

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG HẤP THỤ VÀ PHÓNG THÍCH THUỐC CỦA HẠT CHITOSAN RỖNG

Phạm Thị Phương Thùy

Khoa Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Các loại thuốc có thời gian bán thải ngắn thường được yêu cầu phải bổ sung định kỳ theo thời gian để đảm bảo hiệu quả của thuốc trong việc điều trị. Vì vậy, các loại vật liệu có khả năng nhả thuốc chậm theo thời gian được quan tâm nghiên cứu nhiều. Trong đó, chitosan dạng hạt rỗng được chú ý do có thể hấp thụ thuốc với hiệu suất cao. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát khả năng hấp thụ và phóng thích thuốc của hạt chitosan có cấu trúc rỗng được tổng hợp bằng phương pháp tạo gel với sodium tripolyphosphate. Ampicillin và cefaclor được chọn để khảo sát do có thời gian bán thải ngắn và liều lượng sử dụng cao. Kết quả cho thấy ampicillin được hấp thụ với hiệu suất đạt 75,51% và phóng thích tối đa 80,03% lượng thuốc trong hạt. Với cefaclor, hiệu suất hấp thụ đạt 75,23%, tuy nhiên lượng thuốc phóng thích ra dịch dạ dày có thể lên đến 99,83% lượng thuốc đã hấp thụ. Hạt chitosan rỗng có khả năng nhả chậm các thuốc hấp thụ trong thời gian 8 giờ. Các kháng sinh sau khi phóng thích vẫn giữ được hoạt tính kháng *E. coli*.

Keywords: Ampicillin, cefaclor, chitosan, hạt rỗng, phóng thích.

MỞ ĐẦU

Chitosan, sản phẩm deacetyl hóa của chitin, được quan tâm nghiên cứu nhiều nhờ khả năng phân hủy sinh học và tính tương thích sinh học cao (Cheung *et al.*, 2015). Với vai trò là một polymer sinh học, chitosan được chế tạo linh hoạt thành các dạng vật liệu khác nhau như dạng màng, dạng gel, dạng sợi, dạng hạt,... để đáp ứng các yêu cầu chuyên biệt trong các ứng dụng thuộc lĩnh vực y dược (Zhang *et al.*, 2002). Khi được ứng dụng làm vật liệu dẫn truyền thuốc dạng nổi trong dạ dày, chitosan với cấu trúc dạng hạt rỗng được đặc biệt chú ý do có tỷ trọng thấp (Svirskis *et al.*, 2014). Tuy nhiên, hầu hết các kỹ thuật chế tạo hạt chitosan rỗng được thực hiện trong điều kiện phản ứng khắc nghiệt và sử dụng dung môi hữu cơ độc hại làm ảnh hưởng đến khả năng tương thích sinh học của vật liệu (Caruso *et al.*, 2001). Phương pháp tạo gel ionic trong sodium tripolyphosphate (STPP), một phụ gia được cho phép sử dụng trong thực phẩm, là một phương pháp phổ biến để chế tạo hạt chitosan làm vật liệu mang thuốc, nhưng cho đến nay các nghiên cứu về hạt chitosan rỗng được chế tạo bằng phương pháp này vẫn còn rất hạn chế. Svirskis và đồng tác giả (2014) đã tổng hợp hạt chitosan rỗng mang acyclovir và cho thấy hiệu suất hấp thụ thuốc đạt khá cao ($70,5 \pm 0,31\%$). Kết quả cũng cho thấy hạt chitosan rỗng có khả năng phóng thích acyclovir chậm trong dung dịch HCl 0,1 M (pH = 1,2) (Svirskis *et al.*, 2014). Ghodsi và đồng tác giả (2012) khảo sát khả năng phóng thích kháng sinh vancomycin của hạt chitosan liên kết chéo với glutaraldehyde và cho thấy hiệu suất hấp thụ thuốc dao động trong khoảng 30 - 80%. Vancomycin được giải phóng 10 - 30% trong 12h đầu và nhả chậm liên tục trong 8 ngày (Ghodsi *et al.*, 2012).

Trong nghiên cứu này, hạt chitosan rỗng chứa cefaclor và ampicillin được khảo sát khả năng phóng thích thuốc trong môi trường dịch dạ dày và dịch ruột nhân tạo. Cefaclor là một kháng sinh phổ rộng, thuộc họ cephalosporin thế hệ hai. Cefaclor được hấp thụ tốt trong cơ thể, với nồng độ cao nhất trong huyết thanh được ghi nhận sau 30 - 60 phút (Rasool, Fahmy, 2013). Cefaclor được bài tiết nhanh qua nước tiểu, thời gian bán thải khoảng 2 giờ (Wise, 1990). Ampicillin là một kháng sinh đường uống thuộc nhóm penicillin được sử dụng khá phổ biến. Tuy nhiên, ampicillin cần được sử dụng nhiều lần trong ngày để phát huy tác dụng vì thời gian bán thải chỉ khoảng 0,75 - 1,5 giờ (Anal *et al.*, 2006). Do đó, với thời gian bán thải ngắn và liều lượng cần sử dụng cao, cefaclor và ampicillin được chọn để khảo sát khả năng nhả chậm trong nghiên cứu này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nguyên liệu được sử dụng trong nghiên cứu gồm chitosan (khối lượng phân tử 205,6 kDa) được tổng hợp từ chitin có nguồn gốc từ phế liệu tôm (Việt Nam). Hóa chất được sử dụng gồm acetic acid (Trung Quốc), sodium tripolyphosphate (STPP) ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) (Trung Quốc), cefaclor (Sigma), ampicillin (Sigma). Dịch dạ dày nhân tạo (SGF, pH = 1,2) được chuẩn bị với thành phần gồm 150 mM NaCl (Trung Quốc), 10 mM CaCl_2 (Trung Quốc),

0,5 g/L pepsin (Trung Quốc), HCl (Trung Quốc). Dịch ruột nhân tạo (SIF, pH = 6,8) được chuẩn bị với thành phần gồm 10 mM KH₂PO₄ (Trung Quốc), 2,4 g/L pancreatin (Trung Quốc) và NaOH (Trung Quốc).

Phương pháp

Chế tạo hạt chitosan rỗng mang thuốc

Hạt chitosan rỗng mang thuốc được chế tạo bằng phương pháp tạo gel ionic trong dung dịch STPP 1% (w/v) (pH = 9). Dung dịch chitosan 2% (w/v) được pha trong dung dịch acetic acid 1% (v/v) sau đó được thêm vào 1% (v/v) dung dịch kháng sinh có nồng độ 1000 mg/L. Nồng độ kháng sinh được chọn theo Anal *et al.* (2006). Hỗn hợp được nhỏ từ từ vào dung dịch STPP và khuấy ở 120 rpm trong 2 giờ. Hạt tạo thành được rửa với nước cất và bảo quản ở 4°C.

Khảo sát khả năng hấp thụ thuốc của hạt chitosan rỗng

Hạt chitosan mang thuốc được cho vào dịch dạ dày nhân tạo có pH = 1,2 cho đến khi hạt tan hoàn toàn. Hỗn hợp sau đó được ly tâm thu dịch nổi và hàm lượng thuốc trong dịch nổi được xác định bằng cách đo OD (Optima UV-VIS SP-3000 nano, Nhật Bản) ở bước sóng 210 nm và 265 nm, tương ứng cho ampicillin và cefaclor. Hiệu suất hấp thụ được tính theo công thức:

$$\text{Hiệu suất hấp thụ} = \frac{\text{Nồng độ thuốc trong dịch nổi}}{\text{Nồng độ thuốc ban đầu}} \times 100\%$$

Khảo sát khả năng phóng thích thuốc của hạt chitosan rỗng

Hạt chitosan chứa ampicillin và cefaclor được khảo sát khả năng phóng thích thuốc trong dịch dạ dày nhân tạo (SGF) và dịch ruột nhân tạo (SIF) trong 8 giờ. Mẫu được lấy sau mỗi 1 giờ thí nghiệm và lượng thuốc phóng thích được xác định bằng cách đo OD (Optima UV-VIS SP-3000 nano, Nhật Bản) ở bước sóng 210 nm và 265 nm, tương ứng cho ampicillin và cefaclor. Hiệu suất phóng thích được tính theo công thức:

$$\text{Hiệu suất phóng thích} = \frac{\text{Lượng thuốc trong hạt}}{\text{Lượng thuốc phóng thích}} \times 100\%$$

Trong đó, lượng thuốc trong hạt được tính dựa trên hiệu suất hấp thụ, lượng thuốc phóng thích được tính dựa trên nồng độ thuốc trong dịch dạ dày nhân tạo sau 8 giờ.

Khảo sát khả năng kháng khuẩn của kháng sinh phóng thích từ hạt chitosan rỗng

Hạt chitosan chứa kháng sinh (1 g) được cho vào 30 mL dịch dạ dày nhân tạo để hạt tan hoàn toàn và phóng thích toàn bộ kháng sinh. Khả năng kháng khuẩn của kháng sinh phóng thích từ hạt chitosan được khảo sát bằng phương pháp đục lỗ thạch trên đĩa môi trường LB đã cấy trái *E. coli*. Mẫu đối chứng là dịch dạ dày nhân tạo khi hạt chitosan không mang thuốc tan hoàn toàn. Khả năng kháng *E. coli* được xác định thông qua kích thước vòng kháng khuẩn sau 24 giờ ủ mẫu.

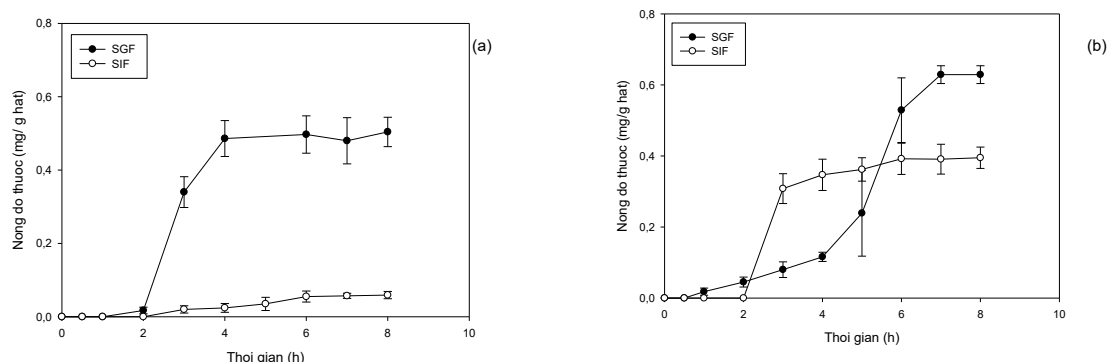
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hiệu suất hấp thụ và phóng thích thuốc của hạt chitosan rỗng sau 8 giờ được trình bày ở Bảng 1. Kết quả cho thấy ampicillin và cefaclor được hấp thụ với hiệu suất tương ứng đạt $75,51 \pm 15,41\%$ và $75,23 \pm 2,56\%$ lượng thuốc ban đầu. Hiệu suất hấp thụ thuốc thấp hơn 100% cho thấy một lượng thuốc đã bị thất thoát trong dung dịch STPP khi khuấy để cấu trúc hạt ổn định. Theo Dương Thị Ánh Tuyết và đồng tác giả (2011), khi sử dụng nano chitosan để hấp thụ insulin, hiệu suất hấp thụ insulin vào hạt đạt 56 - 96%. Porras-Gómez và đồng tác giả (2018) cũng công bố kết quả tương tự với hiệu suất hấp thụ chỉ đạt 50% khi sử dụng hạt nano chitosan với tác nhân nổi ngang là STPP để hấp thụ ampicillin.

Bảng 1. Hiệu suất hấp thụ và phóng thích thuốc

Thuốc khảo sát	Hiệu suất hấp thụ (%)	Lượng thuốc trong hạt (mg/g hạt)	Lượng thuốc phóng thích (mg/g hạt)	Hiệu suất phóng thích (%)
Ampicillin	$75,51 \pm 15,41$	$0,63 \pm 0,12$	$0,504 \pm 0,04$	$80,03 \pm 0,06$
Cefaclor	$75,23 \pm 2,56$	$0,63 \pm 0,02$	$0,629 \pm 0,03$	$99,83 \pm 0,04$

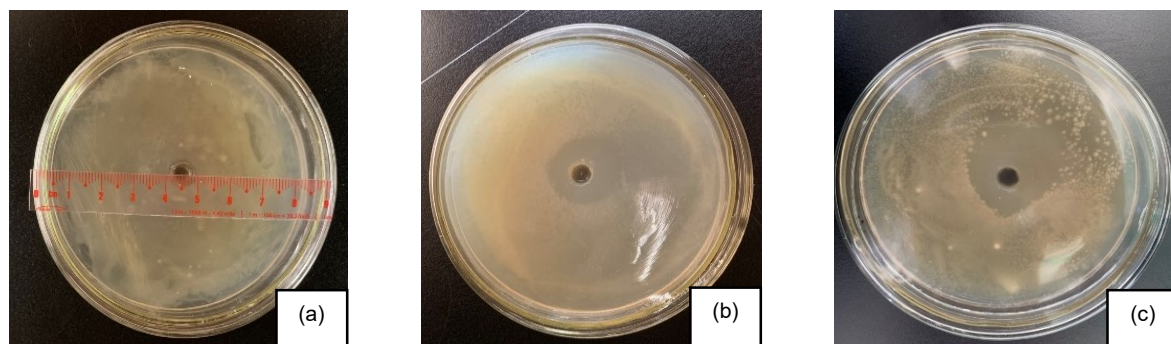
Kết quả hiệu suất phóng thích thuốc cho thấy cefaclor được nhả vào dịch dạ dày nhân tạo gần như hoàn toàn sau 8 giờ thí nghiệm. Kết quả này cao hơn công bố của Dutta và đồng tác giả (2003) khi ghi nhận hiệu suất phóng thích cefaclor từ hạt chitosan đạt 88,64% sau 8 giờ ở môi trường pH = 1,2. Rasool và Fahmy (2013) cho thấy sau 9 giờ, 80% cefaclor được phóng thích vào môi trường dạ dày từ hạt chitosan đặc có liên kết với alginate. Với ampicillin, hiệu suất phóng thích trong nghiên cứu này đạt $80,03 \pm 0,06\%$, cao hơn so với hạt chitosan đặc trong nghiên cứu của Chandy và Sharma (1993) với hiệu suất chỉ đạt 36 - 50% sau 24 giờ trong dịch dạ dày.



Hình 1. Sự phóng thích ampicillin (a) và cefaclor (b) từ hạt chitosan rỗng theo thời gian

Khả năng phóng thích thuốc của hạt chitosan rỗng trong môi trường dịch dạ dày nhân tạo (pH = 1,2) và dịch ruột nhân tạo (pH = 6,8) được thể hiện ở Hình 1. Trong dịch dạ dày nhân tạo, cefaclor được phóng thích với nồng độ cao nhất đạt $0,629 \pm 0,025$ (mg/g hạt) sau 7 giờ và đạt trạng thái bão hòa sau 8 giờ (Hình 1b). Với ampicillin, thuốc cũng được phóng thích nhiều hơn trong dịch dạ dày nhân tạo, tuy nhiên lượng thuốc phóng thích chỉ đạt $0,504 \pm 0,04$ (mg/g hạt) sau 8 giờ, thấp hơn so với cefaclor. Trong môi trường dịch ruột nhân tạo có pH trung tính, hai loại kháng sinh được phóng thích ra ít hơn so với dịch dạ dày. Kết quả này có thể được giải thích bởi sự proton hóa các phân tử STPP làm cho các liên kết ngang giữa chitosan và STPP kém bền, dẫn đến hạt chitosan bị trương phồng và phóng thích thuốc nhiều hơn (Mendes *et al.*, 2016). Trong môi trường pH trung tính, hạt chitosan có cấu trúc bền, ít bị trương nở nên thuốc vẫn được giữ lại trong hạt (Anal *et al.*, 2006). Chandy và Sharma (1993) khảo sát khả năng nhả thuốc của hạt chitosan đặc và cho thấy 71,5% ampicillin được phóng thích trong dịch dạ dày trong khi ở môi trường đệm phosphate, chỉ 36% ampicillin được giải phóng, tương tự với kết quả ở nghiên cứu này. Kết quả phóng thích cho thấy thuốc được nhả chậm từ hạt chitosan rỗng, từ đó cho thấy khả năng ứng dụng của hạt chitosan rỗng làm vật liệu dẫn truyền thuốc.

Ampicillin và cefaclor được chọn làm mẫu thuốc trong nghiên cứu này đều có bản chất kháng sinh với cơ chế ức chế sự tổng hợp thành tế bào vi khuẩn. Vì vậy khả năng kháng *E. coli* của thuốc phóng thích từ hạt chitosan được khảo sát để đảm bảo kháng sinh không bị mất hoạt tính sau khi được hấp thụ vào hạt. Hoạt tính kháng *E. coli* của kháng sinh được đánh giá qua vòng vô khuẩn trên đĩa thạch. Kết quả cho thấy không có sự xuất hiện của vòng vô khuẩn ở mẫu đối chứng sử dụng hạt chitosan không mang thuốc (Hình 2a). Ở đĩa có bổ sung dịch dạ dày nhân tạo khi hạt chitosan mang cefaclor tan hoàn toàn, vòng kháng khuẩn đạt $3,5 \pm 0,1$ (cm), cao hơn so với ampicillin với vòng kháng khuẩn đạt $2,93 \pm 0,5$ (cm) (Hình 2b,c). Điều này có thể giải thích do lượng cefaclor được phóng thích ra nhiều hơn so với ampicillin như đã trình bày ở kết quả trước. Từ đó có thể kết luận hạt chitosan rỗng có khả năng chứa được một lượng lớn thuốc nhưng vẫn đảm bảo hoạt tính của thuốc sau khi phóng thích ra khỏi hạt.



Hình 2. Kết quả kháng khuẩn của kháng sinh phóng thích từ hạt chitosan rỗng.
(a) không có kháng sinh, (b) ampicillin, (c) cefaclor

KẾT LUẬN

Hạt chitosan rỗng được tổng hợp bằng phương pháp tạo gel trong sodium tripolyphosphate có khả năng hấp thụ và nhả chậm thuốc trong các môi trường dịch dạ dày và dịch ruột nhân tạo. Ampicillin được hấp thụ với hiệu suất đạt 75,51% và phóng thích tối đa 80,03% lượng thuốc trong hạt. Với cefaclor, hiệu suất hấp thụ đạt 75,23%, tuy nhiên lượng thuốc phóng thích ra dịch dạ dày có thể lên đến 99,83% lượng thuốc đã hấp thụ. Hạt chitosan rỗng có khả năng nhả chậm các thuốc hấp thụ trong thời gian 8 giờ. Các kháng sinh sau khi phóng thích vẫn giữ được hoạt tính kháng *E. coli*. Các kết quả này cho thấy hạt chitosan rỗng có tiềm năng ứng dụng cao làm vật liệu dẫn truyền thuốc qua đường uống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anal AK, Stevens WF, Remuñá-López C (2006). Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *Int J Pharm* 312: 166-173.
- Caruso F, Spasova M, Salgueirio-Maceira V, Liz-Marzán LM (2001). Multilayer assemblies of silica-encapsulated gold nanoparticles on decomposable colloid templates. *Adv Mater* 13: 1090-1094.
- Chandy T, Sharma CP (1993). Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin. *Biomaterials* 14: 939-944.
- Cheung RCF, Ng TB, Wong TH, Chan WY (2015). Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Mar Drugs* 13(8): 5156-5186.
- Dương Thị Ánh Tuyết, Võ Quốc Khương, Phan Huê Phương, Nguyễn Thị Phương Phong (2011). Nghiên cứu chế tạo vật liệu nano chitosan làm chất hấp phụ protein ứng dụng trong dẫn truyền thuốc. *Sci Technol Dev* 14: 54-61.
- Dutta PK, Khatua MK, Dutta J, Prasad R (2003). Use of chitosan-DMAc/LiCl gel as drug carriers. *Int J Chem Sci* 1(2): 93-102.
- Ghodsí A, Movaffagh J, Tabassi SAS (2012). Vancomycin loaded chitosan beads as a drug delivery system for local antibiotic delivery in some infections. *Res Pharm Sci* 7: 1-10.
- Mendes AC, Gorzelanny C, Halter N, Schneider SW, Chronakis IS (2016). Hybrid electrospun chitosan-phospholipids nanofibers for transdermal drug delivery. *Int J Pharm* 510: 48-56.
- Porras-Gómez M, Vega-Baudrit J, Núñez-Corales S (2018). Ampicillin-loaded chitosan nanoparticles for *in vitro* antimicrobial screening of *Escherichia coli*. *Intechopen* 245-259
- Rasool BKA, Fahmy SG (2013). Development of coated beads for oral controlled delivery of cefaclor: *In vitro* evaluation. *Acta Pharm* 63: 31-44.
- Svirskis D, Seyfoddin A, Chalabi S, In Kim JH, Langford C, Painter S, Al-Kassas R (2014). Development of mucoadhesive floating hollow beads of acyclovir with gastroretentive properties. *Pharm Dev Technol* 19(5): 571-576.
- Zhang H, Alsarra IA, Neau SH (2002). An *in vitro* evaluation of chitosan-containing multiparticulate system for macromolecular delivery to the colon. *Int J Pharm* 239: 197-205.
- Wise R (1990). The pharmacokinetics of the oral cephalosporins-a review. *Antimicrob Agents Chemother* 26: 13-20.

DRUG ENTRAPMENT AND RELEASE FROM HOLLOW CHITOSAN BEADS

Pham Thi Phuong Thuy

Faculty of Biotechnology - Ho Chi Minh City University of Food Industry

SUMMARY

Drugs with short half-lives generally require multiple doses to ensure clinically effective treatment. Therefore, carriers able to release drugs in a sustained manner are of great interest. Especially, hollow chitosan beads have attracted a considerable attention due to their ability to absorb a large amount of drugs. This study aims to evaluate the entrapment efficiency and release patterns of drugs from hollow chitosan beads fabricated by ionic gelation in sodium tripolyphosphate. Ampicillin and cefaclor were used as model drugs because of their short half-lives and large dose. Results showed that ampicillin entrapment efficiency was 75.51% and release up to 80.03% the loaded content. For cefaclor, the entrapment efficiency was 75.23% but the releasing efficiency could be up to 99.83%. The *in vitro* sustained release pattern of drugs from chitosan hollow beads were obtained during 8 hours. The released antibiotics showed antimicrobial activity towards *E. coli*.

Keywords: Ampicillin, cefaclor, chitosan, hollow beads, release.