

Nghiên cứu bào chế hệ vi tự nhũ chứa berberin

Võ Văn Lệnh^{1*}, Nguyễn Việt Cường¹, Trần Văn Thành²

¹Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng

²Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh

Summary

Berberine (BER) is natural isoquinoline alkaloid, reported to possess numerous pharmacological activities including hyperlipidemia, diabetes, metabolic syndrome, obesity, fatty liver disease. However, BER shows low bioavailability because of poor solubility and poor permeability. The purpose of this study was to enhance the dissolution rate of BER by developing a novel delivery system that is self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS). Pseudoternary phase diagrams were constructed using oil, surfactant and co-surfactant types to identify the efficient self-microemulsification region. The optimal formulation with the best self-microemulsifying and solubilization ability consisted of 19.5 % (w/w) of Peceol, 39 % (w/w) Cremophor RH 40, 39 % (w/w) propylen glycol and 2.5 % BER (w/w). SMEDDS was characterized by morphological observation, droplet size, stability, drug content and in vitro release. The SMEDDS of BER could exhibit good stability. In vitro release test showed a complete release of BER from SMEDDS was in 30 minutes. These results demonstrate the potential use of SMEDDS for improving the bioavailability of BER.

Keywords: Berberin chlorid, self-microemulsifying drug delivery system, phase diagrams, Chemix 3.6.

Đặt vấn đề

Berberin (BER) là một isoquinolin alkaloid tự nhiên có nhiều tác dụng dược lý đã được chứng minh như trị alzheimer, hạ lipid huyết, kháng khuẩn, kháng nấm, chống viêm loét dạ dày và đặc biệt là tác dụng hạ đường huyết^[1,2]. Với nhiều tác dụng dược lý hiệu quả nhưng sinh khả dụng đường uống của BER rất thấp (< 5 %) do độ tan kém, tính thấm kém, dẫn đến hạn chế hấp thu và bị chuyển hóa nhiều^[3]. Hệ vi tự nhũ (self microemulsifying drug delivery systems - SMEDDS) là một trong những hệ thống mang thuốc hiện đại đang rất được quan tâm và đã có các ứng dụng được thương mại hóa. SMEDDS giúp cải thiện đáng kể sinh khả dụng của nhiều hoạt chất kém tan, kém thấm nhờ đặt tính tự nhũ hóa tạo các giọt kích thước nano^[4,5].

Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu bào chế và đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng của hệ vi tự nhũ chứa berberin (SMEDDS - BER).

Nguyên liệu và phương pháp

Dung môi, hóa chất

Nguyên liệu berberin clorid, hàm lượng 97,0 % (Trung Quốc), chất đối chiếu berberin clororid, hàm lượng 81,70 % (Viện Kiểm nghiệm Thuốc Thành phố Hồ Chí Minh).

Mẫu thuốc đối chiếu: Viên nang berberin 100 mg của Công ty Cổ phần Hóa Dược Phẩm Mekophar, Số lô: 20005CN, HSD: 18/04/2024.

Propylen glycol, glycerol, PEG 400, Tween 20, Tween 80, Parafin (Xilong - Trung Quốc); Cremophor RH 40, Peceol, Capryol 90, Transcutol, Labrafac (Gattefossé - Pháp);

Dung môi sắc ký đạt tiêu chuẩn sử dụng cho HPLC (Merck, Hoa Kỳ).

Trang thiết bị và dụng cụ nghiên cứu

Thiết bị: Máy đo độ hòa tan PT-DT70 (Pharmatest - Đức); hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC-PDA (Agilent - Mỹ), máy đo kích thước tiểu phân nano Zetasizer (Malvern -

Chịu trách nhiệm: Võ Văn Lệnh

Email: lenhvophar@gmail.com

Ngày nhận: 09/11/2021

Ngày phản biện: 17/11/2021

Ngày duyệt bài: 24/12/2022

Anh), bể siêu âm Elma S108H (Elma - Đức), máy khuấy từ gia nhiệt (Velp - Italia).

Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng berberin

Hàm lượng berberin trong SMEDDS - BER được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò PDA. Cột sắc ký Phenomenex Gemini C18 (250 x 4,5 mm, 5 µm), pha động đẳng dòng acetonitril – acid acetic 1 % (25:75), nhiệt độ cột 30 °C, thể tích tiêm mẫu 10 µl; tốc độ dòng 1,0 ml/phút; phát hiện ở bước sóng 345 nm.

Cân một lượng chính xác khoảng 200 mg SMEDDS - BER vào bình định mức 100 ml, hòa tan bằng hỗn hợp dung môi acid acetic 1 % - acetonitril (75:25). Lọc qua màng lọc 0,22 µm. Tiến hành song song với mẫu đối chiếu berberin có hàm lượng khoảng 300 ppm.

Quy trình phân tích được thẩm định các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH [6] gồm độ đặc hiệu; tính tương thích hệ thống; tính tuyến tính; độ lặp lại; độ chính xác trung gian; độ đúng. Quy trình sau khi thẩm định được ứng dụng để xác định hàm lượng berberin trong các chất mang, các công thức bào chế và đánh giá các chỉ tiêu đối với SMEDDS - BER.

Xác định độ tan của berberin trong các chất mang

Thêm một lượng dư berberin vào 5 ml chất mang, khuấy từ 600 vòng/phút trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó, ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút, lấy phần dịch ly tâm lọc qua màng lọc 0,45 µm. Xác định nồng độ berberin bằng phương pháp **HPLC** đã thẩm định.

Xây dựng giản đồ pha, thiết lập công thức SMEDDS

Dựa vào nghiên cứu kết quả nghiên cứu độ tan của dược chất, chọn pha dầu, chất diện hoạt (CDH) và chất đồng diện hoạt (CĐDH) tương ứng là chất mang cho độ tan tốt nhất trong các chất mang khảo sát. Sử dụng giản đồ pha để xác định tỷ lệ của các thành phần đã chọn để xây dựng công thức SMEDDS tối ưu, sử dụng phương pháp chuẩn độ nước trong xây dựng giản đồ pha [7].

CDH và CĐDH được phối hợp thành hỗn hợp Smix với các tỷ lệ khối lượng khác nhau (5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1 và 1:2). Dầu và hỗn hợp

Smix được phối hợp với tỷ lệ xác định từ 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, và 7:3 trong các ống nghiệm. Sử dụng nước cất để chuẩn độ các hỗn hợp. Ghi nhận lượng nước chuẩn độ tương ứng với vùng hỗn hợp còn trong và đến lúc trở nên đục, những mẫu đẳng hướng và trong được xem là nằm trong vùng vi nhũ tương [8]. Từ đó lựa chọn tỷ lệ dầu/CDH/CĐDH để xây dựng công thức SMEDDS. Giản đồ pha được thiết lập bằng phần mềm Chemix 3.6.

Bào chế SMEDDS - BER

Sau khi thiết lập được giản đồ pha, lựa chọn các công thức SMEDDS có các tọa độ trong vùng vi nhũ tương gồm: giữa vùng vi nhũ tương, có lượng dầu nhiều nhất, có lượng CDH nhiều nhất để khảo sát khả năng tải BER và độ bền nhiệt động học.

Berberin được hòa tan với hỗn hợp Smix trước, sau đó phối hợp từ từ vào pha dầu cho tan hoàn toàn (khuấy từ 100 vòng/phút ở 50 °C). Khảo sát khả năng tải nhiều tỷ lệ BER khác nhau. SMEDDS - BER được điều chỉnh đến 1,5 g. Quan sát cảm quan, kiểm tra độ ổn định nhiệt động học. Công thức SMEDDS tối ưu phải đạt cảm quan, đẳng hướng sau pha loãng, không có tủa và đạt các chỉ tiêu độ bền nhiệt động học.

Đánh giá các chỉ tiêu của SMEDDS - BER

Định lượng berberin trong SMEDDS - BER

Định lượng berberin trong SMEDDS - BER bằng phương pháp **HPLC** đã thẩm định.

Hình thức cảm quan

Hệ phải trong suốt và đồng nhất trước khi pha loãng. Sau khi pha loãng 100 lần với nước cất, hệ phải tạo được vi nhũ tương trong, đồng nhất và không có tủa berberin, không tách lớp.

Kích thước giọt

Pha loãng SMEDDS với nước cất ở các nồng độ 10 % và 1 %, kích thước giọt và phân bố kích thước giọt được kiểm tra bằng kỹ thuật tán xạ tia laser (Zetasizer).

Độ hòa tan

Thiết bị kiểu giỏ quay; môi trường hòa tan là 500 ml dung dịch acid hydrochloric 0,1 N và sau đó thử lại với 500 ml dung dịch đệm phosphat pH 6,8; tốc độ quay: 120 vòng/phút; nhiệt độ: 37 ± 0,5 °C; thời gian: Lấy 5 ml mẫu sau các thời gian 10, 20, 30 và 60 phút, bổ sung lại lượng

dịch hòa tan mới tương ứng. Mẫu được lọc qua màng lọc 0,22 μm và định lượng bằng phương pháp **HPLC** đã thẩm định.

Độ bền nhiệt động học

Chu trình nóng - lạnh: Pha loãng công thức SMEDDS - BER 100 lần với nước cất, tiến hành 6 chu kỳ nóng - lạnh ở 2 mức nhiệt độ 4 °C và 45 °C, thời gian lưu mẫu ở mỗi nhiệt độ là 8 giờ. Hệ đạt yêu cầu nếu sau 8 giờ đạt chỉ tiêu cảm quan.

Chu trình đông - rã đông: Pha loãng công thức SMEDDS - BER 100 lần với nước cất, tiến hành 6 chu kỳ đông - rã đông, thời gian lưu mẫu ở mỗi nhiệt độ là 8 giờ. Hệ đạt yêu cầu nếu sau 8 giờ đạt chỉ tiêu cảm quan.

Ly tâm: Pha loãng công thức SMEDDS - BER 100 lần với nước cất, tiến hành ly tâm 5000 rpm trong 15 phút, hệ đạt yêu cầu nếu không có tủa và tách lớp sau ly tâm.

Kết quả nghiên cứu

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng berberin

Quy trình định lượng được thẩm định các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH [6]. Quy trình đạt yêu cầu về độ đặc hiệu (sắc ký đồ mẫu thử cho một pic có thời gian lưu tương đương với pic trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu, phổ **UV** có cùng hình dạng và các đỉnh hấp thụ cực đại, sắc ký đồ mẫu placebo và mẫu dung môi không có pic tại thời gian lưu tương ứng với pic trong sắc ký đồ mẫu đối chiếu); tính tương thích hệ thống (RSD% của thời gian lưu và diện tích pic $\leq 2,0$ %); tính tuyến tính ($y = 40,389x$, $R^2 = 1$); độ lặp lại (RSD = 0,29 %); độ chính xác trung gian (RSD = 0,185 %); độ đúng (tỷ lệ phục hồi 98-102 %, RSD < 2 %).

Nghiên cứu độ tan của berberin trong các chất mang

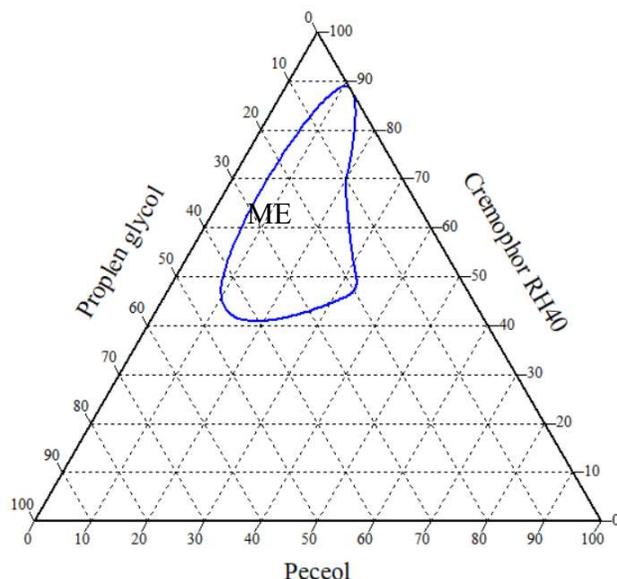
Bảng 1. Độ tan của berberin trong các chất mang

	Chất mang	Độ tan (mg/g)
<i>Dầu</i>	Capryol 90	2,56 \pm 0,17
	Parafin	0,05 \pm 0,00
	Peceol	6,23 \pm 0,65
	Labrafac	0,16 \pm 0,04
<i>CDH</i>	Cremophor RH 40	1,67 \pm 0,23
	Tween 20	1,01 \pm 0,14
	Tween 80	1,50 \pm 0,26
<i>CDDH</i>	Glycerol	67,79 \pm 0,45
	1,2-propylen glycol	48,26 \pm 0,92
	PEG 400	55,44 \pm 0,39
	Transcutol	27,06 \pm 0,34
<i>Khác</i>	Nước	1,89 \pm 0,16
	HCl 0,1 N	0,14 \pm 0,01
	Đệm phosphate 6,8	0,46 \pm 0,03

Chọn pha dầu, chất diện hoạt và chất đồng diện hoạt để nghiên cứu hệ SMEDDS - BER lần lượt là Peceol (P), Cremophor RH 40 (Cr) là pha dầu và chất diện hoạt có khả năng hòa tan berberin tốt nhất. Các chất đồng diện hoạt đều cho thấy khả năng hòa tan BER rất tốt. Tuy berberin tan trong glycerol và PEG-400 tốt hơn

1,2-propylen glycol nhưng định hướng sau này sẽ bào chế viên nang mềm chứa SMEDDS - BER nên chọn 1,2-propylen glycol (PG) làm chất đồng diện hoạt cho SMEDDS nhằm tránh các tương tác với vỏ nang mềm.

Xây dựng giàn đồ pha, thiết lập công thức SMEDDS



Hình 1. Giản đồ 3 pha chỉ ra vùng vi tự nhũ (ME: microemulsion)

Với các tỷ lệ dầu Peceol, chất diện hoạt Cremophor RH 40 và chất đồng diện hoạt propylen glycol nằm trong vùng khoanh màu xanh dương sẽ tạo được SMEDDS.

Bảo chế SMEDDS - BER

Tải tối đa lượng berberin vào các công thức đặc trưng trong vùng vi tự nhũ, đánh giá lượng berberin tải tối đa, cảm quan và độ bền nhiệt động học. Kết quả thu được trong bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ các thành phần của các mẫu khảo sát và kết quả pha loãng

P:Cr:PG	Lượng BER/1 g (mg)	Cảm quan	Chu kỳ nóng - lạnh	Chu kỳ đông - rã đông	Độ ổn định sau ly tâm
20:66,5:13,5	20 mg	Đạt	Đạt	Không đạt	Đạt
30:58,5:11,5	15 mg	Đạt	Không đạt	Không đạt	Đạt
20:53,4:26,6	30 mg	Đạt	Không đạt	Không đạt	Đạt
20:40:40	25 mg	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

P: Peceol, Cr: Cremophor RH40, PG: propylen glycol

Dựa vào kết quả trên cho thấy công thức SMEDDS với Peceol, Cremophor RH 40 và propylen glycol tỷ lệ 20:40:40 sẽ tải được 25 mg berberin/1 g SMEDDS và các chỉ tiêu cảm quan, độ bền nhiệt động học đều đạt. Do đó, chọn tỷ lệ này làm công thức tối ưu (bảng 3).

Bảng 3. Công thức SMEDDS - BER tối ưu

Thành phần	Tỷ lệ (%)
Berberin clorid	2,50
Peceol	19,50
Cremophor RH 40	39,00
Propylen glycol	39,00

Đánh giá các chỉ tiêu chất lượng của SMEDDS - BER

Hình thức cảm quan

Hệ trong suốt, màu vàng đậm và đồng nhất trước khi pha loãng; sau khi pha loãng 100 lần với nước cất hệ tạo được vi nhũ tương trong (mức A), đồng nhất, màu vàng và không có tủa, không tách lớp.

Kích thước giọt

Kích thước trung bình giọt khi pha loãng ở các nồng độ đều đạt kích thước nano (< 100 nm), ở nồng độ 10 % và 1 % không khác biệt đáng kể (> 25 nm), ở 0,1 % có kích thước có tăng tuy nhiên vẫn < 100 nm. PDI của các mẫu đều rất thấp, chứng tỏ sự đồng nhất về kích thước giữa các tiểu phân.

Bảng 4. Kích thước giọt SMEDDS - BER sau khi pha loãng

Nồng độ pha loãng	Kích thước trung bình giọt (nm)	PDI
10 %	24,42	0,185
1 %	22,6	0,140
0,1 %	75,46	0,131

Độ bền nhiệt động học

Sau các chu kỳ nóng-lạnh, đông-rã đông và ly tâm SMEDDS - BER vẫn đạt chỉ tiêu đề ra, qua đó có thể khẳng định SMEDDS - BER ổn định về mặt nhiệt động học.

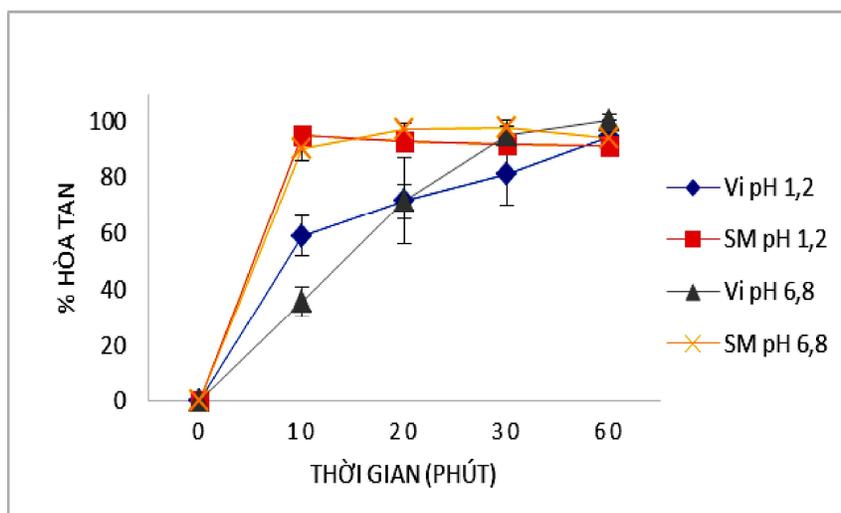
Định lượng

Tiến hành định lượng sáu mẫu SMEDDS - BER riêng biệt chuẩn bị theo quy trình định

lượng đã được thẩm định. Kết quả thu được phù hợp với hàm lượng berberin có trong mẫu theo công thức lý thuyết (2,50 %).

Độ hòa tan

Sau 10 phút hệ SMEDDS - BER đã phóng thích hơn 90 % hoạt chất ở cả hai môi trường pH 1,2 và 6,8; và gần như 100 % sau 30 phút; viên đối chiếu sau 10 phút chỉ khoảng 35% và 59% hoạt chất phóng thích tương ứng với pH 1,2 và 6,8; sau 20 phút hoạt chất của viên đối chiếu chỉ mới đạt khoảng 70 % (hình 2). Qua đó cho thấy SMEDDS - BER phóng thích berberin rất nhanh chóng ở cả 2 môi trường, giúp hoạt chất hấp thu nhanh chóng và hiệu quả ở cả môi trường dịch vị và ruột so với thuốc đối chiếu trên thị trường.



Hình 2. Kết quả độ hoà tan SMEDDS - BER và viên đối chiếu và ở pH 1,2 và pH 6,8 (SM: SMEDD-BER, Vi: Viên đối chiếu)

Bàn luận

Berberin có nhiều tác dụng dược lý đã được chứng minh nhưng sinh khả dụng lại rất thấp. Vi tự nhũ là hệ thống mang thuốc hiện đại, giúp tăng độ tan và tính thấm cho nhiều dược chất, là lựa chọn phù hợp để cải thiện sinh khả dụng của BER.

Kết quả nghiên cứu cho thấy BER kém tan trong nước (1,89 mg/g) và rất kém tan trong môi trường pH acid (0,14 mg/g ở pH 1,2), tan tốt hơn trong các dung môi hữu cơ, và pH quanh

vùng trung tính (0,46 mg/g ở pH 6,8); kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước. BER rất kém tan trong môi trường acid và là dạng muối amoni bậc IV nên phần tan sẽ tồn tại phần lớn dạng ion, cùng với bên mặt kỵ nước dẫn đến các tiểu phân BER dễ bị kết tụ, hai nguyên nhân trên gây cản trở rất lớn cho sự hấp thu thuốc ở dạ dày.

BER rất kém tan trong các loại dầu tự nhiên với chuỗi acid béo bão hòa và có chuỗi mạch carbon trung bình đến dài như parafin, dầu mè.

Độ tan của BER tăng lên đáng kể trong các loại dầu bán tổng hợp có chuỗi C ngắn và chỉ số HLB khoảng 3 - 6, như Capryol 90 và Peceol. Với CDH, BER tan vừa trong Cremophor RH40 và Tween 80 và tan rất tốt trong các CDDH như glycerol, Transcutol, propylen glycol.

Để tạo được SMEDDS, dầu trong công thức thường chiếm tỷ lệ thấp (< 40 %), chất diện hoạt thường chiếm tỷ lệ cao (30 - 70 %). Với các thành phần gồm dầu, CDH và CDDH lần lượt là Peceol, Cremophor RH 40, propylen glycol; vùng SMEDDS là những vị trí mà tỷ lệ dầu Peceol thấp hơn 30 %, Cremophor RH 40 chiếm tỷ lệ càng lớn thì càng dễ hình thành SMEDDS, tuy nhiên, độ nhớt của hệ cũng sẽ tăng theo. Khi phối hợp với propylen glycol, lượng Cremophor RH 40 phù hợp để tạo SMEDDS phải chiếm từ 26 % trở lên.

Công thức SMEDDS - BER tối ưu cho thấy sự ổn định nhiệt động học, sau khi phân tán các giọt đạt kích thước nano và đồng nhất, độ hòa tan trong môi trường pH 1,2 và 6,8 đều được cải thiện đáng kể so với viên đối chiếu. Qua đó cho thấy SMEDDS - BER có thể cải thiện tốt các hạn chế về tính chất lý hóa của berberin, tăng được tính thấm và độ tan của BER, là dạng bào chế tiềm năng giúp cải thiện SKD của BER.

Kết luận

Nghiên cứu này đã bào chế thành công SMEDDS chứa BER theo phương pháp xây dựng giản đồ pha. Công thức SMEDDS - BER tối ưu bao gồm dầu Peceol (19,5 %), chất diện hoạt Cremophor RH 40 (39 %) và chất đồng diện hoạt propylen glycol (39 %) với tỷ lệ tải berberin là 2,5 % (k/k).

SMEDDS - BER được đánh giá các chỉ tiêu cảm quan, độ bền nhiệt động học đều đạt; hệ sau khi tự nhũ hóa các giọt đạt kích thước nano (< 25 nm) và phân bố kích thước giọt hẹp, 1 đỉnh (PDI < 0,2); độ hòa tan được cải thiện đáng kể ở cả môi trường pH 1,2 và 6,8 so với thuốc đối chiếu.

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Chương trình Học bổng Đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước năm 2020 của Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn VINBIGDATA thuộc Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup, mã số: VINIF.2020.ThS.35.

Tài liệu tham khảo

1. Neag M. A., Mocan A., Echeverría J., Pop R. M., Bocsan C. I., Crişan G. & Buzoianu A. D. (2018), "Berberine: Botanical occurrence, traditional uses, extraction methods, and relevance in cardiovascular, metabolic, hepatic, and renal disorders", *Frontiers in Pharmacology*, 9, pp. 557.
2. Chang W., Chen L. & Hatch G. M. (2015), "Berberine as a therapy for type 2 diabetes and its complications: From mechanism of action to clinical studies", *Biochemistry and Cell Biology*, 93 (5), pp. 479–486.
3. Battu S. K., Repka M. A., Maddineni S., Chittiboyina A. G., Avery M. A. & Majumdar S. (2010), "Physicochemical characterization of berberine chloride: A perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery", *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 11 (3), pp. 1466–1475.
4. Stéphane Gibaud, David Attivi (2012), "Microemulsions for oral administration and their therapeutic applications", *Expert Opinion on Drug Delivery, Taylor & Francis*, 9 (8), pp. 937–951.
5. Krstić M., Medarević D., Duriš J. & Ibrić S. (2018), "Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) and self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) as lipid nanocarriers for improving dissolution rate and bioavailability of poorly soluble drugs", *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*, 20 (8), pp. 473–508.
6. ICH (2005), *Validation of analytical procedures: Text and methodology. Q2R1*.
7. Chavda V. P. & Shah D. (2017), "Self-emulsifying delivery systems: One step ahead in improving solubility of poorly soluble drugs", *Nanostructures for Cancer Therapy*, pp. 653–718.