

Nghiên cứu bào chế vi cầu natri alginat chứa bovine serum albumin

Lê Minh Quân*, Bùi Thị Mỹ Kim, Trần Lê Tuyết Châu, Lê Thị Thu Vân
Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Summary

Polymeric microspheres containing protein has received much attention for protein delivery application. Of those, sodium alginate is commonly employed as the polymer for microencapsulation thanks to its biocompatible and biodegradable characteristic. Emulsification method is of interest to prepare microspheres with desired diameter while maintain the nature of protein. However, this method has not commonly applied for sodium alginate-based microsphere. Current study aimed to propose a preparation process via emulsification to produce sodium alginate microspheres loaded with bovine serum albumin. The effect of formulation variables (alginate concentration, surfactant concentration, duration and speed of stirring, ratio volume of water phase to oil phase) on the size and drug loading of achieved microspheres were investigated. The microscopy observations during the process were carried out to determine the formation of microspheres. The morphology and in vitro release of protein from final microspheres product were also evaluated. The results show that formulation with 3 % sodium alginate, 10 % span 80, stirring duration about 12 min, stirring speed 400 rpm and volume ratio of aqueous phase to oil phase 1:3 (v/v) is sufficient to form microsphere with about $87 \pm 6 \mu\text{m}$ diameter and protein loading ratio about $17.01 \pm 0.51\%$. Microspheres were spherical and the in vitro release profile follow a controlled - release manner.

Keywords: Microsphere, sodium alginate, bovine serum albumin.

Đặt vấn đề

Hệ chuyển giao thuốc dạng vi cầu chứa protein là những vi tiểu phân kích thước hàng micromet cấu tạo gồm protein được phân bố trong khung polyme. Với kích thước nhỏ, cùng khả năng kiểm soát sự phóng thích dược chất, vi cầu có tiềm năng để áp dụng cho các chế phẩm trị liệu chứa protein. Một số polyme đã được áp dụng trong nghiên cứu bào chế vi cầu như polylactic-co-glycolic, ethylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose, natri alginat... Trong đó, natri alginat có tính tương thích sinh học, phân hủy sinh học và giá thành phù hợp nên ngày càng nhận được nhiều sự quan tâm nghiên cứu của các nhà bào chế.

Các phương pháp để bào chế vi cầu chứa protein từ natri alginat khá đa dạng. Hướng tiếp cận đơn giản nhất là nhỏ giọt dung dịch natri alginat chứa protein nồng độ xác định vào dung dịch CaCl_2 . Tuy nhiên, phương pháp này tạo ra

tiểu phân có kích thước lớn, thường ở hàng milimet^[1]. Việc áp dụng kỹ thuật sấy phun cũng bị hạn chế do protein có thể bị bất ổn định khi tiếp xúc nhiệt độ cao. Vì vậy, để đáp ứng đồng thời các yêu cầu về mặt kích thước và hạn chế sự thoái biến của protein, quy trình điều chế vi cầu bằng cách tạo nhũ tương thường được lựa chọn. Phương pháp này cho phép tạo ra vi cầu dạng rắn có kích thước trung bình nhỏ. Tuy nhiên, quá trình điều chế đòi hỏi kiểm soát nhiều thông số để có thể tạo vi cầu đáp ứng các tiêu chí hiệu suất bắt giữ cao, kích thước trung bình phù hợp.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng quy trình khả thi để bào chế vi cầu natri alginat chứa protein mô hình bovine serum albumin có kích thước trung bình dưới $100 \mu\text{m}$ và tỉ lệ tải protein lớn hơn 15%. Quá trình hình thành vi cầu đồng thời được đánh giá, từ đó, làm cơ sở phát triển các dạng thuốc phóng thích kéo dài chứa protein.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Protein mô hình được sử dụng trong nghiên cứu là Bovine Serum Albumin (BSA) (Himedia,

Chịu trách nhiệm: Lê Minh Quân
Email: leminhquan@ump.edu.vn
Ngày nhận: 12/01/2021
Ngày phản biện: 29/01/2021
Ngày duyệt bài: 19/02/2021

Ấn Độ). Các nguyên liệu khác bao gồm natri alginat (FMC Biopolymer, Anh), calci clorid, tween 80, span 80, aceton, isooctan (Vina Chemsol, Việt Nam).

Phương pháp bào chế vi cầu

Hòa tan 0,2 g BSA vào 25,0 g dung dịch natri alginat có nồng độ xác định (1%; 3% và 5%, kl/kl), thu được dung dịch A. Nhũ hóa dung dịch A vào 37,5 g dung dịch isooctan chứa một lượng span 80 bằng máy đồng nhất hóa ở 3000 rpm trong 10 phút để tạo nhũ tương nước/dầu (B). Thêm từ từ một lượng tween 80, khuấy 3000 rpm trong 5 phút. Hỗn hợp tạo thành được cho vào 12,5 g dung dịch CaCl₂ 8%, khuấy 350 rpm trong 20 phút. Thêm 12,5 g aceton vào hỗn hợp, khuấy 10 phút. Lọc hỗn hợp thu được dưới áp suất giảm, rửa vi cầu trên lọc bằng aceton trước khi sấy ở 37 °C trong 2 giờ.

Phương pháp đánh giá quá trình hình thành vi cầu

Quá trình hình thành vi cầu được xác định bằng thực nghiệm. Cấu trúc vi tiểu phân/hỗn hợp hình thành trong quá trình điều chế được đánh giá bằng phương pháp nhuộm Sudan III/benzen và quan sát dưới kính hiển vi quang học Olympus CX21 - FS (Anh). Kích thước vi tiểu phân được phân tích bằng thiết bị Mastersizer-3000 (Pháp). Tính chất của BSA sau khi bắt giữ được phân tích bằng phương pháp điện di gel polyacrylamid.

Phương pháp đánh giá tính chất vi cầu

Tỷ lệ tải protein

Tỷ lệ tải protein được xác định bằng thực nghiệm (n = 3), sử dụng phương pháp định lượng bằng quang phổ UV. Chuẩn bị dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ 500 µg/mL. Dung dịch mẫu thử được chuẩn bị bằng cách cân chính xác khoảng một lượng vi cầu cho vào bình nón 50 mL, thêm khoảng 20 mL nước cất, khuấy từ 600 rpm trong 2 giờ. Lọc hỗn hợp thu được qua

màng lọc 0,45 µm vào bình định mức 50 mL, tráng bình nón 3 lần, mỗi lần với khoảng 5,0 mL nước cất, bổ sung thể tích đến vạch. Dung dịch mẫu chuẩn và mẫu thử sau đó được đo quang phổ UV ở bước sóng 278 nm.

Các tính chất hóa lý

Kích thước vi cầu được đánh giá được bằng thiết bị Mastersizer-3000 (Pháp) (n = 5). Hình thái học bề mặt của vi cầu được đánh giá bằng kính hiển vi quét điện tử quét FESEM S4800.

Độ giải phóng hoạt chất in vitro

Được xác định bằng thực nghiệm, sử dụng máy thử độ hòa tan Labinda DS 1400. Cho 1,0 g vi cầu cho vào cốc hòa tan. Thêm 500 mL nước cất (hoặc đệm PBS, pH 7,4), điều chỉnh nhiệt độ 37 °C, tốc độ cánh khuấy 100 rpm. Ở các thời điểm 0,5 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 12 giờ rút 10,0 mL dung dịch từ cốc thử, lọc qua màng lọc millipore 0,45 µm vào ống nghiệm. Lượng protein có trong dung dịch này được định lượng bằng quang phổ hấp thụ UV ở bước sóng 278 nm. Sau mỗi lần rút mẫu, bổ sung 10,0 mL môi trường thử. Thử nghiệm này được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình.

Kết quả và bàn luận

Xây dựng quy trình bào chế vi cầu natri alginat

Quy trình bào chế vi cầu natri alginat bao gồm hai giai đoạn cơ bản (i) tạo nhũ tương nước/dầu chứa pha phân tán natri alginat - BSA có kích thước trung bình phù hợp, (ii) cho nhũ tương tiếp xúc với dung dịch chứa ion Ca²⁺. Nội dung nghiên cứu khảo sát các yếu tố ở giai đoạn tạo nhũ tương bao gồm (i) nồng độ dung dịch natri alginat, (ii) nồng độ chất nhũ hóa, (iii) thời gian nhũ hóa, (iv) tốc độ nhũ hóa, (v) tỉ lệ pha nước:pha dầu. Các thí nghiệm (TN) được bố trí như bảng 1.

Bảng 1. Thí nghiệm khảo sát thông số điều chế vi cầu natri alginate

STT	Các thông số điều chế				Tính chất vi cầu		
	Nồng độ polyme (%)	Nồng độ Span (% kl/kl)	Thời gian nhũ hóa (phút)	Tốc độ nhũ hóa (rpm)	Tỷ lệ pha nước : pha dầu (tt/tt)	Kích thước (µm)	Tỷ lệ tải thuốc (%)
TN1	1	5	10	3000	1,0:1,5	261 ± 17	11,50 ± 0,43
TN2	3	5	10	3000	1,0:1,5	314 ± 15	12,78 ± 0,52
TN3	5	5	10	3000	1,0:1,5	-	-
TN4	3	10	10	3000	1,0:1,5	225 ± 10	13,33 ± 0,61
TN5	3	10	12	3000	1,0:1,5	182 ± 3	13,53 ± 0,72
TN6	3	10	12	4000	1,0:1,5	161 ± 3	13,47 ± 0,48
TN7	3	10	12	3000	1,0:2,0	146 ± 5	17,20 ± 0,67
TN8	3	10	12	3000	1,0:3,0	87 ± 6	17,01 ± 0,51

Ảnh hưởng của nồng độ polyme

Kết quả TN1 và TN2 cho thấy kích thước trung bình vi cầu tăng từ $261 \pm 17 \mu\text{m}$ lên $314 \pm 15 \mu\text{m}$ khi nồng độ dung dịch natri alginate thay đổi từ 1% đến 3%. Kết quả này đồng thuận với nghiên cứu của Sheu và CS., Ramos và CS. [3, 4]. Bên cạnh đó, tỷ lệ tải protein tăng ở các khảo sát sử dụng nồng độ natri alginate cao hơn. Nguyên nhân do ở nồng độ cao, chuỗi natri alginate liên kết chặt chẽ, cấu trúc gel tạo thành đặc khít, khoảng trống nhỏ, protein phần lớn được bắt giữ trên mạng lưới liên kết chéo, không thất thoát ra ngoài trong quá trình điều chế. Thí nghiệm sử dụng natri alginate nồng độ 5% (TN3) không thu được vi tiểu phân hình cầu, chỉ thu được dạng sợi.

Ảnh hưởng của nồng độ chất nhũ hóa

Trong quá trình điều chế nhũ tương, kích thước trung bình pha phân tán giảm dần, diện tích bề mặt tăng, dẫn đến thay đổi năng lượng tự do bề mặt. Kết quả là nhũ tương bất ổn định về mặt động học, pha phân tán có xu hướng kết tụ lại với nhau. Để đáp ứng đồng thời hai yêu cầu (i) bền vững về mặt động học, (ii) kích thước trung bình pha phân tán nhỏ, cần sử dụng thêm chất nhũ hóa trong điều chế.

Khi tăng nồng độ chất nhũ hóa từ 5% lên 10% (kl/kl, so với pha dầu) (TN2 so với TN4), vi cầu tạo thành giảm kích thước trung bình tương ứng $314 \pm 15 \mu\text{m}$ và $225 \pm 10 \mu\text{m}$. Ở nồng độ Span thấp (TN2), nhũ tương tạo thành kém ổn định hơn, các giọt polyme có xu hướng kết tụ dẫn đến vi cầu tạo thành có kích thước trung bình lớn.

Ảnh hưởng của thời gian nhũ hóa và tốc độ nhũ hóa

Thời gian nhũ hóa, tốc độ nhũ hóa có ảnh hưởng đến kích thước trung bình vi cầu. Khi tăng thời gian nhũ hóa 10 phút (TN4) lên 12 phút (TN5) kích thước trung bình vi cầu giảm từ $225 \pm 10 \mu\text{m}$ còn $182 \pm 3 \mu\text{m}$. Tương tự, kích thước vi cầu cũng giảm khi tăng tốc độ nhũ hóa từ 3000 rpm (TN5) lên 4000 rpm (TN6). Ngoài kích thước vi cầu, thời gian nhũ hóa và tốc độ nhũ hóa không có ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ tải thuốc.

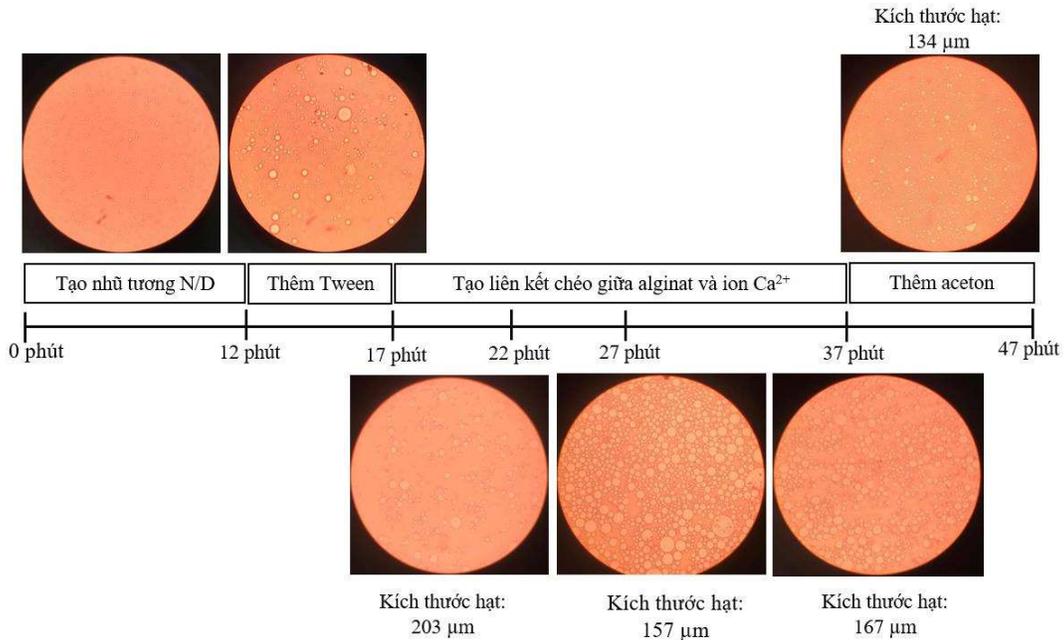
Ảnh hưởng của tỉ lệ pha nước : pha dầu

So sánh vi cầu tạo bởi TN5, TN7 và TN8, có thể thấy kích thước trung bình vi cầu giảm, tỉ lệ tải protein tăng đáng kể khi tỷ lệ pha dầu tăng. Ở TN8, với tỉ lệ pha nước:pha dầu là 1,0:3,0 (tt/tt), kích thước trung bình vi cầu tạo thành là $87 \pm 6 \mu\text{m}$, tỉ lệ tải 17,01%. Nguyên nhân của hiện tượng này có thể do khi thể tích pha ngoại tăng, lực tác động của pha ngoại isooctan lên các giọt nhũ tương lớn hơn, làm chuyển hướng chuyển động va chạm bình thường của pha phân tán (thông thường vi tiểu phân pha phân tán có xu hướng di chuyển lại gần nhau) [5]. Đồng thời thể tích pha dầu tăng cũng làm tăng khoảng cách giữa các giọt nhũ tương, xác suất tiếp xúc và kết tụ giọt nhũ tương giảm.

Tóm lại, TN8 với nồng độ alginate 3%, nồng độ span 80 là 10%, quá trình nhũ hóa trong 12 phút ở tốc độ 4000 rpm, tỉ lệ pha nước pha dầu 1,0:3,0 (tt/tt) là phù hợp để tạo ra vi cầu có kích thước trung bình dưới $100 \mu\text{m}$ và tỉ lệ tải protein lớn hơn 15%. Điều kiện thí nghiệm này được lặp lại để xác định cơ chế hình thành vi cầu cũng như đánh giá hình thái học và khả năng giải phóng hoạt chất của vi cầu tạo thành.

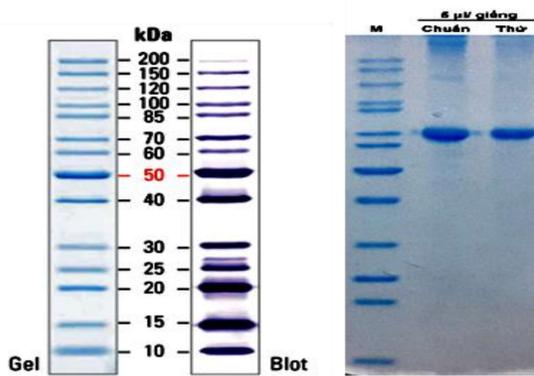
Cơ chế hình thành vi cầu natri alginat

Trong nghiên cứu này, phương pháp bào chế được cải tiến dựa trên nghiên cứu của Wan và CS. [6]. Do vậy, quá trình hình thành vi cầu natri alginate cần được đánh giá. Quan sát sự thay đổi cấu trúc của hệ sau khi có sự tiếp xúc giữa CaCl_2 và nhũ tương cho thấy hệ vẫn giữ cấu trúc nhũ tương nước/dầu, đồng thời có sự hình thành vi cầu trong cốc phản ứng. Cơ chế của sự tạo thành vi cầu có thể giải thích dựa trên kết quả nghiên cứu của Charles J. Thoman và CS.. Nhóm tác giả đã chứng minh tween 80 có thể vận chuyển ion Ca^{2+} đi qua màng với tốc độ $0,72 \pm 0,22 (\times 10^8 \text{ mol/s/m}^2)$ [7]. Do đó, tween 80 có thể gắn thuận nghịch và đưa ion Ca^{2+} đi vào trong pha phân tán, ion Ca^{2+} tiếp xúc với natri alginate có trong giọt nhũ và xây ra liên kết chéo. Quá trình tạo phức với natri alginate tiếp tục cho đến khi tạo được cấu trúc không gian hoàn chỉnh. Vi tiểu phân tạo thành có kích thước trung bình giảm dần và ổn định ở khoảng trung bình $134,0 \mu\text{m}$ (hình 1). Vi cầu thu được sau quá trình sấy có kích thước $87 \pm 6 \mu\text{m}$.



Hình 1. Cấu trúc hệ ở các giai đoạn điều chế

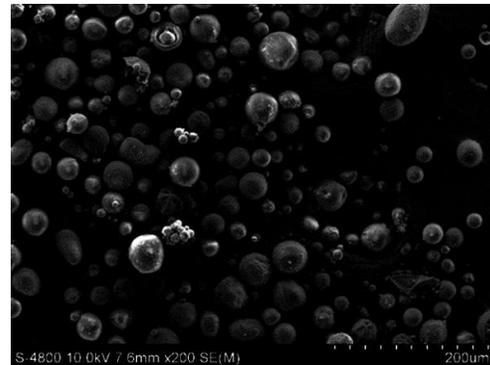
Cơ chế trên cho thấy khi mạng lưới không gian hình thành, BSA bị bắt giữ bên trong cấu trúc phức bởi alginat và ion Ca^{2+} . Kết quả phân tích điện di trên gel polyacrylamid xác nhận BSA bị bắt giữ trong vi cầu natri alginat có dải trùng khớp với mẫu BSA nguyên liệu ở khoảng 70 kDa (hình 2). Quy trình có thể được áp dụng để điều hệ thống mang protein mà vẫn đảm bảo sự toàn vẹn của protein.



Hình 2. Điện di gel BSA nguyên liệu và BSA được giải phóng từ vi cầu thu được từ TN8

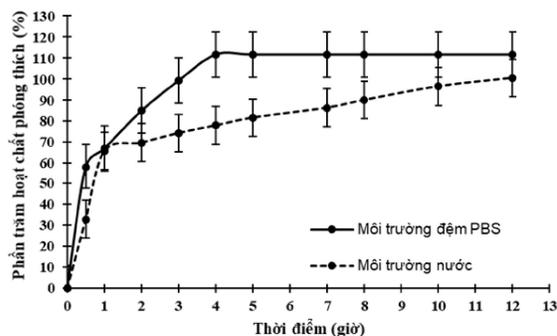
Đánh giá tính chất vi cầu natri alginat

Phân tích hình thái học bằng phép chụp hiển vi điện tử quét cho thấy vi cầu natri alginat tạo thành có dạng hình cầu với bề mặt đồng nhất (hình 3).



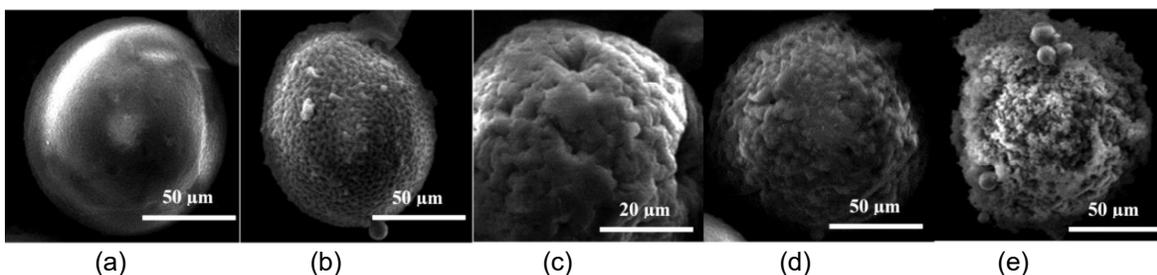
Hình 3. Hình ảnh SEM của vi cầu (TN8) ở độ phóng đại 200 lần

Vi cầu điều chế từ quy trình thích hợp được đưa vào thử nghiệm phóng thích *in vitro* ở hai môi trường: nước và đệm phosphate (PBS, pH 7,4). Kết quả phóng thích BSA trong hai môi trường được thể hiện ở (hình 4). Theo kết quả thử nghiệm phóng thích trên, tốc độ phóng thích hoạt chất trong đệm PBS nhanh hơn, giải phóng hoàn toàn BSA ra môi trường thử trong 4 giờ. Ở môi trường đệm PBS, protein được giải phóng theo cả hai cơ chế khuếch tán và bào mòn khung. Sự bào mòn khung diễn ra khi có xảy ra sự trao đổi ion giữa Ca^{2+} của vi cầu và ion Na^+ từ môi trường. Tuy nhiên, ion Na^+ không có khả năng tạo liên kết chéo giữa các chuỗi natri alginat, mạng lưới liên kết chéo bị phân hủy nhanh, BSA nhanh chóng thoát ra môi trường thử.



Hình 4.
Đồ thị biểu diễn sự phóng thích BSA *in vitro*

Trong khi đó, BSA được phóng thích liên tục và có kiểm soát khi thực hiện thử nghiệm trong nước. Sự phóng thích này có thể giải thích dựa trên quan sát cấu trúc vi cầu ở thời điểm 0 giờ, 1 giờ, 3 giờ, 6 giờ và 12 giờ (hình 5). Kết quả SEM cho thấy mạng lưới liên kết chéo bền vững, duy trì được cấu trúc hình cầu trong suốt 12 giờ, tuy nhiên, theo thời gian trên bề mặt vi cầu xuất hiện các kênh có kích thước mở rộng dần, hình thành một mạng các đường dẫn kết nối với nhau vào bên trong lõi, cho phép BSA có thể khuếch tán ra môi trường bên ngoài.



Hình 5. Hình ảnh SEM của vi cầu ở các thời điểm
(a) $t = 0$ giờ, (b) $t = 1$ giờ, (c) $t = 3$ giờ, (d) $t = 6$ giờ, (e) $t = 12$ giờ

Kết luận

Bằng thực nghiệm, nghiên cứu đã thiết lập được quy trình với các thông số điều chế cụ thể để tạo được vi cầu natri alginate chứa bovine serum albumin có kích thước trung bình nhỏ hơn $87 \pm 6 \mu\text{m}$ và tỉ lệ tải $17,01 \pm 0,51\%$. Đồng thời, quá trình hình thành vi cầu natri alginate cũng được xác định. Nghiên cứu còn đánh giá được hình thái học, khả năng phóng thích hoạt chất của vi cầu. Vi cầu tạo thành có khả năng phóng thích hoạt chất có kiểm soát trong 12 giờ.

Tài liệu tham khảo

1. Blandino A., Macias M., Cantero D. (1999), "Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl_2 concentration on gelation kinetics", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88 (6), pp. 686 - 689.
2. Bruchet M., Melman A. (2015), "Fabrication of patterned calcium cross-linked alginate hydrogel films and coatings through

reductive cation exchange", *Carbohydrate polymers*, 131, pp. 57 - 64.

3. Sheu T., Marshall R. (1993), "Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels", *Journal of Food Science*, 58 (3), pp. 557-561.

4. Ramos P. E. et al. (2018), "Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics", *Food Hydrocolloids*, 77, pp. 8-16.

5. Lê Quan Nghiê (2007), "Bào chế và sinh dược học", tập 2, NXB Giáo dục, Hà Nội, tr. 19.

6. Wan L., Heng P., Chan L. (1992), "Drug encapsulation in alginate microspheres by emulsification", *Journal of Microencapsulation*, 9 (3), pp. 309 - 316.

7. Thoman C. J. (1999), "The versatility of polysorbate 80 (tween 80) as an ionophore", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88 (2), pp. 258-260.