

NGHIÊN CỨU BẢO CHẾ HỆ VI NHŨ TƯƠNG TỰ NHŨ HÓA CHỨA CAO CHIẾT LINH CHÍ GIÀU TRITERPENOID

Phan Hoàng Long¹, Phan Nguyễn Trường Thắng², Trần Việt Hùng², Trương Công Trí¹,
Trần Cao Thụy Hạ Lan^{1,*}

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh;

²Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh

*Email: tcthlan.ckicqld20@ump.edu.vn

(Nhận bài ngày 25 tháng 7 năm 2022)

Tóm tắt

Triterpenoid chiết xuất từ nấm linh chi mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe như hạ lipid máu, chống oxy hóa, ngăn ngừa chống các khối u và cải thiện tình trạng suy giảm trí nhớ. Để khắc phục khả năng hấp thu kém của triterpenoid, đề tài hướng tới việc nghiên cứu bào chế hệ vi nhũ tương tự nhũ hóa (SMEDDS) chứa cao chiết linh chi giàu triterpenoid (TGE-SMEDDS). TGE-SMEDDS được điều chế dựa trên giản đồ ba pha, với propylene glycol monocaprylate là pha dầu, Kolliphor RH40 và Tween 80 là các chất diện hoạt, polyethylen glycol 400 là chất đồng diện hoạt/đồng dung môi. Công thức TGE-SMEDDS được chọn lựa có hàm lượng triterpenoid toàn phần cao, bền nhiệt động học và dễ dàng phân tán tạo vi nhũ tương có kích thước trung bình dưới 300 nm trong các môi trường pH tương tự pH sinh lý đường uống khi đưa vào cơ thể. Nghiên cứu tạo TGE-SMEDDS làm tiền đề tiếp tục phát triển sản phẩm nano linh chi giàu triterpenoid, giúp nâng cao hiệu quả trị liệu từ cao chiết linh chi giàu triterpenoid.

Từ khóa: *Acid ganoderic A, G. lucidum, Vi nhũ tương, SMEDDS, Triterpenoid.*

Summary

Preparation of Self-Microemulsifying Drug Delivery System Containing Triterpenoid-Rich *Ganoderma lucidum* Extract

Triterpenoids extracted from *Ganoderma lucidum* (*G. lucidum*) provide various health benefits, such as lipid-lowering, antioxidant, anti-tumor effects, and improving memory impairment. To overcome the poor absorption of triterpenoids, this study aimed to develop a self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) containing triterpenoid-rich *G. lucidum* extract (TGE-SMEDDS). TGE-SMEDDS were prepared from propylene glycol monocaprylate as oily phase, Kolliphor RH 40 and Tween 80 as surfactants, and polyethylene glycol 400 as co-surfactant/co-solvent utilizing the pseudo-ternary phase diagram. The selected TGE-SMEDDS formulation has a high total triterpenoid content, thermodynamic stability, and fast dispersion to form microemulsions under 300 nm in average size in physiological pH conditions. The research is the initial basis for further development of triterpenoid-rich *G. lucidum* nanopharmaceuticals to improve the therapeutic efficacy of triterpenoid-rich *G. lucidum* extract.

Keywords: *G. lucidum, Ganoderic acid A, Microemulsion, SMEDDS, Triterpenoid.*

1. Đặt vấn đề

Nghiên cứu và phát triển các sản phẩm từ dược liệu là một trong những hướng phát triển chiến lược của ngành Dược Việt Nam hiện nay. Nấm linh chi được sử dụng nhiều trong ngành Dược nhờ có nhiều bằng chứng khoa học về lợi ích sức khỏe của dược liệu quý này trên thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng. Thành phần triterpenoid trong linh chi đã được chứng minh có tác dụng hạ lipid máu, chống oxy hóa, hỗ trợ điều trị khối u và cải thiện tình trạng suy giảm trí nhớ [1]. Tuy nhiên, triterpenoid có tính tan và tính bền kém dẫn đến sinh khả dụng không ổn định [2]. Hiện nay, hệ vi nhũ tương tự nhũ hóa (SMEDDS) trở thành một giá mang tiềm năng để cải thiện sinh khả dụng của các chiết xuất từ dược liệu có khả năng hấp thu kém [3]. SMEDDS có cấu trúc là một hỗn hợp đồng nhất, ổn định, chứa các thành phần dược chất, dầu, chất diện hoạt, chất đồng diện hoạt và chất đồng

dung môi [4]. Khi SMEDDS được phân tán trong môi trường dịch tiêu hóa, dưới sự co bóp của dạ dày và nhu động của ruột, sẽ tự nhũ hóa tạo ra cấu trúc vi nhũ tương (VNT) kiểu dầu trong nước. Chính vì vậy, đề tài hướng tới nghiên cứu bào chế TGE-SMEDDS cải thiện tính tan, tính bền và sinh khả dụng của chiết xuất từ nấm linh chi.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Cao linh chi giàu triterpenoid (TGE) ($\geq 2\%$ triterpenoid toàn phần, HPLC) được cung cấp bởi Viện Kiểm Nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh. Peceol, Labrafac PG, Lauroglycol 90, Propylen glycol monocaprylat (PGM), Labrafac lipophile WL 1349, Labrafil® M 1944 CS được cung cấp bởi Gattefossé (Pháp). Kolliphor RH40 được cung cấp từ BASF SE (Đức) và Tween 80 được cung cấp từ Seppic (Pháp). Polyethylene glycol 400 (PEG 400) được cung cấp từ Himedia (Ấn độ). Hóa chất khác dùng trong nghiên cứu đều đạt tiêu chuẩn phân tích.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát tính tan của TGE trong các tá dược

Hòa tan từng lượng xác định TGE vào trong 5,0 g tá dược bằng máy khuấy từ ở tốc độ 500 vòng/phút, nhiệt độ $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ và áp suất khí quyển, đến khi đạt được ngưỡng nồng độ bão hòa trong thời gian 24 giờ. Tính lượng TGE hòa tan trong tá dược hoặc dung môi bằng cách tính tổng lượng TGE đã thêm vào trước khi đạt điểm bão hòa. Thực hiện 3 lần, lấy kết quả trung bình.

Nghiên cứu thiết lập vùng tạo VNT trong giản đồ 3 pha

Phối hợp các thành phần dầu, chất diện hoạt và chất đồng diện hoạt với các tỉ lệ khác nhau. Sau đó, các công thức khảo sát được pha loãng với nước cất tỉ lệ 1:20 (tt/tt). Vùng tạo VNT trên giản đồ 3 pha được thiết lập từ các công thức bền nhiệt động học và khi phân tán trong nước hình thành VNT trong suốt hoặc xanh nhẹ trong vòng 1 phút ở tốc độ khuấy 100 vòng/phút.

Nghiên cứu thiết lập công thức bào chế và quy trình điều chế TGE-SMEDDS

Các giá mang SMEDDS trong vùng tạo VNT được lựa chọn để tiến hành tải 80 mg TGE.

Hòa tan TGE vào trong pha dầu có chứa một phần PEG, và chuẩn bị pha thân nước chứa chất diện hoạt, đồng diện hoạt. Phối hợp từ từ pha thân dầu vào trong pha thân nước ở tốc độ khuấy 500 vòng/phút trong vòng 15 phút ở nhiệt độ phòng để tạo hỗn hợp đồng nhất.

Nghiên cứu tăng khả năng tải TGE

Lần lượt tăng lượng TGE trong công thức lên 100 mg, 120 mg và đánh giá các tính chất hóa lý của các hệ phân tán.

Phân tích các tính chất hóa lý của TGE-SMEDDS

Phân tích đánh giá dựa trên các chỉ tiêu: cảm quan, khả năng phân tán trong nước cất và các môi trường phù hợp với môi trường pH

sinh lý bên trong cơ thể như pH 1,2 (pH dịch dạ dày), pH 4,5 (pH giữa dạ dày-ruột), pH 6,8 (pH dịch ruột), độ bền dưới lực ly tâm (10000 vòng/phút trong 15 phút), thử nghiệm chu trình nóng - lạnh (6 chu kỳ, nhiệt độ nóng ở 45°C và lạnh ở 4°C , mỗi chu kỳ 48 giờ), chu trình đông - rã đông (6 chu kỳ, đông ở -10°C và rã đông ở 30°C , mỗi chu kỳ 48 giờ), kích thước tiểu phân và thế zeta (Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600), pH, độ nhớt.

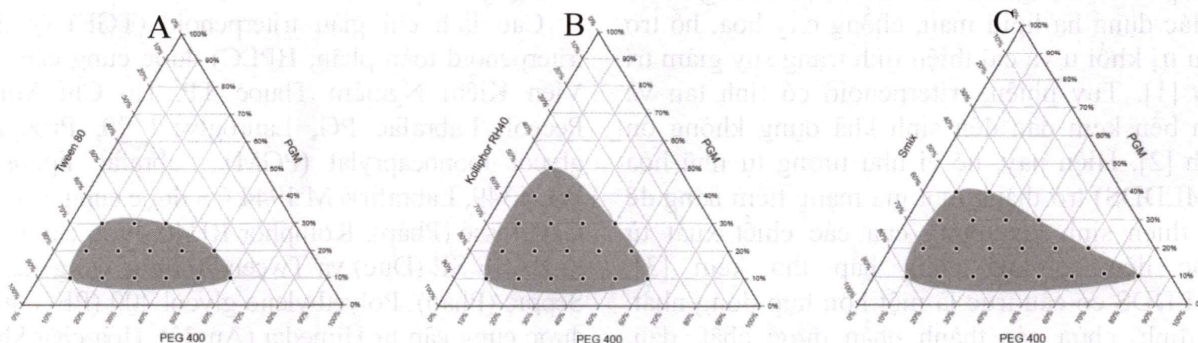
Định tính và định lượng triterpenoid toàn phần trong TGE-SMEDDS: Mẫu thử được hòa tan trong ethanol tuyệt đối, sau đó lọc qua màng lọc millipore $0,45 \mu\text{m}$ trước khi tiêm vào hệ thống HPLC. Điều kiện sắc ký: cột C_{18} ($150 \times 4,6 \text{ mm}$; $3,5 \mu\text{m}$); tốc độ dòng: 1 ml/phút; nhiệt độ cột: 25°C ; đầu dò UV 257 nm; pha động gradient: acid acetic 0,1% (A)- acetonitril (B). Chương trình chạy: bắt đầu, A:B, 80:20% v/v; 0 - 3 phút, % v/v của B tăng lên 26,5%; 3 - 34 phút, giữ nguyên; 34 - 52 phút, % v/v của B tăng lên 38,5%; 52 - 53 phút, % v/v của B giảm xuống 20%; 53 - 65 phút, giữ nguyên.

3. Kết quả nghiên cứu & bàn luận

Khảo sát tính tan của TGE trong các tá dược

TGE khó tan trong nước và hầu hết các tá dược lipid thử nghiệm. Các dầu tổng hợp Peceol, PGM, Lauroglycol 90 cho độ tan tốt hơn các dầu tự nhiên (dầu gấc, dầu nành, dầu dừa, dầu olive, dầu mè). Trong đó, PGM có kết quả độ tan cao nhất ($37,5 \pm 2,9 \text{ mg/g}$), nên được chọn làm pha dầu. TGE tan tốt trong Tween 80 ($988,2 \pm 3,8 \text{ mg/g}$), Kolliphor RH40 ($1008,4 \pm 4,2 \text{ mg/g}$) và PEG 400 ($1404,3 \pm 5,1 \text{ mg/g}$), nên các chất này được lựa chọn là chất diện hoạt, chất đồng diện hoạt/ đồng dung môi trong quá trình thiết lập công thức bào chế.

Nghiên cứu thiết lập vùng tạo VNT trong giản đồ 3 pha



Hình 1. Giản đồ 3 pha của PGM, PEG 400 và Tween 80 (A), Kolliphor RH40 (B) và Smix (C) (Vùng tạo VNT màu xám)

Tiến hành thiết lập vùng tạo VNT trong các giản đồ 3 pha với pha dầu là PGM, chất đồng diện hoạt/ đồng dung môi là PEG 400 và chất diện hoạt lần lượt là Tween 80, Kolliphor RH40 và Smix (Kolliphor RH40:Tween80=1:1) (Hình 1).

Nghiên cứu thiết lập công thức bào chế và quy trình điều chế TGE-SMEDDS

Các giá mang SMEDDS được lựa chọn dựa trên các vùng tạo VNT A, B, C và các tài liệu

liên quan đến tính an toàn của các thành phần tá dược [5], đặc biệt các chất diện hoạt có khả năng gây kích ứng đường tiêu hóa khi sử dụng lượng lớn [6]. Ngoài ra, tỷ lệ cao PEG 400 trong công thức có thể ảnh hưởng đến chất lượng vỏ gelatin của viên nang mềm [7]. Sau quá trình thử nghiệm sàng lọc các công thức trong vùng tạo VNT, đề tài tiếp tục khảo sát trên 05 công thức tiềm năng L1 - L5 có khả năng tải 80 mg TGE (Bảng 1).

Bảng 1. Thành phần và kết quả đánh giá tính chất hóa lý công thức L1 - L5

Thành phần / Thử nghiệm	L1	L2	L3	L4	L5
TGE	80	80	80	80	80
PGM	80	80	80	80	80
PEG 400	80	160	200	160	160
Tween 80	240	160	120	0	80
Kolliphor RH40	0	0	0	160	80
Tổng cộng	480 mg				
Cảm quan	Tất cả các mẫu thể chất lỏng, đồng nhất, mùi đặc trưng				
Độ bền dưới lực ly tâm	Tách lớp	L2-5 ổn định, không tách lớp			
Thời gian tự nhũ (phút)	Không nhũ hóa hoàn toàn sau 15 phút	Không nhũ hóa hoàn toàn sau 15 phút	Không nhũ hóa hoàn toàn sau 15 phút	2 - 3 phút	< 1 phút
Độ bền sau 6 tiếng phân tán	Đục	Trong mờ	Đục	Trong	Trong

Đối với các công thức chỉ sử dụng Tween 80 làm chất diện hoạt, L1 có hiện tượng tách lớp TGE sau khi ly tâm, nhưng không xảy ra ở L2 và L3 khi tỷ lệ PEG 400 tăng dần. Liên quan đến khả năng phân tán, L3 kém hơn so với L1 và L2, do tỷ lệ Tween 80 thấp và tỷ lệ PEG 400 cao. Khi phân tán vào nước, PEG 400 có xu hướng khuếch tán ra pha nước làm TGE bị kết tập, xuất hiện tiểu phân kích thước lớn. L2 vẫn chưa nhũ tương hóa hoàn toàn lượng

TGE khi phân tán vào nước. Do đó, lần lượt thay Tween 80 thành Kolliphor RH40 (công thức L4) và Smix (công thức L5), với tỷ lệ các thành phần khác giữ nguyên như L2. Kết quả cho thấy L4 và L5 có khả năng nhũ hóa hoàn toàn lượng TGE khi phân tán vào môi trường nước, nhưng thời gian tự nhũ của L4 cao (khoảng 3 phút), còn L5 nhũ hóa nhanh hơn (dưới 1 phút). Tiến hành đo dãy phân bố kích thước và thế zeta của L2, L4 và L5 (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả về kích thước tiểu phân và thế zeta của công thức L2, L4 và L5

Chỉ tiêu	L2	L4	L5
Kích thước trung bình (nm)	305,5 ± 0,6	210,2 ± 7,7	154,6 ± 2,4
Kiểu phân bố	2 đỉnh	3 đỉnh	1 đỉnh
Hệ số đa phân tán (PDI)	0,519 ± 0,011	0,594 ± 0,112	0,216 ± 0,017
Thế zeta (mV)	-29,4 ± 1,2	-28,2 ± 0,5	-35,1 ± 0,7

Kết quả cho thấy kích thước tiểu phân trung bình của L5 thấp nhất (154,6 ± 2,4) và chỉ có L5 cho dãy phân bố 1 đỉnh với chỉ số PDI thấp nhất (0,216 ± 0,017). Do đó, khả năng phân tán tạo VNT của hỗn hợp chất diện hoạt tốt hơn sử dụng 1 chất diện hoạt. Kết quả thế zeta của L5 thấp nhất (-35,1 ± 0,7), cho thấy hệ tiểu phân có sự ổn định về mặt điện thế bề mặt, giúp hệ phân tán ổn

định nhờ tương tác đẩy tĩnh điện kết hợp với tạo sự cản trở không gian bề mặt khi phân tán vào môi trường nước. Công thức L5 đạt các chỉ tiêu về độ ổn định vật lý và có khả năng phân tán tốt tạo VNT ổn định.

Nghiên cứu tăng khả năng tải TGE

Tiến hành điều chế công thức L6 và L7 với hàm lượng TGE tăng lên 100 mg và 120 mg (Bảng 3).

Bảng 3. Thành phần và kết quả đánh giá tính chất hóa lý công thức L5, L6 và L7

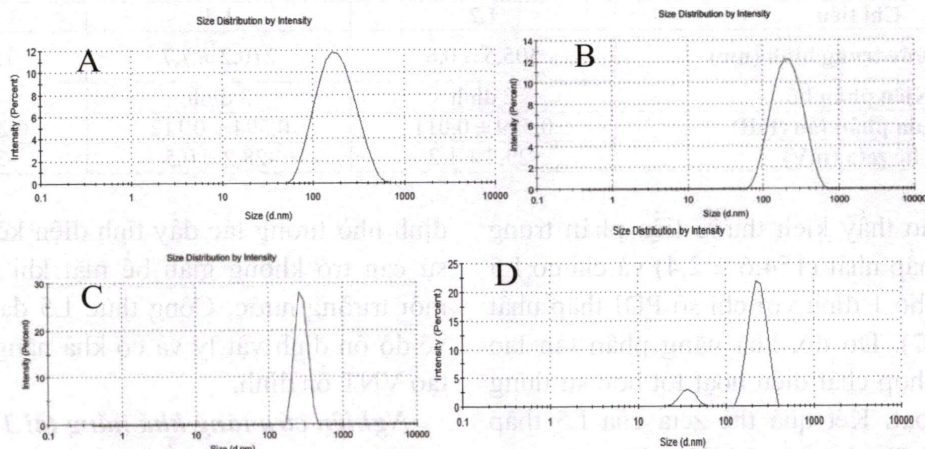
Thành phần/Thử nghiệm	L5	L6	L7
TGE	80	100	120
PGM	80	80	80
PEG 400	160	140	120
Tween 80	80	80	80
Kolliphor RH40	80	80	80
Tổng cộng	480 mg		
Cảm quan	Tất cả các mẫu thể chất lỏng, đồng nhất, mùi đặc trưng		
Đổ bền dưới lực ly tâm	L5-7 ổn định, không tách lớp		
Thời gian tự nhũ (phút)	< 1 phút	< 2 phút	Không nhũ hóa hoàn toàn sau 15 phút
Kích thước trung bình (nm)	154,6 ± 2,4	183,2 ± 3,9	202,5 ± 3,8
Kiểu phân bố (đỉnh)	1 đỉnh	1 đỉnh	2 đỉnh
Hệ số đa phân tán (PDI)	0,216 ± 0,017	0,256 ± 0,092	0,304 ± 0,070
Thế zeta (mV)	-35,1 ± 0,7	-31,7 ± 0,9	-29,3 ± 1,3
Chu trình nóng - lạnh (06 chu kỳ)	Ổn định	Ổn định	Ổn định
Chu trình đông - rã đông (06 chu kỳ)	Ổn định	Ổn định	Tách lớp

L6, L7 vẫn tải được thêm lượng TGE, không bị tách lớp cao sau khi ly tâm. Tuy nhiên, L7 bị tách lớp khi thử nghiệm chu trình đông - rã đông và không nhũ hóa hoàn toàn lượng TGE khi phân tán. L6 đạt các yêu cầu về độ ổn định và khả năng phân tán tạo VNT, nhưng có sự gia tăng về kích thước tiểu phân trung bình so với L5. Do đó, đề tài giữ nguyên mức tải 80 mg TGE nhằm đảm bảo khả năng phân tán tạo VNT ổn định trong quá trình sản xuất, bảo quản và lưu thông phân phối sau này trên thị trường. Chính vì vậy, L5 được nghiên cứu và phân tích thêm các tính chất hóa lý khác như khả năng phân tán vào các môi trường pH khác nhau phù hợp với pH sinh lý, pH, độ nhớt, định tính và định lượng.

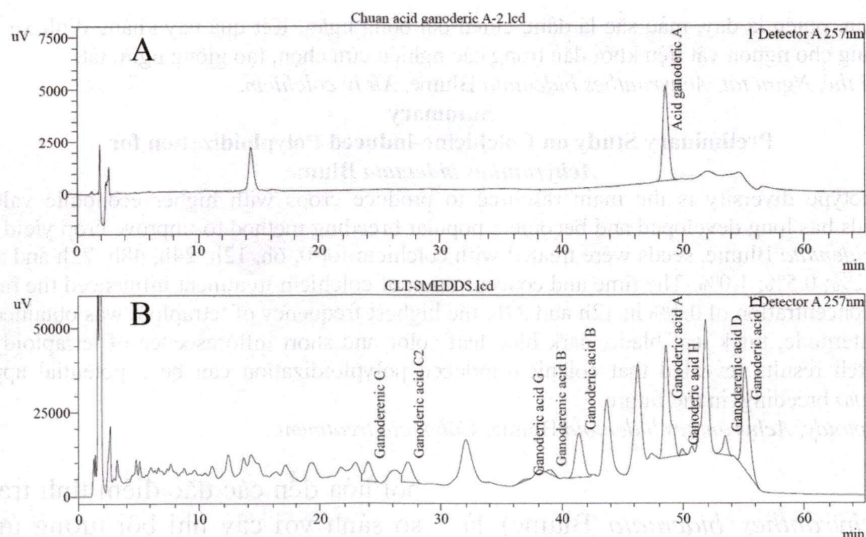
Phân tích thêm các tính chất hóa lý của L5

Hệ phân tán có độ nhớt trung bình $257,6 \pm 7,5$ cP và $\text{pH} = 5,8 \pm 0,27$ phù hợp cho dịch thuốc để

phát triển viên nang mềm trên dây chuyền ép khuôn trên trụ. Các chỉ tiêu định tính và định lượng đều đạt theo quy định trong USP 43. Kết quả định lượng cho thấy, L5 chứa hàm lượng acid ganoderic A là $0,17 \pm 0,001\%$ và triterpenoid toàn phần là $0,54 \pm 0,002\%$. Ngoài ra, công thức L5 có khả năng phân tán tốt vào các môi trường pH khác nhau phù hợp pH sinh lý đường uống. Trong môi trường nước cất và pH 1,2, kích thước tiểu phân trung bình khoảng 160 nm. Trong khi đó, kích thước trung bình tiểu phân tăng lên khoảng 270 nm ở pH 4,5 và pH 6,8, điều này giải thích do sự thay đổi điện tích bề mặt của tiểu phân hình thành trong quá trình nhũ hóa tạo VNT ở các môi trường pH khác nhau. L5 phân tán cho hệ VNT ổn định về kích thước tiểu phân trong 6 tiếng ở tất cả các môi trường, không xuất hiện các hiện tượng kém bền.



Hình 2. Biểu đồ phân bố kích thước tiểu phân khi phân tán công thức L5 ở môi trường nước cất (A), pH 1,2 (B), pH 4,5 (C) và pH 6,8 (D)



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC của acid ganoderic A chuẩn (A) và L5 (B)

4. Kết luận

Nghiên cứu đã thiết lập được công thức và quy trình bào chế TGE-SMEDDS với các thành phần PGM - Kolliphor RH40/Tween 80 - PEG 400 - TGE (16,7:33,3:33,3:16,7; w/w/w/w) có tính khả thi khi nâng cỡ lô sản xuất. Hệ phân tán có độ

bền nhiệt động học, có khả năng phân tán tạo VNT ổn định ở môi trường nước và các môi trường pH sinh lý bên trong cơ thể. Nghiên cứu tiếp tục phát triển sản phẩm viên nang mềm nano linh chi giàu triterpenoid giúp nâng cao hiệu quả trị liệu của cao chiết nấm linh chi.

Tài liệu tham khảo

1. Hsu K. D., Cheng K. C. (2018), From nutraceutical to clinical trial: frontiers in Ganoderma development. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(21), 9037-9051.
2. Qu D., He J., Liu C., Zhou J., Chen Y. (2013), Triterpene-loaded microemulsion using *Coix lacryma-jobi* seed extract as oil phase for enhanced antitumor efficacy: preparation and *in vivo* evaluation. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 109-119.
3. Zhang L., Zhang lanying, Zhang M., Pang Y., Li Y., Zhao A., Feng J. (2015), Self-emulsifying drug delivery system and the applications in herbal drugs. *Drug delivery*, 22(4), 475-486.
4. Patel M. J., Patel S. S., Patel N. M., Patel M. M. (2010), A self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS). *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 4(3), 29-35.
5. Rowe R. C., Sheskey P. J., Quinn M. E. (2009), Handbook of pharmaceutical excipients, *Pharmaceutical Press*.
6. Gao H., Wang M., Sun D., Sun S., Sun C., Liu J., Guan Q. (2017), Evaluation of the cytotoxicity and intestinal absorption of a self-emulsifying drug delivery system containing sodium taurocholate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106, 212-219.
7. Gullapalli R. P. (2010), Soft gelatin capsules (Softgels). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(10), 4107-4148.

Tạp chí Dược liệu, tập 27, số 5/2022 (Trang 313 - 320)

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TẠO THỂ ĐA BỘI Ở NGUỒN TẤT TỪ HẠT BÀNG XỬ LÝ COLCHICIN

**Trần Thị Trang, Đinh Thanh Giảng, Nguyễn Thị Xuyên, Trần Thị Kim Dung,
Nhữ Thu Nga, Nguyễn Đức Mạnh, Lô Đức Việt, Trần Ngọc Thanh***

Viện Dược liệu

*Email: tranngocthanh12@gmail.com

(Nhận bài ngày 28 tháng 6 năm 2022)

Tóm tắt

Trong chọn giống, đa dạng về kiểu gen là nguồn lực chính để tạo ra cây trồng có tính trạng giá trị kinh tế cao hơn. Cầm ứng nhân tạo đã phát triển từ lâu và trở thành một phương pháp tạo giống phổ biến để cải thiện năng suất và chất lượng cây trồng. Trong nghiên cứu này, hạt ngũ tăt (*Achyranthes bidentata* Blume) được xử lý đột biến bằng colchicin trong thời gian 0h, 6h, 12h, 24h, 48h và 72h ở các nồng độ 0%; 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,5%; 1,0%. Thời gian và nồng độ xử lý có ảnh hưởng đến tỷ lệ và thời gian nảy mầm của hạt. Liều lượng xử lý colchicin ở nồng độ 0,1% trong thời gian xử lý 12h và 24h cho tỷ lệ tạo cây ngũ tăt đa bội cao nhất. Một số đặc điểm hình thái điển hình đã được ghi nhận ở các thể ngũ tăt đa bội như chiều