

NGHIÊN CỨU TẠO PHỨC HỢP PRODIGIOSIN TỪ *Serratia marcescens* VỚI PHOSPHOLIPID

Nguyễn Thị Thảo^{*}, Đỗ Thị Tuyên, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Lê Thanh Hoàng, Nguyễn Thị Hiền Trang

Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Prodigiosin (Pg), một sắc tố màu đỏ tự nhiên được tổng hợp bởi một số loài vi khuẩn và chủ yếu là từ *Serratia marcescens* có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa, chống sốt rét,... đặc biệt là có hoạt tính kháng ung thư trên 60 dòng tế bào ung thư. Tuy nhiên, theo các nghiên cứu đã công bố, Pg là một hợp chất không tan trong nước, chỉ tan trong dung môi nên ảnh hưởng rất nhiều đến khả năng ứng dụng của Pg trong thực tiễn. Trong nghiên cứu này, Pg được nghiên cứu tạo phức hợp với phospholipid là phosphatidylcholine (PC) nhằm làm tăng tính tan cũng như độ bền của hoạt chất, từ đó làm tăng tính sinh khả dụng của hoạt chất. Pg tạo phức tốt nhất với PC khi tỉ lệ mol phối trộn là 1:1 ở nhiệt độ 40°C trong 2 giờ (83,7%) hoặc ở 50°C trong 1 giờ (80,93%). Hiệu suất gắn Pg đạt 51,7%. Pg tạo phức với PC nhờ một số liên kết yếu khi phân tích phức hợp bằng phổ hồng ngoại IR và quang phổ hấp phụ UV-VIS. Phức hợp Pg-PC có kích thước hạt nhỏ (trung bình là 391,8 nm) và trị tuyệt đối thế zeta là 6,98 mV cao hơn Pg tự do là -3,62 mV. Pg-PC tan tốt nhất trong đệm Na-acetate pH 4,5 ($1,45 \pm 0,042 \mu\text{g/mL}$).

Từ khóa: Kích thước hạt, phosphatidylcholine, prodigiosin, phức hợp prodigiosin phospholipid, thế zeta.

MỞ ĐẦU

Những năm gần đây, một số enzyme và các hoạt chất tự nhiên hoặc dẫn xuất của chúng đã và đang được quan tâm nghiên cứu để sử dụng trong điều trị và hỗ trợ điều trị ung thư như một số các alkaloid, các dẫn chất podophyllotoxin và các dẫn chất camptothecin. Trong số này, prodigiosin (Pg), có công thức phân tử $\text{C}_{20}\text{N}_{25}\text{N}_3\text{O}$, thuộc họ các hợp chất đỏ tự nhiên có đặc trưng là bộ khung pyrrolypyrromethane. Pg là chất chuyển hóa thứ cấp được sinh tổng hợp bởi các vi khuẩn Gram dương và Gram âm như *Serratia*, *Vibrio*, *Pseudomonas* và *Streptomyces* được biết đến là hợp chất có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm (Duzhak *et al.*, 2012), chống sốt rét (Papireddy *et al.*, 2011), chống oxy hóa (Gulani *et al.*, 2012)..., đặc biệt là có hoạt tính kháng ung thư, gây hiện tượng apoptosis ở tế bào ung thư bằng nhiều con đường khác nhau (Samrot *et al.*, 2011). Khả năng kháng ung thư của Pg đã được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (www.dtp.ncbi.nih.gov) thử nghiệm cho thấy có tác dụng trên 60 dòng tế bào ung thư, với giá trị IC_{50} trung bình là 2,1 $\mu\text{g/mL}$. Trong khi đó, theo tiêu chuẩn thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện quy định những hợp chất có IC_{50} nhỏ hơn 4 $\mu\text{g/mL}$ được xem là có hoạt tính kháng và diệt tế bào ung thư, điều này cho thấy Pg là một hoạt chất có tiềm năng ứng dụng lớn. Tuy nhiên, Pg chỉ tan trong dung môi hữu cơ như trong chloroform, methanol, acetonitrile và dimethyl sulfoxide, nhạy cảm với ánh sáng và không tan trong nước (Songia *et al.*, 1997) nên ít hoặc không có hoạt tính *in vivo*, làm giảm tính sinh khả dụng của hợp chất.

Để khắc phục hạn chế này và nâng cao hiệu quả điều trị, xu hướng tạo phức hợp hoạt chất với các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên có cấu trúc tương tự màng tế bào nhằm tăng khả năng vận chuyển và hấp thụ các hoạt chất rất được quan tâm. Việc sử dụng các phospholipid có nguồn gốc tự nhiên, phát triển thành công dạng bào chế phytosome cho các sản phẩm tự nhiên đã tạo ra một hướng mới cho xu hướng phát triển này. Phospholipid tự nhiên thường được sử dụng là phosphatidyl-choline (PC), là các phân tử lipid nhỏ và là hợp chất hai chức, có chứa một nửa là phosphatidyl ưa dầu và một nửa là choline ưa nước nên có khả năng cải thiện tính sinh khả dụng của các hợp chất tự nhiên. Phần nửa ưa nước (nhóm choline) gắn với hợp chất tự nhiên, trong khi nửa phần phosphatidyl tan trong lipid bao bọc các thành phần liên kết choline. PC có cấu trúc tương tự màng tế bào nên việc gắn hoạt chất với PC nhằm tăng khả năng vận chuyển các hoạt chất từ môi trường thân nước sang môi trường thân lipid để tăng hấp thụ, tăng sinh khả dụng cho các hoạt chất tự nhiên, và đôi khi còn có thể làm thay đổi đặc tính về dược động học hay tác dụng sinh học của hoạt chất.

Mặt khác, trong nghiên cứu trước đây, nhóm nghiên cứu đã xây dựng được quy trình tinh sạch Pg từ chủng *S. marcescens* cũng như bước đầu đánh giá được hoạt tính kháng ung thư trên một số dòng tế bào ở điều kiện *in vitro*. Vì vậy, để khắc phục những nhược điểm của Pg nhằm làm tăng tính ứng dụng cũng như phát triển tiếp được kết quả nghiên cứu đạt được, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tạo phức hợp Pg với phospholipid nhằm làm tăng tính tan cũng như độ bền của hoạt chất, từ đó làm tăng tính sinh khả dụng của hoạt chất.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**Nguyên liệu và hóa chất**

Chủng *S. marcescens* QBN dùng để tổng hợp Pg đã được nghiên cứu trong đề tài thuộc Nhiệm vụ Quỹ gen trước đây.

Các hóa chất và dung môi dùng trong nghiên cứu đều ở dạng tinh khiết và được cung cấp bởi các hãng uy tín: Phosphatidyl-choline từ đậu tương (Đức); ethanol, ethylacetate, methanol, dichlormethan, n-hexan, toluen (Trung Quốc); silica gel 60F254 (Mecrk).

Nuôi cấy, thu nhận và tinh sạch hoạt chất Pg

Chủng *S. marcescens* QBN sau khi hoạt hóa trên đĩa môi trường NA agar được nuôi preculture trong môi trường NA lỏng ở 28°C, qua đêm. Dịch nuôi preculture được tiếp giống 1% sang môi trường 2% bột vừng lắc 200 rpm ở 28°C trong 72 giờ để sinh tổng hợp Pg.

Dịch lên men chủng *S. marcescens* QBN trong môi trường bột vừng được bổ sung hỗn hợp dung môi ethyl acetate + 1% HCl với tỉ lệ 1:1, lắc 200 rpm ở 30°C trong 2 giờ. Sau đó ly tâm mẫu ở 4000 rpm trong 10 phút, 4°C, thu lớp dung môi phía trên có chứa Pg. Dịch chiết mẫu sau đó được cô quay loại bỏ dung môi để thu Pg thô dạng khô.

Hoạt chất Pg được tinh sạch từ dịch nuôi cấy chủng *S. marcescens* QBN theo phương pháp sắc ký cột silica gel 60. Cột được cân bằng với hệ dung môi toluene và n-hexan. Mẫu Pg thô ban đầu được hòa trong hỗn hợp toluene và n-hexan tỷ lệ 1:1 (v/v), sau đó đưa lên cột silica gel. Mỗi phân đoạn thu 50 mL. Ban đầu, mẫu được đẩy bằng hệ dung môi toluene và n-hexan tỷ lệ 1:1 (v/v) để loại dầu và các hợp chất khác. Sau đó, mẫu được rửa giải bằng hệ dung môi toluene và ethyl acetate tỷ lệ 9:1 (v/v) và tiếp tục rửa giải với tỷ lệ 6:4. Cuối cùng, mẫu được rửa giải hoàn toàn bằng methanol. Các phân đoạn thu được sau đó được chạy kiểm tra trên bản sắc ký lớp mỏng (thin layer chromatography, TLC), các phân đoạn tương đối sạch, không còn băng trên sẽ được gom lại để lên cột tinh sạch lần 2.

Mẫu sau khi tinh sạch lần 1 được gom lại và tiếp tục đưa lên cột silica gel 60 lần hai. Mẫu được rửa giải bằng hệ dung môi toluene và ethyl acetate tỷ lệ 9:1 (v/v). Các phân đoạn được kiểm tra, đánh giá mức độ sạch trên TLC và HPLC.

Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Pg sau khi tinh sạch được kiểm tra trên bản mỏng silica gel 60F254 với pha tĩnh là một lớp mỏng các chất hấp phụ silica gel. Dung môi sử dụng làm pha động là hỗn hợp dung môi toluene và ethyl acetate tỷ lệ 1:1 (v/v). Sắc ký đồ được hiện màu bằng phương pháp nhuộm iodine trong khoảng 5-10 phút.

Phương pháp sắc ký lỏng cao áp HPLC

Pg tinh sạch được hòa trong methanol với nồng độ 0,3 mg/mL. Hệ dung môi pha động là methanol:H₂O, chạy với dải nồng độ khác nhau theo thứ tự lần lượt MeOH:H₂O (20 : 80) - 2 phút; MeOH:H₂O (20-100/80-0) - 17 phút; MeOH:H₂O (100 : 0) - 8 phút; MeOH:H₂O (20 : 80) - 5 phút và bước sóng phát hiện là 535 nm (Song *et al.*, 2006).

Xác định hàm lượng Pg

Khối lượng Pg được xác định dựa vào đường chuẩn Pg được xây dựng từ Pg chuẩn (Sigma) dựa trên kết quả đo OD (giá trị mật độ quang) ở bước sóng mà tại đó prodigiosin hấp thụ tối đa (535 nm).

Tạo phức Pg với phosphatidylcholine

Phức hợp Pg với phosphatidylcholine (PC) được điều chế dựa trên phương pháp bốc hơi dung môi theo nghiên cứu của các nhóm tác giả (Vankudri *et al.*, 2017).

Pg sạch và PC sau khi hòa tan lần lượt trong methanol và dichlormethan được trộn với nhau theo tỉ lệ mol nhất định vào bình cầu rồi đun cách thủy hồi lưu trong các thời gian 2-3 giờ, ở nhiệt độ 40-60°C, tốc độ quay khuấy từ 150 rpm. Hỗn hợp phản ứng sau đó được cô quay để loại bớt dung môi đến khi hỗn hợp đậm đặc (còn khoảng 5 -10 mL). Tủa phức hợp Pg-phosphatidylcholine bằng cách bổ sung 30 mL n-hexan vào hỗn hợp đậm đặc thu được sau cô quay, ly tâm thu cặn. Rửa sản phẩm bằng n-hexane lạnh (2 lần) rồi làm khô trong bơm chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi. Phức hợp được bảo quản ở 4°C, tránh ánh sáng.

Hiệu suất gắn tạo phức của Pg được xác định dựa theo công thức: Hiệu suất (%) = [(a-b)/a]*100%, trong đó "a" là khối lượng của hoạt chất Pg ban đầu, "b" là khối lượng của hoạt chất Pg tự do sau phản ứng (Hao *et al.*, 2013).

Khối lượng của Pg trong phức hợp được xác định bằng cách cân một lượng phức hợp, hòa tan trong methanol và đo OD ở bước sóng 535 nm. Dựa vào đường chuẩn Pg đã xây dựng để xác định khối lượng Pg.

Đánh giá khả năng tạo phức hợp Pg-PC

Đánh giá bằng quang phổ hồng ngoại IR: Một lượng mẫu nhỏ của Pg, phosphatidylcholine, phức hợp Pg-PC được đặt dưới đầu dò cố định và được quét trong vùng số sóng 4000-500 cm⁻¹. Từ phổ IR của các mẫu thu được, phân tích sự thay đổi số sóng của các nhóm chức đặc trưng trên phổ đồ để chỉ ra các liên kết mới hình

thành và các nhóm cũ mất đi, từ đó có thể chứng minh liên kết tạo phức giữa phospholipid và dược chất (Prasanna *et al.*, 2013).

Đánh giá bằng quang phổ UV-VIS: Mẫu được hòa trong ethanol với nồng độ 20-100 µg/mL và đo ở dải bước sóng 200 đến 800 nm. Sau khi đo UV-VIS của phức hợp Pg-PC, phân tích sự thay đổi của các nhóm chức đặc trưng trên phổ đồ để chỉ ra các liên kết mới hình thành và các nhóm cũ mất đi, từ đó có thể chứng minh liên kết tạo phức giữa phospholipid và dược chất.

Xác định kích thước hạt và thế zeta của phức hợp Pg-PC

Kích thước và trị tuyệt đối thế zeta của hạt Pg-PC được xác định bằng kỹ thuật tán xạ ánh sáng động (DLS, dynamic light scattering). Phức hợp Pg-PC được hòa ở nồng độ 1% (w/v) trong DMSO.

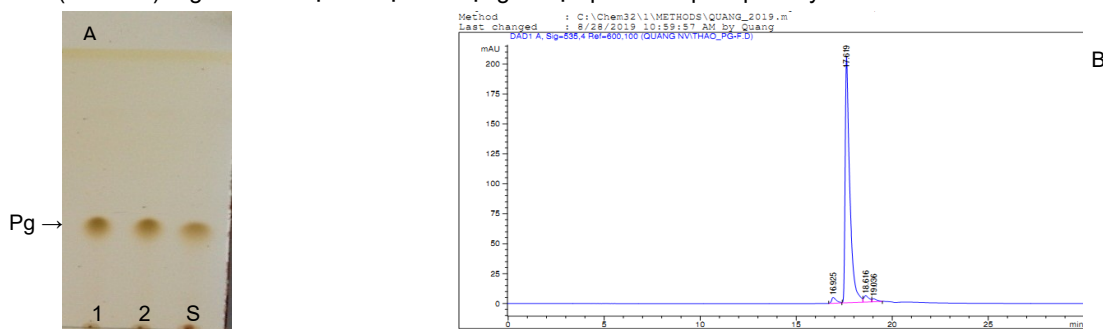
Xác định độ tan của Pg và phức hợp Pg-PC

Phức hợp Pg-PC được kiểm tra độ phân tán trong các hệ đệm có pH 1,2; 4,5 và 6,8. Hòa một lượng dư phức hợp Pg-PC trong các đệm HCl pH 1,2; Na-acetate pH 4,5 và phosphate pH 6,8, khuấy từ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Dịch phân tán sau đó được ly tâm 5000 rpm trong 5 phút, thu dịch và xác định độ hấp thụ quang ở bước sóng 535 nm. Hàm lượng Pg phân tán trong dung dịch được xác định dựa vào đường chuẩn Pg đã xây dựng (Freag *et al.*, 2013).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tối ưu điều kiện tạo phức hợp Pg-PC

Để tạo phức hợp Pg-PC, trước tiên Pg được tinh sạch từ dịch nuôi cấy chủng *S. marcescens* QBN. Dịch nuôi cấy thu được sau 3 ngày nuôi lactic ở điều kiện thích hợp có màu đỏ thẫm cho thấy sắc tố đỏ Pg đã được tổng hợp. Dịch nuôi cấy được dùng để tách chiết và tinh sạch Pg theo phương pháp đã trình bày. Kết quả cho thấy, trên bản TLC chỉ có một băng duy nhất ngang với Pg chuẩn (Hình 1A) và có một peak chiếm 94% trên sắc ký đồ HPLC (Hình 1B). Pg sau tinh sạch được sử dụng để tạo phức với phosphatidylcholine.



Hình 1. Kiểm tra độ sạch của Pg tinh sạch. (A) Sắc ký bản mỏng TLC Pg tinh sạch (1-2) và Pg chuẩn (S); (B). HPLC Pg tinh sạch

Pg sau khi tinh sạch được nghiên cứu tối ưu điều kiện tạo phức hợp với PC về tỉ lệ mol phối trộn, nhiệt độ phản ứng cũng như thời gian thực hiện phản ứng tạo phức.

Kết quả cho thấy phức hợp Pg-PC tạo thành sau khi được tua với n-hexan, tua tạo thành có màu đỏ thẫm ở pha dưới trong hỗn hợp dung dịch (Hình 2A). Sau khi loại bỏ dung dịch pha trên, phức hợp Pg-PC được rửa n-hexan lạnh, làm khô ở nhiệt độ phòng và sấy nhẹ thu được phức hợp dạng bột dẻo màu đỏ sẫm như Hình 2B và lượng phức hợp thu được có sự khác nhau rõ rệt ở các tỉ lệ mol phối trộn.



Hình 2. Phức hợp Pg-phosphatidylcholine khi tua bằng n-hexan

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy hiệu suất tạo phức đạt cao nhất 83,7% ở tỉ lệ phối trộn giữa Pg và PC là 1:1, trong đó hiệu suất gắn Pg là 51,7%. Một số nghiên cứu khác khi nghiên cứu tạo phức rutin, curcumin dạng phytosome, các tác giả cũng cho thấy tỉ lệ mol phối trộn tốt nhất giữa phospholipid và hoạt chất là 1:1 (Vankudri *et al.*, 2017; Bùi *et al.*, 2018). Việc tăng tỉ lệ phospholipid quá cao có thể tạo thành lớp màng ngăn cản sự khuếch tán của hoạt chất trong hỗn hợp phản ứng dẫn đến khả năng tạo phức giảm. Mặc dù ở các tỉ lệ tạo phức khác nhau cho hiệu suất tạo phức khác nhau nhưng tỉ lệ Pg trong phức tạo thành ở các tỉ lệ không có nhiều khác biệt. Hàm lượng Pg trong phức hợp ở các tỉ lệ khác nhau đều nằm trong khoảng 17 - 19% (w/w).

Bảng 1. Hiệu suất tạo phức phytosome và hiệu suất gắn của Pg với PC

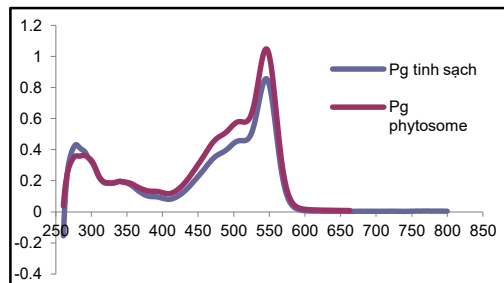
Tỉ lệ phối trộn			Phức hợp Pg-PC		Pg		% Pg trong phức (w/w)
Pg (mg)	PC (mg)	Tỉ lệ mol	Khối lượng phức hợp (mg)	Hiệu suất tạo phức (%)	Pg trong phức (mg)	Hiệu suất gắn Pg	
20	48	1:1	56,8±1,31	83,7	10,17±1,0	51,7	18,2
20	69	1:1,5	46,4±2,07	67,27	8,87±1,5	44,3	19,09
20	92	1:2	29,3±2,16	31,85	5,17±1,7	25,95	17,47
20	138	1:3	10,4±1,87	7,54	1,87±1,2	9,35	17,81
20	184	1:4	kxđ	kxđ	kxđ	kxđ	kxđ

Kết quả khảo sát khối lượng phức tạo thành cho thấy thời gian phản ứng và nhiệt độ phản ứng ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo phức. Ở 40°C, phức hợp Pg-PC được tạo thành tốt nhất sau 2 giờ phản ứng, sau đó phức hợp giảm nhẹ còn 77,79%. Với nhiệt độ phản ứng ở 50°C, phức hợp tạo thành tốt nhất trong 1 giờ phản ứng đầu tiên và hiệu suất đạt 80,93%, tương đương với lượng phức đạt được sau 2 giờ ở 40°C. Tuy nhiên khi nhiệt độ phản ứng tăng lên 60°C, hiệu suất tạo phức giảm mạnh chỉ còn 18,63% trong 1 giờ phản ứng và còn 4,85-3,92% ở những giờ tiếp theo. Như vậy, nhiệt độ và thời gian thích hợp để tạo phức Pg dạng phytosome là 40°C trong 2 giờ hoặc 50°C trong 1 giờ. Nếu nhiệt độ tăng cao hơn hiệu suất tạo phức giảm có thể do phospholipid bị oxy hóa, kém ổn định gây giảm hiệu suất của phản ứng. Trong khi nếu kéo dài thời gian phản ứng có thể gây phá vỡ các liên kết giữa Pg và PC sau khi phản ứng đã đạt trạng thái cân bằng dẫn đến làm giảm hiệu suất.

Đánh giá khả năng tạo phức hợp Pg-PC

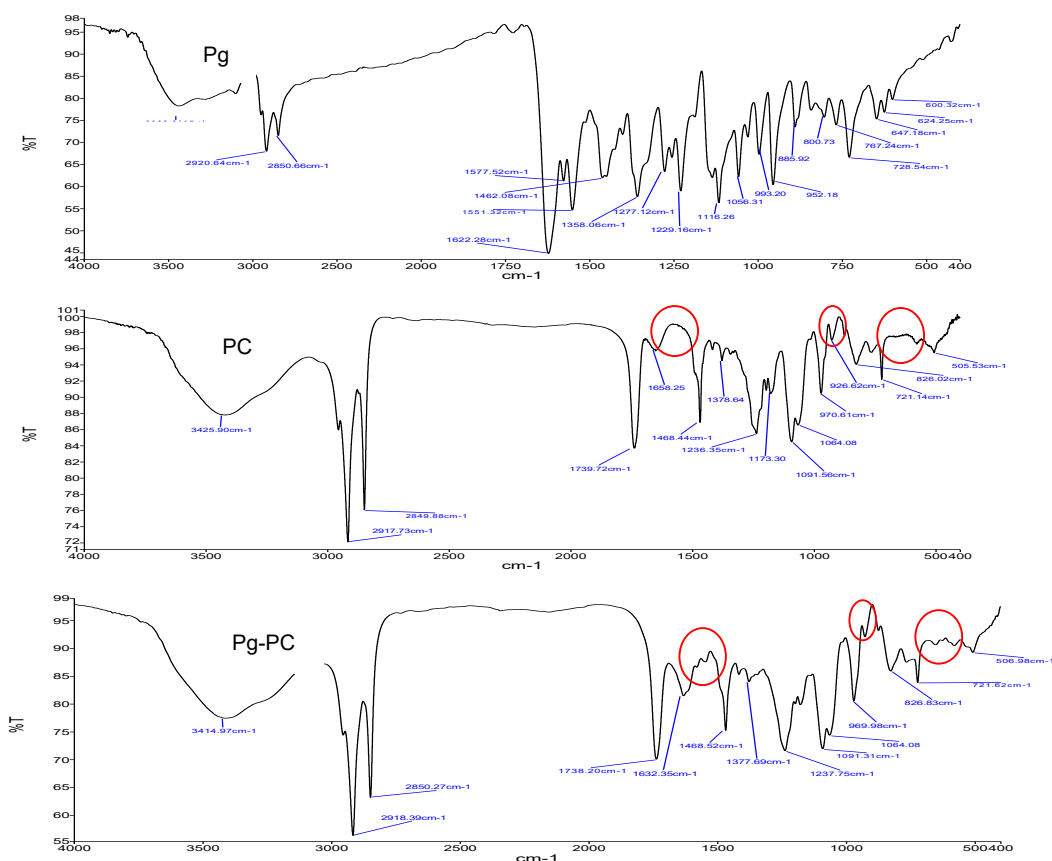
Để đánh giá khả năng tạo phức giữa Pg và PC, các công cụ phân tích quang phổ hấp thụ UV-VIS, phổ hồng ngoại IR được sử dụng.

Kết quả phân tích quang phổ hấp thụ UV-VIS trong vùng bước sóng từ 200-800 nm cho thấy Pg và phức hợp Pg-PC đều có độ hấp phụ cao nhất ở bước sóng 546 nm, tuy nhiên tại hai đỉnh hấp phụ này có sự thay đổi về độ hấp phụ (Hình 3). Trong vùng bước sóng từ 250-300 nm, Pg sạch có đỉnh hấp phụ ở bước sóng 279 nm với độ hấp phụ 0,4322 trong khi phức hợp Pg-PC có độ hấp phụ thấp hơn và đỉnh phổ hấp phụ dịch chuyển sang bước sóng 290 với độ hấp phụ đạt 0,364. Trong khi đó, phức hợp Pg-PC lại có độ hấp phụ (1,048) cao hơn so với Pg tinh sạch (0,856) ở bước sóng 546 nm. Kết quả này bước đầu cho thấy có sự thay đổi nhóm chức và liên kết của Pg trong phức hợp Pg-PC. Để khẳng định rõ hơn, Pg và Pg-PC được xác định phổ hồng ngoại IR để xác định sự thay đổi trong cấu trúc.



Hình 3. Phổ hấp thụ UV-VIS của Pg và phức hợp Pg-PC

Phổ hồng ngoại IR là một phương pháp mạnh để phân tích cấu trúc, việc thay đổi các nhóm chức khác nhau cho thấy sự khác biệt về số lượng băng tần, vị trí, hình dạng và cường độ. Phân tích phổ IR của Pg, PC và phức hợp Pg-PC ở Hình 4 cho thấy phổ IR của PC trong phức hợp có sự xuất hiện một số sóng nhỏ trong vùng từ 1700-1500 và vùng 721-500 so với PC tự do. Bên cạnh đó, đỉnh tần số 1632,35 ở phức hợp Pg-PC có sự thay đổi về vị trí và cường độ so với PC tự do (1658,25). Kết quả này cho thấy đã có sự hình thành một số liên kết yếu giữa PC và Pg. Kết quả này cũng giống với kết quả của Xu và đồng tác giả (2009), Freag và đồng tác giả (2013) đều cho thấy một số liên kết yếu được hình thành trong phức hợp giữa luteolin, diosmin và phospholipid (Xu *et al.*, 2009; Freag *et al.*, 2013).

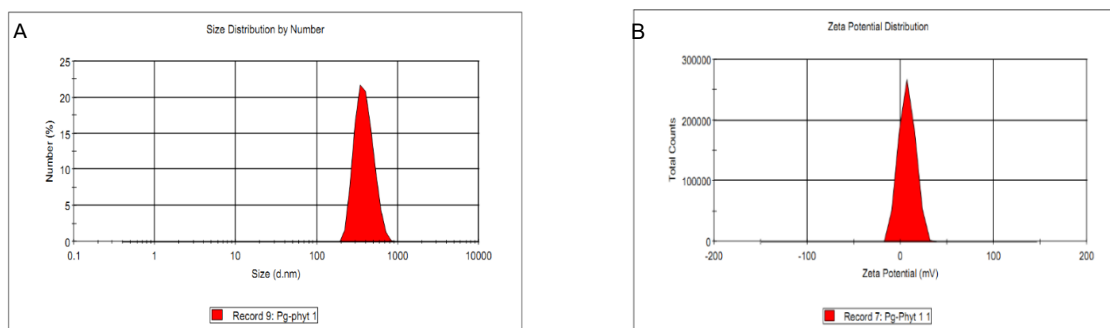


Hình 4. Phổ hồng ngoại IR của Pg, PC và phức hợp Pg-PC

Tính chất của phức hợp Pg-PC

Kích thước hạt và độ tích điện bề mặt (trị tuyệt đối thế zeta) là những tính chất quan trọng của một phức hợp bởi nó liên quan đến khả năng vận chuyển và độ bền của phức hợp trong dung dịch cũng như sự tương tác của phức hợp với tế bào. Thông thường, phức hợp phospholipid có kích thước trong khoảng 50 nm đến 100 μ m, tuy nhiên các hạt có kích thước <400 nm được cho là có khả năng đi qua thành mạch và do đó sẽ có tác dụng tốt hơn đến tế bào đích. Trong khi đó, thế zeta thường được sử dụng như một tiêu chí để đánh giá độ bền của phức hợp và các phức hợp có trị tuyệt đối thế zeta > -40 mV được cho là bền.

Kết quả phân tích dịch phân tán của phức hợp Pg-PC trong DMSO cho thấy kích thước hạt phân bố trong khoảng 220-712 nm, kích thước trung bình là 391,8 nm (Hình 5A), trong đó 85% các hạt có kích thước nhỏ hơn 500 nm. Thế zeta của Pg và phức hợp Pg-PC cho thấy trị tuyệt đối thế zeta của Pg là -3,62 mV, trong khi trị tuyệt đối thế zeta của phức hợp Pg-PC đạt 6,98 mV (Hình 5B). Kết quả này cho thấy phức hệ Pg-PC bền hơn so với Pg tự do.



Hình 5. Phân bố kích thước hạt phức hợp Pg-PC trên máy DLS. Phân bố kích thước hạt (A) và thế trị tuyệt đối thế zeta (B) của phức hợp Pg-PC sau siêu âm

Như vậy, phức hợp Pg-PC tạo thành có kích thước hạt cũng như tăng trị tuyệt đối thể zeta làm tăng độ bền dẫn đến tăng tính sinh khả dụng của phức hợp. Kích thước hạt trung bình đạt 391,8 nm, nhỏ hơn 500 nm phù hợp với một số nghiên cứu tạo phức phytosome của một số hoạt chất như rutin, curcumin, quercetin v.v. có kích thước hạt trong khoảng 100-1600 nm.

Để đánh giá mức độ tan của phức hợp, một lượng dư phức hợp Pg-PC (10 mg) được phân tán trong 5 mL các hệ đệm với pH 1,2; 4,5 và 6,8 bằng khuấy từ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Kết quả xác đo độ hấp phụ quang học ở bước sóng 535 nm cho thấy Pg-PC tan tốt nhất trong đệm Na-acetate pH 4,5 với hàm lượng $1,45 \pm 0,042 \mu\text{g/mL}$, trong khi đó Pg-PC không tan trong đệm pH 1,2. Trong đệm phosphate pH 6,8 Pg-PC tan ít hơn, đạt $0,32 \pm 0,004 \mu\text{g/mL}$. Như vậy, Pg tự do không tan trong đệm nhưng phức hợp Pg-PC có khả năng phân tán trong đệm có pH 4,5-6,8. Kết quả đạt được đúng với mục tiêu đặt ra là làm tăng độ phân tán của hoạt chất trong môi trường nước nhằm làm tăng tính sinh khả dụng của hoạt chất.

KẾT LUẬN

Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi đã tạo được phức hợp Pg với phospholipid làm tăng độ bền và tính tan so với hoạt chất tự do góp phần làm tăng hoạt tính sinh học và tính sinh khả dụng của hoạt chất. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu đã được công bố về nghiên cứu tạo phức hợp hoạt chất với phospholipid. Kết quả thu được có thể tiếp tục sử dụng cho nghiên cứu thử nghiệm hoạt tính sinh học của phức hợp trong điều kiện *in vivo*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi TT, Nguyễn TH, Phan KS (2018). Nghiên cứu bào chế curcumin dạng phytosome và dạng PEG hóa. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Y Dược* 34(1): 29-41.
- Duzhak AB, Panfilova ZL, Duzhak TG, Vasyunina EA, Shternshis MV (2012). Role of prodigiosin and chitinases in antagonistic activity of the bacterium *Serratia marcescens* against the fungus *Didymella applanata*. *Biochem (Mosc)* 77: 910-916.
- Freag MS, Elnaggar YSR, Abdallah OY (2013). Lyophilized phytosomal nanocarriers as platforms for enhanced diosmin delivery: optimization and ex vivo permeation. *Int J Nanomedicine* 8: 2385-2397.
- Gulani C, Bhattacharya S, Das A (2012). Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials. *Malaysian J Microbiol* 8: 116-122.
- Hao H, Jia Y, Han R, Amp IA (2013). Phytosomes: an effective approach to enhance the oral bioavailability of active constituents extracted from plants. *J Chin Pharm Sci* 22(5): 385-392.
- Papireddy K, Smilkstein M, Kelly JM, Shweta, Salem SM, Alhamadsheh M, Haynes SW, Challis, CL, Reynolds KA (2011). Antimalarial activity of natural and synthetic prodiginines. *J Med Chem* 54: 5296-5306.
- Prasanna H, Ramesh K, Rashmi V (2013). Preparation and evaluation of Bocopa-Phospholipid complex for anti-amnesic activity. *Drug invent today* 5: 13-21.
- Samrot AV, Chandana K, Senthilkumar P, Narendra KG (2011). Optimization of Prodigiosin production by *Serratia marcescens* SU-10 and evaluation of its bioactivity. *Int Res J Biotechnol* 2(5): 128-133.
- Song MJ, Bae J, Lee DS, Kim CH, Kim JS, Kim SW, Hong SI (2006). Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. *J Biosci Bioeng* 101(2): 157-61.
- Songia S, Mortellaro A, Taverna S, Fornasiero C, Scheiber EA, Erba E, Colotta F, Mantovani A, Isetta AM, Golay J (1997). Characterization of the new immunosuppressive drug undecyl Prodigiosin in human lymphocytes. *J Immunol* 153: 3987-3995.
- Vankudri R, Habbu P, Hiremath M, Kumar PMR, Iliger S, Savant C, Patil BS (2017). Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study of quercetin-phospholipid complex in rats. *Int J Res Pharm Sci* 8(1): 59-69.
- Xu K, Liu B, Ma Y (2009). Physicochemical properties and antioxidant activities of luteolin-phospholipid complex. *Molecules* 14(9): 3486-3493.

PREPARING COMPLEX OF PRODIGIOSIN FROM *Serratia marcescens* AND PHOSPHOLIPID

Nguyen Thi Thao, Do Thi Tuyen, Nguyen Thi Anh Tuyet, Nguyen Sy Le Thanh, Le Thanh Hoang, Nguyen Thi Hien Trang

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Prodigiosin (Pg), a family of natural red pigments are produced by various bacteria that first characterized from *Serratia marcescens*. It has been demonstrated having anti-bacterial, anti-fungal, anti-neoplastic, anti-oxidant,

anti-malarial properties, etc. and especially, anti-cancer activity on 60 cancer cell lines. However, Pg has been reported to be a water-insoluble compound, soluble in solvents, which affects to use of Pg in therapy. In this study, Pg has been prepared to create a complex with phospholipid (phosphatidylcholine, PC) to increase the solubility and stability of Pg, thereby increasing its bioactivity. The Pg-PC complex was formed the best with a molar ratio of 1: 1 at 40°C for 2 hours (83.7%) or at 50°C for 1 hour (80.93%). The amount of Pg in Pg-PC complex reached 51.7%. The weak links in Pg-PC complex was characterized by IR and UV-VIS spectrum. The Pg-PC complex has average size of 391.8 nm and zeta potential of 6.98 mV higher than zeta potential of Pg (-3.62 mV). The solubility of Pg-PC was the best in Na-acetate buffer pH 4.5 (1.45 ± 0.042 $\mu\text{g/mL}$).

Keywords: Phosphatidylcholine, prodigiosin, prodigiosin phospholipid complex, size complex, zeta potential.