

Nghiên cứu bào chế phức hợp mangiferin-phospholipid

Phạm Thị Phương Dung*, Trần Võ Thị Trinh
Vũ Thị Thu Hiền, Lê Thị Thảo
Khoa Dược, Đại học Đại Nam

Summary

The mangiferin - phospholipid complex was produced by the solvent evaporation method. Different mangiferin complexes containing different kinds of phospholipid with variety ratios of mangiferin and phospholipid were prepared and evaluated the complexation efficiency to choose the optimized type of phospholipid and the optimized ratio. We also test the impact and choose the suitable parameters (temperature and time) of the complexing reaction condition. DSC spectroscopy was used to prove the formation of complex bonds. Results: Among two types of phospholipid (HSPC and lecithin), using lecithin produced higher complexation efficiency. With the ratio of lecithin to the MGF is 1:1, the reaction time is 2 hours, the temperature is 60 °C, the complexation efficiency was the highest, 96.50% ± 2.18%. The obtained DSC spectra showed the bond formation between mangiferin and lecithin in the complex. Conclusion: The study has found the formulation and process to prepare mangiferin - lecithin at laboratory scale and evaluated some characteristics of it.

Keywords: Mangiferin, phospholipid, HSPC, lecithin, complex.

Đặt vấn đề

Mangiferin là một polyphenol xanthonoid được chiết xuất từ nhiều loại thực vật, trong đó có cây xoài (*Mangifera indica* L., *Anacardiaceae*) được trồng phổ biến ở Việt Nam. Mangiferin có tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ tế bào gan. Ngoài ra mangiferin còn có một số tác dụng nổi bật khác như hạ đường huyết, hạ lipid máu, kháng virus, kháng tế bào ung thư, điều hòa miễn dịch... Hiện nay, mangiferin đã được chiết xuất thành nguyên liệu làm thuốc và tiêu chuẩn chất lượng của mangiferin nguyên liệu đã được đưa vào Dược điển Việt Nam [1].

Mặc dù có nhiều tác dụng trong điều trị, nhưng mangiferin thuộc nhóm IV trong hệ thống phân loại sinh dược học, nghĩa là có độ tan và tính thấm kém, nên khi dùng đường uống mangiferin có sinh khả dụng thấp. Do vậy, các hướng nghiên cứu hiện nay đang được tiến hành nhằm cải thiện độ tan, tính thấm và nâng cao sinh khả dụng của mangiferin, trong đó có công nghệ tạo phức với phospholipid giúp cải thiện sinh khả dụng của các hoạt chất nguồn gốc thảo dược. Hiện nay, có nhiều hoạt chất từ thảo dược đã được bào chế dưới dạng phức hợp với phospholipid như curcumin, rutin,

saponin, quercetin và đều đã được chứng minh khả năng cải thiện độ tan, tính thấm và sinh khả dụng [2, 3, 4]. Do vậy chúng tôi thực hiện nghiên cứu bào chế phức hợp mangiferin-phospholipid. Thông báo kết quả nghiên cứu xây dựng công thức, quy trình bào chế và đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng của phức hợp mangiferin - phospholipid.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu và thiết bị

Nguyên liệu và hóa chất

- Mangiferin (MGF) nguyên liệu do Viện Dược liệu cung cấp, đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V. Các loại phospholipid gồm hydrogenated soybean phosphatidylcholin (HSPC, Trung Quốc), lecithin (Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn cơ sở.

- Mangiferin chuẩn 98,3% do Công ty Sigma cung cấp.

- Các dung môi và hóa chất khác gồm aceton, dicloromethan, ethanol, methanol, HCl ... đều đạt tiêu chuẩn dược dụng hoặc tinh khiết phân tích.

Thiết bị

- Máy đo quang phổ UV-2600 Shimadzu (Nhật Bản).

- Thiết bị phân tích kích thước hạt Mastersizer MS 3000 (Anh).

- Thiết bị phân tích nhiệt quét vi sai Setaram (Pháp).

- Máy cắt quay chân không Buchi (Thụy Sĩ).

Chịu trách nhiệm: Phạm Thị Phương Dung

Email: dung.pham.dkh@gmail.com

Ngày nhận: 19/4/2021

Ngày phản biện: 28/4/2021

Ngày duyệt bài: 24/5/2021

- Máy khuấy từ gia nhiệt Are Velp (Ý).
- Máy ly tâm 12 ống Zenith (Trung Quốc).
- Cân phân tích Ohaus có độ chính xác 0,1 mg (Mỹ).
- Thiết bị lọc hút chân không Glassco (Ấn Độ).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp định lượng MGF

Định lượng MGF bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại theo Dược điển Việt Nam V tại bước sóng 368 nm [1].

- Xây dựng đường chuẩn: Pha chính xác dãy dung dịch MGF chuẩn có nồng độ 10 – 30 µg/ml trong hỗn hợp aceton : dung dịch HCl 1% tỷ lệ 1:1. Đo độ hấp thụ của các dung dịch trên tại bước sóng 368 nm. Mẫu trắng là hỗn hợp aceton : dung dịch HCl 1% tỷ lệ 1:1.

- Cách tính nồng độ: Nồng độ MGF của mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$C_{\text{thử}} = \frac{C_{\text{chuẩn}} \times A_{\text{thử}}}{A_{\text{chuẩn}}}$$

Trong đó: $C_{\text{thử}}$; $C_{\text{chuẩn}}$ là nồng độ dung dịch thử và dung dịch chuẩn (µg/ml); $A_{\text{thử}}$; $A_{\text{chuẩn}}$ là độ hấp thụ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn.

Phương pháp bào chế phức hợp MGF - phospholipid

Bào chế phức hợp MGF – phospholipid bằng phương pháp bốc hơi dung môi: Cân MGF và phospholipid theo công thức khảo sát. Hoà tan MGF và phospholipid vào dung môi thích hợp trong bình nón. Tiến hành khuấy từ ở tốc độ 400 v/ph, nhiệt độ 25 - 50°C, trong thời gian 2 - 8 giờ thu được dung dịch trong suốt. Loại dung môi trong thiết bị cất quay ở 60°C, tốc độ quay 90 vòng/phút, thời gian là 2 giờ, thu được phức hợp MGF - phospholipid.

Phương pháp đánh giá phức hợp MGF - phospholipid

Xác định hiệu suất tạo phức

Định lượng MGF toàn phần (MGF dạng tự do và MGF trong phức hợp): Cân chính xác một lượng phức hợp MGF – phospholipid sao cho khối lượng MGF trong phức hợp là 5 mg. Hòa tan hoàn toàn bằng hỗn hợp aceton – dung dịch HCl 1% (1:1) vừa đủ 25 ml. Pha loãng 10 lần bằng hỗn hợp aceton – dung dịch HCl 1% (1:1). Đo độ hấp thụ của dung dịch tại bước sóng 368 nm.

Định lượng MGF tự do: Cân chính xác một lượng phức hợp MGF - phospholipid sao cho khối lượng MGF trong phức hợp là 25 mg. Hòa tan vào 500 ml nước, khuấy 5 giờ. Lọc qua màng lọc 0,22 µm lấy phần cần. Hòa tan cần bằng hỗn hợp aceton – dung dịch HCl 1% (1:1)

vừa đủ 25 ml. Pha loãng nếu cần bằng hỗn hợp aceton – dung dịch HCl 1% (1:1). Đo độ hấp thụ của dung dịch tại bước sóng 368 nm.

Mẫu chuẩn là dung dịch MGF trong hỗn hợp aceton – dung dịch HCl 1% (1:1) có nồng độ 20 µg/ml.

Hiệu suất tạo phức được tính theo công thức:

$$H (\%) = \frac{m_{\text{toàn phần}} - m_{\text{tự do}}}{m_{\text{toàn phần}}} \times 100$$

Trong đó: H là hiệu suất tạo phức; $m_{\text{toàn phần}}$ là khối lượng MGF toàn phần; $m_{\text{tự do}}$ là khối lượng MGF tự do.

Đánh giá khả năng tạo phức giữa MGF và phospholipid bằng phân tích nhiệt vi sai (DSC)

Được thực hiện trên máy phân tích nhiệt vi sai Setaram (Pháp) với các điều kiện sau: Nhiệt độ quét từ 25°C đến 300°C, tốc độ gia nhiệt 10°C/phút và tốc độ thổi khí 2,5 lít/giờ.

Kết quả và bàn luận

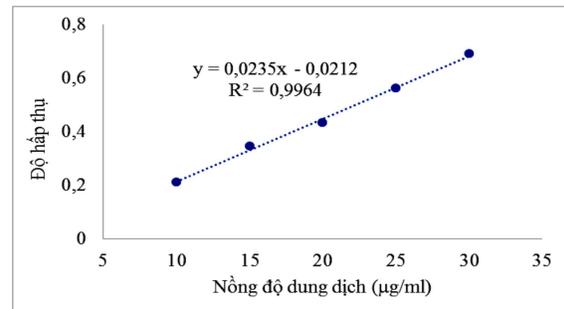
Xây dựng đường chuẩn MGF

Ghi phổ dung dịch MGF chuẩn có nồng độ khoảng 20 µg/ml trong hỗn hợp aceton : dung dịch HCl 1% (1:1), dải sóng 200 – 400 nm. Phổ đồ thu được có các đỉnh hấp thụ trùng với 4 cực đại được mô tả trong Dược điển Việt Nam V, chuyên luận MGF.

Pha một dãy dung dịch chuẩn MGF có nồng độ trong khoảng 10,00 – 30,00 µg/ml. Đo độ hấp thụ của các dung dịch tại bước sóng 368 nm, mẫu trắng là hỗn hợp aceton : dung dịch HCl 1% (1:1). Mỗi mẫu đo 5 lần, lấy kết quả trung bình. Kết quả được trình bày trong bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Độ hấp thụ của các dung dịch MGF chuẩn (n = 5)

Nồng độ MGF (µg/ml)	10,0	15,0	20,0	25,0	30,0
Độ hấp thụ	0,210	0,346	0,434	0,561	0,689
RSD (%)	0,98	0,85	0,76	0,75	0,62



Hình 1. Tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ MGF trong dung dịch

Kết quả ở bảng 1 và hình 1 cho thấy: Trong khoảng nồng độ khảo sát, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa độ hấp thụ và nồng độ MGF trong dung dịch với hệ số tương quan $R^2 = 0,9964$. Ngoài ra các giá trị RSD (%) đều nhỏ hơn 1%. Điều đó chứng tỏ phép đo có độ lặp lại tốt. Như vậy có thể sử dụng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại để định lượng MGF trong các mẫu nghiên cứu tại bước sóng 368 nm.

Bào chế phức hợp MGF - phospholipid

Ảnh hưởng của loại phospholipid

Tiến hành bào chế phức hợp MGF - phospholipid với 2 loại phospholipid là HSPC và lecithin, cố định tỷ lệ MGF : phospholipid là 1: 1 và các điều kiện phản ứng ở nhiệt độ 40°C, thời gian 6 giờ, tốc độ khuấy 400 vòng/phút. Dung môi phản ứng được lựa chọn phụ thuộc vào độ tan của phospholipid, với HSPC dùng dung môi là dicloromethan, với lecithin dùng dung môi là methanol. Mỗi mẫu lặp lại 5 lần, khối lượng MGF cân mỗi lần là 0,1 g. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của loại phospholipid tới hiệu suất tạo phức với MGF (n = 5)

STT	Hiệu suất tạo phức	
	Lecithin	HSPC
1	88,14	60,39
2	90,91	62,83
3	83,62	59,45
4	91,41	63,85
5	84,91	58,89
TB ± SD	87,80 ± 3,49	61,08 ± 2,16

Kết quả cho thấy: Lecithin cho hiệu suất tạo phức cao hơn HSPC (87,80 ± 3,49%, so với với 61,08 ± 2,16%). Do vậy, chúng tôi lựa chọn phospholipid là lecithin để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Ảnh hưởng của tỷ lệ lecithin

Bào chế phức hợp MGF - lecithin với các tỷ lệ 1:1; 1:2 và 1:3 để khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ lecithin tới hiệu suất tạo phức. Cố định các điều kiện phản ứng ở nhiệt độ 40°C, thời gian phản ứng 6 giờ, tốc độ khuấy 400 vòng/phút. Dung môi phản ứng là methanol. Mỗi tỷ lệ thực hiện 5 lần, khối lượng MGF cân mỗi lần là 0,1 g. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ lecithin tới hiệu suất tạo phức với MGF (n = 5)

STT	Hiệu suất tạo phức		
	Tỷ lệ 1:1	Tỷ lệ 1:2	Tỷ lệ 1:3
1	88,14	74,79	53,31
2	90,91	80,97	53,66
3	83,62	84,45	59,97
4	91,41	82,95	58,98
5	84,91	85,48	54,44
TB ± SD	87,80 ± 3,49	81,73 ± 4,23	56,07 ± 3,15

Kết quả ở bảng 3 cho thấy: Tỷ lệ MGF : lecithin là 1:1 cho hiệu suất tạo phức cao nhất (87,80 ± 3,49%). Sau đó là tỷ lệ 1:2 (81,73 ± 4,23%) và thấp nhất là tỷ lệ 1:3 (56,07 ± 5,15%). Do vậy, chúng tôi lựa chọn tỷ lệ MGF : lecithin là 1:1 để khảo sát ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ đến hiệu suất tạo phức.

Ảnh hưởng của thời gian phản ứng

Tiến hành bào chế phức hợp MGF - lecithin (tỷ lệ 1:1) với thời gian phản ứng thay đổi là 2, 4, 6 và 8 giờ, cố định nhiệt độ phản ứng ở 40°C, tốc độ khuấy 400 vòng/phút. Dung môi phản ứng là methanol. Mỗi thời gian phản ứng lặp lại 5 lần, khối lượng MGF cân mỗi lần là 0,1 g. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng tới hiệu suất tạo phức với MGF (n = 5)

STT	Hiệu suất tạo phức			
	2 giờ	4 giờ	6 giờ	8 giờ
1	97,35	93,66	88,14	78,42
2	98,17	91,29	90,91	83,78
3	89,01	88,52	83,62	85,71
4	88,71	82,68	91,41	87,73
5	93,73	85,03	84,91	78,03
TB ± SD	93,39 ± 4,46	88,24 ± 4,47	87,80 ± 3,49	82,73 ± 4,35

Kết quả ở bảng 4 cho thấy: Phức MGF - lecithin có hiệu suất tạo phức cao nhất tại thời điểm 2 giờ. Có thể thời gian phản ứng kéo dài đã làm ảnh hưởng tới độ ổn định của các nguyên liệu đưa vào. Tuy nhiên cần có các nghiên cứu đánh giá thêm để khẳng định nguyên nhân này. Chúng tôi lựa chọn thời gian phản ứng là 2 giờ để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng

Để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng, chúng tôi cố định tỷ lệ MGF : lecithin và thời gian phản ứng theo kết quả thu được ở trên và thay đổi nhiệt độ phản ứng từ 25 - 50°C. Mỗi nhiệt độ lặp lại 5 lần, khối lượng MGF cân mỗi lần là 0,1 g. Kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu suất tạo phức với MGF (n = 5)

STT	Hiệu suất tạo phức			
	25 °C	30 °C	40 °C	50 °C
1	98,34	96,41	97,35	91,31
2	95,56	91,86	98,17	96,2
3	99,31	98,51	89,01	87,98
4	94,54	93,65	88,71	93,33
5	94,75	89,58	93,73	88,29
TB ±	96,50 ±	94,00 ±	93,39 ±	91,42 ±
SD	2,18	3,55	4,46	3,47

Kết quả ở bảng 5 cho thấy: Phức MGF - lecithin cho hiệu suất cao nhất là $96,50 \pm 2,18\%$ khi phản ứng ở điều kiện nhiệt độ phòng (25°C). Nhiệt độ tăng làm cho hiệu suất giảm xuống.

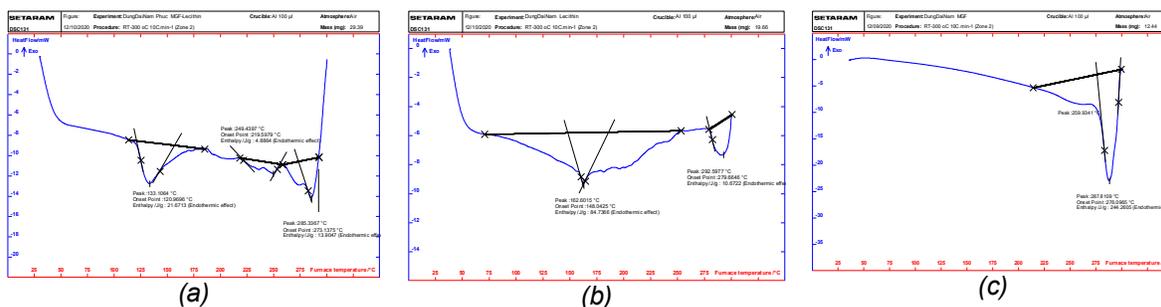
Từ kết quả thu được, chúng tôi đề xuất công thức và quy trình bào chế phức MGF - phospholipid ở quy mô phòng thí nghiệm

như sau: Cân MGF và lecithin với tỷ lệ 1 : 1, hòa tan vào methanol trong bình nón. Khuấy từ ở tốc độ 400 vòng/phút, nhiệt độ 25°C, trong thời gian 2 giờ thu được dung dịch trong suốt. Loại dung môi trong thiết bị cất quay ở 60°C, tốc độ quay 90 vòng/phút, thời gian là 2 giờ thu được phức hợp MGF - lecithin.

Một số đặc tính của phức hợp MGF - lecithin bào chế được

Tiền hành bào chế phức hợp MGF - lecithin với công thức và quy trình đã được lựa chọn ở trên. Phức hợp được đánh giá một số đặc tính như cảm quan và phân tích nhiệt vi sai để chứng minh sự tạo thành liên kết giữa lecithin và MGF.

- Cảm quan: Phức có màu xanh nhạt, hơi nhão sờ dính tay.
- Phân tích nhiệt vi sai (**DSC**): Kết quả được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Phổ DSC của phức MGF - lecithin (a), MGF (b), lecithin (c)

Kết quả ở hình 2 cho thấy: Giản đồ nhiệt của phức hợp MGF - lecithin không còn thấy xuất hiện các pic thu nhiệt của lecithin (162,6015°C và 292,5977°C) và MGF (259, 9041°C và 287,8109°C). Thay vào đó là sự xuất hiện của các pic thu nhiệt mới ở nhiệt độ 133,1064°C và 149,4397 thấp hơn của MGF nguyên liệu (259,9041°C). Điều đó chứng tỏ sự tạo thành phức hợp giữa MGF và lecithin.

Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu, đề tài rút ra một số kết luận sau:

- Công thức bào chế: Lựa chọn được loại phospholipid là lecithin với tỷ lệ MGF : lecithin là 1 : 1 để bào chế phức hợp MGF - lecithin.
- Các thông số kỹ thuật của quá trình bào chế phức hợp MGF - lecithin gồm: Thời gian phản ứng 2 giờ, nhiệt độ phản ứng 25°C và dung môi phản ứng là methanol.

- Hiệu suất tạo phức là $96,50 \pm 2,18\%$. Hình ảnh phổ **DSC** cho thấy sự tạo thành liên kết giữa MGF và lecithin trong phức hợp.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, tập 2, NXB Y học, tr. 608.
2. Nguyễn Thanh Hải (2018), “Nghiên cứu bào chế phytosome rutin”, *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội*, tr. 51-58.
3. Nguyễn Thanh Hải (2018), “Nghiên cứu bào chế curcumin dạng phytosome và dạng PEG hóa”, *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội*, tr. 29-40.
4. Devendra Singh et al. (2012), “Quercetin – phospholipid complex: An amorphous pharmaceutical system in herbal drug delivery, current drug discovery technologies”, 9, pp.17–24.