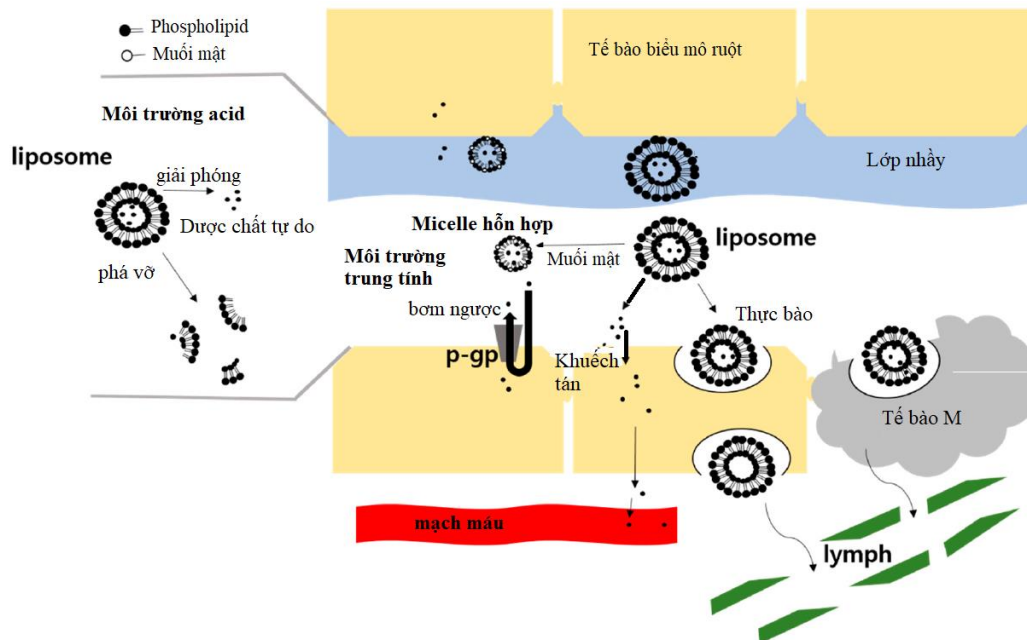
Liposome đã được nghiên cứu dùng đường uống từ năm 1970, đại diện đầu tiên cho lĩnh vực này là chế phẩm liposome insulin [60]. Tuy nhiên hiệu quả của liposome dùng đường uống không đồng nhất giữa các mẻ và khó dự đoán, đánh dấu những thách thức khi sử dụng liposome đường uống.

1.2.6.1. Thách thức

Liposome dùng đường uống có nhiều thách thức như kém ổn định trong đường tiêu hóa do chịu tác động của acid dạ dày, muối mật và men đường tiêu hóa

(pancreatic lipase). Những tác nhân này làm mất tính nguyên vẹn của liposome, gây rò rỉ dược chất hoặc phá vỡ màng lipid kép của những liposome có thành phần phospholipid có nhiệt chuyển pha thấp như phosphatidylcholin (PC), dimyristoyl phosphatidyl cholin (DMPC) [63], [139]. Dịch pancreatic trong đường tiêu hóa chứa các enzym thủy phân lipid như lipase, phospholipase A2, cholesterol esterase, làm thủy phân màng phospholipid kép, phá vỡ cấu trúc của liposome [81].

Tính thấm qua lớp biểu mô niêm mạc ruột của liposome quy ước kém bởi kích thước tiểu phân liposome to cùng với sự hiện diện của nhiều hàng rào biểu mô niêm mạc ruột. Có hai giả định về sự hấp thu thuốc từ liposome qua niêm mạc ruột: một là thuốc được giải phóng trong lòng ruột rồi được hấp thu; hai là liposome được chuyển thành mixell hỗn hợp rồi được hấp thu qua biểu mô ruột, hoặc liposome nguyên vẹn được thực bào qua tế bào biểu mô ruột hoặc hấp thu qua tế bào M ở vùng Peyer trong sợi nhung mao ruột (hình 1.9) [131], [150]. Tuy nhiên tế bào M với số lượng chỉ chiếm 1% so với tổng tế bào biểu mô ruột nên số lượng liposome được hấp thu nguyên vẹn qua tế bào M bị hạn chế [98].



Hình 1.9. Cơ chế hấp thu thuốc từ liposome ở trong đường tiêu hóa [85]

Thiết kế công thức cũng là một thách thức của liposome nói chung và liposome dùng đường uống nói riêng. Sự đồng nhất về chất lượng giữa các lô mẻ cũng như khả năng nâng cấp quy mô bào chế liposome phù hợp cho sử dụng đường uống với liều

cao và sử dụng thời gian dài là vấn đề quan trọng. Liposome vốn không ổn định khi ở dạng hỗn dịch nước, vì vậy việc chuyển đổi công thức dạng lỏng sang dạng rắn vẫn là nhu cầu cần thiết [36], [85] .

1.2.6.2. Một số biện pháp khắc phục

Làm ổn định liposome:

Do tính kém ổn định của liposome trong quá trình bào chế, bảo quản và di chuyển trong đường tiêu hóa, một số biện pháp được sử dụng để cải thiện tính ổn định của liposome như thay đổi thành phần lipid của lớp vỏ hoặc bao bề mặt liposome.

Liposome chứa thành phần phospholipid có nhiệt chuyển pha dưới 37 °C thường bị phá hủy hoàn toàn bởi muối mật, nhưng tác động này ảnh hưởng không rõ rệt với liposome chứa phospholipid có nhiệt chuyển pha trên 37 °C [121]. Bằng cách liên kết stearylamin trong thành phần lớp vỏ liposome, liposome trở nên tích điện dương và ổn định trong đường tiêu hóa, tăng tác dụng hạ đường huyết của insulin [77]. Tác dụng hạ đường huyết của insulin trong liposome được cải thiện khi thay thành phần lipid trong liposome quy ước bằng dipalmitoyl phosphatidylcholin - một lipid có nhiệt chuyển pha 41 °C (bảng 1.1) và dẫn xuất sterol chiết xuất từ đậu nành [107].

Các muối mật tiết từ tế bào gan vào đường ruột cũng là yếu tố làm phá vỡ cấu trúc liposome trong đường tiêu hóa [17], [28]. Việc thêm một số muối mật vào màng phospholipid kép của liposome cũng là biện pháp để cải thiện tính ổn định của liposome chống lại ảnh hưởng của muối mật ở ngoại môi vì xu hướng muối mật sẽ liên kết với phospholipid, khi đã được liên kết sẵn trong lớp phospholipid kép rồi thì lớp vỏ liposome sẽ tránh được tác động của muối mật bên ngoài [63], [131].

Bao bề mặt liposome bằng polyme (chitosan, protein, polyme tan trong ruột) cũng là biện pháp giúp liposome tránh được các tác động khắc nghiệt trong môi trường đường tiêu hóa [23], [62].

Tăng hấp thu:

Sử dụng chất làm tăng hấp thu nhằm làm cho quá trình hấp thu qua đường tiêu hóa dễ dàng hơn cũng là một trong những biện pháp được sử dụng phổ biến. Các chất làm tăng hấp thu như tocopherol polyethylen glycol succinat (TPGS), tween-80 [113], muối mật [67], [135]. Muối mật là một chất diện hoạt sinh lý, đóng vai trò

quan trọng trong hấp thu lipid. Bằng cách liên kết muối mật vào giữa lớp phospholipid kép, sinh khả dụng đường uống của liposome chứa được chất thân dầu và được chất thân nước được cải thiện rõ rệt [67]. Do có cấu trúc gần giống với cholesterol, muối mật dễ liên kết vào lớp trong màng lipid kép của liposome, để tạo nên liposome chứa muối mật với tên khác là bilosome. Những loại muối mật hay được sử dụng để làm tăng sinh khả dụng đường uống là natri cholat, natri taurocholat, natri deoxycholat (NaDC), và natri glycolat. NaDC làm sinh khả dụng đường uống của bilosome cao hơn so với liposome quy ước do NaDC giúp cho quá trình hấp thu dễ dàng hơn và được chất giải phóng từ bilosome rất ít [56].

Một số biện pháp khác làm tăng hấp thu như bao polyme hoặc thay đổi điện tích bề mặt để tăng bám dính lên lớp nhầy niêm mạc ruột [85], [138], gắn trung gian hướng đích tế bào biểu mô ruột để tăng quá trình hấp thu qua thành ruột nhờ trung gian thụ thể thực bào [57], [90], hoặc sử dụng polymer tăng thấm thông qua việc mở khớp nối chặt giữa các tế bào [26] hoặc kết hợp cơ chế mở khớp nối chặt với cơ chế xuyên bào [66]. Tuy nhiên, việc mở khớp nối chặt có nhược điểm là cũng làm cho các chất độc trong đường tiêu hóa cũng được hấp thu.

Chuyển dạng rắn và nâng cấp quy mô:

Thực tiễn phát triển liposome thành một hệ đưa thuốc dùng đường uống đang là mong muốn của nhà nghiên cứu để nâng cấp thành quy mô công nghiệp. Trong sản xuất quy mô phòng thí nghiệm, có nhiều phương pháp được áp dụng như hydrat hóa màng mỏng lipid, tiêm dung môi, loại bỏ chất diện hoạt, bốc hơi pha đảo và một số phương pháp khác [115]. Tuy nhiên, những phương pháp này cho đến nay chỉ thành công trong sản xuất quy mô nhỏ, nhưng lại thể hiện nhiều nhược điểm khi sản xuất quy mô lớn như phân bố kích thước tiểu phân không đều, ít lặp lại giữa các lô mẻ, không ổn định về lý hóa, giá thành cao [132]. Phương pháp tiêm ethanol được coi là phương pháp phù hợp nhất trong số những phương pháp hiện tại để nâng cấp quy mô do đơn giản, an toàn, có thể kiểm soát được kích thước tiểu phân bằng điều chỉnh nhiệt độ pha nước [73]. Tuy nhiên, liposome không ổn định về mặt vật lý ở môi trường nước trong quá trình bảo quản. Vì vậy, việc thiết kế công thức bào chế liposome ở dạng khô là giải pháp phù hợp để sản xuất quy mô lớn và giúp chế phẩm ổn

định trong quá trình bảo quản. Proliposome amphotericin B [134] và proliposome cyclosporin A [74] là những sản phẩm đại diện đầu tiên cho giải pháp này.

1.3. PROLIPOSOME

1.3.1. Khái niệm

Proliposome là sản phẩm dạng bột hoặc hạt khô, trơn chảy tốt, được tạo thành từ dược chất và phospholipid, khi phân tán vào nước hoặc dịch sinh học sẽ tạo hỗn dịch liposome [109], [116], [130].

Proliposome có ưu điểm tương tự như liposome. Ngoài ra, so với liposome, bào chế proliposome thuận tiện hơn, dễ nâng cấp quy mô và chi phí thấp hơn [130].

1.3.2. Thành phần

Thành phần của proliposome cũng tương tự như thành phần của liposome, bao gồm dược chất, phospholipid và các thành phần khác (các chất bảo vệ màng phospholipid, chất chống oxy hóa, tăng hiệu suất liposome hóa ...). Tuy nhiên, khác với liposome, trong thành phần của proliposome còn có chất mang tan trong nước.

Các chất mang thường được sử dụng là những chất có diện tích bề mặt và độ xộp lớn. Hơn nữa, chất mang phải được hòa tan nhanh chóng trong quá trình hydrat hóa trong nước để tạo thành hỗn dịch liposome. Một số chất mang hay được sử dụng gồm: maltodextrin, sorbitol, manitol, .v.v [68].

1.3.3. Phương pháp bào chế

1.3.3.1. Phương pháp phun sấy

Nguyên tắc chung của phương pháp này là dược chất, phospholipid và các thành phần khác được hòa tan trong dung môi, tiếp theo chất mang được phân tán vào dung môi và hỗn hợp này được phun sấy để thu được proliposome dạng bột khô [109]. Phương pháp này được áp dụng khi có yêu cầu về sự đồng nhất kích thước và hình dáng của tiểu phân.

Ưu điểm nổi bật của phương pháp phun sấy là sự hình thành và làm khô tiểu phân là một bước đơn liên tục, do đó tiểu phân được kiểm soát tốt hơn; áp dụng được cho cả dung môi nước và các dung môi khác. Ngoài ra, phương pháp này còn có ưu điểm chi phí thấp, dễ dàng nâng cấp quy mô và phù hợp để sản xuất proliposome khối lượng lớn [130]. Quy trình phun sấy gồm có bốn giai đoạn: Đầu tiên, hỗn dịch gồm

chất mang và thành phần tạo liposome được phun qua vòi phun vào buồng tạo hạt. Tiếp theo, giọt phun sẽ được tiếp xúc với khí nóng thổi vào buồng sấy rồi được sấy khô. Cuối cùng, sản phẩm dạng rắn được tạo thành [109].

1.3.3.2. Phương pháp bao hạt

Phương pháp này dựa vào nguyên tắc của kỹ thuật bao hạt trơ, đóng vai trò giá mang. Nhiều nguyên liệu được sử dụng làm chất mang, có thể là bột hoặc các hạt trơ. Khi sử dụng hạt trơ để làm chất mang, phải bao lót hạt trơ để tạo bề mặt nhẵn cho bước bao phospholipid tiếp theo. Điều này giúp tạo ra lớp bao phospholipid mỏng quanh hạt nhân và khi hydrat hóa sẽ tạo ra liposome có kích thước tiểu phân nhỏ [106].

Quy trình bao gồm các bước sau:

- Hòa tan dược chất, phospholipid và thành phần khác vào dung môi hoặc hỗn hợp dung môi hữu cơ.
- Phun dung dịch thu được qua súng phun lên trên chất mang đã chứa sẵn trong buồng tạo hạt. Dưới tác động của nhiệt và áp suất giảm trong buồng tạo hạt, dung môi bay hơi để lại lớp phospholipid chứa dược chất trên bề mặt chất mang.
- Tiếp tục như vậy cho đến khi hết dịch phun. Sấy sản phẩm thu được để làm khô và loại bỏ dung môi tồn dư.

1.3.3.3. Một số phương pháp khác

Phương pháp đôi dung môi siêu tới hạn [130], phương pháp tráng film trên bề mặt chất mang [116], phương pháp tạo cốt lipid-dược chất [61], phương pháp đông khô [52] cũng có thể áp dụng bào chế proliposome.

1.3.4. Đánh giá proliposome

1.3.4.1. Hình thái

Hình thái của proliposome được đánh giá bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM). Bề mặt của proliposome được quan sát và so sánh với bề mặt của chất mang trước khi bào chế để xác định sự hình thành của proliposome [153].

1.3.4.2. Hàm lượng dược chất

Hàm lượng dược chất trong proliposome được xác định bằng nhiều kỹ thuật khác nhau tùy thuộc vào loại dược chất sử dụng. Đánh giá hàm lượng dược chất trong proliposome là cơ sở để đánh giá hiệu suất nạp dược chất trong pha lipid. Với dược

chất kém tan trong nước, hàm lượng lý tưởng dược chất ở trong pha lipid là 100% (so với lượng dược chất sử dụng). Tuy nhiên, khi dung dịch lipid và dược chất phun lên chất mang thì dược chất có thể bị tách ra khỏi pha lipid và tạo thành dược chất tự do [109].

1.3.4.3. Độ trơn chảy

Proliposome là dạng bột hoặc hạt khô, vì vậy việc đánh giá độ trơn chảy là vấn đề cần thiết để chuyển proliposome vào dạng bào chế thông thường như viên nén hay viên nang. Xác định các thông số như tỉ trọng thô, tỉ trọng biểu kiến, góc chảy và chỉ số Carr's hoặc tỉ số Hausner của proliposome làm cơ sở cho đánh giá độ trơn chảy [68].

1.3.4.4. Khả năng giải phóng dược chất

Khả năng giải phóng dược chất từ proliposome có thể đánh giá bằng nhiều kỹ thuật khác nhau như sử dụng máy thử độ hòa tan, bình khuếch tán Franz, túi thẩm tích, thẩm tích ngược, màng cellophan [133].

1.3.4.5. Trạng thái lý hóa của dược chất sau khi tải vào proliposome

Phép đo nhiễu xạ tia X (Xray powder diffractometry - XRPD) hoặc phân tích nhiệt quét vi sai (Differential scanning calorimetry - DSC) được sử dụng để đánh giá trạng thái vật lý của dược chất khi tải vào proliposome (trạng thái kết tinh hay vô định hình) [11], [109]. Ngoài ra, các tương tác hóa học giữa dược chất với các thành phần khác cũng được đánh giá bằng phân tích phổ hồng ngoại (infrared spectrum) [69], [114].

1.3.4.6. Khả năng hydrat hóa

Đánh giá khả năng hydrat hóa là đánh giá khả năng hình thành liposome sau khi proliposome được cho tiếp xúc với môi trường nước *in vitro* [109]. Môi trường thử thường là những dung dịch đệm ở điều kiện nhiệt độ giống như nhiệt độ cơ thể (37 °C). Sự tạo thành liposome được quan sát dưới kính hiển vi quang học [116].

1.3.4.7. Liposome hoàn nguyên

Liposome được hoàn nguyên từ proliposome sẽ được đánh giá một số đặc tính sau: hình thái liposome được quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM); kích thước và phân bố kích thước tiểu phân, thế zeta được đo bằng sử dụng phương pháp

tán xạ ánh sáng động (DLS), hiệu suất nạp được chất được đánh giá bằng phương pháp thẩm tích hay siêu lọc, siêu ly tâm... [11], [68], [69].

1.3.4.8. Độ ổn định

Độ ổn định của proliposome có thể được đánh giá ở các điều kiện bảo quản khác nhau: như điều kiện lạnh 5 ± 3 °C [11], [29]; điều kiện bảo quản thực 25 ± 2 °C/ $60 \pm 5\%$ RH [11], [83] trong thời gian 3-6 tháng; điều kiện dài hạn 30 ± 2 °C/ $70 \pm 5\%$ [114] và điều kiện lão hóa cấp tốc 40 ± 2 °C / $75 \pm 5\%$ RH trong thời gian 6 tháng [83], [114]. Các tiêu chí đánh giá bao gồm kích thước tiểu phân, phân bố kích thước tiểu phân, hiệu suất nạp của liposome hoàn nguyên và hàm lượng được chất của proliposome.

1.3.5. Một số nghiên cứu proliposome dùng đường uống

Proliposome dùng đường uống đã được nhiều nghiên cứu công bố từ những năm 1990, bắt đầu bằng nghiên cứu của Katare và cộng sự về proliposome ibuprofen [76]. Từ đó đến bây giờ, nhiều nghiên cứu khác đã báo cáo về được chất nạp vào proliposome theo những phương pháp khác nhau đã làm tăng sinh khả dụng đường uống hoặc làm tăng hoạt tính sinh học của được chất.

Các được chất được nghiên cứu bào chế proliposome dùng đường uống thường là những được chất có tác dụng phụ kích ứng đường tiêu hóa như ibuprofen [76], indomethacin [75], hoặc được chất có tính thấm kém qua đường niêm mạc ruột như lopinavir [114], drondaron [83], calcitonin chiết xuất từ cá hồi [136], exemestan [61].

Phương pháp bào chế proliposome được sử dụng gồm bao tắng sôi [75], [76], bao bằng nôi bao truyền thống [84], tráng film trên bề mặt chất mang [83], [114], [136], [145], hydrat hóa film kết hợp đông khô [11], [40] hoặc tạo cốt lipid-được chất [61]. Chất mang sử dụng trong phương pháp bao hoặc tráng film trên bề mặt chất mang gồm manitol [40], hỗn hợp manitol với cốm sỏi bột [76], hạt trợ mang được chất [84], cellulose vi tinh thể [83], sorbitol [75], [136] hoặc maltodextrin [114]. Các thành phần tạo vỏ liposome được sử dụng gồm lecithin, stearylamin, DSPC, DMPG, SPC, HSPC, cholesterol [61], [75], [76], [114], [145].

Sinh khả dụng đường uống của liposome hoàn nguyên từ proliposome đã bào chế theo các phương pháp trên tăng lên 2 lần [114], 2,29 lần [40], 3,6 lần [136], và

4,5 lần [145] so với dạng nguyên liệu. Tác dụng dược lý của liposome hoàn nguyên cũng tăng lên so với nguyên liệu, đồng thời làm giảm tác dụng không mong muốn của dược chất [76].

Như vậy, với một số dược chất có tác dụng phụ khi dùng đường uống, hoặc dược chất có tính thấm kém qua niêm mạc ruột thì việc sử dụng hệ mang dược chất liposome được hoàn nguyên từ proliposome là một giải pháp có tiềm năng.

1.4. CÁC NGHIÊN CỨU VỀ BÀO CHẾ LIPOSOME BERBERIN VÀ PROLIPOSOME BERBERIN

1.4.1. Các nghiên cứu về bào chế liposome berberin

Liposome đã được nghiên cứu nhiều với các dược chất khác nhau từ những năm 1970. Tuy nhiên, liposome BBR mới bắt đầu nghiên cứu trong 10 năm trở lại đây.

Các phương pháp được sử dụng để bào chế liposome BBR gồm hydrat hóa film [32], [92], [100], [110], [124], tiêm ethanol [15], [99] và bốc hơi pha đảo [92]. Tá dược tạo vỏ liposome đa phần được sử dụng là phospholipid có nguồn gốc từ đậu nành như HSPC, SPC [32], [92], [99], [124], hoặc từ trứng như EPC [100]. Ngoài ra, các thành phần khác được thêm vào để làm vững chắc màng phospholipid kép như cholesterol hoặc để tăng thời gian tuần hoàn trong cơ thể của liposome như DSPE-PEG₂₀₀₀, DQA-PEG₂₀₀₀-DSPE [15], [92], [100]. Liposome sau khi bào chế được làm giảm KTTTP bằng phương pháp đun qua màng lọc polycarbonat với kích cỡ lỗ lọc khác nhau [15], [92], [100] hoặc kết hợp đun qua màng lọc polycarbonat với đồng nhất hóa áp suất cao [92] hoặc siêu âm [110], [124]. Sau khi đun qua màng polycarbonat có kích cỡ 200 nm và 100 nm, liposome có KTTTP nhỏ (từ 100 đến 130 nm), phân bố KTTTP hẹp (PDI từ 0,07 đến 0,2) [92], [100]. Phương pháp làm giảm KTTTP bằng siêu âm có KTTTP to (từ 140 đến 1100 nm), phân bố KTTTP rộng (PDI từ 0,3 đến 0,5) [110], [124]. Dược chất tự do được loại bỏ bằng phương pháp lọc gel [92], [99], [100], hoặc thẩm tích [15], hoặc ly tâm lạnh [124]. Hiệu suất nạp dược chất có sự dao động lớn trong cùng phương pháp hydrat hóa film, từ 14% [92] đến 94% [100], [124]. Sự khác nhau này do nhiều yếu tố ảnh hưởng như thành phần công thức, phương pháp làm giảm KTTTP.

Từ kết quả tổng quan các nghiên cứu về bào chế liposome BBR trên, phương

pháp hydrat hóa film đơn giản, thao tác dễ dàng. Bên cạnh đó, phương pháp tiêm ethanol cũng dễ thực hiện, dễ nâng cấp quy mô, liposome tạo ra đồng nhất về kích thước, dung môi ít độc. Phương pháp làm nhỏ kích thước tiểu phân bằng đùn qua màng lọc polycarbonat làm liposome tạo ra có kích thước đồng nhất, phân bố kích thước tiểu phân nhỏ. Trong nghiên cứu của Lin và cộng sự, khi so sánh 2 phương pháp làm nhỏ kích thước tiểu phân bằng đùn qua màng, đồng nhất hóa áp suất cao thì đùn qua màng có hiệu suất nạp cao hơn [92].

1.4.2. Các nghiên cứu về bào chế proliposome berberin

Proliposome dùng đường uống như một hướng tiếp cận mới nhằm khắc phục các nhược điểm của liposome khi qua đường tiêu hóa. Tuy proliposome có nhiều tiềm năng, nhưng cho đến nay có rất ít nghiên cứu về proliposome BBR. Gần đây, Jia và cộng sự nghiên cứu bào chế proliposome BBR bằng phương pháp đôi dung môi siêu tới hạn. Chất mang sử dụng chính là thành phần tạo vỏ liposome bao gồm HSPC/EPC/cholesterol với tỉ lệ xác định. Tỉ lệ BBR: chất mang = 1:10. Dung môi hòa tan được chất và chất mang là hỗn hợp dimethyl sulfoxid và cloromethan với tỉ lệ 1:5. Proliposome BBR với thông số quy trình bào chế tối ưu có hàm lượng được chất 9% với tỉ lệ giải phóng được chất trong môi trường pH 1,2 và pH 7,4 trong 3 giờ đầu lần lượt là 19% và 47%. Sau 20 giờ, các tỉ lệ này lần lượt là 34% và 85%. Liposome BBR hoàn nguyên có kích thước tiểu phân trung bình 180 nm đo bằng phương pháp DLS với chỉ số phân bố KTCP (PDI) bằng 0,216, và khi đo bằng phương pháp chụp TEM thì kích thước liposome khoảng 50 nm. Hiệu suất nạp tối ưu là 92% [69].

Do mới chỉ được Jia và cộng sự bào chế bằng phương pháp đôi dung môi siêu tới hạn, nên proliposome BBR là đối tượng nghiên cứu tiềm năng để thực hiện nhiều nghiên cứu bằng sử dụng những phương pháp bào chế khác nhau.

1.5. CÁC NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG VÀ TÁC DỤNG HẠ LIPID MÁU *IN-VIVO* CỦA BERBERIN, LIPOSOME BERBERIN VÀ PROLIPOSOME BERBERIN DÙNG ĐƯỜNG UỐNG

1.5.1. Đánh giá sinh khả dụng *in-vivo* dùng đường uống của berberin

BBR có nhiều tác dụng dược lý tiềm năng, nhưng sinh khả dụng đường uống thấp đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu. Bắt đầu bằng nghiên cứu của Zuo F.

và cộng sự năm 2006 trên đối tượng thử chuột cống với liều 40 mg/kg [164]. Sau đó, có nhiều nghiên cứu về lĩnh vực này trên cùng đối tượng chuột cống với nhiều mức liều khác nhau từ 25 mg/kg [54], 90 mg/kg [91], [95] đến 100 mg/kg chuột [51]. Mẫu máu được lấy ở các vị trí khác nhau như ở tĩnh mạch chủ bụng dưới [164], tĩnh mạch hock mắt [51], [95] hoặc tĩnh mạch cổ [54]. Số thời điểm lấy máu là 7 [164], 12 [51], hoặc 14 [54], [88]. Thời điểm lấy mẫu máu để định lượng nồng độ thuốc trong máu thường bắt đầu từ sau 5 phút [54], sau 10 phút [88] hoặc sau 15 phút [51] uống thuốc và điểm kết thúc lấy mẫu sau khi uống thuốc 36 giờ [51], [54], [164].

Để phân tích nồng độ thuốc trong máu chuột cống, phương pháp sắc ký lỏng kết hợp khối phổ (LC-MS/MS) là phương pháp phổ biến để định lượng BBR trong máu chuột. Trong phương pháp định lượng này, một số nghiên cứu đã lựa chọn pha động gồm acetonitril và nước (chứa 0,1% acid formic) với tỉ lệ biến đổi theo thời gian [51], [54], [95]. Tuy nhiên một số nghiên cứu lại lựa chọn pha động gồm nước/acetonitril (100:1) và metanol với tỉ lệ pha động biến đổi theo thời gian [164]. Chất chuẩn nội được sử dụng là diphenhydramin [54] hoặc tetrahydropalmitin [88]. Trong các nghiên cứu trên, BBR được ion hóa ở chế độ phun điện tử dương. Ion có $m/z=319,8$ [95] hoặc $m/z=320$ [54] dùng để định lượng BBR.

Các thông số dược động học được đánh giá bằng sử dụng mô hình không ngăn [51], [54], [164]. Mặc dù một số nghiên cứu đều thực hiện trên đối tượng chuột cống với cùng liều, cùng phương pháp và chất chuẩn nội, nhưng kết quả nghiên cứu cho thấy có sự dao động lớn về giá trị của đại lượng T_{max} . Trong nghiên cứu của Liu M, giá trị $T_{max} = 1,0 \pm 1,5$ h, nhưng trong nghiên cứu của Li Guofei, giá trị này đạt đến $18,9 \pm 23,0$ h. Tuy nhiên, giá trị C_{max} đều xấp xỉ 30 ng/mL [88], [95]. Các giá trị AUC_{0-36} giữa các nghiên cứu với các liều từ 25 mg/kg đến 100 mg/kg cân nặng chuột đều dưới 100 ng.h/mL [51], [95], [164] (bảng 1.2).

Bảng 1.2. Các nghiên cứu sinh khả dụng in vivo của BBR

Đối tượng thử	Liều (mg/kg)	Vị trí, thời điểm lấy mẫu	PP định lượng BBR trong huyết tương	Mô hình và các thông số đánh giá	TLTK
Chuột cống (n=4)	40	Tĩnh mạch chủ bụng dưới Lấy mẫu tại 7 thời điểm, từ 0 giờ đến 36 giờ	LC-MS/MS Pha động: Nước/acetonitril (100:1) và MeOH với tỉ lệ pha động biến đổi (0 phút 80:20; 10 phút 60:40; 20 phút 0:100)	Mô hình không ngăn $T_{\max}$ (h)= 2 $C_{\max}$ (ng/ml) = 5 AUC_{0-36} (ng.h/ml) = 37,42 MRT (h) = 10,53	[164]
Chuột cống (n=6)	100	Tĩnh mạch mắt Lấy mẫu tại 12 thời điểm, từ 15 phút sau uống thuốc đến 36 giờ	UPLC-MS/MS Chất chuẩn nội: tetrahydropalmitin Pha động: nước (chứa 0,1% acid formic) và acetonitril	Mô hình không ngăn $T_{\max}$ (h)= 2,6±1,1 $C_{\max}$ (ng/ml) = 9,48±3,4 AUC_{0-36} (ng.h/ml) = 46,5±12,8	[51]
Chuột cống (n=5)	25	Tĩnh mạch cổ Lấy mẫu tại 14 thời điểm, từ 5 phút sau uống thuốc đến 36 giờ	UPLC-MS/MS Chất chuẩn nội: Diphenhydramin Pha động: acetonitril: nước (chứa 0,1% acid formic). Ion định lượng: m/z =320	Mô hình không ngăn $T_{1/2}$ (phút) = 770,36 $T_{\max}$ (phút) = 15 ± 0 $C_{\max}$ (ng/ml) =16,7 ±4,5 AUC_{0-t} ng.phút/ml) = 2.039,5±492,2 CL/F (L/h/kg) = 4.999,34 ± 1198,8	[54]
Chuột cống (n=6)	90	Lấy 200 µl máu tại tĩnh mạch hốc mắt	UPLC-MS/MS Chất chuẩn nội là tetrahydropalmitin Pha động: acetonitril: nước (chứa 0,1% acid formic). Ion định lượng: m/z =319,8	Thông số: AUC_{0-36} (µg.h/L) = 88,8 ± 41,2 $AUC_{0-\infty}$ (µg.h/L) = 99,7 ± 48,8 $T_{\max}$ (h) = 1,0 ± 1,5 $C_{\max}$ (ng/mL)= 29,2 ± 26,1	[95]
Chuột cống (n=6)	90	Lấy máu 14 thời điểm, từ 10 phút; 20 phút sau uống thuốc đến 60 giờ.	UPLC-MS/MS Chất chuẩn nội tetrahydropalmitin. Pha động: acetonitril:nước chứa amoni acetat 10mM. Ion định lượng: m/z =319,8	Thông số: AUC_{0-60} (µg.h/L) = 305,8 ± 156,7 $T_{\max}$ (h) = 18,90 ± 23,0 $C_{\max}$ (ng/mL)= 28,2 ± 12,7	[88]

1.5.2. Đánh giá sinh khả dụng *in-vivo* đường uống của liposome berberin và proliposome berberin

Rất ít nghiên cứu về sinh khả dụng đường uống của liposome BBR hoặc proliposome BBR. Gần đây, Nguyen và cộng sự (2014) đã nghiên cứu về SKD đường uống của liposome BBR trên thỏ và Jia cùng cộng sự (2019) nghiên cứu SKD đường uống của proliposome BBR trên chuột cống. Trong cả hai nghiên cứu, mẫu máu được lấy 8 thời điểm (trên thỏ) hoặc 12 thời điểm (trên chuột cống) đến 24 giờ. Nồng độ BBR trong huyết tương được định lượng bằng phương pháp HPLC [110] hoặc LC-MS/MS [69]. Các thông số đánh giá được động học cơ bản gồm C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, MRT_{0-t} , $MRT_{0-\infty}$. Kết quả cho thấy liposome BBR có SKD cao hơn hỗn dịch BBR quy ước từ 0,8-1,5 lần trong nghiên cứu của Nguyen và cộng sự [110], và cao hơn 20 lần trong nghiên cứu của Jia và cộng sự [69]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Nguyen, thời gian lưu trú không khác với nhóm uống hỗn dịch [110].

1.5.3. Mô hình đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh của berberin trên động vật thực nghiệm

Cholesterol máu nội sinh được tổng hợp ở gan chiếm 70% tổng số cholesterol trong cơ thể người, 30% còn lại có nguồn gốc ngoại sinh được hấp thu từ thức ăn bởi protein Niemann-Pick C1 like-1 trên màng đỉnh của tế bào niêm mạc ruột [1], [101]. Để đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh của thuốc, trước hết phải gây được mô hình tăng lipid máu nội sinh.

Các chất gây tăng lipid máu nội sinh thường được sử dụng là Tween 80, Triton WR-1339 và Poloxamer 407. Cả 3 loại này đều sử dụng liều đơn, đường tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm phúc mạc, mang lại hiệu quả nhanh, phù hợp cho nghiên cứu sàng lọc ban đầu [6], [87], [104]. Triton làm tăng sinh tổng hợp cholesterol ở gan làm cholesterol tăng đột ngột trong huyết thanh trong vòng 24 giờ đầu. Tween 80 gây tăng cholesterol huyết tương nhanh, nhưng trong thời gian ngắn (6-12 giờ), chủ yếu do tăng cholesterol nội sinh [6]. Poloxamer 407 (P-407) gây tăng TG và cả cholesterol ở huyết tương với nồng độ hằng định trong 24 giờ [87]. Trong các chất gây tăng lipid máu nội sinh này, P-407 sử dụng đường tiêm màng bụng thể hiện ưu điểm vượt trội hơn do thời gian làm tăng lipid máu duy trì lâu hơn, nồng độ ổn định hơn trong huyết tương, an toàn, ít độc, không gây thủy phân HDL [104].

Mô hình đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh của berberin trên chuột cống được gây tăng lipid máu bằng tiêm phúc mạc P-407 liều 500 mg/kg được Kim và cộng sự thực hiện với 2 liều thử BBR 50 mg/kg và 100 mg/kg. Cả hai liều thử đều có tác dụng làm giảm nồng độ TC, LDL-C, TG và làm tăng HDL-C so với nhóm chứng một cách có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt về tác dụng giữa hai liều thử [79].

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

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU, THIẾT BỊ, ĐỘNG VẬT NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên vật liệu

Các nguyên vật liệu và hóa chất chính dùng trong nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.1

Bảng 2.1. Nguyên vật liệu sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên nguyên liệu	Nguồn gốc	Tiêu chuẩn
1	Berberin base (98,06%; CAS number: 2086-83-1)	Sichuan Weikeqi Biological Technology Co., Ltd -Trung Quốc	Nhà sản xuất
2	Berberin chuẩn (86,2%, số lô C0420168.04)	VKN thuốc Trung ương	Chuẩn làm việc
3	Artovastatin (Lipitor) 20mg	Pfizer -USA	Nhà sản xuất
4	Glibenclamid chuẩn (100,10%, số lô 0103129)	VKN thuốc Trung ương	Chuẩn làm việc
5	Hydrogenated soy phosphatidylcholin (>98%)	Lipoid GmbH - Đức	Nhà sản xuất
6	Distearoyl phosphatidylglycerol (>98%)	Lipoid GmbH - Đức	Nhà sản xuất
7	Natri deoxycholat (>98%)	Thermo Fisher Co., Ltd -USA	Nhà sản xuất
8	α -tocopherol	CISME - Italy	BP 2015
9	Ethanol tuyệt đối	Đức	BP 2015
10	Ethanol 96 %	Đức	BP 2015
11	Methanol	Lach-ner - Cộng hòa Séc	BP 2015
12	Methanol	Merck - Đức	Dùng cho HPLC
13	Cloroform	Lach-ner - Cộng hòa Séc	BP 2015
14	Acid formic	Fisher-Cộng hòa Séc	Dùng cho LCMS
15	Acetonitril	Merck - Đức	Dùng cho HPLC
16	Manitol	Damao Co., Ltd - Trung Quốc	Nhà sản xuất
17	Poloxamer 407	Sigma Aldrich-USA	Nhà sản xuất
18	Natri heparin 5000 UI/ml	Đức	BP 2015
19	Dinatri hydrophosphat	Trung Quốc	Tinh khiết phân tích

STT	Tên nguyên liệu	Nguồn gốc	Tiêu chuẩn
20	Kali dihydrophosphat	Trung Quốc	Tinh khiết phân tích
21	Acid hydrochloric đặc	Trung Quốc	Tinh khiết phân tích
22	Nước muối sinh lý 0,9 %	Việt Nam	Nhà sản xuất
23	Nước tinh khiết	Việt Nam	Dược điển VN V
24	Nước cất	Việt Nam	Dược điển VN V

2.1.2. Thiết bị

Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.2

Bảng 2.2 Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

Thiết bị	Nước sản xuất	Địa điểm nghiên cứu
<i>Thiết bị dùng trong bào chế</i>		
Máy cắt quay R-300, Büchi Labortechnik	Đức	Viện nghiên cứu Dược – Đại học Tartu- Estonia
Máy bao tâng sôi Mini-Glatt	Đức	Trường Đại học Dược Hà Nội
Máy bao tâng sôi Diosna-Minilab	Đức	Trường Đại học Dược Hà Nội
Xilanh Hamilton	Mỹ	Trường Đại học Dược Hà Nội
Thiết bị đùn tay mini extruder	Mỹ	Trường Đại học Dược Hà Nội
Tủ sấy chân không Daihan labtech	Hàn Quốc	Trường Đại học Dược Hà Nội
Bể điều nhiệt Wisd, WB-22	Hàn Quốc	Trường Đại học Dược Hà Nội
Máy khuấy từ LLG-uniSTIRRER	Đức	Viện nghiên cứu Dược – Đại học Tartu- Estonia
Bể siêu âm SONOREX RK 1050 CH	Đức	Viện nghiên cứu Dược – Đại học Tartu- Estonia
<i>Thiết bị dùng để đánh giá</i>		
Máy đo kích thước tiểu phân và phân bố kích thước tiểu phân Zetasizer Nano ZS90	Anh	Trường Đại học Dược Hà Nội
Máy đo quang phổ UV/Vis U-5100	Nhật	Trường Đại học Dược Hà Nội
Thiết bị thử độ hòa tan Erweka-DT	Đức	Trường Đại học Dược Hà Nội
Máy đo thể tích biểu kiến của hạt và bột SVM10	Erweka-Đức	Trường Đại học Dược Hà Nội
Bể ổn nhiệt lắc ngang Memmert WNB	Đức	Trường Đại học Dược Hà Nội
Máy ly tâm	Nhật	Trường Đại học Dược Hà Nội
Tủ vi khí hậu Binder KBF P	Đức	Trường Đại học Dược Hà Nội
Cân phân tích 4 số	Satorius-Đức	Trường Đại học Dược Hà Nội

Thiết bị	Nước sản xuất	Địa điểm nghiên cứu
Cân xác định mất khối lượng do làm khô Moisture analyzer MF50 A&D	Nhật	Trường Đại học Dược Hà Nội
Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent HPLC 1200	Mỹ	Trường Đại học Dược Hà Nội
Máy sinh hóa TC 3300 plus Teco Diagnostic	Mỹ	Trường Đại học Dược Hà Nội
Máy đo kích thước tiểu phân và phân bố kích thước tiểu phân Zetasizer Nano ZSP model ZEN 5600	Anh	Viện nghiên cứu Dược – Đại học Tartu- Estonia
Máy đo quang phổ UV/Vis UV-1800	Nhật	Viện nghiên cứu Dược – Đại học Tartu- Estonia
Máy phân tích hạt ZetaView® NTA	Đức	Trung tâm sinh học – Đại học Helsinki, Phần Lan
Kính hiển vi điện tử đông lạnh Cryo-EM FEI Talos Arctica	Mỹ	Trung tâm sinh học – Đại học Helsinki, Phần Lan
Kính hiển vi huỳnh quang 2 photon Leica TCS SP8	Đức	Khoa Y sinh, Đại học Helsinki, Phần Lan
Máy đo phổ huỳnh quang Cary Eclipse	Australia	Viện Vật lý - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Kính hiển vi điện tử đồng tiêu Nikon Confocal C1 si	Nhật	Viện Vật lý - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Kính hiển vi điện tử quét Regulus 8100	Nhật	Viện Vật lý - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Kính hiển vi điện tử truyền qua TEM, Jeol, Jem-1010	Nhật	Viện vệ sinh dịch tễ Trung ương
Máy quang phổ hồng ngoại FTIR Spectrum Two™, PerkinElmer	Anh	Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Máy nhiễu xạ tia X Equinox 5000	Pháp	Viện Khoa học vật liệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Hệ thống sắc ký lỏng Acquity H class, kết hợp khối phổ Xevo TQD, Waters	Mỹ	Trung tâm đánh giá tương đương sinh học - Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương
Cân phân tích 05 số Mettler Toledo	Thụy Sĩ	Trung tâm đánh giá tương đương sinh học - Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương
Máy ly tâm lạnh Sigma 4-16KS	Đức	Trung tâm đánh giá tương đương sinh học - Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương
Tủ lạnh sâu -35°C Panasonic	Nhật	Trung tâm đánh giá tương đương sinh học - Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương

2.1.3. Động vật thí nghiệm

Động vật thí nghiệm được lựa chọn cho nghiên cứu đánh giá SKD đường uống là chuột cống trắng Wistar, giống đực trưởng thành, khỏe mạnh, khối lượng từ 170-240 gam, do Học viện Quân Y cung cấp.

Động vật cho thí nghiệm đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh là chuột nhắt trắng trưởng thành chủng Swiss, cân nặng từ 20-28 gam, khỏe mạnh, do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

Tất cả động vật được nuôi ở trong lồng nhựa chuẩn polypropylen và duy trì điều kiện nuôi chuẩn với nhiệt độ 22 ± 2 °C, độ ẩm tương đối 30-70 % với chu kỳ 12/12 giờ sáng tối. Chuột được nuôi ổn định ít nhất 5 ngày trước khi thực hiện nghiên cứu tại phòng nuôi động vật của Bộ môn Dược lý Trường Đại học Dược Hà Nội. Trong thời gian này, chuột được cho ăn chế độ ăn chuẩn và uống nước tự do.

2.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Nội dung nghiên cứu trong luận án được thiết kế theo các mục tiêu nghiên cứu như sau:

Mục tiêu 1: “Xây dựng được công thức và quy trình bào chế liposome berberin và proliposome berberin ở quy mô phòng thí nghiệm” gồm các nội dung:

- Thẩm định phương pháp định lượng BBR bằng quang phổ UV-Vis và HPLC.
- Nghiên cứu tiền công thức.
- Nghiên cứu bào chế và đánh giá một số đặc tính của liposome berberin.
- Nghiên cứu bào chế và đánh giá một số đặc tính của proliposome berberin và liposome tạo thành từ proliposome berberin quy mô phòng thí nghiệm.
- Nâng cấp quy mô bào chế proliposome BBR 200 gam/mẻ.
- Xây dựng một số chỉ tiêu chất lượng của proliposome BBR.
- Theo dõi độ ổn định của proliposome BBR.

Mục tiêu 2: “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” gồm các nội dung:

- Thẩm định phương pháp định lượng BBR trong huyết tương chuột cống bằng LC-MS/MS.
- Đánh giá sinh khả dụng của liposome BBR tạo thành từ proliposome BBR

dùng đường uống trên chuột thí nghiệm

- Đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh của liposome BBR tạo thành từ proliposome BBR trên chuột thí nghiệm.

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

- Dung môi pha loãng 1: ethanol 96 %.
- Dung môi pha loãng 2: Nước cất.
- Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 10,0 mg BBR chuẩn, cho vào bình định mức 10ml, hòa tan bằng siêu âm trong methanol. Thêm methanol đến vạch. Pha loãng dung dịch trên bằng ethanol 96 % để thu được dung dịch chuẩn gốc OS1 có nồng độ 0,02 mg/ml. Làm tương tự như vậy để được dung dịch chuẩn gốc OS2 với nồng độ 0,02 mg/ml với dung môi pha loãng 2.

Từ dung dịch chuẩn gốc OS1 và OS2, pha loãng thành 2 dãy các dung dịch BBR chuẩn có nồng độ 4; 5; 6,7; 8; 10; 12 $\mu\text{g/ml}$, dung môi pha loãng 1 và 2 tương ứng. Quét phổ dung dịch BBR có nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$ trong khoảng bước sóng từ 400 nm đến 200 nm. Lựa chọn bước sóng tại đó BBR có độ hấp thụ cực đại. Đo độ hấp thụ tại bước sóng cực đại đã lựa chọn của các dung dịch chuẩn trên với mẫu trắng là dung môi pha loãng. Từ kết quả độ hấp thụ thu được, xây dựng các đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ BBR trong các dung môi pha loãng khác nhau.

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

- Chuẩn bị các dung dịch:
 - Dung môi pha loãng: methanol, ethanol 96 %.
 - Dung dịch đệm kali dihydrophosphat (KH_2PO_4) 0,033M (pH 4,5): Hòa tan 4,488g Kali dihydrophosphat (TT) trong nước cất 2 lần. Kiểm tra pH và điều chỉnh về 4,5 bằng dung dịch acid hydrocloric 1N hoặc dung dịch NaOH 10M (nếu cần). Lọc qua màng lọc 0,45 μm . Siêu âm 15 phút để đuổi bọt khí.

- Pha động: hỗn hợp acetonitril : dung dịch đệm KH_2PO_4 0,033M (pH 4,5) = 1:1
- Dung dịch chuẩn: cân chính xác khoảng 10,0 mg berberin chuẩn, hòa tan trong methanol ở bình định mức 10ml bằng siêu âm, thêm dung môi methanol tới vạch và lắc kỹ được dung dịch gốc có nồng độ 1 mg/ml. Pha loãng dung dịch gốc với ethanol 96 % để được dung dịch có nồng độ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Lọc qua màng lọc cellulose acetat kích thước lỗ lọc 0,45 μm .
- Dung dịch thử: Cân chính xác 1 lượng proliposome BBR hoặc hỗn hợp vật lý (trong đánh giá tương tác được chất với tá dược) chứa tương ứng với 10,0 mg BBR, cho vào bình định mức 10ml. Thêm methanol vào gần đến vạch, hòa tan các thành phần tạo liposome hoặc hỗn hợp vật lý trong 15 phút ở bể siêu âm (manitol không tan sẽ lắng xuống đáy). Bổ sung methanol đến vạch. Dịch trong được lọc qua màng lọc 0,45 μm . Dịch lọc được pha loãng bằng ethanol 96% để tạo dung dịch thử có nồng độ BBR 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Dung dịch mẫu trắng: cân mẫu placebo (thành phần giống với proliposome BBR hoặc hỗn hợp vật lý nhưng không có dược chất), hòa tan trong methanol (manitol không tan sẽ lắng xuống đáy). Phần dịch trong được pha loãng bằng ethanol 96 % tương tự như quy trình xử lý mẫu thử để được dung dịch mẫu trắng với lượng nền tương đương với lượng trong mẫu thử nồng độ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Điều kiện sắc ký:
 - Qua tham khảo nghiên cứu trước về phương pháp định lượng BBR [24] kết hợp với khảo sát sơ bộ, các điều kiện chạy sắc ký được lựa chọn trên hệ thống sắc ký Agilent Infinity 1200 như sau: cột sắc ký Inertsil®-ODS3, 250 x 4,6 mm, kích thước hạt nhồi 5 μm . Pha động là hỗn hợp acetonitril : dung dịch đệm KH_2PO_4 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.
 - Thăm định phương pháp định lượng dựa trên một số tiêu chí:
 - Tính thích hợp của hệ thống: tiêm mẫu chuẩn có nồng độ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lặp lại 6 lần qua hệ thống sắc ký theo chương trình đã chọn. Yêu cầu độ lặp lại về diện tích pic, thời gian lưu giữa mỗi lần tiêm có giá trị RSD không quá 2%. Số đĩa lý thuyết ≥ 1000 .
 - Tính chọn lọc - độ đặc hiệu: Tiêm mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử vào hệ

thống sắc ký theo chương trình đã lựa chọn và ghi lại các sắc ký đồ. Yêu cầu pic của berberin được nhận diện rõ trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn, mẫu thử và không xuất hiện pic lạ tại thời điểm trùng với thời gian lưu của BBR trên sắc ký đồ mẫu trắng.

- Khoảng tuyến tính: chuẩn bị một dãy gồm 5 dung dịch chuẩn BBR có các nồng độ từ 2,5, 5, 10, 20, 25 và 50 µg/ml. Tiêm lần lượt các dung dịch vào hệ thống sắc ký theo chương trình đã chọn. Xác định mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ berberin. Khoảng tuyến tính phải có hệ số tương quan $0,99 \leq R^2 \leq 1$.

- Độ chính xác: chuẩn bị dung dịch mẫu trắng như trên. Thêm chuẩn vào nền mẫu để được các dung dịch với 3 mức nồng độ 4, 5 và 6 µg/ml. Lọc qua màng lọc kích thước lỗ lọc 0,45 µm. Tiêm vào hệ thống theo chương trình đã chọn. Yêu cầu phần trăm tìm lại của các mẫu ở 3 mức nồng độ nằm trong khoảng từ 98 -102 %.

- Độ chụm: chuẩn bị 6 mẫu proliposome berberin chứa chính xác khoảng 10 mg BBR, hòa tan trong bình định mức 10 ml bằng methanol rồi pha loãng bằng ethanol 96 % để được các dung dịch có nồng độ BBR 5 µg/ml. Tiến hành chạy sắc ký theo chương trình đã lựa chọn. Xác định nồng độ dung dịch từ phương trình hồi quy tuyến tính và tính hàm lượng BBR trong proliposome BBR. Yêu cầu độ lặp lại về hàm lượng berberin giữa các mẫu có giá trị RSD không vượt quá 2%.

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

Chuẩn bị mẫu:

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn trong dung môi:

- Dung dịch chuẩn gốc để pha đường chuẩn và pha mẫu kiểm tra: Cân chính xác chất chuẩn berberin clorid hòa tan trong methanol thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ BBR khoảng 500 µg/ml.

- Dung dịch chuẩn làm việc: Pha loãng dịch chuẩn gốc trong methanol để thu được các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 5000 ng/ml và 250 ng/ml.

- Dung dịch chuẩn nội gốc: Cân chính xác chất chuẩn glibenclamid hòa tan trong methanol thu được dung dịch chuẩn nội gốc có nồng độ glibenclamid khoảng 250 µg/ml.

- Dung dịch chuẩn nội làm việc: Từ dung dịch chuẩn nội gốc, tiến hành pha loãng trong hỗn hợp dung môi methanol: nước (1:1) để thu được dung dịch chuẩn nội

làm việc có nồng độ khoảng 250 ng/ml.

Chuẩn bị đường chuẩn và mẫu LLOQ trong huyết tương:

- Từ các dung dịch chuẩn trong dung môi, pha các dung dịch chuẩn làm việc trong huyết tương trắng chuột có nồng độ BBR tương ứng khoảng 25 ng/ml và 2 ng/ml.

- Từ các dung dịch chuẩn làm việc trong huyết tương, pha các dung dịch chuẩn trong huyết tương bằng huyết tương trắng chuột có nồng độ BBR 0,2; 0,5; 1; 2; 8; 12; 20; 25 ng/ml.

- Mỗi đường chuẩn bao gồm: 01 mẫu huyết tương trắng (blank), 01 mẫu huyết tương trắng có pha IS (zero) và 08 mẫu huyết tương có pha chuẩn BBR và IS.

Chuẩn bị mẫu kiểm tra trong huyết tương (QCs):

- Từ dung dịch chuẩn làm việc nồng độ 250 ng/ml, pha các dung dịch chuẩn làm việc trong huyết tương có nồng độ 25 ng/ml và 2 ng/ml. Từ các dung dịch này, pha các dung dịch mẫu kiểm tra trong huyết tương với 3 nồng độ: 0,6 ng/ml (LQC); 10 ng/ml (MQC) và 18 ng/ml (HQC).

Chuẩn bị mẫu pha loãng:

- Từ dung dịch chuẩn làm việc nồng độ BBR 5000 ng/ml, pha loãng bằng hỗn hợp dung môi methanol: nước (1:1) để được dung dịch có nồng độ 2500 ng/ml. Từ dung dịch thu được có nồng độ 2500 ng/ml, pha loãng trong huyết tương trắng chuột để được nồng độ BBR khoảng 125 ng/ml. Lấy 36 µl dung dịch này tiếp tục được pha loãng với 14 µl huyết tương trắng chuột để được mẫu pha loãng gấp 5 lần nồng độ HQC (90 ng/ml).

Chuẩn bị mẫu kiểm tra tính thích hợp của hệ thống:

- Lấy 30 µl dung dịch mẫu kiểm tra trong huyết tương có nồng độ BBR 25 ng/ml, pha loãng với 20 µl huyết tương trắng chuột để được mẫu dung dịch dùng kiểm tra tính thích hợp của hệ thống có nồng độ 15 ng/ml.

Xử lý mẫu:

Quy trình xử lý mẫu được tiến hành bằng phương pháp kết tủa protein với dung môi chiết là acetonitril [32]. Quy trình gồm các bước sau:

- Mẫu huyết tương chuột cần định lượng nồng độ BBR được để ráo đông ở nhiệt

độ phòng.

- Tiến hành hút 50 µl mẫu huyết tương sau khi đã đông cho vào ống Eppendorf, thêm 10 µl IS và 200 µl acetonitril. Lắc nhẹ 5 giây. Ly tâm 9000 vòng/phút trong 5 phút. Hút khoảng 230 µl lớp dịch trong, cho vào lọ sắc ký. Thêm 100 µl nước, lắc nhẹ. Tiêm sắc ký.

- Với mẫu có nồng độ BBR cao ngoài khoảng tuyến tính, tiến hành pha loãng mẫu 5 lần bằng cách hút 10 µl mẫu huyết tương, thêm 40 µl huyết tương trắng. Lắc đều rồi xử lý tiếp như trên.

Phương pháp định lượng:

Mẫu huyết tương sau khi xử lý được định lượng bằng phương pháp LC-MS/MS với các điều kiện sắc ký được cải tiến trên cơ sở tham khảo các tài liệu đã công bố trước đây về định lượng BBR trong huyết tương chuột [32], [88], [155], kết hợp với thực nghiệm khảo sát để lựa chọn điều kiện sắc ký cũng như điều kiện khối phổ và lựa chọn chất chuẩn nội (IS). Điều kiện sắc ký gồm có cột C18 với kích thước cột 50 x 2,1 mm, kích thước hạt nhồi 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. Nhiệt độ buồng tiêm mẫu bằng nhiệt độ phòng. Điều kiện khối phổ được trình bày ở bảng 2.3.

Bảng 2.3. Điều kiện khối phổ của phương pháp LC-MS/MS định lượng BBR

Thông số	Hoạt chất	Berberin	Glibenclamid (IS)
Chế độ ion hóa		ESI (+)	ESI (+)
Điện thế đầu phun (kV)		3,5	3,5
Điện thế bộ phận thu mẫu (V)		40	40
Nhiệt bay hơi (°C)		350	350
Tốc độ khí bay hơi (lít/giờ)		650	650
Tốc độ khí bộ phận thu mẫu (lít/giờ)		20	20
Thế phân mảnh ion (V)		34	14
Ion ban đầu (parent ion)		m/z = 335,92	m/z = 494,2
Ion tạo thành (product ion)		m/z = 320,11	m/z = 369,1

Quy trình thẩm định phương pháp định lượng BBR trong huyết tương chuột được thực hiện theo hướng dẫn của Ủy ban Y tế châu Âu [7] và Cơ quan quản lý thực

phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ [8] bao gồm các tiêu chí sau: sự phù hợp của hệ thống sắc ký, tính chọn lọc, tính tuyến tính, độ nhạy, độ đúng, độ chính xác (trong ngày và khác ngày), tính nguyên vẹn khi pha loãng, khả năng phục hồi, ảnh hưởng của nền mẫu, độ ổn định của BBR trong huyết tương ở các điều kiện phân tích và bảo quản mẫu. Cụ thể như sau:

Sự phù hợp của hệ thống:

Chuẩn bị mẫu BBR trong huyết tương chứa BBR với nồng độ 15 ng/ml theo quy trình phân tích để kiểm tra sự phù hợp của hệ thống. Tiêm lặp lại 6 lần mẫu này theo các điều kiện sắc ký đã chọn như ở “phương pháp định lượng”. Xác định thời gian lưu, diện tích pic và tính tỉ lệ giữa pic của BBR so với pic của chuẩn nội. Yêu cầu pic của BBR và IS phải cân đối, được nhận diện rõ ràng, tách khỏi pic tạp có trong mẫu, có sự lặp lại về thời gian lưu và diện tích pic của BBR và IS. Các hệ số biến thiên (CV) về thời gian lưu của BBR và IS $\leq 1,0\%$. Hệ số biến thiên về tỉ lệ diện tích pic BBR/IS $\leq 5,0\%$.

Tính chọn lọc, đặc hiệu của phương pháp:

Tiến hành chuẩn bị 6 mẫu huyết tương trắng, 6 mẫu chuẩn có chứa IS và BBR ở nồng độ LLOQ (0,2 ng/ml) trong từng nguồn mẫu huyết tương trắng trên, 01 đường chuẩn và các mẫu QC (LQC, MQC, HQC). Phân tích các mẫu trên theo quy trình. Ghi lại sắc ký đồ, thông số pic và đáp ứng pic. Yêu cầu pic của BBR và IS phải cân đối, nhận diện rõ ràng, tách khỏi pic tạp có trong mẫu. Tại thời điểm trùng với thời gian lưu của BBR, đáp ứng pic của từng mẫu trắng phải không quá 20 % đáp ứng pic của mẫu LLOQ tương ứng. Tại thời điểm trùng với thời gian lưu của IS, đáp ứng peak của từng mẫu trắng phải không quá 5% đáp ứng pic trung bình IS của mẫu đường chuẩn (CC), QC.

Xây dựng đường chuẩn trong huyết tương chuột và khoảng tuyến tính:

Tiến hành khảo sát khoảng nồng độ BBR từ 0,2 ng/ml đến 25 ng/ml với 08 mẫu chuẩn trong huyết tương như trình bày ở mục “chuẩn bị đường chuẩn và mẫu LLOQ trong huyết tương”, mỗi nồng độ 2 mẫu độc lập. Xử lý các mẫu theo quy trình. Phân tích các mẫu bằng phương pháp LC-MS/MS. Các đường chuẩn được xây dựng bằng sử dụng hồi quy tuyến tính giữa tỉ lệ diện tích pic BBR/IS và nồng độ thực của BBR

trong mẫu, sử dụng hệ số trọng số $1/x^2$ (x là nồng độ chuẩn). Tính lại nồng độ BBR có trong mẫu chuẩn theo phương trình hồi quy đã xây dựng. Xác định độ chính xác bằng cách so sánh giá trị tính được với nồng độ thực tương ứng. Yêu cầu trong khoảng nồng độ khảo sát, độ chính xác so với giá trị thực của các nồng độ phải nằm trong khoảng từ 85% - 115%. Tại điểm có nồng độ nhỏ nhất của đường chuẩn (điểm LLOQ), độ chính xác được phép từ 80% đến 120%. Có ít nhất 75% số điểm trong dãy đường chuẩn đạt được tiêu chuẩn trên. Khoảng tuyến tính có hệ số tương quan $r \geq 0,95$.

Xác định giới hạn định lượng dưới (LLOQ):

Giới hạn định lượng dưới là nồng độ thấp nhất trên đường chuẩn, phản ánh độ nhạy và độ chụm của phương pháp.

Tiến hành xử lý 6 mẫu huyết tương trắng có pha chuẩn BBR ở nồng độ 0,2 ng/ml và IS. Chuẩn bị đường chuẩn trong cùng điều kiện. Phân tích các mẫu bằng phương pháp LC-MS/MS theo quy trình. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng pic. Tiến hành lặp lại trong 3 ngày liên tiếp. Xác định lại nồng độ của các mẫu khảo sát từ phương trình hồi quy đường chuẩn. Tính độ chính xác bằng cách so sánh nồng độ tính được với nồng độ thực. Tính độ chụm của mẫu LLOQ bằng cách tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD) hay hệ số tương quan (CV) giữa các mẫu. Nồng độ khảo sát được chấp nhận là LLOQ khi thỏa mãn các điều kiện sau: Tại thời điểm trùng với thời gian lưu của BBR, đáp ứng pic trung bình của mẫu LLOQ (signal) phải gấp ít nhất 5 lần đáp ứng pic của mẫu trắng có thêm IS (noise) ($S/N > 5$). Độ chính xác trung bình của từng ngày và của 3 ngày phải đạt từ 80% - 120% so với nồng độ lý thuyết. Độ chụm từng ngày và của 3 ngày phải $\leq 20\%$.

Xác định độ chính xác, độ lặp lại trong ngày và khác ngày:

Đánh giá độ chính xác, độ lặp lại trong ngày và khác ngày ở 4 mức nồng độ: LLOQ (0,2 ng/ml), LQC (0,6 ng/ml), MQC (10 ng/ml) và HQC (18 ng/ml). Chuẩn bị đường chuẩn và 4 lô mẫu huyết tương, mỗi lô gồm 6 mẫu độc lập chứa các mẫu QCs và LLOQ. Trong cùng một ngày, tiến hành xử lý và phân tích sắc ký các mẫu QC và LLOQ song song với đường chuẩn bằng phương pháp LC-MS/MS. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng pic. Xác định nồng độ, độ chính xác và độ chụm của các mẫu QC và

LLOQ. Tiến hành lặp lại trong 3 ngày liên tiếp. Yêu cầu với mỗi mức nồng độ QC, độ chính xác trung bình phải nằm trong khoảng từ 85% - 115% so với nồng độ thực, độ lặp lại có độ lệch chuẩn tương đối hay hệ số biến thiên $CV \leq 15\%$. Riêng mẫu nồng độ LLOQ, độ chính xác trong khoảng 80%-120% và $CV \leq 20\%$.

Độ chụm khi pha loãng:

Chuẩn bị 06 mẫu pha loãng để khảo sát độ đúng, độ chính xác của phương pháp khi pha loãng như trình bày ở phần “chuẩn bị mẫu pha loãng”. Tiến hành pha loãng mẫu 5 lần trong huyết tương. Chuẩn bị 01 đường chuẩn trong cùng điều kiện, xử lý các mẫu gồm mẫu pha loãng, các mẫu QC trong huyết tương và phân tích bằng phương pháp LC-MS/MS. Tính nồng độ, độ chính xác và độ chụm của các mẫu pha loãng theo đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Yêu cầu độ chính xác trung bình của mẫu pha loãng phải nằm trong khoảng từ 85% đến 115% so với nồng độ thực đã pha. Độ chụm giữa các nồng độ của mẫu pha loãng có giá trị $CV \leq 15\%$.

Tỉ lệ thu hồi:

Tiến hành xử lý các lô mẫu huyết tương chứa BBR ở 03 mức nồng độ LQC, MQC, và HQC bằng phương pháp kết tủa protein với dung môi acetonitril, mỗi lô gồm 06 mẫu độc lập. Phân tích theo quy trình bằng phương pháp LC-MS/MS, ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng pic. Song song tiến hành xử lý các lô mẫu pha trong nền mẫu sau xử lý và có nồng độ tương ứng với nồng độ các mẫu QC, mỗi lô gồm 06 mẫu độc lập. Phân tích định lượng trực tiếp các mẫu trên không qua chiết tách trong cùng điều kiện với các mẫu có qua chiết tách. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng pic. Xác định tỉ lệ thu hồi của BBR và IS bằng cách so sánh kết quả đáp ứng pic của BBR và chuẩn nội trong các mẫu QC pha trong huyết tương (có qua chiết tách) với đáp ứng pic của các mẫu tương ứng pha trong nền mẫu (không qua chiết tách). Yêu cầu tỉ lệ thu hồi giữa các nồng độ không khác nhau quá $\pm 15\%$. Giá trị CV% giữa các đáp ứng pic của BBR và IS trong các mẫu không qua chiết tách ở mỗi nồng độ phải không quá 10%. Giá trị CV% giữa các đáp ứng pic của BBR và IS trong các mẫu QC có qua chiết tách ở mỗi nồng độ phải không quá 15%.

Ảnh hưởng của nền mẫu:

Tiến hành xử lý 06 mẫu huyết tương trắng có nguồn gốc khác nhau theo phương

pháp kết tủa protein với dung môi acetonitril để thu được các dung dịch nền mẫu tương ứng. Pha mẫu chuẩn có chứa IS và BBR ở 2 nồng độ LQC và HQC trong từng dung dịch nền mẫu trên. Song song chuẩn bị 06 mẫu chuẩn trong pha động có chứa IS và BBR ở 2 nồng độ LQC và HQC. Tiến hành phân tích LC-MS/MS các mẫu trên, xác định diện tích pic BBR và IS của các mẫu pha trong dung dịch nền mẫu và pha động. Đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu dựa trên tỉ số MF_{BBR}/MF_{IS} . Trong đó, MF_{BBR} và MF_{IS} lần lượt là tỉ số giữa diện tích pic của BBR và IS trong dung dịch nền mẫu với giá trị trung bình pic của BBR và IS trong pha động có nồng độ tương đương. Yêu cầu ở mỗi mức nồng độ, tỉ số MF_{BBR}/MF_{IS} có giá trị $CV \leq 15\%$.

Độ ổn định:

Mẫu được nghiên cứu độ ổn định bằng cách so sánh nồng độ BBR và IS trong mẫu sau bảo quản với nồng độ tại thời điểm ban đầu. Tiến hành đánh giá độ ổn định của các dung dịch chuẩn gốc BBR và IS trong thời gian dài (27 ngày đối với BBR, 13 ngày đối với IS) bảo quản ở nhiệt độ $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$, và trong thời gian ngắn (3,5 giờ) ở nhiệt độ phòng, dung dịch chuẩn nội làm việc trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng. Độ ổn định của BBR trong huyết tương chuột của BBR ở 2 nồng độ LQC và HQC cũng được đánh giá trong các điều kiện phân tích và bảo quản khác nhau: sau 05 chu kỳ đông rã, mẫu huyết tương trong thời gian ngắn (6 giờ) ở nhiệt độ phòng, mẫu huyết tương bảo quản ở $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 52 ngày, mẫu huyết tương sau xử lý bảo quản trong buồng tiêm mẫu (auto-sampler) sau 25 giờ ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Mẫu được coi là ổn định khi phần trăm độ ổn định nằm trong khoảng 85-115% và giá trị CV% giữa các đáp ứng thu được của mỗi mẫu không quá 15%.

$\% \text{ Độ ổn định} = (\text{trung bình đáp ứng mẫu độ ổn định} \times \text{nồng độ mẫu mới pha} \times 100) / (\text{Trung bình đáp ứng mẫu mới pha} \times \text{nồng độ mẫu độ ổn định})$ [8].

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 bằng kính hiển vi điện tử quét (Scanning electron microscope-SEM)

Tiến hành: Bột nguyên liệu được trải trên tấm carbon dính sẵn trên đế kim loại, tiếp theo phủ một lớp platin lên bột để tăng độ dẫn điện. Lắp đế kim loại vào

thanh gắn và đưa vào buồng soi mẫu. Mẫu được chiếu dòng điện từ trường 3kV, và quan sát hình thái dưới kính hiển vi điện tử quét với các độ phóng đại khác nhau.

b. Phương pháp nhiễu xạ tia X (X-ray diffraction-XRD)

Tiến hành: Các mẫu bột nguyên liệu BBR, DSPG, HSPC, NaDC, manitol được trải đều một lớp mỏng lên mặt kính diện tích khoảng 2cm x 2cm. Cho mẫu vào máy đo nhiễu xạ và tiến hành chiếu tia X với bước sóng tia X tới từ bức xạ $K_{\alpha 1}$ của đồng kim loại (Cu) là $\lambda_{Cu} = 1,5405 \text{ \AA}$, góc quét từ 0-120 độ. Tốc độ quét 0,15 độ theta/bậc và 100 giây/bậc.

c. Phương pháp đo phổ hồng ngoại (FTIR)

Tiến hành: Lấy khoảng 2 mg mẫu phân tích đã nghiền mịn, trộn đều với khoảng 300 mg kali bromid (KBr) đã sấy khô, ép thành viên mỏng (đường kính khoảng 10 mm) với áp suất khoảng 800 mPa trong điều kiện chân không rồi đo phổ IR.

d. Phương pháp đo phổ huỳnh quang của berberin

Tiến hành: Pha dung dịch BBR tương ứng với nồng độ khoảng 0,2 mg/ml trong các dung môi khác nhau là nước cất và ethanol 96 %. Tiến hành đo phổ huỳnh quang của BBR ở bước sóng kích thích 343 nm đối với dung dịch BBR trong nước cất và ở bước sóng 350 nm đối với dung dịch BBR trong ethanol 96 %. Ghi nhận các đỉnh cực đại phát quang của nguyên liệu berberin trong các dung môi khác nhau.

e. Phương pháp chụp hình ảnh phát huỳnh quang

Tiến hành: Bột nguyên liệu BBR và các tá dược NaDC, HSPC, DSPG được trải một lớp mỏng lên lam kính, đặt lam và tiến hành chụp ảnh huỳnh quang ở bước sóng 488 nm (kênh bước sóng xanh) trên kính hiển vi điện tử đồng tiêu hay kính hiển vi điện tử quét lase.

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

Tương tác dược chất với tá dược được đánh giá bằng cách phối hợp dược chất BBR với tá dược gồm HSPC, DSPG, NaDC, vitamin E, manitol với các tỉ lệ khác nhau. Các nguyên liệu HSPC, DSPG, NaDC, manitol được rây qua rây 0,25 mm trước khi trộn đều theo nguyên tắc đồng lượng để tạo thành hỗn hợp vật lý rồi cho vào ống Eppendorf, đậy nắp kín và bảo quản ở nhiệt độ $40 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm $75 \pm 5\%$, đánh giá

hình thức bên ngoài và hàm lượng BBR trong mẫu trước và sau khi lưu ở điều kiện trên bằng phương pháp HPLC như trình bày ở mục 2.3.1.2.

2.3.3. Phương pháp bào chế liposome berberin

2.3.3.1. Phương pháp tiêm ethanol

Quy trình bào chế liposome bằng phương pháp tiêm ethanol được tiến hành theo phương pháp của Batzi và Korn [25]. BBR và các tá dược HSPC, DSPG, NaDC, α -tocopherol được hòa tan trong 40 ml ethanol tuyệt đối bằng siêu âm, gia nhiệt đến 45°C. Dung dịch thu được tiếp tục được tiêm vào 120 ml nước cất đã làm nóng lên từ 45-65 °C và khuấy từ với tốc độ khuấy 500 vòng/phút trên máy khuấy từ LLG-uniSTIRRER. Tốc độ tiêm 1 ml/phút, sử dụng kim tiêm 27G x 0,5” (NeoJet, Neomedic limited, UK). Sau khi tiêm hết dung dịch tạo liposome, tiếp tục khuấy từ và duy trì nhiệt độ khảo sát 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 và cô đặc hỗn dịch liposome trong máy cất quay áp suất giảm R-300 ở điều kiện khảo sát: nhiệt độ từ 60 – 65 °C, áp suất từ 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

Liposome được bào chế dựa theo phương pháp của Bangham [22]. Dược chất và các tá dược HSPC, DSPG, NaDC, α -tocopherol được hòa tan trong 40 ml hỗn hợp dung môi methanol và cloroform với tỉ lệ 2,5:1 (tt/tt) với qui mô mẻ như trình bày ở phụ lục 3.2. Dung dịch thu được cho vào bình cầu dung tích 1 lít, thêm 3g bi thủy tinh rồi đem cất quay ở điều kiện khảo sát: nhiệt độ từ 41 - 55 °C; áp suất giảm trong khoảng từ 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. Lớp film tạo thành được hydrat hóa bằng 60 ml nước cất ở nhiệt độ 65 °C, tốc độ quay của bình cầu 200 vòng/phút, thời gian 60 phút. Hỗn dịch liposome tạo thành tiếp tục làm giảm kích thước tiểu phân bằng phương pháp đùn từ 20-60 lần qua màng

polycarbonat có kích thước lỗ lọc 400 nm [92]. Liposome sau khi làm giảm kích thước tiểu phân được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 – 8 °C cho các phân tích tiếp theo.

2.3.4. Phương pháp bào chế proliposome berberin

Proliposome BBR được bào chế theo phương pháp cải tiến từ phương pháp bao hạt [55]. Thành phần tạo liposome gồm BBR, HSPC, DSPG, NaDC và α -tocopherol như mô tả ở bảng 2.4 được hòa tan trong hỗn hợp dung môi methanol và cloroform với tỉ lệ 2,5:1 (tt/tt). 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.

Bảng 2.4. Thành phần tạo film trên chất mang manitol dùng trong khảo sát ban đầu

Thành phần tạo film	Tỉ lệ mol	Số mmol	Khối lượng cho 1 mẻ (g)
Berberin	8	6	2,058
α -tocopherol	2	1,5	0,648
NaDC	2	1,5	0,624
HSPC	3,6	2,7	2,118
DSPG	5,4	4,05	3,156

2.3.5. Phương pháp đánh giá một số đặc tính của liposome BBR

2.3.5.1. Đánh giá hình thái và cấu trúc

Hình thái của liposome BBR được quan sát bằng sử dụng hai loại kính hiển vi: kính hiển vi điện tử đông lạnh (cryo-EM) và kính hiển vi huỳnh quang.

Với kỹ thuật dùng cryo-EM, hỗn dịch liposome BBR được thủy tinh hóa bằng cách hút 3 μ l hỗn dịch, phun lên đĩa lưới Quantifoil R1.2/1.3 (đã được phủ carbon) và làm đông lạnh đĩa chứa mẫu bằng ni-tơ lỏng trong thiết bị thủy tinh hóa mẫu Leica EMGP (Leica Microsystem GmbH, Đức). Mẫu sau đó được quan sát dưới kính hiển vi điện tử FEI Talos Arctica với dòng điện từ trường 200 kV. Hình ảnh được ghi lại với độ phóng đại 150.000 lần, độ phân giải 0,97 Å/pixel với 3 camera FEI Falcon.

Với kỹ thuật dùng kính hiển vi điện tử huỳnh quang 2 photon, ứng dụng tính chất vật lý của BBR có thể phát quang ở khoảng bước sóng từ 470 - 670 khi kích ở

bước sóng 350 nm [47], hỗn dịch liposome BBR được nhỏ vào đĩa thủy tinh có đáy, hình ảnh và kích thước liposome được ghi lại bằng 2 phương pháp như sau: (1) chiếu chùm tia lase argon kích ở bước sóng 488 nm, và thu tín hiệu ở bước sóng 500 – 570 nm; (2) nguồn ánh sáng (picoEmerald, APE, Berlin, Germany) được chuyển sang dải bước sóng từ 800 - 820 nm và huỳnh quang phát ra từ BBR trong liposome được ghi lại ở bước sóng từ 400 – 500 nm.

2.3.5.2. Đánh giá kích thước và phân bố kích thước tiểu phân liposome

Phương pháp tán xạ ánh sáng động:

Tiến hành: Pha loãng mẫu với số lần thích hợp rồi cho khoảng 1 ml hỗn dịch mẫu vào cốc đo sạch, khô và tiến hành đo với góc tán xạ 90°, hệ số tán xạ của 1,58.

Phương pháp phân tích vết hạt:

Tiến hành: Pha loãng mẫu đến nồng độ thích hợp rồi tiêm vào buồng mẫu của thiết bị phân tích vết hạt ZetaView® NTA. Đo mẫu theo chương trình cài đặt, đồng thời ghi lại hình ảnh của chuyển động của các tiểu phân riêng lẻ.

2.3.5.3. Đánh giá hiệu suất liposome hóa

Hút chính xác 1,0 ml hỗn dịch liposome BBR, cho vào ống siêu ly tâm (MW 30.000 dalton, Merck, Đức) rồi cho vào máy ly tâm với tốc độ 4.000 vòng/phút trong 30 phút. Dịch ly tâm dưới màng lọc được cho vào bình định mức 10 ml và bổ sung thể tích vừa đủ 10ml bằng ethanol 96 %. Lắc đều và đo phổ hấp thụ UV-Vis ở bước sóng 350 nm. Nồng độ BBR tự do ($C_{\text{tự do}}$) trong dịch ly tâm được tính theo phương trình đường chuẩn xây dựng trong cùng ngày phân tích theo phương pháp đã ở mục 2.3.1.1. Nếu nồng độ dược chất tự do thấp dưới khoảng tuyến tính, nồng độ dược chất nạp trong liposome được xác định thay thế dược chất tự do bằng phương pháp sau. Phá vỡ liposome BBR trên màng siêu lọc bằng dung môi methanol và cho vào bình định mức 10ml. Dùng methanol để rửa sạch màng lọc rồi gộp dịch rửa vào bình định mức. Thêm dung môi ethanol 96% vừa đủ thể tích. Tiến hành đo phổ để xác định nồng độ dược chất nạp trong liposome ($C_{\text{liposome hóa}}$).

Để định lượng hàm lượng dược chất toàn phần có trong liposome ($C_{\text{toàn phần}}$), hút chính xác 1,0 ml hỗn dịch liposome khác cho vào bình định mức dung tích 10ml. Thêm ethanol 96 % cho đến vạch, hòa tan bằng siêu âm để phá vỡ liposome và hòa

tan BBR hoàn toàn. Dung dịch được pha loãng với số lần thích hợp để đo phổ hấp thụ UV-Vis ở bước sóng 350 nm. Tính nồng độ BBR toàn phần, sử dụng phương trình đường chuẩn. Mẫu trắng được chuẩn bị là liposome trắng (thành phần giống như liposome BBR nhưng không chứa được chất) được hòa tan trong ethanol 96 % và pha loãng như ở phần định lượng $C_{\text{toàn phần}}$. Hiệu suất nạp BBR vào liposome được tính theo công thức (Eq.1) nếu mẫu có nồng độ được chất tự do nằm trong khoảng tuyến tính. Nếu nồng độ được chất tự do nằm dưới khoảng tuyến tính, hiệu suất nạp được chất được tính theo công thức (Eq.2).

$$EE (\%) = \frac{(C_{\text{toàn phần}} - C_{\text{tự do}}) \times 100}{C_{\text{toàn phần}}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Hoặc

$$EE (\%) = \frac{C_{\text{liposome hóa}} \times 100}{C_{\text{toàn phần}}} \quad (\text{Eq. 2})$$

2.3.5.4. Đánh giá khả năng giải phóng được chất in vitro

Khả năng giải phóng được chất của liposome BBR được tiến hành bằng sử dụng thiết bị thử độ hòa tan Erweka kiểu cánh khuấy, theo nguyên tắc động học thẩm tích, sử dụng túi thẩm tích màng cellulose (MW cut-off = 14.000 dalton). Túi đã được ngâm 12 giờ trong môi trường thử giải phóng để làm ướt và thông các lỗ màng [110]. Môi trường thử giải phóng mô phỏng sự thay đổi môi trường pH trong đường tiêu hóa, bao gồm dung dịch HCl 0,1N, dung dịch đệm phosphat pH 4,5 và môi trường đệm phosphat pH 6,8. Hút 6,0 ml hỗn dịch liposome BBR (tương đương 3,0 mg BBR toàn phần) cho vào túi thẩm tích, thêm 4,0 ml môi trường giải phóng, buộc chặt túi. Treo túi thẩm tích chứa mẫu vào cánh khuấy của máy thử độ hòa tan Erweka. Song song, mẫu đối chiếu là 6,0 ml dung dịch BBR nồng độ 0,5 mg/ml được làm tương tự như mẫu thử. Cho vào mỗi cốc của máy thử hòa tan 300 ml môi trường thử giải phóng, nhiệt độ 37 °C, tốc độ cánh khuấy 50 vòng/phút. Lấy mẫu (5ml) tại các thời điểm 15 phút, 30 phút, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 và 24 giờ. Bù thể tích bằng môi trường mới tương ứng. Định lượng BBR giải phóng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis. Tốc độ giải phóng được chất được tính bằng công thức sau (Eq. 3)

$$RR (\%) = \frac{c_n \times V_m + \sum_{i=1}^{i=n-1} c_i \times V}{W_{total}} \times 100 \% \quad (\text{Eq. 3})$$

Trong đó: V_m là thể tích môi trường giải phóng (300 ml), V là thể tích môi trường giải phóng được rút ra tại mỗi thời điểm (5ml), n là số mẫu được rút khỏi môi trường giải phóng, C_i là nồng độ dược chất trong môi trường giải phóng tại thời điểm rút mẫu thứ i , W_{total} là tổng lượng BBR có trong mẫu.

Kết quả về tốc độ giải phóng dược chất được tính bằng trung bình của 3 lần thử.

2.3.5.5. Đánh giá trạng thái lý hóa của liposome BBR

Trạng thái lý hóa của liposome BBR được đánh giá bằng phép đo nhiễu xạ tia X và phổ hồng ngoại FTIR [16]. Để thực hiện các phép đo này, hỗn dịch liposome BBR được chuyển thành dạng bột khô.

Mẫu hỗn dịch liposome BBR được làm khô bằng cách sấy trong tủ sấy áp suất giảm ở nhiệt độ 40 °C trong vòng 48 giờ, áp suất – 0,09 mPa. Liposome BBR dạng bột khô được đóng trong lọ thủy tinh đầy nắp kín để thực hiện các phép đo nhiễu xạ tia X và FTIR. Quy trình thực hiện như mục 2.3.2.1 b và 2.3.2.1 d.

2.3.6. Phương pháp đánh giá một số đặc tính của proliposome BBR

2.3.6.1. Đánh giá hình thái và kích thước của proliposome BBR

Hình thái và kích thước của proliposome BBR được đánh giá bằng phương pháp chụp SEM [68]. Kỹ thuật thực hiện như trình bày ở mục 2.3.2.1 a.

2.3.6.2. Đánh giá trạng thái lý hóa của proliposome BBR

Trạng thái lý hóa của proliposome BBR được đánh giá theo phương pháp tương tự như đánh giá trạng thái lý hóa của liposome BBR mục 2.3.5.5. Tuy nhiên, proliposome BBR ở dạng hạt khô nên không cần thực hiện bước sấy khô giống như liposome.

2.3.6.3. Đánh giá hình thái và kích thước của liposome berberin được tạo thành từ proliposome berberin

a. Hydrat hóa proliposome berberin để tạo liposome berberin

Để đánh giá hình thái của liposome BBR tạo thành từ proliposome BBR, proliposome BBR được hydrat hóa trong nước cất ở 37 ± 1 °C, siêu âm trong thời gian 5 phút, tiếp tục ủ hỗn dịch thu được ở nhiệt độ 37 ± 1 °C trong bể giữ nhiệt trong

khoảng thời gian từ 5-20 phút (tùy công thức) cho đến khi proliposome BBR được hydrat hóa hoàn toàn tạo thành hỗn dịch đục mờ [69].

b. Đánh giá hình thái, kích thước của liposome berberin tạo thành

Hỗn dịch liposome BBR thu được đem chụp hình thái và kích thước tiểu phân bằng sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Hỗn dịch được nhỏ lên lưới 300 ô đã được phủ một lớp carbon mỏng. Sau đó, mẫu được nhuộm bằng dung dịch uranyl acetat 1% trong 5 phút. Dùng giấy thấm đặt cạnh mép lưới để thấm chất nhuộm thừa. Để mẫu khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng rồi đem quan sát hình thái và đo kích thước liposome dưới kính hiển vi điện tử truyền qua [122].

Kích thước và phân bố kích thước của liposome BBR tạo thành từ proliposome cũng được đánh giá bằng phương pháp DLS giống như trình bày ở mục 2.3.5.2.

2.3.6.4. Xác định mất khối lượng do làm khô của proliposome BBR

Phép thử được thực hiện theo Dược điển Việt Nam V, phụ lục 9.6, “xác định mất khối lượng do làm khô” [2], có thay đổi cho phù hợp với thiết bị sử dụng là tủ sấy tĩnh. Lượng mẫu proliposome BBR 1,0g, nhiệt độ sấy 80 °C. Sau 30 phút sấy, tiến hành lấy mẫu làm nguội đến nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm rồi cân ngay. Tiếp tục sấy thêm 10 phút hoặc đến khi chênh lệch khối lượng giữa lần cân sau với lần trước đó không quá 0,5mg.

Mất khối lượng do làm khô được tính theo công thức:

$$H (\%) = \frac{a-b}{a} \times 100$$

Trong đó: a là khối lượng mẫu trước khi sấy

b là khối lượng mẫu sau khi sấy

Kết quả được xác định là trung bình của 3 lần đo

2.3.6.5. Định lượng hàm lượng berberin trong proliposome BBR

Hàm lượng BBR trong proliposome BBR được định lượng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis hoặc phương pháp HPLC [24], [69].

Phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis:

Cân chính xác một lượng proliposome BBR tương ứng với 10,0 mg BBR, cho vào bình định mức 10 ml. Cho methanol vào gần đến vạch, siêu âm trong bể siêu âm

15 phút, thêm methanol đến vạch. Các thành phần tạo liposome sẽ hòa tan trong methanol. Chất mang manitol không tan lắng xuống đáy. Dịch trong được lọc qua màng lọc 0,45 µm. Hút chính xác 2 ml dịch lọc, cho vào bình định mức 100 ml, thêm ethanol 96%. Các bước tiếp theo tiến hành như mục 2.3.1.1 của dung dịch chuẩn. Hàm lượng BBR trong proliposome được tính theo phương trình đường chuẩn. Mỗi mẫu thử thực hiện 3 lần và tính kết quả trung bình.

Phương pháp HPLC:

Chuẩn bị dung môi, mẫu trắng, dãy dung dịch xây dựng đường chuẩn, dung dịch thử và tiến hành chạy sắc ký theo mục 2.3.1.2. Hàm lượng BBR trong proliposome BBR được tính theo phương trình hồi quy tuyến tính mô tả mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ BBR như đã xây dựng ở mục 2.3.1.2. Mẫu thử được tiêm 3 lần và lấy kết quả trung bình.

2.3.6.6. Đánh giá hiệu suất quá trình bào chế

Hiệu suất quá trình là phần trăm về tỉ lệ giữa khối lượng BBR chứa trong proliposome BBR thu được với khối lượng BBR ban đầu. Hiệu suất quá trình được tính theo công thức:

$$H\% = \frac{m_{BBR/sp}}{m_{BBRbd}} \times 100\%$$

Trong đó: $m_{BBR/sp}$ là khối lượng BBR chứa trong khối lượng sản phẩm thu được (g)

m_{BBRbd} là khối lượng BBR ban đầu (g)

2.3.6.7. Đánh giá hiệu suất liposome hóa của liposome BBR tạo thành

Proliposome BBR được hydrat hóa như ở mục 2.3.6.3a. Hiệu suất liposome hóa của liposome BBR tạo thành được đánh giá theo phương pháp ở mục 2.3.5.3.

2.3.6.8. Xác định khối lượng riêng biểu kiến

Khối lượng riêng biểu kiến của proliposome BBR được thử theo Dược điển Việt Nam V, phụ lục 6.13 “Xác định khối lượng riêng thô và khối lượng riêng gô của bột” [2]. Thiết bị sử dụng máy đo thể tích biểu kiến của hạt/bột Erweka SVM. Thực hiện gô lặp lại cho đến khi sự thay đổi thể tích giữa hai lần đo liên tiếp không quá 2%.

Tính khối lượng riêng gô ra g/ml theo công thức $d = m/V_f$ với V_f là thể tích

của lần đo cuối cùng (ml), d là khối lượng riêng gỗ (biểu kiến), m là khối lượng proliposome BBR đem đo (g). Phép thử thực hiện 3 lần và lấy kết quả trung bình.

2.3.6.9. Phương pháp đánh giá khả năng hydrat hóa của proliposome BBR

Phương pháp dựa trên nghiên cứu của Janga 2012 [68], nhưng cải tiến để quan sát tốt hơn quá trình hydrat hóa. Chuẩn bị khay có 4 giếng có nắp đậy, cho vào mỗi giếng 1ml môi trường thử hydrat hóa gồm dung dịch HCl 0,1N (pH 1,2), dung dịch đệm phosphat pH 4,5 và dung dịch đệm phosphat pH 6,8. Cho khay vào đĩa petri đã chứa sẵn nước làm ấm lên 40 - 43°C bằng dòng điện với hiệu điện thế 8,6 vôn, cường độ dòng điện 2,01 ampe. Dùng thìa inox nhỏ rắc ít hơn 10 tiểu phân proliposome BBR vào mỗi giếng và quan sát hình thái proliposome dưới kính hiển vi điện tử quét lase.

2.3.6.10. Phương pháp đánh giá khả năng giải phóng dược chất in vitro

Cân chính xác một lượng proliposome BBR chứa khoảng 3 mg BBR, cho vào lọ thủy tinh 10 ml, thêm 5 ml môi trường giải phóng, lắc nhẹ để proliposome phân tán trong môi trường rồi ngay lập tức đổ hỗn dịch vào túi thẩm tích đã ngâm 12 giờ trong môi trường giải phóng để làm thông các lỗ lọc. Tráng sạch lọ bằng 5 ml môi trường rồi buộc túi thẩm tích vào cánh khuấy của máy thử độ hòa tan. Cho 300 ml môi trường hòa tan vào cốc thử tương ứng với môi trường đã cho vào túi thẩm tích và thực hiện các bước tiếp theo như phương pháp đã trình bày ở mục 2.3.5.4.

Phần trăm giải phóng được tính theo công thức

$$RR (\%) = \frac{C_n \times 300 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 5}{W_{total}} \times 100$$

Trong đó C_n và C_i lần lượt là nồng độ của BBR trong môi trường giải phóng ở thời điểm lấy mẫu thứ n và thứ i. W_{total} là lượng BBR có trong mẫu proliposome đem thử giải phóng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và tính kết quả trung bình.

2.3.6.11. Phương pháp nghiên cứu độ ổn định của proliposome BBR

Độ ổn định của proliposome BBR được đánh giá dựa theo quy định của ASEAN về điều kiện bảo quản chung [20].

- Đối tượng thử: 03 mẻ proliposome BBR, đóng vào túi nhôm hàn kín.
- Điều kiện bảo quản và thời điểm kiểm tra: Các mẫu proliposome BBR được

theo dõi trong các điều kiện thực (phòng thí nghiệm) và điều kiện lão hóa cấp tốc như trình bày ở bảng 2.5.

Bảng 2.5. Điều kiện bảo quản và thời điểm lấy mẫu trong nghiên cứu theo dõi độ ổn định

Điều kiện bảo quản	Nhiệt độ (°C)	Độ ẩm tương đối (%)	Thời điểm kiểm tra
Điều kiện thực	25-30	60-90	0, 1, 3, 6 tháng
Lão hóa cấp tốc	40 ± 2	75 ± 5	0, 1, 3, 6 tháng

Sau khoảng thời gian 0, 1, 3, 6 tháng theo dõi, mẫu proliposome BBR đóng trong túi nhôm hàn kín được lấy ra và đánh giá một số chỉ tiêu chính: hình thức cảm quan, hình thái tiểu phân, trạng thái lý hóa (Xray, FTIR), độ ẩm, hàm lượng, giải phóng dược chất, kích thước và phân bố kích thước tiểu phân của liposome sau hoàn nguyên, hiệu suất liposome hóa.

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

Nghiên cứu được thực hiện dựa trên phương pháp gần đây nhất của Gong 2014 và Jia 2019 [54], [69], có thay đổi cho phù hợp với thiết kế nghiên cứu. Chuột cống giống đực trưởng thành khỏe mạnh, khối lượng từ 170 g - 240 g, được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm, mỗi nhóm 7 động vật. Chuột được nhịn ăn qua đêm trước ngày nghiên cứu, nhưng được uống nước tự do. Chuột ở nhóm thứ nhất (nhóm chứng) được cho uống hỗn dịch BBR pha trong dung dịch NaCMC 0,5% (nồng độ BBR 10 mg/ml) với liều BBR 100 mg/kg cân nặng. Chuột ở nhóm thứ 2 được cho uống liposome BBR tạo thành từ proliposome (theo phương pháp ở mục 2.3.6.3a để được liposome có nồng độ BBR 10 mg/ml) tương đương với liều BBR 100 mg/kg. Sau khi được uống mẫu thử, chuột được lấy máu (0,25 ml) từ tĩnh mạch đuôi tại các 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 với thể tích bằng thể tích máu được rút ra để bổ sung thể tích tuần hoàn. Mẫu máu được cho vào ống Eppendorf 2 ml đã chứa sẵn heparin (20 IU/ống), ly tâm với tốc độ 3500 vòng/phút trong 15 phút. Phần dịch nổi (huyết tương) được chuyển sang ống Eppendorf khác và bảo quản huyết tương ở tủ âm sâu -35 °C cho đến ngày phân tích. Song song, các mẫu huyết tương trắng của lô chuột cống trắng (lô trắng) được thu thập và bảo quản theo quy trình tương tự mẫu thử. Nồng độ BBR trong huyết tương được định lượng bằng phương

pháp sắc ký lỏng kết hợp khối phổ (LC-MS/MS) đã được thẩm định ở mục 2.3.1.3.

Các thông số đánh giá bao gồm: Nồng độ đỉnh trong huyết tương (C_{max}), thời gian đạt nồng độ đỉnh trong huyết tương (T_{max}), diện tích dưới đường cong từ thời điểm 0 đến thời điểm t (AUC_{0-t}), diện tích dưới đường cong từ thời điểm 0 đến thời điểm vô cùng ($AUC_{0-\infty}$), thời gian lưu trú trung bình từ thời điểm 0 đến thời điểm t (MRT_{0-t}), thời gian lưu trú trung bình từ thời điểm 0 đến thời điểm vô cùng ($MRT_{0-\infty}$).

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

Phương pháp nghiên cứu dựa trên tham khảo các kết quả nghiên cứu trước [5], [87], [104]. Chuột nhắt trắng giống đực trưởng thành khỏe mạnh, khối lượng từ 20 - 28 g được chia ngẫu nhiên thành 6 nhóm, mỗi nhóm từ 8-9 động vật. Trong thời gian 10 ngày, chuột mỗi ngày được cho uống như sau:

Nhóm 1 (nhóm chứng sinh lý) và nhóm 2 (nhóm chứng bệnh lý), chuột được cho uống nước cất với thể tích bằng thể tích nhóm uống thuốc. Nhóm 3 (nhóm chứng dương), chuột được cho uống atorvastatin với liều 20 mg/kg cân nặng (mẫu được chuẩn bị như sau: nghiền mịn 1 viên Lipitor 20mg, phân tán bột vào 10 ml dung dịch NaCMC 0,5% trong nước. Lắc siêu âm để được chất phân tán đều, thu được hỗn dịch có nồng độ atorvastatin 2 mg/ml). Nhóm 4 (nhóm đối chiếu), chuột được cho uống hỗn dịch BBR với liều 100 mg/kg cân nặng. Nhóm 5 (nhóm thử 1), chuột được cho uống liposome BBR tạo thành từ proliposome BBR (theo phương pháp ở mục 2.3.6.3a để được liposome có nồng độ BBR 10 mg/ml) với liều BBR 50 mg/kg cân nặng. Nhóm 6 (nhóm thử 2), chuột được cho uống liposome BBR với liều BBR 100 mg/kg cân nặng. 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 poloxamer 407 2% trong nước muối sinh lý với liều 200 mg/kg cân nặng để làm tăng lipid máu nội sinh. Chuột sau khi tiêm được nhịn đói trong vòng 24 giờ rồi được lấy máu tĩnh mạch xoang mắt (0,25 ml) cho vào ống Eppendorf 2ml. Máu được để lắng 30 phút rồi đem ly tâm ở 3500 vòng/phút trong 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.

Nồng độ cholesterol toàn phần (TC), cholesterol tỉ trọng thấp (LDL-C), cholesterol tỉ trọng cao (HDL-C) và triglycerid (TG) được định lượng bằng sử dụng bộ kit enzyme (ERBA Diagnostics Inc., Miami, Florida, USA) trên thiết bị phân tích hóa sinh bán tự động TC-3300 Plus.

2.3.9. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu dược động học được phân tích bằng phần mềm Phoenix WinNolin (Version 8.3, Cerata[®] Inc., Clayton, Missouri, USA), sử dụng mô hình không ngăn để tính toán các thông số dược động học như C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, MRT_{0-t} , $MRT_{0-\infty}$. Các giá trị C_{max} , T_{max} , AUC, 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.

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

Để có cơ sở cho việc đánh giá các nồng độ/hàm lượng berberin trong từng giai đoạn của quá trình nghiên cứu bào chế, đề tài tiến hành khảo sát và thẩm định khoảng nồng độ tuyến tính của phương pháp định lượng berberin bằng UV-Vis, thẩm định phương pháp HPLC và thẩm định phương pháp định lượng berberin trong huyết tương chuột bằng phương pháp LC-MS/MS.

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

3.1.1.1. Phổ hấp thụ UV-Vis của berberin

Quét phổ dung dịch BBR chuẩn có nồng độ 5 µg/ml trong ethanol 96 % từ bước sóng 200 đến 400 nm cho 2 đỉnh hấp thụ cực đại chính tại bước sóng 266 nm và 350 nm (phụ lục 1.1a). Vì vậy, bước sóng 350 nm được chọn để xác định hàm lượng BBR trong các mẫu nghiên cứu khi sử dụng dung môi ethanol 96 % bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis. Tuy nhiên, đỉnh hấp thụ cực đại này bị dịch chuyển sang 343 nm khi sử dụng dung môi nước cất để pha mẫu (phụ lục 1.1a). Do đó, khi xác định hàm lượng BBR trong dung môi pha loãng là nước cất, độ hấp thụ cực đại sẽ được xác định tại bước sóng 343 nm.

3.1.1.2. Tính tuyến tính

Chuẩn bị dãy dung dịch BBR chuẩn theo phương pháp trình bày ở mục 2.3.1.1. Đo độ hấp thụ của các dung dịch trên tại bước sóng 350 nm trong dung môi ethanol 96 % và 343nm trong dung môi nước. Kết quả được trình bày ở phụ lục 1.1b (dung môi ethanol 96 %), phụ lục 1.1c (dung môi nước). Kết quả này cho thấy có sự phụ thuộc tuyến tính giữa độ hấp thụ và nồng độ BBR trong khoảng nồng độ đã khảo sát với hệ số tương quan $r = 0,995 (>0,99)$ trong cả hai môi trường ethanol 96 % và môi trường nước. Như vậy, có thể sử dụng phương pháp quang phổ UV-Vis để định lượng BBR trong nghiên cứu bào chế.

3.1.2. Thẩm định phương pháp định lượng berberin bằng HPLC

3.1.2.1. Tính thích hợp của hệ thống

Chuẩn bị dung dịch chuẩn có nồng độ 5 µg/ml, tiêm lặp lại 6 lần như mô tả ở mục 2.3.1.2. Kết quả xác định thời gian lưu, diện tích pic và số đĩa lý thuyết được trình bày ở phụ lục 1.2a.

Kết quả ở phụ lục 1.2a cho thấy phần trăm độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của các giá trị thời gian lưu nhỏ hơn 1% và diện tích pic nhỏ hơn 2%. Số đĩa lý thuyết trung bình $13727 > 1000$. Như vậy, chương trình sắc ký đã chọn phù hợp để định lượng BBR trong các mẫu bào chế.

3.1.2.2. Tính chọn lọc-độ đặc hiệu

Chuẩn bị mẫu chuẩn (5 µg/ml), mẫu thử, mẫu trắng như mục 2.3.1.2. Tiến hành tiêm mẫu vào hệ thống sắc ký theo điều kiện sắc ký đã chọn. Kết quả sắc ký đồ (phụ lục 1.2) cho thấy trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn và mẫu thử đều có 1 pic có thời gian lưu ở thời điểm 3,6 phút. Trên sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic tại thời điểm trùng với thời gian lưu của BBR. Điều đó chứng tỏ pic trên sắc ký đồ là của BBR, phương pháp định lượng có độ đặc hiệu cao.

3.1.2.3. Khoảng tuyến tính

Xác định mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ BBR trong mẫu chuẩn, kết quả được trình bày ở phụ lục 1.2c và phụ lục 1.2d.

Kết quả ở cho thấy có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ BBR trong dung dịch chuẩn trong khoảng nồng độ đã khảo sát với hệ số tương quan $r = 0,9994$

3.2.1.4. Độ chính xác

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn chứa BBR như ở mục 2.3.1.2. Kết quả đánh giá độ chính xác của phương pháp HPLC được trình bày phụ lục 1.2e.

Kết quả cho thấy các mẫu đều có phần trăm tìm lại trong khoảng từ 99,47% đến 101,41%, chứng tỏ phương pháp có độ chính xác cao, có thể sử dụng để xác định hàm lượng BBR trong chế phẩm.

3.1.2.5. Độ chụm

Pha 6 mẫu dung dịch thử chứa proliposome BBR với nồng độ BBR 5 µg/ml và

chạy sắc ký theo phương pháp trình bày ở mục 2.3.1.2. Kết quả đánh giá độ chụm trình bày ở phụ lục 1.2f cho thấy mẫu thử có hàm lượng BBR trung bình là 14,87%, độ lệch chuẩn tương đối $RSD < 2\%$. Phương pháp có độ chụm đạt yêu cầu.

Như vậy, phương pháp HPLC đạt yêu cầu về thẩm định và có thể sử dụng để định 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 sắc ký lỏng kết hợp khối phổ (LC-MS/MS)

3.1.3.1. Tính thích hợp của hệ thống

Tiến hành chạy sắc ký lặp lại 6 lần mẫu huyết tương chứa BBR có nồng độ 15 ng/ml sau khi xử lý theo quy trình ở mục 2.3.1.3. Kết quả đánh giá sự phù hợp của hệ thống trình bày ở phụ lục 1.3a và phụ lục 1.3b cho thấy thời gian lưu (t_R) của các pic BBR và giá trị tỉ lệ diện tích giữa các pic BBR với các pic của chuẩn nội (IS) đều có độ lặp lại tốt ($RSD < 5\%$), chứng tỏ hệ thống LC-MS/MS ổn định và phù hợp để định lượng BBR trong huyết tương chuột theo hướng dẫn của EMA và FDA.

3.1.3.2. Tính chọn lọc - độ đặc hiệu

Chuẩn bị 6 mẫu huyết tương trắng chuột từ 6 nguồn và 6 mẫu chuẩn có chứa IS và BBR ở nồng độ 0,2 ng/ml (LLOQ) trong từng nguồn mẫu huyết tương trắng trên. Tiến hành xử lý mẫu theo quy trình như ở mục 2.3.1.3, phân tích mẫu bằng phương pháp LC-MS/MS. Kết quả được trình bày ở phụ lục 1.4a-c.

Số liệu ở phụ lục 1.4a cho thấy tại thời điểm trùng với thời gian lưu của BBR, đáp ứng pic của từng mẫu trắng không quá 20% đáp ứng pic của mẫu LLOQ tương ứng. Tại thời điểm trùng với thời gian lưu của IS, đáp ứng pic của từng mẫu trắng không quá 5% so với đáp ứng pic trung bình IS của mẫu đường chuẩn và QC. Kết quả phân tích phù hợp với yêu cầu của tính đặc hiệu, chọn lọc của phương pháp về đáp ứng pic. Ngoài ra, phổ ion chọn lọc tạo thành của BBR (m/z 336,1 $\rightarrow$ 320,1) và phổ ion chọn lọc tạo thành của IS (m/z 494,2 $\rightarrow$ 369,1) được thể hiện ở phụ lục 1.4b. Phụ lục 1.4c cho thấy, trên sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic chất lạ một cách có ý nghĩa tại thời gian lưu của ion chọn lọc BBR (0,79 phút) và tại thời gian lưu của ion chọn lọc IS (1,67 phút). Như vậy, phương pháp định lượng có tính đặc

hiệu, chọn lọc đối với BBR.

3.1.3.3. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Tiến hành xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa giá trị tỉ lệ diện tích pic BBR/IS (y) với nồng độ lý thuyết của BBR (x) trong huyết tương chuột bằng phương trình hồi quy tuyến tính, sử dụng hệ số trọng số $1/x^2$ (x là nồng độ chuẩn lý thuyết). Kết quả được trình bày ở phụ lục 1.5 cho thấy rằng trong khoảng nồng độ từ 0,2 ng/ml đến 25 ng/ml có sự tương quan tuyến tính chặt giữa tỉ lệ diện tích pic BBR/IS với nồng độ BBR với $r > 0,998$. Đồng thời, kết quả cũng đáp ứng được yêu cầu của đường chuẩn trong phương pháp phân tích nồng độ thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của EMA và FDA với lớn hơn 75% điểm của đường chuẩn có độ đúng nằm trong khoảng từ 85% - 115% và độ đúng của nồng độ LLOQ nằm trong khoảng 80%-120%.

3.1.3.4. Giới hạn định lượng dưới

Tiến hành phân tích sắc ký 6 mẫu huyết tương trắng có pha chuẩn BBR có nồng độ 0,2 ng/ml (LLOQ) và IS theo phương pháp LC-MS/MS, lặp lại 3 ngày liên tiếp. Xác định nồng độ của BBR trong các mẫu bằng cách sử dụng phương trình đường chuẩn chạy sắc ký trong cùng điều kiện. Kết quả được trình bày ở phụ lục 1.6. Kết quả đánh giá giới hạn định lượng dưới cho thấy giá trị S/N của BBR trong mẫu có nồng độ BBR 0,2 ng/ml đều lớn hơn 5. Độ chính xác của các mẫu ở nồng độ BBR 0,2 ng/ml từng ngày và của 3 ngày đều nằm trong khoảng 80%-120%. Độ lặp lại từng ngày và của 3 ngày (CV%) đều $\leq 20\%$. Theo hướng dẫn của EMA và US-FDA, nồng độ BBR 0,2 ng/ml đáp ứng yêu cầu của giới hạn định lượng dưới trong phương pháp phân tích nồng độ thuốc trong dịch sinh học.

3.1.3.5. Độ chính xác, độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Xác định độ chính xác, độ lặp lại trong ngày và khác ngày theo phương pháp như trình bày ở mục 2.3.1.3. Xác định hàm lượng BBR trong mẫu dựa vào đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ chính xác được xác định bằng tính phần trăm biến thiên về nồng độ giữa nồng độ tính được với nồng độ thực và được biểu thị bằng sai số tương đối (relative error-RE, %). Độ lặp lại được xác định bằng cách tính phần trăm hệ số biến thiên (CV%) giữa các giá trị nồng độ tính được ở mỗi mức nồng

độ. Kết quả được trình bày ở bảng 3.1 và phụ lục 1.7.

Bảng 3.1. Độ chính xác và độ lặp lại của phương pháp LC-MS/MS trong phân tích nồng độ BBR trong huyết tương chuột. Số liệu được phân tích 3 ngày liên tiếp (n= 6)

Nồng độ (ng/ml)		Độ chính xác (RE, %)	Độ lặp lại (CV, %)	
Thực	Trung bình tính		Trong ngày	Khác ngày
0,2 (LLOQ)	0,1963	-1,9	10,3	14,2
0,6 (LQC)	0,620	3,3	5,2	12,6
10,0 (MQC)	10,216	2,2	6,7	8,3
18,0 (HQC)	17,561	-2,4	1,9	4,2

Kết quả cho thấy, độ chính xác của phương pháp nằm trong khoảng từ -2,4% đến 3,3% thuộc giới hạn $\pm 15\%$, độ lặp lại trong ngày và khác ngày đều nhỏ hơn 15%, kể cả nồng độ LLOQ. Như vậy, phương pháp đã xây dựng đạt tiêu chí về độ chính xác, độ lặp lại trong ngày và khác ngày theo hướng dẫn của EMA và FDA.

3.1.3.6. Độ chụm khi pha loãng

Pha loãng 6 mẫu huyết tương chứa BBR ở nồng độ 90 ng/ml (gấp 5 lần nồng độ HQC) theo phương pháp ở mục 2.3.1.3. Song song chuẩn bị 01 đường chuẩn và phân tích trong cùng điều kiện. Kết quả độ chụm khi pha loãng trình bày ở phụ lục 1.8 cho thấy độ chính xác trung bình của các mẫu là 101,1% (RE=1,1%), nằm trong khoảng 85%-115% (RE trong khoảng 15%) so với nồng độ thực đã pha. Độ chụm CV=3,6% (nhỏ hơn 15%). Như vậy, phép pha loãng mẫu 5 lần trong huyết tương đạt yêu cầu về tiêu chí pha loãng theo hướng dẫn của EMA và FDA.

3.1.3.7. Tỷ lệ thu hồi

Kết quả về tỉ lệ thu hồi BBR và chuẩn nội glibenclamid trình bày ở phụ lục 1.9 cho thấy tỉ lệ thu hồi BBR và IS giữa các nồng độ rất cao và không quá $\pm 15\%$, giá trị CV giữa các đáp ứng pic của BBR và IS trong các mẫu trong nền mẫu (không qua chiết tách) từ 1,6 - 7,6% (nhỏ hơn 10%), trong các mẫu trong huyết tương (có qua chiết tách) từ 3,2 – 9,9% (nhỏ hơn 15%). Như vậy, quy trình chiết đạt độ lặp lại cao và ổn định, đáp ứng được yêu cầu của phép phân tích thuốc trong dịch sinh học.

3.1.3.8. Ảnh hưởng của nền mẫu

Phân tích các mẫu chuẩn có chứa IS và BBR ở 2 nồng độ LQC và HQC trong 06 nền mẫu huyết tương chuột và 06 mẫu chuẩn trong pha động theo phương pháp ghi ở mục 2.3.1.3 để đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu lên chất phân tích. Xác định các giá trị MF_{BBR} , MF_{IS} , tỉ số MF_{BBR}/MF_{IS} ở 2 mức nồng độ LQC và HQC. Kết quả được trình bày ở bảng 3.2.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nền mẫu trên BBR và IS ở nồng độ LQC và HQC trên 6 lô huyết tương chuột

Nồng độ (ng/mL)	Lô huyết tương chuột	Ảnh hưởng nền mẫu (%)		Ảnh hưởng nền mẫu chuẩn hóa (MF_{BBR}/MF_{IS})
		BBR	IS	
0,6 (LQC)	Nº. 1	56,7	78,1	0,725
	Nº. 2	67,2	81,1	0,829
	Nº. 3	73,9	95,2	0,776
	Nº. 4	68,0	99,0	0,687
	Nº. 5	64,5	93,9	0,687
	Nº. 6	59,4	83,6	0,711
	Trung bình	65,0	88,5	0,736
	CV (%)	9,6	9,7	7,7
18,0 (HQC)	Nº. 1	69,2	83,2	0,831
	Nº. 2	67,8	83,2	0,815
	Nº. 3	66,8	89,4	0,747
	Nº. 4	66,8	88,1	0,759
	Nº. 5	64,1	81,8	0,784
	Nº. 6	66,6	86,2	0,772
	Trung bình	66,9	85,3	0,785
	CV (%)	2,5	3,6	4,2

Kết quả cho thấy ảnh hưởng nền mẫu đã chuẩn hóa ở nồng độ 0,6 ng/ml có CV = 7,7% và ở nồng độ 18 ng/ml có CV = 4,2% (đều nhỏ hơn 15%), chứng tỏ nền mẫu không làm giảm hiệu quả của phương pháp phân tích và đáp ứng được tiêu chuẩn của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

3.1.3.9. Độ ổn định

Độ ổn định của BBR trong huyết tương chuột trong quá trình phân tích và bảo

quản được nghiên cứu theo phương pháp như mô tả ở mục 2.3.1.3.

Độ ổn định của dung dịch chuẩn gốc:

Độ ổn định của dung dịch chuẩn gốc BBR có nồng độ khoảng 500 µg/ml trong thời gian dài (27 ngày), dung dịch glibenclamid gốc (chuẩn nội) có nồng độ khoảng 250 µg/ml trong thời gian dài (13 ngày) ở điều kiện 2 - 8 °C, dung dịch chuẩn gốc IS trong thời gian ngắn (3,5 giờ) ở điều kiện phòng thí nghiệm được trình bày ở phụ lục 1.10.

Kết quả độ ổn định cho thấy, dung dịch gốc BBR và IS có độ ổn định nằm trong khoảng 85% - 115% và CV giữa các mẫu nhỏ hơn 15%. Như vậy, dung dịch gốc BBR và dung dịch gốc IS đạt độ ổn định trong điều kiện bảo quản trên.

Độ ổn định trong thời gian ngắn của dung dịch chuẩn nội làm việc:

Dung dịch chuẩn nội làm việc được theo dõi độ ổn định trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng. Kết quả trình bày ở phụ lục 1.11 cho thấy, dung dịch chuẩn nội làm việc có phần trăm độ ổn định nằm trong khoảng 85-115% và CV < 15%. Như vậy, mẫu dung dịch chuẩn nội làm việc ổn định trong điều kiện nhiệt độ phòng trong thời gian bảo quản đến 48 giờ.

Độ ổn định của mẫu BBR trong huyết tương:

Tiến hành phân tích mẫu BBR trong huyết tương ở 2 nồng độ LQC và HQC được bảo quản ở các điều kiện khác nhau theo quy trình phân tích. Kết quả được trình bày ở phụ lục 1.12. Kết quả ở phụ lục 1.12 cho thấy, nồng độ mẫu sau khi bảo quản trong tất cả các điều kiện khác nhau và trong quá trình phân tích mẫu có phần trăm độ ổn định (độ lệch so với nồng độ ban đầu) không quá 15% và giá trị CV% không quá 15%. Như vậy, mẫu BBR trong huyết tương ổn định trong thời gian đến 6 giờ bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng (25 °C), trong thời gian đến 52 ngày bảo quản ở điều kiện nhiệt độ -35°C, đến 12 giờ sau 05 chu kỳ rã đông ở nhiệt độ phòng và 25 giờ sau khi xử lý mẫu để tiêm sắc ký ở nhiệt độ phòng (buồng auto-sampler 25 °C).

Các kết quả thẩm định về độ thích hợp của hệ thống, tính chọn lọc - độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, độ đúng, độ lặp lại, tỉ lệ thu hồi, ảnh hưởng của nền mẫu, tính toàn vẹn khi pha loãng và độ ổn định trong các điều kiện khác nhau cho thấy: phương pháp đã xây dựng đạt được các tiêu chí quy định trong hướng dẫn phân tích thuốc trong dịch sinh học của EMA và FDA. Vì vậy, có thể sử dụng phương pháp này để định lượng BBR trong huyết tương chuột.

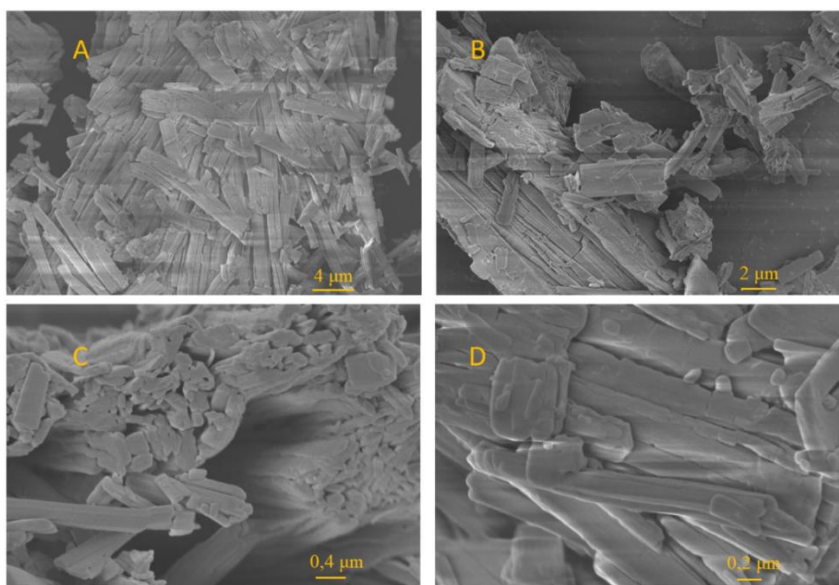
3.2. NGHIÊN CỨU TIỀN CÔNG THỨC

Các đặc tính chất vật lý, hóa học của dược chất và tá dược sẽ ảnh hưởng đến quá trình bào chế và độ ổn định của sản phẩm. Vì vậy, việc đánh giá các đặc tính lý hóa của dược chất cũng như nghiên cứu tương tác giữa dược chất và tá dược là một hoạt động thiết yếu ban đầu nhằm làm cơ sở để xây dựng công thức, lựa chọn phương pháp bào chế và phương pháp đánh giá sản phẩm.

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

3.2.1.1. Hình thái và kích thước của berberin

Tiến hành quan sát hình thái của BBR dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) theo phương pháp đã trình bày ở mục 2.3.2.1. Hình thái và kích thước tiểu phân BBR trình bày ở hình 3.1 cho thấy, BBR là những tiểu phân kết tinh hình gậy, có kích thước khá đều đặn, chiều dài trung bình khoảng 10 μm , tiết diện khoảng 0,2 μm .



Hình 3.1. Hình thái và kích thước của tiểu phân bột nguyên liệu BBR:

A. Độ phóng đại 3.000 lần; B. Độ phóng đại 5.000 lần; C. Độ phóng đại 20.000 lần, tiết diện ngang; D. Độ phóng đại 30.000 lần.

3.2.1.2. Phổ nhiễu xạ tia X

Phổ nhiễu xạ tia X của BBR được trình bày ở phụ lục 2.1 và ở các hình 3.12, hình 3.20. Phổ đồ nhiễu xạ tia X của BBR cho thấy có nhiều đỉnh nhiễu xạ đặc trưng với các vạch nhiễu xạ sắc nhọn, cường độ từ trung bình đến rất mạnh ở các vị trí $9,1^\circ$; $9,7^\circ$; $13,4^\circ$; $16,7^\circ$; $25,8^\circ$ 2θ . Như vậy, BBR tồn tại ở dạng tinh thể, có cấu trúc ô mạng

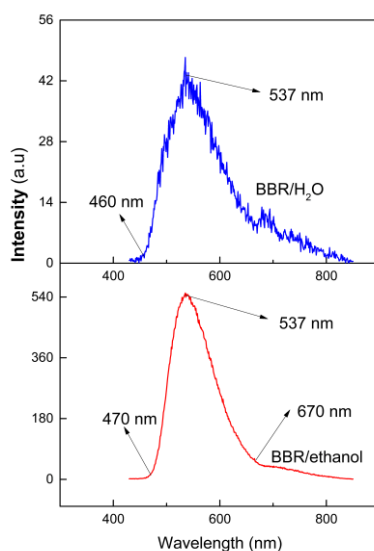
gây ra các nhiễu xạ đặc trưng như trên.

3.2.1.3. Phổ hồng ngoại FTIR

Phổ hồng ngoại của BBR trình bày ở phụ lục 2.2 và hình 3.21 cho thấy, BBR thể hiện các dao động đặc trưng của nhóm chức oxyd thơm (ArC-O-CH_3) tạo nên 4 tín hiệu, trong đó có 2 tín hiệu bất đối xứng với cường độ mạnh ở số sóng 1271 cm^{-1} và 1232 cm^{-1} và 2 tín hiệu đối xứng với cường độ trung bình ở số sóng 1065 và 1034 cm^{-1} . Khung dị vòng ni-tơ 6 cạnh tạo ra các tín hiệu mạnh, sắc nhọn ở số sóng 1598 , 1505 , 1388 , và 1363 cm^{-1} . Nhóm chức cyclic ether tạo ra 2 tín hiệu ở 975 và 897 cm^{-1} . Như vậy, 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.

3.2.1.4. Phổ huỳnh quang

Phổ huỳnh quang của BBR trình bày ở hình 3.2 cho thấy, dung dịch BBR ở nồng độ $0,2\text{ mg/ml}$ trong môi trường nước cho cường độ phát quang yếu hơn trong môi trường ethanol. Trong cả hai môi trường, BBR phát quang ở khoảng bước sóng từ 470 - 670 nm .

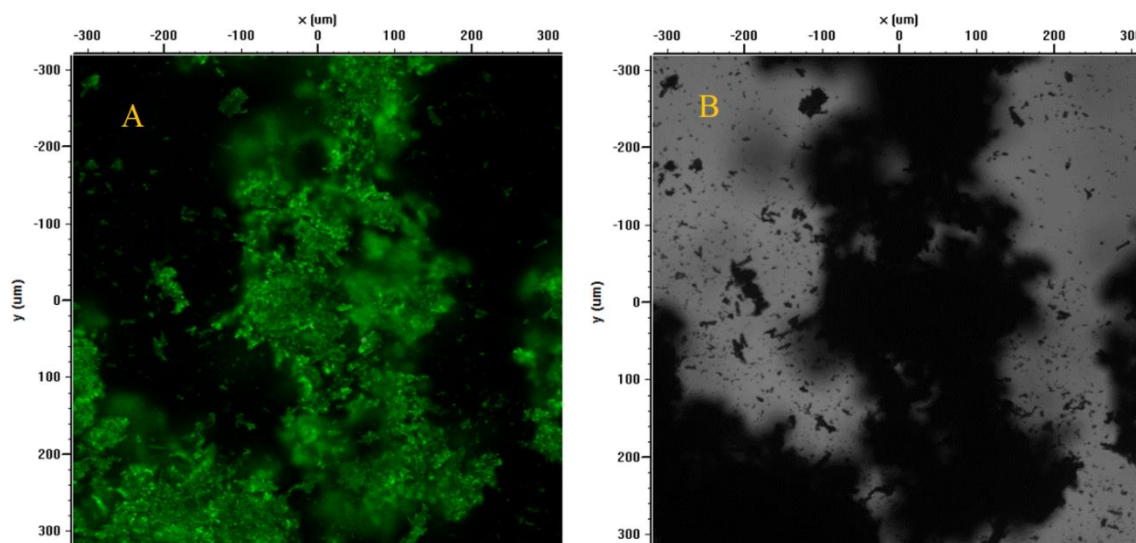


Hình 3.2. Phổ huỳnh quang của dung dịch BBR $0,2\text{ mg/ml}$ trong môi trường nước và ethanol

3.2.1.5. Hình ảnh phát huỳnh quang

Hình ảnh phát huỳnh quang của bột nguyên liệu BBR được chụp lại bằng kính

hiển vi điện tử quét laser ở kênh sóng xanh 488 nm (green channel) và ở trường sáng (transmission field) được biểu thị ở hình 3.3.



Hình 3.3. Hình ảnh bột nguyên liệu BBR quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét: A. Hình ảnh phát huỳnh quang ở bước sóng 488nm. B. Hình ảnh bột BBR dưới ánh sáng truyền qua.

Hình ảnh trên cho thấy BBR phát huỳnh quang màu xanh khi quan sát BBR dưới bước sóng 488 nm. Dưới ánh sáng truyền qua, BBR là khối bột màu đen.

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

BBR được phối hợp với các tá dược khác theo tỉ lệ của các công thức được thiết kế theo phương pháp ở mục 2.3.2.2. Kết quả đánh giá sự thay đổi về hình thức và hàm lượng BBR sau 1 tháng bảo quản được trình bày ở bảng 3.3. Hàm lượng dược chất được tính theo kết quả trung bình của 3 lần định lượng.

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy, sau 1 tháng bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc, hỗn hợp bột không thay đổi về màu sắc và thể chất. Hàm lượng có dao động nhưng sự thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Có thể kết luận rằng, không có tương kỵ nào giữa dược chất với tá dược ảnh hưởng đến độ ổn định của dược chất được quan sát. Vì vậy, những tá dược trên có thể được sử dụng để bào chế liposome BBR và proliposome BBR.

Bảng 3.3. Kết quả đánh giá tương tác dược chất với tá dược sau 1 tháng bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc

Tỉ lệ dược chất-tá dược	Hình thức		Hàm lượng so với lý thuyết (%)		Thay đổi (%)
	Ban đầu	Sau 1 tháng	Ban đầu	Sau 1 tháng	
BBR : Lipid* : NaDC : α -TP (9:9:2:0)	Bột khô, màu vàng tươi đều	Bột khô, màu vàng tươi đều	98,3 $\pm$ 2,2	97,6 $\pm$ 1,3	-0,7
BBR : Lipid* : NaDC : α -TP (9:9:0:3)	Bột khô, màu vàng tươi đều	Bột khô, màu vàng tươi đều	97,5 $\pm$ 2,5	98,6 $\pm$ 1,1	1,1
BBR : Lipid* : NaDC : α -TP (8:9:2:2)	Bột khô, màu vàng tươi đều	Bột khô, màu vàng tươi đều	100,6 $\pm$ 1,7	100,4 $\pm$ 2,1	-0,2
BBR : Lipid* : NaDC : α -TP (6:9:2:0)	Bột khô, màu vàng tươi đều	Bột khô, màu vàng tươi đều	96,4 $\pm$ 0,8	97,8 $\pm$ 3,1	1,4
Tỉ lệ khối (BBR : Lipid* : NaDC : α - TP):manitol (1:1)	Bột khô, màu vàng tươi đều	Bột khô, màu vàng tươi đều	97,0 $\pm$ 1,7	96,5 $\pm$ 1,3	-0,5
Tỉ lệ khối (BBR : Lipid* : NaDC : α - TP):manitol (2:1)	Bột khô, màu vàng tươi đều	Bột khô, màu vàng tươi đều	102,3 $\pm$ 2,6	100,5 $\pm$ 1,2	-1,8

Ghi chú: (*): Tỉ lệ mol Lipid HSPC:DSPG = 1:1

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, được thể hiện ở bảng 3.4 và phụ lục 3.2.

Bảng 3.4. Thành phần liposome berberin

STT	Ký hiệu công thức	Tỉ lệ mol (BBR : lipid : NaDC : α - tocopherol)	Tỉ lệ thành phần lipid (HSPC : DSPG)
1	F04	9 : 9 : 2 : 0	7 : 3
2	F21	9 : 9 : 0 : 3	7 : 3
3	F17	8 : 9 : 2 : 2	7 : 3
4	F13	8 : 9 : 2 : 2	6 : 4
5	F12	8 : 9 : 2 : 0	7 : 3
6	F14	6 : 9 : 2 : 0	6 : 4
7	F16	6 : 9 : 2 : 0	4 : 6
8	F18	6 : 9 : 2 : 0	7 : 3
9	F19	8 : 9 : 2 : 2	4 : 6
10	F20	9 : 9 : 0 : 3	6 : 4
11	F22	9 : 9 : 0 : 3	4 : 6

3.3.2. Bào chế liposome berberin bằng phương pháp tiêm ethanol

Tiến hành bào chế liposome BBR bằng phương pháp tiêm ethanol theo phương pháp trình bày ở mục 2.3.3.1. Trên cơ sở nghiên cứu tiền công thức và thông tin tổng quan tài liệu, công thức bào chế liposome BBR với các thành phần chính gồm BBR, HSPC, DSPG, α -tocopherol và NaDC như thiết kế ở bảng 3.4 và phụ lục 3.2. Một số thông số của quy trình bào chế được chủ động lựa chọn cho nghiên cứu dựa trên kết quả của nghiên cứu trước, có thay đổi cho phù hợp với mục đích của nghiên cứu hiện tại. Các thông số chủ động lựa chọn bao gồm: Tỉ lệ pha ethanol: nước = 1:3, tốc độ khuấy từ 500 vòng/phút, tốc độ tiêm 1ml/phút với kim tiêm 27G x 0,5". Thời gian sau khi phối hợp hai pha 30 phút.

3.3.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố thuộc về quy trình bào chế

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ phối hợp hai pha đến đặc tính của liposome BBR:

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ phối hợp 2 pha đến đặc tính của liposome BBR bằng cách cố định các điều kiện trong quá trình bào chế như đã chủ động lựa chọn như trên. Các mức nhiệt độ phối hợp 2 pha được khảo sát gồm 45°C, 55°C và 65°C. Kết quả khảo sát được trình bày ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Đặc tính của liposome BBR theo nhiệt độ phối hợp hai pha

Mẫu	Nhiệt độ phối hợp 2 pha (°C)	KTTP TB (d.nm)	PDI	Hiệu suất liposome hóa (%)
FJ21-45	45	141,8 ± 30,1	0,489 ± 0,03	49,7 ± 2,5
FJ21-55	55	126,8 ± 50,5	0,349 ± 0,02	56,5 ± 1,4
FJ21-65	65	117,3 ± 1,3	0,186 ± 0,004	57,8 ± 2,1

Số liệu biểu diễn dưới dạng trung bình ± SD (n=5)

Kết quả ở bảng 3.5 cho thấy có sự khác nhau giữa các mẫu liposome BBR khi tăng nhiệt độ phối hợp 2 pha từ 45°C đến 65°C. Ở mức nhiệt độ 45°C, liposome tạo ra có phân bố KTTP lớn ($PDI > 0,4$). Ở cả hai mức nhiệt độ 55 và 65°C, đều xuất hiện một quần thể liposome với KTTP trung bình xấp xỉ nhau khoảng 120 nm. Tuy nhiên, ở mức nhiệt độ 55°C, phân bố kích thước tiểu phân rộng hơn, thể hiện ở chỉ số PDI lớn hơn, và có sự dao động về kích thước giữa các mẻ bào chế lớn hơn so với mức nhiệt độ 65°C. Về hiệu suất nạp được chất, mức nhiệt 45 °C thấp nhất, hai mức nhiệt còn lại có hiệu suất nạp không khác nhau có ý nghĩa thống kê. Về hình thức, cả 3 mức nhiệt độ đều tạo ra hỗn dịch liposome BBR hơi mờ đục, màu tươi, không lắng cặn, không tủa BBR tự do, không có các tiểu phân quan sát được bằng mắt thường. Tuy nhiên, ở mức nhiệt 65°C cho kích thước tiểu phân nhỏ và đồng đều nhất, hiệu suất nạp được chất không kém hơn mức nhiệt khác. Vì vậy, mức nhiệt độ 65°C được lựa chọn để phối hợp hai pha trong nghiên cứu.

Khảo sát ảnh hưởng của áp suất và nhiệt độ trong quá trình loại dung môi:

Lựa chọn được thông số tối ưu trong loại bỏ dung môi nhằm xây dựng quy trình bào chế tạo ra được sự đồng nhất cho từng lô mẻ và tiết kiệm thời gian bào chế. Tiến hành khảo sát điều kiện cất quay để loại dung môi ethanol đồng thời cô đặc hỗn dịch liposome tạo thành bằng cách pha chế mẫu FJ21 theo thông số quy trình đã chọn gồm tỉ lệ pha ethanol: nước = 1 : 3, tốc độ tiêm 1 ml/phút, tốc độ khuấy từ 500 vòng/phút, nhiệt độ phối hợp 2 pha 65°C. Sau khi phối hợp 2 pha, tiếp tục duy trì nhiệt độ 65°C để ổn định hỗn dịch trong thời gian 30 phút rồi đem cất quay theo các điều kiện khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 3.6 và phụ lục 3.1.

Bảng 3.6. Đặc tính của liposome BBR theo nhiệt độ và áp suất cắt quay

Mẫu	Nhiệt độ cắt quay (°C)	Áp suất (mbar)	KTTP TB (d.nm)	PDI	Đặc điểm liposome
FJ21-60/200	60	200	112,8 ± 2,7	0,220 ± 0,04	Đa phân tán
FJ21-65/200	65	200	120,3 ± 13,5	0,125 ± 0,007	Đơn phân tán
FJ21-60/180	60	180	117,3 ± 1,3	0,186 ± 0,004	Đơn phân tán
FJ21-65/180	65	180	125,6 ± 1,7	0,144 ± 0,020	Đơn phân tán
FJ21-60/130	60	130	110,7 ± 86,1	0,326 ± 0,013	Đa phân tán
FJ21-65/130	65	130	-	-	-

Ghi chú: Số liệu biểu diễn dưới dạng trung bình ± SD, n=3-5.

(-) : không đo được kích thước tiểu phân do hỗn dịch không phù hợp với tiêu chí của máy

Sản phẩm thu được có đặc điểm như sau:

Về hình thức: sản phẩm thu được của mẫu FJ21-65/130 có sự cô đặc, tạo thành hỗn dịch không mịn và có chất kết dính xung quanh thành bình. Các mẫu còn lại cho hỗn dịch đục nhẹ, màu vàng tươi đồng nhất, không có tiểu phân quan sát được bằng mắt thường.

Về KTTP và phân bố KTTP: kết quả ở bảng 3.6 và phụ lục 3.1 cho thấy, ngoại trừ mẫu FJ21-65/130 không đo được kích thước tiểu phân, các mẫu còn lại có hỗn dịch liposome thu được đều có kích thước tiểu phân nhỏ. Tuy nhiên, mẫu FJ21-60/200 và FJ21-60/130 có phân bố kích thước tiểu phân không đồng nhất, có sự hình thành các quần thể liposome với kích thước khác nhau thể hiện ở số lượng pic tạo thành. Ba mẫu còn lại FJ21-65/200, FJ-60/180, FJ-65/180 cho kích thước tiểu phân khoảng 120 nm và phân bố kích thước tiểu phân hẹp, thể hiện ở chỉ số PDI nhỏ hơn 0,3, tạo thành 1 pic liposome duy nhất và có sự lặp lại giữa các mẻ.

Từ kết quả thu được, khoảng nhiệt độ cắt quay từ 60-65°C, áp suất cắt quay 180 mbar được chọn để làm thông số quy trình giai đoạn loại bỏ dung môi và cô đặc liposome BBR.

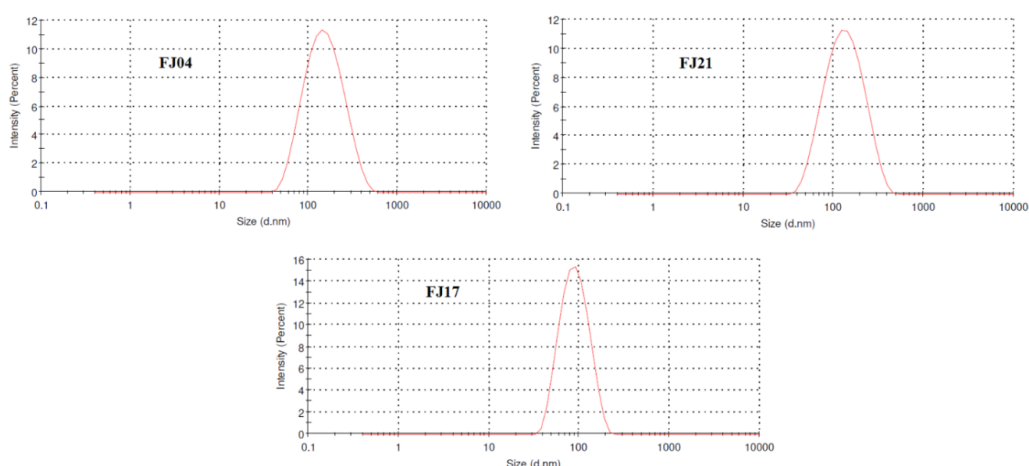
3.3.2.2. Khảo sát các yếu tố thuộc về công thức ảnh hưởng đến đặc tính liposome berberin

Khảo sát ảnh hưởng của thành phần đến đặc tính liposome BBR:

Thành phần cấu tạo nên liposome không những ảnh hưởng đến đặc tính của liposome mà còn ảnh hưởng đến độ ổn định của liposome trong quá trình bảo quản và khả năng bảo tồn nguyên vẹn cấu trúc trong đường tiêu hóa. Việc lựa chọn thành phần cấu tạo liposome là vấn đề quan trọng trong quá trình nghiên cứu bào chế. Tiến hành bào chế các công thức có thành phần khác nhau như trình bày ở phụ lục 3.2 bằng phương pháp ở mục 2.3.3.1 với các điều kiện quy trình đã được chọn như: nhiệt độ phối hợp 2 pha 65°C, nhiệt độ cất quay 60°C, áp suất cất quay 180 mbar, tốc độ vòng quay 150 vòng/phút. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.7 và hình 3.4.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của thành phần công thức đến đặc tính liposome BBR bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol (n=3-5, TB $\pm$ SD)

Mẫu	Thành phần BBR : Lipid : NaDC : α -tocopherol (tỉ lệ mol)	KTTP TB (d.nm)	PDI	Hiệu suất liposome hóa (%)
FJ04	9 : 9 : 2 : 0	133,6 $\pm$ 1,1	0,209 $\pm$ 0,008	55,9 $\pm$ 2,4
FJ21	9 : 9 : 0 : 3	117,3 $\pm$ 1,3	0,186 $\pm$ 0,004	57,8 $\pm$ 2,1
FJ17	8 : 9 : 2 : 2	82,3 $\pm$ 1,3	0,113 $\pm$ 0,004	60,3 $\pm$ 1,6



Hình 3.4. Phân bố kích thước tiểu phân (theo cường độ) của liposome BBR mẫu FJ04, FJ21 và FJ17

Sau khi bào chế, sản phẩm thu được có đặc điểm sau:

Về hình thức, các hỗn dịch thu được đều hơi mờ đục đều, màu vàng tươi, không lắng cặn, không kết tủa, không có tiểu phân quan sát được bằng mắt thường sau bảo quản 3 ngày ở điều kiện 2 – 8 °C.

Về KTTP và phân bố KTTP: Kết quả ở bảng trên cho thấy, kích thước tiểu phân trung bình của mẫu FJ04 và FJ21 dao động trong khoảng 120-130 nm. Trong lúc đó mẫu FJ17 có kích thước liposome trung bình khá nhỏ, khoảng 80 nm. Hình 3.4 cho thấy đặc điểm liposome tạo thành của cả 3 mẫu đều chỉ có 1 pic duy nhất trong mỗi mẫu, phân bố kích thước tiểu phân là biểu đồ phân bố chuẩn với sự phân bố hẹp, chỉ số PDI đều nhỏ hơn 0,3. Trong 3 mẫu trên thì KTTP và phân bố KTTP của mẫu FJ17 là nhỏ nhất, tiếp theo là mẫu FJ21 và cuối cùng là mẫu FJ04. Điều này cho thấy, nếu thành phần cấu tạo của liposome bao gồm cả NaDC và α -tocopherol thì KTTP nhỏ hơn đáng kể, phân bố KTTP hẹp hơn thể hiện ở biểu đồ phân bố tiểu phân cân đối và có độ rộng chân pic hẹp hơn (hình 3.4)

Về hiệu suất nạp được chất vào liposome: hiệu suất nạp được chất của 3 mẫu khá tương đồng. Có xấp xỉ 55% lượng được chất được nạp vào liposome. Sự có mặt của cả hai thành phần NaDC và α -tocopherol có xu hướng làm tăng hiệu suất nạp được chất (mẫu FJ17).

Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ mol được chất trong công thức:

Tỉ lệ mol được chất trong tổng số mol các thành phần khác trong công thức quyết định hàm lượng được chất toàn phần. Tuy nhiên, hiệu quả điều trị lại do số mol được chất được nạp vào liposome. Vì vậy, việc chọn được tỉ lệ mol được chất hợp lý trong công thức là vấn đề quan trọng nhằm vừa nâng cao hiệu suất quy trình và hiệu quả điều trị, vừa tiết kiệm được chất. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ mol được chất đến đặc tính của liposome BBR bằng cách thiết kế công thức cho tất cả các mẫu nghiên cứu đều có cùng thành phần cấu tạo, giống nhau về tỉ lệ mol lipid (kể cả tỉ lệ mol giữa 2 loại lipid là HSPC và DSPG) và NaDC, các mẫu chỉ khác nhau về tỉ lệ mol được chất như theo mô tả ở bảng 3.8 và phụ lục 3.2. Kết quả được trình bày ở bảng 3.9.

Bảng 3.8. Thành phần công thức bào chế liposome BBR khi thay đổi tỉ lệ mol BBR

Mẫu	Tỉ lệ mol BBR : Lipid : NaDC : α- tocopherol	Tỉ lệ mol HSPC:DSPG	BBR (mmol)	HSPC (mmol)	DSPG (mmol)	NaDC (mmol)
FJ04	9 : 9 : 2 : 0	7 : 3	0,1125	0,07875	0,03375	0,025
FJ12	8 : 9 : 2 : 0	7 : 3	0,1000	0,07875	0,03375	0,025
FJ18	6 : 9 : 2 : 0	7 : 3	0,0750	0,07875	0,03375	0,025

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của tỉ lệ mol BBR đến đặc tính của liposome BBR (n=3, TB $\pm$ SD)

Mẫu	KTTP TB (d.nm)	PDI	Hiệu suất liposome hóa (%)
FJ04	133,6 $\pm$ 1,1	0,209 $\pm$ 0,008	55,9 $\pm$ 2,4
FJ12	120,4 $\pm$ 1,1	0,243 $\pm$ 0,001	58,4 $\pm$ 2,5
FJ18	50,9 $\pm$ 1,2	0,259 $\pm$ 0,009	64,9 $\pm$ 3,5

Về hình thức: các mẫu thu được sau bào chế đều cho hỗn dịch đục mờ đều, màu vàng tươi, không có kết tủa hoặc lắng cặn, không có tiểu phân kết tinh quan sát được bằng mắt thường sau 3 ngày bảo quản ở điều kiện 2 – 8 °C.

Về KTTP và phân bố KTTP: cả 3 mẫu đều cho liposome với kích thước tiểu phân nhỏ, và có xu hướng giảm dần kích thước khi giảm tỉ lệ mol dược chất. Mẫu FJ04 với tỉ lệ mol dược chất cao nhất cho kích thước lớn nhất (KTTP trung bình 133,6 nm), tiếp theo là mẫu FJ12 (với KTTP trung bình 120,4 nm) và tỉ lệ mol nhỏ nhất là mẫu FJ18 cho kích thước tiểu phân nhỏ nhất (KTTP trung bình 51 nm). Phân bố KTTP của cả 3 mẫu đều hẹp, với chỉ số PDI nhỏ hơn 0,3.

Về hiệu suất nạp dược chất, mẫu có xu hướng tăng dần hiệu suất liposome hóa khi giảm tỉ lệ mol dược chất. Mẫu FJ04 có tỉ lệ mol BBR lớn nhất nhưng có hiệu suất nạp dược chất trung bình là 55,9%, trong lúc đó mẫu FJ18 có tỉ lệ mol BBR nhỏ nhất lại có hiệu suất nạp trung bình là 64,9%. Điều này chứng tỏ tỉ lệ mol dược chất có ảnh hưởng đến hiệu suất nạp dược chất vào liposome.

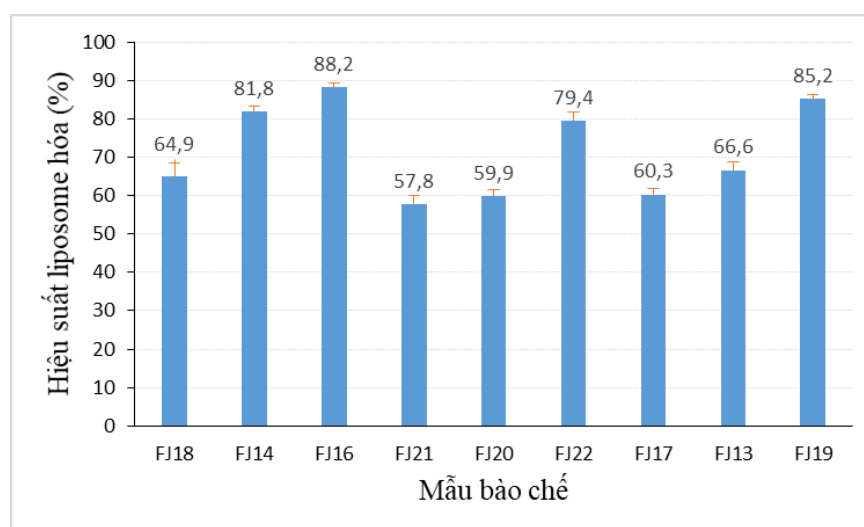
Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ mol lipid HSPC và DSPG:

Phospholipid là thành phần cấu tạo nên lớp vỏ liposome. Hai loại phospholipid

HSPC và DSPG được sử dụng phối hợp với tỉ lệ khác nhau. Để đánh giá ảnh hưởng của 2 loại lipid này đến đặc tính của liposome, tiến hành khảo sát 3 nhóm công thức (phụ lục 3.2). Trong đó, trong cùng một nhóm công thức có thành phần giống nhau nhưng khác nhau về tỉ lệ mol giữa 2 loại lipid, giữa các nhóm công thức khác nhau về tỉ lệ mol được chất và khác cả thành phần. Kết quả được trình bày ở bảng 3.10, hình 3.5 và phụ lục 3.3 (điền hình về phân bố KTTP).

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của tỉ lệ mol HSPC:DSPG đến đặc tính liposome BBR (n = 3-5)

Nhóm	Mẫu	Tỉ lệ mol BBR : Lipid : NADC : α -TP	Tỉ lệ mol HSPC : DSPG	KTTP TB (d.nm)	PDI	Hiệu suất liposome hóa (%)
I	FJ14	6 : 9 : 2 : 0	6 : 4	243,6 $\pm$ 4,1	0,195 $\pm$ 0,012	81,8 $\pm$ 1,4
	FJ16	6 : 9 : 2 : 0	4 : 6	91,2 $\pm$ 2,0	0,232 $\pm$ 0,015	88,2 $\pm$ 1,2
	FJ18	6 : 9 : 2 : 0	7 : 3	50,9 $\pm$ 1,2	0,250 $\pm$ 0,009	64,9 $\pm$ 3,5
II	FJ20	9 : 9 : 0 : 3	6 : 4	86,2 $\pm$ 8,6	0,329 $\pm$ 0,030	59,9 $\pm$ 1,6
	FJ21	9 : 9 : 0 : 3	7 : 3	117,3 $\pm$ 1,3	0,186 $\pm$ 0,004	57,8 $\pm$ 2,1
	FJ22	9 : 9 : 0 : 3	4 : 6	316,4 $\pm$ 3,3	0,529 $\pm$ 0,033	79,4 $\pm$ 2,3
III	FJ13	8 : 9 : 2 : 2	6 : 4	149,1 $\pm$ 0,8	0,220 $\pm$ 0,008	66,6 $\pm$ 2,2
	FJ17	8 : 9 : 2 : 2	7 : 3	82,3 $\pm$ 1,3	0,113 $\pm$ 0,004	60,3 $\pm$ 1,6
	FJ19	8 : 9 : 2 : 2	4 : 6	146,5 $\pm$ 2,7	0,186 $\pm$ 0,007	85,2 $\pm$ 1,0



Hình 3.5. Hiệu suất liposome hóa của các mẫu bào chế

Sản phẩm thu được từ các mẫu bào chế trên đều có chung đặc điểm về hình thức: hỗn dịch màu vàng tươi, hơi mờ đục đồng nhất, không lắng tủa, không có tiêu phân kết tinh sau 3 ngày bảo quản ở điều kiện nhiệt độ 2 – 8 °C.

Về KTTP và phân bố KTTP: liposome BBR của các mẫu trong cùng một nhóm có KTTP trung bình dao động đáng kể. Tỷ lệ mol HSPC : DSPG khác nhau tạo ra liposome có KTTP trung bình khác nhau. Liposome nhóm I dao động từ 51 nm đến 244 nm, nhóm II dao động từ 86 nm - 316 nm, nhóm III dao động từ 82 nm – 150 nm. Sự dao động về KTTP trung bình trong 3 nhóm không theo quy luật chung. Tuy nhiên, trong mỗi nhóm, sự thay đổi tỷ lệ mol của HSPC: DSPG dẫn đến thay đổi KTTP trung bình của liposome. Liposome trong nhóm công thức III, KTTP trung bình dao động hẹp nhất trong 3 nhóm. Về phân bố kích thước tiểu phân, phần lớn các mẫu đều có phân bố kích thước khá hẹp, chỉ số PDI dưới 0,3. Riêng mẫu FJ20 có PDI > 0,3 và FJ 22 có PDI > 0,5 là biểu hiện của phân bố quần thể rộng và có lớn hơn 1 quần thể liposome trong biểu đồ phân bố KTTP (phụ lục 3.3).

Về hiệu suất liposome hóa, liposome nhóm I có hiệu suất liposome hóa cao nhất trong 3 nhóm, tiếp theo là nhóm III và hiệu suất thấp nhất thuộc về nhóm II. Trong cùng một nhóm, hiệu suất nạp được chất càng tăng khi tăng tỷ lệ mol DSPG. Bằng chứng là các mẫu FJ16, FJ19 và FJ22 có hiệu suất liposome hóa cao nhất trong lần lượt các nhóm I, II, và III mà các mẫu này đều có tỷ lệ DSPG cao nhất nhóm với tỷ lệ HSPC: DSPG = 4: 6 trong công thức. Điều đáng lưu ý là mẫu FJ19 vừa có tỷ lệ mol được chất cao vừa có hiệu suất liposome hóa cao. Các mẫu có hiệu suất nạp thứ nhì trong cùng một nhóm là các mẫu có tỷ lệ mol HSPC: DSPG = 6:4, và cuối cùng là các mẫu có tỷ lệ này = 7: 3 (hình 3.5). Như vậy, tỷ lệ mol HSPC: DSPG có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất liposome hóa.

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

Để lựa chọn được phương pháp bào chế tối ưu, phương pháp hydrat hóa film được sử dụng để khảo sát bào chế liposome BBR.

Dựa vào thực tế khảo sát trên thiết bị cất quay R-300 để dung môi bốc hơi từ từ nhằm tạo màng film mỏng lên thành bình. Điều kiện cất quay loại bỏ dung môi được lựa chọn với nhiệt độ cất 41 °C, áp suất 330 mbar trong 5 phút đầu, nâng nhiệt độ lên

50 °C với áp suất 300 mbar trong 10 phút tiếp theo và sau đó điều chỉnh nhiệt độ lên 55 °C và duy trì áp suất 280 mbar cho đến khi loại bỏ hết dung môi hữu cơ và tạo lớp film trên thành bình.

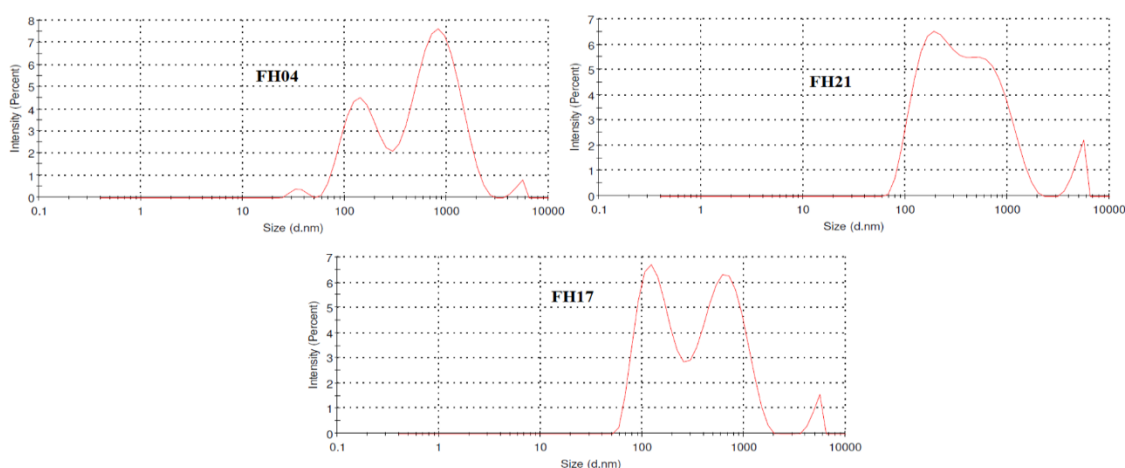
Để so sánh với phương pháp tiêm ethanol, nghiên cứu tiếp tục thực hiện khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố thuộc về công thức ảnh hưởng đến đặc tính của liposome BBR

Ảnh hưởng của thành phần cấu tạo liposome:

Tiến hành bào chế liposome bằng phương pháp hydrat hóa film theo phương pháp ở mục 2.3.3.2 với điều kiện đã lựa chọn trên. Kết quả được trình bày ở bảng 3.11 và hình 3.6.

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của thành phần cấu tạo lên đặc tính liposome BBR bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film (n=3, TB ± SD).

Mẫu	Thành phần BBR : Lipid : NaDC : α -TP (tỉ lệ mol)	KTTP TB (d.nm)	PDI	Đặc điểm phân bố KT liposome
FH04	9 : 9 : 2 : 0	830,1 ± 5,9	0,539 ± 0,06	Đa phân tán
FH21	9 : 9 : 0 : 3	315,1 ± 7,5	0,429 ± 0,012	Đa phân tán
FH17	8 : 9 : 2 : 2	251,6 ± 6,1	0,486 ± 0,011	Đa phân tán



Hình 3.6. Phân bố kích thước tiểu phân (theo tỉ trọng) của các mẫu FH04, FH21, FH17 sau khi bào chế

Về hình thức: Các mẫu sau bào chế có là những hỗn dịch hơi mờ đục, màu vàng tươi, không có kết tủa quan sát được bằng mắt thường sau 3 ngày bảo quản ở điều

kiện nhiệt độ 2 – 8 °C.

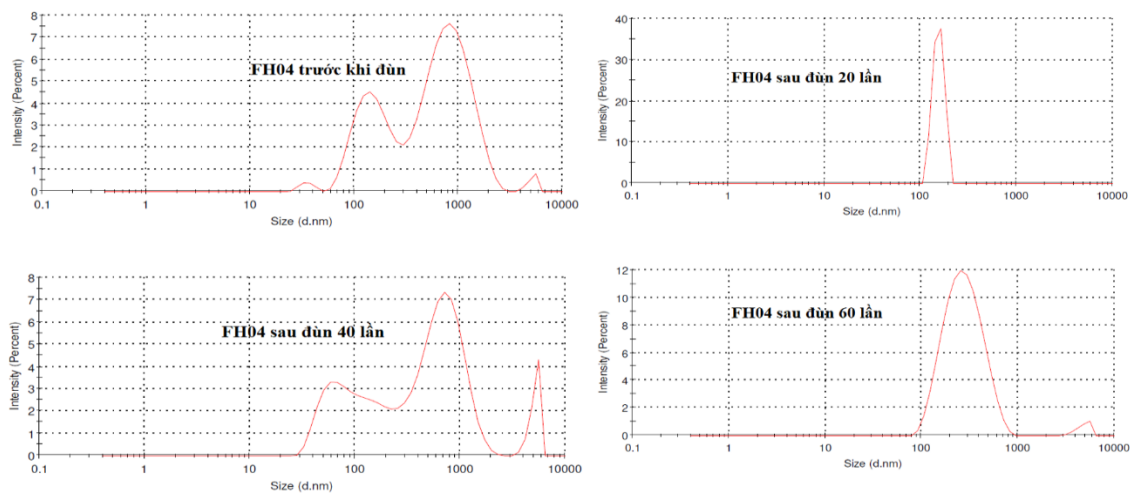
Về KTTP và phân bố KTTP: KTTP của liposome cả 3 mẫu đều lớn và phân bố kích thước rộng. Mỗi mẫu đều có từ 2-3 quần thể liposome (đa phân tán) trong hỗn dịch. Mẫu FH04 với thành phần công thức chứa NaDC có KTTP trung bình lớn nhất (830 nm), phân bố kích thước rộng nhất, khoảng kích thước đại diện từ 30 nm đến 2000 nm (hình 3.6), chỉ số PDI > 0,5. Mẫu FH21 với thành phần công thức chứa α -tocopherol có KTTP trung bình nhỏ hơn mẫu FH04 nhiều (315 nm), phân bố kích thước hẹp hơn với chỉ số PDI < 0,5. Mẫu FH17 với thành phần công thức chứa cả NaDC và α -tocopherol có KTTP trung bình nhỏ nhất (252 nm) với chỉ số PDI < 0,5. Như vậy, thành phần công thức chứa cả NaDC và α -tocopherol có xu hướng làm giảm KTTP trung bình của liposome một cách rõ rệt. Tuy nhiên, kết quả trên cho thấy KTTP vẫn lớn và phân bố rộng nên cần thiết phải có phương pháp làm giảm KTTP phù hợp (hình 3.6).

Ảnh hưởng của phương pháp đun qua màng polycarbonat đến KTTP của liposome:

Đun qua màng lọc polycarbonat là phương pháp làm giảm kích thước tiểu phân ít ảnh hưởng đến rò rỉ dược chất và cho kích thước tiểu phân khá đồng nhất. Tiến hành làm giảm KTTP bằng phương pháp đun qua màng lọc polycarbonat có kích thước lỗ lọc 400 nm như mô tả ở mục 2.3.3.2, khảo sát số lần làm đun là 0 lần, 20 lần, 40 lần và 60 lần. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.12 và hình 3.7.

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của số lần đun qua màng 400 nm đến KTTP của mẫu FH04

Số lần đun	KTTP TB (d.nm)	PDI	Đặc điểm phân bố KT
0	830,1 ± 5,9	0,539 ± 0,06	Đa phân tán
20	673,1 ± 160,9	0,612 ± 0,108	Không đạt tiêu chí đo của thiết bị
40	295,8 ± 34,5	0,807 ± 0,063	Đa phân tán
60	248,7 ± 3,4	0,272 ± 0,053	Đơn phân tán



Hình 3.7. Phân bố KTTT liposome mẫu FH04 sau khi đun qua màng polycarbonat kích thước lỗ lọc 400 nm

Kết quả ở bảng 3.12 và hình 3.7 cho thấy, KTTT trung bình của liposome qua 20 lần đun qua màng polycarbonat (kích thước lỗ lọc 400 nm) chưa được cải thiện nhiều, thậm chí tăng, đồ thị phân bố KTTT không phải là phân bố chuẩn, quần thể liposome không xác định được do không phù hợp với tiêu chí đo của thiết bị. Dao động kích thước trung bình lớn, sai số chuẩn về kích thước lên đến 161 nm. Sau 40 lần đun, KTTT trung bình có giảm, sai số chuẩn cũng giảm đáng kể. Tuy nhiên chỉ số đa phân tán vẫn lớn, hình thành 3 quần thể liposome. Sau 60 lần đun, KTTT trung bình giảm đáng kể, đồ thị phân bố KTTT là đồ thị phân bố chuẩn, sai số chuẩn về KTTT nhỏ (3,4 nm), chỉ số đa phân tán hẹp ($PDI < 0,3$) chứng tỏ liposome đã được đồng nhất về KTTT. Từ kết quả trên, số lần đun qua màng polycarbonat 400 nm là 60 lần được chọn để đồng nhất hóa KTTT của các mẫu tiếp theo.

Ảnh hưởng của tỉ lệ mol dược chất:

Tiến hành bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film các mẫu FH04, FH12, FH18, sau đó đun qua màng polycarbonat kích thước lỗ lọc 400 nm, kết quả được trình bày ở bảng 3.13.

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của tỉ lệ mol BBR đến đặc tính của liposome (n=3, TB ± SD)

Mẫu	Tỉ lệ mol BBR : Lipid : NaDC : α -TP	Trước khi đùn qua màng polycarbonat		Sau khi đùn qua màng polycarbonat		EE (%)
		KTTP TB (d.nm)	PDI	KTTP TB (d.nm)	PDI	
FH04	9 : 9 : 2 : 0	830,1 ± 5,9	0,539 ± 0,06	248,7 ± 3,3	0,272 ± 0,053	60,5 ± 4,5
FH12	8 : 9 : 2 : 0	808,5 ± 40,0	0,429 ± 0,04	292,0 ± 3,9	0,181 ± 0,033	67,6 ± 3,1
FH18	6 : 9 : 2 : 0	355,0 ± 13,1	0,395 ± 0,057	239,2 ± 2,4	0,243 ± 0,009	78,0 ± 1,7

Kết quả trên cho thấy KTTP trung bình của liposome BBR trước đùn qua màng polycarbonat có xu hướng giảm nhưng sự khác nhau không rõ rệt khi giảm tỉ lệ mol được chất từ 9 (FH04) xuống 8 (FH12). Tuy nhiên, khi tỉ lệ mol được chất giảm xuống còn 6 (FH18) thì KTTP trung bình của liposome giảm xuống đáng kể, ở khoảng 355,0 ± 13 nm, chỉ số đa phân tán nhỏ hơn 0,4. Điều này chứng tỏ tỉ lệ mol BBR có ảnh hưởng đến KTTP trung bình trong bào chế liposome bằng phương pháp hydrat hóa film. Sau khi đùn 60 lần qua màng polycarbonat 400 nm, KTTP trung bình của tất cả các mẫu đều dưới 300 nm, phân bố KTTP hẹp, chỉ số PDI nhỏ hơn 0,3. Như vậy, tỉ lệ mol được chất chỉ ảnh hưởng đến KTTP, phân bố KTTP trước khi đùn qua màng polycarbonat.

Về hiệu suất liposome hóa, kết quả ở bảng 3.13 cho thấy hiệu suất nạp được chất có xu hướng tăng dần từ 60,5% lên 78% khi giảm dần tỉ lệ mol được chất từ 9 xuống 6 trong công thức. Kết quả này cũng giống như kết quả thu được ở phương pháp bào chế liposome bằng tiêm ethanol.

Ảnh hưởng của tỉ lệ mol HSPC:DSPG đến đặc tính của liposome BBR:

Từ kết quả ở phương pháp tiêm ethanol, các công thức có hiệu suất liposome hóa cao trên 60% được chọn để tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của tỉ lệ mol HSPC:DSPG trên phương pháp bào chế hydrat hóa film. Kết quả được trình bày ở bảng 3.14.

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của tỉ lệ mol HSPC:DSPG lên đặc tính của liposome BBR
($n=3$, TB $\pm$ SD)

Nhóm	Mẫu	Tỉ lệ mol BBR : Lipid : NaDC : α -TP	Tỉ lệ mol HSPC : DSPG	KTTP TB (d.nm)	PDI	Hiệu suất liposome hóa (%)
A	FH14	6 : 9 : 2 : 0	6 : 4	233,8 $\pm$ 5,8	0,496 $\pm$ 0,02	87,3 $\pm$ 0,8
	FH16	6 : 9 : 2 : 0	4 : 6	563,4 $\pm$ 34,2	0,577 $\pm$ 0,12	91,9 $\pm$ 4,2
	FH18	6 : 9 : 2 : 0	7 : 3	355,0 $\pm$ 13,1	0,395 $\pm$ 0,057	78,0 $\pm$ 1,7
B	FH13	8 : 9 : 2 : 2	6 : 4	278,9 $\pm$ 25,6	0,652 $\pm$ 0,09	72,0 $\pm$ 3,0
	FH17	8 : 9 : 2 : 2	7 : 3	251,6 $\pm$ 6,1	0,486 $\pm$ 0,01	66,6 $\pm$ 0,4
	FH19	8 : 9 : 2 : 2	4 : 6	234,3 $\pm$ 6,6	0,522 $\pm$ 0,07	87,0 $\pm$ 0,6

Kết quả ở bảng trên cho thấy:

Về KTTP và phân bố KTTP, trong nhóm A, mẫu FH14 có KTTP trung bình thấp nhất, mẫu FH18 có phân bố KTTP nhỏ nhất (PDI = 0,395). Ở nhóm B, KTTP trung bình của liposome khá đều giữa các mẫu. Trong đó, mẫu FH19 cho KTTP trung bình nhỏ nhất (230 nm), nhưng phân bố KTTP rộng (PDI = 0,522). Nhìn chung, KTTP của các mẫu nhóm A và nhóm B đều bị ảnh hưởng bởi tỉ lệ mol HSPC:DSPG. Các mẫu đều có phân bố KTTP lớn hơn 0,3, tồn tại ít nhất 2 quần thể liposome trong mỗi mẫu hỗn dịch (phụ lục 3.4).

Về hiệu suất nạp, trong nhóm A, mẫu FH16 có hiệu suất nạp cao nhất (91,9%), mẫu FH18 có hiệu suất nạp thấp nhất (78,0%). Tương tự như thế, ở nhóm B, mẫu FH19 có hiệu suất nạp cao nhất (87,5%), và mẫu FH17 có hiệu suất nạp thấp nhất (66,6%). Như vậy, tỉ lệ mol HSPC:DSPG có ảnh hưởng đến hiệu suất liposome hóa, tỉ lệ HSPC : DSPG = 4 : 6 cho hiệu suất liposome hóa cao nhất.

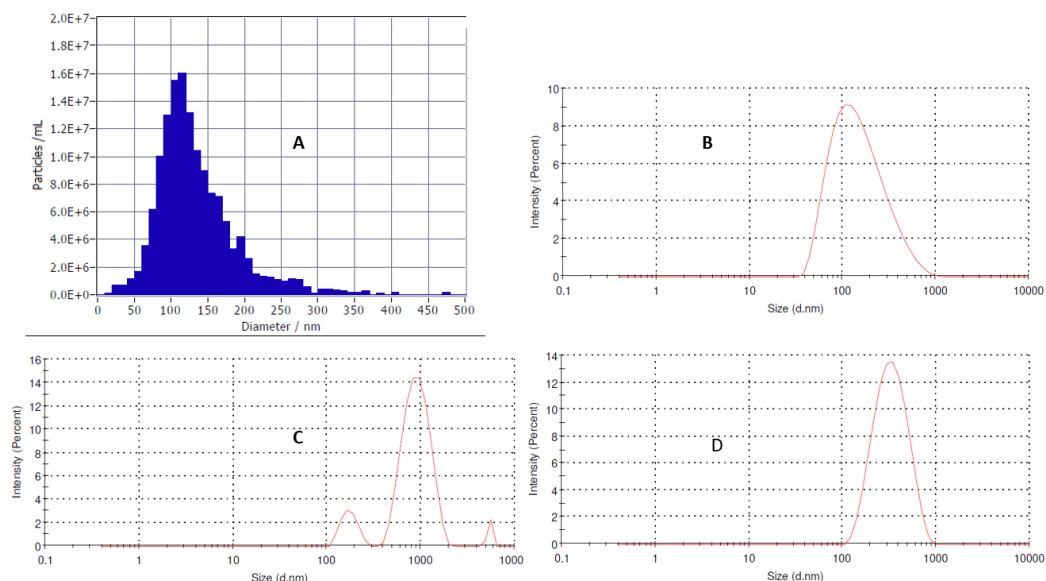
3.3.4. So sánh ảnh hưởng của phương pháp bào chế lên đặc tính của liposome berberin

Ảnh hưởng của phương pháp bào chế lên KTTP và phân bố KTTP

KTTP và phân bố KTTP của liposome BBR tạo thành từ hai phương pháp bào chế tiêm ethanol và hydrat hóa film được trình bày ở bảng 3.15, hình 3.8 và phụ lục 3.3, phụ lục 3.4, phụ lục 3.5.

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của phương pháp bào chế lên KТП và phân bố KТП (n=3-5, TB $\pm$ SD)

Ký hiệu mẫu	Phương pháp tiêm ethanol		Phương pháp hydrat hóa film			
			Trước khi đun qua màng polycarbonat		Sau khi đun qua màng polycarbonat	
	KТП TB (d.nm)	PDI	KТП TB (d.nm)	PDI	KТП TB (d.nm)	PDI
F04	133,6 $\pm$ 1,1	0,209 $\pm$ 0,008	830,1 $\pm$ 5,9	0,539 $\pm$ 0,06	248,7 $\pm$ 3,3	0,272 $\pm$ 0,053
F12	120,4 $\pm$ 1,1	0,243 $\pm$ 0,001	808,5 $\pm$ 40,0	0,429 $\pm$ 0,04	292,0 $\pm$ 3,9	0,181 $\pm$ 0,033
F18	50,9 $\pm$ 1,2	0,259 $\pm$ 0,009	355,0 $\pm$ 13,1	0,395 $\pm$ 0,057	239,2 $\pm$ 2,4	0,243 $\pm$ 0,009
F21	117,3 $\pm$ 1,3	0,209 $\pm$ 0,008	315,1 $\pm$ 7,5	0,429 $\pm$ 0,012	236,0 $\pm$ 2,0	0,248 $\pm$ 0,009
F14	243,6 $\pm$ 4,1	0,195 $\pm$ 0,012	233,8 $\pm$ 5,8	0,496 $\pm$ 0,02	208,2 $\pm$ 3,2	0,312 $\pm$ 0,031
F16	91,2 $\pm$ 2,0	0,232 $\pm$ 0,015	563,4 $\pm$ 34,2	0,577 $\pm$ 0,12	448,5 $\pm$ 6,6	0,276 $\pm$ 0,016
F17	82,3 $\pm$ 1,3	0,113 $\pm$ 0,004	251,6 $\pm$ 6,1	0,486 $\pm$ 0,01	220,5 $\pm$ 1,4	0,237 $\pm$ 0,009
F13	149,1 $\pm$ 0,8	0,220 $\pm$ 0,008	278,9 $\pm$ 25,6	0,652 $\pm$ 0,09	182,8 $\pm$ 2,6	0,297 $\pm$ 0,022
F19	146,5 $\pm$ 2,7	0,186 $\pm$ 0,007	234,3 $\pm$ 6,6	0,522 $\pm$ 0,07	111,5 $\pm$ 3,7	0,285 $\pm$ 0,011

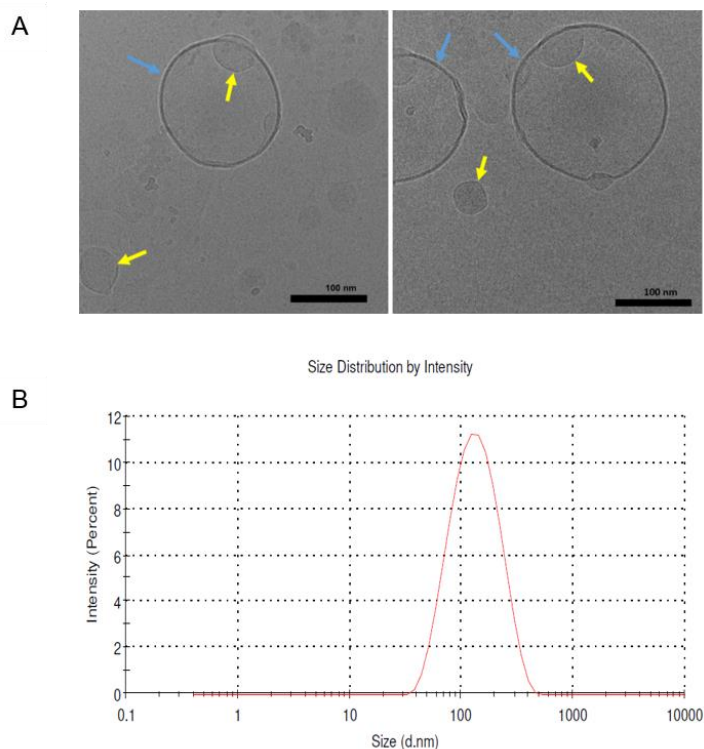


Hình 3.8. Phân bố KТП của liposome BBR mẫu F12 bào chế theo phương pháp tiêm ethanol (A, B) và hydrat hóa film (C,D): A. phân bố kích thước theo số tiểu phân đo bằng kỹ thuật NTA; B. phân bố KТП theo cường độ đo bằng kỹ thuật DLS; C. Phân bố KТП trước khi đun qua màng; D. Phân bố KТП sau khi đun qua màng 60 lần.

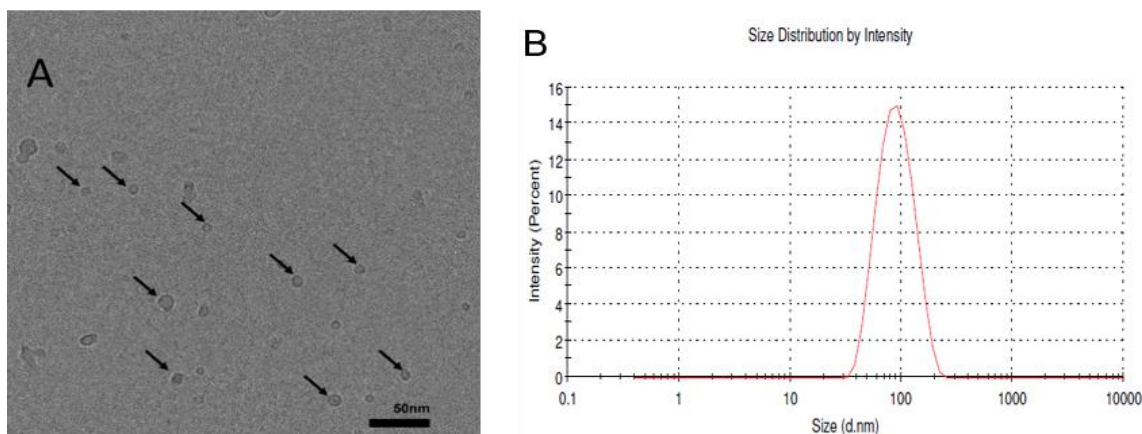
Từ kết quả ở bảng 3.15 và hình 3.8 cho thấy, liposome bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol cho KTTP trung bình nhỏ (dưới 300 nm), phân bố KTTP hẹp, với chỉ số PDI nhỏ hơn 0,3 ở tất cả các mẫu. Liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa cho kích thước tiểu phân to, KTTP trung bình lên đến hơn 800 nm, phân bố KTTP không đều, thể hiện ở chỉ số PDI đều lớn trên 0,3, nhiều mẫu chỉ số PDI lớn hơn 0,5. Sau khi đun qua màng, liposome có KTTP nhỏ hơn và phân bố KTTP hẹp lại, chỉ số đa phân tán PDI hầu hết đều nhỏ hơn 0,3.

Ảnh hưởng của phương pháp bào chế lên cấu trúc của liposome:

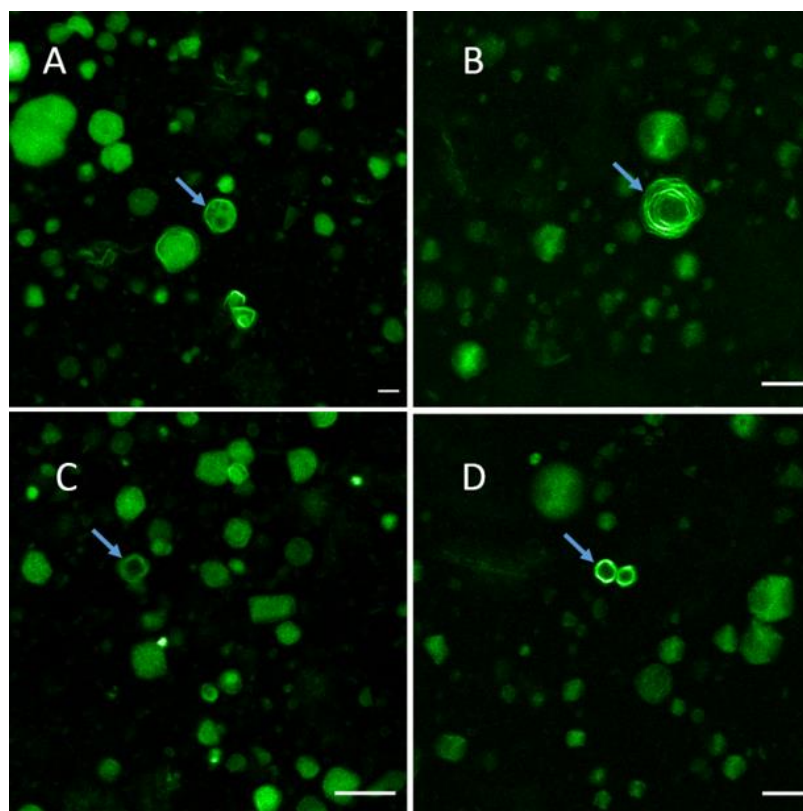
Tiến hành quan sát hình thái và cấu trúc của liposome BBR bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol bằng sử dụng kính hiển vi đông lạnh (Cryo-EM), kích thước tiểu phân của liposome được so sánh với kích thước đo bằng phương pháp DLS. Liposome BBR bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film được quan sát hình thái và cấu trúc bằng kính hiển vi huỳnh quang 2 photon. Kết quả được trình bày ở hình 3.9a, hình 3.9b và hình 3.10.



Hình 3.9a. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi đông lạnh (cryo-EM) về hình thái và cấu trúc của liposome BBR (mẫu FJ21) bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol (A) và phân bố KTTP của liposome BBR (mẫu FJ21) đo bằng DLS



Hình 3.9b. A. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi đông lạnh (cryo-EM) về hình thái và cấu trúc của liposome BBR (mẫu FJ17) bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol và B. phân bố KTTTP của liposome BBR (mẫu FJ17) đo bằng DLS



Hình 3.10. Hình ảnh cấu trúc của liposome BBR (mẫu FH12) bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film chụp bằng kính hiển vi huỳnh quang 2 photon: A. Cấu trúc nhiều ngăn (MVV); B. Cấu trúc nhiều lớp (MLV); C & D. Cấu trúc một lớp (UV). (Thang đo 10 μ m).

Từ kết quả ở hình 3.9a, 3.9b và 3.10 cho thấy, liposome BBR bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol cấu trúc 1 lớp nhỏ, kích thước dưới 300 nm. Trong lúc đó, liposome BBR bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film có hình cầu, cấu trúc đa dạng, gồm liposome nhiều ngăn, liposome nhiều lớp và có cả liposome 1 lớp.

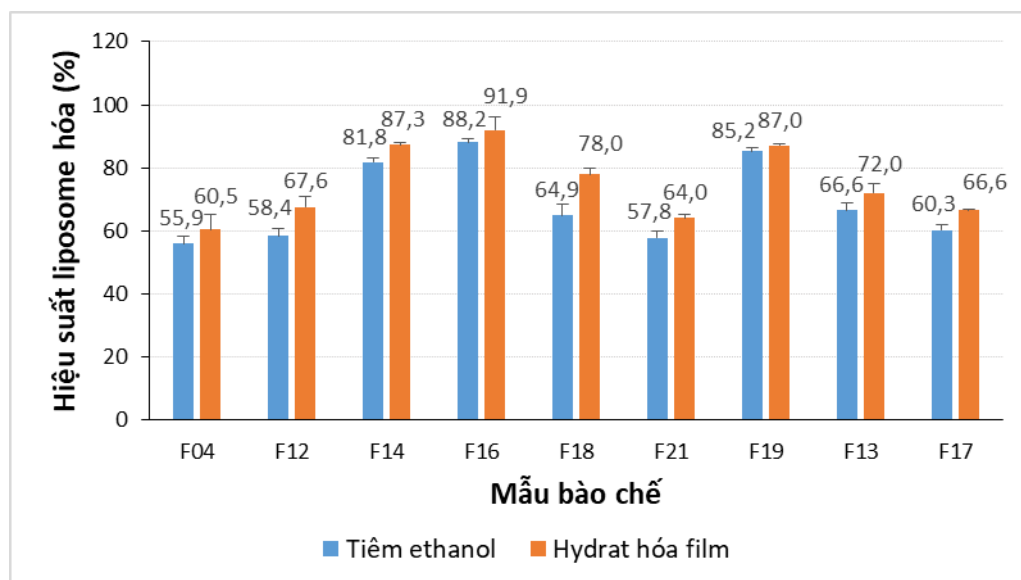
BBR có tính phát huỳnh quang tự nhiên, khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, BBR phát huỳnh quang cho ánh sáng xanh. Trong khi đó, các thành phần khác trong công thức không cho ánh huỳnh quang (phụ lục 3.6). Kết quả ở các hình 3.10A, B, C và D cho thấy, trong cấu trúc của liposome BBR, dược chất BBR tích lũy ở giữa màng phospholipid kép, tạo ra các vòng hình tròn phát huỳnh quang. Trong ngăn nước không chứa dược chất BBR.

Ảnh hưởng của phương pháp bào chế lên hiệu suất liposome hóa:

Hiệu suất liposome hóa của các mẫu liposome BBR bào chế bằng hai phương pháp tiêm ethanol và hydrat hóa film được trình bày ở bảng 3.16 và hình 3.11. Bằng sử dụng phép so sánh cặp (pair t-test) của phần mềm SPSS 20.0 để so sánh hiệu suất nạp của 2 phương pháp, kết quả cho thấy phương pháp hydrat hóa film cho hiệu suất nạp cao hơn so với phương pháp tiêm ethanol với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

Bảng 3.16. Hiệu suất liposome hóa của các mẫu liposome BBR bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol và hydrat hóa film (n=3-5, TB $\pm$ SD)

MẪU Phương pháp	F04	F12	F21	F14	F16	F18	F13	F17	F19
Tiêm ethanol	55,9 $\pm 2,4$	58,4 $\pm 2,5$	57,8 $\pm 2,1$	81,8 $\pm 1,4$	88,2 $\pm 1,2$	64,9 $\pm 3,5$	66,6 $\pm 2,2$	60,3 $\pm 1,6$	85,2 $\pm 1,0$
Hydrat hóa film	60,5 $\pm 4,6$	67,6 $\pm 3,1$	64,0 $\pm 1,4$	87,3 $\pm 0,8$	91,9 $\pm 4,2$	78,0 $\pm 1,7$	72,0 $\pm 3,0$	66,6 $\pm 0,4$	87,0 $\pm 0,6$



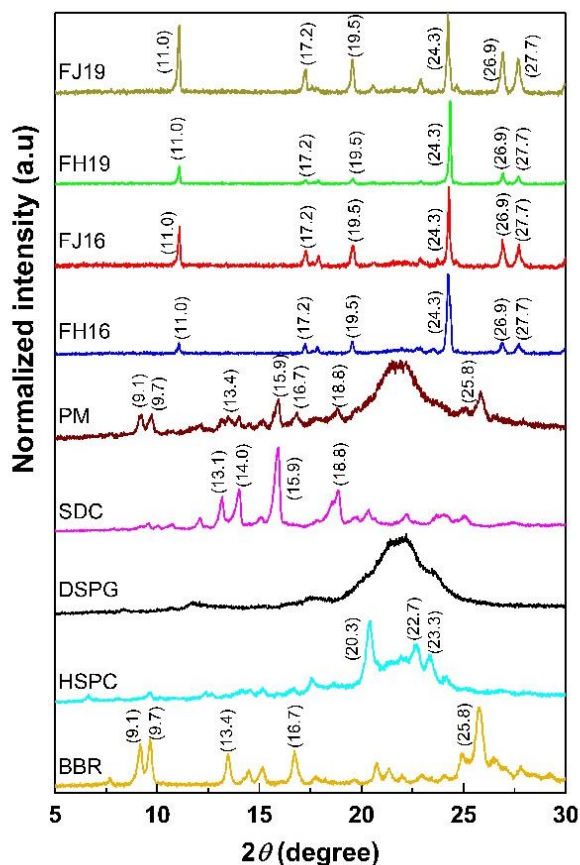
Hình 3.11. Hiệu suất liposome hóa của các mẫu liposome BBR bào chế theo hai phương pháp tiêm ethanol và hydrat hóa film

Ảnh hưởng của phương pháp bào chế lên trạng thái rắn của BBR trong liposome

Tiến hành đánh giá trạng thái rắn của BBR khi nạp vào liposome bằng phương pháp nhiễu xạ tia X ghi ở mục 2.3.4.5. Mẫu được chụp gồm liposome BBR bào chế bằng hai phương pháp tiêm ethanol (FJ16, FJ19) và hydrat hóa film (FH16, FH19). Song song, phổ nhiễu xạ tia X của các nguyên liệu cấu tạo nên liposome được đo để so sánh. Phổ nhiễu xạ tia X của nguyên liệu và các mẫu liposome BBR được biểu diễn ở hình 3.12 và phụ lục 3.7.

Kết quả ở hình 3.12, phụ lục 3.7 cho thấy, bột nguyên liệu BBR tồn tại ở dạng kết tinh nên có các pic nhiễu xạ đặc trưng tại các vị trí $9,1^\circ$, $9,7^\circ$, $13,4^\circ$, $16,7^\circ$, và $25,8^\circ$ 2 theta. DSPG có 1 pic rộng kéo dài từ $19,6^\circ$ đến $24,2^\circ$ 2 theta. HSPC cho các pic nhiễu xạ ở vị trí $20,3^\circ$, $22,7^\circ$ và $23,3^\circ$ 2 theta. NaDC tồn tại ở dạng kết tinh và cho các pic nhiễu xạ ở các vị trí $13,1^\circ$, 14° , $15,9^\circ$ và $18,8^\circ$ 2 theta. Phổ nhiễu xạ của hỗn hợp vật lý (PM) thể hiện đầy đủ các pic đặc trưng của các nguyên liệu ở các vị trí tương ứng. Ngược lại, các pic đặc trưng ở phổ nhiễu xạ của các mẫu liposome BBR FJ16, FJ19, FH16, FH19 bị dịch chuyển vị trí so với vị trí ban đầu của các nguyên liệu cấu tạo nên liposome trên thang độ 2 theta. Cụ thể, pic nhiễu xạ của BBR đã dịch chuyển sang các vị trí $11,0^\circ$, $17,2^\circ$, $19,5^\circ$, $24,3^\circ$, $26,9^\circ$ và $27,7^\circ$ 2 theta. Kết quả này cho thấy,

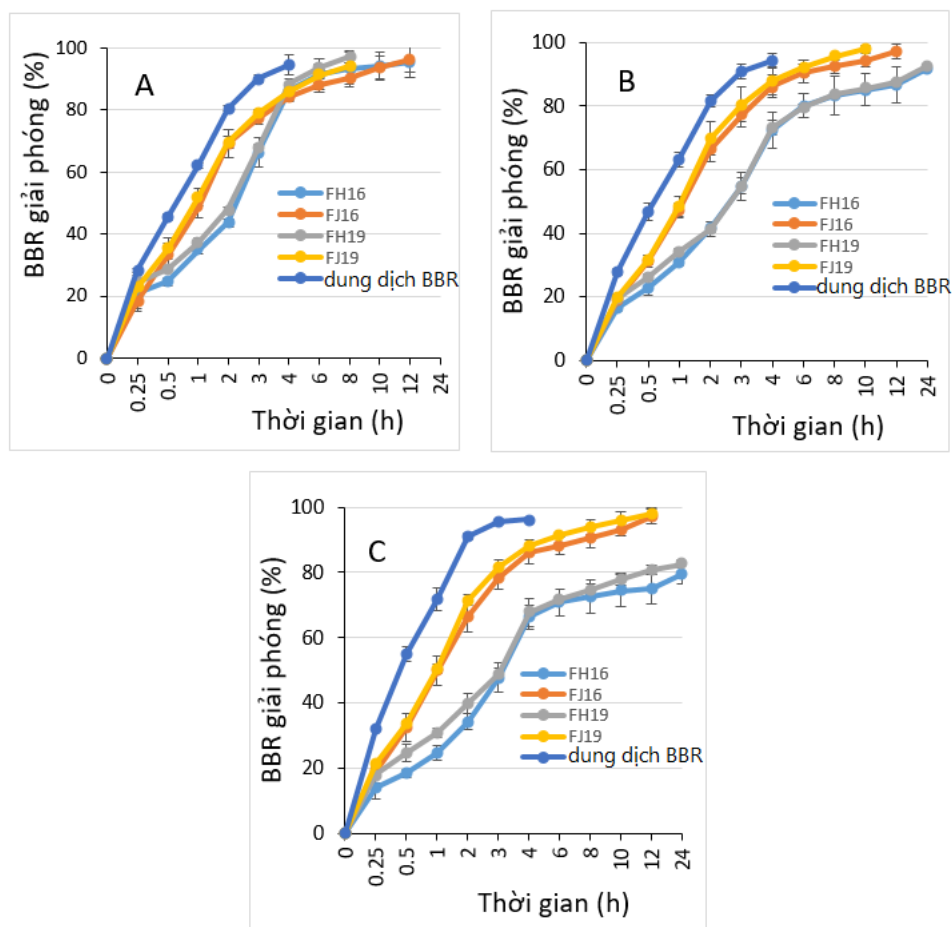
BBR trong liposome đã giảm bớt dạng kết tinh hoặc đã liên kết chặt chẽ với các thành phần khác trong công thức. Hơn nữa, các pic nhiễu xạ của các mẫu bào chế theo phương pháp tiêm ethanol (FJ16, FJ19) có cường độ cao hơn so với cường độ nhiễu xạ của các mẫu bào chế theo phương pháp hydrat hóa film (FH16, FH19). Điều này chứng tỏ sự liên kết giữa BBR với các thành phần khác trong liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film chặt chẽ hơn phương pháp tiêm ethanol.



Hình 3.12. Phổ nhiễu xạ tia X của liposome BBR và nguyên liệu cấu tạo nên liposome

Ảnh hưởng của phương pháp bào chế lên giải phóng dược chất in vitro:

Tiến hành đánh giá tốc độ giải phóng dược chất từ liposome BBR ở trong 3 môi trường giải phóng theo phương pháp trình bày ở mục 2.3.4.4. Các mẫu thử giải phóng gồm FJ16, FH16, FJ19, FH19 và mẫu nguyên liệu BBR để làm đối chứng. Thời gian thử giải phóng kéo dài 24 giờ. Thí nghiệm lặp lại 3 lần và tính kết quả trung bình. Kết quả được trình bày ở hình 3.13 và phụ lục 3.8.



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. Trong môi trường dung dịch acid hydrocloric 0,1N (pH = 1,2); B. Trong môi trường đệm phosphat pH4,5; C. Trong môi trường đệm phosphat pH 6,8.

Ở môi trường acid hydrocloric pH1,2 (hình 3.13A), trong vòng 4 giờ đầu, phần trăm BBR ở liposome FJ16 và FJ19 và cả FH16, FH19 giải phóng trên 80%, tỉ lệ này ở dung dịch BBR trên 95%. Ở môi trường mô phỏng dịch tá tràng (hình 3.13B), dược chất giải phóng từ liposome BBR FJ19 và FJ16 trong 2 giờ đầu xấp xỉ 65%. Trong lúc đó, tỉ lệ này ở liposome FH16 và FH19 xấp xỉ 40%, ở dung dịch BBR trên 80%. Trong 2 giờ tiếp theo, lượng BBR giải phóng đến 85% từ FJ16 và FJ19, 75% từ FH16 và FH19 và trên 95% từ dung dịch BBR. Trong vòng 8 giờ, tổng lượng BBR giải phóng đến 95% từ FJ16 và FJ19, hơn 80% từ FH16, FH19. Tỉ lệ này ở mẫu bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film đạt đến 90% trong 24 giờ. Trong khi đó, ở mẫu

bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol, khả năng giải phóng dược chất chỉ kéo dài đến 12 giờ.

Trong môi trường mô phỏng dịch ruột non (hình 3.13C), tốc độ giải phóng BBR từ dung dịch BBR tăng lên và từ các mẫu FJ và FH chậm lại so với ở môi trường acid hydrocloric 0,1N và đệm phosphat pH 4,5. Tốc độ giải phóng của các mẫu F16 chậm hơn so với các mẫu F19. Trong 2 giờ đầu, có 70% dược chất được giải phóng từ FJ19 và 65% giải phóng ở FJ16. Tỷ lệ này ở mẫu FH thấp hơn đáng kể, có 40% dược chất được giải phóng từ FH19 và có 35% giải phóng từ FH16. Phần trăm giải phóng BBR ở các mẫu FJ trong 2 giờ tiếp theo đạt trên 80%, trong lúc đó ở các mẫu FH chỉ dưới 65%. Các mẫu FJ kéo dài giải phóng trong vòng 12 giờ và đạt đến hơn 95% dược chất được giải phóng, ở mẫu FH khả năng giải phóng kéo dài trên 24 giờ và có xấp xỉ 80% dược chất được giải phóng ở thời điểm kết thúc.

Như vậy 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 tỷ lệ mol dược chất cao nên công thức của mẫu F19 được chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.4. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ PROLIPOSOME BERBERIN

Liposome mặc dù có nhiều ưu điểm, nhưng có nhược điểm chính là khó nâng cấp quy mô, kém ổn định và nồng độ dược chất thấp do tồn tại ở dạng hỗn dịch. Kết quả ở mục 3.3.4 cho thấy, mẫu liposome BBR bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film có hiệu suất nạp cao, có khả năng kéo dài thời gian giải phóng dược chất *in vitro* trong các môi trường mô phỏng dịch dạ dày, dịch ruột hơn so với mẫu bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol. Ngoài ra, liên kết giữa BBR với thành phần tạo vỏ trong liposome bào chế bằng hydrat hóa film chặt chẽ hơn trong liposome bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol. Vì vậy, nguyên lý hydrat hóa màng film để tạo thành liposome BBR được áp dụng trong bào chế proliposome BBR bằng cách tạo lớp film trên bề mặt chất mang tương tự như lớp film trên thành bình cầu trong bào chế liposome bằng phương pháp hydrat hóa film nhằm mục đích tăng hiệu suất nạp, kéo dài giải phóng dược chất, tăng liên kết giữa dược chất với tá dược tạo liposome để tăng hấp thu dược chất ở dạng liposome, tránh hiện tượng bơm ngược BBR. Trong nghiên cứu của luận án, phương pháp bao hạt được chọn để tạo màng film trên bề

mặt chất mang. Do đó, đề tài tiếp tục nghiên cứu bào chế proliposome BBR ở dạng rắn để khắc phục nhược điểm của liposome đồng thời tăng hiệu suất nạp, kéo dài khả năng giải phóng dược chất của liposome pha lại từ proliposome trong đường tiêu hóa.

3.4.1. Xác định một số thông số quy trình và lựa chọn công thức bào chế proliposome berberin

Tiến hành bào chế proliposome BBR bằng phương pháp bao hạt trên thiết bị bao tầng sôi. Chất mang được lựa chọn là manitol. Qua đánh giá phân bố KTTTP manitol bằng chụp SEM (hình 3.14) cho thấy manitol có kích thước từ 50-400 μm . Vì vậy, manitol được tiếp tục đánh giá tỉ lệ phân bố KTTTP bằng phương pháp rây, sử dụng các loại rây có kích cỡ mắt rây khác nhau: 125, 250, 500 μm . Kết quả cho thấy, manitol dưới rây 125 μm chiếm tỉ lệ 10,35%, manitol trong khoảng rây 250 và 500 μm chiếm tỉ lệ 26,39%, chiếm tỉ lệ lớn nhất là manitol có kích thước nằm trong khoảng từ 125-250 μm với 63,26%. Loại phần bột manitol dưới rây 125 μm , phân đoạn còn lại được đưa vào bào chế proliposome. Với thiết bị tầng sôi, qua khảo sát sơ bộ bằng quan sát thực tế, tốc độ phun dịch được chọn là 0,7 vòng/phút (tương ứng với 1,5 ml/phút) và áp suất đầu súng phun 0,7 bar với kiểu phun từ trên xuống.

Lựa chọn tốc độ thổi khí:

Tốc độ thổi khí là thông số ảnh hưởng đến khả năng treo và đảo hạt trong buồng sấy. Với thiết bị Mini-Glatt, tốc độ thổi khí tối thiểu là 8 m^3/h và tối đa là 20 m^3/h . Trong nghiên cứu, tốc độ thổi khí được khảo sát ở 2 mức là 10 m^3/h và 15 m^3/h . Tỉ lệ về khối lượng giữa thành phần tạo liposome với chất mang (manitol) được chọn cho khảo sát ban đầu là 1:1.

Lựa chọn nhiệt độ khí vào:

Hỗn hợp dung môi gồm methanol và cloroform là những dung môi dễ bay hơi. Khi được thổi gió trong buồng sấy, tốc độ bay hơi càng tăng. Vì vậy, nhiệt độ khí vào được khảo sát ở 2 mức nhiệt độ thấp 45 $^{\circ}\text{C}$ và 50 $^{\circ}\text{C}$. Nếu nhiệt độ thấp dưới 45 $^{\circ}\text{C}$, quá trình bốc hơi chậm, tiểu phân có hàm ẩm lớn sẽ kết dính lại với nhau làm quá trình bao hạt không đều. Ngược lại, nhiệt độ cao quá (trên 50 $^{\circ}\text{C}$) sẽ gần đến điểm sôi của dung môi, làm dung môi bay hơi quá nhanh.

Lựa chọn tỉ lệ khối lượng giữa thành phần tạo liposome và chất mang:

Tỉ lệ khối lượng giữa thành phần tạo liposome và chất mang được khảo sát để chọn được tỉ lệ phù hợp, sao cho chất mang mang được nhiều được chất nhằm tăng hàm lượng BBR trong proliposome nhưng không ảnh hưởng đến chất lượng hay đặc tính của liposome hoàn nguyên. Trong nghiên cứu này, 2 mức tỉ lệ khối lượng giữa thành phần tạo liposome: manitol được lựa chọn là 1 : 1 và 2 : 1.

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

Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của một số thông số quy trình và tỉ lệ khối lượng giữa thành phần tạo liposome với manitol như đã được lựa chọn ở mục 3.4.1 với tốc độ phun dịch 1,5ml/phút, áp suất phun 0,7 bar. Kết quả được trình bày ở bảng 3.17.

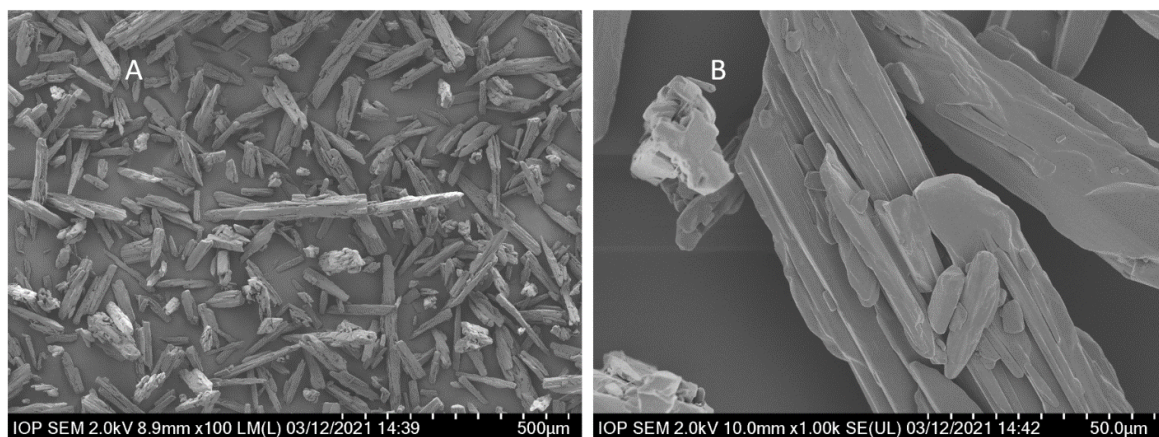
Bảng 3.17. Tỉ lệ khối lượng và thông số quy trình bào chế proliposome BBR bằng phương pháp bao hạt trên thiết bị bao tăng sôi

Ký hiệu công thức	Tỉ lệ khối lượng*	Tốc độ thổi khí (m³/h)	Nhiệt khí vào (°C)
FF19-1.1	1:1	15	50
FF19-1.2	1:1	10	50
FF19-1.3	1:1	10	45
FF19-2.1	2:1	10	45

Ghi chú: * là tỉ lệ khối lượng giữa thành phần tạo liposome BBR (BBR, HSPC, DSPG, NaDC và α -TP) và manitol.

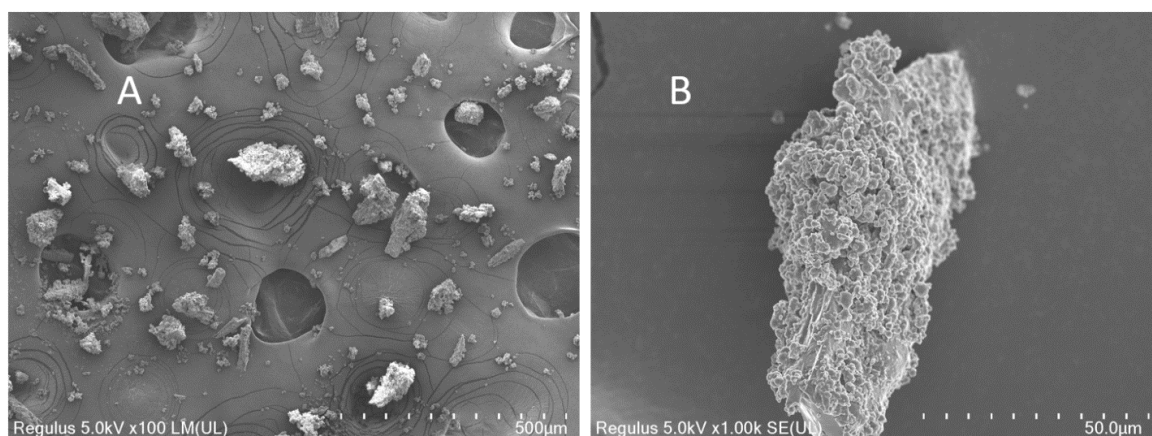
Ảnh hưởng của thông số quy trình đến hình thái và bề mặt proliposome BBR:

Tiến hành phun dịch phun chứa các thành phần tạo liposome lên chất mang manitol theo phương pháp như ở mục 2.3.4 với các thông số quy trình đã lựa chọn như ở bảng 3.17. Hình thái của proliposome BBR được biểu thị ở hình 3.15, 3.16, 3.17, 3.18. Hình 3.14 cho thấy manitol là những tiểu phân kết tinh hình gậy, có kích thước dưới 400 μ m, có bề mặt phẳng hoặc gồ ghề.

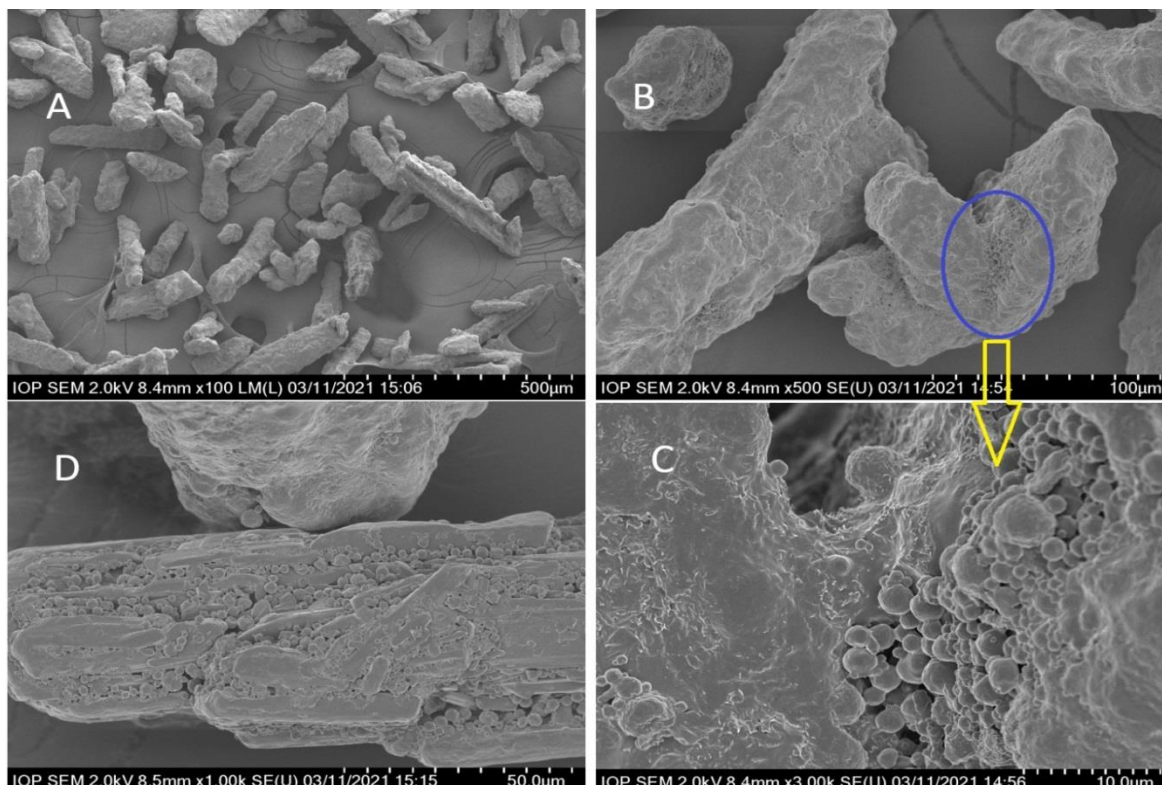


Hình 3.14. Hình thái của chất mang manitol quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét SEM: A. độ phóng đại 100 lần và B. độ phóng đại 1000 lần.

Proliposome BBR mẫu FF19-1.1 (hình 3.15) có hình dạng và kích thước không đều, có những hạt mịn do dịch phun không bám được lên chất mang và khô lại. Một số tiểu phân chất mang được bám quá nhiều dịch phun và ngược lại, một số tiểu phân manitol không được bám hoặc được bám rất ít thành phần tạo liposome. Dịch phun bám trên bề mặt chất mang khi khô lại không tạo thành film mà tạo thành các cụm tiểu phân kết dính không đều (hình 3.15B).

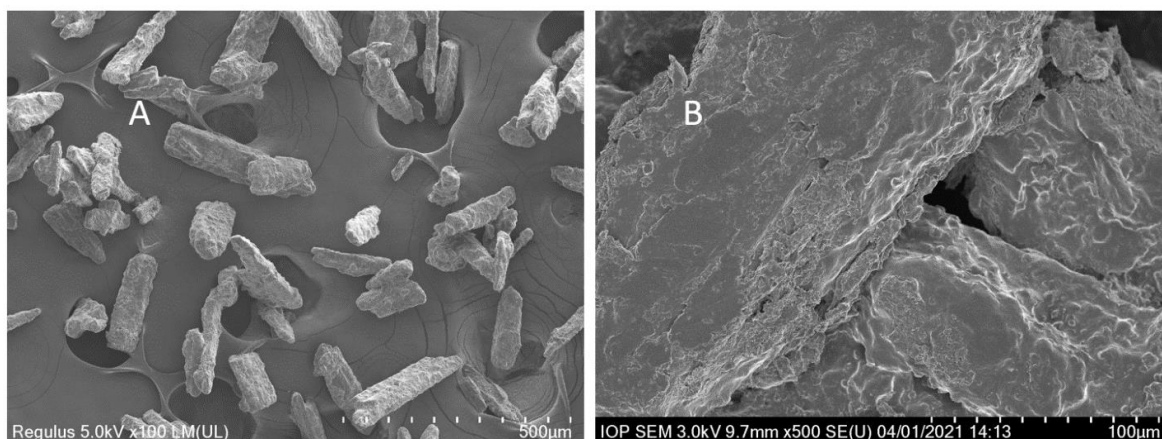


Hình 3.15. Hình thái của proliposome BBR mẫu FF19-1.1 quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét SEM: A. độ phóng đại 100 lần; B. độ phóng đại 1000 lần

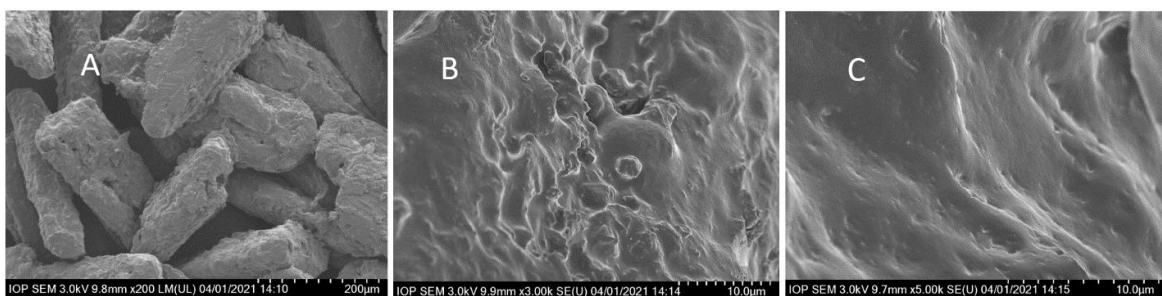


Hình 3.16. Hình thái và bề mặt của proliposome BBR mẫu FF19-1.2 dưới kính hiển vi điện tử quét SEM: A. Hình thái proliposome BBR (độ phóng đại 100 lần); B. Bề mặt proliposome BBR (độ phóng đại 500 lần); C. Bề mặt của proliposome BBR (độ phóng đại 3.000 lần); D. Bề mặt proliposome BBR (độ phóng đại 1000 lần)

Proliposome BBR mẫu FF19-1.2 (hình 3.16) có hình gậy giống chất mang manitol, KTTP khá đều đặn, chứng tỏ dịch phun đã bám đều lên chất mang. Tuy nhiên, trên bề mặt chất mang vừa có màng film tạo thành ở bề mặt nhẵn vừa có các vi cầu tạo thành ở những vị trí bề mặt gồ ghề (hình 3.16B, C). Với những tiểu phân chất mang có bề mặt gồ ghề xù xì, trên bề mặt hoàn toàn không có lớp film mà chỉ có vi cầu tạo thành (hình 3.16D).



Hình 3.17. Hình thái và bề mặt của proliposome BBR mẫu FF19-1.3 dưới kính hiển vi điện tử quét SEM: A. Hình thái proliposome BBR (độ phóng đại 100 lần); B. Bề mặt proliposome (độ phóng đại 500 lần)



Hình 3.18. Hình thái và bề mặt của proliposome BBR mẫu FF19-2.1 dưới kính hiển vi điện tử quét SEM: A. Hình thái proliposome BBR (độ phóng đại 200 lần); B. Bề mặt proliposome ở vị trí gồ ghề (độ phóng đại 3000 lần); C. Bề mặt proliposome ở vị trí gồ ghề (độ phóng đại 5000 lần)

Hình thái của proliposome BBR mẫu FF19-1.3 (hình 3.17) và proliposome BBR mẫu FF19-2.1 (hình 3.18) có hình gậy giống hình thái của manitol, KTTTP đều đặn. Bề mặt chất mang manitol được tráng đều lớp film của các thành phần tạo liposome, kể cả ở những vị trí bề mặt gồ ghề (hình 3.17B, hình 3.18B, C). Vì vậy, thông số quy trình với tốc độ thổi khí 10 m³/h và nhiệt khí vào 45 °C, áp suất phun 0,7 bar, tốc độ phun dịch 1,5 ml/phút là phù hợp để bào chế proliposome BBR theo phương pháp bao hạt trên thiết bị tăng sôi.

Ảnh hưởng của thông số quy trình và công thức đến mất khối lượng do làm khô, hàm lượng của proliposome BBR:

Xác định mất khối lượng do làm khô theo mục 2.3.6.4 và định lượng hàm lượng

BBR theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.6.5 cho các mẫu proliposome BBR FF19-1.1, FF19-1.2, FF19-1.3 và FF19-2.1. Kết quả được trình bày ở bảng 3.18.

Bảng 3.18. Mất khối lượng do làm khô và hàm lượng BBR của proliposome BBR (n=3, TB ± SD)

Mẫu	Mất khối lượng do làm khô (%)	Hàm lượng BBR (%)
FF19-1.1	3,37 ± 0,31	11,6 ± 6,3
FF19-1.2	3,63 ± 0,40	9,7 ± 1,3
FF19-1.3	3,53 ± 0,35	11,1 ± 0,6
FF19-2.1	3,42 ± 0,27	14,7 ± 1,0

Nhận xét: Từ kết quả của bảng trên, cho thấy mất khối lượng do làm khô của các mẫu đều dưới 4%. Hàm lượng dược chất của các mẫu có tỉ lệ khối lượng 1: 1 nằm trong khoảng từ 9,7 – 11,6%. Riêng với mẫu FF19-2.1 có tỉ lệ khối lượng 2:1 nên hàm lượng dược chất đạt đến khoảng 15%. Biến thiên về hàm lượng của mẫu FF19-1.1 giữa các lần định lượng lớn nhất, đến 6,3%. Kết quả này cho thấy hàm lượng giữa các trong mẫu không đều. Các mẫu còn lại có biến thiên hàm lượng hẹp, dưới 1,5%.

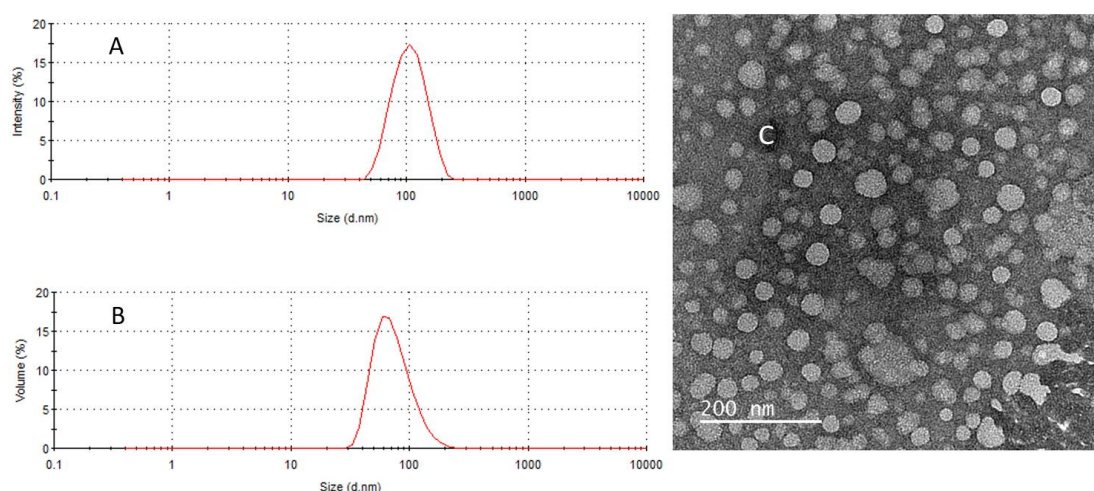
KTTP, phân bố KTTP và hiệu suất nạp của liposome tạo thành từ proliposome BBR:

Tiến hành hydrat hóa các mẫu proliposome BBR FF19-1.1, FF19-1.2, FF19-1.3 và FF19-2.1 theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.6.3. Mẫu liposome tạo thành tương ứng được đo KTTP và phân bố KTTP theo phương pháp ghi ở mục 2.3.4.2, đánh giá hiệu suất liposome hóa theo mục 2.3.4.3. Kết quả được trình bày ở bảng 3.19, hình 3.19.

Bảng 3.19. KTTP, phân bố KTTP và hiệu suất nạp dược chất của liposome tạo thành từ proliposome BBR (n=3, TB ± SD)

Mẫu	KTTP TB (d.nm)	PDI	Hiệu suất liposome hóa (%)
FF19-1.2	682,9 ± 288,6	0,915 ± 0,075	-
FF19-1.3	123,5 ± 10,8	0,293 ± 0,028	87,3 ± 1,5
FF19-2.1	116,6 ± 5,8	0,269 ± 0,038	87,8 ± 1,0

Kết quả cho thấy liposome tạo thành từ proliposome berberin của mẫu FF19-1.2 có KTTP và phân bố KTTP lớn. Mẫu FF19-1.3, FF19-2.1 có KTTP và phân bố KTTP nhỏ. Như vậy, yếu tố thông số quy trình đã ảnh hưởng đáng kể đến kích thước và phân bố kích thước của liposome tạo thành. Hiệu suất liposome hóa của hai mẫu FF19-1.3, FF19-2.1 tương đương nhau, đạt 87%. Trong số các mẫu proliposome BBR trên thì mẫu FF19-2.1 là mẫu có nhiều ưu điểm nhất, vừa có KTTP nhỏ, phân bố KTTP hẹp, vừa có hiệu suất nạp cao và hàm lượng dược chất lớn. Vì vậy, mẫu FF19-2.1 được chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.19. Liposome BBR tạo thành từ proliposome BBR mẫu FF19-2.1. A. Phân bố KTTP theo cường độ; B. Phân bố KTTP theo thể tích; C. hình thái liposome BBR chụp qua TEM

3.4.3. Đánh giá một số đặc tính của proliposome berberin

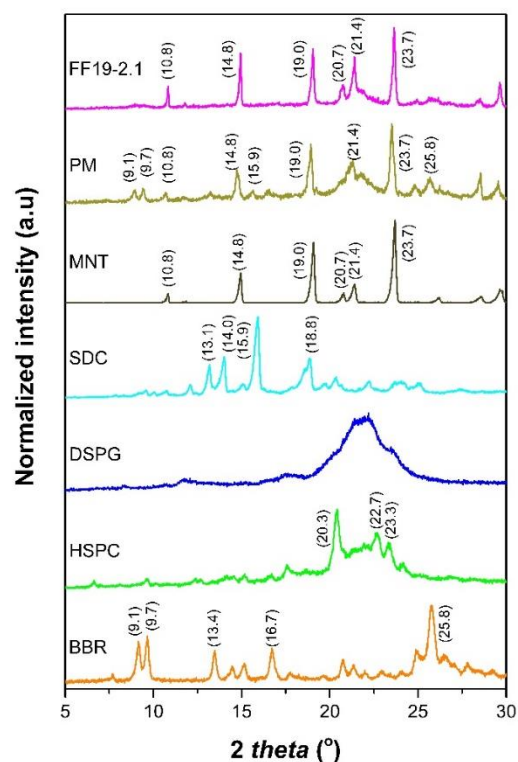
Trên cơ sở lựa chọn ở trên, mẫu proliposome FF19-2.1 tiếp tục được đánh giá một số đặc tính khác như sau:

3.4.3.1. Đặc tính lý hóa

Đặc tính lý hóa của proliposome BBR được đánh giá bằng đo phổ nhiễu xạ tia X và phổ hồng ngoại theo phương pháp như ở các mục 2.3.2.1b, c.

Phổ nhiễu xạ tia X:

Phổ nhiễu xạ tia X của proliposome BBR mẫu FF19-2.1 được thể hiện ở hình 3.20, phụ lục 3.7 và phụ lục 3.9.



Hình 3.20. Phổ nhiễu xạ tia X của BBR, HSPC, DSPG, NaDC (SDC), MNT, hỗn hợp vật lý (PM) và proliposome BBR FF19-2.1

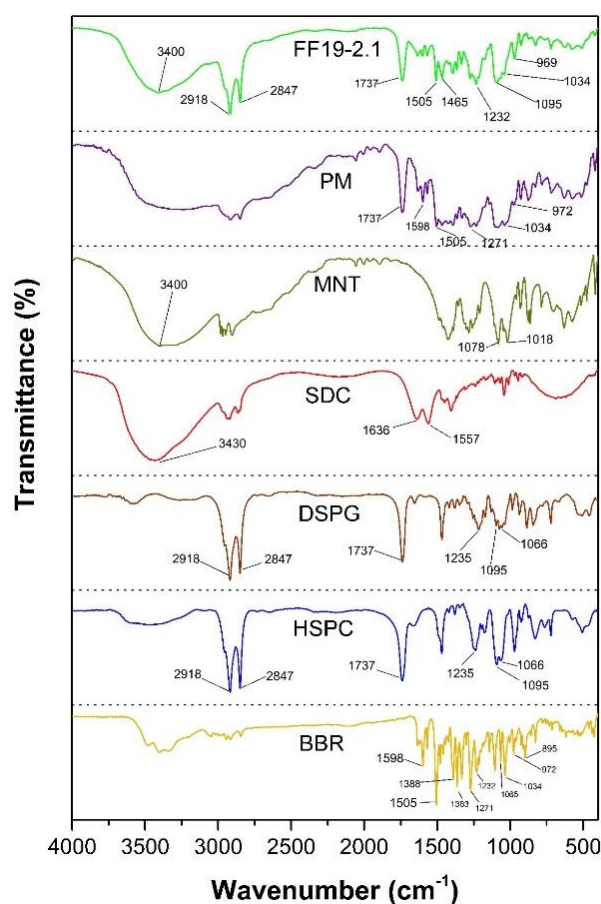
Hình 3.20 cho thấy, manitol tồn tại ở dạng kết tinh, thể hiện nhiều đỉnh nhiễu xạ cường độ mạnh tại các vị trí $10,8^\circ$, $14,8^\circ$, $19,0^\circ$, $20,7^\circ$, $21,4^\circ$, $23,7^\circ$ 2θ . Phổ nhiễu xạ của hỗn hợp vật lý (PM) có đầy đủ các đỉnh nhiễu xạ của BBR, HSPC, DSPG, NaDC (SDC), MNT chứng tỏ sự có mặt đầy đủ các thành phần trên nhưng không xảy ra tương tác nào trong hỗn hợp vật lý. Mẫu proliposome BBR có một số đỉnh nhiễu xạ tại vị trí trùng với đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của manitol. Trên phổ đồ nhiễu xạ của proliposome, không xuất hiện các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của BBR, và một số thành phần khác như NaDC, HSPC và DSPG. Kết quả này chứng tỏ BBR khi được bào chế thành proliposome đã chuyển từ dạng kết tinh sang dạng vô định hình.

Phổ hồng ngoại FTIR:

Phổ hồng ngoại được thể hiện ở hình 3.21 và phụ lục 3.10. BBR có các tín hiệu của dao động đặc trưng của nhóm aryl ether oxyd (ArC-O-CH_3), dị vòng N 6 cạnh, nhóm ether vòng và nhóm ether vòng thơm (như đã trình bày ở mục 3.2.1.3). HSPC và DSPG đều có nhóm P=O tạo nên dao động 1235 cm^{-1} và nhóm P-O^- gây ra dao

động tại số sóng 1096 cm^{-1} và 1066 cm^{-1} . Nhóm chức ester (COO^-) tạo nên dao động mạnh tại vị trí 1737 cm^{-1} . Dao động của H ở liên kết C-H trong mạch carbon của 2 lipid này tạo ra 2 tín hiệu mạnh ở 2918 cm^{-1} và 2847 cm^{-1} . Dao động của H trong liên kết O-H của NaDC tạo ra tín hiệu với cường độ mạnh và phổ rộng có đỉnh tại 3430 cm^{-1} . Nhóm gốc acid (COO^-) của NaDC tạo ra dao động rất mạnh tại 1557 cm^{-1} and 1636 cm^{-1} . Manitol có nhóm nhóm O-H enol tạo ra dao động mạnh và phổ rộng tại đỉnh 3400 cm^{-1} và nhóm chức ($-\text{CH}_2\text{-OH}$) tạo ra 2 tín hiệu ở 1078 cm^{-1} và 1018 cm^{-1} . Hỗn hợp vật lý có 1 phổ rất rộng với cường độ mạnh kéo dài từ 3400 cm^{-1} to 2847 cm^{-1} , là kết quả của sự chồng phổ của các các nhóm chức O-H của NaDC, O-H của manitol và C-H của mạch carbon của 2 lipid HSPC, DSPG. Phổ hồng ngoại của hỗn hợp vật lý còn thể hiện pic dao động mạnh của nhóm chức ester của 2 lipid tại số sóng 1737 cm^{-1} và 1 tín hiệu mạnh của nhóm chức dị vòng ni-tơ 6 cạnh của BBR tại số sóng 1598 cm^{-1} . Các dải hấp thụ còn lại của BBR trong hỗn hợp vật lý bị các dải hấp thụ của các nhóm chức của HSPC, DSPG, MNT và NaDC phủ lên, tạo ra một dải hấp thụ với cường độ mạnh và biên độ lớn với các đỉnh pic ở 1505 cm^{-1} , 1272 cm^{-1} , 1034 cm^{-1} . Điều này chứng tỏ sự có mặt của tất cả các thành phần trong hỗn hợp vật lý nhưng không có sự tương tác giữa các thành phần với nhau.

Phổ hồng ngoại của proliposome BBR FF19-2.1 có các tín hiệu đặc trưng của BBR ở 1505 cm^{-1} , mannitol ở 3400 cm^{-1} , HSPC và DSPG ở 2918 cm^{-1} , chứng tỏ có sự có mặt BBR, HSPC, DSPG trong proliposome BBR FF19-2.1. Một vài tín hiệu đặc trưng của BBR và các thành phần khác trong phổ hấp thụ hồng ngoại của proliposome bị biến mất (dao động ở số sóng 1598 cm^{-1} , 1388 cm^{-1} và 1363 cm^{-1}) 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.



Hình 3.21. Phổ hồng ngoại FTIR của BBR, HSPC, DSPG, NaDC (SDC), MNT, hỗn hợp vật lý (PM) và proliposome BBR FF19-2.1

3.4.3.2. Hiệu suất quá trình, khối lượng riêng biểu kiến

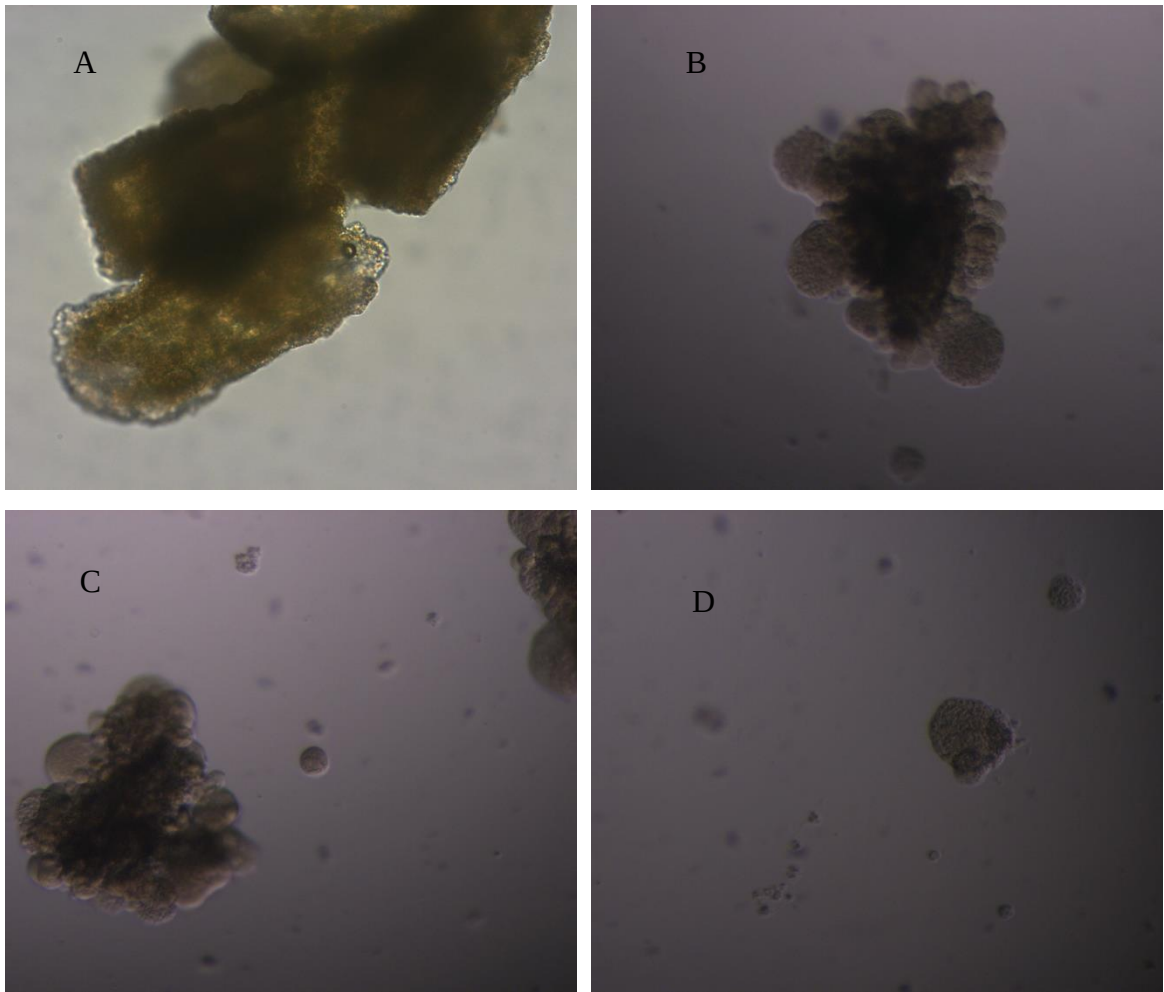
Hiệu suất quá trình bao tăng sôi và khối lượng riêng biểu kiến được đánh giá theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.6.6 và 2.3.6.8. Kết quả được trình bày ở bảng 3.20.

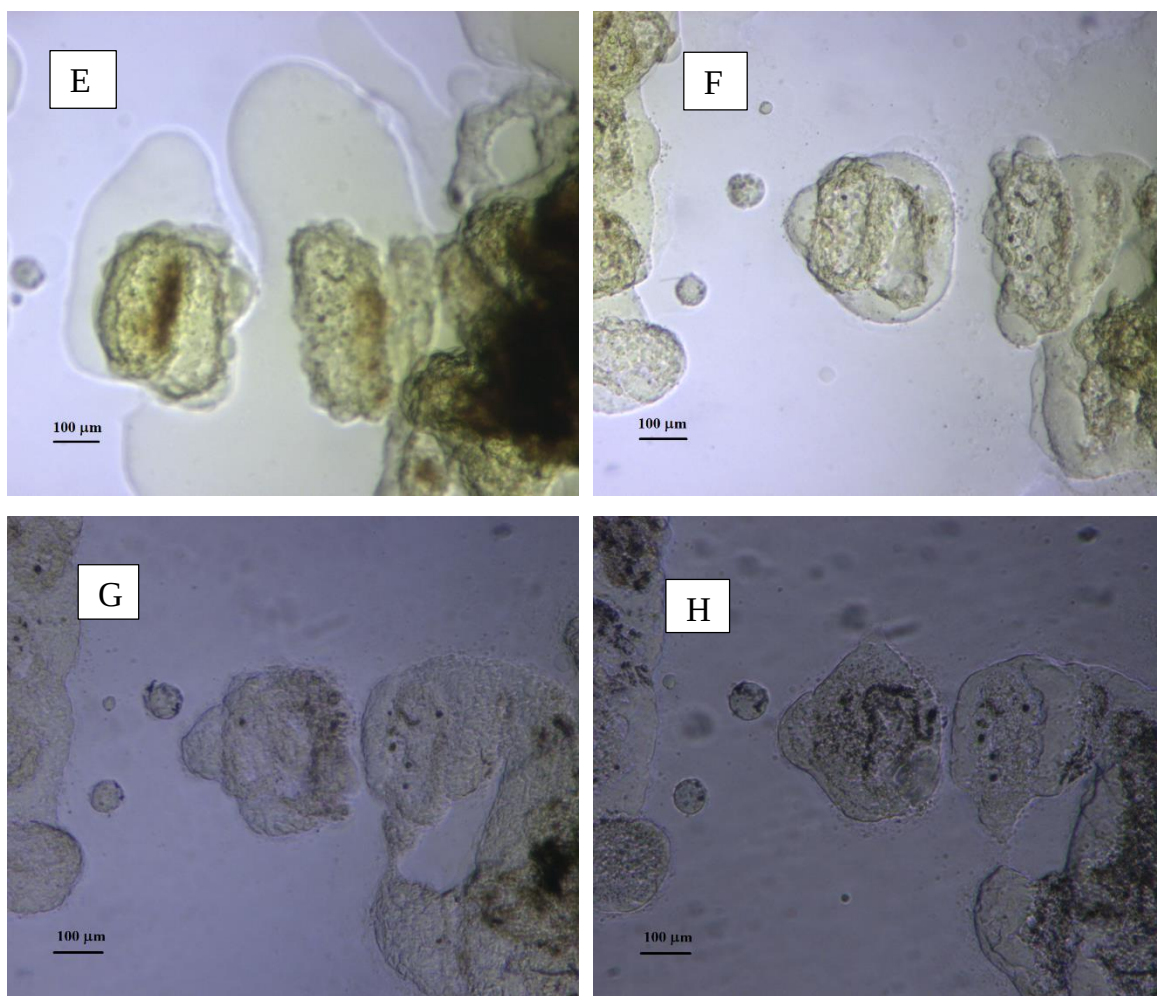
Bảng 3.20. Hiệu suất, khối lượng riêng biểu kiến của proliposome BBR bào chế trên máy Mini-Glatt ($n=3$, $TB \pm SD$)

Mẻ	Hiệu suất quá trình (%)	Khối lượng riêng biểu kiến (g/ml)
1	80,7	$0,453 \pm 0,02$
2	86,2	$0,458 \pm 0,05$
3	83,9	$0,465 \pm 0,08$
Trung bình	$83,6 \pm 2,7$	$0,459 \pm 0,01$

3.4.3.3. Khả năng hydrat hóa

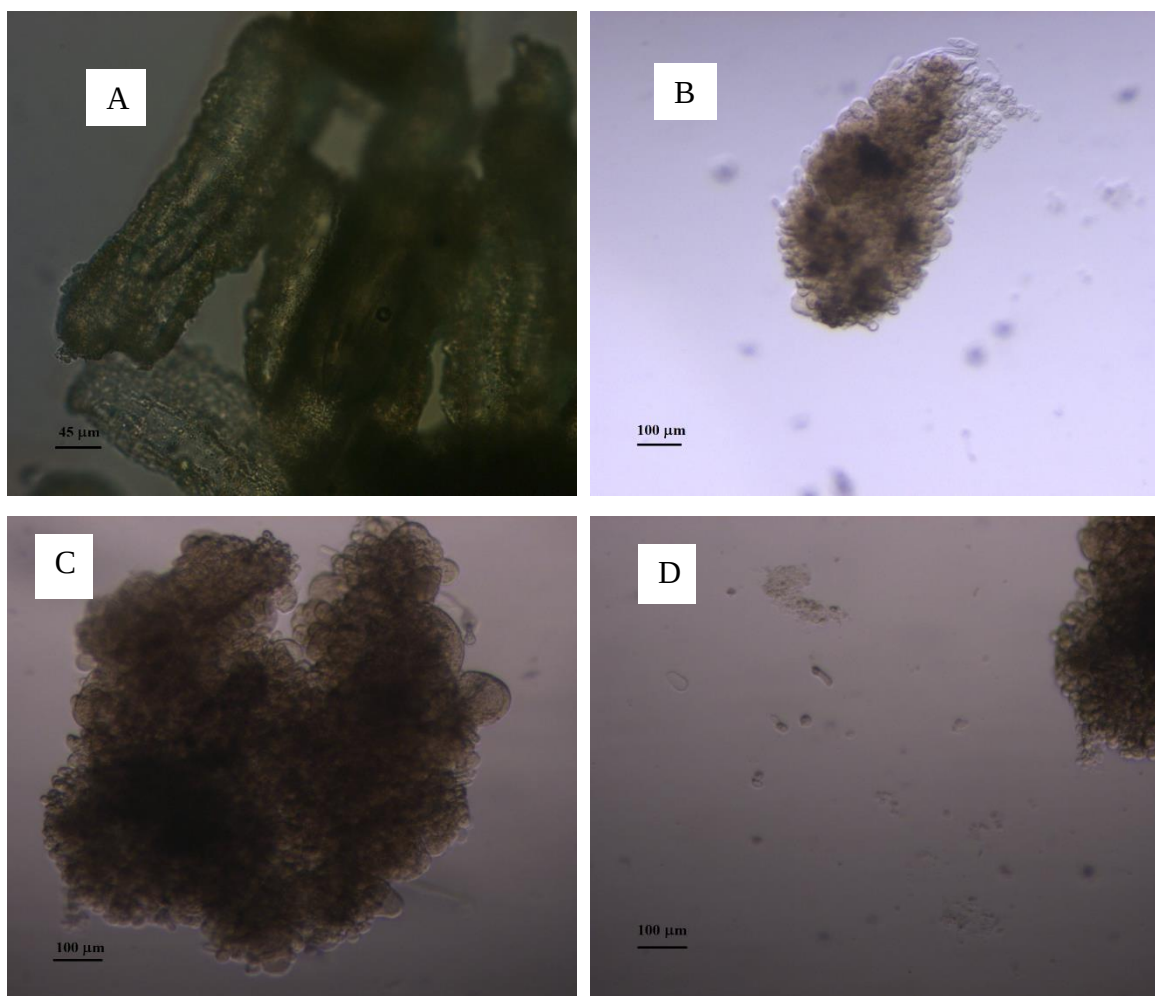
Tiến hành đánh giá khả năng hydrat hóa của proliposome BBR trong 3 môi trường: dung dịch acid hydrochloric 0,1N (pH 1,2), đệm phosphat pH 4,5, đệm phosphat pH 6,8 như mô tả ở mục 2.3.6.9. Kết quả được thể hiện ở hình 3.22, hình 3.23 và hình 3.24.





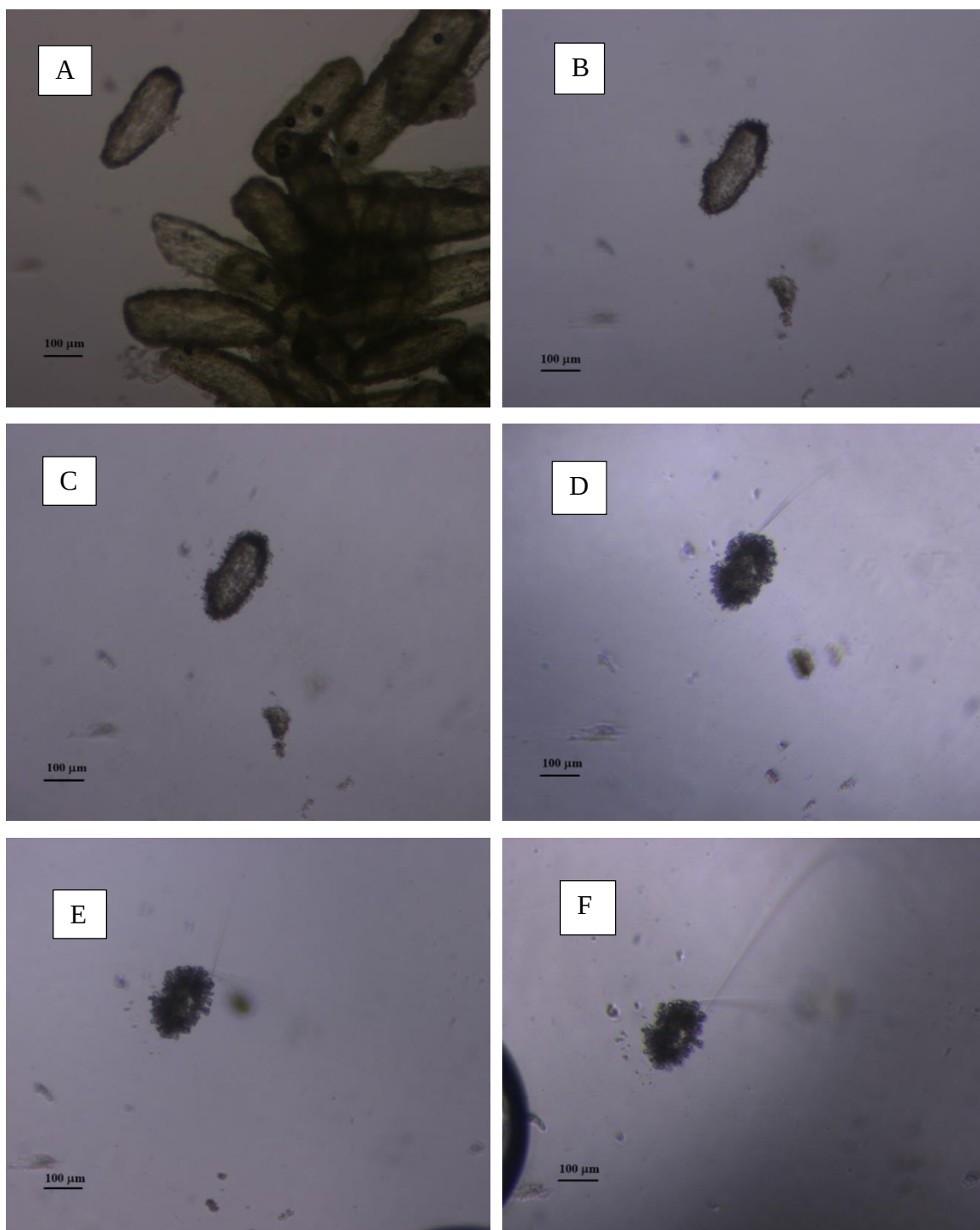
Hình 3.22. Hình ảnh hydrat hóa trong môi trường pH 1,2 màng film trên tiểu phân proliposome BBR chụp bằng kính hiển vi điện tử quét laser (CLSM): A. Ngay khi cho vào môi trường; B, C, D, E. sau vài giây; F. sau 2 phút; G. Sau 10 phút; H. Sau 30 phút

Kết quả ở hình 3.22 cho thấy trong môi trường acid pH 1,2, lớp màng film ngay lập tức được thấm nhanh môi trường và trương phồng lên thành lớp bóng bao bọc tiểu phân (hình 3.22 B, C, D, E). Lớp này sau đó này bị thụ động hóa, bề mặt trở nên chắc chắn và trơ với môi trường, không tiếp tục quá trình hydrat hóa hoặc bị hydrat hóa rất chậm (hình 3.22 F, G, H).



Hình 3.23. Hình ảnh hydrat hóa màng film trên tiểu phân proliposome BBR trong môi trường pH 4,5 chụp bằng kính hiển vi điện tử quét laser (CLSM): A. ngay khi tiếp xúc môi trường hydrat hóa (vật kính 10x); B và C. sau khi bị hydrat hóa phồng lên những túi nhỏ (vật kính 4x); D. các túi nhỏ bị bong ra thành những túi nhỏ hơn (vật kính 4x)

Trong môi trường đệm phosphate pH 4,5, lớp màng film được hydrat hóa nhanh, tạo trên bề mặt proliposome nhiều bóng xốp nhỏ đều đặn (hình 3.23 B, C). Sau đó, các bóng xốp này tiếp tục được hydrat hóa để tạo ra những bóng nhỏ hơn và bong ra khỏi bề mặt tiểu phân proliposome rồi phân tán ra môi trường (hình 3.23 B, D).

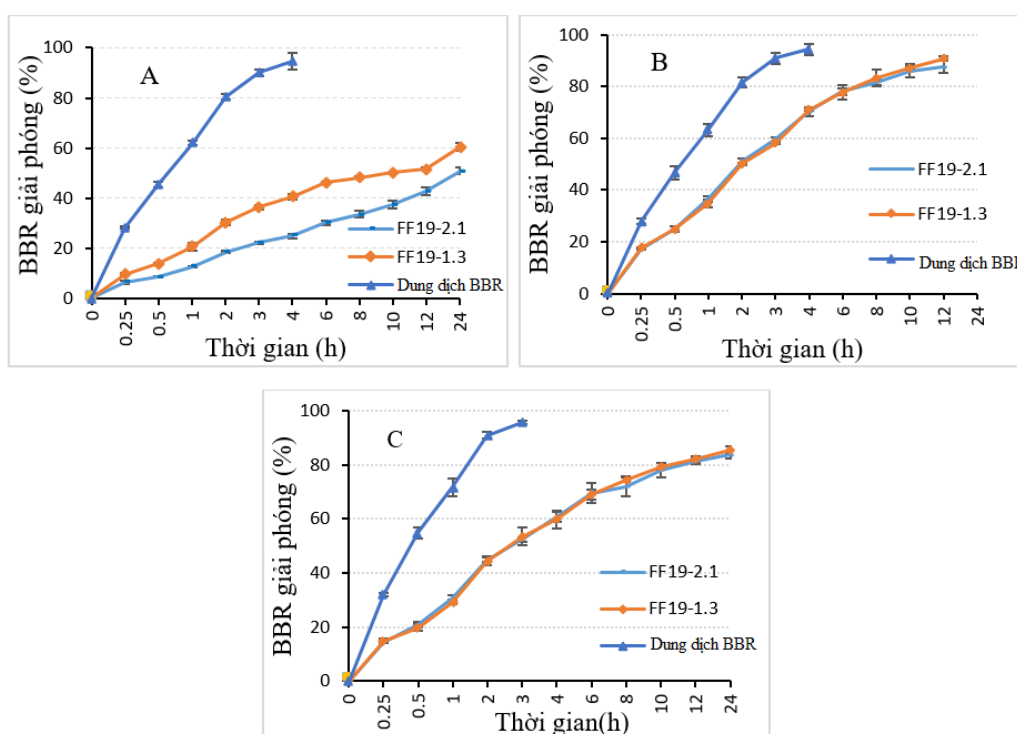


Hình 3.24. Hình ảnh hydrat hóa màng film trên tiểu phân proliposome BBR trong môi trường pH 6,8 chụp bằng kính hiển vi điện tử quét laser (CLSM): A. Ngay khi tiếp xúc môi trường hydrat hóa; B và C Một tiểu phân bắt đầu hydrat hóa màng film để tạo thành những nhung mao xung quanh tiểu phân; D, E, F. Những nhung mao tiếp tục được hydrat hóa để tạo thành những túi nhỏ xung quanh tiểu phân tạo bề mặt xốp và bong ra khỏi tiểu phân và phân tán ra môi trường

Trong môi trường đệm phosphat pH 6,8, lớp màng film được hydrat hóa nhanh, tạo trên bề mặt proliposome các vi nhung mao. Sau đó, vi nhung mao này tiếp tục được hydrat hóa để tạo ra những túi nhỏ hơn và phân tán ra môi trường (hình 3.24 D, E, F).

3.4.3.4. Khả năng giải phóng dược chất

Tiến hành đánh giá khả năng giải phóng dược chất từ proliposome BBR FF19-2.1 và proliposome BBR mẫu FF19-1.3 trong 3 môi trường khác nhau theo phương pháp đã trình bày ở mục 2.3.5.10. Kết quả được thể hiện ở hình 3.25.



Hình 3.25. Phần trăm giải phóng qua màng thẩm tích của dược chất từ proliposome BBR mẫu FF19-1.3 và FF19-2.1 bào chế bằng phương pháp bao hạt trong 3 môi trường giải phóng ở 37 °C (n=3, TB ± SD). A. Trong môi trường dung dịch acid HCl 0,1N (pH = 1,2); B. Trong môi trường đệm phosphat pH4,5; C. Trong môi trường đệm phosphat pH 6,8

Hình 3.25A biểu diễn tốc độ giải phóng BBR trong môi trường acid HCl 0,1N (pH 1,2). Có sự khác biệt về tốc độ giải phóng giữa hai mẫu FF19-1.3 và FF19-2.1. Trong vòng 4 giờ đầu, phần trăm giải phóng dược chất từ proliposome BBR mẫu FF19-2.1 đạt khoảng 25%, trong lúc mẫu FF19-1.3 đạt khoảng 40%. Trong khoảng

thời gian này, dung dịch BBR giải phóng đến 95% dược chất.

Kết quả ở hình 3.25B và C cho thấy tốc độ giải phóng BBR trong môi trường đệm phosphat pH 4,5 và pH 6,8 của 2 mẫu FF19-1.3 và FF19-2.1 là tương tự nhau. Trong vòng 4 giờ đầu, ở trong môi trường đệm phosphat pH 4,5, phần trăm giải phóng dược chất từ proliposome BBR đạt 70,3%, từ dung dịch BBR đạt trên 95%. Trong lúc đó cũng trong vòng 4 giờ đầu, phần trăm giải phóng dược chất từ proliposome ở môi trường đệm phosphat pH 6,8 là 60,8%. Trong vòng 12 giờ, tổng lượng BBR giải phóng trong môi trường đệm phosphat pH 4,5 và pH 6,8 lần lượt là 87,6% và 81,5%. Trong 24 giờ, tỉ lệ giải phóng dược chất trong môi trường đệm phosphat pH 6,8 xấp xỉ 85%.

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

3.4.4.1. Bào chế proliposome berberin quy mô 25 g/mẻ

Proliposome BBR bào chế theo công thức FF19-2.1 vừa có hàm lượng BBR cao, hiệu suất nạp lớn (87%), có khả năng kéo dài thời gian giải phóng dược chất *in vitro* trong các môi trường acid dịch vị pH 1,2, môi trường đệm phosphat pH 4,5, môi trường đệm phosphat pH 6,8 lần lượt là hơn 24 giờ, đến 12 giờ và đến 24 giờ. Ngoài ra, KTTP của liposome BBR tạo thành từ proliposome BBR nhỏ, phân bố KTTP hẹp. Vì vậy, công thức bào chế proliposome BBR mẫu FF19-2.1 được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo như trình bày ở bảng 3.21.

Bảng 3.21. Công thức bào chế proliposome BBR qui mô 25 g/mẻ bằng phương pháp bao hạt trên thiết bị tăng sôi Mini-Glatt

Thành phần công thức	Tỉ lệ mol	Số mmol/mẻ	Khối lượng cho 1 mẻ (g)
Berberin	8	12	4,04
α -tocopherol	2	3	1,29
NaDC	2	3	1,24
HSPC	3,6	5,4	4,25
DSPG	5,4	8,1	6,31
Manitol			8,6
Dung môi (bay hơi trong quá trình bào chế)			
Methanol			225 ml
Cloroform			90ml

3.4.4.2. Quy trình bào chế proliposome berberin bằng phương pháp bao hạt

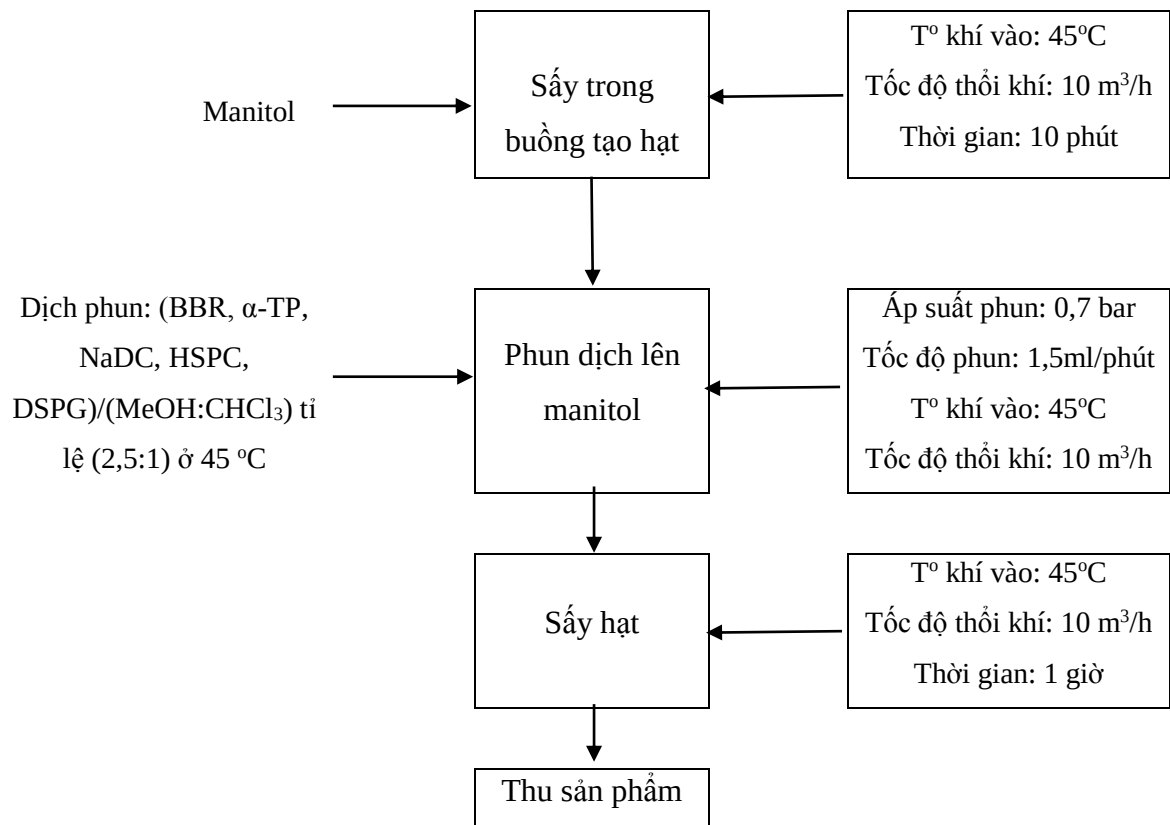
Chuẩn bị dụng cụ, thiết bị trước pha chế:

- Các dụng cụ pha chế, thiết bị máy móc được vệ sinh sạch sẽ, đảm bảo khô

và sạch trước khi sử dụng.

Chuẩn bị nguyên liệu trước pha chế:

- Sấy manitol ở nhiệt độ 70°C trong tủ sấy tĩnh trong thời gian 1 giờ.
- Các nguyên liệu dùng pha chế được cân, đóng theo đúng công thức, đủ số lượng.



Hình 3.26. Sơ đồ các bước bào chế proliposome BBR bằng máy bao tầng sôi Mini-Glatt

Mô tả quy trình:

- Cân các nguyên liệu BBR, α-TP, NaDC, HSPC, DSPG theo công thức rồi hòa tan bằng siêu âm hỗn hợp trên trong dụng cụ kín với hỗn hợp dung môi (MeOH: CHCl₃) tỉ lệ (2,5:1), gia nhiệt lên 45 °C để tăng độ tan và tốc độ tan của nguyên liệu.
- Cho manitol vào buồng tạo hạt của máy bao tầng sôi Mini-Glatt. Lắp thiết bị với súng phun ở vị trí phun từ trên xuống, đảm bảo hệ thống thiết bị được lắp kín nhằm tránh hao hụt nguyên liệu trong quá trình bào chế.
- Cài đặt thông số quy trình: nhiệt độ khí vào: 45 °C; tốc độ thổi khí: 10 m³/h
- Tiến hành thổi khí nóng với thông số như trên vào buồng tạo hạt để tiếp tục

sấy nóng manitol trong 10 phút.

- Sau khoảng thời gian trên, tiến hành phun dung dịch gồm các thành phần tạo liposome hòa tan trong hỗn hợp dung môi lên manitol với tốc độ phun 1,5ml/phút, áp suất phun 0,7 bar. Nhiệt khí vào và tốc độ thổi gió duy trì như ban đầu.

- Sau khi phun hết dịch phun, tiếp tục thổi khí nóng 10 m³/h với nhiệt khí vào trong khoảng 1 giờ để sấy khô proliposome BBR. Tiếp tục sấy trong tủ sấy chân không ở 40°C, áp suất -0,06 mPa trong 8 giờ để loại dung môi.

- Quá trình sấy kết thúc, tắt thiết bị và tiến hành thu sản phẩm. Rây lại qua rây 0,8 mm cân và ghi nhận khối lượng thu được. Kiểm tra hàm ẩm.

- Vệ sinh thiết bị theo quy trình.

3.4.5. Nghiên cứu nâng cấp quy mô bào chế proliposome berberin 200 g/mẻ

Sau khi đã lựa chọn công thức proliposome BBR FF19-2.1 và quy trình bào chế quy mô 25 g/mẻ, tiến hành nâng cấp quy mô bào chế lên 200 g/mẻ trên thiết bị bao tăng sôi Diosna-Minilab. Công thức cho quy mô 200 g/mẻ như trình bày ở bảng 3.22.

Các thông số thay đổi từ thiết bị bao Mini-Glatt sang thiết bị bao Diosna-Minilab được khảo sát về áp suất đầu súng phun, tốc độ phun dịch, tốc độ thổi khí, nhiệt khí vào. Sau khi khảo sát, các thông số trên được lựa chọn tối ưu cho quá trình bao và làm khô proliposome như trình bày ở bảng 3.23.

Bảng 3.22. Công thức bào chế proliposome BBR quy mô 200 g/mẻ trên thiết bị Diosna-minilab

Thành phần công thức	Tỉ lệ mol	Số mmol/mẻ	Khối lượng cho 1 mẻ (g)
Berberin	8	96	32,29
α -tocopherol	2	24	10,33
NaDC	2	24	9,95
HSPC	3,6	43,2	33,86
DSPG	5,4	64,8	50,49
Manitol			68,46
Dung môi (bay hơi trong quá trình bao tăng sôi)			
Methanol			1800 ml
Cloroform			720 ml

Bảng 3.23. Các thông số quy trình khi nâng cấp quy mô bào chế

Thông số	Quy mô 25 g/mẻ (thiết bị tăng sôi Mini-Glatt)	Quy mô 200 g/mẻ (Thiết bị tăng sôi Diosna-Minilab)
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 ³ /h)	10	
Tốc độ thổi khí (%)		45

Sau khi lựa chọn các thông số quy trình bào chế proliposome BBR ở quy mô 200 g/mẻ, tiến hành bào chế 3 mẻ proliposome BBR và đánh giá các đặc tính của proliposome BBR sau khi nâng cấp quy mô.

3.4.5.1. Quy trình bào chế

Chuẩn bị dụng cụ, thiết bị trước pha chế:

- Các dụng cụ pha chế, thiết bị máy móc được vệ sinh sạch sẽ, đảm bảo khô và sạch trước khi sử dụng.

Chuẩn bị nguyên liệu trước pha chế:

- Sấy manitol ở 70 °C trong 1 giờ ở tủ sấy tĩnh.
- Các nguyên liệu dùng pha chế được cân, đóng theo đúng công thức, đủ số lượng.

Mô tả quy trình:

- Cân các nguyên liệu BBR, α -TP, NaDC, HSPC, DSPG theo công thức rồi hòa tan trong hỗn hợp trên trong hỗn hợp dung môi (MeOH: CHCl₃) tỉ lệ (2,5:1).

- Manitol sau khi được xử lý (sấy và rây chọn kích thước) và cân đúng khối lượng được cho vào buồng tạo hạt của máy bao tăng sôi Diosna. Lắp thiết bị với súng phun ở vị trí phun từ trên xuống, đảm bảo hệ thống thiết bị được lắp kín nhằm tránh hao hụt nguyên liệu trong quá trình bào chế.

- Cài đặt thông số quy trình bao gồm: nhiệt độ khí vào 45 °C, tốc độ thổi khí 45%, áp suất đầu súng phun 1,2 bar, tốc độ phun dịch 4,5 ml/phút.

- Tiến hành thổi khí nóng với thông số như trên vào buồng tạo hạt để tiếp tục sấy nóng manitol trong 15 phút.

- Sau khoảng thời gian trên, tiến hành phun dung dịch gồm các thành phần tạo liposome hòa tan trong hỗn hợp dung môi lên manitol với thông số qui trình đã cài đặt. Trong thời gian phun, vẫn duy trì thông số nhiệt khí vào và tốc độ thổi gió như ban đầu.

- Sau khi phun hết dịch phun, tiếp tục thổi khí nóng với tốc độ 45%, nhiệt khí vào 45°C trong khoảng 1 giờ để sấy khô proliposome BBR.

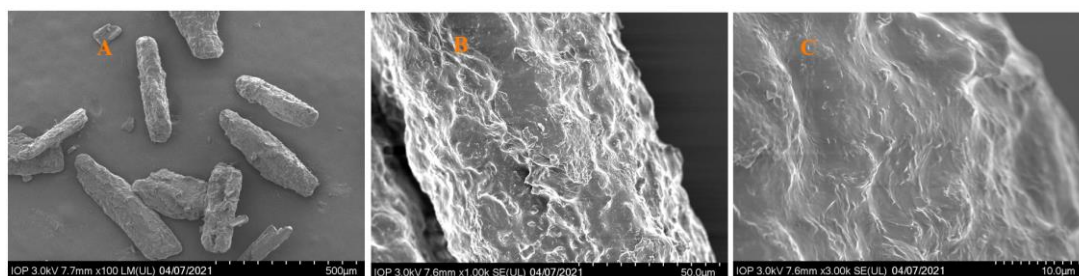
- Quá trình sấy kết thúc, tắt thiết bị và tiến hành thu sản phẩm. Rây lại qua rây 1000 mm. Sấy trong tủ sấy tĩnh qua đêm ở nhiệt độ 40°C để đuổi hết dung môi tồn dư. Cân ghi nhận khối lượng thu được. Kiểm tra hàm ẩm. Proliposome BBR thu được đóng vào 1 lớp túi PE và 1 lớp túi nhôm hàn kín, bảo quản ở nhiệt độ phòng thí nghiệm cho các phân tích tiếp theo.

- Vệ sinh thiết bị theo quy trình.

3.4.5.2. Đánh giá một số đặc tính của proliposome berberin bào chế ở quy mô 200 g/mẻ

a. Hình thái và bề mặt của proliposome BBR bào chế ở quy mô 200 g/mẻ

Hình thái bề mặt của proliposome BBR bào chế ở quy mô 200 g/mẻ được trình bày ở hình 3.27.



Hình 3.27. Hình ảnh proliposome BBR bào chế ở quy mô 200 g/mẻ quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét SEM: độ phóng đại 100 lần; B. độ phóng đại 1000 lần; C. Độ phóng đại 3000 lần

Hình 3.27 cho thấy, proliposome BBR tạo ra có kích thước và hình dạng đồng nhất. Bề mặt tiểu phân đã được tráng lớp film tạo bởi thành phần dịch phun đã bám và lan đều lên chất mang manitol.

b. Hiệu suất quá trình, mất khối lượng do làm khô, hàm lượng và khối lượng riêng biểu kiến

Hiệu suất quá trình, mất khối lượng do làm khô, khối lượng riêng biểu kiến được

đánh giá theo các phương pháp đã trình bày lần lượt ở mục 2.3.6.6, 2.3.6.4, 2.3.6.8. Định lượng hàm lượng BBR trong proliposome bằng phương pháp HPLC theo phương pháp đã trình bày ở mục 2.3.6.5. Kết quả được trình bày ở bảng 3.24.

Bảng 3.24. Kết quả đánh giá hiệu suất quy trình, khối lượng riêng biểu kiến, mất khối lượng do làm khô, hàm lượng BBR của proliposome BBR (TB $\pm$ SD, n=3)

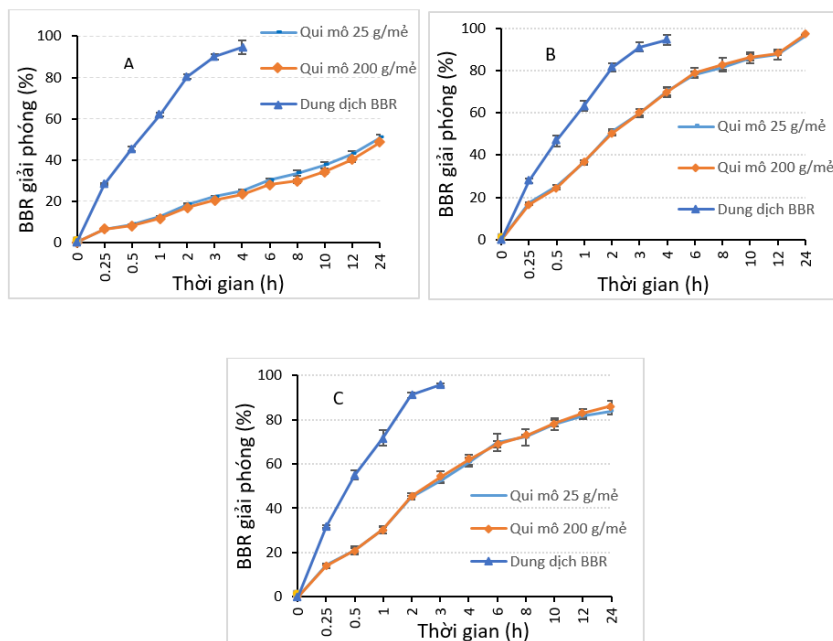
Mẻ	Hiệu suất quá trình (%)	Khối lượng riêng biểu kiến (g/ml)	Mất khối lượng do làm khô (%)	Hàm lượng BBR (%)
1	80,3	0,464 $\pm$ 0,027	3,52 $\pm$ 0,14	14,88 $\pm$ 0,03
2	82,3	0,459 $\pm$ 0,032	3,35 $\pm$ 0,33	14,93 $\pm$ 0,13
3	83,7	0,467 $\pm$ 0,015	3,61 $\pm$ 0,27	14,07 $\pm$ 0,07
Chỉ tiêu chấp nhận	$\geq 75,0$	$\geq 0,350$	$\leq 5,0$	12,00 - 18,00

c. Giải phóng dược chất

Kết quả đánh giá giải phóng dược chất được trình bày ở bảng 3.25 và hình 3.28.

Bảng 3.25. Phần trăm giải phóng qua màng thẩm tích của BBR từ proliposome BBR bào chế ở 2 qui mô trong các môi trường khác nhau

Thời gian (giờ)	% giải phóng trong môi trường pH 1,2		% giải phóng trong môi trường pH 4,5		% giải phóng trong môi trường pH 6,8	
	Qui mô 25 g/mẻ	Qui mô 200 g/mẻ	Qui mô 25 g/mẻ	Qui mô 200 g/mẻ	Qui mô 25 g/mẻ	Qui mô 200 g/mẻ
0,25	6,48 $\pm$ 0,68	6,42 $\pm$ 0,41	17,33 $\pm$ 0,39	16,83 $\pm$ 0,63	14,47 $\pm$ 0,25	14,02 $\pm$ 1,21
0,5	8,58 $\pm$ 0,37	8,09 $\pm$ 0,28	25,11 $\pm$ 0,73	24,21 $\pm$ 0,54	20,82 $\pm$ 1,02	21,04 $\pm$ 1,91
1	12,66 $\pm$ 0,39	11,55 $\pm$ 0,16	36,49 $\pm$ 1,03	36,82 $\pm$ 0,57	30,69 $\pm$ 1,00	30,34 $\pm$ 1,70
2	18,57 $\pm$ 0,41	17,16 $\pm$ 0,51	51,05 $\pm$ 1,35	50,23 $\pm$ 1,07	44,90 $\pm$ 0,85	45,50 $\pm$ 1,25
3	22,15 $\pm$ 0,63	20,47 $\pm$ 0,34	59,65 $\pm$ 0,78	59,99 $\pm$ 2,00	52,39 $\pm$ 0,80	54,15 $\pm$ 2,66
4	24,98 $\pm$ 0,85	23,39 $\pm$ 0,47	70,28 $\pm$ 1,85	69,60 $\pm$ 2,14	60,81 $\pm$ 1,92	61,32 $\pm$ 1,15
6	30,22 $\pm$ 0,96	28,08 $\pm$ 0,63	78,16 $\pm$ 1,32	78,84 $\pm$ 2,51	69,62 $\pm$ 3,90	68,94 $\pm$ 1,39
8	33,51 $\pm$ 1,32	34,50 $\pm$ 1,38	81,66 $\pm$ 1,20	82,72 $\pm$ 3,09	72,08 $\pm$ 3,82	72,79 $\pm$ 0,48
10	37,36 $\pm$ 1,56	34,50 $\pm$ 1,38	85,98 $\pm$ 2,62	86,21 $\pm$ 1,34	77,93 $\pm$ 2,65	78,32 $\pm$ 1,37
12	42,90 $\pm$ 1,50	40,24 $\pm$ 1,19	87,62 $\pm$ 2,30	88,13 $\pm$ 0,96	81,51 $\pm$ 1,18	82,90 $\pm$ 1,74
24	50,90 $\pm$ 1,34	48,52 $\pm$ 0,93	96,29 $\pm$ 0,29	97,11 $\pm$ 1,83	83,68 $\pm$ 1,41	86,06 $\pm$ 2,35



Hình 3.28. Phần trăm giải phóng qua màng thẩm tích của BBR từ proliposome BBR bào chế ở 2 qui mô trong các môi trường khác nhau: A. môi trường dung dịch acid HCl 0,1N pH 1,2; B. môi trường đệm phosphat pH 4,5; C. môi trường đệm phosphat pH 6,8.

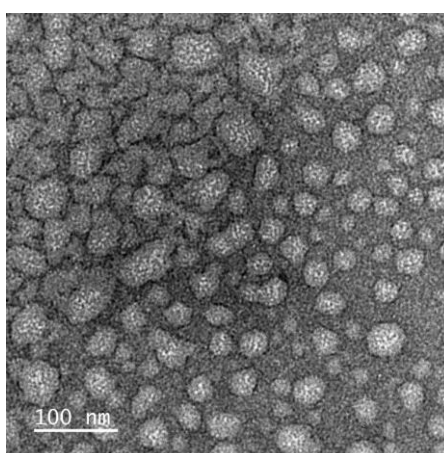
Kết quả ở bảng 3.25 và hình 3.28 cho thấy tốc độ giải phóng BBR từ proliposome ở cả hai qui mô hầu như không có sự khác biệt trong cả 3 môi trường giải phóng. Trong môi trường acid, tốc độ giải phóng BBR từ proliposome chậm, chỉ dưới 20% trong 2 giờ đầu. Trong môi trường đệm phosphat pH 4,5 và đệm phosphat pH 6,8, tốc độ giải phóng trong 2 giờ đầu của proliposome bào chế ở cả hai quy mô lần lượt là ở mức 50% và 45%. Trong vòng 8 giờ, lượng BBR giải phóng trong môi trường acid HCl 0,1N pH 1,2, đệm phosphat pH 4,5, đệm phosphat pH 6,8 lần lượt ở mức 35%, 80% và 72%. Trong 24 giờ, lượng BBR giải phóng trong các môi trường trên lần lượt ở các mức 50%, 97% và 86%.

d. *KTTP, phân bố KTTP, hiệu suất liposome hóa, hình thái của liposome BBR tạo thành từ proliposome berberin*

KTTP, phân bố KTTP và hiệu suất liposome hóa của liposome tạo thành từ proliposome BBR bào chế ở quy mô 200 g/m² được đánh giá theo phương pháp ở mục 2.3.5.2 và 2.3.5.3. Hình thái của liposome BBR tạo thành được đánh giá theo phương pháp ở mục 2.3.6.3. Kết quả được trình bày ở bảng 3.26 và hình 3.29.

Bảng 3.26. Một số đặc tính của liposome BBR tạo thành ($n=3$, $TB \pm SD$)

Mẻ	Liposome BBR tạo thành		
	KTTP TB (d.nm)	PDI	EE (%)
1	$123,5 \pm 10,8$	$0,259 \pm 0,009$	$88,1 \pm 1,5$
2	$133,3 \pm 7,2$	$0,278 \pm 0,005$	$86,9 \pm 0,8$
3	$109,9 \pm 5,5$	$0,312 \pm 0,008$	$88,5 \pm 0,5$
Chỉ tiêu chấp nhận	≤ 500	$\leq 0,5$	$\geq 70,0$



Hình 3.29. Hình thái của liposome BBR tạo thành từ proliposome BBR qui mô 200 g/mẻ quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)

3.4.5.3. Đề xuất một số chỉ tiêu chất lượng

Một số tiêu chuẩn chất lượng của proliposome BBR được đề xuất dựa trên những kết quả đánh giá đặc tính của proliposome BBR từ 3 mẻ bào chế được trình bày ở bảng 3.27.

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

Chỉ tiêu	Dự kiến tiêu chuẩn	Phương pháp thử
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

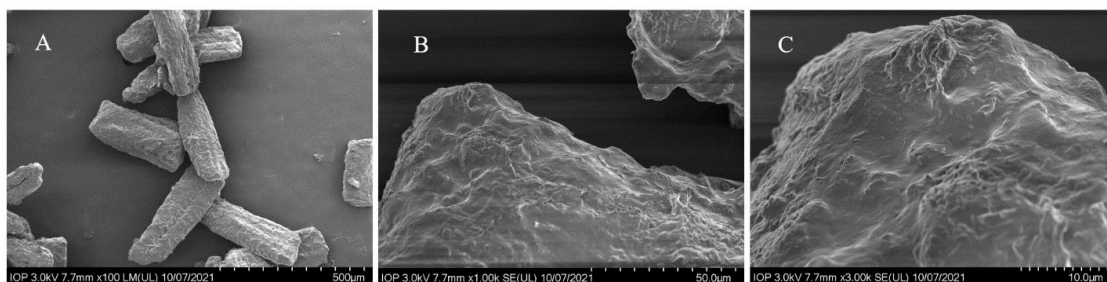
Chỉ tiêu	Dự kiến tiêu chuẩn	Phương pháp thử
Định tính	Sắc ký đồ của mẫu thử phải có 1 pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic BBR chuẩn	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
Hàm lượng BBR trong proliposome (%)	13,5 – 16,5	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
Phần trăm được chất giải phóng trong môi trường pH 6,8	Trong 1 giờ đầu: < 40% Trong 4 giờ đầu: 50-65% Sau 10 giờ: $\geq 70\%$	Phép thử giải phóng được chất qua màng thấm tích
Liposome BBR hoàn nguyên từ proliposome BBR: + KTTTP trung bình + PDI + Hiệu suất liposome hóa (%)	≤ 500 (d.nm) $\leq 0,5$ ≥ 70	Tán xạ ánh sáng động Phương pháp siêu lọc kết hợp với ly tâm

3.4.6. Nghiên cứu độ ổn định của proliposome berberin

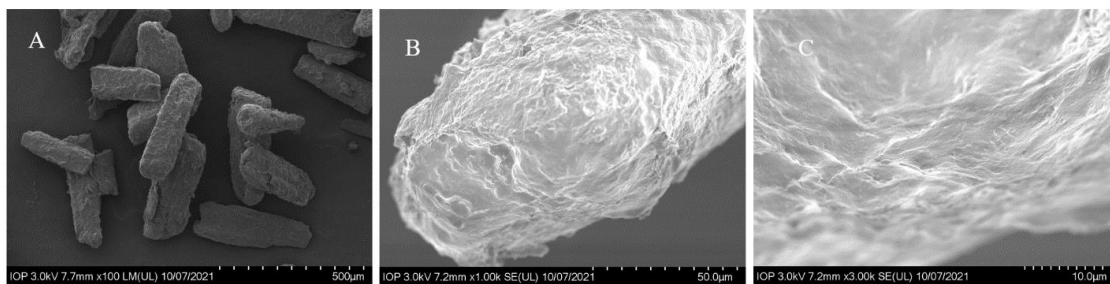
Độ ổn định của proliposome BBR bào chế ở quy mô 200 g/mẻ được nghiên cứu ở 2 điều kiện thực và LHCT như mô tả ở mục 2.3.6.11

3.4.6.1. Độ ổn định về hình thái tiểu phân proliposome berberin

Sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện thực và 6 tháng bảo quản ở điều kiện LHCT, proliposome BBR được quan sát hình thái tiểu phân bằng sử dụng kính hiển vi điện tử quét SEM. Kết quả được trình bày ở hình 3.30 và hình 3.31.



Hình 3.30. Hình thái của proliposome BBR bào chế qui mô 200 g/mẻ sau 6 tháng bảo quản điều kiện thực quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét. A. độ phóng đại 100 lần; B. độ phóng đại 1000 lần; C. độ phóng đại 3000 lần.



Hình 3.31. Hình thái của proliposome BBR FF19 bào chế qui mô 200 g/mẻ sau 6 tháng bảo quản điều kiện lão hóa cấp tốc quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét. A. độ phóng đại 100 lần; B. độ phóng đại 1000 lần; C. độ phóng đại 3000 lần.

Kết quả cho thấy sau 6 tháng theo dõi ở điều kiện thực và điều kiện LHCT, proliposome BBR vẫn giữ hình thái như ban đầu, lớp film bao bọc xung quanh tiểu phân chất mang không bị bong hoặc nứt mặt.

3.4.6.2. Mất khối lượng do làm khô

Sau thời gian bảo quản 6 tháng ở điều kiện thực, 6 tháng ở điều kiện LHCT, mẫu được xác định mất khối lượng do làm khô. Kết quả được trình bày ở bảng 3.28.

Bảng 3.28. Kết quả xác định mất khối lượng do làm khô sau bảo quản 6 tháng ở điều kiện thường và điều kiện lão hóa cấp tốc (TB $\pm$ SD, n=3)

Mẻ	Mất khối lượng do làm khô (%)	
	Điều kiện thực	Điều kiện lão hóa cấp tốc
1	3,71 $\pm$ 0,09	3,83 $\pm$ 0,11
2	3,54 $\pm$ 0,06	3,51 $\pm$ 0,19
3	3,63 $\pm$ 0,12	3,71 $\pm$ 0,07

Kết quả cho thấy, phần trăm mất khối lượng do làm khô ở cả hai điều kiện đều nằm trong giới hạn cho phép. Điều này chứng tỏ điều kiện bảo quản đóng proliposome vào túi nhôm hàn kín hạn chế được hơi ẩm thấm vào bên trong chế phẩm.

3.4.6.3. Độ ổn định về hàm lượng

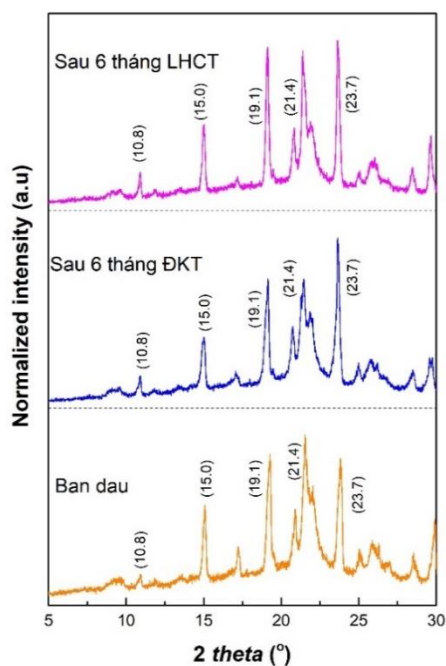
Kết quả theo dõi độ ổn định về hàm lượng của BBR trong proliposome BBR của 3 mẻ được trình bày ở bảng 3.29. Hàm lượng BBR ban đầu của mẻ 1, mẻ 2 và mẻ 3 lần lượt là 14,88%, 14,93% và 14,07%. Các sắc ký đồ được trình bày ở phụ lục 3.11. Kết quả ở bảng 3.29 cho thấy, hàm lượng BBR trong proliposome sau 6 tháng theo dõi ở điều kiện thực và điều kiện LHCT so với ban đầu vẫn đạt yêu cầu.

Bảng 3.29. Phần trăm BBR trong proliposome BBR bảo quản ở điều kiện thực và lão hóa cấp tốc so với ban đầu ($n=3$, $TB \pm SD$)

Điều kiện	Thời gian (tháng)	% hàm lượng so với ban đầu		
		Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
	0	100	100	100
Thực	1	101,05 $\pm$ 0,72	99,12 $\pm$ 1,03	99,89 $\pm$ 0,57
	3	99,85 $\pm$ 1,20	100,37 $\pm$ 0,92	100,75 $\pm$ 0,43
	6	98,99 $\pm$ 0,45	100,64 $\pm$ 0,95	101,18 $\pm$ 0,27
LHCT	1	100,23 $\pm$ 1,04	101,06 $\pm$ 0,35	100,95 $\pm$ 0,71
	3	98,80 $\pm$ 0,69	98,68 $\pm$ 0,31	99,34 $\pm$ 0,85
	6	98,84 $\pm$ 0,55	99,73 $\pm$ 0,81	99,62 $\pm$ 0,91

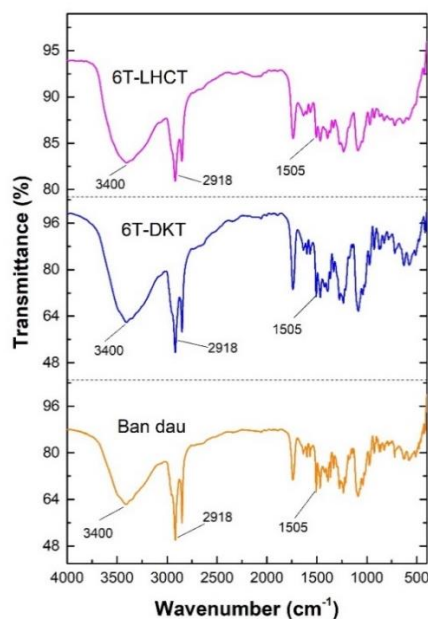
3.4.6.4. Độ ổn định về trạng thái lý hóa

Đặc tính lý hóa của proliposome BBR được đánh giá bằng phương pháp nhiễu xạ tia X và phổ hồng ngoại FTIR như trình bày ở mục 2.3.6.2. Kết quả được thể hiện ở hình 3.32 và hình 3.33.



Hình 3.32. Phổ nhiễu xạ tia X của proliposome BBR bào chế qui mô 200 g/m² ở thời điểm ban đầu và sau 6 tháng bảo quản ở ĐKT và LHCT

Kết quả ở hình 3.32 cho thấy, các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của proliposome BBR không thay đổi so với ban đầu sau thời gian 6 tháng theo dõi ở 2 điều kiện trên.



Hình 3.33. Phổ hồng ngoại của proliposome BBR bào chế qui mô 200 g/mẻ ở thời điểm ban đầu và sau 6 tháng bảo quản ở ĐKT và LHCT

Phổ hấp thụ hồng ngoại của proliposome BBR bào chế ở qui mô 200 g/mẻ ở hình 3.33 thể hiện các dao động của các thành phần trong proliposome BBR với các tín hiệu đặc trưng của BBR ở 1505 cm^{-1} , manitol ở 3400 cm^{-1} , HSPC và DSPG ở 2918 cm^{-1} . Khi tịnh tiến các phổ đồ về cùng một vị trí trên trục số sóng thì có sự chồng khít phổ tương đối tốt. Điều này chứng tỏ liên kết giữa các thành phần trong proliposome BBR hầu như không thay đổi sau thời gian theo dõi ở 2 điều kiện thực và LHCT.

3.4.6.5. Độ ổn định về giải phóng dược chất

Kết quả theo dõi độ ổn định về giải phóng dược chất từ proliposome BBR bào chế ở qui mô 200 g/mẻ trong 3 môi trường giải phóng gồm dung dịch acid HCl 0,1N (pH 1,2), dung dịch đệm phosphate pH 4,5 và môi trường đệm phosphate pH 6,8 được thể hiện ở phụ lục 3.12. Kết quả cho thấy, phần trăm giải phóng dược chất từ proliposome BBR trong cùng một môi trường giải phóng có sự dao động giữa các mẫu sau 6 tháng bảo quản ở hai điều kiện thực và LHCT. Tuy nhiên, phần trăm giải phóng dược chất vẫn nằm trong giới hạn chấp nhận được.

3.4.6.6. Độ ổn định về kích thước tiểu phân và phân bố kích thước tiểu phân, hiệu suất liposome hóa của liposome tạo thành từ proliposome berberin

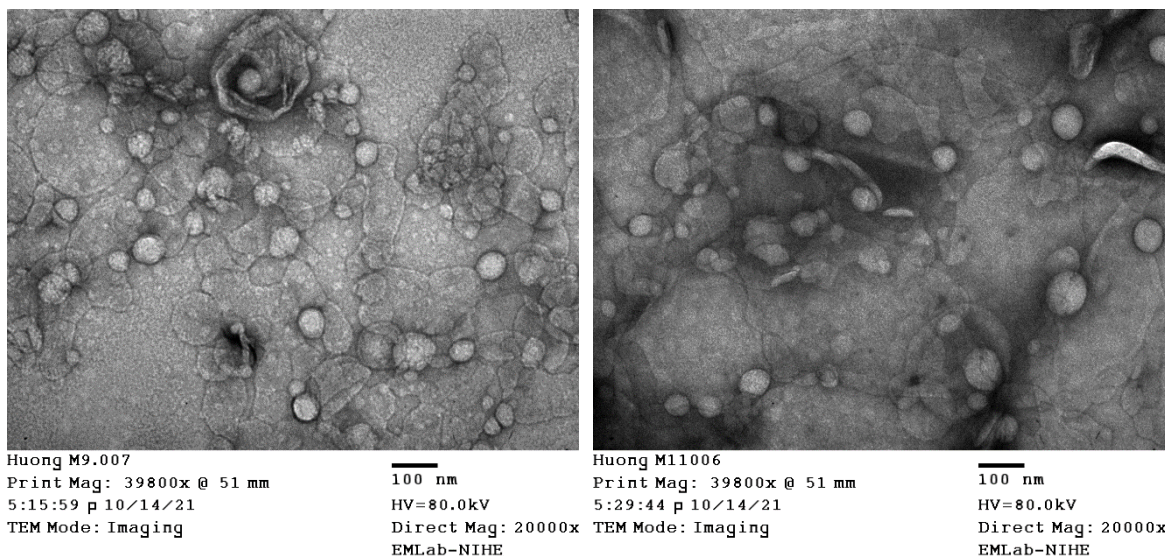
Tiến hành đánh giá KTTP, phân bố KTTP và hiệu suất liposome hóa của liposome tạo thành từ proliposome BBR sau khi bảo quản điều kiện thực và điều kiện LHCT 6 tháng. Kết quả được trình bày ở bảng 3.30, bảng 3.31 và hình 3.34.

Bảng 3.30. Kích thước tiểu phân, phân bố KTTTP và hiệu suất liposome hóa của liposome tạo thành từ proliposome bảo quản ở điều kiện thực sau 6 tháng

Mỡ	Chỉ tiêu	Thời gian (tháng)			
		0	1	3	6
1	KTTPTB (d.nm)	123,5 ± 10,8	106,5 ± 8,8	116,6 ± 6,3	135,9 ± 5,8
	PDI	0,259 ± 0,009	0,267 ± 0,002	0,279 ± 0,007	0,266 ± 0,006
	Hiệu suất liposome hóa (%)	88,1 ± 1,5	86,7 ± 0,9	85,4 ± 3,1	86,9 ± 2,3
2	KTTPTB (d.nm)	133,3 ± 7,2	121,5 ± 6,7	127,6 ± 4,3	115,9 ± 2,5
	PDI	0,278 ± 0,005	0,254 ± 0,007	0,234 ± 0,009	0,246 ± 0,005
	Hiệu suất liposome hóa (%)	86,9 ± 0,8	88,1 ± 1,3	87,5 ± 2,1	85,4 ± 1,5
3	KTTPTB (d.nm)	109,5 ± 5,5	117,6 ± 8,2	120,9 ± 4,3	115,4 ± 4,8
	PDI	0,312 ± 0,008	0,271 ± 0,005	0,237 ± 0,004	0,265 ± 0,006
	Hiệu suất liposome hóa (%)	88,5 ± 0,5	86,8 ± 2,3	87,5 ± 1,2	86,9 ± 1,7

Bảng 3.31. Kích thước tiểu phân, phân bố KTTTP và hiệu suất liposome hóa của liposome tạo thành từ proliposome bảo quản ở điều kiện LHCT sau 6 tháng

Mỡ	Chỉ tiêu	Thời gian (tháng)			
		0	1	3	6
1	KTTPTB (d.nm)	123,5 ± 10,8	118,2 ± 7,2	130,1 ± 5,4	120,5 ± 6,2
	PDI	0,259 ± 0,009	0,277 ± 0,006	0,286 ± 0,003	0,295 ± 0,005
	Hiệu suất liposome hóa (%)	88,1 ± 1,5	85,8 ± 0,7	86,5 ± 2,4	85,3 ± 1,8
2	KTTPTB (d.nm)	133,3 ± 7,2	122,5 ± 5,9	117,6 ± 4,1	120,7 ± 2,5
	PDI	0,278 ± 0,005	0,225 ± 0,007	0,297 ± 0,002	0,236 ± 0,008
	Hiệu suất liposome hóa (%)	86,9 ± 0,8	87,4 ± 1,3	85,1 ± 0,8	84,9 ± 2,6
3	KTTPTB (d.nm)	109,5 ± 5,5	114,6 ± 9,4	113,1 ± 2,3	107,9 ± 6,4
	PDI	0,312 ± 0,008	0,276 ± 0,004	0,217 ± 0,007	0,245 ± 0,006
	Hiệu suất liposome hóa (%)	88,5 ± 0,5	86,3 ± 1,2	85,6 ± 2,9	85,5 ± 1,4



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

Kết quả ở bảng 3.30, bảng 3.31 và hình 3.34 cho thấy proliposome BBR sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện thực và lão hóa cấp tốc đều có khả năng tạo thành liposome có KTTP và phân bố KTTP có sự dao động, tuy nhiên mức thay đổi hầu như không đáng kể so với ban đầu.

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

Tiến hành đánh giá SKD *in vivo* của hỗn dịch quy ước BBR và hỗn dịch liposome BBR tạo thành từ proliposome BBR trên hai nhóm chuột cống. Thời điểm lấy máu và xử lý mẫu máu như thiết kế thí nghiệm ở mục 2.3.7. Các mẫu huyết tương chuột được định lượng bằng phương pháp LC-MS/MS như mô tả ở mục 2.3.1.3. Kết quả nồng độ BBR trong huyết tương chuột cống sau khi uống hỗn dịch quy ước và sau khi uống hỗn dịch liposome BBR được trình bày lần lượt ở bảng 3.32 và bảng 3.33.

Bảng 3.32. Nồng độ BBR trong huyết tương chuột cống sau khi uống hỗn dịch quy ước BBR (n=7)

Thời gian (phút)	Nồng độ BBR trong huyết tương (ng/ml)							TB ± SD (ng/ml)
	ĐV 1	ĐV 2	ĐV 3	ĐV 4	ĐV 5	ĐV 6	ĐV 7	
5	1,265	3,647	2,158	2,320	6,687	5,158	6,317	3,936 ± 2,150
15	4,245	192,954 ²	27,060	37,201	53,819	26,432	30,487	29,874 ± 16,150
30	6,044	13,828	9,519	57,633	25,225	55,182	40,770	29,743 ± 21,568
60	7,909	15,083	20,255	10,263	14,697	25,302	17,585	15,870± 5,887
90	10,594	17,254	13,630	7,579	8,393	20,788	12,207	12,921± 4,763
120	10,901	14,482	17,181	9,001	5,663	7,014	6,891	10,162± 4,295
180	8,014	12,726	10,914	5,405	6,916	7,507	7,915	8,485± 2,495
240	12,855	9,397	15,567	7,069	6,776	15,103	8,386	10,736± 3,727
360	3,866	3,722	4,233	6,133	5,042	8,205	5,288	5,213± 1,572
480	3,956	2,707	3,969	2,530	2,864	8,729	3,812	4,081± 2,140
600	3,009	2,047	1,968	1,904	2,765	5,331	2,900	2,846± 1,190
720	2,607	1,668	2,890	1,694	8,385	4,321	1,538	3,300± 2,446
1440	0,948	0,566	4,118	2,736	4,862	2,796	0,038 ¹	2,671± 1,692
2160	0,580	0,213	2,250	0,093 ¹	0,213	0,198 ¹	0,101 ¹	0,814± 0,973

Chú thích: (¹): nồng độ dưới LLOQ được tính từ phép ngoại suy; (²): nồng độ cao bất thường

Với nhóm chuột uống hỗn dịch quy ước BBR, kết quả ở bảng 3.32 cho thấy tại các thời điểm khảo sát, nồng độ BBR trong huyết tương chuột dao động từ 0,5 đến 57 ng/ml. Nồng độ này có giá trị trung bình thấp nhất là 0,814 ng/ml tại thời điểm 2160 phút và cao nhất là 29,874 ng/ml tại thời điểm 15 phút. Một số thời điểm, nồng độ BBR ở một số động vật thấp hơn giới hạn định lượng dưới (0,2 ng/ml). Ngoài ra, tại thời điểm 15 phút, nồng độ BBR trong huyết tương trong 1 động vật cao hơn bất thường so với động vật cùng nhóm và cùng thời điểm (vượt quá giá trị TB ± 3SD). Điểm này bị loại bỏ khi xử lý thống kê và tính toán các thông số được động học trên nhóm chuột uống hỗn dịch quy ước BBR.

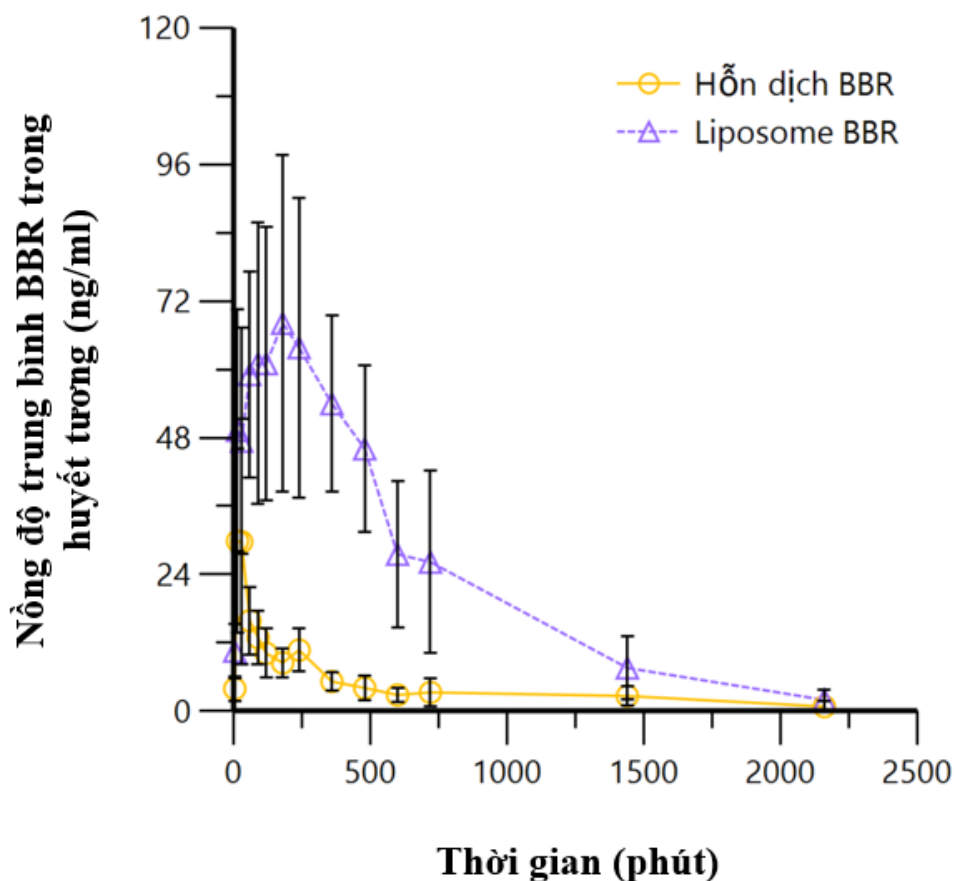
Bảng 3.33. Nồng độ BBR trong huyết tương chuột cống sau khi uống liposome BBR
(n=7)

Thời gian (phút)	Nồng độ BBR trong huyết tương chuột (ng/ml)							TB ± SD (ng/ml)
	ĐV 8	ĐV 9	ĐV 10	ĐV 11	ĐV 12	ĐV 13	ĐV 14	
5	5,100	20,341	9,040	9,279	12,243	8,873	9,009	10,555± 4,787
15	46,458	29,688	72,624	42,905	84,924	34,445	34,029	49,296± 21,215
30	55,299	9,527	55,342	42,676	74,960	43,458	50,666	47,418± 19,868
60	53,400	70,433	54,240	40,478	89,445	38,082	67,697	59,111± 18,110
90	58,739	74,272	23,219	54,252	100,612	43,384	72,971	61,064± 24,755
120	82,404	62,569	34,374	22,288	84,881	66,002	74,654	61,025± 23,978
180	88,558	78,177	23,053	33,379	94,546	63,193	95,743	68,093± 29,559
240	74,028	101,984	38,139	24,886	68,656	56,779	82,326	63,828± 26,304
360	77,624	52,263	73,664	40,458	42,853	49,325	41,766	53,993± 15,422
480	76,508	42,955	36,608	40,341	51,750	41,540	32,720	46,060± 14,660
600	268,309 ²	49,948	18,171	19,859	25,984	23,787	125,507 ²	27,550± 12,897
720	60,117	23,627	12,586	15,313	19,831	29,975	21,864	26,188± 15,992
1440	12,141	4,742	2,818	2,751	17,778	7,704	5,217	7,593± 5,545
2160	1,196	5,361	0,292	0,976	3,381	1,680	0,961	1,978± 1,779

Chú thích: (²): nồng độ cao bất thường

Với nhóm chuột uống liposome BBR, kết quả định lượng nồng độ BBR trong huyết tương chuột từ thời điểm sau khi uống 5 phút đến sau khi uống 2160 phút trình bày ở bảng 3.33 cho thấy giá trị trung bình của nồng độ này thấp nhất là 1,978 ng/ml (tại thời điểm 2160 phút) và cao nhất là 68 ng/ml (tại thời điểm 180 phút). Hầu hết tại các điểm khảo sát đều cho thấy nồng độ BBR trong huyết tương cao hơn so với nhóm chuột uống hỗn dịch quy ước BBR. Cá biệt tại 1 thời điểm 30 phút của 1 động vật có nồng độ BBR trong huyết tương (9,527 ng/ml) thấp hơn so với nồng độ thời điểm này của một số chuột ở nhóm uống hỗn dịch quy ước. Tại thời điểm 600 phút, nồng độ BBR huyết tương của 2 động vật có giá trị cao bất thường (ngoài khoảng giá trị TB ± 3SD) nên cũng được loại bỏ khi phân tích thống kê và tính toán các thông số được động học.

Sự khác nhau về nồng độ BBR trong huyết tương chuột giữa nhóm uống hỗn dịch quy ước BBR và nhóm uống liposome BBR được minh họa dưới dạng đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ BBR trung bình trong huyết tương của 2 nhóm theo thời gian ở hình 3.35. Các đồ thị biểu diễn nồng độ BBR của từng chuột riêng biệt trong mỗi nhóm được trình bày ở phụ lục 4.1.



Hình 3.35. Đường biểu diễn nồng độ trung bình BBR trong huyết tương chuột cống theo thời gian của nhóm uống hỗn dịch quy ước BBR và nhóm uống liposome BBR sau khi uống liều đơn tương đương với liều BBR 100 mg/kg cân nặng ($n=7$)

Một số thông số được động học ở giai đoạn hấp thu thuốc qua đường uống trên nhóm chuột uống hỗn dịch BBR quy ước và nhóm chuột uống liposome BBR với liều tương ứng với BBR 100 mg/kg cân nặng được tính toán theo mô hình không ngăn. Số liệu được trình bày ở bảng 3.34.

Bảng 3.34. Một số thông số dược động học của BBR trên chuột uống hỗn dịch quy ước BBR và liposome BBR với liều tương ứng 100 mg/kg cân nặng chuột (n=7)

Thông số	Đơn vị tính	Nhóm uống hỗn dịch quy ước BBR	Nhóm uống liposome BBR
C _{max}	ng/mL	37,80 ± 18,80	83,00 ± 18,60 ^a
T _{max}	h	1,07 ± 1,36	3,00 ± 1,61 ^b
AUC ₀₋₃₆	ng.h/mL	135,40 ± 45,00	852,10 ± 289,50 ^a
AUC _{0-∞}	ng.h/mL	164,70 ± 67,40	872,00 ± 295,50 ^a
MRT ₀₋₃₆	h	8,30 ± 3,30	8,73 ± 1,04
MRT _{0-∞}	h	14,42 ± 8,53	9,53 ± 1,51

Ghi chú: (a): $p < 0,001$ khi so với nhóm uống hỗn dịch quy ước BBR; (b): $p < 0,05$ khi so với nhóm uống hỗn dịch quy ước BBR.

Kết quả ở bảng 3.34 cho thấy, ở nhóm chuột uống liposome BBR có sự gia tăng đáng kể các giá trị C_{max}, T_{max}, AUC₀₋₃₆, AUC_{0-∞} so với nhóm chuột uống hỗn dịch quy ước BBR một cách có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa lần lượt là $p < 0,001$, $p < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,001$.

Để so sánh SKD giữa hỗn dịch quy ước BBR và liposome BBR, hai phép thống kê t-test một phía với 90% khoảng tin cậy được sử dụng để so sánh các giá trị C_{max}, T_{max}, AUC, MRT. Kết quả được trình bày ở bảng 3.35. Ngoài ra các giá trị T_{max} giữa 2 nhóm được so sánh bằng sử dụng phép non parametric Wilcoxon rank sum test. Kết quả được trình bày ở phụ lục 4.2.

Bảng 3.35. Kết quả so sánh trung bình SKD giữa hỗn dịch quy ước BBR với hỗn dịch liposome BBR ở chuột cống sau khi uống 1 liều đơn BBR 100 mg/kg cân nặng (n=7).

Thông số	Tỉ lệ (%)	CI Lower 90 (%)	CI Upper 90 (%)
AUC ₀₋₃₆	628,3	456,5	864,8
AUC _{0-∞}	552,8	384,7	794,4
C _{max}	246,2	158,6	382,1
MRT ₀₋₃₆	112,8	83,0	153,2
MRT _{0-∞}	78,6	52,0	118,7

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn bằng tỉ số liposome BBR/BBR quy ước chuyển dạng logarit.

Kết quả ở bảng 3.35 cho thấy sự khác nhau về sinh khả dụng giữa nhóm chuột uống hỗn dịch quy ước BBR với nhóm uống hỗn dịch liposome BBR. Tỷ số các giá trị AUC_{0-36} , $AUC_{0-\infty}$, and C_{max} giữa nhóm uống liposome BBR/nhóm uống hỗn dịch quy ước BBR lần lượt là 628,3%, 552,8% và 246,2% với khoảng tin cậy 90% (dưới và trên) lần lượt là 456,5 - 864,8%, 384,7 - 794,4%, 158,6 - 382,1%. Kết quả này cho thấy sinh khả dụng của nhóm uống hỗn dịch liposome BBR cao hơn nhóm uống hỗn dịch quy ước BBR.

Ngoài ra, kết quả của phép kiểm tra tổng xếp hạng phi tham số non parametric Wilcoxon run sum test (phụ lục 4.2) chứng minh rằng các giá trị T_{max} của nhóm uống liposome BBR cao hơn các giá trị này ở nhóm uống hỗn dịch quy ước BBR một cách có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ ($p=0,0199$). Tuy nhiên, sự khác nhau về thời gian lưu trú trung bình (MRT) trong huyết tương của BBR từ thời điểm 0 đến 36 giờ và từ 0 đến vô cực giữa 2 nhóm không có ý nghĩa thống kê.

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

Tiến hành đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh trên chuột nhắt theo phương pháp ở mục 2.3.8. Các thông số đánh giá gồm nồng độ cholesterol toàn phần (TC), cholesterol tỉ trọng thấp (LDL-C), cholesterol tỉ trọng cao (HDL-C) và triglycerid (TG).

3.6.1. So sánh ảnh hưởng trên nồng độ cholesterol toàn phần huyết thanh của liposome BBR và hỗn dịch quy ước BBR trên chuột được gây tăng lipid máu nội sinh.

Kết quả ảnh hưởng trên nồng độ TC của liposome BBR và hỗn dịch quy ước BBR ở chuột được gây tăng lipid máu nội sinh bằng P-407 được trình bày ở bảng 3.36.

Kết quả ở bảng 3.36 cho thấy nồng độ TC trung bình trong máu ở nhóm chứng bệnh (chuột được gây tăng lipid máu nội sinh bằng P-407 và không được điều trị) tăng so với nhóm chứng sinh lý một cách có ý nghĩa thống kê với tỉ lệ tăng 103,3% ($p < 0,001$). Điều này chứng tỏ P-407 với liều 200 mg/kg cân nặng đã làm tăng nồng độ TC trên chuột thực nghiệm. Ở nhóm chuột được điều trị bằng atorvastatin liều 20 mg/kg cân nặng (nhóm chứng dương), nồng độ TC giảm một cách có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh với tỉ lệ giảm 20,24% ($p < 0,05$).

Bảng 3.36. Nồng độ TC trong huyết thanh ở các nhóm chuột nhắt trắng được gây tăng lipid máu nội sinh sau 10 ngày điều trị (TB ± SD, n= 8-9)

Lô	Liều dùng (mg/kg)	TC (mmol/L)	% giảm so với chứng bệnh
Chứng sinh lý		3,62 ± 0,87	
Chứng bệnh		7,36 ± 1,10 [#]	
Chứng dương (atorvastatin)	20	5,87 ± 1,34*	20,24
Đối chiếu (hỗn dịch quy ước BBR)	100	6,17 ± 1,62	16,17
Thử 1 (liposome berberin)	50	6,26 ± 1,63	15,08
Thử 2 (liposome berberin)	100	6,20 ± 0,90*	15,76

Ghi chú: ký hiệu (): p < 0,05 khi so sánh với lô chứng bệnh; ký hiệu (#): p < 0,001 khi so sánh với lô chứng sinh lý*

Ở nhóm chuột được điều trị bằng atorvastatin liều 20 mg/kg cân nặng (nhóm chứng dương), nồng độ TC giảm một cách có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh với tỉ lệ giảm 20,24% (p < 0,05). Ở nhóm chuột được điều trị bằng hỗn dịch quy ước BBR với liều 100 mg/kg cân nặng, nồng độ TC trung bình trong máu có xu hướng giảm 16,17% so với nhóm chứng. Tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05). Ở nhóm chuột được điều trị bằng hỗn dịch liposome BBR tương ứng với liều BBR 50 mg/kg cân nặng, nồng độ TC trung bình có xu hướng giảm 15,08% so với nhóm chứng. Tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05). Ở nhóm chuột được điều trị bằng hỗn dịch liposome BBR tương ứng với liều BBR 100 mg/kg cân nặng, nồng độ TC giảm một cách có ý nghĩa thống kê với tỉ lệ giảm 15,76% so với nhóm chứng (p < 0,05).

Như vậy, liposome BBR tương ứng với liều BBR 100 mg/kg cân nặng chuột có tác dụng làm giảm nồng độ TC trong máu chuột nhắt trắng bị gây tăng lipid máu nội sinh bằng P-407. Trong lúc đó, hỗn dịch BBR quy ước cũng với mức liều BBR 100 mg/kg không có tác dụng giảm chỉ số này.

3.6.2. So sánh ảnh hưởng của liposome berberin và hỗn dịch quy ước berberin trên nồng độ cholesterol tỉ trọng thấp ở chuột được gây tăng lipid máu nội sinh

Kết quả ảnh hưởng của liposome BBR và hỗn dịch quy ước BBR trên nồng độ LDL-C huyết thanh ở chuột được gây tăng lipid máu nội sinh bằng P-407 được trình bày ở bảng 3.37.

Bảng 3.37. Nồng độ LDL-C huyết thanh ở các nhóm chuột nhắt trắng được gây tăng lipid máu nội sinh sau 10 ngày điều trị (TB $\pm$ SD, n= 8-9)

Lô	Liều dùng (mg/kg)	LDL-C (mmol/L)	% giảm so với chứng bệnh
Chứng sinh lý		0,17 $\pm$ 0,14	
Chứng bệnh		3,77 $\pm$ 0,85 [#]	
Chứng dương (atorvastatin)	20	2,46 $\pm$ 1,45*	34,75
Đối chiếu (hỗn dịch quy ước BBR)	100	2,62 $\pm$ 1,59	30,50
Thử 1 (liposome berberin)	50	1,73 $\pm$ 1,38**	54,11
Thử 2 (liposome berberin)	100	1,62 $\pm$ 1,47**	57,03

Ghi chú: (*): $p < 0,05$ khi so sánh với lô chứng bệnh; (**): $p < 0,01$ khi so sánh với lô chứng bệnh; (#): $p < 0,001$ khi so sánh với lô chứng sinh lý.

Kết quả ở bảng 3.37 cho thấy, ở nhóm chứng bệnh có nồng độ LDL-C trung bình tăng một cách có ý nghĩa thống kê với tỉ lệ tăng so với nhóm sinh lý là 2117,6% ($p < 0,001$). Điều này chứng tỏ P-407 với liều 200 mg/kg đã làm tăng nồng độ LDL-C trên chuột thực nghiệm. Ở nhóm chuột được điều trị bằng cho uống atorvastatin 20mg/kg (nhóm chứng dương), nồng độ LDL-C trung bình trong huyết thanh giảm 34,75% so với nhóm chứng bệnh ($p < 0,05$). Nồng độ này ở nhóm chuột được điều trị bằng cho uống hỗn dịch BBR quy ước với liều 100 mg/kg có xu hướng giảm 30,50% so với nhóm chứng bệnh. Tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Ở nhóm chuột được điều trị bằng cho uống hỗn dịch liposome BBR tương ứng với liều BBR 50 mg/kg, nồng độ trung bình LDL-C trong huyết thanh giảm một

cách có ý nghĩa thống kê với tỉ lệ giảm 54,11% so với nhóm chứng bệnh ($p < 0,01$). Tương tự như vậy, nồng độ này ở nhóm chuột được điều trị bằng cho uống hỗn dịch liposome BBR tương ứng với liều BBR 100 mg/kg giảm với tỉ lệ 57,03% so với nhóm chứng bệnh ($p < 0,01$).

Như vậy, hỗn dịch BBR quy ước với liều 100 mg/kg không có tác dụng làm hạ LDL-C huyết thanh. Trong lúc đó, hỗn dịch liposome BBR với cả 2 liều 50 mg/kg và 100 mg/kg đều có tác dụng làm giảm LDL-C huyết thanh trong mô hình nghiên cứu. Tác dụng làm giảm LDL-C giữa 2 liều liposome BBR không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.6.3. So sánh ảnh hưởng của liposome berberin và hỗn dịch quy ước berberin trên nồng độ cholesterol tỉ trọng cao ở chuột được gây tăng lipid máu nội sinh

Kết quả ảnh hưởng trên nồng độ HDL-C của liposome BBR và hỗn dịch BBR ở chuột được gây tăng lipid máu nội sinh bằng P-407 được trình bày ở bảng 3.38.

Bảng 3.38. Nồng độ HDL-C huyết thanh ở các nhóm chuột nhất được gây tăng lipid máu nội sinh sau 10 ngày điều trị ($TB \pm SD$, $n = 8-9$)

Lô	Liều dùng (mg/kg)	HDL-C (mmol/L)
Chứng sinh lý		$2,66 \pm 0,47$
Chứng bệnh		$2,66 \pm 0,37$
Chứng dương (atorvastatin)	20	$2,44 \pm 0,37$
Đối chiếu (hỗn dịch quy ước BBR)	100	$2,47 \pm 0,29$
Thử 1 (liposome berberin)	50	$2,71 \pm 0,59$
Thử 2 (liposome berberin)	100	$2,86 \pm 0,43$

Kết quả ở bảng 3.38 cho thấy chuột nhất trắng sau khi gây tăng lipid máu bằng P-407 có nồng độ HDL-C không khác biệt so với lô chứng sinh lý ($p > 0,05$). Điều này chứng tỏ rằng P-407 không làm tăng hay giảm nồng độ HDL-C trong huyết thanh chuột một cách có ý nghĩa thống kê. Ở các nhóm chuột được điều trị bằng atorvastatin 20 mg/kg hoặc hỗn dịch BBR quy ước hoặc liposome BBR với các liều tương ứng với BBR 50mg/kg và 100 mg/kg, nồng độ HDL-C không có sự khác biệt so với nhóm chứng bệnh với tất cả các giá trị p đều lớn hơn 0,05.

3.6.4. So sánh ảnh hưởng của liposome berberin và hỗn dịch quy ước berberin trên nồng độ triglycerid ở chuột được gây tăng lipid máu nội sinh

Kết quả ảnh hưởng trên nồng độ TG của liposome BBR và hỗn dịch quy ước BBR ở chuột được gây tăng lipid máu nội sinh bằng P-407 được trình bày ở bảng 3.39.

Bảng 3.39. Nồng độ TG huyết thanh ở các nhóm chuột nhất được gây tăng lipid máu nội sinh sau 10 ngày điều trị (TB $\pm$ SD, n= 8-9)

Lô	Liều dùng (mg/kg)	TG (mmol/L)	% giảm so với chứng bệnh
Chứng sinh lý		1,74 $\pm$ 0,93	
Chứng bệnh		11,90 $\pm$ 2,84 [#]	
Chứng dương (atorvastatin)	20	10,34 $\pm$ 4,98	13,11
Đối chiếu (hỗn dịch quy ước BBR)	100	10,53 $\pm$ 5,64	11,51
Thử 1 (liposome berberin)	50	7,42 $\pm$ 3,47*	37,65
Thử 2 (liposome berberin)	100	7,36 $\pm$ 3,78*	38,15

Ghi chú: (*): $p < 0,05$ khi so sánh với lô chứng bệnh; (**): $p < 0,01$ khi so sánh với lô chứng bệnh; (#): $p < 0,001$ khi so sánh với lô chứng sinh lý.

Kết quả ở bảng 3.39 cho thấy, P-407 với liều 200 mg/kg đã làm tăng nồng độ TG trung bình trong huyết thanh chuột nhất trắng một cách rõ rệt với tỉ lệ tăng 583,91% so với nhóm sinh lý ($p < 0,001$). Ở nhóm chuột được điều trị bằng atorvastatin liều 20 mg/kg, nồng độ TG trung bình có xu hướng giảm với tỉ lệ giảm 13,11% so với nhóm chứng bệnh, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tương tự, nhóm chuột được điều trị bằng hỗn dịch BBR quy ước cũng có xu hướng làm giảm TG trong huyết thanh 11,5% so với nhóm chứng bệnh, nhưng mức giảm này chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Ở nhóm chuột được điều trị bằng

hỗn dịch liposome BBR với cả 2 mức liều tương ứng với BBR 50 mg/kg và 100 mg/kg, nồng độ TG trung bình trong huyết thanh giảm một cách có ý nghĩa thống kê với tỉ lệ giảm lần lượt là 37,6% và 38,2% so với nhóm chứng bệnh với các giá trị $p < 0,05$.

Như vậy, hỗn dịch BBR quy ước ở liều 100 mg/kg không có tác dụng làm giảm nồng độ TG trong huyết thanh trên chuột nhắt trắng được làm tăng TG nội sinh bằng P-407 ở mức liều 200 mg/kg. Nhưng hỗn dịch liposome BBR lại có tác dụng làm giảm nồng độ TG trong huyết thanh ở cả hai mức liều tương ứng với BBR 50mg/kg và 100 mg/kg. Tác dụng làm giảm TG giữa 2 liều liposome BBR không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. VỀ NGHIÊN CỨU TIỀN CÔNG THỨC

Nghiên cứu các tính chất lý hóa của dược chất là một bước quan trọng trước khi xây dựng công thức bào chế. Trong nghiên cứu của luận án, BBR được quan sát các đặc điểm về hình thái, kích thước bằng chụp SEM, xác định trạng thái của dược chất tồn tại ở dạng kết tinh bằng đo phổ nhiễu xạ tia X. Ở trạng thái kết tinh, BBR có các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng ở các vị trí $9,1^\circ$, $9,7^\circ$, $13,4^\circ$, $16,7^\circ$ và $25,8^\circ$ 2θ . Kết quả này tương tự với nghiên cứu trước đây của Sahibzada, tác giả đã công bố BBR tồn tại ở dạng kết tinh và có các đỉnh nhiễu xạ ở các vị trí $8,6^\circ$, $9,1^\circ$, $12,9^\circ$, $16,2^\circ$, $20,9^\circ$ và $25,4^\circ$ 2θ [123].

Phổ hồng ngoại của BBR thể hiện các dao động đặc trưng của dị vòng ni-tơ 6 cạnh (các tín hiệu mạnh, sắc nhọn ở số sóng 1598, 1505, 1388, và 1363 cm^{-1}), nhóm ether oxyd (2 tín hiệu ở 975 và 897 cm^{-1}), nhóm oxyd thơm (2 tín hiệu bất đối xứng với cường độ mạnh ở số sóng 1271 cm^{-1} và 1232 cm^{-1} và 2 tín hiệu đối xứng với cường độ trung bình ở số sóng 1065 và 1034 cm^{-1}) phù hợp với công bố của Pretsch Ernő [118]. Trong công bố của Pretsch, khung dị vòng ni-tơ 6 cạnh có khoảng số sóng dao động $1610\text{--}1361\text{ cm}^{-1}$, nhóm chức oxyd thơm (ArC-O-CH_3) có các khoảng số sóng dao động $1275\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ và khoảng số sóng $1075\text{--}1020\text{ cm}^{-1}$, vòng cyclic ether có dao động tại số sóng khoảng 950 cm^{-1} và khung cyclic ether thơm dao động ở số sóng khoảng 925 cm^{-1} . Kết quả của luận án cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Sahibzada [123], tác giả đã báo cáo dao động của liên kết $\text{C}=\text{C}$ vòng thơm tạo ra các dao động ở số sóng $1504,48\text{ cm}^{-1}$ và $1597,06\text{ cm}^{-1}$, dao động của khung C-C ở bước sóng $700\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$.

BBR có tính chất phát huỳnh quang tự nhiên với cường độ phát quang trong môi trường ethanol mạnh hơn môi trường nước. Dải bước sóng phát quang của dung dịch BBR $0,2\text{ mg/ml}$ trong nước khi kích thích ở bước sóng $\lambda_{\text{max}} = 343\text{ nm}$ nằm trong khoảng $460\text{ nm} - 670\text{ nm}$. Kết quả này cũng lặp lại khi kích thích dung dịch BBR $0,2\text{ mg/ml}$ trong ethanol ở bước sóng ở $\lambda_{\text{max}} = 350\text{ nm}$. Kết quả của luận án cũng phù hợp

với kết quả nghiên cứu của Domingo và cộng sự [47], tác giả đã công bố khi kích dung dịch BBR trong nước nồng độ 8 mg/100ml ở $\lambda_{\max}$ = 350 nm thì phổ phát quang nằm trong khoảng 470 nm – 670 nm. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của đề tài, qua khảo sát đỉnh hấp thụ cực đại của BBR trong dung môi khác nhau cho kết quả khác nhau (do ảnh hưởng của dung môi gây nên sự dịch chuyển bước sóng hấp thụ cực đại) nên bước sóng kích thích khác nhau được lựa chọn khi đo phổ phát huỳnh quang theo nguyên tắc ở bước sóng hấp thụ cực đại sẽ cho cường độ phát huỳnh quang mạnh nhất.

Kết quả về sự thay đổi hàm lượng BBR dưới 2% sau 1 tháng theo dõi trong điều kiện lão hóa cấp tốc khi phối hợp với các tá dược khác cho thấy rằng BBR khá ổn định trong điều kiện bảo quản nhiệt độ 40 °C và không có sự tương tác nào đáng lưu ý với các tá dược trong danh mục nghiên cứu. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Battu và cộng sự khi nhóm nghiên cứu báo cáo rằng BBR trong các môi trường đệm khác nhau sau bảo quản 6 tháng ở 2 điều kiện nhiệt độ 25 °C và 40 °C có phần trăm độ ổn định hơn 95% [24].

4.2. VỀ BÀO CHẾ VÀ ĐÁNH GIÁ LIPOSOME BERBERIN

4.2.1. Yếu tố công thức

Khi thiết kế công thức bào chế, 2 lipid HSPC và DSPG được sử dụng bởi đây là hai trong số những phospholipid thường sử dụng để bào chế liposome và có nhiệt độ chuyển pha cao ở 54,5 °C với DSPG và 55 °C đối với HSPC [4], [126]. Theo nghiên cứu của Richard, nếu thành phần phospholipid của liposome có nhiệt chuyển pha dưới 37 °C thì liposome sẽ bị phá hủy bởi muối mật, nhưng với phospholipid có nhiệt chuyển pha cao trên 37 °C thì tác động của muối mật sẽ không ảnh hưởng đến sự nguyên vẹn của liposome [121]. HSPC và DSPG sử dụng trong công thức có nhiệt chuyển pha cao trên 37 °C nên hai phospholipid này sẽ giúp liposome ổn định trong đường tiêu hóa khi sử dụng đường uống [63], [121], [139].

Một thành phần khác không phải là thành phần chính trong cấu tạo liposome nhưng có vai trò quan trọng không kém đến sự ổn định của liposome là α -tocopherol. Alpha-tocopherol được đưa vào công thức như là một chất chống oxy hóa để ổn định màng phospholipid kép và làm giảm rò rỉ dược chất [19], [119].

Thành phần có vai trò làm ổn định liposome được sử dụng trong công thức bào

chế liposome BBR là NaDC. Theo Birru, các muối mật tiết từ gan rồi đổ vào đường ruột sẽ là một trong những yếu tố làm phá vỡ cấu trúc liposome trong đường tiêu hóa [28]. Theo báo cáo của Shukla và cộng sự, khi lớp phospholipid kép của liposome được liên kết sẵn với muối mật thì lớp vỏ liposome sẽ không tương tác với muối mật ở ngoại môi [131]. NaDC là một muối mật, được chủ động đưa vào công thức để bào chế liposome nhằm tránh tác động bất lợi của muối mật ở ngoại môi đến sự ổn định và tính nguyên vẹn của liposome khi vượt qua các hàng rào bất lợi trong đường tiêu hóa. Ngoài ra, các muối mật còn có vai trò làm tăng sinh khả dụng đường uống của liposome và hạn chế sự giải phóng dược chất từ liposome trong đường tiêu hóa [56].

Trong bào chế liposome trực tiếp bằng phương pháp tiêm ethanol, thành phần công thức ảnh hưởng một cách đáng kể đến KTTTP và phân bố KTTTP. Với công thức FJ17, thành phần gồm có BBR : lipid : NaDC : α -tocopherol với tỉ lệ mol 8 : 9 : 2 : 2, kết quả đo bằng kỹ thuật DLS cho thấy mẫu FJ17 có kích thước liposome nhỏ, phân bố KTTTP hẹp (PDI 0,113) hơn nhiều so với công thức không có một trong hai thành phần NaDC (FJ04) và α -tocopherol (FJ21). Hình ảnh chụp bằng cryo-EM về hình thái và KTTTP của liposome FJ17 (có NaDC) với FJ21 (không có NaDC) cũng cho thấy liposome FJ17 nhỏ hơn nhiều so với liposome FJ21 (hình 3.9a,b). Kết quả này cũng lặp lại với mẫu bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film, thể hiện ở mẫu FH17 có KTTTP trung bình nhỏ hơn các mẫu FH04 và FH21. Như vậy, sự kết hợp giữa NaDC và α -tocopherol có vai trò làm giảm kích thước tiểu phân liposome nhỏ hơn so với chỉ có α -tocopherol. Kết quả này khẳng định thêm vai trò của NaDC với KTTTP của liposome như báo cáo trước đây của Zheng và cộng sự về sự ảnh hưởng của NaDC lên sự hình thành transferosome (là một loại liposome có KTTTP nhỏ làm tăng tính thấm qua da) [163]. Bên cạnh làm giảm KTTTP liposome, NaDC cũng có vai trò nhất định trong việc làm tăng hiệu suất nạp của liposome khi kết hợp với α -tocopherol. Điều này có thể giải thích rằng cả hai thành phần trên đều là thành phần thân dầu, đặc biệt NaDC và cả α -tocopherol có cấu trúc gần giống với cholesterol nên khi hình thành liposome, NaDC và α -tocopherol sẽ xen vào cấu trúc của màng phospholipid kép và làm chặt chẽ cấu trúc màng, do đó giữ được dược chất ở trong

liposome và giảm rò rỉ dược chất. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Song năm 2005, tác giả đã công bố liposome có chứa NaTDC có hiệu suất nạp tăng lên 2,8 lần so với liposome không chứa NaTDC [135].

Tỉ lệ mol dược chất BBR có ảnh hưởng đến kích thước tiểu phân trong bào chế liposome bằng cả 2 phương pháp. Khi tăng dần tỉ lệ mol BBR từ 6 lên 8 và lên 9 trong công thức thì kích thước tăng dần nhưng hiệu suất nạp lại giảm dần. Ở phương pháp tiêm ethanol, mẫu FJ18 có tỉ lệ mol (BBR : Lipid : NaDC : α -tocopherol) = (6 : 9 : 2 : 0) có KTTTP trung bình nhỏ nhất (51 nm) trong khi mẫu FJ12 với tỉ lệ mol BBR tăng lên 8 thì KTTTP trung bình tăng lên đến 120 nm và khi tỉ lệ này tăng lên 9 thì KTTTP trung bình tăng lên 134 nm. Ngược lại với KTTTP, hiệu suất nạp BBR lại giảm dần khi tăng tỉ lệ mol. FJ18 có tỉ lệ mol dược chất thấp nhất thì có hiệu suất nạp cao nhất (65%) trong khi mẫu FJ04 có tỉ lệ mol dược chất cao nhất lại có hiệu suất nạp thấp nhất (56%). Quy luật này cũng lặp lại trong các mẫu liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film. Mẫu FH18 có hiệu suất nạp cao nhất (78%) và mẫu FH04 có hiệu suất nạp thấp nhất (60,5%). Kết quả này có thể giải thích là do khả năng liên kết giữa dược chất với màng phospholipid kép có giới hạn. Khi lượng dược chất vượt quá giới hạn liên kết của màng thì bị loại bỏ và trở thành dược chất tự do.

Tỉ lệ mol HSPC: DSPG ảnh hưởng đến KTTTP liposome được bào chế bằng 2 phương pháp có thể giải thích rằng sự hình thành hay sự hòa màng liposome chịu tác động của tỉ lệ 2 loại lipid này. Do đó khi tỉ lệ mol thay đổi, sự đan xen giữa HSPC và DSPG để tạo màng phospholipid kép có sự xáo trộn và dẫn đến sự khác nhau về KTTTP của liposome.

Kết quả về ảnh hưởng của tỉ lệ mol HSPC: DSPG đến hiệu suất liposome hóa trong cả hai phương pháp bào chế liposome được trình bày ở bảng 3.10 (phương pháp tiêm ethanol) và bảng 3.14 (phương pháp hydrat hóa film) cho thấy rằng tỉ lệ mol giữa 2 loại lipid ảnh hưởng rõ rệt lên hiệu suất nạp dược chất. Trong 3 tỉ lệ khảo sát thì tỉ lệ HSPC: DSPG = 4:6 cho hiệu suất nạp cao nhất, tiếp theo là tỉ lệ HSPC: DSPG = 6:4 và cuối cùng là tỉ lệ HSPC: DSPG = 7:3. Như vậy, hiệu suất nạp tăng dần khi tỉ lệ DSPG tăng. Kết quả này có thể được giải thích là do ảnh hưởng của sự tích điện của lipid DSPG và HSPC khác nhau. Lipid DSPG tích điện âm (-1) trong khi HSPC

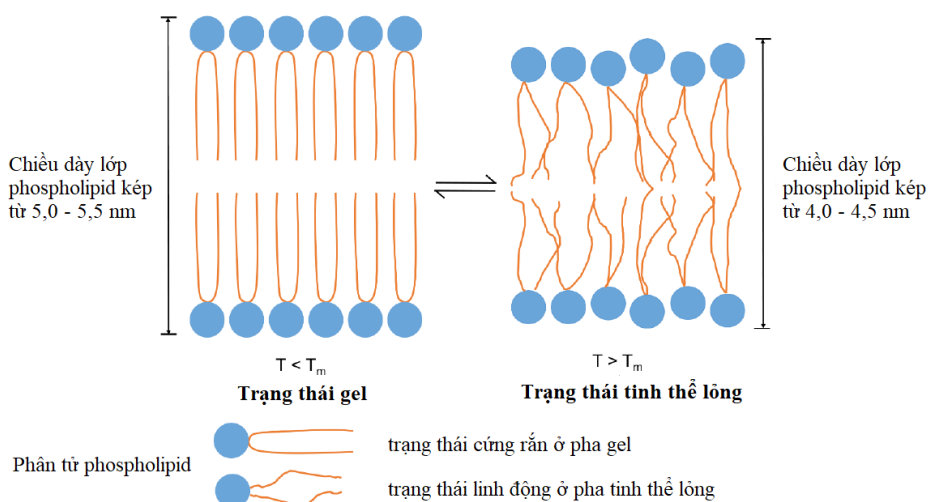
không tích điện [109]. Mặt khác, phân tử BBR tích điện dương (do có nguyên tử N^+) do đó khi BBR được nạp vào liposome, sự tương tác tĩnh điện giữa phân tử DSPG và HSPC tạo cặp ion dẫn đến BBR được giữ trong màng nhiều hơn khi tăng tỉ lệ DSPG. Vì vậy, hiệu suất liposome hóa tăng.

4.2.2. Yếu tố quy trình bào chế

Trong bào chế liposome bằng phương pháp tiêm ethanol, một số thông số quy trình được lựa chọn chủ động nhằm phù hợp với mục đích nghiên cứu của đề tài. Tỉ lệ pha ethanol: nước trong nghiên cứu của luận án được lựa chọn chủ động là 1:3 với mục đích làm tăng cỡ mẫu của liposome và giảm thời gian cô đặc, tránh tối thiểu tác động của nhiệt và áp suất lên liposome trong quá trình bào chế. Tốc độ khuấy 500 vòng/phút được lựa chọn dựa trên thực tế quan sát khả năng xáo trộn của hỗn hợp trong quá trình tiêm pha ethanol vào pha nước, đảm bảo cho giọt pha ethanol được phân tán nhanh và đều vào pha nước. Kích thước đầu kim tiêm được lựa chọn loại 27G (đường kính trong 0,21 mm) là loại có đường kính nhỏ nhất nhằm tạo ra giọt tiêm nhỏ và tia phun mạnh, tạo khả năng phân tán pha ethanol vào pha nước đồng đều và nhanh chóng. Do đó các phân tử phospholipid cũng sẽ phân tán đều và nhanh trong pha nước.

Nhiệt độ phối hợp 2 pha trong bào chế liposome BBR bằng phương pháp tiêm ethanol được khảo sát ở 3 mức là 45, 55 và 65 °C. Cơ sở lựa chọn mức nhiệt độ này là dựa vào nhiệt chuyển pha của 2 lipid đang sử dụng: HSPC và DSPG với nhiệt chuyển pha lần lượt là 55 và 54,5 °C [4], [117]. Vậy nên nghiên cứu lựa chọn các mức trên, bằng và dưới nhiệt chuyển pha để đánh giá sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến đặc tính liposome. Từ đó, chọn được nhiệt độ thích hợp nhất cho quá trình bào chế. Kết quả cho thấy rằng ở mức nhiệt độ dưới nhiệt chuyển pha, liposome tạo thành có hai quần thể khác nhau chứng tỏ đã xảy ra sự không đồng nhất về quá trình hình thành liposome. KTTP trung bình lớn nhất trong 3 mức nhiệt. Ở mức nhiệt 55 và 65 °C (mức bằng và trên nhiệt chuyển pha), liposome hình thành đồng nhất hơn và chỉ có 1 quần thể trong mỗi mẫu. KTTP của mẫu phối hợp pha ethanol và nước ở nhiệt trên nhiệt chuyển pha nhỏ nhất. Ngoài sự khác nhau về KTTP, hiệu suất nạp của mẫu bào chế dưới nhiệt chuyển pha thấp hơn hai mẫu ở mức nhiệt chuyển pha và trên nhiệt

chuyển pha. Mẫu liposome bào chế ở mức nhiệt phối hợp 2 pha ethanol và nước trên mức nhiệt chuyển pha vừa cho KTTT đồng nhất nhất, hiệu suất nạp cao nhất. Điều này có thể giải thích là do khi lipid ở trên nhiệt chuyển pha, trạng thái vật lý của lipid chuyển từ pha gel qua pha tinh thể lỏng hoàn toàn, cấu trúc màng phospholipid kép linh động hơn, bề dày màng lipid kép nhỏ lại. Vì vậy, các phân tử phospholipid dễ dàng sắp xếp thành màng kép và liposome hình thành với kích thước nhỏ đồng nhất. Ngoài ra, sự linh động của phân tử phospholipid làm cho được chất dễ nạp vào liposome. Trong khi đó, ở mẫu phối hợp 2 pha dưới mức nhiệt chuyển pha, phân tử phospholipid ở trạng thái gel cứng nhắc và sự hình thành màng kép và tiếp chuyển thành liposome khó khăn hơn, được chất được bao gói vào liposome cũng hạn chế hơn (hình 4.1)



Hình 4.1. Sơ đồ quá trình chuyển pha gel sang pha tinh thể lỏng của màng phospholipid kép [50]

Áp suất và nhiệt độ trong quá trình loại bỏ dung môi ở phương pháp tiêm ethanol để bào chế liposome có ảnh hưởng lớn đến tính đồng nhất của sự hình thành quần thể liposome. Khoảng nhiệt độ 60 - 65 °C và áp suất 180 mbar là điều kiện phù hợp để cất quay loại bỏ dung môi. Với nhiệt độ 60 °C và áp suất 200 mbar, hỗn dịch thu được mặc dù có kích thước nhỏ nhưng có 2-3 quần thể liposome với kích thước trung bình của các quần thể chênh nhau đến gần 100 nm. Điều này có thể giải thích là khi áp suất giảm và nhiệt độ chưa phù hợp nên dung môi được loại bỏ quá chậm hoặc tốc độ bay hơi không đều, dẫn đến sự hình thành những quần thể liposome có kích thước nhỏ và to khác nhau. Với nhiệt độ 60 °C và áp suất 130 mbar thì dung môi

lại bay hơi quá nhanh, làm các phân tử lipid sắp xếp thành lớp lipid kép nhanh chóng, tạo thành liposome không đồng đều. Với nhiệt độ 65 °C và áp suất 130 mbar, tác động của nhiệt độ cao và áp suất giảm mạnh có thể làm biến đổi một số trạng thái vật lý của lipid, tạo ra hỗn dịch có các tiểu phân bị keo hóa dính trên thành bình.

Phương pháp làm nhỏ KTTP liposome bằng đùn qua màng polycarbonat là phương pháp được lựa chọn nhiều nhất trong các nghiên cứu bào chế liposome BBR [15], [92], [100]. Khác với các loại màng khác có cấu trúc lỗ lọc xoắn, màng polycarbonat có cấu trúc lỗ lọc hình trụ thẳng, có thể giúp các tiểu phân được chui qua dưới tác động của lực nén để làm nhỏ tiểu phân mà không bị giữ lại trong màng. So với phương pháp làm nhỏ KTTP bằng đồng nhất hóa áp suất cao thì phương pháp đùn qua màng giảm được sự rò rỉ dược chất tốt hơn [92]. Trong nghiên cứu của luận án, màng polycarbonat có kích thước lỗ lọc 400 nm được lựa chọn để sử dụng phù hợp với đặc điểm liposome tạo thành. Số lần đùn qua màng được khảo sát là 20, 40 và 60 lần bằng thiết bị đùn mini extruder. Sau 20 lần đùn, liposome bị bóc tách và tạo thành quần thể không đồng nhất nên không thể đo được KTTP do không phù hợp với tiêu chí đo của thiết bị. Sau 60 lần đùn, KTTP mới đồng nhất và cho phân bố KTTP hẹp. So với phương pháp siêu âm và đồng nhất hóa thì phương pháp đùn qua màng tốn nhiều thời gian hơn. Tuy nhiên, phương pháp siêu âm có nguy cơ làm rò rỉ dược chất và đưa tạp kim loại vào hỗn dịch. Phương pháp đồng nhất hóa áp suất cao tuy nhanh nhưng hơn đòi hỏi lượng mẫu lớn, không phù hợp với nghiên cứu tham dò ban đầu. Phương pháp đùn qua màng với thiết bị đơn giản và giảm được rò rỉ dược chất, phù hợp với cỡ mẫu nhỏ cho nghiên cứu quy mô phòng thí nghiệm.

4.2.3. Phương pháp bào chế

Phương pháp tiêm ethanol và phương pháp hydrat hóa film là các phương pháp bào chế liposome được sử dụng phổ biến ở quy mô phòng thí nghiệm. Phương pháp tiêm ethanol thậm chí còn là phương pháp phù hợp để nâng cấp quy mô do đơn giản, an toàn, có thể kiểm soát kích thước tiểu phân bằng điều chỉnh nhiệt độ pha nước khi phối hợp hai pha [73]. Trong kết quả nghiên cứu của luận án, liposome bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol có KTTP nhỏ hơn và phân bố KTTP hẹp hơn liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film. Bằng kỹ thuật DLS, KTTP trung bình của liposome BBR bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol chỉ dưới 250 nm. Trong

khi đó, KTTTP trung bình của liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film có KTTTP trung bình đến 800 nm. Kết quả này là do sự khác nhau trong cơ chế hình thành liposome ở mỗi phương pháp. Ở phương pháp tiêm ethanol, liposome hình thành từ BBR, HSPC, DSPG, NaDC và α -tocopherol trong quá trình dung môi ethanol bị loại bỏ khỏi pha nước dưới tác dụng của nhiệt độ và áp suất giảm. Trong quá trình này, các phân tử dược chất và tá dược tự sắp xếp theo đặc tính lý hóa vốn có để tạo thành liposome. Tuy nhiên hỗn dịch liposome tạo ra từ phương pháp tiêm ethanol thường rất loãng, khó phù hợp để đưa vào dạng thuốc nếu không có biện pháp cô đặc. Ở phương pháp hydrat hóa màng mỏng lipid, dược chất BBR và các thành phần khác được hòa tan trong dung môi hữu cơ, sau đó dung môi được loại bỏ bằng áp suất giảm và nhiệt độ thích hợp để tráng thành lớp mỏng gồm BBR và các thành phần tạo liposome trên thành bình cầu. Tiếp theo lớp màng mỏng được hydrat hóa để tạo thành liposome. Liposome bào chế bằng phương pháp này có kích thước không đồng nhất, phải làm giảm KTTTP bằng các phương pháp như đun, siêu âm, .vv. [18].

Phương pháp bào chế khác nhau tạo ra liposome có cấu trúc khác nhau. Liposome BBR bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol có cấu trúc 1 lớp nhỏ (SUV) hoặc lớn (LUV) gồm 1 lớp phospholipid kép bao bọc quanh 1 nhân nước trung tâm (hình 3.9a và 3.9b). Liposome BBR bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film có nhiều loại cấu trúc khác nhau gồm liposome 1 lớp (UV), liposome nhiều lớp (MLV) và liposome nhiều ngăn (MVV) (hình 3.10). Kết quả này cũng phù hợp với công bố của Kim [80] và Uhl [143].

4.2.4. Phương pháp đánh giá

Về phương pháp đánh giá KTTTP và phân bố KTTTP:

Trong nghiên cứu này, phương pháp DLS được sử dụng để đo kích thước tiêu phân liposome bởi đây là phương pháp dễ sử dụng do thời gian đo mẫu ngắn (1-10 phút), chuẩn bị mẫu đơn giản, dễ thực hiện, chi phí thấp [43], [49]. Bên cạnh những ưu điểm trên, DLS có một số hạn chế như rất nhạy cảm với nhiệt độ và độ nhớt của dung môi, khó đo với mẫu không trong suốt, cốc đo phải luôn chuẩn bị sạch sẽ, tín hiệu mẫu đến detector phụ thuộc vào nồng độ của các đại phân tử [137]. Ngoài ra, một số phương pháp khác để đo kiểm tra KTTTP lại nhằm xem xét, phân tích kỹ lưỡng

hơn đặc tính của liposome cũng được sử dụng như phân tích vết hạt nano (NTA) (hình 3.8) và cryo-EM (hình 3.9). Ngoài chức năng đo KTTP với độ phân giải cao hơn so với DLS, phương pháp NTA còn có khả năng ghi lại dấu vết từng chuyển động đơn lẻ và cho phép nghiên cứu về độ phát quang của hạt nano [154]. Kỹ thuật DLS ghi lại sự phân bố kích thước dựa trên cường độ phân tán có độ phân giải thấp và không dễ để đo sự phân bố thể tích chính xác cho các mẫu đa phân tán. Sự phân bố kích thước hạt dựa vào số lượng tiểu phân dễ dàng chuyển thành phân bố theo thể tích mà không bị sai lệch nhiều khi sử dụng kỹ thuật NTA. Ngoài ra NTA còn đo cho phép nghiên cứu về độ phát quang của các hạt nano do đặc tính không kết hợp và không định hướng của ánh sáng huỳnh quang. Nhờ đó có thể xác định được hình dạng của liposome và xem xét có xảy ra sự kết tụ tiểu phân trong hỗn dịch hay không qua quan sát hình ảnh chuyển động của các tiểu phân. Nhược điểm của NTA là phạm vi nồng độ hạn chế [154]. Phương pháp cryo-EM được xem như là tiêu chuẩn vàng để phân tích hình ảnh liposome bởi vừa ghi được hình ảnh, vừa đo được KTTP và xác định được cấu trúc con của liposome. Tuy nhiên, cryo-EM có nhược điểm là chi phí đắt và thông lượng ít [43]. Với kết quả đo KTTP ở hình 3.9b, có thể thấy sự khác nhau về khả năng phát hiện của 2 phương pháp đo KTTP. Ở DLS chỉ phát hiện được các liposome KTTP trên 20 nm, nhưng với kỹ thuật cryo-EM, một số liposome với kích thước bé khoảng 5-6 nm cũng được phát hiện. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Crawford, tác giả đã báo cáo về sự khác nhau giữa DLS và cryo-EM trong xác định KTTP liposome. Kết quả giữa 2 phương pháp này chỉ giống nhau khi liposome là một hệ đơn phân tán và quần thể gồm các tiểu phân có cùng kích thước. Sự sai khác giữa 2 phương pháp đo là do hạn chế hoặc sai số của DLS khi phát hiện những tiểu phân nanolipid nhỏ trong hỗn dịch đa phân tán [27].

Về đánh giá hình thái và cấu trúc:

Hình thái và cấu trúc của liposome có thể được xác định bằng nhiều kỹ thuật khác nhau như: AFM, TEM, cryo-EM, TPFM, CLSM [39]. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật cryo-EM được sử dụng để xác định hình thái cấu trúc của liposome bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol do liposome tạo thành từ phương pháp này có kích thước nhỏ, đòi hỏi phải có thiết bị phân tích có độ phân giải cao. Liposome bào chế

bằng phương pháp hydrat hóa film có kích thước to hơn, có thể lên đến kích thước micro nên kính hiển vi điện từ huỳnh quang 2 photon (TPFM) được sử dụng để đồng thời xác định vị trí của BBR được nạp vào liposome do BBR có khả năng phát huỳnh quang tự nhiên. Thông qua xác định cấu trúc, có thể xác định được BBR nạp vào khoang nước hay vào lớp phospholipid kép.

Trong cấu trúc của liposome BBR bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film, nhờ vị trí phát huỳnh quang của BBR là ở lớp màng lipid kép (hình 3.10), có thể khẳng định rằng BBR được nạp vào màng phospholipid kép của liposome và không có BBR ở khoang nước. Theo các tài liệu đã công bố trước đây, khi bào chế liposome, được chất thân nước thì sẽ nằm trong khoang nước, được chất thân dầu sẽ nằm ở màng phospholipid kép [10]. Mặc dù tính chất vật lý của BBR có tính thân nước [24], nhưng kết quả nghiên cứu của luận án ngược lại nguyên lý phân bố được chất trong liposome như trên: BBR vẫn nằm trong màng phospholipid kép. Kết quả này cũng khác với các công bố trước đây của Allijn và Ma về giả thuyết phân bố của BBR trong liposome. Theo những nghiên cứu này, BBR được cho là phân bố trong khoang nước của liposome khi bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol [15] và hydrat hóa film [100]. Tuy nhiên, BBR được tải vào liposome theo phương pháp trong luận án là phương pháp thụ động. Các nghiên cứu của Allijn và Ma là phương pháp nạp được chất chủ động.

Về đánh giá hiệu suất liposome hóa:

Có nhiều phương pháp đánh giá hiệu suất liposome hóa: thẩm tích, tách sắc ký cột (lọc gel), li tâm, siêu lọc [31], [78], [120], [146]. Trong những phương pháp này thì phương pháp siêu lọc nhanh và có độ lặp lại cao, giảm bớt sự rò rỉ được chất. Vì vậy, trong nghiên cứu của luận án, phương pháp siêu lọc được chọn để đánh giá hiệu suất liposome hóa. Hiệu suất liposome hóa của liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film dao động từ 61 - 92%, trong lúc đó hiệu suất này ở phương pháp tiêm ethanol từ 56 - 88%. Sự khác nhau về hiệu suất nạp được chất giữa 2 phương pháp bào chế là do sự khác nhau về cấu trúc của liposome: liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film có cấu trúc đa dạng, từ đơn lớp, đa lớp đến nhiều ngăn trong khi cấu trúc liposome bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol chỉ có 1 ngăn. Mặt khác,

vị trí của BBR trong liposome được chứng minh qua hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử huỳnh quang 2 photon là nằm trong lớp phospholipid kép. Do đó, liposome có càng nhiều lớp hay nhiều ngăn thì càng nạp được nhiều dược chất. Kết quả về hiệu suất liposome hóa của liposome BBR bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film trong luận án cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyen và cộng sự, tác giả đã báo cáo rằng hiệu suất nạp của BBR vào liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film là 83,2% [110]. Kết quả này của luận án đồng thời cũng phù hợp với các kết quả nghiên cứu khác của Sailor (hiệu suất nạp dược chất từ 56-82%) [124], của Ma (93,5%) [100] và cao hơn hiệu suất nạp một số nghiên cứu bào chế liposome BBR bằng phương pháp hydrat hóa film khác như Calvo (2,1-28%) [32], Lin (14%) [92]. Hiệu suất nạp của liposome BBR bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol dao động từ 56-88%, thấp hơn kết quả của Luo (94%) [99]. Tuy nhiên, tỉ lệ dược chất/lipid (w/w) trong nghiên cứu của Luo chỉ có 1:20, trong khi đó trong nghiên cứu của luận án, tỉ lệ mol thấp nhất giữa BBR: lipid là 6 : 9 (tương ứng với tỉ lệ thấp nhất về khối lượng là 6:18).

Về phương pháp đánh giá trạng thái rắn của BBR nạp vào liposome:

Phương pháp chụp nhiễu xạ tia X và phương pháp phân tích nhiệt vi sai (DSC) là 2 phương pháp phổ biến để đánh giá trạng thái rắn của dược chất trong hệ tiểu phân. Trong nghiên cứu này, phương pháp nhiễu xạ tia X được thực hiện để đánh giá trạng thái rắn của BBR nạp vào liposome bào chế bằng 2 phương pháp tiêm ethanol và hydrat hóa film. Khi dược nạp vào liposome, các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của BBR đã biến mất tại các vị trí $9,1^\circ$, $9,7^\circ$, $13,4^\circ$, $16,7^\circ$, và $25,8^\circ$ 2θ mà thay vào đó là sự xuất hiện các đỉnh nhiễu xạ ở các vị trí mới tại $11,0^\circ$, $17,2^\circ$, $19,5^\circ$, $24,3^\circ$, $26,9^\circ$ và $27,7^\circ$ 2θ . Sự dịch chuyển góc nhiễu xạ này có nghĩa là khoảng cách mặt mạng tinh thể (d) của các nguyên tử BBR bị thay đổi bởi sự thay đổi góc 2θ theo công thức của định luật Brag:

$$d = \frac{n\lambda}{2\sin \theta}$$

Trong đó: n là bậc của nhiễu xạ, λ là bước sóng của tia X, θ là góc tia tới = $2\theta/2$.

Khi khoảng cách mặt tinh thể giữa các nguyên tử bị thay đổi có nghĩa là tính

chất kết tinh của BBR bị giảm bớt hoặc BBR đã liên kết chặt chẽ với các thành phần khác làm biến dạng mặt tinh thể. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Xue và cộng sự, tác giả đã chứng minh rằng khi BBR nạp vào hệ tiểu phân nanolipid sẽ chuyển từ trạng thái kết tinh sang dạng vô định hình [155]. Như kết quả ở hình 3.12, cường độ nhiễu xạ của các pic trong mẫu bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film yếu hơn nhiều so với cường độ các pic trong mẫu bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol. Điều này chứng tỏ rằng, sự chuyển trạng thái rắn của BBR ở liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film mạnh hơn so với phương pháp tiêm ethanol.

Về phương pháp đánh giá khả năng giải phóng dược chất:

Phương pháp động học thẩm tích được áp dụng để đánh giá khả năng giải phóng dược chất. Như kết quả trình bày ở hình 3.13, các mẫu liposome BBR đều có khả năng kéo dài giải phóng dược chất *in vitro*. Các mẫu bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol có tỉ lệ giải phóng dược chất cao hơn so với các mẫu bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film ở trong cả 3 môi trường. Trong vòng 8 giờ đầu, tỉ lệ giải phóng ở trong 3 môi trường của các mẫu đều trên 75%, ngoại trừ mẫu bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film (FH19 và FH16). Tỉ lệ giải phóng dược chất trong môi trường mô phỏng acid dịch vị cao hơn trong các môi trường pH 4,5 và 6,8. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu gần đây đã báo cáo rằng liposome không bền trong môi trường acid dẫn đến tốc độ giải phóng dược chất khác nhau trong các môi trường pH khác nhau [59]. Trong môi trường đệm phosphat pH 4,5 và pH 6,8, liposome bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol trong 8 giờ đầu giải phóng trên 90% trong lúc đó, liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film chỉ giải phóng xấp xỉ từ 75-85%. Sự khác nhau về tỉ lệ giải phóng dược chất từ liposome bào chế bằng hai phương pháp khác nhau này có thể giải thích là do sự khác nhau về cấu trúc của liposome. Liposome BBR bào chế bằng phương pháp tiêm ethanol có cấu trúc 1 lớp (hình 3.9), trong lúc đó, liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film lại có cấu trúc hỗn hợp: 1 lớp, nhiều lớp và nhiều ngăn (hình 3.10). Đây cũng là bằng chứng cho thấy rằng, liposome 1 lớp bị phá vỡ cấu trúc trong môi trường acid dịch vị nhanh hơn so với liposome nhiều ngăn hoặc nhiều lớp. Tỉ lệ giải phóng BBR từ liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film của luận án cũng phù hợp với kết quả của nghiên cứu trước đây của Sailor [124]. Tốc độ giải phóng của BBR từ liposome công thức F19 cao hơn từ liposome BBR F16. Điều này có thể giải thích là do tỉ lệ mol

được chất trong công thức F19 cao hơn so với công thức F16. BBR khi nạp vào liposome đã được chứng minh là nằm ở trong màng phospholipid kép (hình 3.10), do đó tỉ lệ mol BBR tăng làm cho mức độ chen vào màng phospholipid kép nhiều hơn làm cho màng lipid kép trở lên lỏng lẻo hơn nên giữ được được chất kém hơn.

4.3. VỀ BÀO CHẾ VÀ ĐÁNH GIÁ PROLIPOSOME BERBERIN

4.3.1. Yếu tố công thức

Công thức bào chế proliposome BBR được lựa chọn từ công thức tối ưu trong bào chế liposome BBR (F19). Thành phần công thức và tỉ lệ mol các thành phần được giữ nguyên gồm BBR:Lipid:NaDC: α -tocopherol = 8:9:2:2. Trong đó lipid gồm 2 loại HSPC và DSPG với tỉ lệ mol 4:6. Công thức này đã được khảo sát ở phần bào chế liposome BBR cho hiệu suất nạp cao, tỉ lệ được chất lớn, giải phóng được chất kéo dài đến hơn 8h trong môi trường đệm phosphat pH 6,8. Hai loại lipid sử dụng trong công thức thuộc nhóm PCs và PGs là những nhóm được sử dụng phổ biến trong bào chế proliposome BBR do tính ổn định tốt, độ tinh khiết cao và không độc [109]. Các chất ổn định proliposome thường được sử dụng trong bào chế proliposome gồm chất ổn định màng, chất tăng hiệu suất nạp là những chất tích điện dương hoặc âm và chất chống oxy hóa [109], [130]. Công thức bào chế proliposome BBR có chất tăng ổn định là NaDC và chất chống oxy hóa là α -tocopherol.

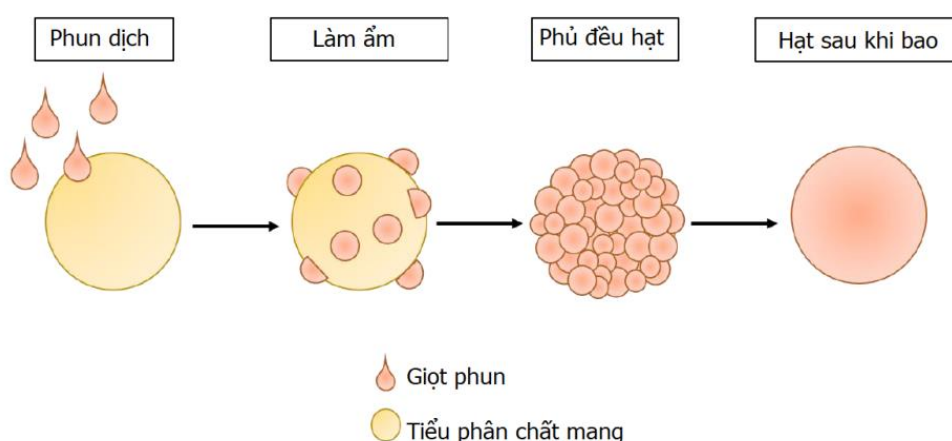
Manitol là chất mang được lựa chọn trong nghiên cứu này. Đó là một trong những chất mang thông dụng trong bào chế proliposome do có khả năng tan nhanh trong nước trong quá trình hydrat hóa để tạo thành hỗn dịch liposome [68]. Kích thước tiểu phân manitol khác nhau có thể sẽ ảnh hưởng đến khả năng chuyển động trong buồng bao và ảnh hưởng đến quá trình tạo màng. Tuy nhiên, việc kiểm soát các khoảng kích thước khác nhau dưới 125 μm không thể đánh giá bằng các biện pháp rây thông thường như trong bào chế và sản xuất nên luận án không khảo sát yếu tố này. Kích thước hạt manitol được đưa vào nghiên cứu là từ 125-500 μm .

Lượng dung môi hữu cơ trong công thức được sử dụng để tạo dịch phun khá lớn với nhằm tạo ra dịch bao loãng, giúp giọt phun dễ lan và bao phủ nhanh trên bề mặt chất mang để tạo thành lớp film. Tuy nhiên, hạn chế của việc sử dụng tỉ lệ dung môi khá lớn này là có thể ảnh hưởng đến ô nhiễm môi trường và tồn dư dung môi trong sản phẩm. Việc đánh giá dung môi tồn dư trong chế phẩm là cần thiết khi triển khai ứng dụng vào sản xuất.

4.3.2. Về phương pháp bào chế

Proliposome có thể bào chế bằng nhiều phương pháp khác nhau như tráng phim trên bề mặt chất mang, phun sấy, bao hạt, kháng dung môi siêu tới hạn, phương pháp đông khô, và tạo cốt lipid-dược chất [52], [61], [106], [130]. Trong nghiên cứu của luận án, phương pháp bao hạt được lựa chọn bởi phương pháp này có nhiều ưu điểm như quy trình đơn giản, dễ thực hiện và có thể nâng cấp qui mô [133].

Nguyên tắc bào chế proliposome theo phương pháp bao hạt được thực hiện dựa trên nguyên tắc của Grave [55]. Quy trình gồm 4 giai đoạn gồm: phun dịch bao lên hạt, để dịch bao thấm ẩm hạt, sấy khô và tiếp tục phun phủ đều hạt và sấy khô hạt (hình 4.2). Cuối cùng thu được các hạt gồm nhân manitol được phủ lớp film chứa các thành phần tạo liposome bên ngoài. Dung dịch bao hạt là thành phần tạo liposome được hòa tan trong dung môi hữu cơ phù hợp. Cơ chế tạo hạt trong phương pháp này là bồi dần từng lớp để tạo thành màng film đồng nhất trên bề mặt chất mang manitol.



Hình 4.2. Sơ đồ nguyên tắc bao hạt [55]

4.3.3. Về thông số quy trình bào chế và độ ổn định của proliposome berberin

a. Về thông số quy trình

Ở cả hai quy mô, áp suất đầu súng phun được lựa chọn chủ động qua quan sát nhằm tránh hiện tượng lắng đọng chất mang lên thành buồng tạo hạt bởi áp suất đầu súng phun không những tạo ra áp suất để thổi giọt phun đi mà còn tạo ra 1 áp suất lên thành buồng tạo hạt, thổi chất mang, giúp chống bám chất mang dính lên thành buồng.

Trong qui mô phòng thí nghiệm, tốc độ phun cũng được chủ động lựa chọn phù

hợp với lượng chất mang có sẵn trong buồng tạo hạt. Các thông số quy trình khác bao gồm nhiệt khí vào, tốc độ thổi khí được khảo sát để đánh giá ảnh hưởng của các thông số này lên đặc tính sản phẩm. Kết quả cho thấy rằng, hai thông số này ảnh hưởng rất nhiều đến hình thái proliposome BBR. Với thiết bị bao Mini-Glatt có dung tích buồng bao 5 lít, nếu nhiệt độ khí vào và áp suất thổi khí cao quá (tốc độ thổi khí 15 m³/h, nhiệt khí vào 50°C), giọt phun khô nhanh trước khi bám vào chất mang và/hoặc giọt phun không bám vào được trên chất mang do chất mang di chuyển rất nhanh qua khỏi vùng bao. Đây là nguyên nhân gây nên sự không đồng nhất về hình thái tiểu phân proliposome BBR thu được (hình 3.15). Với nhiệt khí vào 50°C và tốc độ thổi khí 10 m³/h, mặc dù giọt phun bám được trên chất mang do tốc độ thổi khí thấp, chất mang được treo lơ lửng trong vùng bao nhưng nhiệt độ khí vào cao nên giọt phun khô nhanh khi tiếp xúc với chất mang, dẫn đến sự hình thành một số vi cầu ở các mặt chất mang thô ráp xù xì (hình 3.16). Với nhiệt khí vào 45°C và tốc độ thổi khí 10 m³/h, giọt phun bám được lên chất mang và dịch phun có khả năng lan đều trên bề mặt chất mang trước khi khô. Vì vậy, chất mang được bao đều tạo thành màng film, kể cả những vị trí thô ráp, gồ ghề (hình 3.17 và hình 3.18). Như vậy, thông số nhiệt khí vào 45°C và tốc độ thổi khí 10 m³/h là phù hợp nhất để bào chế proliposome BBR bằng phương pháp bao tăng sôi với chất mang là manitol, dịch phun là dung dịch các thành phần tạo liposome BBR được hòa tan trong hỗn hợp methanol và cloroform với tỉ lệ 2,5:1 (v/v). Kết quả thu được cho thấy rằng, thông số nhiệt độ, nhiệt khí vào ảnh hưởng đến sự đồng nhất và bề mặt tiểu phân proliposome BBR. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Jones [72], tác giả đã công bố rằng, các yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến sự hình thành màng film trên tiểu phân bao gồm sự bốc hơi dung môi, tốc độ cấp dịch, kích thước giọt phun. Trong nghiên cứu của luận án, tốc độ cấp dịch được cố định và áp suất súng phun không đổi, nên kích thước giọt phun sẽ không thay đổi trong quá trình bao. Do đó, sự bốc hơi dung môi là yếu tố quyết định hình thái và sự hình thành màng film quanh chất mang của proliposome BBR. Tốc độ này lại chịu ảnh hưởng 2 thông số nhiệt khí vào và tốc độ thổi khí.

Trong nâng cấp quy mô, áp suất phun cũng được khảo sát dựa trên quan sát mức độ bám dính lên thành buồng tạo hạt của chất mang. Với thiết bị Diosna-Minilab,

áp suất súng phun 1,2 bar, chất mang được thổi khô thành buồng tạo hạt để đi vào vùng bao. Tốc độ phun dịch được nâng từ mức 1,5 ml/phút ở qui mô phòng thí nghiệm lên 4,5 ml/phút trong nâng cấp qui mô. Tốc độ phun dịch được khảo sát theo tốc độ thổi khí bởi tốc độ thổi khí quyết định năng suất sấy. Hơn nữa, nghiên cứu của Jones chỉ ra rằng tốc độ phun dịch không phụ thuộc vào cỡ lô [72]. Sau khi khảo sát, tốc độ thổi khí được lựa chọn trong nghiên cứu này là 45%. Với tốc độ thổi khí này, chất mang được thổi với vận tốc phù hợp, tạo điều kiện thuận lợi cho giọt phun bám lên bề mặt trong quá trình bao, đồng thời tạo năng suất sấy phù hợp cho quá trình bao.

b. Về độ ổn định của proliposome berberin

Các chỉ tiêu độ ổn định về hàm lượng, độ ẩm, khả năng giải phóng dược chất, độ ổn định về hình thái, trạng thái lý hóa của proliposome BBR sau thời gian bảo quản 6 tháng ở hai điều kiện thực và LHCT đã được đánh giá. Kết quả cho thấy, các tiêu chí trên mặc dù có sự thay đổi tại các thời điểm đánh giá, tuy nhiên các giá trị đo được vẫn nằm trong phạm vi cho phép về độ sai lệch giữa các lần đo. Ngoài ra, một số tiêu chí về liposome hoàn nguyên cũng được đánh giá độ ổn định như KTTP, phân bố KTTP, hiệu suất liposome hóa, ở hai điều kiện bảo quản trên. Như vậy, proliposome đã được đánh giá các tiêu chí không những phù hợp với những nghiên cứu trước đây về proliposome [11], [83], [114] mà còn phù hợp với hướng dẫn chung của ASEAN về nghiên cứu độ ổn định các chế phẩm thuốc [20].

Về bao bì đóng gói, proliposome BBR vẫn đảm bảo được sự ổn định về tiêu chí mất khối lượng do làm khô qua thời gian theo dõi ở 2 điều kiện thực và LHCT, chứng tỏ proliposome BBR được đóng trong bao bì túi nhôm hàn kín đảm bảo không thấm ẩm sau 6 tháng bảo quản.

4.3.4. Về phương pháp đánh giá

a. Đánh giá hình thái

Proliposome BBR được đánh giá hình thái bằng phương pháp chụp SEM là phương pháp phổ biến để quan sát bề mặt. Mẫu được quan sát dưới các độ phóng đại khác nhau, để vừa quan sát hình thái tiểu phân, vừa quan sát bề mặt. Hình thái của tiểu phân proliposome BBR có hình thái giống với chất mang manitol nhưng được phủ lên bề mặt một bởi thành phần tạo liposome. Tùy thuộc vào nhiệt độ và tốc độ

thời khí mà mà lớp phủ là màng film hoặc là các vi cầu hoặc vừa màng film vừa vi cầu.

Cường độ điện trường được lựa chọn với mức từ 2-5kV để vừa quan sát được hình thái bề mặt mẫu nhưng vừa đảm bảo không ảnh hưởng đến chất lượng mẫu và không làm hỏng mẫu.

b. Đánh giá một số đặc tính lý hóa của proliposome BBR

Các đặc tính lý hóa của proliposome BBR được đánh giá bằng phương pháp đo nhiễu xạ tia X (XRD) và phổ hấp thụ hồng ngoại (FTIR).

Phổ nhiễu xạ tia X cho thấy đặc tính kết tinh dạng tinh thể của BBR nguyên liệu tạo ra nhiều đỉnh nhiễu xạ tại các vị trí $9,1^\circ$, $9,7^\circ$, $13,4^\circ$, $16,7^\circ$ và $25,8^\circ$ 2θ . Nhưng các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng này bị mất đi khi BBR được nạp vào proliposome, chứng tỏ BBR đã bị chuyển dạng từ kết tinh sang vô định hình. Kết quả này cũng tương tự như kết quả của Jia và cộng sự khi đánh giá proliposome BBR được bào chế bằng phương pháp sử dụng carbondioxid siêu tới hạn [69]. Một số thành phần khác như NaDC tồn tại ở dạng kết tinh, trong lúc đó HSPC, DSPG tồn tại ở dạng bán kết tinh. Tuy nhiên, các thành phần này đều chuyển thành dạng vô định hình khi tạo thành proliposome. Riêng manitol không bị ảnh hưởng bởi quá trình tạo thành proliposome, vẫn tồn tại ở dạng kết tinh và thể hiện đầy đủ các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng như dạng nguyên liệu trong phổ nhiễu xạ.

Phổ hấp thụ hồng ngoại của BBR (hình 3.21) thể hiện các tín hiệu dao động bất đối với cường độ mạnh tại số sóng 127 cm^{-1} , 1232 cm^{-1} và 2 dao động cân đối với cường độ trung bình tại số sóng 1065 cm^{-1} , 1034 cm^{-1} . Đây là các dao động của nhóm aryl ether oxyd (ArC-O-CH_3). Các dao động mạnh với cường độ lớn tại số sóng 1598 cm^{-1} , 1505 cm^{-1} , 1388 cm^{-1} và 1363 cm^{-1} là các tín hiệu dao động của dị vòng N 6 cạnh. Tương tự như vậy, nhóm ether vòng và nhóm ether vòng thơm cho các dao động lần lượt tại số sóng 975 cm^{-1} và 987 cm^{-1} . Các dao động đặc trưng của các nhóm chức trong cấu trúc phân tử BBR ở các số sóng này cũng phù hợp với tài liệu đã công bố trước đây của Ernő về phổ hồng ngoại của các nhóm chức của hợp chất hữu cơ [118]. Phổ hấp thụ hồng ngoại của proliposome BBR cho thấy khi được nạp vào màng film của proliposome, BBR đã liên kết chặt chẽ với các thành phần tạo màng film khác. Điều này làm hạn chế các dao động của các nhóm chức đặc trưng của phân tử

BBR như nhóm aryl ether oxyd (ArC-O-CH_3), dị vòng N 6 cạnh, nhóm ether vòng và nhóm ether vòng thơm. Do đó, nhiều phổ dao động đặc trưng của các nhóm chức trong cấu trúc phân tử BBR bị mất đi so với phổ hấp thụ hồng ngoại của nguyên liệu BBR. Tuy nhiên, vẫn tồn tại một phổ đặc trưng của BBR ở số sóng 1505 cm^{-1} , nhưng cường độ tín hiệu bị giảm đi nhiều bởi sự tương tác với thành phần khác làm giới hạn dao động của các nhóm chức này. Kết quả nghiên cứu của đề tài cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Jia và cộng sự khi đánh giá phổ hồng ngoại của proliposome bào chế bằng phương pháp đối dung môi siêu tới hạn [69].

c. Đánh giá khả năng hydrat hóa

Khả năng hydrat hóa trong các môi trường mô phỏng dịch đường tiêu hóa như môi trường acid dịch vị (dung dịch HCl 0,1N, pH = 1,2), môi trường dịch tá tràng (đệm phosphat pH = 4,5) và môi trường phần đầu ruột non (đệm phosphat pH = 6,8) được đánh giá bằng sử dụng kính hiển vi điện tử quét laser. Đây là kính hiển vi có thể sử dụng để soi tươi mẫu trong môi trường mô phỏng nhằm ghi lại hình ảnh của quá trình hydrat hóa lớp màng film. Kết quả ở hình 3.22 cho thấy trong môi trường acid pH 1,2, lớp màng film được thấm nhanh môi trường ngay lập tức, tạo nên 1 lớp bao bọc tiểu phân. Lớp này sau đó trở nên chắc chắn và trợ với môi trường, không tiếp tục quá trình hydrat hóa hoặc bị hydrat hóa rất chậm. Vì vậy, lớp màng film khó hydrat hóa hoàn toàn để tạo thành liposome.

Trong môi trường đệm phosphat pH 4,5, lớp màng film được hydrat hóa nhanh, tạo trên bề mặt proliposome nhiều bóng xộp nhỏ đều đặn (hình 3.23 B, C). Sau đó, các bóng xộp này tiếp tục được hydrat hóa để tạo ra những bóng nhỏ hơn và bong ra khỏi bề mặt tiểu phân proliposome rồi phân tán ra môi trường (hình 3.23 B, D) và có thể quá trình hydrat hóa các bóng nhỏ lại được tiếp tục để tạo ra liposome có kích thước nhỏ không quan sát được bằng kính hiển vi điện tử quét laser do giới hạn về độ phân giải.

Trong môi trường đệm phosphat pH 6,8, lớp màng film được hydrat hóa nhanh để tạo những vi nhung mao xung quanh màng film (hình 3.24 B). Những vi nhung mao này tiếp tục được hydrat hóa để tạo thành những túi nhỏ rồi bong ra khỏi bề mặt tiểu phân (hình 3.24 C, D, E, F).

Như vậy, quá trình hydrat hóa của proliposome BBR trong dung dịch acid HCl 0,1N pH 1,2 khác với quá trình hydrat hóa trong 2 môi trường dung dịch đệm phosphat pH 4,5 và pH 6,8. Trong dung dịch acid pH 1,2, tiểu phân proliposome BBR được hydrat hóa một phần ngay khi tiếp xúc với môi trường. Tuy nhiên, quá trình hydrat hóa sau đó bị ngưng lại do sự tạo thành các lớp hàng rào chắc chắn xung quanh tiểu phân, ngăn cản quá trình hydrat hóa tiếp theo. Ngược lại, trong môi trường dung dịch đệm phosphat pH 4,5, quá trình hydrat hóa màng film diễn ra nhanh ngay khi tiểu phân proliposome BBR tiếp xúc môi trường để hình thành những túi xung quanh bề mặt tiểu phân, tạo bề mặt xốp giúp môi trường dễ dàng len lỏi vào trong để hòa tan nhân manitol và quá trình hydrat hóa diễn ra nhanh chóng. Trong môi trường pH 6,8, lớp màng film thấm nước và nhanh chóng tạo thành sợi nhung mao xung quanh tiểu phân, sợi này lại được thấm môi trường và hydrat hóa tiếp tục để tạo thành những túi nhỏ, hình thành lớp túi xốp bao bọc tiểu phân. Điều này tạo ra các kênh thấm nước vào trong nhân manitol và hòa tan nhân dần dần. Các bóng xốp mất vị trí bám và phân tán ra môi trường để tiếp tục hydrat hóa tạo liposome.

d. Đánh giá khả năng giải phóng dược chất

Khả năng giải phóng dược chất BBR từ proliposome được đánh giá bằng phương pháp thử độ hòa tan trên thiết bị thử hòa tan Erweka kiểu cánh khuấy theo hướng dẫn của Dược điển Việt Nam V, phụ lục 11.4 [2], có thay đổi cho phù hợp với nghiên cứu. Các môi trường thử mô phỏng bậc thang pH trong đường tiêu hóa như pH1,2 của dịch vị (dung dịch acid HCl 0,1N), pH 4,5 ở tá tràng pH 6,8 ở đầu ruột non. Khả năng giải phóng dược chất ở môi trường acid rất thấp, có khoảng 25% dược chất được giải phóng trong 4 giờ đầu và chỉ có khoảng 50 % BBR được giải phóng trong vòng 24 giờ. Phần trăm giải phóng dược chất thấp ở môi trường pH 1,2 trong nghiên cứu này cũng phù hợp với các nghiên cứu khác về đánh giá giải phóng dược chất từ proliposome như nghiên cứu của Janga và cộng sự [68], Jia và cộng sự [69]. Tuy nhiên, trong môi trường đệm phosphat pH 4,5, tỉ lệ giải phóng dược chất trong 4 giờ đầu đạt đến 70%, trong lúc đó tỉ lệ này ở trong môi trường đệm phosphat pH 6,8 là 60%. Trong vòng 12 giờ, BBR giải phóng đến 90% trong môi trường pH 4,5. Tỉ lệ này trong môi trường đệm phosphat pH 6,8 là 80% và kéo dài giải phóng đến 24 giờ

thì đạt khoảng 85%. Sự khác nhau về tỉ lệ giải phóng dược chất BBR từ proliposome BBR trong môi trường đệm phosphat pH 4,5 và pH 6,8 cũng phù hợp với tỉ lệ giải phóng dược chất từ liposome BBR. Điều này cũng được giải thích là do trong môi trường acid, liposome bị phá hủy cấu trúc nhanh hơn so với môi trường có pH cao. Tuy nhiên, có sự khác nhau về giải phóng dược chất trong môi trường acid rất thấp (pH1,2) từ proliposome BBR và liposome BBR. Proliposome BBR giải phóng dược chất rất chậm trong môi trường acid bởi vì màng film khó hydrat hóa và trở thành một màng bảo vệ chắc chắn như kết quả thử nghiệm hydrat hóa trên (hình 3.25). Ngược lại, BBR lại giải phóng dược chất rất nhanh từ liposome do cấu trúc liposome bị phá hủy nhanh ở pH acid thấp. Như vậy, proliposome có thể được coi là một hệ mang dược chất có thể hoàn nguyên thành liposome sau khi qua khỏi dạ dày. Vì vậy, proliposome có ưu điểm hơn liposome là không những bảo vệ được dược chất khỏi sự phân hủy bởi acid dịch vị mà còn là tiền liposome, giúp khắc phục được nhược điểm bị phá hủy cấu trúc bởi acid dịch vị của liposome.

e. Đánh giá liposome tạo thành từ proliposome BBR

Khả năng tạo thành liposome của proliposome được đánh giá bằng phương pháp thử hydrat hóa proliposome trong 3 môi trường mô phỏng bậc thang pH đường tiêu hóa. Trong hai môi trường dung dịch đệm phosphat pH 4,5 và dung dịch đệm phosphat pH 6,8, proliposome BBR dễ dàng hydrat hóa màng film để tạo thành liposome (hình 3.23, 3.24). Tuy nhiên, khả năng hydrat hóa thành liposome của proliposome BBR trong môi trường acid dịch vị gặp nhiều khó khăn do lớp film ban đầu trương phồng lên rồi ngay lập tức co lại và trở thành màng bảo vệ proliposome (hình 3.22).

Trong môi trường nước, proliposome BBR sau khi được lắc với nước cất ở 37° được tiếp tục ủ ở 37 °C trong vòng 5-20 phút để đảm bảo quá trình hydrat hóa được xảy ra hoàn toàn. Kỹ thuật này được áp dụng dựa trên phương pháp của Jia và cộng sự sử dụng để hydrat hóa proliposome BBR bào chế bằng phương pháp đối dung môi siêu tới hạn [69].

Liposome tạo thành từ proliposome được soi tươi dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), sử dụng kỹ thuật nhuộm bằng uranyl acetat để có thể quan sát rõ nét hình thái của liposome. Hình thái của liposome quan sát được có hình cầu đều

đạn, có kích thước đo được trong vi trường xấp xỉ 50 nm. Kích thước này cũng nằm trong khoảng phân bố kích thước của liposome BBR đo được bằng kỹ thuật nhiễu xạ ánh sáng động (hình 3.19).

Hiệu suất nạp của liposome tạo thành từ proliposome BBR là $87,8 \pm 1,0\%$, xấp xỉ với hiệu suất nạp của liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film ($87,5 \pm 0,6\%$). Như vậy, mặc dù liposome BBR được bào chế bằng hai phương pháp khác nhau, nhưng cùng một công thức bào chế và cùng cơ chế tráng film nên hiệu suất nạp là tương đương nhau. Tuy nhiên, phương pháp bào chế proliposome khắc phục được nhược điểm của liposome khi di chuyển qua vùng pH acid trong đường tiêu hóa, nhược điểm này đã được báo cáo bởi He và cộng sự [59]. Ngoài ra, phân bố KTTTP của liposome tạo thành từ proliposome đã được báo cáo đồng nhất hơn so với liposome bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film thông thường [61], [133].

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

4.4.1. Phương pháp đánh giá

4.4.1.1. Đối tượng thử, mô hình dược động học và liều dùng

Về đối tượng thử, có nhiều nghiên cứu về dược động học đường uống của BBR và hầu hết các thí nghiệm đều tiến hành trên chuột cống [51], [54], [88], [94], [164]. Tuy nhiên, rất ít nghiên cứu dược động học đường uống của liposome BBR hoặc proliposome BBR. Gần đây, có hai nghiên cứu về lĩnh vực này gồm nghiên cứu về dược động học đường uống của liposome BBR trên thỏ của Nguyen [110] và proliposome BBR trên chuột cống của Jia [69]. Trong nghiên cứu của luận án, chuột cống được lựa chọn làm đối tượng thử do có nhiều ưu điểm như có thể lấy máu được nhiều thời điểm và enzym chuyển hóa của chuột cống giống với người.

Về mô hình dược động học, nghiên cứu chọn mô hình không ngăn để tính toán các thông số dược động học. Mô hình này cũng được áp dụng trong các nghiên cứu trước của Zuo 2006 [164], Fan 2013 [51], Gong 2014 [54].

Về liều dùng, sinh khả dụng của BBR được nghiên cứu với nhiều liều dùng khác nhau trên chuột cống: 25 mg/kg [54], 40 mg/kg [164], 90 mg/kg [88], [95], và 100 mg/kg [51]. Sinh khả dụng của liposome BBR hoặc proliposome BBR được nghiên cứu với liều tương đương BBR 5 mg/kg trên thỏ [110] và 150 mg/kg trên chuột

cống [69], song song nghiên cứu SKD của hỗn dịch BBR với liều như lô thử. Trong nghiên cứu của luận án, liposome BBR được sử dụng với liều tương đương với BBR 100 mg/kg trên chuột cống, có so sánh đối chứng với hỗn dịch quy ước BBR với cùng mức liều.

4.4.1.2. Thời điểm và vị trí lấy mẫu máu

Trong các nghiên cứu trước, thời điểm lấy mẫu máu để xác định thông số được động học trên chuột cống được thực hiện ở 7 thời điểm [164], 12 thời điểm [51], [69], 14 thời điểm [54], [88]. Thời gian lấy mẫu máu được thực hiện sau thời gian uống thuốc 24 giờ [69], 36 giờ [51], [54], [164], thậm chí kéo dài đến 60 giờ [88]. Trong nghiên cứu của luận án, số thời điểm lấy mẫu máu là 14 và thời gian lấy máu kéo dài sau thời gian uống thuốc 36 giờ.

Có nhiều vị trí lấy mẫu máu chuột cống như tĩnh mạch chủ bụng dưới [164], tĩnh mạch xoang mắt [51], [69], [95], tĩnh mạch cổ [54]. Lấy máu tĩnh mạch mắt thì phải thực hiện bước gây mê theo yêu cầu về đạo đức nghiên cứu trên động vật của Ủy ban Y tế Châu Âu. Tĩnh mạch đùi được lựa chọn là vị trí lấy mẫu máu trong nghiên cứu bởi thao tác thuận tiện, không cần phẫu thuật nhưng vẫn lấy được mẫu chính xác.

4.4.1.3. Phương pháp xử lý mẫu

Để chiết BBR từ máu chuột, có thể thực hiện các phương pháp chiết lỏng-lỏng hoặc tủa protein [32], [88]. Phương pháp kết tủa protein được lựa chọn cho nghiên cứu của luận án bởi so với phương pháp chiết lỏng-lỏng, phương pháp kết tủa protein với dung môi acetonitril có ưu điểm là đơn giản, dễ thực hiện và hiệu suất chiết cao [32].

4.4.1.4. Phân tích berberin trong huyết tương chuột bằng phương pháp LC-MS/MS

BBR có sinh khả dụng đường uống thấp (dưới 10%) do bị chuyển hóa ngay tại ruột, chịu tác động của bơm tống thuốc, bị đào thải theo chu trình gan-ruột [161]. Mặt khác, mẫu huyết tương có nhiều thành phần phức tạp nên việc định lượng nồng độ BBR trong huyết tương gặp nhiều khó khăn nếu không sử dụng phương pháp phù hợp. Phương pháp HPLC được sử dụng khi định lượng BBR trong máu thỏ [110]. Tuy nhiên trong máu chuột chủ yếu được định lượng bằng phương pháp LC-MS/MS [32], [51], [54], [88], [95]. Phương pháp LC-MS/MS cũng được lựa chọn cho nghiên

cứu sinh khả dụng BBR trong luận án bởi phương pháp này có độ nhạy, tính chọn lọc, độ đúng, độ chính xác cao.

Ngoài ra, việc sử dụng chuẩn nội giúp giảm sai số trong quá trình phân tích, tăng độ tin cậy. Chuẩn nội được sử dụng trong nghiên cứu là glibenclamid bởi thực tế khảo sát cho độ nhạy cao hơn so với chất chuẩn nội khác (palmatin).

Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp phân tích BBR trong huyết tương chuột bằng phương pháp LC-MS/MS đạt yêu cầu về các tiêu chí đánh giá dược chất trong dịch sinh học theo hướng dẫn chung của EMA [7] và FDA [8].

4.4.1.5. Mẫu đối chiếu

Các nghiên cứu về sinh khả dụng của liposome BBR và proliposome BBR đều sử dụng mẫu đối chiếu là BBR nguyên liệu [69], [110]. Vì vậy, trong nghiên cứu của luận án, hỗn dịch quy ước BBR được pha chế từ nguyên liệu BBR trong dung dịch NaCMC 0,5% được lựa chọn làm mẫu đối chiếu.

4.4.1.6. Phương pháp xử lý số liệu

Một số phần mềm cho phép tính toán các thông số dược động học đường uống của BBR trong máu chuột như DAS version 2.1 [88], DAS version 3.0 [70], Excel Solver [32]. Phần mềm Phoenix[®] được sử dụng để xử lý số liệu dược động học trong nghiên cứu của luận án bởi phần mềm này cho phép vừa tính toán các thông số sinh khả dụng với nhiều mô hình khác nhau vừa cho phép so sánh tương đương sinh học giữa hai chế phẩm.

4.4.2. Kết quả đánh giá

Khi so sánh sinh khả dụng đường uống của BBR ở dạng nạp vào proliposome với BBR nguyên liệu, Jia và cộng sự đã chứng minh rằng dạng proliposome BBR cho sinh khả dụng AUC₀₋₂₄ trên chuột cống cao hơn dạng BBR nguyên liệu 22,47 lần ở mức liều 150 mg/kg cân nặng chuột (n=7) trong thời gian [69]. Trong nghiên cứu của luận án, thí nghiệm cũng được tiến hành trên chuột cống với mức liều được thiết kế 100 mg/kg cân nặng chuột. Sinh khả dụng AUC₀₋₃₆ của BBR nạp vào liposome cao gấp 6,28 lần so với BBR tự do với khoảng tin cậy 90%. Nồng độ đỉnh trong huyết tương (C_{max}) cao gấp 2,46 lần so với dạng BBR tự do (khoảng tin cậy 90%). Kết quả

này cho thấy, BBR khi nạp vào liposome được hấp thu tốt hơn so với dạng tự do do tăng tính thấm qua niêm mạc ruột, giảm ảnh hưởng của bơm tống thuốc.

Thời gian lưu trú trung bình trong máu của BBR của nhóm uống liposome BBR khác không có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng uống BBR tự do. Kết quả của đề tài cũng phù hợp với Nguyen và cộng sự khi nghiên cứu liposome BBR dùng đường uống trên thỏ [110]. Ngoài ra, sự không cải thiện về thời gian lưu trú của liposome BBR so với BBR tự do cũng tương tự với kết quả của Ahammed và cộng sự khi nghiên cứu sinh khả dụng của liposome rotinavir dùng đường uống [11]. Trong nghiên cứu của Ahammed, mặc dù thời gian lưu trú của ritonavir trong máu của liposome không khác so với dạng tự do, nhưng thời gian lưu trú của ritonavir ở gan của nhóm uống liposome dài hơn so với nhóm uống dạng tự do. Trong nghiên cứu của luận án, thời gian lưu trú thuốc ở gan chưa được đánh giá và đó cũng là hạn chế của đề tài.

4.5. VỀ TÁC DỤNG HẠ LIPID MÁU NỘI SINH CỦA LIPOSOME BERBERIN

4.5.1. Mô hình dược lý, đối tượng thử và liều thử

Ở người, 70% cholesterol được tổng hợp ở gan và còn lại 30% có nguồn gốc ngoại sinh (do thực phẩm cung cấp). Vì vậy mô hình đánh giá tác dụng hạ lipid máu nội sinh được lựa chọn trong nghiên cứu của luận án. Đây cũng là mô hình cho kết quả nhanh, phù hợp với nghiên cứu sàng lọc ban đầu [6]. Bước đầu tiên để đánh giá mô hình là gây tăng lipid máu nội sinh.

Trong các chất dùng để gây tăng lipid máu nội sinh thì Poloxamer 407 với đường tiêm màng bụng được cho là nhanh, kéo dài thời gian tác dụng và nồng độ trong huyết tương ổn định hơn [104]. Mô hình nghiên cứu của Leon và cộng sự cho thấy P-407 sử dụng với liều 0,5 g/kg trên chuột nhắt làm tăng cả TG và TC huyết tương và TG ở gan [87]. Liều 300 mg/kg chuột cống làm tăng cholesterol máu trong thời gian tối thiểu 96 giờ [71]. Trong mô hình nghiên cứu của Tạ Thu Thủy, P-407 được tiêm phúc mạc với liều đơn 200 mg/kg trên chuột nhắt làm tăng rõ rệt nồng độ TC (203%), non-HDL-C (247%) và TG (913%) trong huyết tương so với nhóm chứng với $p < 0,001$, tăng HDL-C (13,4%) so với nhóm chứng ($p < 0,05$) [5]. Như

vậy, với liều từ 200 mg/kg đến liều 0,5 g/kg chuột nhất đều cho kết quả làm tăng tốt nồng độ lipid máu nội sinh. Vì vậy, mô hình nghiên cứu trên chuột nhất với liều thấp 200mg/kg tiêm phúc mạc được chọn cho nghiên cứu trong luận án, vừa tiết kiệm vừa an toàn và hiệu quả. Thời điểm lấy mẫu để kiểm tra nồng độ lipid máu là 24 giờ sau khi tiêm P-407 bởi theo nghiên cứu của Leon và cộng sự, tại thời điểm này, nồng độ lipid máu nội sinh đạt cực đại, sau đó giảm dần về giá trị bình thường [87]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở các lô chuột được tiêm màng bụng P-407, các chỉ số TC, LDL-C và TG đều tăng lên rõ rệt với tỉ lệ tăng lần lượt là 103,3% ($p < 0,001$), 2117,6% ($p < 0,001$), 583,9% ($p < 0,001$) so với lô chứng sinh lý.

Về đối tượng thử, chuột nhất được lựa chọn cho nghiên cứu của luận án vì chuột nhất rẻ tiền nhưng vẫn đảm bảo được hiệu quả của thí nghiệm [5].

Về liều thử, có 2 liều được nghiên cứu là 50 mg/kg và 100 mg/kg cân nặng chuột. Liều này được xác định căn cứ vào giá trị liều trong các nghiên cứu về sinh khả dụng trước đây: liều proliposome BBR tương ứng với BBR 150 mg/kg trên chuột cống [69], liều 100 mg/kg [51], 90 mg/kg [88], [95], 40 mg/kg [164], 25 mg/kg [54].

4.5.2. Chứng dương

Chứng dương sử dụng trong nghiên cứu là atorvastatin. Mức liều atorvastatin được lựa chọn trong mô hình gây tăng lipid máu nội sinh trên chuột nhất là 20 mg/kg. Liều này được nghiên cứu là cho tác dụng hiệu quả trên mô hình gây tăng lipid máu nội sinh [71].

Kết quả trong nghiên cứu cho thấy, atorvastatin có tác dụng làm giảm rõ rệt TC và LDL-C với tỉ lệ giảm lần lượt là 20,2% và 34,7% so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$). Trên TG, atorvastatin không có tác dụng làm giảm nồng độ này. Kết quả của luận án cũng phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước về tác dụng của atorvastatin trong điều trị rối loạn lipid máu trên chuột thực nghiệm [5].

4.5.3. Mẫu đối chiếu và kết quả đánh giá

Mẫu đối chiếu được chọn là hỗn dịch quy ước của BBR pha trong dung dịch NaCMC 0,5% với liều 100 mg/kg cân nặng chuột nhất. Với liều này, BBR không có tác dụng làm giảm các chỉ số TC, LDL và TG và cũng không làm thay đổi nồng độ

HDL ($p > 0,05$). Kết quả này khác với kết quả nghiên cứu của Kim và cộng sự [79], tác giả đã báo cáo BBR với liều BBR 50 mg/kg và 100 mg/kg đã làm giảm nồng độ TC, LDL-C, TG và làm tăng HDL-C trên chuột cống so với nhóm chứng một cách có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trên mô hình gây tăng lipid máu chuột cống bởi P-407 với liều 500 mg/kg tiêm phúc mạc. Sự khác nhau về khả năng ảnh hưởng đến thông số lipid máu trong kết quả của luận án và kết quả nghiên cứu của Kim [79] là do sự khác nhau trong thiết kế nghiên cứu về liều và đối tượng thử: nghiên cứu của luận án thực hiện với liều P-407 là 200 mg/kg trên chuột nhắt. Trong khi đó nghiên cứu của Kim, P-407 được sử dụng với liều 500 mg/kg trên chuột cống.

Trong lúc mẫu đối chiếu không có tác dụng làm giảm các chỉ số lipid trên chuột nhắt một cách có ý nghĩa thống kê thì mẫu thử liposome BBR với liều tương đương BBR 50 mg/kg chuột làm giảm chỉ số LDL-C 54,1% ($p < 0,01$) và TG 37,6% ($p < 0,05$) so với lô chứng bệnh trên cùng đối tượng thử. Liposome BBR với liều tương đương 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% ($p < 0,05$).

Sự khác biệt về tác dụng làm giảm lipid máu nội sinh của liposome BBR so với hỗn dịch BBR quy ước bởi do sinh khả dụng của liposome BBR cao hơn hỗn dịch quy ước 6,28 lần (hình 3.35, bảng 3.34 và bảng 3.35). Với sinh khả dụng cao, nồng độ BBR trong máu của nhóm chuột uống liposome BBR đủ để ức chế quá trình tăng sinh tổng hợp cholesterol nội sinh và làm đảo ngược quá trình ức chế sự biểu hiện của LDL-receptor gây ra bởi P-407 [87]. Ngược lại, hỗn dịch quy ước có sinh khả dụng thấp nên không gây ra được tác dụng này.

Trong mô hình gây tăng lipid máu nội sinh của luận án, P-407 không gây tăng nồng độ HDL-C máu. Các chứng dương, hỗn dịch quy ước và liposome BBR cả 2 liều đều không ảnh hưởng đến nồng độ HDL-C. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả của các nghiên cứu trước [30], [160].

4.6. ĐÓNG GÓP MỚI CỦA ĐỀ TÀI

Đề tài đã có những đóng góp mới sau:

1. 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 đặc tính của liposome BBR bào chế. Liposome BBR bào chế được có KTTP nhỏ (KTTP trung bình < 200 nm) và phân bố KTTP hẹp (chỉ số đa phân tán PDI $< 0,3$), hiệu suất liposome hóa cao ($>85\%$), giải phóng được chất kéo dài trong môi trường đệm phosphat pH 6,8 trên 12 giờ.

2. Xây dựng được công thức và quy trình bào chế proliposome BBR bằng phương pháp bao hạt 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.

3. 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 (Các giá trị C_{max} và $AUC_{0-36 h}$ của nhóm uống liposome BBR lần lượt cao gấp 2,46 lần và 6,28 lần so với các giá trị này ở nhóm uống hỗn dịch quy ước BBR).

4. 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 LDL-C lần lượt ở mức 54,11% và 57,0% so với lô chứng bệnh ($p<0,001$), giảm TG lần lượt ở mức 37,7% và 38,2% ($p<0,05$).

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, α -TP, NaDC và lipid với tỉ lệ mol BBR : α -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 tăng 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 tăng 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 berberin 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 (Cmax tăng 2,46 lần, AUC_{0-36 h} tăng 6,28 lần, AUC_{0-∞} 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.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

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. Nanoformulation and Evaluation of Oral Berberine-Loaded Liposomes. *Molecules* (IF=3,267) **2021**, 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. 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) **2022**, 616, 121525. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121525>

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Bộ môn Hóa sinh Trường Đại học Y Hà Nội (2001), *Hóa sinh*, Nhà xuất bản Y học, pp. 318-376.
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, pp. PL-177 - PL-203.
3. Đỗ Tất Lợi (2015), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Việt Nam, pp. 195.
4. Phạm Thị Minh Huệ; Nguyễn Thanh Hải (2017), *Liposome, phytosome phòng sinh học trong bào chế*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội, pp. 1-84.
5. Tạ Thu Thủy (2016), Đánh giá tác dụng điều trị hội chứng rối loạn lipid máu của cao lỏng Đại An, Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
6. Viện Dược liệu (2006), *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo*, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, pp. 131-138.

Tài liệu tiếng Anh

7. (CHMP) European Medicines Agency (EMA); Committee for Medicinal Products for Human Use, *Guideline on bioanalytical method validation*, EMA, Editor. 2011: London, United Kingdom.
8. (CVM) Food and Drug Administration of the United State (US. FDA); U.S Department of Health and Human Services (DHHS); Center for Veterinary Medicine, *Bioanalytical Method validation. In Guidance for Industry*, US-FDA, Editor. 2018: Rockville, MD, USA.
9. Abidi P., Zhou Y., et al. (2005), "Extracellular signal-regulated kinase-dependent stabilization of hepatic low-density lipoprotein receptor mRNA by herbal medicine berberine", *Arteriosclerosis, thrombosis, vascular biology*, 25(10), pp. 2170-2176.
10. Abolfazl A., Rogaie, R-S., et al. (2013), "Liposome: classification, preparation, and applications", *Nanoscale Research Letters*, 8(1), pp. 102.
11. Ahammed V., Narayan, R., et al. (2017), "Development and *in vivo* evaluation of functionalized ritonavir proliposomes for lymphatic targeting", *Life sciences*, 183, pp. 11-20.

12. Ahmed K. S., Hussein S. A., et al. (2019), "Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications", *Journal of Drug Target*, 27(7), pp. 742-761.
13. Ahmed T., Gilani A. U., et al. (2015), "Berberine and neurodegeneration: A review of literature", *Pharmacological Reports*, 67(5), pp. 970-9.
14. Al-masri I. M., Mohammad M. K., et al. (2009), "Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) is one of the mechanisms explaining the hypoglycemic effect of berberine", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(5), pp. 1061-6.
15. Allijn I. E., Czarny B. M. S., et al. (2017), "Liposome encapsulated berberine treatment attenuates cardiac dysfunction after myocardial infarction", *Journal of Control Release*, 247, pp. 127-133.
16. Alwattar J. K., Chouaib R., et al. (2020), "A novel multifaceted approach for wound healing: optimization and *in vivo* evaluation of spray dried tadalafil loaded pro-nanoliposomal powder", *International Journal of Pharmaceutics*, 587, pp. 119647.
17. Andrieux K., Forte L., et al. (2009), "Solubilisation of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers by sodium taurocholate: a model to study the stability of liposomes in the gastrointestinal tract and their mechanism of interaction with a model bile salt", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), pp. 346-355.
18. Anil K-S., Bhawana S., et al. (2017), "A study on liposomes: Classification techniques and importance", *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(6), pp. 55-60.
19. Aranda F.J., Sánchez-Migallón, M.P., et al. (1996), "Influence of α -tocopherol incorporation on Ca^{2+} -induced fusion of phosphatidylserine vesicles", *Arch. Biochem. Biophys.*, 333 (2), pp. 394-400.
20. Association of South East Asian Nations (2018), *ASEAN guideline on stability study of drug product*, ASEAN - 25th meeting of the Pharmaceutical Product Working Group (PPWG), Da Nang, Viet Nam, pp. 1-21.
21. Bangham A. D., Horne R. W. (1964), "Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope", *Journal of Molecular Biology*, 8, pp. 660-8.

22. Bangham A. D., Standish M. M., et al. (1965), "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids", *J Mol Biol*, 13(1), pp. 238-52.
23. Barea M. J, Jenkins M. J, et al. (2010), "Evaluation of liposomes coated with a pH responsive polymer", *International Journal of Pharmaceutics*, 402(1-2), pp. 89-94.
24. Battu S. K., Repka M. A., et al. (2010), "Physicochemical characterization of berberine chloride: a perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery", *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 11(3), pp. 1466-75.
25. Batzri S., Korn, E.D. (1973), "Single bilayer liposomes prepared without sonication", *BBA-Biomembranes* 298 1015-1019(4), pp. 1015-1019.
26. Benediktsdóttir B. E., Gudjónsson T., et al. (2014), "N-alkylation of highly quaternized chitosan derivatives affects the paracellular permeation enhancement in bronchial epithelia in vitro", *European Journal of Pharmaceutics*, 86(1), pp. 55-63.
27. Berclaz N., Blöchliger, E., et al. (2001), "Matrix effect of vesicle formation as investigated by cryotransmission electron microscopy", *The Journal of Physical Chemistry B*, 105 (5), pp. 1065-1071.
28. Birru W. A, Warren D. B, et al. (2014), "Digestion of phospholipids after secretion of bile into the duodenum changes the phase behavior of bile components", *Molecular Pharmaceutics*, 11(8), pp. 2825-2834.
29. Bobbala S. K. R., & Veerareddy, P. R. (2012), "Formulation, evaluation, and pharmacokinetics of isradipine proliposomes for oral delivery", *Journal of Liposome Research* 22(4), pp. 285–294
30. Brusq J-M., Ancellin N., et al. (2006), "Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine", *Journal of Lipid Research*, 47(6), pp. 1281-1288.
31. Calle D., Negri V., et al. (2015), "Magnetoliposomes loaded with poly-unsaturated fatty acids as novel theranostic anti-inflammatory formulations", *Theranostics*, 5(5), pp. 489.
32. Calvo A., Moreno E., et al. (2020), "Berberine-loaded liposomes for the treatment of leishmania infantum-infected balb/c mice", *Pharmaceutics*, 12(9), pp. 858.

33. Catherine Charcosset A. J., Jean-Pierre Valour, et al. (2015), "Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices", *Chemical Engineering Research and Design*, 94, pp. 508-515.
34. Chang W., Li K., et al. (2016), "Berberine Pretreatment Confers Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Model of Type 2 Diabetes", *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 21(5), pp. 486-94.
35. Chang X. X., Yan H. M., et al. (2012), "The effects of berberine on hyperhomocysteinemia and hyperlipidemia in rats fed with a long-term high-fat diet", *Lipids Health Dis*, 11, pp. 86.
36. Chen C., Han D., et al. (2010), "An overview of liposome lyophilization and its future potential", *Journal of Controlled Release*, 142(3), pp. 299-311.
37. Chen Y., Wang Y., et al. (2011), "Berberine Improves Glucose Homeostasis in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats in Association with Multiple Factors of Insulin Resistance", *ISRN Endocrinology*, 2011, pp. 519371.
38. Chi L., Peng L., et al. (2014), "The anti-atherogenic effects of berberine on foam cell formation are mediated through the upregulation of sirtuin 1", *International Journal of Molecular Medicine*, 34(4), pp. 1087-93.
39. Chirayil C.J., Abraham, J., et al. (2017), "Instrumental techniques for the characterization of nanoparticles", *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*, Thomas S., Thomas, R., Zachariar, A.K., Mishra, R.K., Elsevier Amsterdam, Netherlands, pp. 1-36.
40. Chu C., Tong S. S., et al. (2011), "Proliposomes for oral delivery of dehydrosilymarin: preparation and evaluation *in vitro* and *in vivo*", *Acta Pharmacol Sin*, 32(7), pp. 973-80.
41. Cicero A. F., Rovati L. C., et al. (2007), "Eulipidemic effects of berberine administered alone or in combination with other natural cholesterol-lowering agents. A single-blind clinical investigation", *Arzneimittelforschung*, 57(1), pp. 26-30.
42. Cicero A., Ertek S., (2009), "Berberine: Metabolic and cardiovascular effects in preclinical and clinical trials", *Nutrition and Dietary Supplements*, 1, pp. 1-10.

43. Crawford R., Dogdas B., et al. (2011), "Analysis of lipid nanoparticles by Cryo-EM for characterizing siRNA delivery vehicles", *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1-2), pp. 237-44.
44. Cullis P. R., Mayer, L. D., et al. (1989), "Generating and loading of liposomal systems for drug-delivery applications", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 3(3), pp. 267-282.
45. Dai P., Wang J., et al. (2015), "Renoprotective effects of berberine as adjuvant therapy for hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus: Evaluation via biochemical markers and color Doppler ultrasonography", *Exp Ther Med*, 10(3), pp. 869-876.
46. Darley E., Singh J. K. D., et al. (2019), "The Fusion of Lipid and DNA Nanotechnology", *Genes (Basel)*, 10(12), pp. 1001.
47. Domingo M.P., Pardo, J., et al. (2010), "Berberine: A fluorescent alkaloid with a variety of applications from medicine to chemistry", *Mini-Rev. Org. Chem.*, 7, pp. 335-340.
48. Domitrović R., Jakovac H., et al. (2011), "Hepatoprotective activity of berberine is mediated by inhibition of TNF- α , COX-2, and iNOS expression in CCl(4)-intoxicated mice", *Toxicology*, 280(1-2), pp. 33-43.
49. Edwards K. A., Baeumner A. J. (2006), "Analysis of liposomes", *Talanta*, 68(5), pp. 1432-41.
50. Eze M.O. (1991), "Phase Transitions in Phospholipid Bilayers: Lateral Phase Separations Play Vital Roles in Biomembranes", *Biochemical Education*, 19(4), pp. 204-208.
51. Fan D., Wu X., et al. (2013), "Enhancement by sodium caprate and sodium deoxycholate of the gastrointestinal absorption of berberine chloride in rats", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(9), pp. 1447-56.
52. Fei X., Chen, X., et al. (2009), "Preparation, characterization, and biodistribution of breviscapine proliposomes in heart", *Journal of Drug Targeting*, 17(5), pp. 408–414.
53. Garg C., Satija S., et al. (2016), "Force degradation studies of bioactive berberine and *Tinospora cordifolia* extract", *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(5), pp. 15-18.
54. Gong Z., Chen Y., et al. (2014), "Pharmacokinetic comparison of berberine in rat plasma after oral administration of berberine hydrochloride in normal and

- post inflammation irritable bowel syndrome rats", *International journal of Molecular Sciences*, 15(1), pp. 456-467.
55. Grave A. , *GLATT fluid bed technology for the coating of powders, pellets and micropellets*, in *Symposium on Pharmaceutical Engineering Research SPhERe*. 2019, Glatt Pharmaceutical Services GmbH & Co, KG: Braunschweig/Germany.
 56. Guan P., Lu Y., et al. (2011), "Enhanced oral bioavailability of cyclosporine A by liposomes containing a bile salt", *International Journal of Nanomedicine*, 6, pp. 965.
 57. Gupta Prem N, Vyas Suresh P (2011), "Investigation of lectinized liposomes as M-cell targeted carrier-adjuvant for mucosal immunization", *Colloids surfaces B: Biointerfaces*, 82(1), pp. 118-125.
 58. Hamman J. H., Demana P. H., et al. (2007), "Targeting receptors, transporters and site of absorption to improve oral drug delivery", *Drug Target Insights*, 2, pp. 71-81.
 59. He H., Lu Y., et al. (2019), "Adapting liposomes for oral drug delivery", *Acta Pharm Sin B*, 9(1), pp. 36-48.
 60. He H., Lu Y., et al. (2018), "Biomimetic thiamine-and niacin-decorated liposomes for enhanced oral delivery of insulin", *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(1), pp. 97-105.
 61. Hiremath P. S., Soppimath, K. S., & Betageri, G. V. (2009), "Proliposomes of exemestane for improved oral delivery: Formulation and *in vitro* evaluation using PAMPA, Caco-2 and rat intestine", *International Journal of Pharmaceutics*, 380(1-2), pp. 96–104
 62. Hosny K. M., Ahmed O. A. A, et al. (2013), "Enteric-coated alendronate sodium nanoliposomes: a novel formula to overcome barriers for the treatment of osteoporosis", *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(6), pp. 741-746.
 63. Hu S., Niu M., et al. (2013), "Integrity and stability of oral liposomes containing bile salts studied in simulated and *ex vivo* gastrointestinal media", *International Journal of Pharmaceutics*, 441(1-2), pp. 693-700.
 64. Hu Y-J., Ju R-J., et al. (2021), "Liposomes in Drug Delivery: Status and Advances", *Liposome-Based Drug Delivery Systems*, Qi Wan-Liang Lu; Xian-Rong, Springer, Berlin, Germany, pp. 3-24.

65. Hu Y., Ehli E. A, et al. (2012), "Lipid-lowering effect of berberine in human subjects and rats", *Phytomedicine*, 19(10), pp. 861-867.
66. Huang A., Su Z., et al. (2014), "Oral absorption enhancement of salmon calcitonin by using both N-trimethyl chitosan chloride and oligoarginines-modified liposomes as the carriers", *Drug Delivery* 21(5), pp. 388-396.
67. Jalali A., Moghimipour E., et al. (2014), "Enhancing effect of bile salts on gastrointestinal absorption of insulin", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(11), pp. 1797-1802.
68. Janga K.Y, Jukanti R., et al. (2012), "Bioavailability enhancement of zaleplon via proliposomes: Role of surface charge", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(2), pp. 347-357.
69. Jia J., Zhang K., et al. (2019), "Berberine-loaded solid proliposomes prepared using solution enhanced dispersion by supercritical CO₂: Sustained release and bioavailability enhancement", *Journal of Drug Delivery Science Technology* 51, pp. 356-363.
70. Jia Y., Xu B., et al. (2017), "Effects of type 2 diabetes mellitus on the pharmacokinetics of berberine in rats", *Journal of Pharmaceutical biology*, 55(1), pp. 510-515.
71. Johnston T. P. (2004), "The P-407-induced murine model of dose-controlled hyperlipidemia and atherosclerosis: a review of findings to date", *J Cardiovasc Pharmacol*, 43(4), pp. 595-606.
72. Jones David (1994), "Air suspension coating for multiparticulates", *Drug Development Industrial Pharmacy*, 20(20), pp. 3175-3206.
73. Justo O. R., & Moraes, Â. M. (2011), "Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume", *Chemical Engineering Research and Design*, 89(6), pp. 785–792.
74. Karn P. R., Jin S. E., et al. (2014), "Preparation and evaluation of cyclosporin A-containing proliposomes: a comparison of the supercritical antisolvent process with the conventional film method", *Int J Nanomedicine*, 9, pp. 5079-91.
75. Katare O. P., Vyas S. P., et al. (1991), "Proliposomes of indomethacin for oral administration", *J Microencapsul*, 8(1), pp. 1-7.

76. Katare O. P., Vyas, S. P., & Dixit, V. K. (1990), "Effervescent granule based proliposomes of ibuprofen", *Journal of Microencapsulation*, 7(4), pp. 455-462.
77. Kato Y., Hosokawa T., et al. (1993), "Influence of liposomes on tryptic digestion of insulin", *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 16(5), pp. 457-461.
78. Khatri N., Baradia D., et al. (2014), "cRGD grafted liposomes containing inorganic nano-precipitate complexed siRNA for intracellular delivery in cancer cells", *Journal of Controlled Release*, 182, pp. 45-57.
79. Kim M., Kim T-W., et al. (2019), "Berberine ameliorates brain inflammation in poloxamer 407-induced hyperlipidemic rats", *Journal of International Neurology Journal*, 23(Suppl 2), pp. S102.
80. Kim S., Turker M. S., et al. (1983), "Preparation of multivesicular liposomes", *Biochim Biophys Acta*, 728(3), pp. 339-48.
81. Kokkona M., Kallinteri P., et al. (2000), "Stability of SUV liposomes in the presence of cholate salts and pancreatic lipases: effect of lipid composition", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(3), pp. 245-252.
82. Kong W., Wei J., et al. (2004), "Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins", *Nat Med*, 10(12), pp. 1344-51.
83. Kovvasu S. P., Kunamaneni, P., Yeung, S., Rueda, J., & Betageri, G. V. (2019), "Formulation of Dronedarone Hydrochloride-Loaded Proliposomes: In Vitro and In Vivo Evaluation Using Caco-2 and Rat Model", *AAPS PharmSciTech*, 20(6), pp.26.
84. Kumar R., Gupta R. B., et al. (2001), "Formulation, characterization, and in vitro release of glyburide from proliposomal beads", *Drug Deliv*, 8(1), pp. 25-7.
85. Lee M-K. (2020), "Liposomes for enhanced bioavailability of water-insoluble drugs: in vivo evidence and recent approaches", *Pharmaceutics*, 12(3), pp. 264.
86. Lee Y. S, Kim W. S, et al. (2006), "Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states", *Diabetes*, 55(8), pp. 2256-2264.
87. Leon C., Wasan K. M, et al. (2006), "Acute P-407 administration to mice causes hypercholesterolemia by inducing cholesterolgenesis and down-

regulating low-density lipoprotein receptor expression", *Pharmaceutical Research*, 23(7), pp. 1597-1607.

88. Li G., Yang F., et al. (2016), "Development and application of a UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of fenofibric acid and berberine in rat plasma: application to the drug-drug pharmacokinetic interaction study of fenofibrate combined with berberine after oral administration in rats", *Biomedical Chromatography*, 30(7), pp. 1075-1082.
89. Li H., Li X. L., et al. (2014), "Berberine ameliorates experimental autoimmune neuritis by suppressing both cellular and humoral immunity", *Scand J Immunol*, 79(1), pp. 12-9.
90. Li K. X., Chen D. W., et al. (2011), "Preparation and investigation of Ulex europaeus agglutinin I-conjugated liposomes as potential oral vaccine carriers", *Archives of Pharmacal Research*, 34(11), pp. 1899-1907.
91. Li Z., Zhang M., et al. (2017), "Development of Liposome containing sodium deoxycholate to enhance oral bioavailability of itraconazole", *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(2), pp. 157-164.
92. Lin Y. C., Kuo J. Y., et al. (2013), "Optimizing manufacture of liposomal berberine with evaluation of its antihepatoma effects in a murine xenograft model", *International Journal of Pharmaceutics*, 441(1-2), pp. 381-8.
93. Liu B., Wang G., et al. (2011), "Berberine inhibits human hepatoma cell invasion without cytotoxicity in healthy hepatocytes", *PLoS One*, 6(6), pp. e21416.
94. Liu L., Liu J., et al. (2015), "Berberine improves endothelial function by inhibiting endoplasmic reticulum stress in the carotid arteries of spontaneously hypertensive rats", *Biochem Biophys Res Commun*, 458(4), pp. 796-801.
95. Liu M., Su X., et al. (2015), "Validated UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin, simvastatin hydroxy acid and berberine in rat plasma: Application to the drug-drug pharmacokinetic interaction study of simvastatin combined with berberine after oral administration in rats", *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1006, pp. 8-15.
96. Liu X., Zhang X., et al. (2016), "Protective mechanisms of berberine against experimental autoimmune myocarditis in a rat model", *Biomed Pharmacother*, 79, pp. 222-30.

97. Liu Y. T., Hao H. P., et al. (2010), "Extensive intestinal first-pass elimination and predominant hepatic distribution of berberine explain its low plasma levels in rats", *Drug Metab Dispos*, 38(10), pp. 1779-84.
98. Lopes M. A., Abraham B. A., et al. (2014), "Intestinal absorption of insulin nanoparticles: contribution of M cells", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology Medicine*, 10(6), pp. 1139-1151.
99. Luo X., Li, J., et al. (2013), "Preparation of berberine hydrochloride long-circulating liposomes by ionophore A23187-mediated ZnSO₄ gradient method", *Asian J. Pharm. Sci.*, 8, pp. 261-266.
100. Ma X., Zhou J., et al. (2013), "Modulation of drug-resistant membrane and apoptosis proteins of breast cancer stem cells by targeting berberine liposomes", *Biomaterials*, 34(18), pp. 4452-65.
101. Mach F., Baigent C., et al. (2020), "2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk", *Eur Heart J*, 41(1), pp. 111-188.
102. Maja L., Željko K., et al. (2020), "Sustainable technologies for liposome preparation", *The Journal of Supercritical Fluids*, 165, pp. 104984.
103. Meng L., Qi X., (2018), "Purification method of drug-loaded liposome", *Liposome-base drug delivery systems*, Springer, pp. 1-11.
104. Millar J. S, Cromley D. A, et al. (2005), "Determining hepatic triglyceride production in mice: comparison of poloxamer 407 with Triton WR-1339", *Journal of Lipid Research*, 46(9), pp. 2023-2028.
105. Minaian M., Ghannadi A., et al. (2011), "Comparative Study of Berberis vulgaris Fruit Extract and Berberine Chloride Effects on Acetic Acid-Induced Colitis in Rats", *Iran J Pharm Res*, 10(1), pp. 97-104.
106. Muneer S, Masood Z, et al. (2017), "Proliposomes as pharmaceutical drug delivery system: a brief review", *J. Nanomed. Nanotechnol*, 8(3), pp. 1-5.
107. Muramatsu K., Maitani Y., et al. (1996), "Dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes with soybean-derived sterols and cholesterol as a carrier for the oral administration of insulin in rats", *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 19(8), pp. 1055-1058.
108. Neag M. A, Mocan A., et al. (2018), "Berberine: Botanical occurrence, traditional uses, extraction methods, and relevance in cardiovascular,

- metabolic, hepatic, and renal disorders", *Frontiers in Pharmacology*, 9, pp. 557.
109. Nekkanti V., Venkatesan N., et al. (2015), "Proliposomes for oral delivery: progress and challenges", *Curr Pharm Biotechnol*, 16(4), pp. 303-12.
 110. Nguyen T. X., Huang L., et al. (2014), "Chitosan-coated nano-liposomes for the oral delivery of berberine hydrochloride", *J Mater Chem B*, 2(41), pp. 7149-7159.
 111. Othman M. S., Safwat G., et al. (2014), "The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats", *Food Chem Toxicol*, 69, pp. 175-81.
 112. Park D. W., Jiang S., et al. (2014), "GSK3 β -dependent inhibition of AMPK potentiates activation of neutrophils and macrophages and enhances severity of acute lung injury", *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307(10), pp. L735-45.
 113. Parmentier J., Hofhaus G., et al. (2014), "Improved oral bioavailability of human growth hormone by a combination of liposomes containing bio-enhancers and tetraether lipids and omeprazole", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(12), pp. 3985-3993.
 114. Patel G. M., Shelat P. K., et al. (2017), "QbD based development of proliposome of lopinavir for improved oral bioavailability", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108, pp. 50-61.
 115. Patil Y. P., Jadhav S., (2014), "Novel methods for liposome preparation", *Chemistry Physics of Lipids*, 177, pp. 8-18.
 116. Payne N. I., Ambrose C. V., et al. (1986), "Proliposomes: a novel solution to an old problem", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(4), pp. 325-329.
 117. Pei K. A.-J. W., Chen W-K., Tsao C-W., (2009), *Liposome for incorporating large amounts of hydrophobic substances*, Patent United States, Editor, Industrial Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan US.
 118. Pretsch E., Bühlmann P., et al. (2000), *Structure determination of organic compounds*, Springer, pp. 245-312.
 119. Quinn P. J. (2012), "The effect of tocopherol on the structure and permeability of phosphatidylcholine liposomes", *J Control Release*, 160(2), pp. 158-63.
 120. Richard L., Magin H-C. C., (1987), "Rapid separation of liposomes using ultrafiltration", *Biotechnology Techniques* 1(3), pp. 185-188.

121. Richards M. H, Gardner C. R, (1978), "Effects of bile salts on the structural integrity of liposomes", *Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects*, 543(4), pp. 508-522.
122. Ruozzi B., Belletti D., et al. (2011), "AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study", *Int J Nanomedicine*, 6, pp. 557-63.
123. Sahibzada M. U. K., Sadiq A., et al. (2018), "Berberine nanoparticles with enhanced in vitro bioavailability: characterization and antimicrobial activity", *Drug Des Devel Ther*, 12, pp. 303-312.
124. Sailor G., Seth, A.K., et al. (2015), "Formulation and in vitro evaluation of berberine containing liposome optimized by 32 full factorial designs", *J. Applied Pharm. Sci.* , 5 (7), pp. 23-28.
125. Sakho E.H.M., Elaheh A. E., et al. (2017), "Dynamic light scattering", *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*. Thomas S., Thomas, R., Zachariar, A.K., Mishra, R.K. , Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 3, pp.37-49.
126. Samad A., Sultana Y., et al. (2007), "Liposomal drug delivery systems: an update review", *Curr Drug Deliv*, 4(4), pp. 297-305.
127. Sandeep Kalepu S. K. T, Sudheer B.,et al. (2013), "Liposomal drug delivery system - A Comprehensive Review", *International Journal of Drug Development and Research*, 5(4), pp. 62-75.
128. Schönsee Carina D., Bucheli Thomas D. (2020), "Experimental Determination of Octanol–Water Partition Coefficients of Selected Natural Toxins", *Journal of Chemical & Engineering Data*, 65(4), pp. 1946-1953.
129. Shirwaikar A., Shirwaikar A., et al. (2006), "In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine", *Biol Pharm Bull*, 29(9), pp. 1906-10.
130. Shruthi MV, Parthiban S, et al. (2014), "Proliposomes as a novel drug delivery system for the improvement of vesicular stability", *Int. J. Res. Pharm. Nano Sci*, 3, pp. 326-336.
131. Shukla A., Mishra V., et al. (2016), "Bilosomes in the context of oral immunization: development, challenges and opportunities", *Drug Discovery Today*, 21(6), pp. 888-899.

132. Shukla D., Chakraborty S., et al. (2011), "Lipid-based oral multiparticulate formulations—advantages, technological advances and industrial applications", *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(2), pp. 207-224.
133. Singh N., Kushwaha P., et al. (2019), "Proliposomes: an approach for the development of stable liposome", *Ars Pharmaceutica*, 60(4), pp. 231-240.
134. Singodia D., Verma, A., et al. (2011), "Investigations on feasibility of in situ development of amphotericin B liposomes for industrial applications", *Journal of Liposome Research*, 22(1), pp. 8–17.
135. Song K. H., Chung S. J., et al. (2005), "Enhanced intestinal absorption of salmon calcitonin (sCT) from proliposomes containing bile salts", *Journal of Control Release*, 106(3), pp. 298-308.
136. Song K. H., Chung S. J., et al. (2002), "Preparation and evaluation of proliposomes containing salmon calcitonin", *Journal of Control Release*, 84(1-2), pp. 27-37.
137. Stetefeld J., McKenna S. A., et al. (2016), "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences", *Biophys Rev*, 8(4), pp. 409-427.
138. Takeuchi H., Matsui Y., et al. (2003), "Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats", *Journal of Controlled Release*, 86(2-3), pp. 235-242.
139. Tian J-N., Ge B-Q., et al. (2016), "Thermodynamics and structural evolution during a reversible vesicle–micelle transition of a vitamin-derived bolaamphiphile induced by sodium cholate", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 64(9), pp. 1977-1988.
140. Tillhon M., Guamán Ortiz L. M., et al. (2012), "Berberine: new perspectives for old remedies", *Biochem Pharmacol*, 84(10), pp. 1260-7.
141. Torchilin V. P. (2005), "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers", *Nat Rev Drug Discov*, 4(2), pp. 145-60.
142. Tsai P. L., Tsai T. H. (2004), "Hepatobiliary excretion of berberine", *Drug Metabolism Disposition*, 32(4), pp. 405-12.
143. Uhl P., Helm F., et al. (2016), "A liposomal formulation for the oral application of the investigational hepatitis B drug Myrcludex B", *Eur J Pharm Biopharm*, 103, pp. 159-166.

144. van Swaay D., deMello A. (2013), "Microfluidic methods for forming liposomes", *Lab on a Chip*, 13(5), pp. 752-67.
145. Velpula A., Jukanti R., et al. (2013), "Proliposome powders for enhanced intestinal absorption and bioavailability of raloxifene hydrochloride: effect of surface charge", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(12), pp. 1895-906.
146. Wallace S. J, Li J., et al. (2012), "Drug release from nanomedicines: selection of appropriate encapsulation and release methodology", *Drug Delivery Translational Research*, 2(4), pp. 284-292.
147. Wang C., Li J., et al. (2009), "Ameliorative effect of berberine on endothelial dysfunction in diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin", *European Journal of Pharmacology*, 620(1-3), pp. 131-7.
148. Wang L., Liu L., et al. (2012), "Berberine induces caspase-independent cell death in colon tumor cells through activation of apoptosis-inducing factor", *PLoS One*, 7(5), pp. e36418.
149. Wang Y., Yi X., et al. (2014), "Berberine decreases cholesterol levels in rats through multiple mechanisms, including inhibition of cholesterol absorption", *Metabolism*, 63(9), pp. 1167-77.
150. Wu Wei, Lu Yi, et al. (2015), "Oral delivery of liposomes", *Therapeutic Delivery*, 6(11), pp. 1239-1241.
151. Xia X., Yan J., et al. (2011), "Berberine improves glucose metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis", *PLoS One*, 6(2), pp. e16556.
152. Xiao M., Men L. N., et al. (2014), "Berberine protects endothelial progenitor cell from damage of TNF- α via the PI3K/AKT/eNOS signaling pathway", *European Journal of Pharmacology*, 743, pp. 11-6.
153. Xiao Y., Song Y., et al. (2006), "Preparation of silymarin proliposome: A new way to increase oral bioavailability of silymarin in beagle dogs", *International Journal of Pharmaceutics*, 319, pp. 162-168.
154. Xu R. (2015), "Light scattering: A review of particle characterization applications", *Particuology*, 18, pp. 11-21
155. Xue M., Yang M., et al. (2013), "Characterization, pharmacokinetics, and hypoglycemic effect of berberine loaded solid lipid nanoparticles", *International Journal of Nanomedicine*, 8, pp. 4677.

156. Yin J., Xing H., et al. (2008), "Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus", *Metabolism*, 57(5), pp. 712-7.
157. Yoshie M. Y. T., Makoto K., et al. (2006), "Site of drug absorption after oral administration: Assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract", *Pharmaceutical Sciences*, 29(3-4), pp. 240-250.
158. Yuan N-N., Cai C-Z., et al. (2019), "Neuroprotective effects of berberine in animal models of Alzheimer's disease: a systematic review of pre-clinical studies", *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19(1), pp. 1-10.
159. Yung-Tsuan Ho., Jai-Sing Yang, et al. (2009), "Berberine suppresses in vitro migration and invasion of human SCC-4 tongue squamous cancer cells through the inhibitions of FAK, IKK, NF- κ B, u-PA and MMP-2 and -9", *Cancer Letters*, 279(2), pp. 155-162.
160. Zhang Q., Xiao X., et al. (2011), "Berberine Moderates Glucose and Lipid Metabolism through Multipathway Mechanism", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp. 924851.
161. Zhang X., Qiu F., et al. (2011), "Intestinal absorption mechanisms of berberine, palmatine, jateorhizine, and coptisine: involvement of P-glycoprotein", *Xenobiotica*, 41(4), pp. 290-6.
162. Zhao X., Zhang J., et al. (2012), "Protective effects of berberine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in mice", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(5), pp. 796-800.
163. Zheng W. S., Fang X. Q., et al. (2012), "Preparation and quality assessment of itraconazole transfersomes", *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1-2), pp. 291-8.
164. Zuo F., Nakamura N., et al. (2006), "Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudo germ-free rats determined by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry", *Drug Metabolism and Disposition*, 34(12), pp. 2064-72.

Tài liệu tham khảo trang web

165. http://www.chemsrc.com/en/cas/2086-83-1_122113.html, ngày truy cập 10/10/2018

NỘI DUNG CÁC PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1. KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG

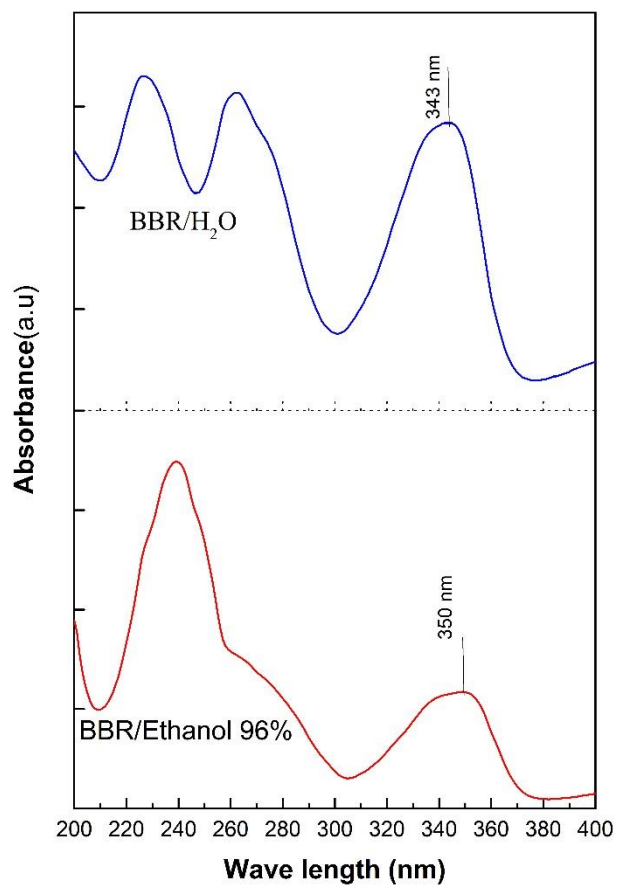
PHỤ LỤC 2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TIỀN CÔNG THỨC

PHỤ LỤC 3. KẾT QUẢ BÀO CHẾ, ĐÁNH GIÁ LIPOSOME BERBERIN VÀ PROLIPOSOME BERBERIN

PHỤ LỤC 4. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG CỦA LIPOSOME BERBERIN

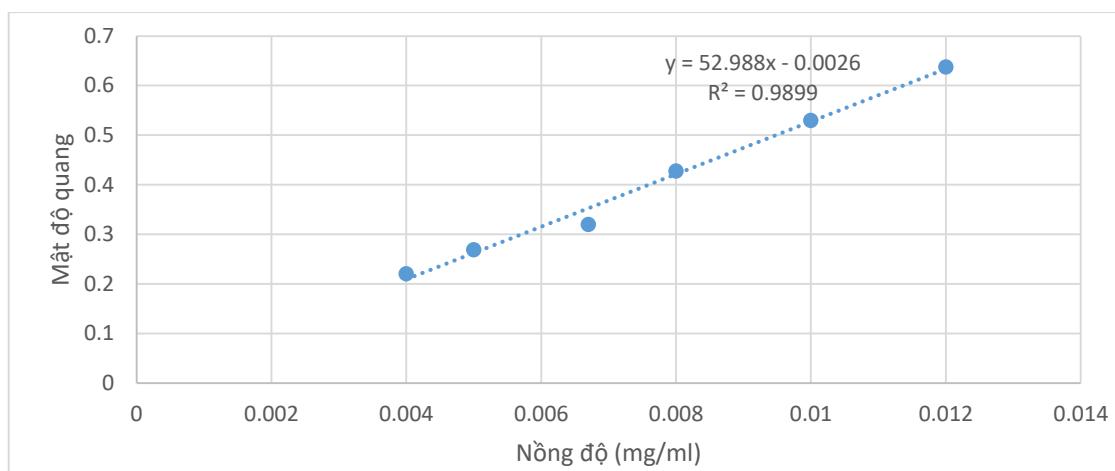
PHỤ LỤC 1. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG

Phụ lục 1.1a. Phổ hấp thụ của BBR trong 2 môi trường nước và ethanol 96%



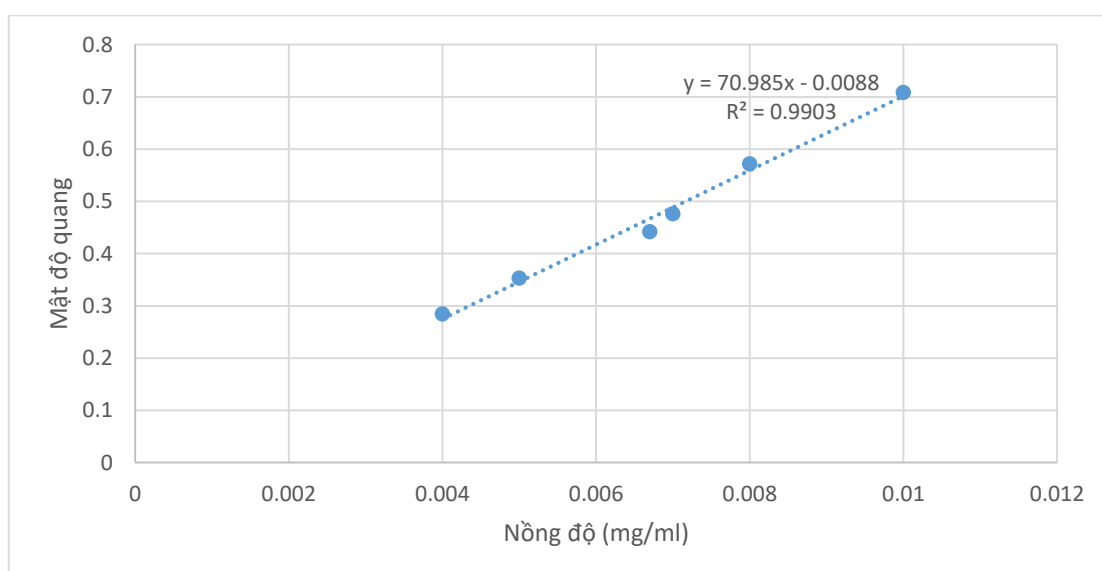
Hình PL1.1a- Phổ hấp thụ của BBR trong 2 môi trường nước và ethanol 96%

Phụ lục 1.1b. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa mật độ quang với nồng độ BBR trong dung môi ethanol 96%



Hình PL1.1b. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa mật độ quang với nồng độ BBR trong ethanol 96 %

Phụ lục 1.1c. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa mật độ quang với nồng độ BBR trong dung môi nước cất



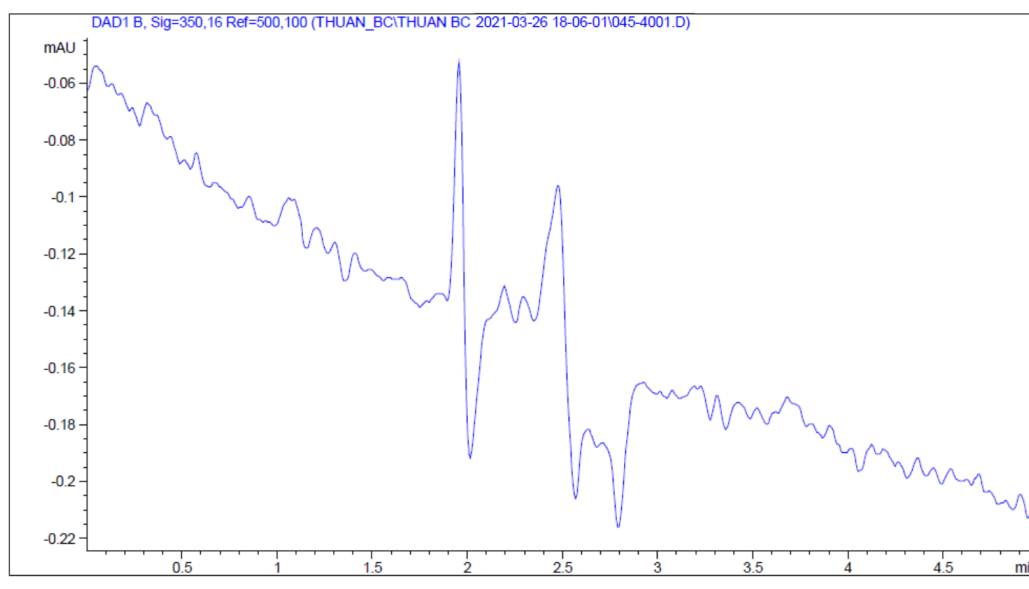
Hình PL1.1c. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa mật độ quang với nồng độ BBR trong nước cất

Phụ lục 1.2a. Tính thích hợp của hệ thống

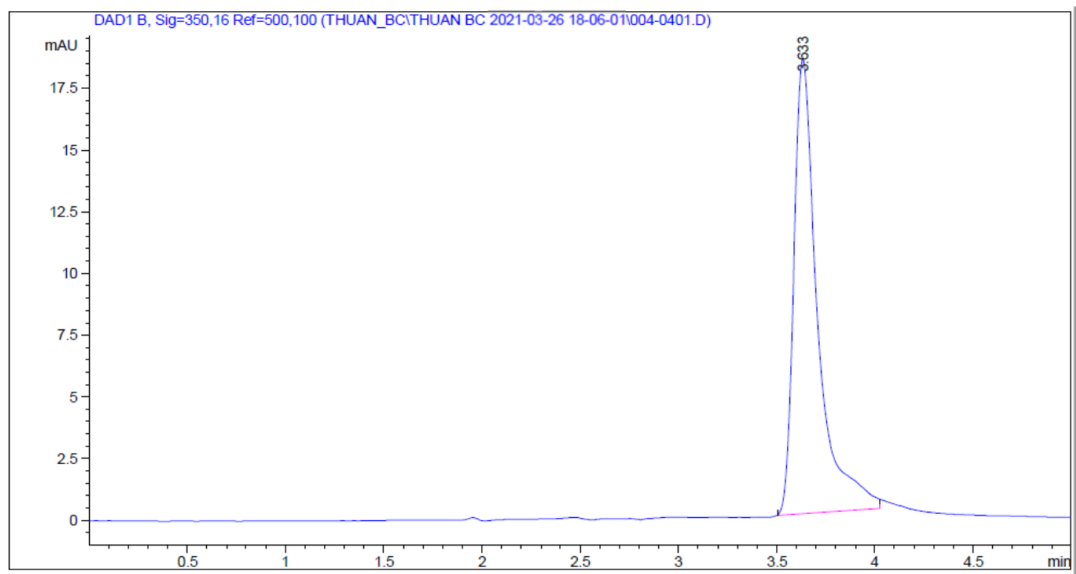
Bảng 1.2a. Kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống HPLC

STT	Thời gian lưu t_R (phút)	Diện tích pic (mAU.giây)	Số đĩa lý thuyết
1	3,60	154,95	13596
2	3,60	153,86	13932
3	3,62	154,03	13686
4	3,62	153,78	13636
5	3,63	154,49	13799
6	3,63	154,32	13712
TB	3,62	154,24	13727
RSD (%)	0,33	0,29	0,89

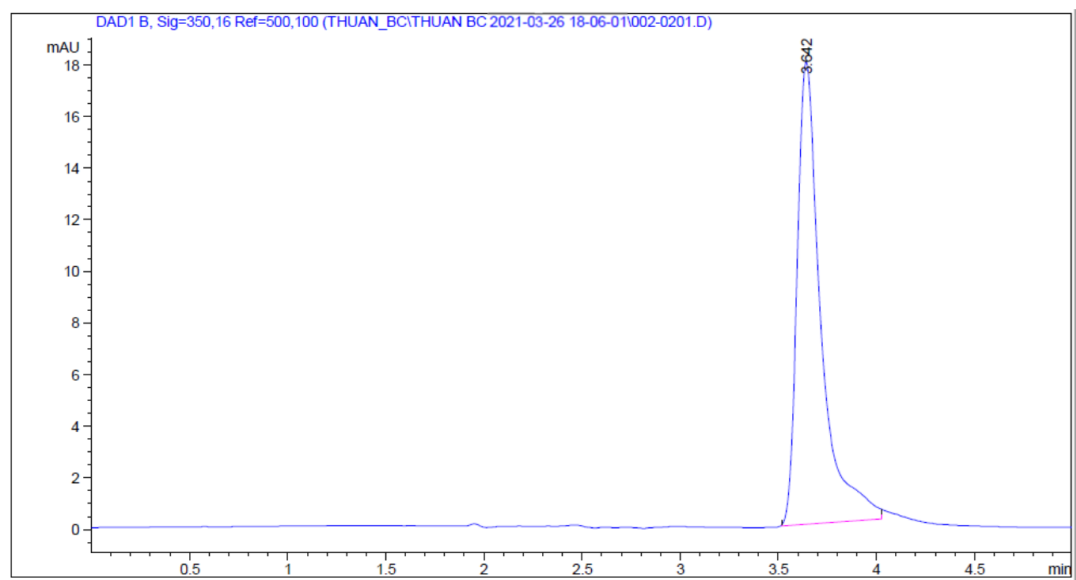
Phụ lục 1.2b. Tính chọn lọc- độ đặc hiệu của phương pháp HPLC (mẫu trắng, mẫu chuẩn 5 $\mu\text{g/ml}$, mẫu thử 5 $\mu\text{g/ml}$)



Hình PL-1.2b.1. Sắc ký đồ mẫu trắng



Hình PL-1.2b.2. Sắc ký đồ mẫu chuẩn

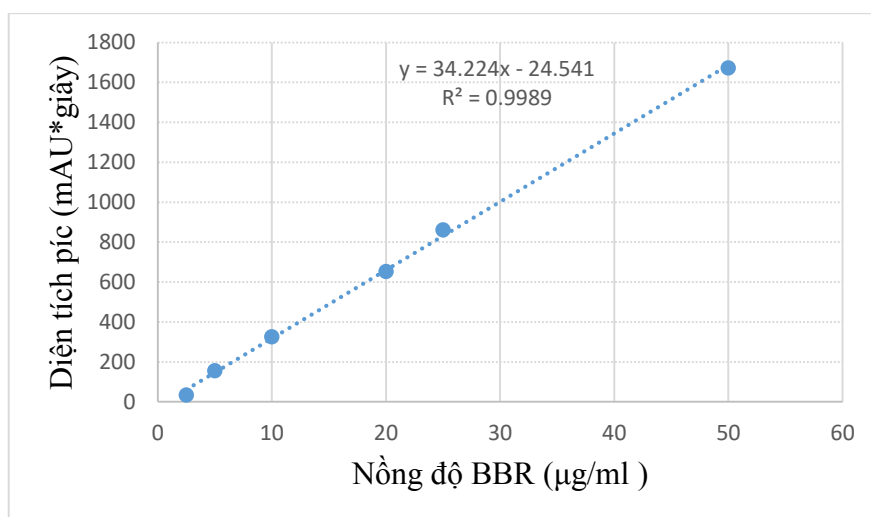


Hình PL-1.2b.3. Sắc ký đồ mẫu thử

Phụ lục 1.2c. Sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic với nồng độ BBR (mẫu chuẩn 5 µg/ml)

Lần	Diện tích pic (mAU*giây)					
	Nồng độ 2,5 µg/ml	Nồng độ 5 µg/ml	Nồng độ 10 µg/ml	Nồng độ 20 µg/ml	Nồng độ 25 µg/ml	Nồng độ 50 µg/ml
1	34,97	156,50	325,82	653,24	862,07	1664,80
2	34,86	155,99	325,12	651,80	859,84	1661,66
3	34,68	154,49	325,16	653,07	860,76	1694,10
Diện tích pic TB	34,84	155,66	325,37	652,70	860,89	1673,52
SD	0,15	1,04	0,39	0,79	1,12	17,89
RSD (%)	0,42	0,67	0,12	0,12	0,13	1,07

Phụ lục 1.2d. Mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ BBR trong phương pháp định lượng berberin bằng HPLC



Hình PL1.2d. Đường biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ BBR trong phương pháp định lượng BBR bằng HPLC

Phụ lục 1.2e. Độ chính xác của phương pháp định lượng berberin bằng HPLC

Bảng PL-1.2e. Kết quả đánh giá độ chính xác của phương pháp HPLC khi định lượng BBR

Phép thử	Mức nồng độ (µg/ml)	Nồng độ mẫu pha (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.giây)	Nồng độ tìm lại (µg/ml)	Tỉ lệ thu hồi (%)	Trung bình (%)	RSD (%)
1	4	3,89	108,64	3,93	101,14	100,51	0,91
2		4,09	114,68	4,07	99,47		

3		4,29	124,79	4,33	100,93		
4	5	4,91	143,67	4,92	100,15	100,63	0,68
5		5,21	156,43	5,29	101,41		
6		5,32	158,03	5,33	100,34		
7	6	5,64	170,54	5,70	101,09	100,34	0,66
8		6,27	190,17	6,27	100,01		
9		6,92	212,22	6,91	99,92		
	Trung bình					100,49	0,74

Phụ lục 1.2f. Độ chụm của phương pháp định lượng berberin bằng HPLC

Bảng PL-1.2f. Kết quả khảo sát độ chụm của phương pháp

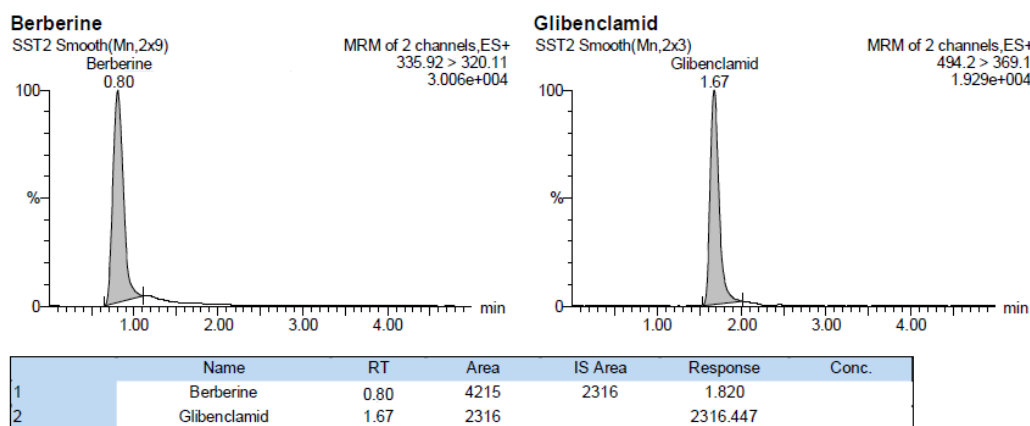
STT	Khối lượng mẫu thử (g)	Diện tích pic (mAU.giây)	Hàm lượng BBR (%)
1	0,0684	151,42	15,02
2	0,0705	155,79	14,94
3	0,0721	157,30	14,75
4	0,0720	157,12	14,75
5	0,0694	150,79	14,77
6	0,0712	158,03	14,97
TB			14,87
RSD (%)			0,84

Phụ lục 1.3a. Kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống LC-MS/MS

Bảng PL1.3a. Kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống LC-MS/MS (n=6)

STT	BBR		IS		Tỷ lệ diện tích
	t _R (phút)	Diện tích (a.u)	t _R (phút)	Diện tích (a.u)	BBR/IS
1	0,80	4215	1,67	2316	1,82
2	0,80	4319	1,67	2263	1,91
3	0,79	4552	1,68	2409	1,89
4	0,79	4527	1,68	2397	1,89
5	0,79	4514	1,67	2410	1,87
6	0,79	4215	1,67	2328	1,81
TB	0,79	4390,3	1,67	2353,8	1,87
RSD (%)	0,7	3,6	0,3	2,6	2,2

Phụ lục 1.3b. Phổ đại diện của mẫu SST (system stability test) ghi lại thời gian lưu của BBR và IS



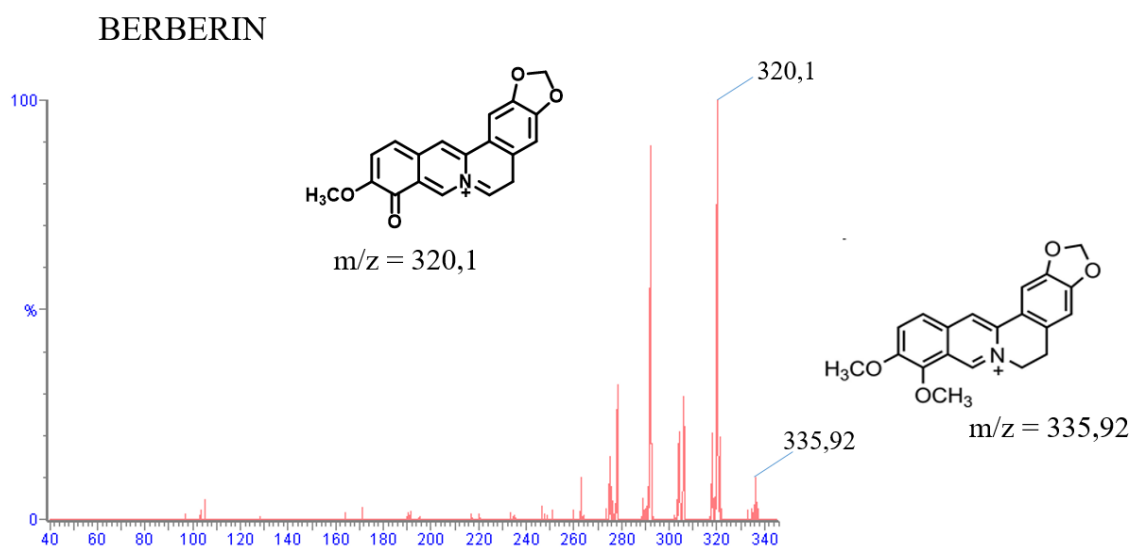
Hình PL-1.3b. Phổ đại diện của mẫu SST ghi lại thời gian lưu của BBR và IS

Phụ lục 1.4a

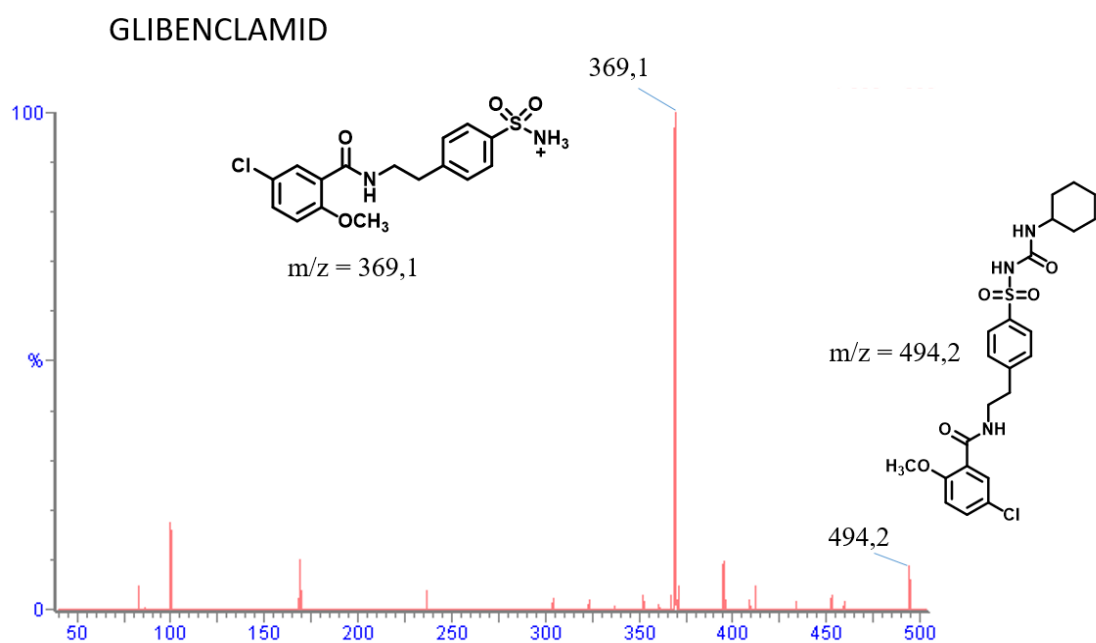
Bảng 3.5. Kết quả đánh giá tính chọn lọc - độ đặc hiệu của hệ thống LC-MS/MS

STT	Tại thời gian lưu của BBR			Tại thời gian lưu của IS		
	Đáp ứng pic của mẫu trắng (a.u)	Đáp ứng pic của mẫu LLOQ (a.u)	Tỉ lệ đáp ứng pic của mẫu trắng/LLOQ (%)	Đáp ứng pic của mẫu trắng (a.u)	Đáp ứng pic trung bình của mẫu CC-QC (a.u)	Tỉ lệ đáp ứng pic của mẫu trắng/CC-QC (%)
1	7	95	7,4	1	3361	0,0
2	5	64	7,8	0		0,0
3	3	59	5,1	3		0,1
4	5	67	7,5	2		0,1
5	3	78	3,8	1		0,0
6	6	68	8,8	1		0,0

Phụ lục 1.4b. Phổ ion tạo thành của BBR và glibenclamid (IS)

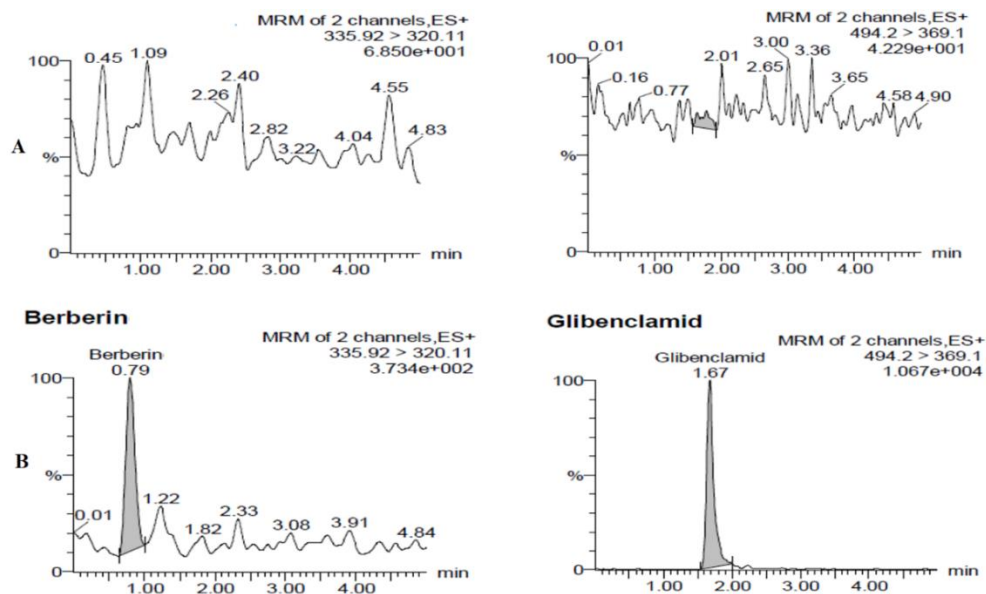


Hình PL-1.4b.1. Phổ ion tạo thành của BBR



Hình PL-1.4b..2. Phổ ion tạo thành của glibenclamid (IS)

Phụ lục 1.4c.



Hình PL-1.4.c. Sắc ký đồ LC-MS/MS đại diện của BBR và IS trong mẫu huyết tương chuột: (A) mẫu huyết tương trắng; (B) mẫu huyết tương trắng có chứa IS và BBR ở nồng độ LLOQ.

Phụ lục 1.5. Kết quả khảo sát đường chuẩn theo mô hình tuyến tính trọng số $1/x^2$

Bảng PL1.5. Kết quả khảo sát đường chuẩn theo mô hình tuyến tính trọng số $1/x^2$

Mẫu	Nồng độ thực (ng/ml)	Đường chuẩn 1		Đường chuẩn 2		Đường chuẩn 3	
		Tỷ lệ BBR/IS	Độ đúng (%)	Tỷ lệ BBR/IS	Độ đúng (%)	Tỷ lệ BBR/IS	Độ đúng (%)
S1	0,2	0,017	99,7	0,021	102,0	0,023	98,5
S2	0,5	0,044	94,8	0,046	94,9	0,053	103,6
S3	1,0	0,105	109,5	0,094	101,1	0,099	99,7
S4	2,0	0,206	105,6	0,183	99,5	0,198	101,5
S5	8,0	0,779	98,8	0,677	93,2	0,755	98,1
S6	12,0	1,178	99,5	1,098	101,0	1,163	101,0
S7	20,0	1,926	97,5	1,873	103,4	1,916	99,9
S8	25,0	2,337	94,6	2,375	105,0	2,340	97,7
Phương trình hồi quy (y = ax + b)		a = 0,0924		a = 0,0904		a = 0,0957	
		b = 0,00174		b = 0,00289		b = 0,00387	
		r = 0,9998		r = 0,9989		r = 0,9997	

Phụ lục 1.6. Kết quả xác định giới hạn định lượng dưới

Bảng PL 1.6.1. Đáp ứng pic của mẫu LLOQ và mẫu zero tại thời điểm trùng với thời gian lưu của BBR

STT	Ngày thứ nhất		Ngày thứ 2		Ngày thứ 3	
	Đáp ứng pic của mẫu Zero (a.u)	Đáp ứng pic của mẫu LLOQ (a.u)	Đáp ứng pic của mẫu Zero (a.u)	Đáp ứng pic của mẫu LOQ (a.u)	Đáp ứng pic của mẫu Zero (a.u)	Đáp ứng pic của mẫu LLOQ (a.u)
1	2	83	5	74	2	41
2		72		81		58
3		68		70		47
4		80		53		41
5		63		54		55
6		68		66		57
TB		72		66		50
Tỉ số đáp ứng LLOQ /Zero (S/N)		36,2		13,3		24,9

Bảng PL 1.6.2. Độ chính xác, độ lặp lại của mẫu LLOQ ($C_{thực}=0,2$ ng/mL)

STT	Ngày thứ nhất		Ngày thứ 2		Ngày thứ 3	
	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)
1	0,228	114,0	0,239	116,3	0,175	85,7
2	0,223	111,5	0,227	111,9	0,208	103,8
3	0,198	99,0	0,210	104,8	0,189	94,2
4	0,206	103,0	0,173	84,4	0,171	83,0
5	0,175	87,5	0,178	87,6	0,214	106,5
6	0,185	92,5	0,192	95,8	0,225	111,1
TB	0,203	101,3	0,203	100,1	0,199	97,4
CV (%)	10,3	10,3	13,1	13,0	11,2	11,9
TB (n = 18)					0,201	99,6
CV% (n = 18)					11,0	11,2

Phụ lục 1.7. Bảng kết quả thẩm định độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày về nồng độ BBR trong huyết tương bằng pp LC-MS/MS

Bảng PL-1.7.1 Kết quả khảo sát độ chính xác - độ lặp lại trong ngày – ngày 1

STT	Mã CC: CC06032021							
	LLOQ: 0,200 (ng/mL)		LQC: 0,600 (ng/mL)		MQC: 10,000 (ng/mL)		HQC: 18,000 (ng/mL)	
	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)
1	0,228	113,9	0,580	96,6	10,236	102,4	17,452	97,0
2	0,223	111,7	0,545	90,8	9,661	96,6	17,868	99,3
3	0,198	98,8	0,534	89,0	8,648	86,5	18,531	102,9
4	0,206	102,8	0,568	94,6	9,570	95,7	18,012	100,1
5	0,175	87,5	0,534	89,0	9,228	92,3	18,081	100,4
6	0,185	92,3	0,608	101,3	10,396	104,0	18,054	100,3
TB	0,203	101,2	0,562	93,6	9,623	96,3	18,000	100,0
CV (%)	10,3	10,3	5,2	5,2	6,7	6,7	1,9	1,9

Bảng PL-1.7.2. Kết quả khảo sát độ chính xác - độ lặp lại trong ngày – ngày 2

STT	Mã CC: CC08032021							
	LLOQ: 0,200 (ng/mL)		LQC: 0,600 (ng/mL)		MQC: 10,000 (ng/mL)		HQC: 18,000 (ng/mL)	
	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)
1	0,239	119,7	0,636	106,0	10,227	102,3	17,768	98,7
2	0,227	113,5	0,653	108,8	9,437	94,4	17,387	96,6
3	0,210	105,2	0,629	104,8	9,405	94,0	16,499	91,7
4	0,148	73,8	0,609	101,5	9,653	96,5	17,328	96,3
5	0,154	77,2	0,700	116,7	10,262	102,6	17,355	96,4
6	0,192	96,2	0,503	83,8	10,047	100,5	17,080	94,9
TB	0,195	97,6	0,622	103,6	9,839	98,4	17,236	95,8
CV (%)	19,3	19,4	10,6	10,6	4,0	4,0	2,5	2,4

Bảng PL-1.7.3. Kết quả khảo sát độ chính xác - độ lặp lại trong ngày – ngày 3

STT	Mã CC: CC09032021							
	LLOQ: 0,200 (ng/mL)		LQC: 0,600 (ng/mL)		MQC: 10,000 (ng/mL)		HQC: 18,000 (ng/mL)	
	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)
1	0,161	80,3	0,570	95,0	11,288	112,9	16,530	91,8
2	0,208	104,1	0,794	132,4	10,902	109,0	16,335	90,7
3	0,189	94,7	0,750	125,0	10,765	107,6	16,557	92,0
4	0,157	78,3	0,629	104,9	11,287	112,9	17,988	99,9
5	0,214	107,0	0,608	101,3	11,889	118,9	18,428	102,4
6	0,218	109,1	0,700	116,6	10,983	109,8	18,852	104,7
TB	0,191	95,6	0,675	112,5	11,186	111,9	17,448	96,9
CV (%)	14,0	14,2	12,9	12,9	3,6	3,6	6,3	6,3

Bảng PL-1.7.4. Kết quả khảo sát độ lặp lại khác ngày

STT	Ngày	LLOQ		LQC		MQC		HQC	
		Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)
1	Ngày 1	0,228	113,9	0,580	96,6	10,236	102,4	17,452	97,0
2		0,223	111,7	0,545	90,8	9,661	96,6	17,868	99,3
3		0,198	98,8	0,534	89,0	8,648	86,5	18,531	102,9
4		0,206	102,8	0,568	94,6	9,570	95,7	18,012	100,1
5		0,175	87,5	0,534	89,0	9,228	92,3	18,081	100,4
6		0,185	92,3	0,608	101,3	10,396	104,0	18,054	100,3
7	Ngày 2	0,239	119,7	0,636	106,0	10,227	102,3	17,768	98,7
8		0,227	113,5	0,653	108,8	9,437	94,4	17,387	96,6
9		0,210	105,2	0,629	104,8	9,405	94,0	16,499	91,7
10		0,148	73,8	0,609	101,5	9,653	96,5	17,328	96,3
11		0,154	77,2	0,700	116,7	10,262	102,6	17,355	96,4
12		0,192	96,2	0,503	83,8	10,047	100,5	17,080	94,9
13	Ngày 3	0,161	80,3	0,570	95,0	11,288	112,9	16,530	91,8
14		0,208	104,1	0,794	132,4	10,902	109,0	16,335	90,7
15		0,189	94,7	0,750	125,0	10,765	107,6	16,557	92,0
16		0,157	78,3	0,629	104,9	11,287	112,9	17,988	99,9
17		0,214	107,0	0,608	101,3	11,889	118,9	18,428	102,4
18		0,218	109,1	0,700	116,6	10,983	109,8	18,852	104,7
TB		0,2	98,1	0,6	103,2	10,2	102,2	17,6	97,6
CV (%)		14,2	14,3	12,6	12,6	8,3	8,3	4,2	4,2

Phụ lục 1.8. Độ chính xác và độ chụm khi pha loãng mẫu berberin trong huyết tương

Bảng PL1.8. Độ chính xác và độ chụm khi pha loãng 5 lần mẫu BBR trong huyết tương nồng độ 90 ng/ml

STT	Đáp ứng pic BBR (a.u)	Đáp ứng pic IS (a.u)	Tỉ lệ BBR/IS	Nồng độ (ng/mL)	Độ đúng (%)
1	4372	1759	2,486	85,864	95,4
2	4516	1778	2,540	87,743	97,5
3	4455	1668	2,670	92,260	102,5
4	4553	1657	2,747	94,945	105,5
5	4612	1760	2,621	90,553	100,6
6	4649	1702	2,731	94,370	104,9
TB				90,956	101,1
CV (%)				3,6	4,0

Phụ lục 1.9. Tỉ lệ thu hồi trong định lượng BBR bằng phương pháp LC-MS/MS

Bảng PL-1.9.1. Tỉ lệ thu hồi của BBR ở 3 mức nồng độ

STT	Mẫu LQC			Mẫu MQC			Mẫu HQC		
	Huyết tương (a.u)	Nền mẫu (a.u)	Tỉ lệ thu hồi (%)	Huyết tương (a.u)	Nền mẫu (a.u)	Tỉ lệ thu hồi (%)	Huyết tương (a.u)	Nền mẫu (a.u)	Tỉ lệ thu hồi (%)
1	160	158	101,3	2737	2700	101,3	4857	5176	93,8
2	143	171	83,6	2777	2767	100,4	5253	4958	105,9
3	168	184	91,3	2824	2949	95,8	4865	5185	93,8
4	179	173	103,5	2652	2791	95,0	5093	5128	99,3
5	153	164	93,3	3021	2699	111,9	5087	5093	99,9
6	187	170	110,3	2769	2844	97,4	5170	5109	101,2
TB	165	170	97,1	2797	2792	100,2	5054	5018	98,9
CV (%)	9,9	5,2	9,8	4,4	3,4	6,2	3,2	1,6	4,7

Bảng PL-1.9.2. Tỷ lệ thu hồi của glibenclamid (IS)

STT	Đáp ứng pic IS (a.u)	
	Mẫu trong huyết tương (có chiết tách)	Mẫu pha trong nền mẫu (không chiết tách)
1	3222	3181
2	3311	3136
3	2885	3939
4	3416	3770
5	3180	3479
6	2955	3406
7	3151	3543
8	3181	3328
9	3306	3464
10	3434	3686
11	3116	3390
12	3282	3400
13	3032	3746
14	3334	3385
15	3256	3746
16	3557	3938
17	3392	2973
18	3318	3432
Trung bình	3240	3497
CV (%)	5,3	7,6
Tỷ lệ thu hồi (%)	92,7	

Phụ lục 1.10. Độ ổn định của dung dịch chuẩn gốc

Bảng PL1.10a. Kết quả đánh giá độ ổn định của dung dịch chuẩn gốc BBR

Thời gian ổn định	27 ngày			
STT	Độ ổn định dung dịch gốc		Dung dịch gốc mới pha	
	Đáp ứng pic (a.u)	Nồng độ (µg/mL)	Đáp ứng pic (a.u)	Nồng độ (µg/mL)
1	5182	499,9	5055	500,4
2	4919		5128	
3	4800		4985	
Trung bình	4967		5056	
CV (%)	3,9		1,4	
% Độ ổn định	98,3			

Bảng PL 1.10b. Kết quả đánh giá độ ổn định của dung dịch chuẩn nội (IS)

Thời gian ổn định	13 ngày			
STT	Độ ổn định dung dịch gốc		Dung dịch gốc mới pha	
	Đáp ứng pic (a.u)	Nồng độ (µg/ml)	Đáp ứng pic (a.u)	Nồng độ (µg/ml)
1	2513351	269,0	2461142	258,0
2	2518354		2464122	
3	2556001		2458163	
Trung bình	2529235		2461142	
CV (%)	0,9		0,1	
% Độ ổn định	98,9			

Bảng PL1.10c. Độ ổn định trong thời gian ngắn của dung dịch gốc IS ở nhiệt độ phòng

Thời gian ổn định	3,5 giờ			
STT	Độ ổn định dung dịch gốc		Dung dịch gốc mới pha	
	Đáp ứng pic (a.u)	Nồng độ (µg/ml)	Đáp ứng pic (a.u)	Nồng độ (µg/ml)
1	43645	254,3	40132	249,3
2	43195		40800	
3	43322		40435	
Trung bình	43387		40456	
CV (%)	0,5		0,8	

% Độ ổn định	105,1
---------------------	--------------

Phụ lục 1.11. Độ ổn định trong thời gian ngắn của chuẩn nội làm việc

Bảng PL-1.11. Độ ổn định của dung dịch chuẩn nội làm việc trong 48 giờ

STT	Mẫu độ ổn định		Dung dịch IS mới pha	
	Đáp ứng pic (a.u)	Nồng độ (ng/ml)	Đáp ứng pic (a.u)	Nồng độ (ng/ml)
1	4977	251,000	4890	251,400
2	4998		4876	
3	4970		5032	
TB	4982		4933	
CV (%)	0,3		1,7	
% Độ ổn định	98,9			

Phụ lục 1.12. Độ ổn định của BBR trong huyết tương

Bảng PL-1.12.1. Độ ổn định huyết tương thời gian ngắn ở nhiệt độ phòng (6 giờ)

LQCS: 0,600 ng/mL				
STT	Đáp ứng pic của BBR (a.u)	Đáp ứng pic của IS (a.u)	BBR/IS	Nồng độ (ng/mL)
1	108	1136	0,095	0,509
2	141	1415	0,100	0,528
3	115	1385	0,083	0,463
4	128	1047	0,122	0,677
5	144	1304	0,111	0,604
6	144	1301	0,111	0,606
Trung bình				0,564
CV (%)				13,9
% Độ ổn định				94,1

HQCS: 18,000 ng/mL				
STT	Đáp ứng pic của BBR (a.u)	Đáp ứng pic của IS (a.u)	BBR/IS	Nồng độ (ng/mL)
1	4475	1429	3,132	18,651
2	4744	1458	3,254	19,381
3	4900	1316	3,724	21,818
4	4476	1554	2,880	17,143
5	4595	1507	3,048	18,151
6	4597	1434	3,206	19,093
Trung bình				19,039
CV (%)				8,2
% Độ ổn định				105,8

Bảng PL-1.12.2. Độ ổn định huyết tương thời gian dài (52 ngày)

STT	LQCS: 0,600ng/mL			
	Đáp ứng pic của BBR (a.u)	Đáp ứng pic của IS (a.u)	BBR/IS	Nồng độ (ng/mL)
1	193	3046	0,063	0,595
2	195	3099	0,063	0,591
3	192	2736	0,070	0,667
4	196	3387	0,058	0,539
5	160	3083	0,052	0,478
6	160	3070	0,052	0,481
Trung bình				0,559
CV (%)				13,2
% Độ ổn định				93,1

STT	HQCS: 18,000 ng/mL			
	Đáp ứng pic của BBR (a.u)	Đáp ứng pic của IS (a.u)	BBR/IS	Nồng độ (ng/mL)
1	5340	3442	1,551	15,965
2	5689	3129	1,818	18,721
3	5374	3235	1,661	17,101
4	5375	3352	1,604	16,504
5	5392	3210	1,680	17,290
6	5296	2916	1,817	18,704
Trung bình				17,400
CV (%)				6,5
% Độ ổn định				96,6

Bảng PL-1.12.3. Kết quả độ ổn định sau 5 chu kỳ đông rã

LQCS: 0,600 ng/mL				
STT	Đáp ứng pic của BBR (a.u)	Đáp ứng pic của IS (a.u)	BBR/IS	Nồng độ (ng/mL)
1	157	1543	0,101	0,532
2	151	1526	0,099	0,518
3	167	1534	0,109	0,575
4	170	1603	0,106	0,560
5	156	1454	0,108	0,568
6	203	1529	0,133	0,719
Trung bình				0,579
CV (%)				12,5
% Độ ổn định				96,5
HQCS: 18,000 ng/mL				

STT	Đáp ứng pic của BBR (a.u)	Đáp ứng pic của IS (a.u)	BBR/IS	Nồng độ (ng/mL)
1	4306	1548	2,782	16,561
2	4545	1598	2,844	16,928
3	4892	1543	3,171	18,882
4	4678	1541	3,036	18,074
5	5044	1670	3,021	17,986
6	5107	1699	3,006	17,896
Trung bình				17,721
CV (%)				4,8
% Độ ổn định				98,5

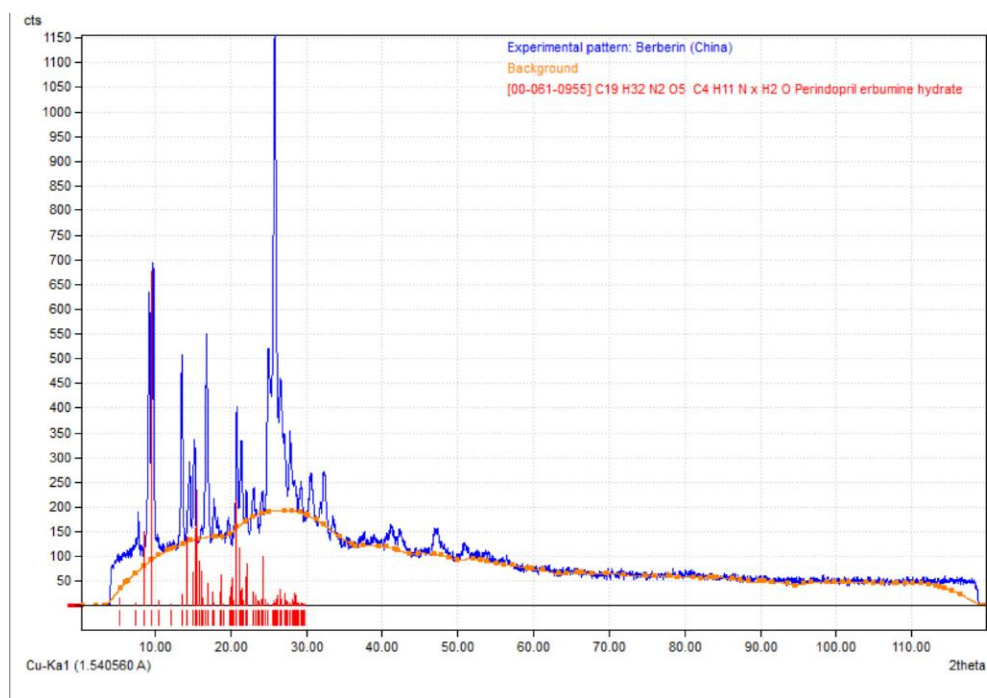
Bảng PL-1.12.4. Kết quả độ ổn định của BBR sau 25 giờ bảo quản ở autosampler

STT	LQCS: 0,600 ng/mL			
	Đáp ứng pic của BBR (a.u)	Đáp ứng pic của IS (a.u)	BBR/IS	Nồng độ (ng/mL)
1	129	1407	0,092	0,473
2	134	1354	0,099	0,519
3	133	1318	0,101	0,529
4	177	1359	0,130	0,649
5	164	1279	0,128	0,693
6	144	1360	0,106	0,557
Trung bình				0,570
CV (%)				14,7
% Độ ổn định				95,0

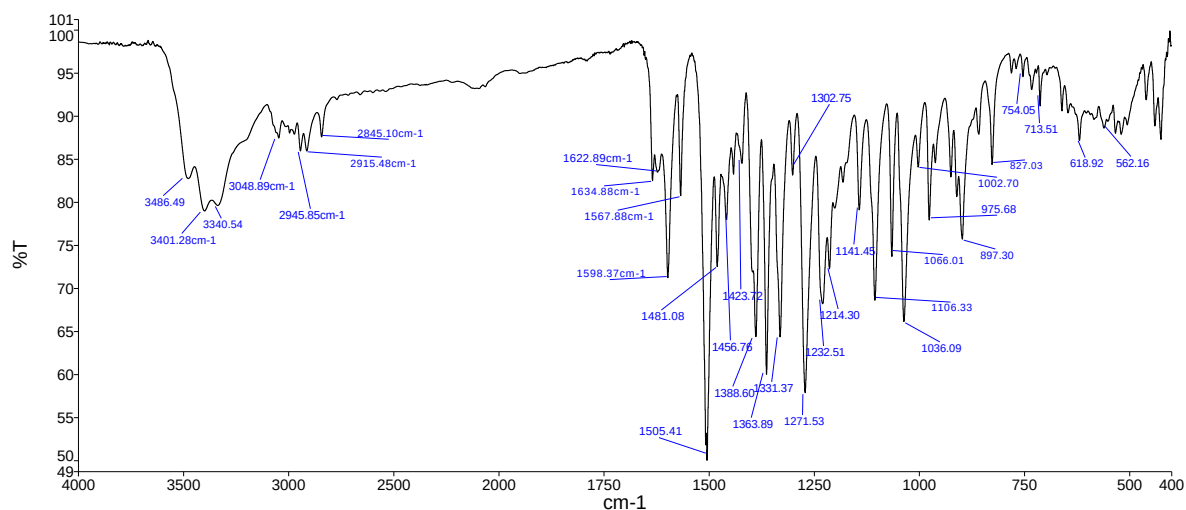
STT	HQCS: 18,000 ng/mL			
	Đáp ứng pic của BBR (a.u)	Đáp ứng pic của IS (a.u)	BBR/IS	Nồng độ (ng/mL)
1	4566	1414	3,230	19,236
2	4405	1439	3,060	18,221
3	4306	1542	2,793	16,621
4	4446	1570	2,832	16,857
5	4324	1424	3,036	18,079
6	4464	1425	3,132	18,653
Trung bình				17,945
CV (%)				5,7
% Độ ổn định				99,7

PHỤ LỤC 2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TIỀN CÔNG THỨC

Phụ lục 2.1. Phổ nhiễu xạ tia X của BBR

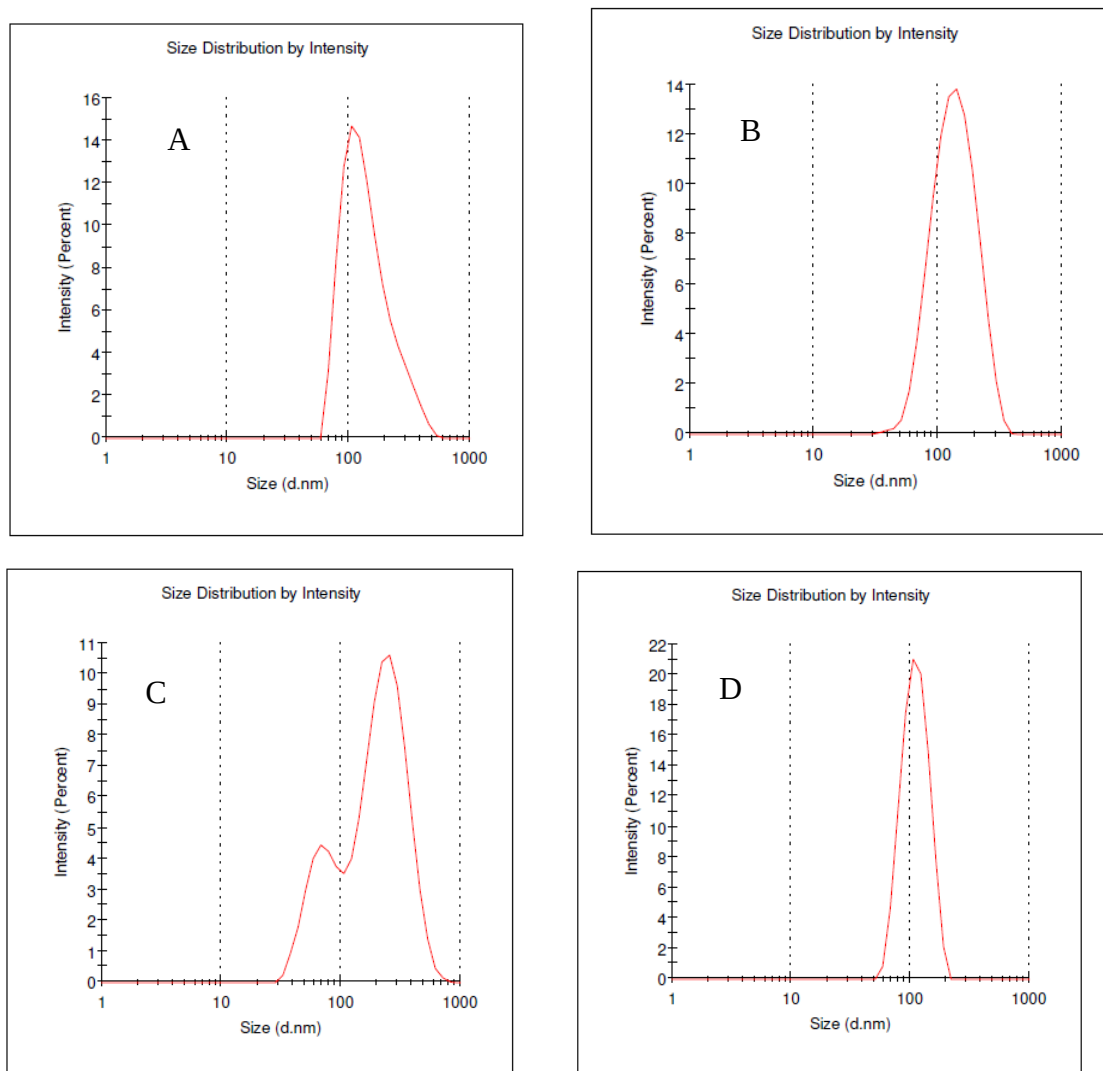


Phụ lục 2.2. Phổ hồng ngoại của BBR

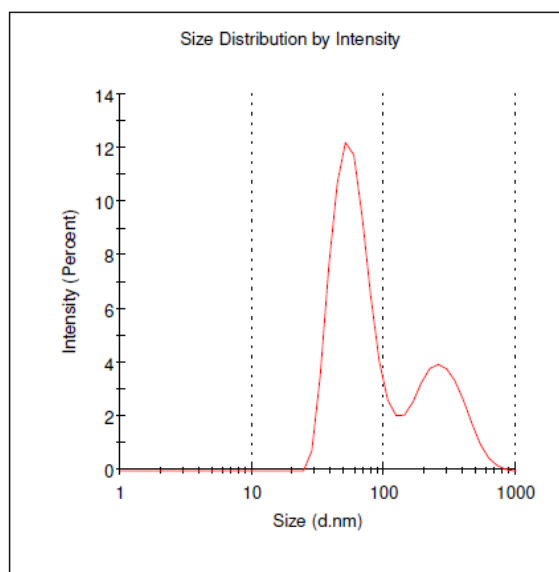


PHỤ LỤC 3. KẾT QUẢ BÀO CHẾ VÀ ĐÁNH GIÁ LIPOSOME BERBERIN

Phụ lục 3.1. Biểu đồ phân bố KTCP đại diện của các mẫu FJ21-60/200, FJ21-65/200, FJ21-60/180, FJ21-65/180



Hình PL – 3.1a. Biểu đồ phân bố KTCP theo cường độ của các mẫu FJ21-65/200 (A) và mẫu FJ21-65/180 (B), mẫu FJ21-60/200 (C), và mẫu FJ21-60/180 (D)



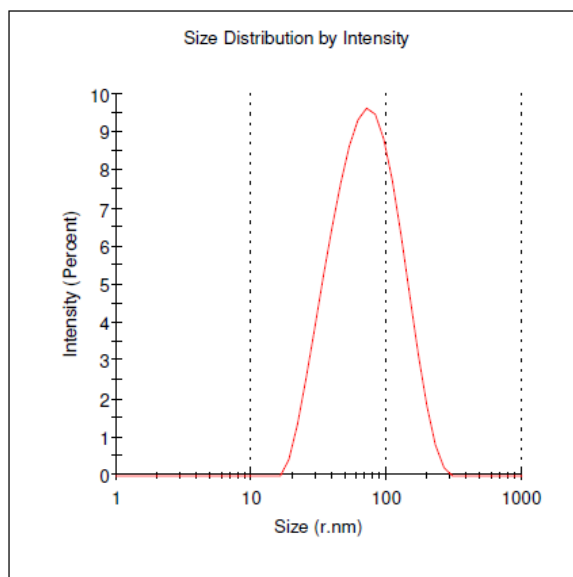
Hình PL – 3.1b. Biểu đồ phân bố KTCP theo cường độ của các mẫu FJ21-60/130

Phụ lục 3.2. Bảng thành phần chi tiết các công thức trong bào chế liposome berberin

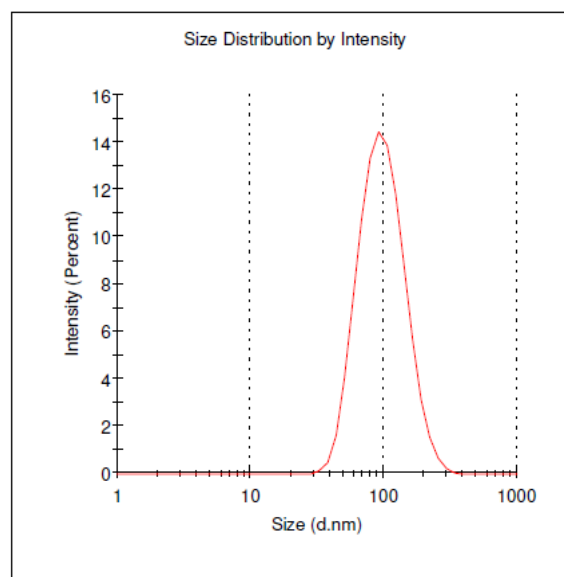
Ký hiệu	Tỉ lệ mol BBR : Lipid : SDC : α -tocopherol	Tỉ lệ mol HSPC : DSPG	Công thức cho 1 mẻ pha chế liposome BBR		
			Thành phần	Số mmol	Khối lượng (g)
F04	9 : 9 : 2 : 0	7 : 3	BBR	0,1125	0,0378
			HSPC	0,07875	0,0617
			DSPG	0,03375	0,0263
			SDC	0,025	0,0104
			α -TP	0	0
F21	9 : 9 : 0 : 3	7 : 3	BBR	0,1125	0,0378
			HSPC	0,07875	0,0617
			DSPG	0,03375	0,0263
			SDC	0	
			α -TP	0,0375	0,0162
F17	8 : 9 : 2 : 2	7 : 3	BBR	0,1	0,0336
			HSPC	0,07875	0,0617
			DSPG	0,03375	0,0263
			SDC	0,025	0,0104
			α -TP	0,025	0,0108
F12	8 : 9 : 2 : 0	7 : 3	BBR	0,1000	0,0336

			HSPC	0,07875	0,0617
			DSPG	0,03375	0,0263
			SDC	0,025	0,0104
			α -TP	0	0
F18	6 : 9 : 2 : 0	7 : 3	BBR	0,0750	0,0252
			HSPC	0,07875	0,0617
			DSPG	0,03375	0,0263
			SDC	0,025	0,0104
			α -TP	0	0
F14	6 : 9 : 2 : 0	6 : 4	BBR	0,0750	0,0252
			HSPC	0,0675	0,0529
			DSPG	0,0450	0,0351
			SDC	0,025	0,0104
			α -TP	0	
F16	6 : 9 : 2 : 0	4 : 6	BBR	0,0750	0,0252
			HSPC	0,0450	0,0353
			DSPG	0,0675	0,0526
			SDC	0,025	0,0104
			α -TP	0	0
F20	9 : 9 : 0 : 3	6 : 4	BBR	0,1125	0,0378
			HSPC	0,0675	0,0529
			DSPG	0,0450	0,0351
			SDC	0	0,0000
			α -TP	0,0375	0,0162
F22	9 : 9 : 0 : 3	4 : 6	BBR	0,1125	0,0378
			HSPC	0,0450	0,0353
			DSPG	0,0675	0,0526
			SDC	0	0,0000
			α -TP	0,0375	0,0162
F13	8 : 9 : 2 : 2	6 : 4	BBR	0,1	0,0336
			HSPC	0,0675	0,0529
			DSPG	0,0450	0,0351
			SDC	0,025	0,0104
			α -TP	0,025	0,0108
F19	8 : 9 : 2 : 2	4 : 6	BBR	0,1	0,0336
			HSPC	0,0450	0,0353
			DSPG	0,0675	0,0526
			SDC	0,025	0,0104
			α -TP	0,025	0,0108

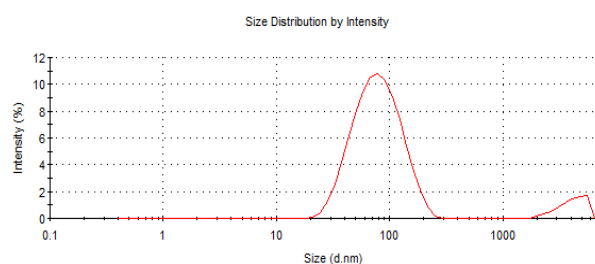
Phụ lục 3.3. Ảnh điển hình về phân bố kích thước tiểu phân theo cường độ của các mẫu liposome berberin trong nhóm I, II, III



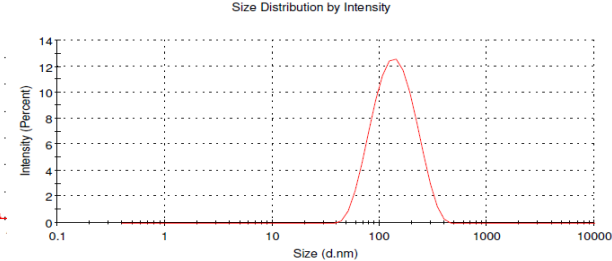
Phân bố KTTT theo cường độ mẫu FJ18



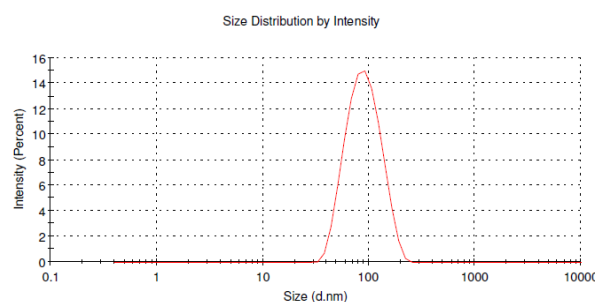
Phân bố KTTT theo cường độ mẫu FJ16



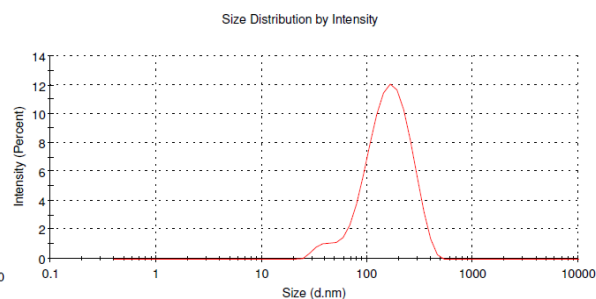
Phân bố KTTT theo cường độ mẫu FJ20



Phân bố KTTT theo cường độ mẫu FJ21

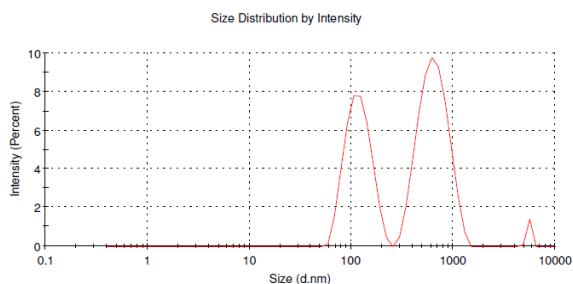


Phân bố KTTT theo cường độ mẫu FJ17

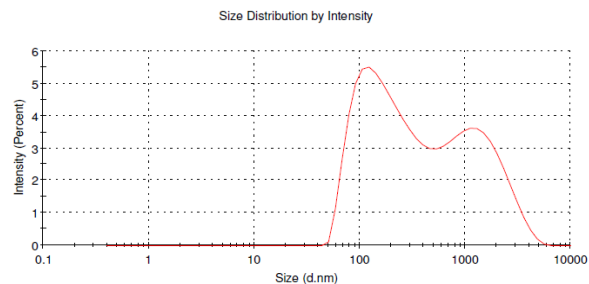


Phân bố KTTT theo cường độ mẫu FJ19

Phụ lục 3.4. Ảnh điển hình về phân bố kích thước tiểu phân theo cường độ của các mẫu liposome berberin bào chế bằng hydrat hóa film trong nhóm A, B

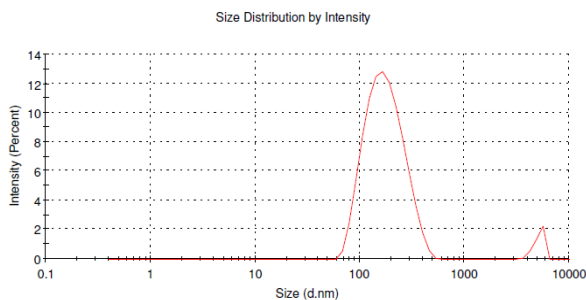


Phân bố KTCP theo cường độ mẫu FH13 trước khi đùn qua màng polycarbonat

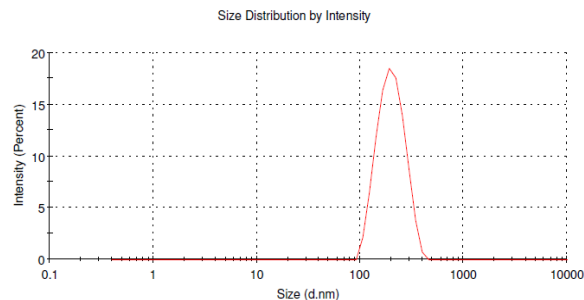


Phân bố KTCP theo cường độ mẫu FH14 trước khi đùn qua màng polycarbonat

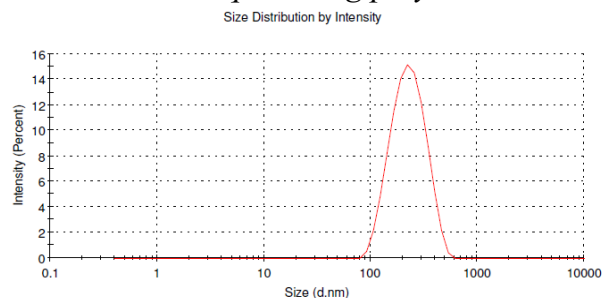
Phụ lục 3.5. Ảnh điển hình phân bố KTCP theo cường độ của liposome bào chế bằng hydrat hóa film sau khi đùn qua màng polycarbonat 0,4 μ m



Phân bố KTCP theo cường độ mẫu FH13 sau khi đùn qua màng polycarbonat

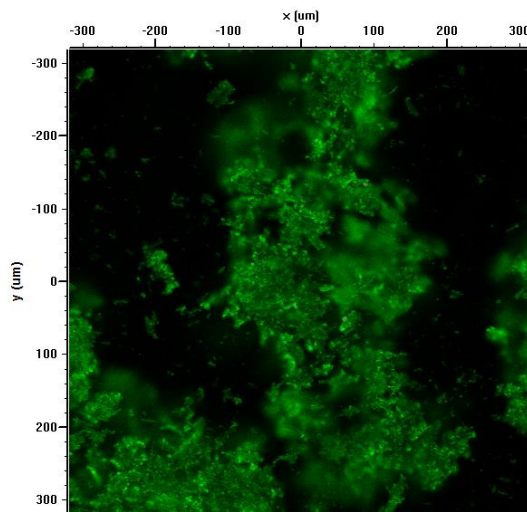


Phân bố KTCP theo cường độ mẫu FH14 sau khi đùn qua màng polycarbonat

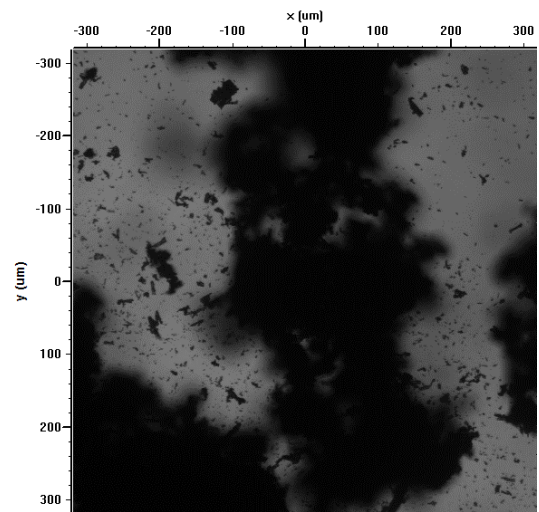


Phân bố KTCP theo cường độ mẫu FH17 sau khi đùn qua màng polycarbonat

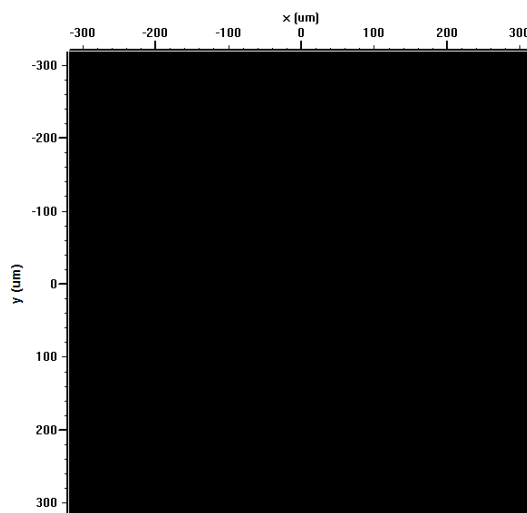
Phụ lục 3.6. Hình ảnh các nguyên liệu dùng bào chế liposome BBR quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (CLSM), trường sóng xanh và trường sáng (ánh sáng truyền qua)



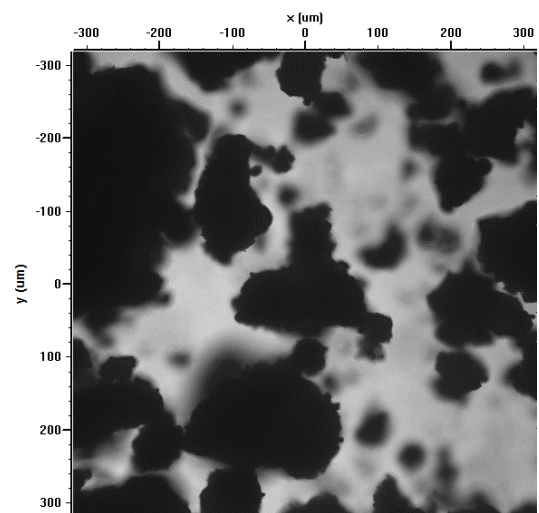
BBR phát huỳnh quang khi quan sát dưới trường sóng xanh



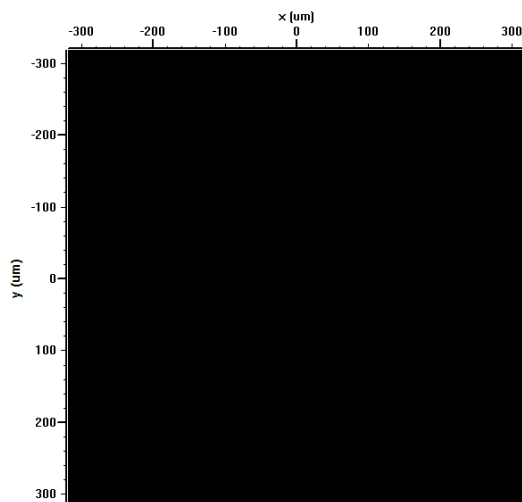
BBR quan sát dưới trường ánh sáng truyền qua



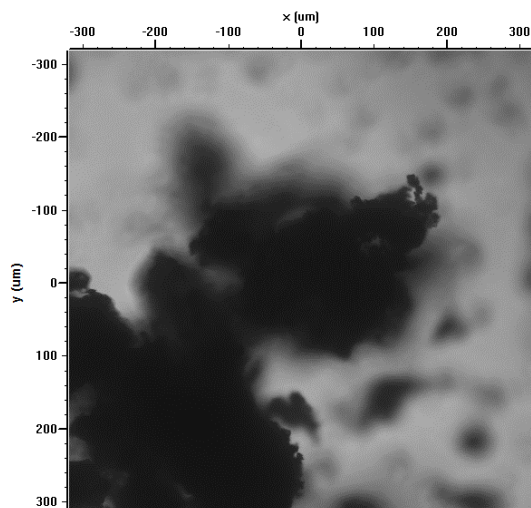
DSPG không phát huỳnh quang khi quan sát dưới trường sóng xanh



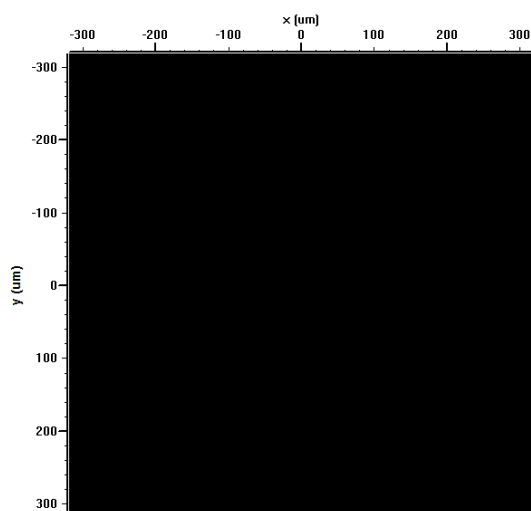
DSPG quan sát dưới trường ánh sáng truyền qua



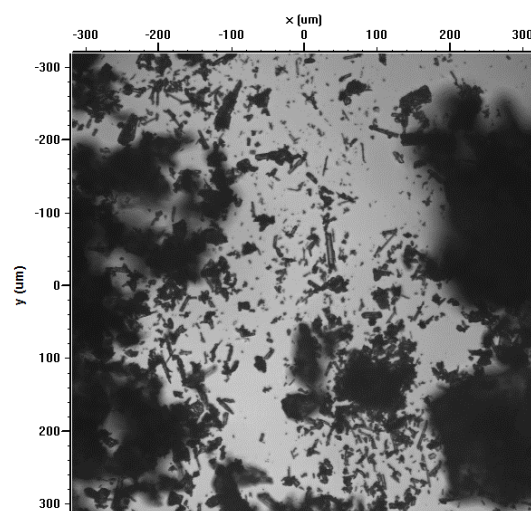
HSPC không phát huỳnh quang khi quan sát dưới trường sóng xanh



HSPC quan sát dưới trường ánh sáng truyền qua

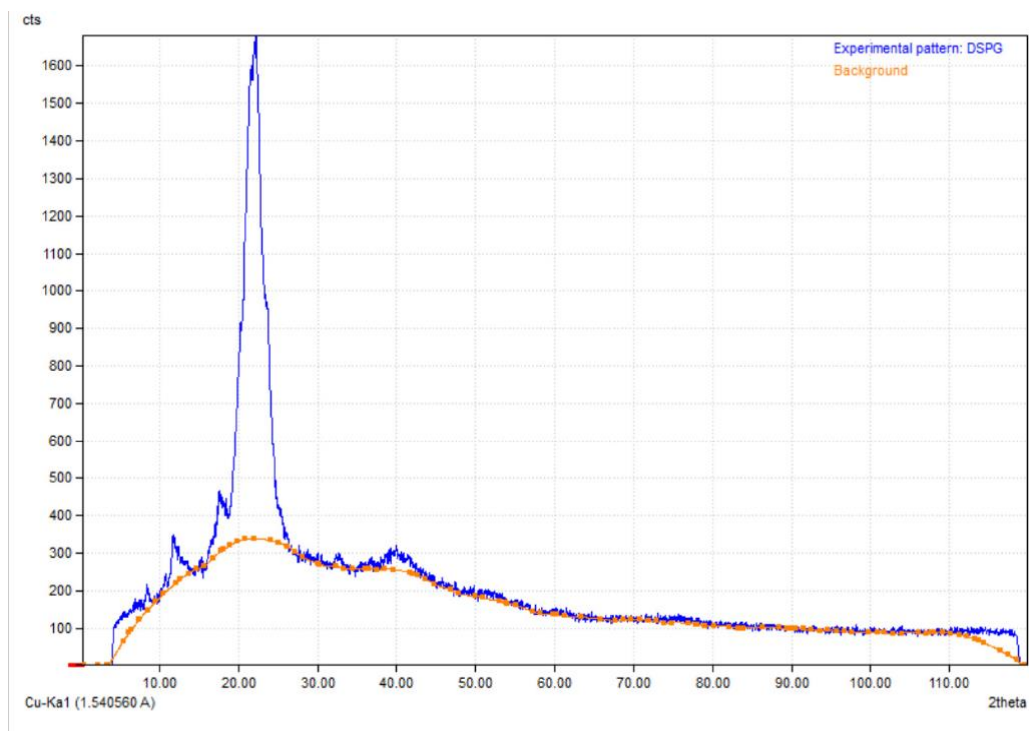


SDC không phát huỳnh quang khi quan sát dưới trường sóng xanh

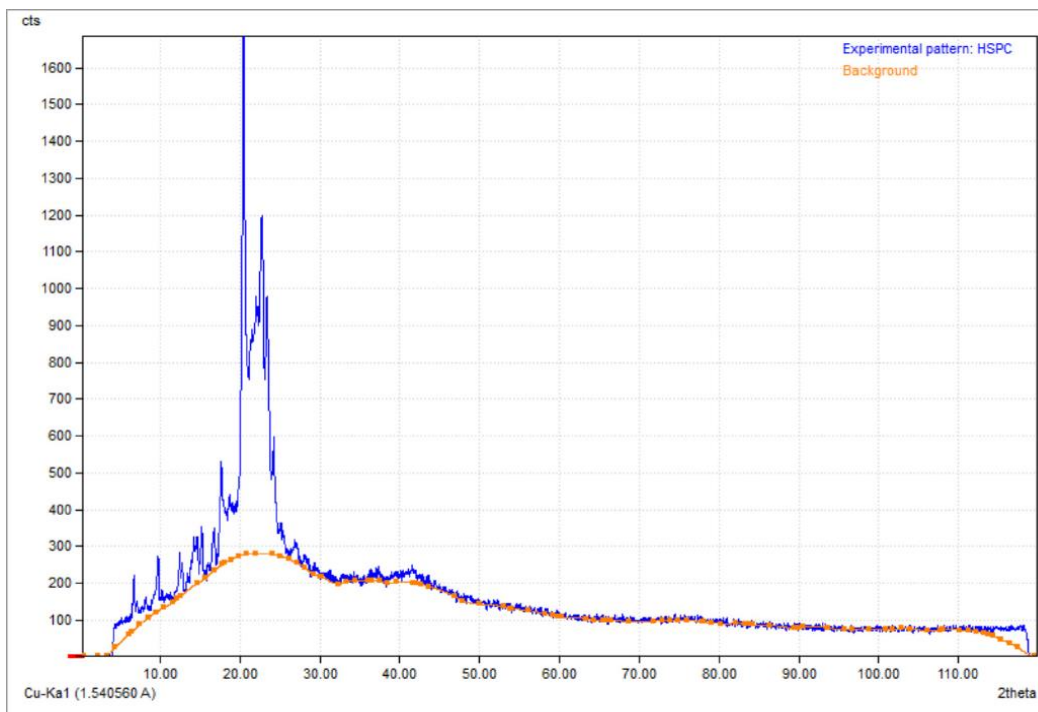


SDC quan sát dưới trường ánh sáng truyền qua

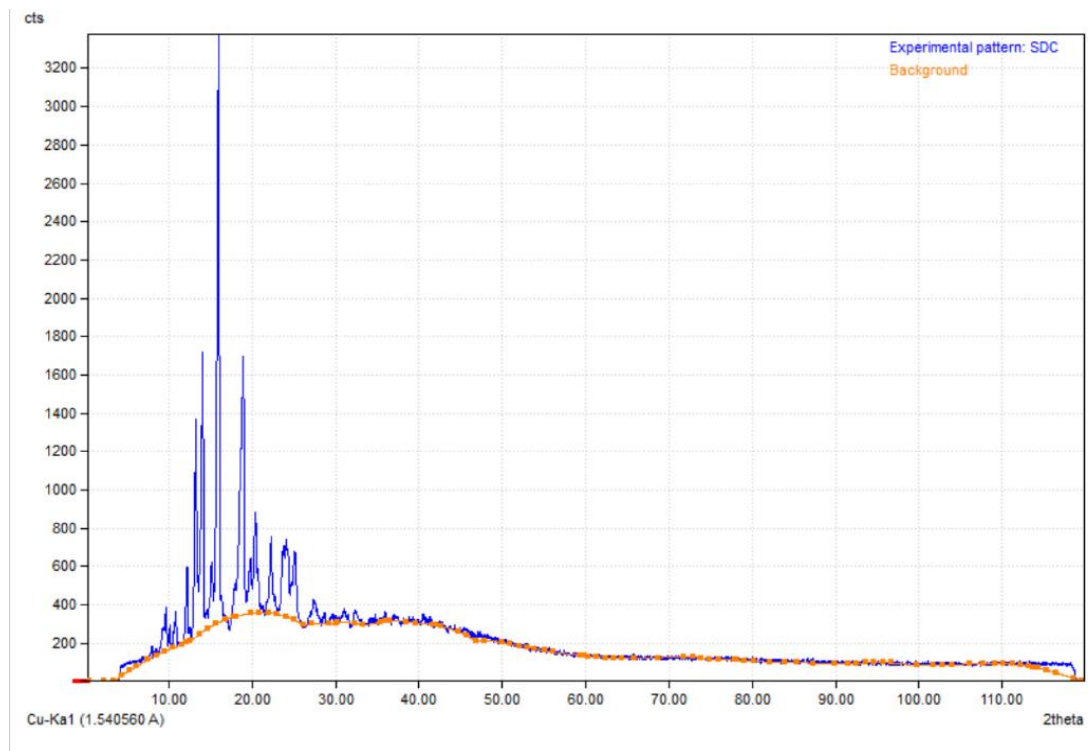
Phụ lục 3.7. Phổ nhiễu xạ tia X của các nguyên liệu cấu tạo nên liposome BBR, của mẫu liposome FJ16, FJ19, FH16, FH19



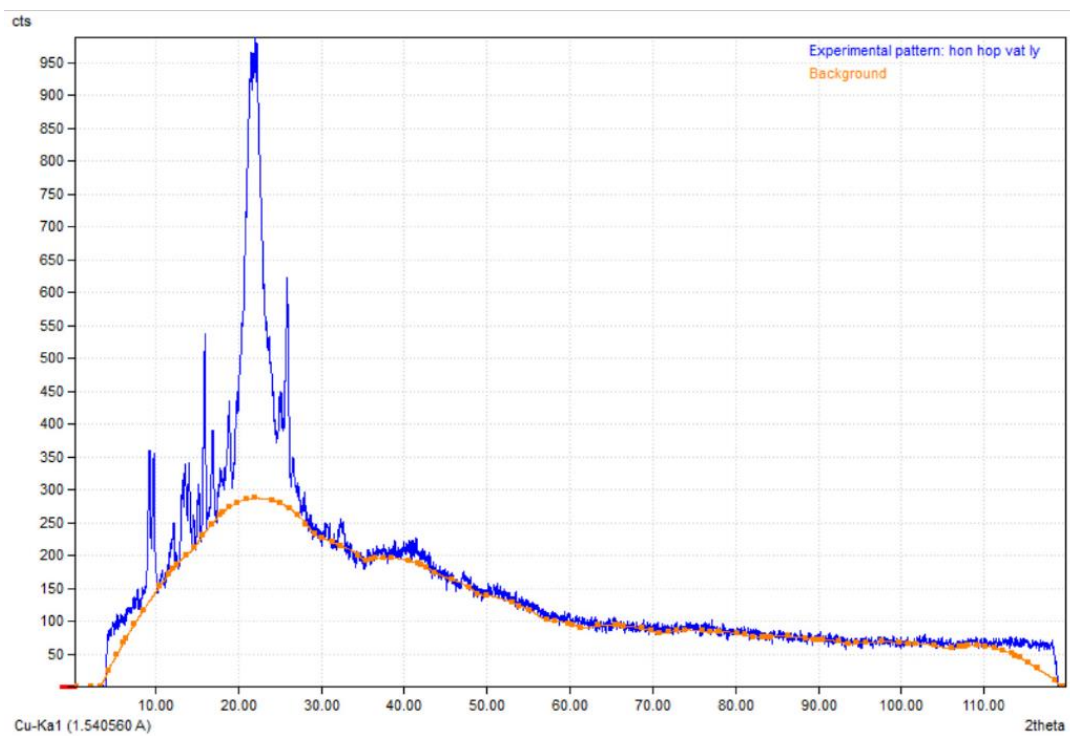
Hình PL-3.7.1. Phổ nhiễu xạ tia X của mẫu DSPG



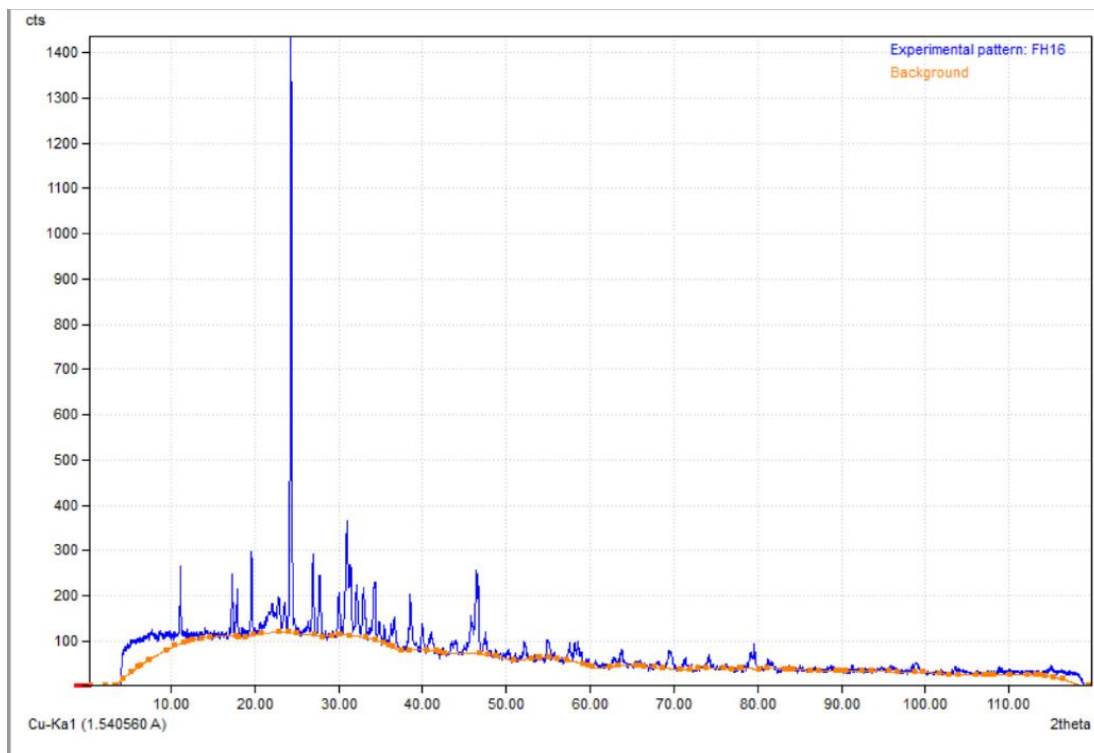
Hình PL-3.7.2. Phổ nhiễu xạ tia X của mẫu HSPC



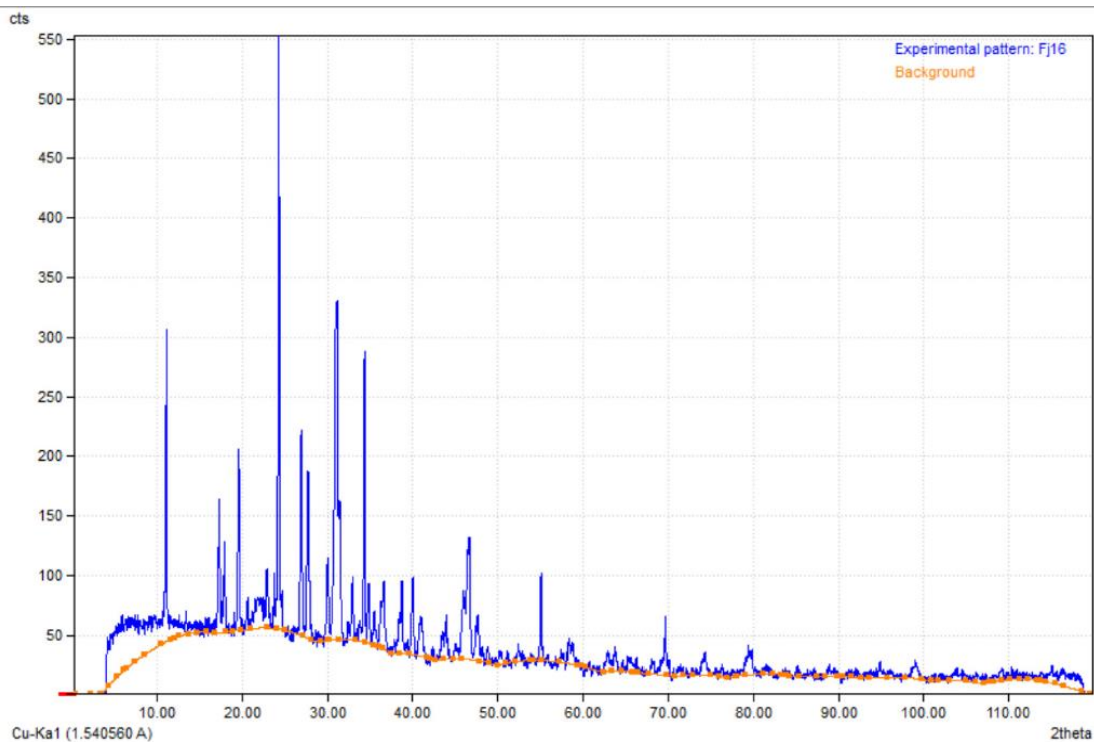
Hình PL-3.7.3. Phổ nhiễu xạ tia X của mẫu SDC



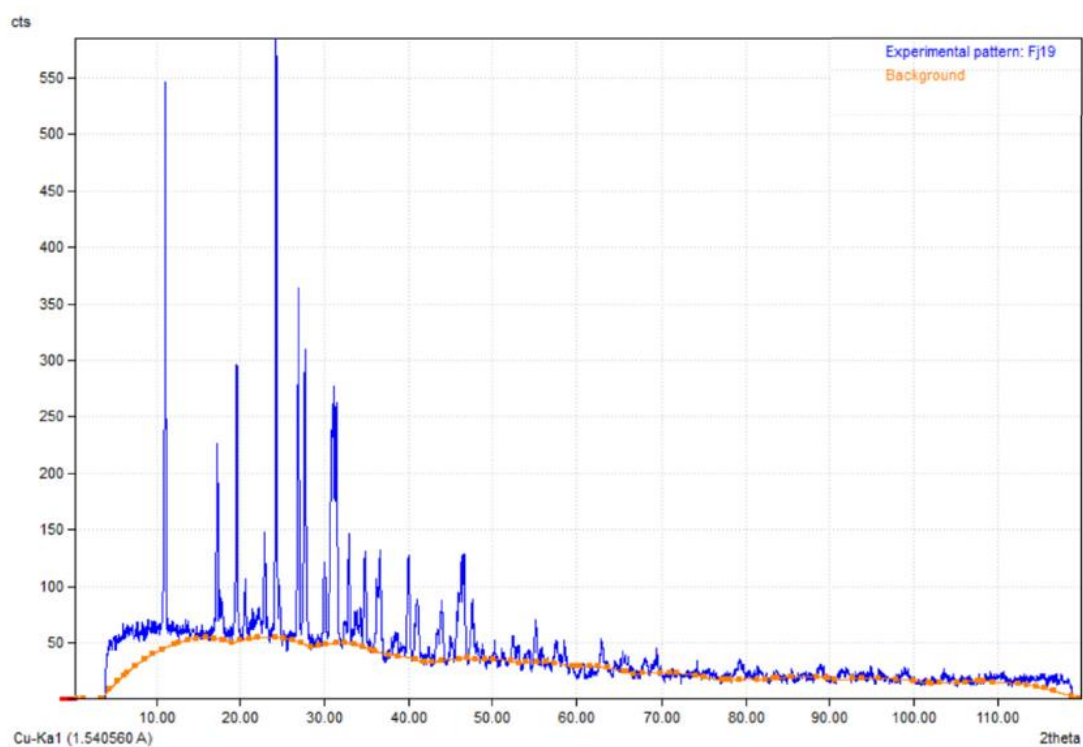
Hình PL-3.7.4. Phổ nhiễu xạ tia X của mẫu hỗn hợp vật lý BBR, HSPC, DSPG, SDC



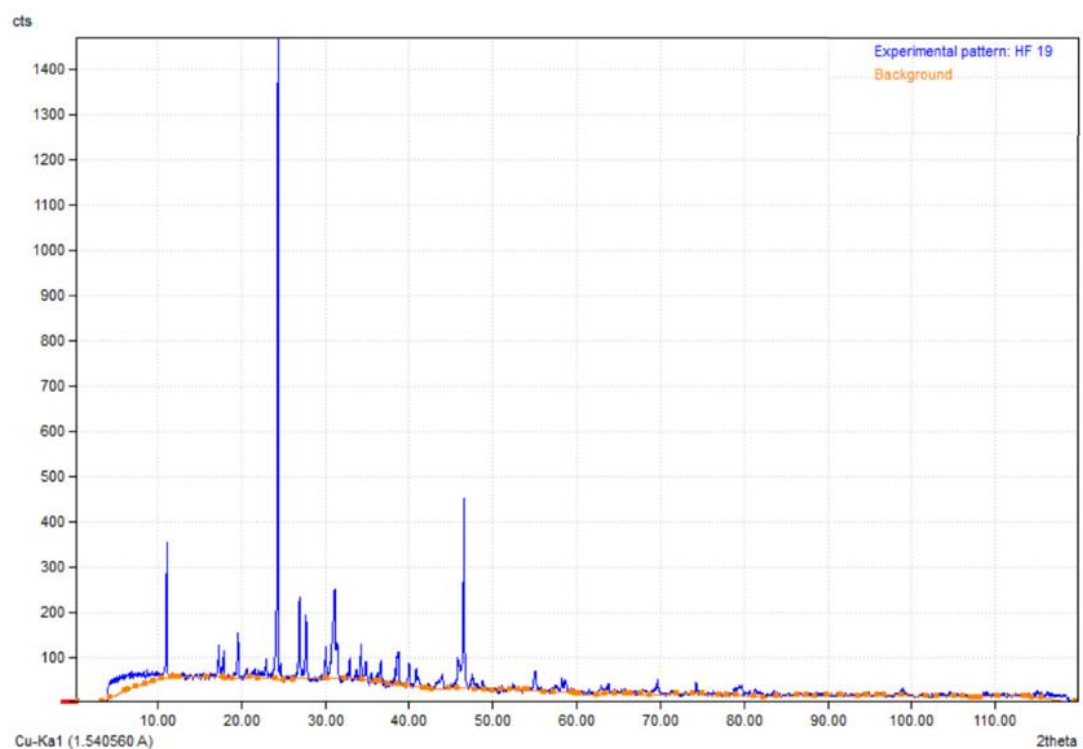
Hình PL-3.7.5. Phổ nhiễu xạ tia X của mẫu FH16



Hình PL-3.7.6. Phổ nhiễu xạ tia X của mẫu FJ16



Hình PL-3.7.7. Phổ nhiễu xạ tia X của mẫu FJ19



Hình PL-3.7.8. Phổ nhiễu xạ tia X của mẫu FH19

Phụ lục 3.8. Số liệu giải phóng dược chất từ liposome BBR mẫu FJ16, FJ19, FH16, FH19

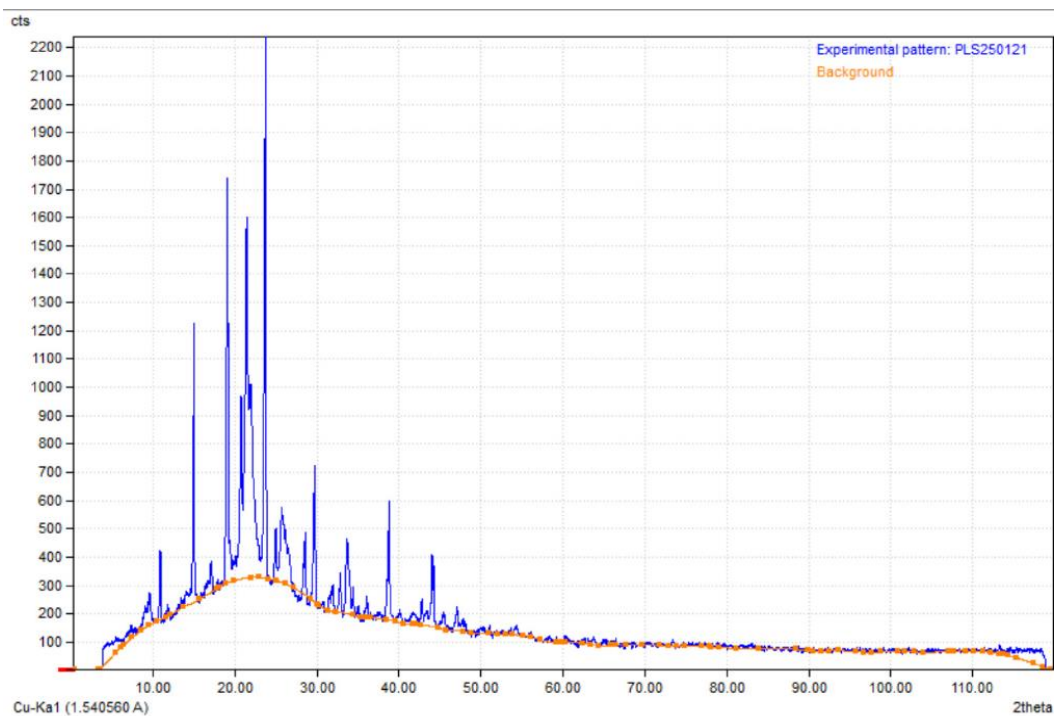
Bảng PL-3.8.1. Phần trăm giải phóng BBR từ liposome BBR FJ16, FH16

Thời gian (giờ)	% giải phóng trong môi trường pH 1,2		% giải phóng trong môi trường pH 4,5		% giải phóng trong môi trường pH 6,8	
	FJ16	FH16	FJ16	FH16	FJ16	FH16
0,25	18,12 ± 2,33	20,84 ± 5,83	19,01 ± 0,64	16,50 ± 0,93	19,01 ± 1,14	13,95 ± 3,27
0,5	33,08 ± 3,85	24,62 ± 1,26	31,30 ± 1,89	22,80 ± 2,19	32,25 ± 4,30	18,36 ± 1,35
1	48,58 ± 3,52	34,85 ± 1,24	47,20 ± 2,31	30,73 ± 1,05	49,77 ± 4,51	24,61 ± 2,26
2	68,99 ± 4,45	43,55 ± 1,18	66,46 ± 3,75	41,91 ± 1,81	66,34 ± 4,67	34,22 ± 2,37
3	77,31 ± 1,81	66,38 ± 4,64	77,26 ± 3,63	54,87 ± 4,45	78,28 ± 3,51	47,70 ± 4,50
4	84,04 ± 1,35	86,53 ± 3,37	86,23 ± 3,67	72,32 ± 5,64	86,32 ± 3,85	66,29 ± 3,62
6	88,07 ± 2,31	91,57 ± 4,86	90,37 ± 2,90	80,15 ± 3,71	88,22 ± 2,61	70,80 ± 4,23
8	90,31 ± 2,94	93,23 ± 5,17	92,47 ± 2,08	83,31 ± 5,97	90,69 ± 3,24	72,60 ± 5,06
10	93,68 ± 3,48	94,03 ± 4,65	94,35 ± 2,07	85,20 ± 5,05	93,14 ± 2,08	74,32 ± 4,91
12	96,26 ± 4,08	95,56 ± 5,12	97,07 ± 2,34	86,62 ± 5,72	97,07 ± 2,21	74,97 ± 4,47
24				91,67 ± 0,63		79,72 ± 3,35

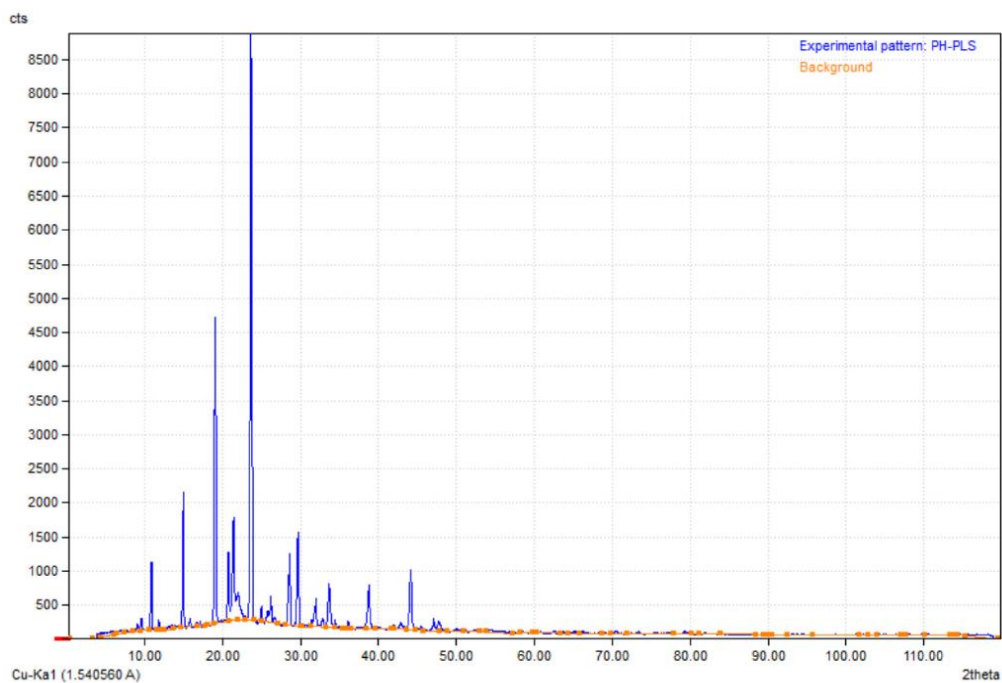
Bảng PL-3.8.2. Phần trăm giải phóng BBR từ liposome BBR FJ19, FH19

Thời gian (giờ)	% giải phóng trong môi trường pH 1,2		% giải phóng trong môi trường pH 4,5		% giải phóng trong môi trường pH 6,8	
	FJ19	FH19	FJ19	FH19	FJ19	FH19
0,25	22,81 ± 2,79	24,47 ± 0,08	19,77 ± 1,02	19,29 ± 0,71	21,38 ± 0,06	17,95 ± 2,72
0,5	35,29 ± 3,53	28,51 ± 0,23	31,73 ± 1,56	26,17 ± 1,17	33,62 ± 0,72	24,68 ± 2,60
1	51,83 ± 2,69	37,35 ± 1,24	48,35 ± 3,16	34,02 ± 1,31	50,47 ± 1,41	30,79 ± 1,28
2	69,55 ± 1,85	47,81 ± 0,63	69,88 ± 5,18	41,37 ± 2,28	71,55 ± 1,68	39,87 ± 3,20
3	79,04 ± 1,02	67,71 ± 1,21	80,51 ± 5,49	54,79 ± 2,51	81,81 ± 1,88	48,89 ± 1,84
4	85,97 ± 1,43	88,29 ± 0,47	87,96 ± 4,46	73,18 ± 2,40	88,09 ± 0,89	67,80 ± 4,24
6	91,22 ± 1,17	93,83 ± 0,96	92,01 ± 2,45	79,55 ± 1,12	91,38 ± 0,11	71,69 ± 1,00
8	94,16 ± 1,11	97,16 ± 2,04	95,69 ± 0,13	83,82 ± 0,01	94,00 ± 2,3	74,72 ± 1,70
10	97,80 ± 0,91	97,93 ± 1,07	98,26 ± 1,04	85,65 ± 0,36	96,00 ± 2,64	77,95 ± 2,02
12	98,34 ± 1,61	98,58 ± 1,44	98,72 ± 0,59	87,68 ± 0,40	98,16 ± 1,51	80,71 ± 1,40
24				92,41 ± 0,83		82,53 ± 1,15

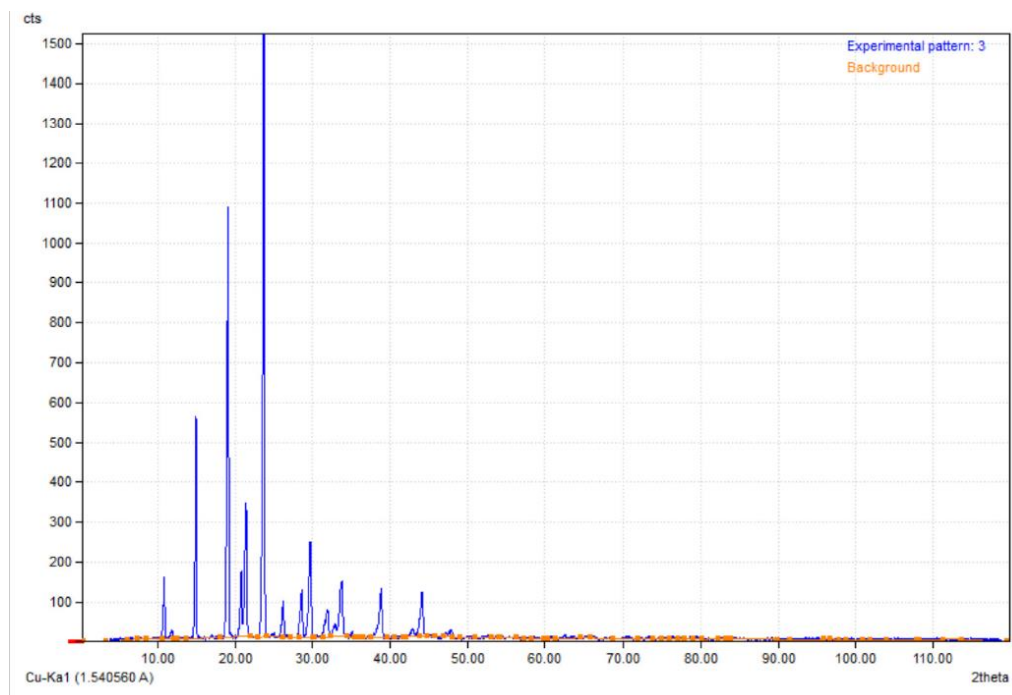
Phụ lục 3.9. Phổ nhiễu xạ tia X của mẫu proliposome FF19 và nguyên liệu manitol



Hình PL-3.9.1. Phổ nhiễu xạ tia X của mẫu proliposome FF19

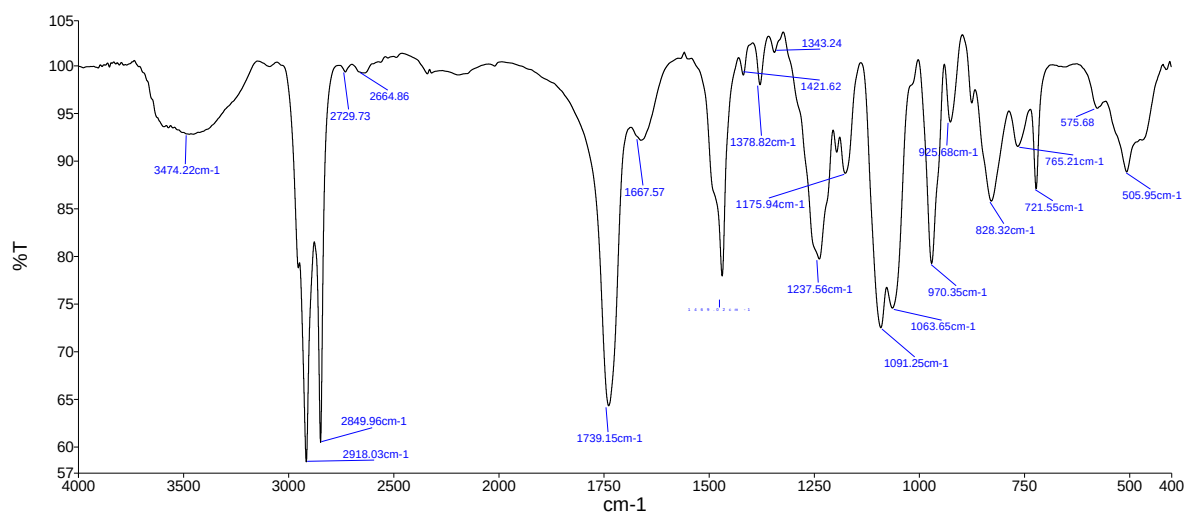


Hình PL-3.9.2. Phổ nhiễu xạ tia X của mẫu hỗn hợp vật lý của BBR, HSPC, DSPG, SDC, manitol

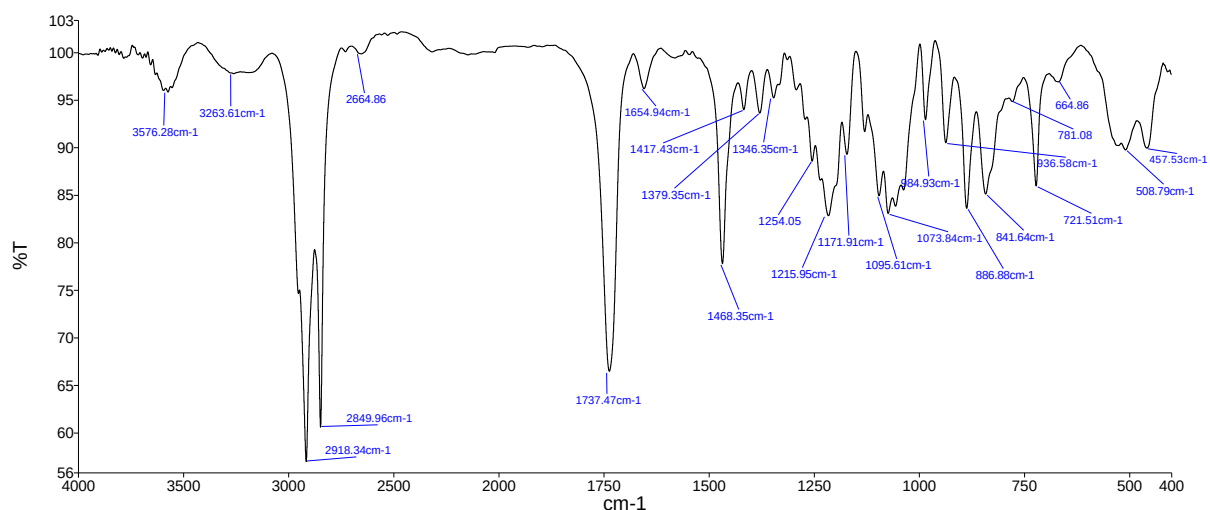


Hình PL-3.9.3. Phổ nhiễu xạ tia X của mẫu mannitol

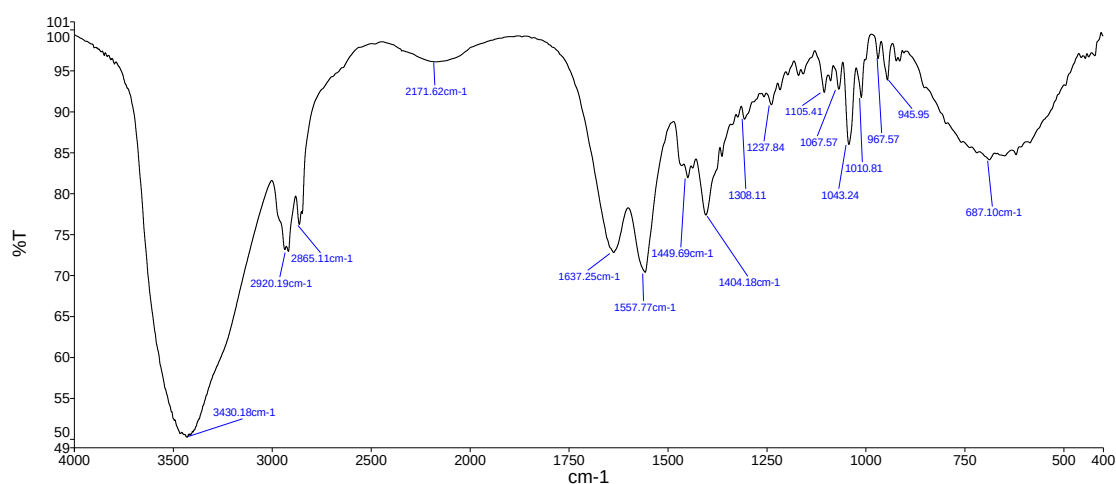
Phụ lục 3.10. Phổ hấp thụ hồng ngoại của HSPC, DSPG, SDC, MNT và proliposome BBR FF19-2.1



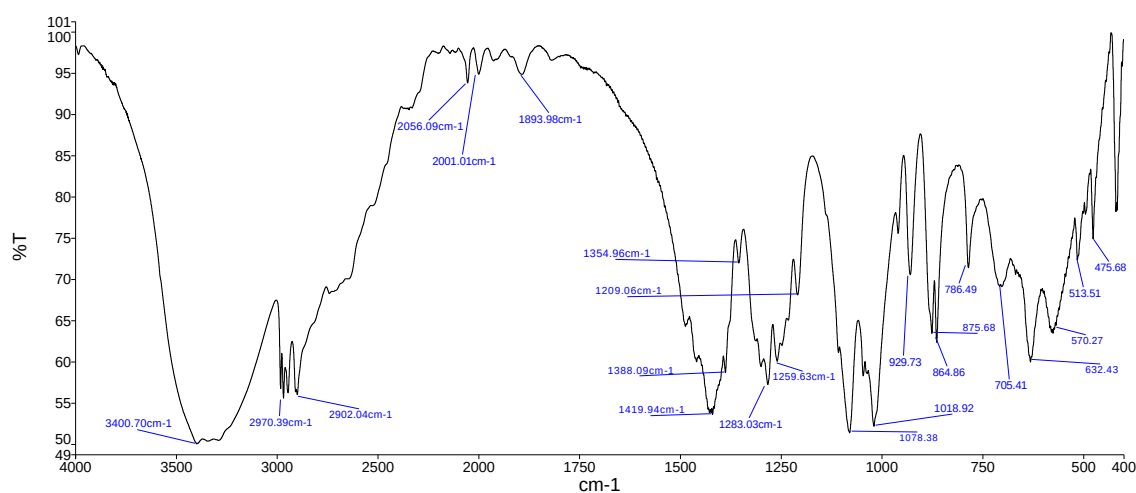
Hình PL-3.10.1. Phổ hấp thụ hồng ngoại của HSPC



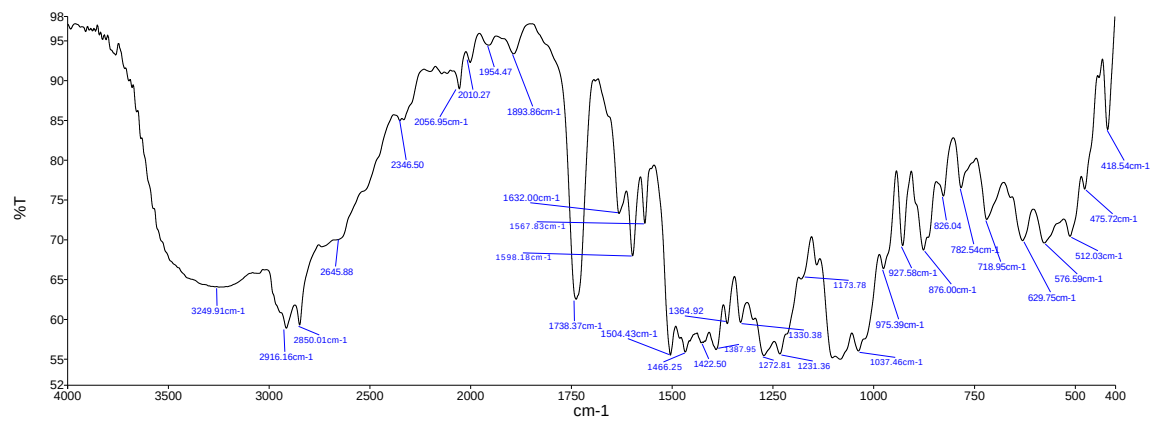
Hình PL-3.10.2. Phổ hấp thụ hồng ngoại của DSPG



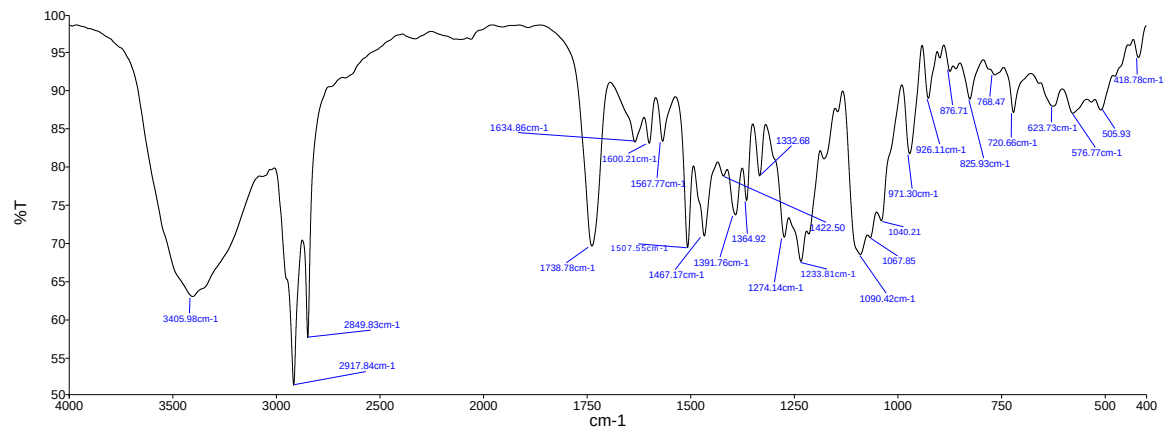
Hình PL-3.10.3. Phổ hấp thụ hồng ngoại của SDC



Hình PL-3.10.4. Phổ hấp thụ hồng ngoại của manitol

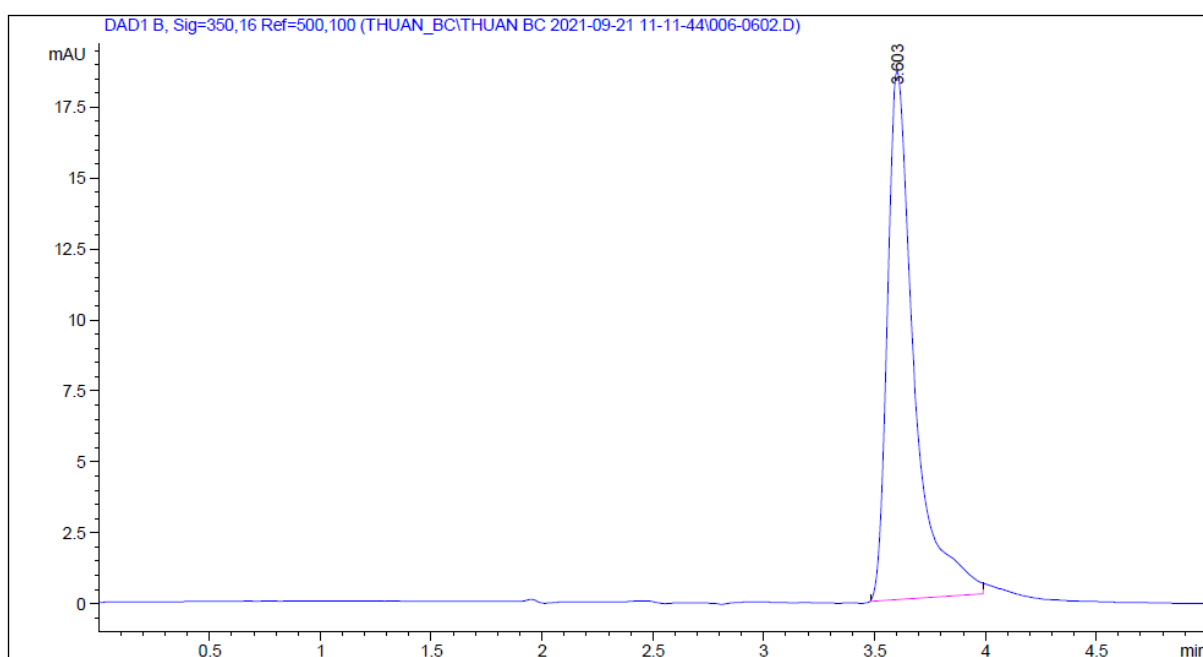


Hình PL-3.10.5. Phổ hấp thụ hồng ngoại của hỗn hợp vật lý BBR, HSPC, DSPG, SDC, manitol

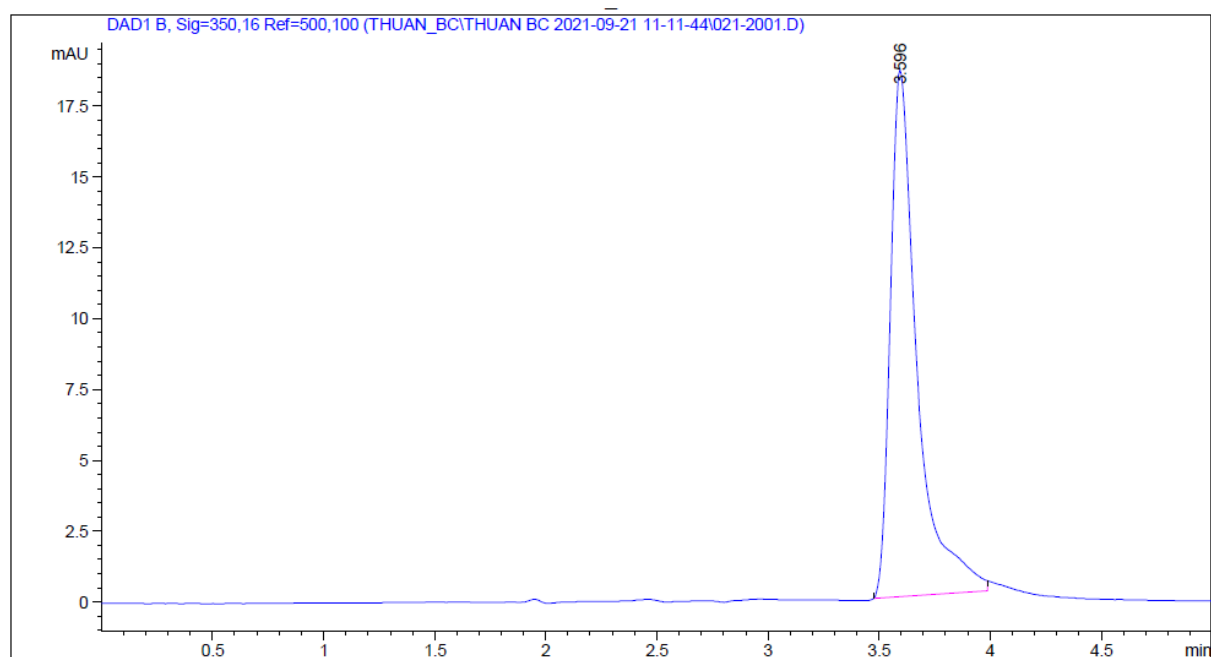


Hình PL-3.10.6. Phổ hấp thụ hồng ngoại của proliposome FF19-2.1

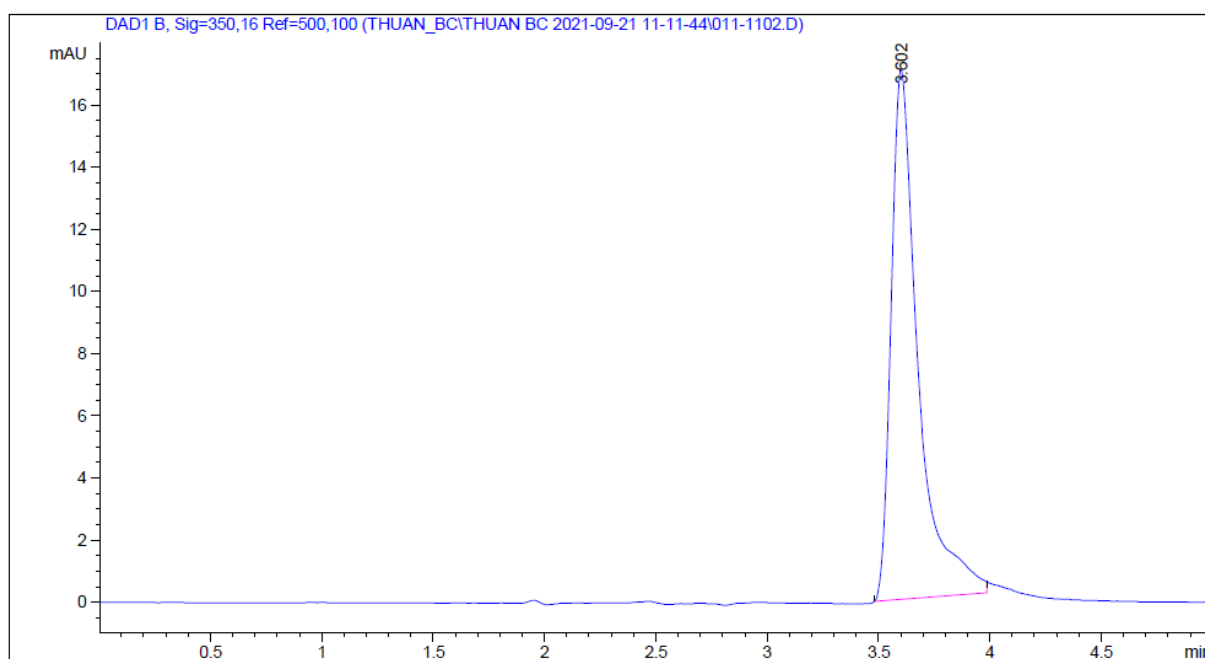
Phụ lục 3.11. Sắc ký đồ của BBR trong định lượng proliposome BBR bằng phương pháp HPLC sau 6 tháng bảo quản



A. Sắc ký đồ mẫu chuẩn



B. Sắc ký đồ mẫu thử bảo quản ĐKT



C. Sắc ký đồ mẫu thử bảo quản điều kiện LHCT

Hình PL-3.11. *Sắc ký đồ của berberin ở mẫu chuẩn (A), mẫu thử proliposome berberin sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện thực (B) và điều kiện LHCT (C).*

Phụ lục 3.12. Giải phóng dược chất của proliposome BBR sau thời gian 6 tháng bảo quản ở điều kiện thực và LHCT

Bảng PL-3.12.1 *Phần trăm giải phóng dược chất từ proliposome berberin trong môi trường acid HCl 0,1N sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện thực và LHCT.*

Thời gian (giờ)	Mỡ 1 (%)			Mỡ 2 (%)			Mỡ 3 (%)		
	Ban đầu	Thực	LHC T	Ban đầu	Thực	LHC T	Ban đầu	Thực	LHC T
0,25	6,48 ± 0,47	5,85± 0,73	7,27± 0,32	6,79 ± 0,89	6,81± 0,31	7,16 ± 0,27	5,98 ± 0,19	6,07± 0,56	6,52 ± 0,23
0,5	8,17 ± 0,57	8,37 ± 0,55	9,03 ± 0,46	8,32 ± 0,22	8,52 ± 0,32	8,57 ± 0,75	9,77± 0,23	7,58 ± 0,78	7,86 ± 0,45
1	11,52 ± 0,96	12,68 ± 0,52	12,56± 0,71	11,72 ± 0,56	12,83 ± 0,67	13,72 ± 0,56	11,40± 1,36	12,89 ± 0,52	14,24 ± 0,76
2	17,45 ± 1,05	17,87± 0,75	18,33 ± 0,67	16,57 ± 0,89	17,59 ± 0,74	19,54 ± 0,85	17,46 ± 0,33	19,91 ± 0,67	19,55 ± 0,53
3	20,85 ± 0,74	21,31± 1,23	21,09 ± 0,89	20,35± 1,21	21,13 ± 1,05	22,74 ± 1,17	22,20 ± 1,55	22,30 ± 1,73	23,42 ± 0,47
4	23,61 ± 1,22	24,63 ± 1,02	25,52 ± 0,92	23,71 ± 0,85	24,07 ± 0,72	25,45 ± 0,53	24,86 ± 1,42	24,15 ± 1,03	25,20 ± 1,73
6	28,65 ± 2,03	28,23 ± 1,28	30,12 ± 1,04	28,18± 0,46	29,42 ± 1,06	29,52 ± 0,46	27,41± 0,97	29,94 ± 2,01	30,03 ± 0,65
8	29,33 ± 1,56	31,36 ± 1,42	31,82 ± 1,13	30,86± 2,12	31,94 ± 1,36	32,10 ± 1,26	29,23± 1,94	30,67 ± 1,58	32,81 ± 0,92
10	35,77 ± 2,37	36,27 ± 1,63	36,02 ± 1,73	34,61± 2,46	35,49± 1,67	35,74 ± 1,24	33,04 ± 2,02	34,51± 1,73	35,76 ± 2,00
12	41,49 ± 1,65	43,45± 2,03	43,06 ± 1,32	40,02 ± 1,37	41,98± 2,03	43,93 ± 1,32	39,14 ± 0,86	41,48± 1,16	43,96 ± 1,24
24	47,32 ± 0,78	48,71± 0,35	49,96 ± 0,93	47,68 ± 0,75	48,27± 0,22	49,23 ± 1,02	47,50 ± 0,47	48,11± 0,63	48,36 ± 0,62

Bảng PL-3.12.2. Phần trăm giải phóng dược chất từ proliposome berberin trong môi trường đệm phosphate pH 4,5 sau 6 tháng bảo quản điều kiện thực và LHCT.

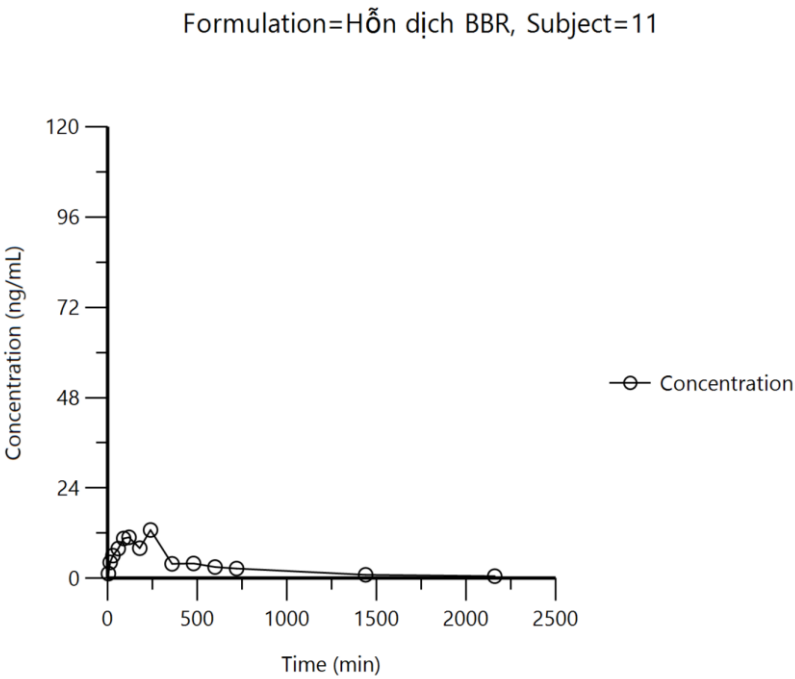
Thời gian (giờ)	Mỡ 1 (%)			Mỡ 2 (%)			Mỡ 3 (%)		
	Ban đầu	Thực	LHCT	Ban đầu	Thực	LHCT	Ban đầu	Thực	LHCT
0,25	17,44 ± 0,22	17,85 ± 0,34	19,35 ± 0,47	16,17 ± 0,82	16,81 ± 0,51	17,33 ± 0,75	16,89 ± 0,69	15,02 ± 0,44	15,82 ± 0,76
0,5	23,63 ± 0,52	24,40 ± 0,38	24,57 ± 0,61	24,27 ± 0,42	23,80 ± 0,57	24,42 ± 0,77	24,71 ± 0,68	25,93 ± 0,37	25,41 ± 0,48
1	37,24 ± 0,33	39,85 ± 0,41	40,45 ± 0,55	37,05 ± 0,58	36,44 ± 0,76	36,81 ± 0,85	36,17 ± 0,27	37,93 ± 0,66	38,50 ± 0,92
2	49,05 ± 1,09	48,75 ± 0,71	50,84 ± 0,77	51,11 ± 0,63	52,31 ± 0,55	52,41 ± 0,48	50,54 ± 1,36	52,21 ± 1,04	53,17 ± 0,85
3	62,29 ± 0,75	61,06 ± 1,07	63,89 ± 1,34	58,64 ± 1,12	60,05 ± 2,05	60,00 ± 2,21	59,02 ± 1,43	59,16 ± 1,78	62,20 ± 1,34
4	69,73 ± 0,94	71,35 ± 1,25	71,59 ± 0,63	71,53 ± 0,85	71,68 ± 1,02	72,56 ± 1,34	67,30 ± 2,11	68,40 ± 0,85	68,47 ± 0,88
6	71,08 ± 2,33	74,05 ± 0,57	74,45 ± 0,82	76,12 ± 0,73	77,86 ± 0,59	79,38 ± 1,98	79,31 ± 1,26	79,46 ± 0,44	80,21 ± 0,74
8	83,71 ± 1,54	83,60 ± 0,89	84,72 ± 1,08	79,26 ± 0,44	82,36 ± 0,66	85,08 ± 2,41	85,19 ± 1,79	87,36 ± 0,95	89,41 ± 0,63
10	85,84 ± 1,43	85,62 ± 0,76	86,86 ± 2,33	85,09 ± 0,93	85,94 ± 0,46	90,04 ± 3,43	87,69 ± 2,55	89,22 ± 1,29	92,57 ± 1,02
12	87,83 ± 0,45	87,23 ± 0,88	88,20 ± 0,54	88,20 ± 1,47	88,21 ± 0,55	94,02 ± 2,78	89,35 ± 1,23	92,12 ± 0,88	94,54 ± 1,13
24	98,25 ± 1,15	97,63 ± 1,22	98,09 ± 1,36	95,00 ± 0,88	95,66 ± 0,79	97,45 ± 1,74	98,73 ± 0,77	98,59 ± 0,56	98,88 ± 0,28

Bảng PL-3.12.3. Phần trăm giải phóng dược chất từ proliposome berberin trong môi trường đệm phosphate pH 6,8 sau 6 tháng bảo quản điều kiện thực và LHCT.

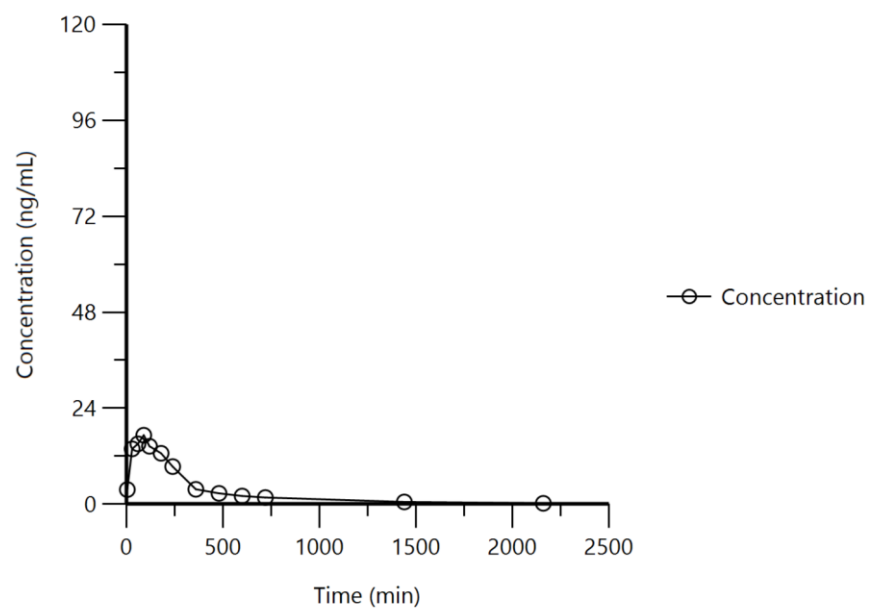
Thời gian (giờ)	Mẻ 1 (%)			Mẻ 2 (%)			Mẻ 3 (%)		
	Ban đầu	Thực	LHCT	Ban đầu	Thực	LHCT	Ban đầu	Thực	LHCT
0,25	14,07 ± 0,51	14,67 ± 0,33	14,36 ± 0,65	15,21 ± 0,38	15,40 ± 0,13	15,09 ± 0,42	12,79 ± 0,44	12,70 ± 0,55	15,11 ± 0,71
0,5	22,63 ± 0,67	21,62 ± 0,34	22,33 ± 0,49	21,56 ± 0,35	19,51 ± 0,71	20,64 ± 0,71	18,93 ± 0,62	17,40 ± 0,21	18,61 ± 0,54
1	32,30 ± 0,73	32,28 ± 0,12	33,00 ± 0,48	29,49 ± 0,42	28,04 ± 0,37	30,70 ± 0,29	29,22 ± 0,51	29,90 ± 0,79	29,57 ± 0,74
2	46,40 ± 1,23	46,66 ± 0,77	48,46 ± 1,65	44,21 ± 0,78	43,07 ± 0,53	44,82 ± 2,73	45,89 ± 0,69	49,19 ± 2,43	48,85 ± 0,73
3	57,12 ± 1,45	58,22 ± 1,23	59,18 ± 3,36	51,97 ± 0,41	50,00 ± 1,47	52,75 ± 1,09	53,35 ± 0,92	53,24 ± 0,61	52,85 ± 0,09
4	62,69 ± 3,63	63,80 ± 0,45	63,26 ± 0,52	59,50 ± 1,28	60,16 ± 2,76	62,80 ± 1,58	63,58 ± 1,49	64,14 ± 1,73	63,92 ± 0,79
6	67,43 ± 1,57	67,05 ± 1,43	68,00 ± 1,33	70,16 ± 2,83	69,95 ± 0,33	69,25 ± 1,85	69,25 ± 1,35	70,23 ± 0,67	73,71 ± 1,29
8	73,34 ± 2,48	76,17 ± 0,55	76,73 ± 1,05	72,58 ± 1,49	73,11 ± 0,78	73,30 ± 0,89	72,46 ± 0,83	76,87 ± 3,56	75,09 ± 2,11
10	77,76 ± 1,35	78,18 ± 0,79	78,62 ± 1,58	79,88 ± 0,73	80,33 ± 0,48	78,03 ± 1,45	77,33 ± 0,93	78,42 ± 2,35	79,12 ± 1,23
12	81,18 ± 1,13	82,09 ± 0,74	82,11 ± 0,96	80,91 ± 2,33	83,99 ± 2,37	84,52 ± 1,03	83,60 ± 2,93	85,22 ± 1,12	84,63 ± 2,23
24	86,13 ± 2,11	87,45 ± 2,35	87,85 ± 0,98	85,37 ± 1,83	87,78 ± 1,77	86,11 ± 0,79	85,68 ± 0,47	88,95 ± 1,07	88,83 ± 2,35

**PHỤ LỤC 4. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG CỦA LIPOSOME
BERBERIN**

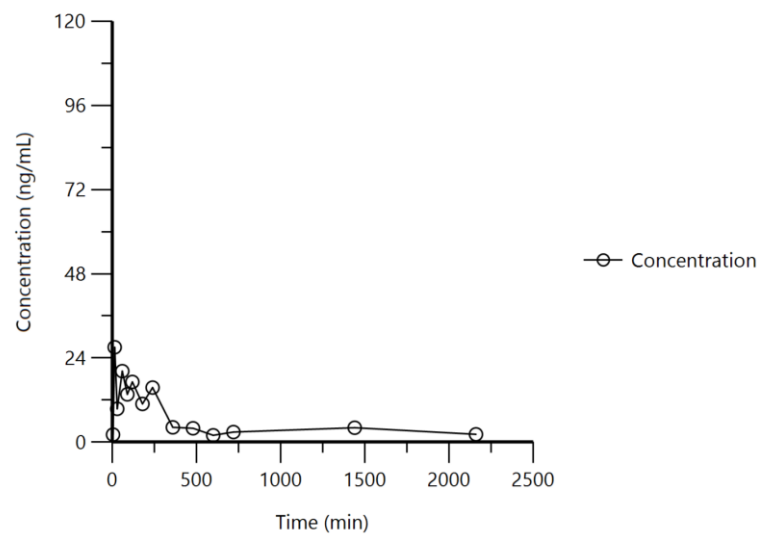
Phụ lục 4.1. Đồ thị biểu diễn nồng độ BBR theo thời gian của từng chuột trong mỗi nhóm nghiên cứu.



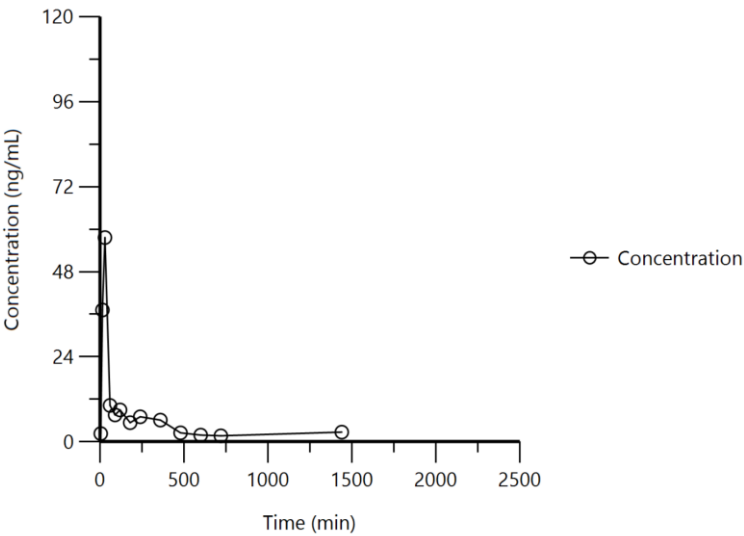
Formulation=Hỗn dịch BBR, Subject=12



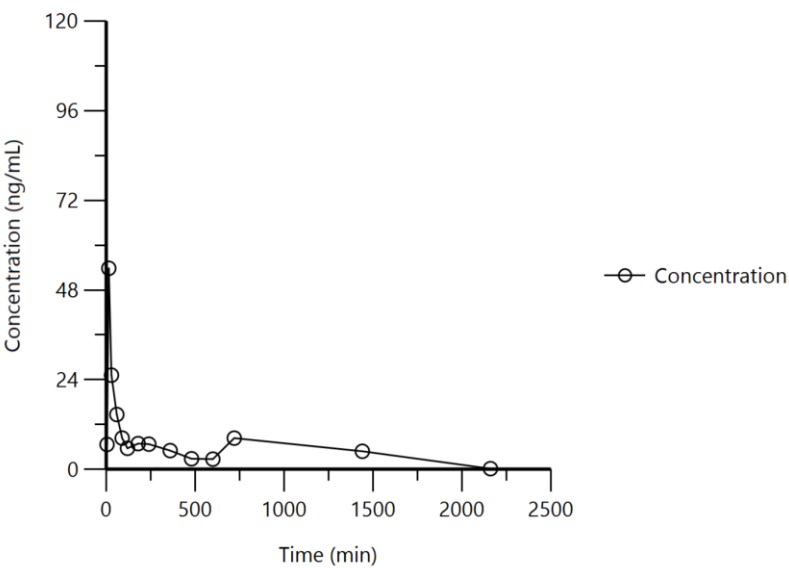
Formulation=Hỗn dịch BBR, Subject=14



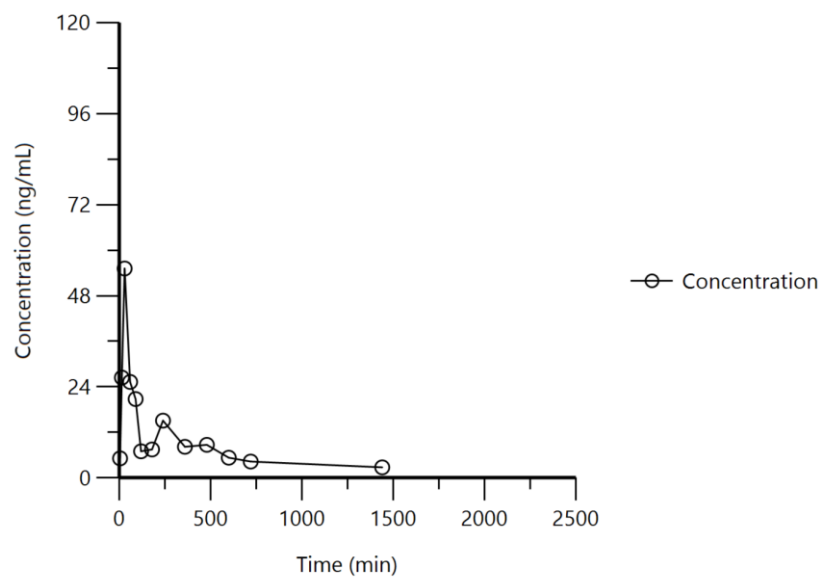
Formulation=Hỗn dịch BBR, Subject=15



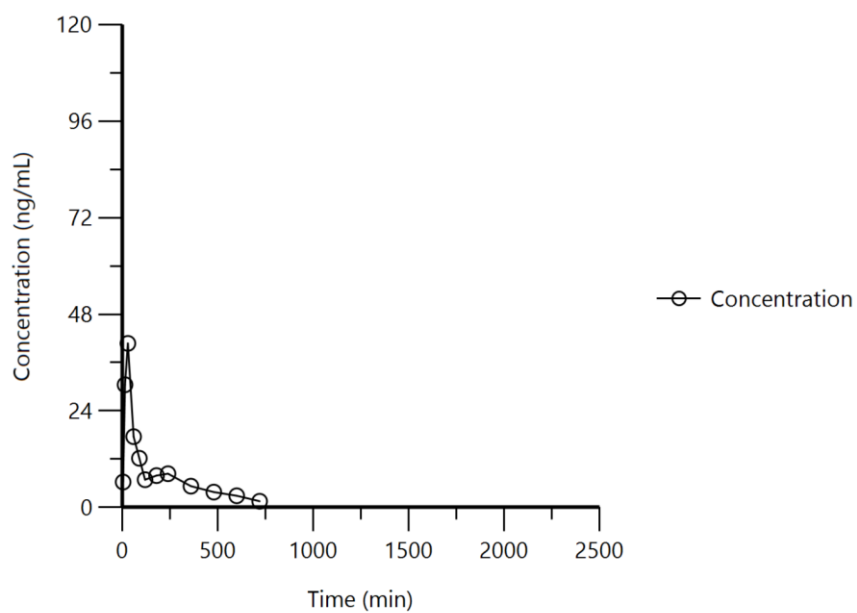
Formulation=Hỗn dịch BBR, Subject=18



Formulation=Hỗn dịch BBR, Subject=19

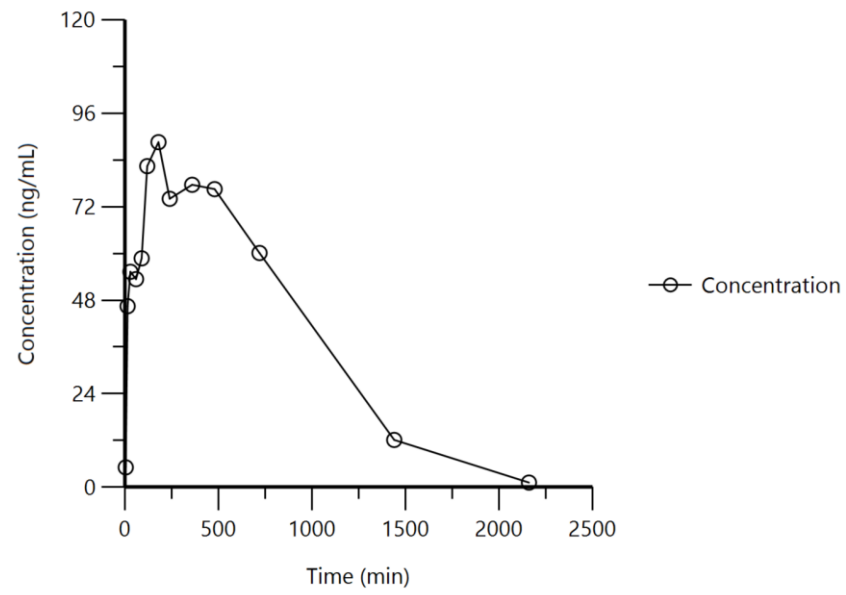


Formulation=Hỗn dịch BBR, Subject=20

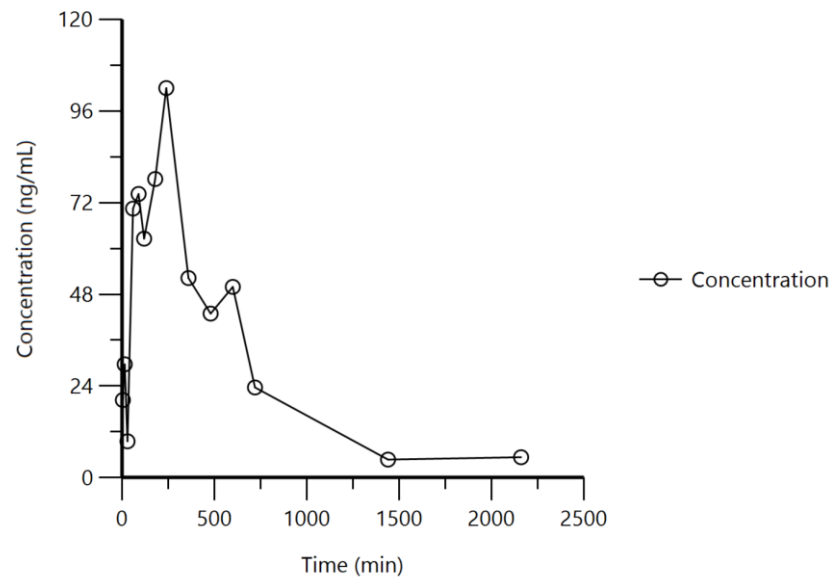


Hình PL-4.1.1. Đồ thị biểu diễn nồng độ BBR trong huyết tương theo thời gian của nhóm chuột uống hỗn dịch quy ước BBR

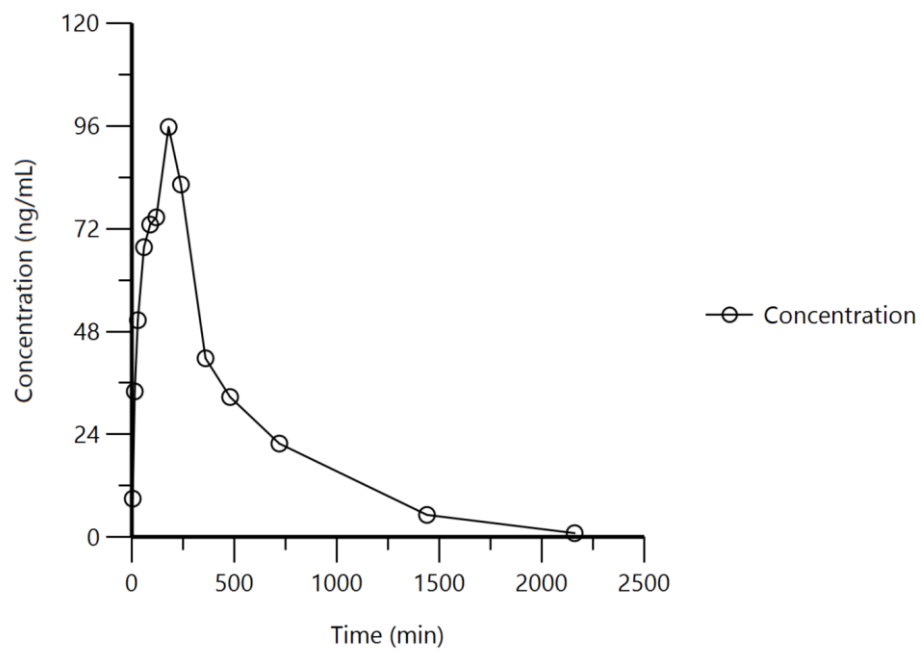
Formulation=Liposome BBR, Subject=1



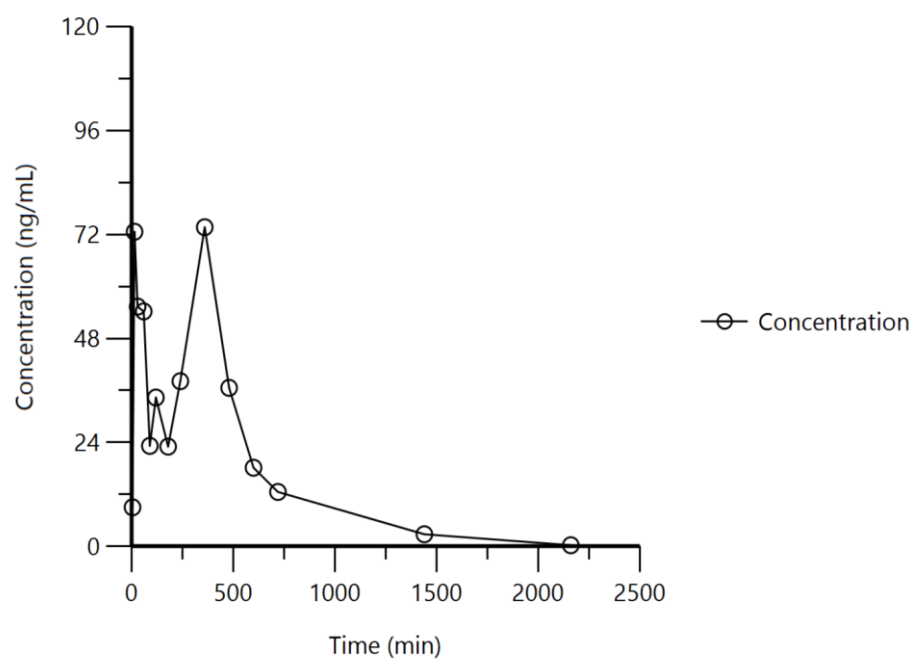
Formulation=Liposome BBR, Subject=3



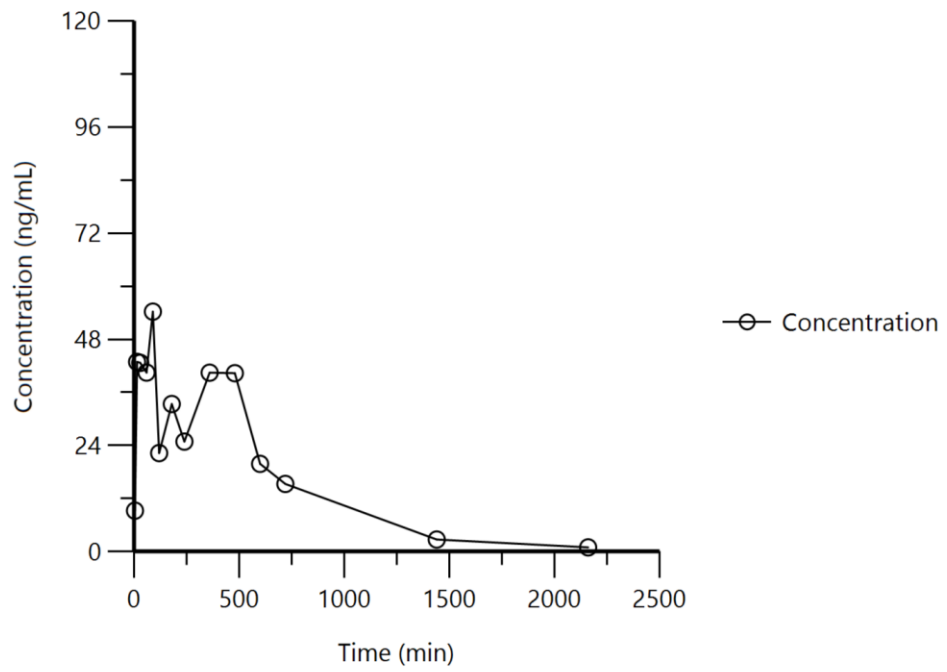
Formulation=Liposome BBR, Subject=5



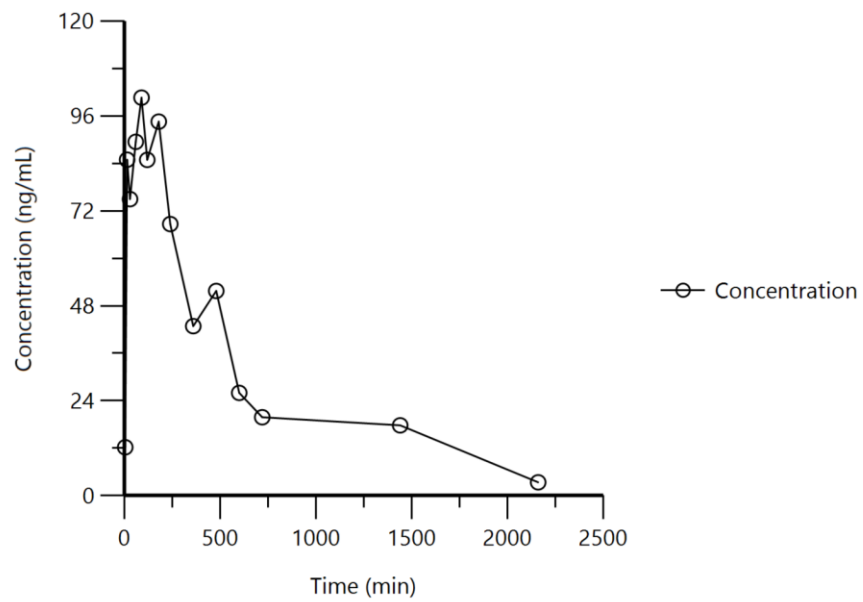
Formulation=Liposome BBR, Subject=7



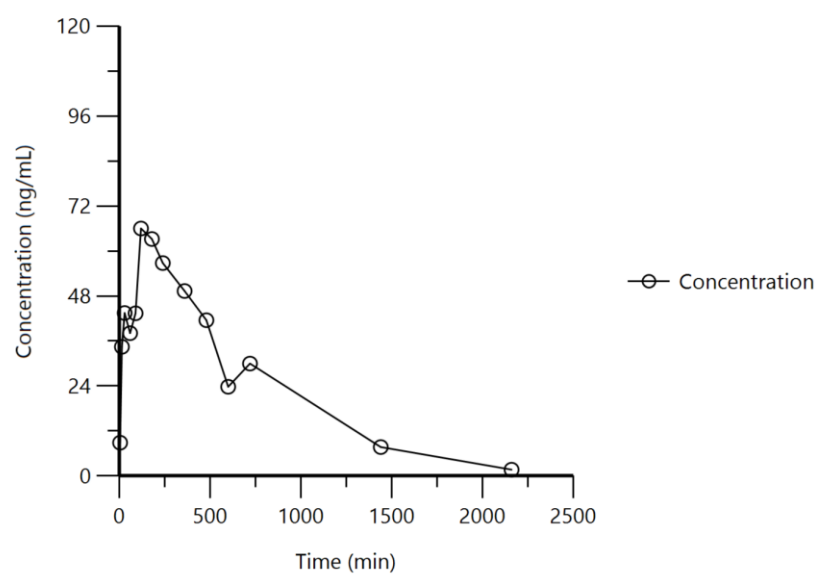
Formulation=Liposome BBR, Subject=8



Formulation=Liposome BBR, Subject=9



Formulation=Liposome BBR, Subject=10



Hình PL-4.1.2. Đồ thị biểu diễn nồng độ BBR trong huyết tương theo thời gian của nhóm chuột uống liposome BBR

Phụ lục 4.2. Kết quả phép phân tích one-way theo công thức cho giá trị T_{max} .

Tmax - Oneway of Tmax (min) by Formulation

