

LÂM THỊ THÚY KIỀU

HÓA HỮU CƠ

NĂM 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lâm Thị Thúy Kiều

**NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ
TÍNH CHẤT HỆ NANOLIPOSOME MANG CAO
ETHANOL ỚT ĐỊNH HƯỚNG GÂY ĐỘC TẾ BÀO
TRÊN DÒNG MCF-7**

LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh - Năm 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lâm Thị Thúy Kiều

**NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ
TÍNH CHẤT HỆ NANOLIPOSOME MANG CAO
ETHANOL ỚT ĐỊNH HƯỚNG GÂY ĐỘC TẾ BÀO
TRÊN DÒNG MCF-7**

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 8440114

LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

Hướng dẫn 1: PGS. TS. Nguyễn Đại Hải

Hướng dẫn 2: TS. Võ Đỗ Minh Hoàng

Thành phố Hồ Chí Minh - Năm 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày ... tháng ... năm 20...

Học viên cao học

Lâm Thị Thúy Kiều

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã cho tôi cơ hội được học tập và rèn luyện trong suốt quá trình học từ tháng 6/2021 đến nay.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS. TS. Nguyễn Đại Hải và TS. Võ Đỗ Minh Hoàng đã tận tình hướng dẫn tôi thực hiện đề tài này.

Tôi xin cảm ơn Phòng Vật liệu Y sinh, Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Công nghệ Hóa học và Trường Đại học Trà Vinh đã tạo điều kiện thuận lợi để tôi có thể hoàn thành đề tài.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã động viên tinh thần và hỗ trợ tôi trong thời gian tôi học tập và thực hiện đề tài.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày ... tháng ... năm 20...

Học viên cao học

Lâm Thị Thúy Kiều

MỤC LỤC

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	i
DANH MỤC CÁC BẢNG	iii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	iv
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	2
1.1. VẬT LIỆU NANO PHÂN PHỐI THUỐC	2
1.2. LIPOSOME	4
1.2.1. Giới thiệu về liposome	4
1.2.2. Phân loại liposome	5
1.2.3. Thành phần chính của liposome	7
1.2.4. Phương pháp tổng hợp và giảm kích thước liposome	8
1.2.5. Ứng dụng của liposome phân phối thuốc điều trị ung thư	11
1.3. CAO ỚT	13
1.3.1. Giới thiệu về cao ớt.....	13
1.3.2. Tình hình về nguồn nguyên liệu ớt ở Việt Nam	13
1.3.3. Thành phần hóa học quan trọng trong quả ớt	14
1.3.4. Phương pháp chiết xuất cao ớt.....	15
1.3.5. Hoạt tính sinh học của cao ớt.....	17
CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.1. NGUYÊN LIỆU - HÓA CHẤT VÀ TRANG THIẾT BỊ	19
2.1.1. Nguyên liệu – hóa chất.....	19
2.1.2. Dụng cụ và trang thiết bị.....	20
2.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22

2.2.1. Trích ly và đánh giá các đặc tính hóa lý và hoạt tính sinh học của cao ớt (capsicum oleoresin)	22
2.2.2. Nghiên cứu tổng hợp hệ nanoliposome mang cao ớt.....	25
2.2.3. Đánh giá các đặc trưng lý hóa của hệ nanoliposome mang cao ớt.....	27
2.2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học của hệ nanoliposome mang cao ớt	30
2.2.5. Phân tích thống kê.....	31
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	32
3.1. KẾT QUẢ TRÍCH LY, ĐÁNH GIÁ CÁC ĐẶC TÍNH HÓA LÝ VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO ỚT	32
3.1.1. Kết quả điều chế cao ớt.....	32
3.1.2. Kết quả đánh giá các đặc tính hóa lý của cao ớt.....	33
3.1.3. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học của cao ớt	38
3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP HỆ NANOLIPOSOME NANG HÓA CAO ỚT	39
3.2.1. Kết quả ảnh hưởng thời gian siêu âm đến kích thước hạt và PDI của liposome mang cao ớt	39
3.2.2. Kết quả khảo sát hàm lượng cao ớt nang hóa vào liposome	40
3.3. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ CÁC ĐẶC TÍNH CỦA HỆ NANOLIPOSOME NANG HÓA CAO ỚT.....	45
3.3.1. Kết quả đánh giá các đặc tính hóa lý	45
3.3.2. Kết quả xác định hiệu suất nang hóa và hàm lượng tải cao ớt của hệ nanoliposome	48
3.3.3. Kết quả đánh giá sự ổn định của hệ nanoliposome nang hóa cao ớt	49
3.3.4. Kết quả đánh giá khả năng phóng thích capsaicin của hệ nanoliposome mang cao ớt	51

3.4. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA HỆ NANOLIPOSOME MANG CAO ỚT	52
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	57
4.1. KẾT LUẬN.....	57
4.2. KIẾN NGHỊ.....	58
TÀI LIỆU THAM KHẢO	59
DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC.....	65
PHỤ LỤC.....	67

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Từ đầy đủ	Nghĩa tiếng Việt
AFM	Atomic force microscopy	Hiển vi lực nguyên tử
CLSM	Confocal laser scanning microscopy	Hiển vi quét laser đồng tiêu
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide	Tên hóa chất
CV	Cell viability	Khả năng sống sót của tế bào
DLS	Dynamic light scattering	Tán xạ ánh sáng động
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium	Môi trường nuôi cấy tế bào
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	Tên hóa chất liên quan gốc tự do
DSC	Differential scanning calorimetry	Phân tích nhiệt lượng vi sai
EE	Entrapment efficiency	Hiệu suất nang hóa
EMA	European Medicines Agency	Cơ quan Dược phẩm Châu Âu
ESEM	Environmental scanning electron microscope	Hiển vi điện tử quét môi trường
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh bào thai bò
FDA	Food and Drug Administration	Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
GUV	Giant unilamellar vesicle	Liposome đơn lớp kích thước khổng lồ
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
ITC	Isothermal titration calorimetry	Phân tích nhiệt lượng chuẩn độ đẳng nhiệt
LC	Loading capacity	Hàm lượng tải

LNP	Lipid nanoparticle	Hạt nano lipid
LUV	Large unilamellar vesicle	Liposome đơn lớp kích thước lớn
MAE	Microwave assisted extraction	Chiết được hỗ trợ vi sóng
MLV	Multilamellar vesicle	Liposome đa lớp
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	Thuốc nhuộm tetrazolium
MVV	Multivesicular vesicle	Liposome đa nang
MWCO	Molecular weight cut-off	Ngưỡng trọng lượng phân tử
NLC	Nanostructured lipid carrier	Chất mang lipid có cấu trúc nano
CO	Capsicum oleoresin	Cao ớt
PBS	Phosphate-buffered saline	Dung dịch muối đệm phosphat
PDI	Polydispersity index	Chỉ số đa phân tán
PEG	Polyethylene glycol	Tên hóa chất
PL	Phospholipid	Tên hóa chất
PTA	Phosphotungstic acid	Tên hóa chất
RNase	Ribonuclease	Một họ enzyme
SFE	Supercritical fluid extraction	Chiết dung môi siêu tới hạn
SLN	Solid lipid nanoparticle	Hạt nano lipid rắn
SUV	Small unilamellar vesicle	Liposome đơn lớp kích thước nhỏ
TEM	Transmission electron microscopy	Hiển vi điện tử truyền qua
UAE	Ultrasonication assisted extraction	Chiết được hỗ trợ sóng siêu âm
v/v	Volume/volume	Phần trăm theo thể tích
w/v	Weight/ volume	Phần trăm khối lượng/thể tích
w/w	Weight/weight	Phần trăm theo khối lượng
WST	Water soluble tetrazolium	Thuốc nhuộm tetrazolium tan được trong nước

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1 Phân loại liposome theo kích thước và số lớp.....	5
Bảng 2.1 Danh mục hóa chất sử dụng trong nghiên cứu.....	20
Bảng 2.2 Danh mục các trang thiết bị và dụng cụ.....	21
Bảng 3.1 Hiệu suất điều chế cao ốt.....	32
Bảng 3.2 Kết quả kiểm tra tính tương thích hệ thống.....	36
Bảng 3.3 Mối liên hệ giữa nồng độ và diện tích peak của các mẫu chuẩn.....	37
Bảng 3.4 Kết quả định lượng capsaicin trong cao ốt.....	38
Bảng 3.5 Kết quả ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến kích thước hạt và PDI của liposome mang 30% cao ốt.....	39
Bảng 3.6 Kết quả khảo sát kích thước hạt, PDI, thế zeta của các mẫu liposome mang cao ốt với hàm lượng cao ốt khác nhau theo thời gian.....	42
Bảng 3.7 Kết quả kích thước hạt, PDI và thế zeta của mẫu liposome mang 40% cao ốt (LC4).....	45
Bảng 3.8 Kết quả định lượng capsaicin trong mẫu liposome mang 40% cao ốt (LC4) trước và sau khi loại cao ốt tự do.....	48
Bảng 3.9 Kết quả kích thước hạt, PDI và thế zeta của mẫu liposome mang 40% cao ốt (LC4).....	49
Bảng 3.10 Tỷ lệ phóng thích capsaicin của hệ nanoliposome mang cao ốt so với cao ốt tự do.....	51
Bảng 3.11 Tỷ lệ sống của tế bào MCF-7 dưới tác dụng của liposome, cao ốt và liposome mang cao ốt.....	53

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1 Cấu trúc của các loại hạt nano dựa trên lipid.....	3
Hình 1.2 Cấu trúc cơ bản của liposome	4
Hình 1.3 Phân loại liposome theo kích thước hạt và số lớp phospholipid kép. 5	
Hình 1.4 Phân loại liposome theo đặc điểm biến tính bề mặt	6
Hình 1.5 Công thức cấu tạo của cholesterol, lecithin và CTAB.....	8
Hình 1.6 Sơ đồ tổng hợp liposome bằng phương pháp hydrate hóa màng lipid	8
Hình 1.7 Sơ đồ tổng hợp liposome bằng phương pháp bốc hơi pha đảo.....	10
Hình 1.8 Hiệu ứng tăng cường tính thấm và lưu giữ (EPR).....	12
Hình 1.9 Các hợp chất capsaicinoid trong quả ớt	14
Hình 2.1 Mẫu quả ớt <i>Capsicum frutescens</i> L.....	19
Hình 2.2 Quy trình điều chế cao ớt.....	23
Hình 2.3 Quy trình tổng hợp hệ nanoliposome mang cao ớt.....	26
Hình 3.1 Sản phẩm cao ớt chiết được	32
Hình 3.2 Phổ FTIR của cao ớt đo trên thiết bị NICOLET iS10	33
Hình 3.3 Cấu trúc vanillylamide trong các capsaicinoid	33
Hình 3.4 Tính đặc hiệu của phương pháp định lượng capsaicin trong cao ớt	34
Hình 3.5 Tính đặc hiệu của phương pháp định lượng capsaicin trong liposome mang cao ớt	34
Hình 3.6 Phổ UV-Vis của mẫu chuẩn capsaicin và các mẫu thử	35
Hình 3.7 Đường biểu diễn mối liên hệ giữa nồng độ và diện tích peak của capsaicin	37
Hình 3.8 Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến kích thước hạt và PDI của liposome mang 30% cao ớt.....	40

Hình 3.9 Các mẫu sản phẩm nanoliposome mang cao ốt với hàm lượng cao ốt khác nhau.....	41
Hình 3.10 Hiện tượng kém bền của mẫu liposome mang 50% cao ốt (LC5).	41
Hình 3.11 Kích thước hạt của các mẫu liposome mang cao ốt với hàm lượng cao ốt khác nhau theo thời gian	44
Hình 3.12 PDI của các mẫu liposome mang cao ốt với hàm lượng cao ốt khác nhau theo thời gian.....	44
Hình 3.13 Thế zeta của các mẫu liposome mang cao ốt với hàm lượng cao ốt khác nhau theo thời gian	44
Hình 3.14 Các đặc tính lý hóa của mẫu liposome 40% mang cao ốt (LC4)...	46
Hình 3.15 Ảnh TEM của mẫu liposome mang 40% cao ốt (LC4)	46
Hình 3.16 Phổ FTIR của liposome và liposome mang cao ốt	47
Hình 3.17 Kích thước hạt và PDI của mẫu liposome mang 40% cao ốt (LC4) theo thời gian.....	50
Hình 3.18 Thế zeta của mẫu liposome mang 40% cao ốt (LC4) theo thời gian	50
Hình 3.19 Khả năng phóng thích của liposome mang cao ốt và cao ốt tự do	52
Hình 3.20 Tỷ lệ tế bào MCF-7 sống dưới tác dụng của liposome và liposome mang cao ốt. (*) $p < 0,05$ so sánh với liposome	54
Hình 3.21 Tỷ lệ tế bào MCF-7 sống dưới tác dụng của cao ốt và liposome mang cao ốt. (*) $p < 0,05$ so sánh với cao ốt	54
Hình 3.22 Ảnh tế bào MCF-7 sống dưới tác dụng của liposome, cao ốt và liposome mang cao ốt	55
Hình 3.23 Tỷ lệ tế bào MCF-7 sống dưới tác dụng của capsaicin theo nghiên cứu của Chang (2011)	56

MỞ ĐẦU

Hiện nay, thuốc và sản phẩm chăm sóc sức khỏe có nguồn gốc tự nhiên ngày càng chiếm ưu thế trong ngành Dược hiện đại. Xu hướng này kết hợp việc khai thác kinh nghiệm y học cổ truyền phong phú và nền văn minh ẩm thực đa dạng của các dân tộc phương Đông, cùng với những thành tựu đạt được trong công nghệ chiết xuất tinh chế các hợp chất tự nhiên, và những tiềm năng to lớn về nguồn tài nguyên sinh học nhiệt đới là những tiền đề quan trọng để đẩy mạnh nghiên cứu các hoạt chất tự nhiên có hoạt tính sinh học nhằm ứng dụng trong điều trị bệnh cũng như chăm sóc sức khỏe con người.

Cao ớt (*Capsicum oleoresin*) là một sản phẩm chiết xuất dung môi hữu cơ từ quả của cây ớt, thuộc chi *Capsicum*. Cao ớt được sử dụng rộng rãi như một chất phụ gia thực phẩm để bảo quản và tăng cường hương vị. Hơn thế nữa, chiết xuất ethanol cao ớt đã được báo cáo có nhiều hoạt tính sinh học khác nhau như chống ung thư, chống béo phì, chống oxy hóa và chống viêm. Tuy nhiên, trong lĩnh vực Dược hiện nay, việc ứng dụng cao ớt bị hạn chế bởi một số nhược điểm của nó như mùi vị cay nồng, cảm giác nóng rát khi tiếp xúc, độ hòa tan thấp và sinh khả dụng kém.

Chính vì thế, một số phương pháp bao bọc và dẫn truyền dược chất có thể được áp dụng để khắc phục những hạn chế này. Trong số đó, các vật liệu có tính tương hợp sinh học như liposome được báo cáo nhiều trong những thập kỷ gần đây. Liposome với cấu trúc tương tự màng tế bào và độ tương hợp sinh học cao giúp xâm nhập vào mô tế bào thông qua hệ tuần hoàn mà không gây độc cho tế bào, tăng cường tập trung thuốc ở mô đích và nhà chứa thuốc. So với các chất mang khác, liposome là một trong những hệ vận chuyển hoạt chất rất tiềm năng.

Với những lý do trên, đề tài “**Nghiên cứu tổng hợp và đánh giá tính chất hệ nanoliposome mang cao ethanol ớt định hướng gây độc tế bào trên dòng MCF-7**” được tiến hành với mong muốn bước đầu thông qua việc nang hóa cao ớt bên trong hệ chất mang nanoliposome sẽ giúp hạn chế tác dụng phụ, tăng sinh khả dụng của cao ớt, sau đó có thể hướng đến nghiên cứu kiểm soát giải phóng thuốc và phân phối thuốc đúng mục tiêu. Do đó, ngoài ý nghĩa về mặt khoa học, nghiên cứu còn mang ý nghĩa thực tiễn góp phần ứng dụng hoạt chất tiềm năng này trong lĩnh vực điều trị bệnh và chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. VẬT LIỆU NANO PHÂN PHỐI THUỐC

Sự phát triển của vật liệu nano mang thuốc ứng dụng trong lĩnh vực y sinh đã thu hút nhiều sự chú ý trong những thập kỷ qua. Các nỗ lực nghiên cứu đã được tập trung vào việc xây dựng các hệ thống phân phối thuốc khác nhau, nhằm khắc phục những hạn chế của các dạng bào chế thông thường và để đảm bảo cải thiện sinh khả dụng, giảm tác dụng phụ, giải phóng thuốc được kiểm soát và phân phối đúng mục tiêu.

Vật liệu nano phân phối thuốc nền vô cơ đã đạt được thành tựu nổi bật như hạt nano silica trung tính được chức năng hóa cho thấy phản ứng khi thay đổi kích thích xung quanh, chẳng hạn như nhiệt độ, pH, oxy hóa khử, ánh sáng, siêu âm, từ trường hoặc điện trường, enzyme, oxy hóa khử, ROS (reactive oxygen species), glucose và ATP (Adenosin Triphosphat), hoặc sự kết hợp của chúng, liên tục đã cách mạng hóa các ứng dụng tiềm năng của hạt nano silica trung tính trong kỹ thuật y sinh [1].

Bên cạnh đó, *vật liệu nano phân phối thuốc nền hữu cơ* đã đạt nhiều tiến bộ vượt bậc. Trong đó phát triển mạnh mẽ nhất là các vật liệu nano mang thuốc dựa trên cơ sở lipid (lipid nanoparticle, LNP). LNP đã đóng một vai trò quan trọng trong sự thành công của nhiều loại thuốc điều trị ung thư và được coi là vật liệu dẫn đầu trong hệ thống phân phối thuốc ở kích thước nano. LNP được phân thành 5 loại tùy thuộc vào phương pháp chế tạo và các đặc tính hóa lý của công thức, bao gồm: liposome, niosome, transfersome, các hạt nano lipid rắn và chất mang lipid có cấu trúc nano. Các LNP đều có cấu trúc tiểu cầu đặc trưng, nhưng chủ yếu khác nhau về loại thành phần cấu trúc (hình 1.1) [2,3].

Liposome: Liposome được cấu trúc bởi phospholipid và cholesterol, là những thành phần tương tự cấu trúc của màng tế bào nên độ tương hợp sinh học cao, giúp xâm nhập vào mô tế bào thông qua hệ tuần hoàn mà không gây độc cho tế bào, có khả năng bảo vệ thuốc và tăng cường tập trung thuốc ở mô đích và nhả chậm thuốc. Tuy nhiên, liposome có một số nhược điểm như độ ổn định bảo quản thấp do rò rỉ thuốc trong môi trường.

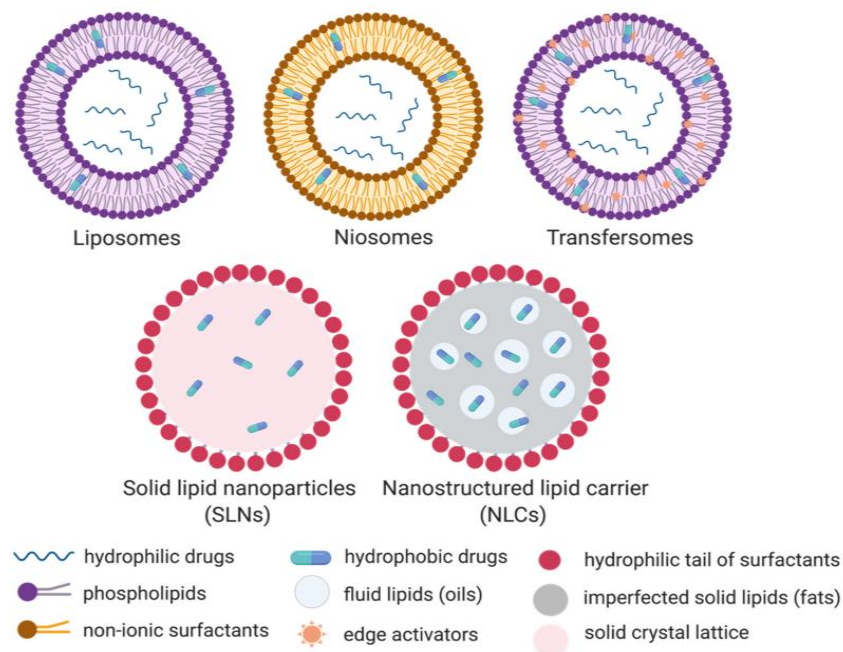
Niosome: Niosome được hình thành bởi các chất hoạt động bề mặt không ion và cholesterol trong môi trường nước. Hơn nữa, lớp vỏ trung tính của chúng

thể hiện khả năng tương thích khi so sánh với các liposome tích điện dương. Mặc dù có các đặc tính ưu việt, niosome cũng bị rò rỉ thuốc và kết tụ hạt do thiếu lực đẩy ion.

Transfersome: Transfersome là các hạt nano đàn hồi hoặc có thể biến dạng bao gồm phospholipid, chất hoạt hóa cạnh và cholesterol. Việc bổ sung chất hoạt hóa cạnh nâng cao tính linh hoạt của chúng, thúc đẩy sự thâm thấu vào mô cao hơn. Transfersome cho thấy khả năng thâm nhập và hiệu quả bám cao nhất đối với các phân tử ưa mỡ. Sự phân hủy oxy hóa của chúng và chi phí nguyên liệu cao vẫn là một thách thức để sản xuất loại hạt này với số lượng lớn.

Hạt nano lipid rắn (SLN): SLN được làm từ chất béo rắn và chất hoạt động bề mặt để tạo thành hạt nano hình cầu với lõi lipid rắn và vỏ đơn lớp. Chúng thể hiện hiệu quả bao bọc đối với các loại thuốc kỵ nước cao hơn so với liposome vì chúng không có lõi chứa nước. Lõi cứng này cũng cải thiện độ ổn định của SLN so với liposome. Việc sản xuất SLN không cần dung môi hữu cơ, giúp loại bỏ nguy cơ độc hại do dư lượng dung môi gây ra.

Chất mang lipid có cấu trúc nano (NLC): NLC đã được phát triển để tăng cường khả năng bao bọc thuốc và ngăn ngừa rò rỉ thuốc. Lõi NLC được cấu tạo bởi hỗn hợp lipid rắn và lỏng để tăng tải thuốc và ức chế sự giải phóng thuốc trong quá trình bảo quản, còn vỏ bên ngoài là chất hoạt động bề mặt đơn lớp.



Hình 1.1 Cấu trúc của các loại hạt nano dựa trên lipid [2]

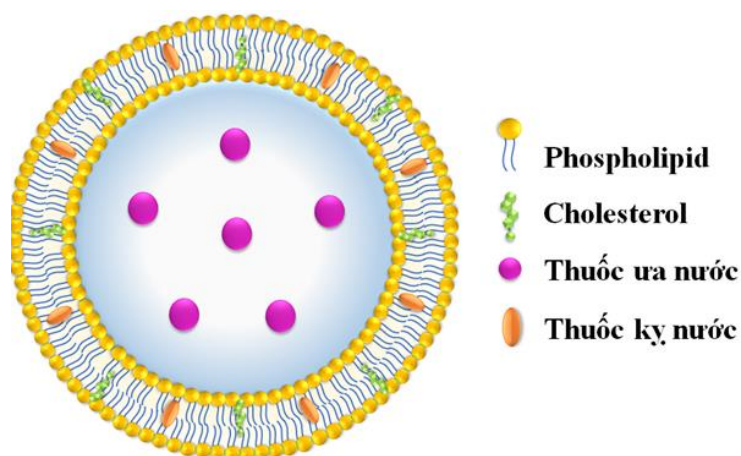
Một cách tổng quát, mặc dù liposome có một số hạn chế nhất định, song hiện nay liposome vẫn được coi là một trong những hệ mang thuốc lý tưởng để cải thiện tính ổn định, phân phối và sinh khả dụng của thuốc. Những vấn đề liên quan đến liposome sẽ được trình bày chi tiết ở phần tiếp theo.

1.2. LIPOSOME

1.2.1. Giới thiệu về liposome

Liposome được nhà huyết học người Anh, Alec D Bangham, mô tả lần đầu tiên vào năm 1961. Sau đó, vào năm 1980, liposome nhắm mục tiêu đầu tiên được phát triển đã cải thiện đáng kể hiệu quả điều trị bằng cách tăng tích tụ tại các mô, cơ quan, tế bào đích mà không giải phóng thuốc đến các vị trí khác. Vào những năm 1990, Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) phê duyệt lần đầu tiên thuốc Doxil®, một liposome tầng hình bao bọc doxorubicin được sử dụng để điều trị lâm sàng ung thư buồng trứng và ung thư vú di căn [2].

Liposome là một loại cấu trúc sinh học nguồn gốc hữu cơ với thành phần cấu tạo chủ yếu là phospholipid và cholesterol. Nó có cấu trúc hình cầu đơn lớp hoặc đa lớp bao bọc một khoang chứa nước bên trong. Kích thước của các túi hình cầu này có thể dao động từ vài nanomet đến vài micromet [4]. Nền tảng cho sự tự lắp ráp (self-assembly) của các liposome là các tương tác kỵ nước và lực Van der Waals giữa phospholipid và các phân tử nước. Do vậy, liposome có thể mang cả thuốc ưa nước và kỵ nước. Thuốc ưa nước sẽ được phân bố trong khoang nước của liposome, còn thuốc kỵ nước thì phân bố giữa lớp phospholipid kép (hình 1.2).



Hình 1.2 Cấu trúc cơ bản của liposome

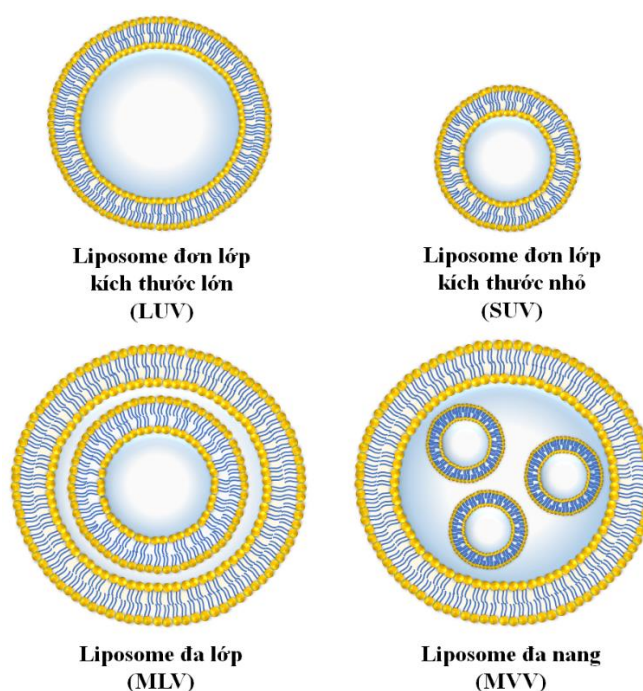
1.2.2. Phân loại liposome

1.2.2.1. Dựa trên kích thước và số lớp màng phospholipid kép

Liposome có thể được phân loại dựa trên kích thước và số lớp màng phospholipid (PL) kép, cụ thể được trình bày trong bảng 1.1 và hình 1.3 [5].

Bảng 1.1 Phân loại liposome theo kích thước và số lớp

STT	Phân loại	Số lớp/Kích thước
1	Liposome đơn lớp kích thước nhỏ (Small Unilamellar Vesicle, SUV)	1 lớp PL kép, có kích thước từ 20 – 100 nm
2	Liposome đơn lớp kích thước lớn (Large Unilamellar Vesicle, LUV)	1 lớp PL kép, có kích thước > 100 nm
3	Liposome đơn lớp kích thước khổng lồ (Giant Unilamellar Vesicle, GUV)	1 lớp phospholipid kép, có kích thước > 1 μm
4	Liposome đa lớp (Multilamellar Vesicle, MLV)	5–25 lớp PL kép với nhiều ngăn nước đồng tâm, kích thước > 0,5 μm
5	Liposome đa nang (Multivesicular Vesicle, MVV)	Gồm nhiều nang nhỏ nằm trong liposome, có kích thước > 1 μm



Hình 1.3 Phân loại liposome theo kích thước hạt và số lớp phospholipid kép

1.2.2.2. Dựa trên khả năng biến tính bề mặt vật liệu và mục đích sử dụng

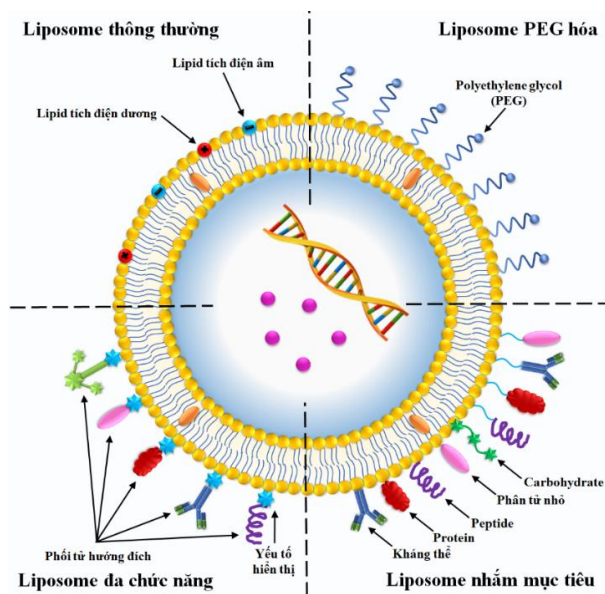
Liposome cũng có thể được phân loại dựa trên khả năng biến tính bề mặt vật liệu và mục đích sử dụng như được trình bày ở hình 1.4.

Liposome thông thường (conventional liposome): là loại liposome cơ bản nhất và cũng là thế hệ liposome đầu tiên được phát triển, trong thành phần màng chỉ chứa các lipid tích điện âm, dương hoặc trung tính.

Liposome PEG hóa (PEGylated liposome): nhờ được bao phủ bên ngoài lớp màng phospholipid kép là các polymer ưa nước, liposome có khả năng “tàng hình” trước hệ miễn dịch của cơ thể, giúp làm tăng thời gian tuần hoàn của liposome, giảm tỷ lệ đào thải thuốc. Một trong số những polymer được ứng dụng thành công và phổ biến nhất hiện nay là polyethylene glycol [6-8].

Liposome nhắm mục tiêu (ligand-targeted liposome): sử dụng các phối tử hướng đích như protein, polypeptide, chuỗi carbohydrate, kháng thể,... có khả năng nhận biết và liên kết với mục tiêu thông qua cơ chế miễn dịch tương tác kháng nguyên – kháng thể hoặc phối tử – thụ thể (ligand – receptor) trên màng tế bào. Các phối tử có thể được gắn trực tiếp trên màng phospholipid kép hoặc gắn ở đuôi của polymer bảo vệ [9].

Liposome đa chức năng (multifunctional liposome): là sự kết hợp nhiều chức năng khác nhau trên cùng một cấu trúc liposome để phục vụ cùng lúc nhiều mục đích như kết hợp chẩn đoán và điều trị (theranostic liposome) [10].



Hình 1.4 Phân loại liposome theo đặc điểm biến tính bề mặt

1.2.3. Thành phần chính của liposome

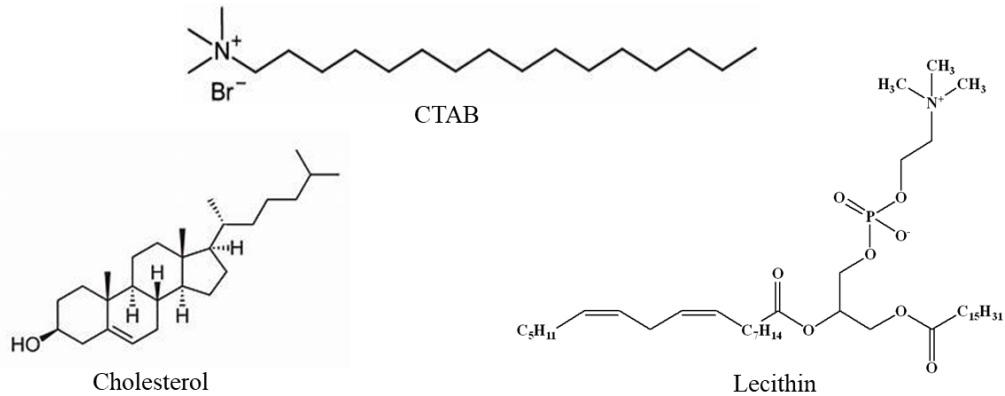
Thành phần chính của liposome bao gồm phospholipid, cholesterol và một số chất hoạt động bề mặt.

Phospholipid: Chiếm tỷ lệ lớn trong thành phần cấu tạo của liposome là phospholipid. Đây là một loại lipid chứa phospho và có cấu trúc lưỡng tính bao gồm đầu phosphate ưa nước và đuôi hydrocarbon kỵ nước được liên kết với gốc alcohol. Bản chất lưỡng tính lý giải cho khả năng tự lắp ráp của phospholipid khi đưa vào phân tán trong môi trường nước, tạo thành lớp màng lipid kép, nhũ hoá để ổn định nhũ tương. Phospholipid cũng là thành phần chính của màng tế bào. Do đó, liposome có tính tương hợp cao với tế bào và mô. Nguồn gốc của phospholipid được sử dụng trong các công thức tổng hợp có thể là tự nhiên, tổng hợp hoặc bán tổng hợp. Liposome tổng hợp từ phospholipid tự nhiên thường có độ tương hợp sinh học cao hơn các loại khác [11].

Lecithin được sử dụng trong công thức bào chế là một dạng phosphatidylcholine không bão hòa chiết xuất từ đậu nành, nên an toàn, tránh nguy cơ lây nhiễm virus như các loại lipid có nguồn gốc động vật khác, hiệu quả nang hóa thuốc tốt, giá thành rẻ, phù hợp cho sản xuất quy mô công nghiệp. Tuy nhiên, lecithin có xu hướng hình thành liposome với nhiều lớp phospholipid kép và kém ổn định [12].

Cholesterol: Một thành phần không thể thiếu trong cấu trúc màng phospholipid kép của liposome đó chính là cholesterol. Cholesterol được sử dụng như một chất làm ổn định giúp làm tăng khả năng liên kết giữa các phân tử phospholipid, tăng độ cứng của lớp phospholipid kép, giảm khả năng thẩm thấu của màng đối với các chất điện giải và không điện giải, chống lại sự kết tụ của các hạt liposome. Cholesterol là một chất béo steroid có mặt ở màng tế bào của các mô trong cơ thể và được vận chuyển trong huyết tương của mọi động vật [13].

Chất hoạt động bề mặt: Chất hoạt động bề mặt là các phân tử có cấu trúc lưỡng tính. Chúng có ứng dụng tiềm năng trong ổn định công thức thuốc hoặc hỗ trợ vận chuyển thuốc. Chất hoạt động bề mặt được phân làm 2 loại chính là chất hoạt động bề mặt ion như CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) và chất hoạt động bề mặt không ion như Tween 80 (polysorbate 80) [12].



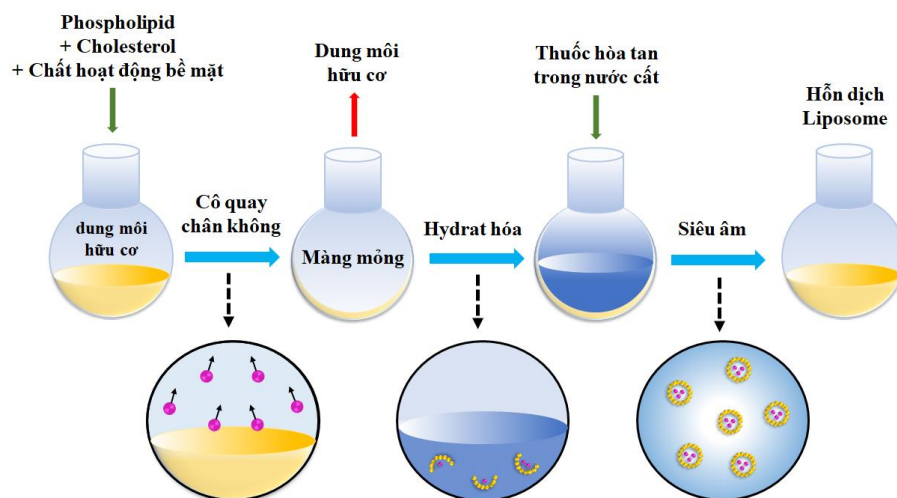
Hình 1.5 Công thức cấu tạo của cholesterol, lecithin và CTAB

Các yếu tố như tỷ lệ thành phần, phương pháp tổng hợp và sự biến tính bề mặt vật liệu đều ảnh hưởng tính chất của liposome. Phần tiếp theo của luận văn sẽ trình bày về các phương pháp tổng hợp liposome.

1.2.4. Phương pháp tổng hợp và giảm kích thước liposome

1.2.4.1. Phương pháp hydrate hóa màng lipid

Phương pháp hydrat hoá màng lipid được Alec Douglas Bangham đưa ra vào năm 1964 và là một trong những phương pháp phổ biến nhất hiện nay dùng để tổng hợp liposome. Cơ chế hình thành liposome theo phương pháp Bangham là tạo lớp màng phospholipid mỏng bằng phương pháp cô quay chân không và bao bọc lấy dược chất trong quá trình hydrat hóa. Dược chất ưa nước thì hòa vào dung môi nước, dược chất kỵ nước thì cho vào dung môi hữu cơ [14]. Các bước tiến hành được mô tả như hình 1.6.



Hình 1.6 Sơ đồ tổng hợp liposome bằng phương pháp hydrate hóa màng lipid

Tạo màng lipid: Hoà tan hỗn hợp lipid trong dung môi thích hợp, tỉ lệ 10 - 20 mg lipid/1ml dung môi, sau đó bốc hơi dung môi để tạo thành màng mỏng lipid sử dụng thiết bị cất quay chân không hoặc đông khô lipid. Dược chất có thể phối hợp và hoà tan vào dung môi hữu cơ cùng với các lipid để quá trình bốc hơi dung môi cũng tạo điều kiện cho dược chất liên kết với lipid.

Hydrate hoá: Hydrate hoá lipid với môi trường hydrate, ở nhiệt độ và thời gian thích hợp, kết hợp quay tốc độ cao tăng hòa tan để tạo thành hỗn dịch liposome. Môi trường hydrate hoá tùy theo loại lipid và mục đích mang thuốc có thể là nước, dung dịch NaCl 0,9 %, dung dịch đệm (citrat, phosphat, Hepes...), dung dịch đường (glucose, dextrose, sucrose...). Môi trường hydrate hoá có thể chứa muối, chất ổn định, dược chất. Quá trình hydrate hóa nên được tiến hành ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ chuyển pha của lipid T_c khoảng 10 °C nhằm đảm bảo tính linh động trong quá trình sắp xếp hệ mang thuốc, thông thường từ 50 – 60 °C. Thời gian hydrate hoá phụ thuộc vào loại phospholipid [15,16].

1.2.4.2. Phương pháp tiêm ethanol

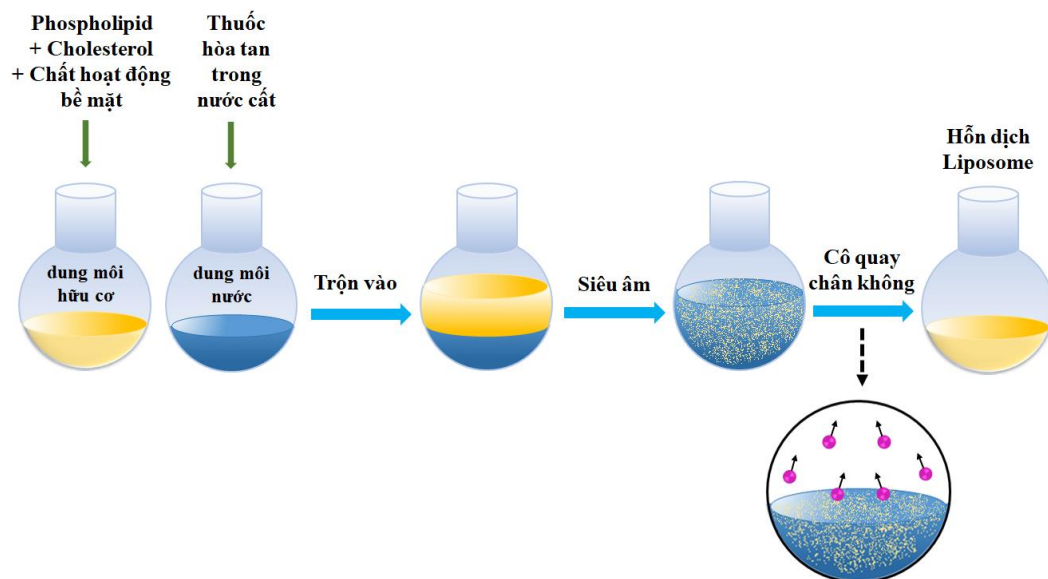
Dược Batzri và Korn mô tả năm 1973, còn được gọi là phương pháp pha loãng ethanol hay tiêm ethanol. Quy trình bào chế gồm các bước: hòa tan phospholipid và các thành phần tạo màng vào ethanol, bơm nhanh dung dịch này vào môi trường nước cất hoặc hệ đệm Tris hydrochloric, kết hợp khuấy trộn. Do thay đổi dung môi tạo thành các SUV có kích thước khoảng 25 nm. Sử dụng siêu lọc để loại ethanol và tinh chế liposome. Liposome thu được có kích thước nhỏ (30 - 110 nm) khá đồng nhất mà không phải trải qua quá trình siêu âm. Ưu điểm của phương pháp này là sử dụng dung môi không quá độc như ethanol và dễ dàng mở rộng quy mô [17].

1.2.4.3. Phương pháp tiêm ether

Hòa tan dược chất trong nước, đun cách thủy để duy trì nhiệt độ khoảng 55 – 65 °C. Hòa tan các thành phần tạo màng liposome vào ether hoặc diethyl ether/methanol. Bơm từ từ dung dịch ether vào dung dịch nước từ phía đáy, khi tiếp xúc với pha nước, ether bốc hơi dưới áp suất giảm tạo thành liposome không đồng nhất có kích thước 200 – 1000 nm. Phương pháp tiến hành nhanh nhưng hiệu suất tạo liposome thấp, dược chất phải tiếp xúc với nhiệt độ và dung môi, có thể ảnh hưởng tới độ ổn định của chế phẩm [18].

1.2.4.4. Phương pháp bốc hơi pha đảo (Reverse – phase evaporation method)

Phương pháp bốc hơi pha đảo sử dụng các dung môi hữu cơ như diethyl ether/isopropyl ether hoặc hỗn hợp của diethyl ether: chloroform (1:1 v/v) và hỗn hợp của chloroform: methanol (2:1 v/v) hòa tan phospholipid. Tiến hành bốc hơi dung môi dưới áp suất giảm. Hòa tan trở lại hỗn hợp các thành phần bằng một dung môi không trộn lẫn được với nước. Để tạo micelle đảo, thêm pha nước và siêu âm trong khoảng thời gian thích hợp cho đến khi tạo thành hệ phân tán dạng nhũ tương nước trong dầu. Các micelle đảo có cấu trúc gồm phospholipid đơn lớp bao quanh nhân nước. Sau đó, bốc hơi từ từ dưới áp suất giảm để loại dung môi hữu cơ, khi đó các micelle sát nhập vào nhau, hệ chuyển sang trạng thái gel. Tiếp tục quá trình bốc hơi dung môi, khi đạt tới điểm giới hạn, trạng thái gel bị bẻ gãy các micelle bị phá vỡ phospholipid tái sắp xếp tạo cấu trúc lipid kép và hình thành liposome (hình 1.7).



Hình 1.7 Sơ đồ tổng hợp liposome bằng phương pháp bốc hơi pha đảo

Ưu điểm chính của phương pháp này là tỷ lệ đóng gói dược chất cao, phù hợp để bào chế liposome mang các chất có cấu trúc phân tử công kênh, kích thước lớn như albumin. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp là tạo ra các liposome có kích thước lớn, không đồng nhất, trong quá trình bào chế sử dụng nhiều dung môi hữu cơ, cần có biện pháp loại và kiểm soát dung môi tồn dư và những khó khăn để mở rộng quy mô [19].

Liposome sau khi được bào chế thường có kích thước lớn và đa lớp nên cần công đoạn tiếp theo là giảm và đồng nhất kích thước tiểu phân bằng các phương pháp sau:

1.2.4.5. Phương pháp siêu âm

Liposome đa lớp kích thước lớn có thể phân chia và tái tạo thành các liposome đơn lớp kích thước nhỏ từ năng lượng siêu âm sử dụng thanh siêu âm hoặc bể siêu âm. Thanh siêu âm cho hiệu quả cao nhưng chỉ tác dụng với thể tích nhỏ và dễ làm nóng hoặc đưa tạp vào mẫu, còn bể siêu âm có thể áp dụng cho lượng lớn mẫu nhưng khó kiểm soát được kích thước và độ đồng nhất kích thước do khó kiểm soát được các thông số siêu âm [7],[15].

1.2.4.6. Phương pháp nén/ đẩy qua màng

Nguyên tắc của phương pháp là đẩy liposome qua màng (polycarbonate) có kích thước lỗ xốp phù hợp. Do đó liposome đa lớp lớn có thể biến dạng và trở thành liposome đơn lớp hoặc nanoliposome tùy theo kích thước của màng. Thông thường cần đẩy nhiều chu kỳ và sử dụng màng có kích thước từ lớn đến nhỏ dần. Ở quy mô nhỏ, sử dụng thiết bị cầm tay. Với quy mô lớn, sử dụng thiết bị nén áp suất cao với khí trơ (còn gọi là đồng nhất hoá áp suất cao) dựa trên nguyên tắc sử dụng áp suất làm nhiễu loạn dòng chảy của hệ phân tán, tăng tốc độ va chạm của các giọt dẫn tới các tiểu phân được phân chia nhỏ hơn [20].

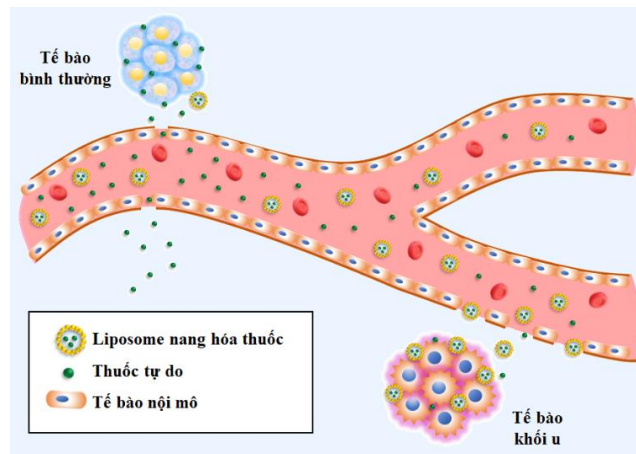
So sánh giữa phương pháp siêu âm và phương pháp đẩy qua màng với thể tích nhỏ cho thấy phương pháp siêu âm có thể nhanh chóng cho kích thước nhỏ, còn phương pháp đẩy qua màng cần lặp lại nhiều chu kỳ mới giảm được kích thước nhưng độ đồng nhất cao hơn. Ngoài ra, liposome có thể được đồng hóa bằng phương pháp đông lạnh - giải đông (freeze- thawed) hoặc phương pháp vi hóa lỏng (microfluidization) [19].

1.2.5. Ứng dụng của liposome phân phối thuốc điều trị ung thư

Trong sự đa dạng của các chất mang nano, liposome đã được chứng minh là có khả năng mang thuốc ứng dụng phân phối điều trị ung thư do tính tương thích sinh học cao, khả năng phân hủy sinh học hoàn toàn, độc tính thấp và khả năng bao bọc được các hoạt chất cả ưa nước và kỵ nước, đơn giản hóa việc phân phối thuốc đến vị trí khối u. Hơn nữa, liposome còn có tác dụng bao bọc bảo vệ hoạt

chất khỏi môi trường làm phân hủy thuốc nhanh chóng và giảm tác dụng phụ của thuốc [7],[9].

Các thuốc được bào chế dưới dạng liposome có khả năng đi vào sâu trong mô tế bào ung thư qua các lỗ rò có kích thước lớn hơn 400 nm trên thành mạch máu của khối u mà không thể đi qua các khe hở có đường kính nhỏ hơn 10 nm trên thành mạch máu bình thường, nhờ đó hạn chế sự đào thải thuốc qua gan và thận, tăng thời gian lưu thông của thuốc. Khi đi vào cơ thể, theo hệ thống tuần hoàn, liposome di chuyển và tập trung ở mô tế bào ung thư nhờ hiệu ứng tăng cường tính thấm và lưu giữ (Enhanced Permeability and Retention effect, EPR) (hình 1.8) [21].



Hình 1.8 Hiệu ứng tăng cường tính thấm và lưu giữ (EPR)

Các loại thuốc ung thư đã được bào chế dưới dạng liposome như doxorubicin liposome (Doxil[®]/ Caelyx[®]), daunorubicine liposome (DaunoXome[®]) và liposomal cytosine b-arabinoside (DepoCyte[®]) [2].

Hiện nay, những nghiên cứu về ứng dụng liposome mang thuốc điều trị ung thư không ngừng tăng lên cho thấy liposome được vẫn được coi là hệ thống chất mang nano dẫn đầu trong phân phối thuốc. Việc sử dụng công nghệ liposome để phân phối chiết xuất thiên nhiên hoạt tính được báo cáo gần đây. Việc nang hóa hoạt chất thiên nhiên vào liposome đã cải thiện đáng kể hiệu quả của chúng so với dạng hợp chất tự do [22,23].

Do đó, nghiên cứu này đã hướng đến hệ liposome mang cao ốt, một hoạt chất thiên nhiên với hoạt tính đa dạng có nhiều ứng dụng tiềm năng. Phần tiếp theo trong luận văn sẽ trình bày về cao ốt.

1.3. CAO ỚT

1.3.1. Giới thiệu về cao ớt

Cao ớt (CO, capsicum oleoresin) là một chiết xuất dầu từ quả của cây ớt thuộc chi *Capsicum*, họ Cà (Solanaceae). Hoạt chất được quan tâm nhiều nhất trong cao ớt là các capsaicinoid, bao gồm capsaicin, nordihydrocapsaicin, dihydrocapsaicin, homodihydrocapsaicin, homocapsaicin. Trong đó, capsaicin và dihydrocapsaicin là thành phần chính của cao ớt được chứng minh có nhiều lợi ích cho sức khỏe [24].

Trong đời sống thường nhật, cao ớt được sử dụng rộng rãi như một chất phụ gia thực phẩm để bảo quản và tăng cường hương vị. Trong y học, cao ớt được sử dụng trong một số loại thuốc giảm đau cơ bắp và khớp liên quan tới viêm khớp, đau lưng, bong gân [25,26]. Ngoài ra, nhiều hoạt tính sinh học khác của cao ớt đã được báo cáo như kháng ung thư [27,28], kháng oxy hóa và kháng viêm [24],[29-31], chống béo phì [32-34], kháng khuẩn [35,36] và có lợi ích cho các bệnh tim mạch, tiêu hóa [37].

Tuy nhiên, việc ứng dụng cao ớt bị hạn chế bởi một số nhược điểm như độ tan kém, khó thẩm thấu qua da dẫn đến sinh khả dụng kém và gây nên các dụng phụ nóng rát trên da [38]. Một số nghiên cứu trên thế giới chỉ ra rằng, khi nang hóa cao ớt trong một số hệ mang nano giúp tăng khả năng thẩm thấu vào da, giảm tác dụng phụ (đỏ, nóng) và tăng hiệu quả điều trị của cao ớt [31],[32].

1.3.2. Tình hình về nguồn nguyên liệu ớt ở Việt Nam

Ở Việt Nam, ớt là một loại cây gia vị có giá trị kinh tế cao, được trồng chủ yếu tại các tỉnh miền Trung và Nam Bộ. Những năm gần đây, một số tỉnh vùng Đồng bằng Sông Hồng cũng đã bắt đầu trồng ớt với diện tích lớn nhằm cung cấp nguyên liệu cho các nhà máy, các công ty sản xuất các mặt hàng thực phẩm để tiêu thụ và xuất khẩu, đem lại lợi nhuận cao.

Các tỉnh trồng ớt tại Việt Nam như Thái Bình, Quảng Bình, Quảng Nam, Bình Định, An Giang, Đồng Tháp, Tiền Giang, Long An, Lâm Đồng, Vĩnh Phúc, Thái Bình, Nam Định và một số tỉnh thành khác. Diện tích trồng ớt khoảng 2.000 ha/năm (năm 2014) và sản lượng ớt khoảng 80.000 tấn/năm (năm 2013) (*Số liệu Tổng cục Thống kê Việt Nam, năm 2013 – 2014*)

Các loại ớt gia vị được trồng rất phổ biến ở Việt Nam là giống *Capsicum annum* như ớt bell pepper (ớt chuông Đà Lạt), ớt Cayenne (ớt sừng) và giống

Capsicum frutescens như ớt hiểm (ớt xiêm, ớt chili), ớt chỉ thiên (ớt hiểm lai) [39].

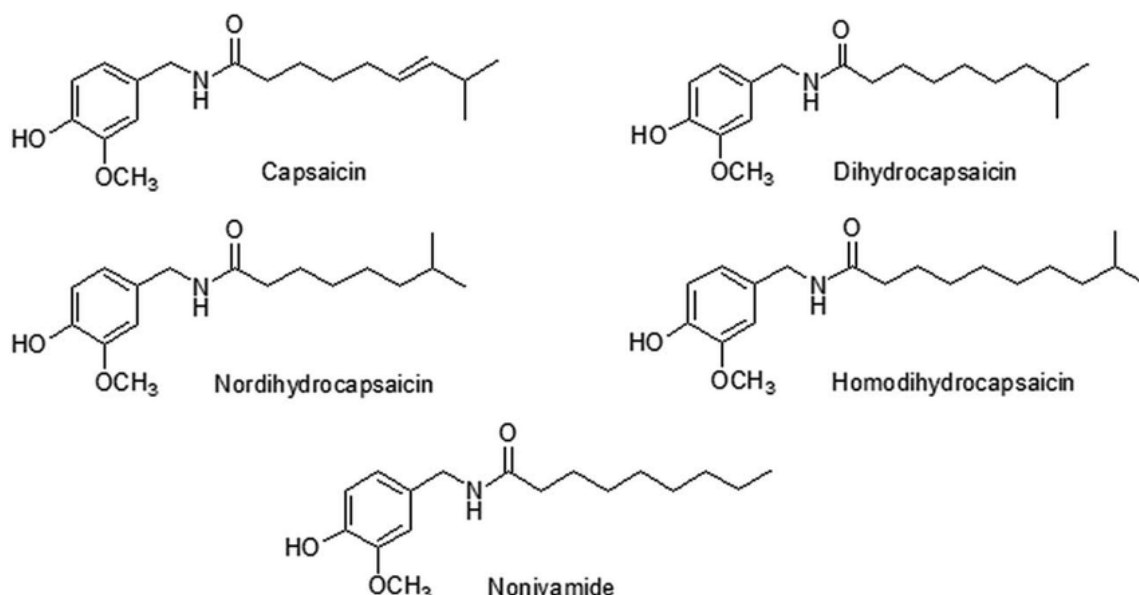
Trong tình hình dịch bệnh Covid-19 thời gian qua khiến xuất khẩu ớt gặp khó khăn, làm cho giá ớt giảm mạnh, gây tổn thất kinh tế nặng nề cho người nông dân trồng ớt ở Việt Nam. Do đó, việc nghiên cứu nang hóa cao ớt vào liposome định hướng ứng dụng trong y sinh dược không những có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, giúp điều trị, chăm sóc sức khỏe cộng đồng mà còn giúp tiêu thụ sản lượng ớt đáng kể, giúp nâng cao giá trị kinh tế của quả ớt cho người nông dân trồng ớt ở Việt Nam.

1.3.3. Thành phần hóa học quan trọng trong quả ớt

Thành phần hóa học quan trọng trong quả ớt bao gồm các loại capsaicinoid, chất màu, vitamin và chất béo [39-42].

1.3.3.1. Capsaicinoid

Các hợp chất capsaicinoid thuộc họ alkaloid, có cấu trúc vanillylamid, mạch nhánh là các acid béo từ 9 - 11 carbon, bao gồm capsaicin, dihydrocapsaicin, homocapsaicin, homodihydrocapsaicin, norcapsaicin và nordihydrocapsaicin. Nhóm chất này làm nên vị cay của quả ớt và là nhóm các hoạt chất quan trọng ứng dụng làm nguyên liệu trong mỹ phẩm và dược phẩm [39,40].



Hình 1.9 Các hợp chất capsaicinoid trong quả ớt

1.3.3.2. *Chất màu*

Các chất màu chính trong quả ớt là carotenoid như capsanthin, cryptoxanthin, zeaxanthin, lutein, betacarotene và chlorophyll. Các chất màu này có giá trị trong công nghiệp dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm [40].

1.3.3.3. *Các loại vitamin*

Trong quả ớt có chứa hàm lượng vitamin phong phú bao gồm vitamin C, A, E, phức hợp vitamin B. Vitamin là thành phần quan trọng trong quả ớt được ứng dụng trong công nghệ thực phẩm chế biến các sản phẩm từ quả ớt [42].

1.3.3.4. *Chất béo*

Trong quả ớt chứa hàm lượng chất béo cao và nằm chủ yếu ở hạt ớt, với thành phần chính là acid linoleic. Các chất béo cũng có giá trị trong công nghiệp thực phẩm.

Ngoài ra, trong quả ớt có chứa các đường đơn (fructose, glucose, galactose, sucrose) và các acid amin. Các hợp chất này làm tăng độ nhớt của dịch chiết gây khó khăn cho quá trình lọc và tách các capsaicinoid.

1.3.4. *Phương pháp chiết xuất cao ớt*

1.3.4.1. *Phương pháp ngâm chiết*

Chiết ngấm kiệt là phương pháp thường được dùng để chiết dược liệu do kỹ thuật đơn giản và chi phí thấp. Để nâng cao hiệu suất chiết, nguyên liệu được nghiền nhỏ, sau đó được ngâm vào dung môi trong điều kiện nhất định, có thể kết hợp với khuấy để tăng sự khuếch tán và giảm nồng độ chất chiết ở khu vực bề mặt mẫu, điều này giúp nâng suất chiết cao hơn. De Aguiar và cộng sự đã nghiên cứu sử dụng *n*-hexan, ethanol, aceton và methanol làm dung môi chiết, nhận thấy rằng methanol là dung môi tốt nhất để chiết xuất capsaicinoid từ quả ớt [40],[43].

1.3.4.2. *Phương pháp chiết Soxhlet*

Trong phương pháp này, dung môi chiết luôn ở dạng tinh khiết khi tiếp xúc với nguyên liệu, góp phần tăng khả năng chiết các thành phần hóa học từ nguyên liệu ra dung môi. Boonkird và cộng sự đã sử dụng phương pháp chiết

Soxhlet với dung môi là ethanol để chiết xuất capsaicinoid từ quả ớt. Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi thu capsaicinoid đạt 92% [44].

1.3.4.3. Phương pháp chiết siêu âm (UAE)

Công nghệ chiết bằng sóng siêu âm được đánh giá là thân thiện với môi trường do sử dụng dung môi là nước, ethanol, thời gian chiết ngắn, đồng thời cho năng suất và độ ổn định cao hơn so với phương pháp chiết thông thường. Sóng siêu âm giúp phá vỡ thành tế bào của mẫu, kích thước hạt giảm, và tăng cường quá trình khuếch tán và chuyển khối bằng các quá trình thay đổi áp suất nhanh chóng gây ra các khoang khí và quá trình vỡ các bóng khí tạo ra sóng xung kích [40]. Boonkird và cộng sự so sánh hiệu suất thu hồi của capsaicin từ quả ớt bằng các phương pháp chiết khác nhau đã chỉ ra rằng phương pháp UAE thu được hiệu suất cao hơn so với phương pháp ngâm kiệt [44].

1.3.4.4. Phương pháp chiết dung môi siêu tới hạn (SFE)

Đây là phương pháp chiết xuất xanh, được sử dụng rộng rãi để chiết xuất các chất có hoạt tính sinh học. CO₂ siêu tới hạn có khả năng chiết các hợp chất không phân cực đến phân cực yếu. Để chiết các chất có độ phân cực cao hơn, một lượng nhỏ ethanol, methanol được thêm vào như đồng dung môi [40]. Phương pháp chiết SFE ở nhiệt độ thấp nên giữ được các đặc tính của các hoạt chất. Trần Anh Khoa và cộng sự cho biết phương pháp SFE thu được lượng cao ớt chiết ít hơn tuy nhiên hàm lượng capsaicinoid lại cao hơn so với các phương pháp chiết xuất khác [39].

1.3.4.5. Phương pháp chiết vi sóng (MAE)

Phương pháp này là một kỹ thuật chiết xuất tiên tiến với sự kết hợp của dung môi với năng lượng vi sóng để làm nóng dung môi và nguyên liệu, làm tăng tốc độ đứt gãy của tế bào, thay đổi các đặc tính vật lý của các mô sinh học, cải thiện độ xốp và tăng cường quá trình trích ly. Trần Anh Khoa và cộng sự so sánh ảnh hưởng của các phương pháp chiết xuất khác nhau đến lượng cao chiết và hàm lượng capsaicinoid thu được từ quả ớt, kết quả cho thấy, phương pháp MAE cho lượng cao chiết và hàm lượng capsaicinoid tốt nhất [39].

Tóm lại, phương pháp chiết xuất thông thường như ngâm kiệt có thể thu được capsaicinoid nhưng sử dụng một lượng lớn dung môi và thời gian chiết xuất dài. Gần đây kỹ thuật chiết xuất tiên tiến như phương pháp UAE phù hợp cho

chiết capsaicinoid do sử dụng ít dung môi hơn, thời gian chiết ngắn và năng suất tốt hơn chiết xuất thông thường. Phương pháp MAE cho hiệu quả chiết xuất cao tuy nhiên chỉ phù hợp ở quy mô phòng thí nghiệm. Phương pháp SFE là phương pháp chiết xuất xanh do sử dụng dung môi thân thiện với môi trường. Để xây dựng được phương pháp chiết tối ưu đảm bảo yếu tố công nghệ, thiết bị, môi trường và kinh tế cần đánh giá hiệu quả của từng phương pháp trên nhiều khía cạnh.

1.3.5. Hoạt tính sinh học của cao ớt

Những nghiên cứu về capsaicinoid cho thấy chúng có nhiều dược tính bao gồm các hoạt động giảm đau, chống ung thư, chống viêm, chống oxy hóa và chống béo phì, có lợi cho hệ tim mạch và tiêu hóa.

1.3.5.1. Tác dụng chống ung thư

Tác dụng chống ung thư của thành phần cao ớt được đề cập trong một số báo cáo như Montani và cộng sự (2015) nghiên cứu quá trình apoptosis của capsaicin đối với các tế bào ung thư bàng quang ở người [27]; Dwivedi, V. và cộng sự (2011) nghiên cứu khả năng gây độc tế bào của gia vị Ấn Độ chống lại các tế bào ung thư biểu mô vảy thực quản [28].

1.3.5.2. Tác dụng giảm đau và kháng viêm

Tác dụng giảm đau và kháng viêm của cao ớt được báo cáo qua một số nghiên cứu: năm 2021, Võ Đỗ Minh Hoàng và cộng sự nghiên cứu đặc tính chống viêm của cao ớt *in vivo* và bào chế gel bôi giảm đau kháng viêm chứa cao ớt [24,31]; năm 2012, Zimmer, A.R. và cộng sự nghiên cứu đặc tính chống oxy hóa và chống viêm của *Capsicum baccatum* [29]; năm 2013, Desai, P.R. và cộng sự nghiên cứu sự phân phối tại chỗ của anti-TNF alpha siRNA và capsaicin thông qua các hạt nano polyme lai lipid giúp ức chế hiệu quả tình trạng viêm da *in vivo* [30].

1.3.5.3. Tác dụng chống béo phì

Năm 2014, Kim J. và cộng sự đã nghiên cứu hiệu quả của capsicum oleoresin và nhũ tương nano capsicum oleoresin đối với bệnh béo phì ở chuột [32]. Tác dụng giảm béo của cao ớt cũng được thể hiện qua nghiên cứu của Lee, M. S. và cộng sự (2017) về hiệu quả phân giải mỡ của nhũ tương nano hai lớp alginate

và đơn lớp có chứa capsicum oleoresin trong các tế bào mỡ 3T3-L1 [33]; và qua nghiên cứu của Jeon, G. và cộng sự (2010) về hoạt động chống béo phì của chiết xuất methanol từ hạt ớt cay (*Capsicum annuum* L.) trong tế bào mỡ 3T3-L1 [34].

1.3.5.4. Tác dụng giảm đau

Tác dụng giảm đau của thành phần cao ớt được đề cập trong một số công bố như Teixeira và cộng sự (2015) nghiên cứu thí điểm về tính an toàn của thuốc mỡ bôi chứa capsaicin chữa bệnh đau dây thần kinh [25]; Fraenkel, L. và cộng sự (2004) nghiên cứu các lựa chọn điều trị trong thoái hóa khớp gối của bệnh nhân [26].

1.3.5.5. Tác dụng kháng khuẩn

Năm 2003, Careaga, M. và cộng sự nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất ớt chuông chống lại vi khuẩn *Salmonella typhimurium* và *Pseudomonas aeruginosa* được cấy trong thịt bò sống [35]; Năm 2015, Chen, X. và cộng sự nghiên cứu điều chế các copolymer polyurethane ưa nước với capsaicin và PEG để kháng vi khuẩn [36].

1.3.5.6. Tác dụng bảo vệ tim mạch, tiêu hóa

Tác dụng này được đề cập trong nghiên cứu của Peng, J. (2010) về thụ thể vanilloid TRPV1 có vai trò bảo vệ tim mạch và đường tiêu hóa [37].

Qua tổng quan, cao ớt được chứng minh có tác dụng dược lý đa dạng và liposome là một trong những hệ chất mang hoạt chất tiềm năng. Việc nang hóa cao ớt vào hệ nanoliposome là một hướng nghiên cứu chưa được thực hiện tại Việt Nam cũng như trên thế giới. Liposome mang cao ớt có tiềm năng mở ra nhiều ứng dụng điều trị và chăm sóc sức khỏe hơn so với cao ớt tự do bởi hệ mang liposome có độ tương hợp sinh học cao, khả năng mang thuốc hướng đích, nhả chậm thuốc, giúp nâng cao sinh khả dụng và hạn chế tác dụng phụ không mong muốn của cao ớt. Từ tất cả những luận chứng trên cho thấy đề tài “ **Nghiên cứu tổng hợp và đánh giá tính chất hệ nanoliposome mang cao ethanol ớt định hướng gây độc tế bào trên dòng MCF-7**” là cần thiết để tiến hành nghiên cứu.

CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU - HÓA CHẤT VÀ TRANG THIẾT BỊ

2.1.1. Nguyên liệu – hóa chất

2.1.1.1. Nguyên liệu

Quả ớt *Capsicum frutescens* L. chín đỏ được thu hái ở huyện Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh. Sau đó ớt được loại bỏ trái hư, bỏ cuống, rửa sạch, sấy khô ở 50 – 55 °C trong 24 giờ và được bảo quản ở nhiệt độ phòng tại Phòng Vật liệu Y sinh, Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng [24].



Hình 2.1 Mẫu quả ớt *Capsicum frutescens* L.

2.1.1.2. Hóa chất

Tất cả các hóa chất được sử dụng không qua quá trình tinh chế nào thêm. Danh mục hóa chất được liệt kê ở bảng 2.1.

Bảng 2.1 Danh mục hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên hóa chất	Xuất xứ	Mục đích sử dụng
1	Cholesterol	Sigma	Nguyên liệu tổng hợp
2	Lecithin	TCI	Nguyên liệu tổng hợp
3	Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)	Sigma	Nguyên liệu tổng hợp
4	Phosphoric acid 98%	Fisher	Hóa chất phân tích
5	Methanol	Fisher	Hóa chất phân tích
6	Acetonitrile	Fisher	Hóa chất phân tích
7	Chuẩn capsaicin 98% (USP), Mỹ	Sigma-Aldrich	Chất chuẩn
8	Chloroform	Chemsol	Dung môi
9	Ethanol 96%	Việt Nam	Dung môi
10	Nước cất	Việt Nam	Dung môi

2.1.2. Dụng cụ và trang thiết bị

Dụng cụ và trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Phòng Vật liệu Y sinh, Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng và Trường Đại học Trà Vinh. Danh mục các trang thiết bị và dụng cụ được liệt kê ở bảng 2.2.

Bảng 2.2 Danh mục các trang thiết bị và dụng cụ

STT	Thiết bị	Nguồn
1	Máy cô quay Buchi Rotavapor R-114, Thụy Sĩ	Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng
2	Bể siêu âm Elmasonic S 80H, Đức	
3	Máy đông khô Eyela FDU-1200, Nhật Bản	
4	Máy li tâm Hermle Z32HK, Đức	
5	Cân phân tích 4 số lẻ Ohaus pioneer PA114, Mỹ	
6	Máy khuấy từ gia nhiệt VELP Scientifica, Ý	
7	Máy xay RRH-2000A, RiriHong, Trung Quốc	
8	Máy phân tích kích thước hạt SZ-100, Horiba Scientific, Nhật Bản	
9	Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Ultimate 3000, Thermo scientific, Mỹ	Trường Đại học Trà Vinh
10	Máy quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier Nicolet iS10, Thermo scientific, Mỹ	
Dụng cụ và vật tư khác		
1	Bình cầu cổ nhám Duran 250 ml	Phòng Vật liệu Y Sinh, Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng
2	Cá từ	
3	Chai, lọ đựng mẫu	
4	Micropipet 100-1000 μ l	
5	Bình định mức 10, 20, 25 mL	
6	Màng thẩm tách (MWCO = 3,5 kDa)	

2.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Trích ly và đánh giá các đặc tính hóa lý và hoạt tính sinh học của cao ớt (capsicum oleoresin)

2.2.1.1. Phương pháp xử lý nguyên liệu

Quả ớt *Capsicum frutescens* L. chín đỏ được thu hái ở huyện Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam. Sau khi mua, quả ớt được chọn lọc loại bỏ những trái hư, bỏ cuống, rửa sạch với nước. Sau đó, ớt được sấy ở nhiệt độ 50 – 55 °C trong 24 giờ và được xay nhỏ thành bột ớt sử dụng máy xay RRH-2000A (Trung Quốc). Việc thu mẫu, giám định tên khoa học, vi phẫu, soi bột đã được tiến hành bởi nhóm nghiên cứu trước đó [24].

2.2.1.2. Phương pháp điều chế cao ớt

Cao ethanol ớt (hay gọi tắt là cao ớt) được chiết bằng phương pháp chiết siêu âm sử dụng dung môi ethanol 96%. Dịch chiết sau đó được ly tâm để thu dầu capsicum oleoresin có độ tinh khiết cao. Quy trình này được kế thừa từ nghiên cứu của Võ Đỗ Minh Hoàng và cộng sự (2021) [24]. Cao ớt sau đó được loại bỏ bớt các chất màu và chất béo bằng phương pháp rửa với methanol 70% theo quy trình của Xinjun Xu và cộng sự (2017) [45].

Quy trình điều chế cao ớt được trình bày trong hình 2.2. Quy trình được thuyết minh như sau:

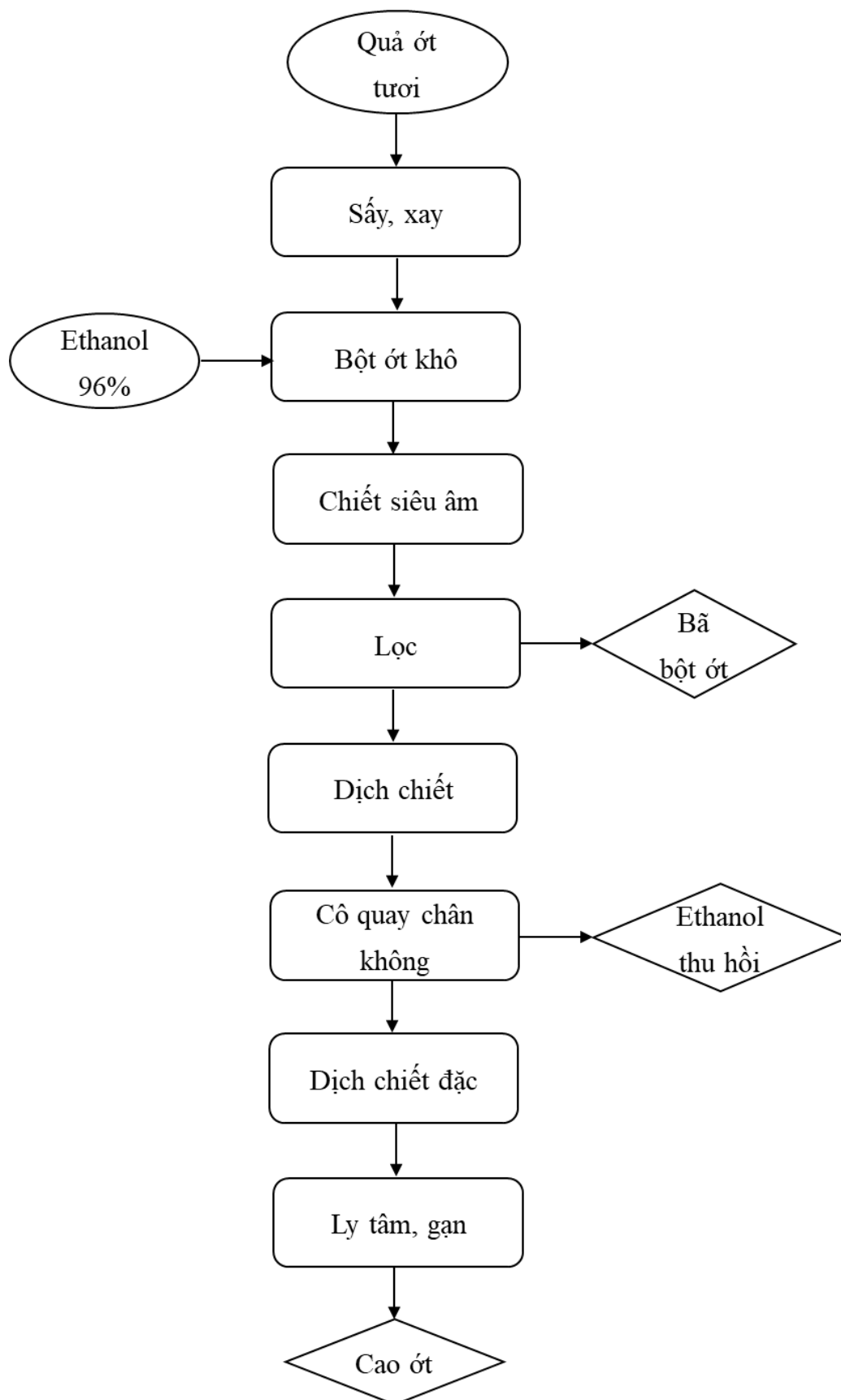
Bước 1: Quả ớt tươi chín đỏ được thu hái, rửa sạch với nước, sấy khô ở 50 - 55 °C sau đó xay thành bột.

Bước 2: Bột ớt được ngâm trong ethanol 96% theo tỉ lệ 1:5 (w/v), siêu âm ở 60 °C trong 60 phút. Dịch chiết được lọc và sau đó dung môi được loại bỏ bằng cất quay áp suất giảm ở 50 °C.

Bước 3: Dịch chiết sau cô quay được ly tâm tại 5000 rpm trong 2 giờ, kết quả là chất lỏng tách thành 2 lớp. Lớp phía trên được thu là dầu capsicum oleoresin.

Bước 4: Cao ớt sau đó được rửa với methanol 70% để loại bỏ bớt các chất màu và chất béo.

Hiệu quả của quá trình bào chế cao ớt được đánh giá thông qua việc xác định hàm lượng capsaicin trong cao ớt phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao [24],[39].



Hình 2.2 Quy trình điều chế cao ớt

2.2.1.3. Phương pháp đánh giá đặc trưng cấu trúc của các thành phần trong cao ớt

Sử dụng phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) trên thiết bị quang phổ hồng ngoại Nicolet iS10 (Thermo scientific, Mỹ) để ghi nhận một số nhóm chức, nhóm liên kết đặc trưng trong cấu trúc hóa học của các thành phần trong cao ớt [24].

2.2.1.4. Phương pháp định lượng capsaicin trong cao ớt

Hàm lượng capsaicin trong cao ớt được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao [24],[39] sử dụng thiết bị HPLC Ultimate 3000 (Thermo scientific, Mỹ) tại Trường Đại học Trà Vinh. Phương pháp dựa theo chuyên luận capcicum oleoresin, Dược điển Hoa Kỳ USP41, có đánh giá lại tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu của phương pháp trong điều kiện thiết bị sẵn có.

Điều kiện sắc ký: Cột Kinetex® 5 µm C18 100 A°, 150 x 4.6 mm; nhiệt độ cột 25 °C; pha động Acetonitrile : H₃PO₄ 0,1% (4:6 v/v); tốc độ dòng 1 mL/phút; đầu dò PDA; bước sóng phát hiện 225 nm; thời gian phân tích 35 phút và thể tích tiêm 10 µL.

Chuẩn bị mẫu:

Mẫu trắng: Dung môi pha động acetonitrile : H₃PO₄ 0,1% (4:6 v/v).

Dung dịch chuẩn gốc (S): Cân chính xác một lượng capsaicin chuẩn 98% tương ứng với 5 mg capsaicin vào bình định mức 25 mL, thêm methanol đến định mức, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Dung dịch thu được có nồng độ capsaicin là 200 µg/mL.

Các dung dịch chuẩn để xây dựng đường tuyến tính: Dùng pipet chính xác lấy một thể dung dịch dung dịch gốc S tương ứng với nồng độ cần pha cho vào bình định mức 10 mL, thêm methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Cách pha các dung dịch mẫu chuẩn được trình bày trong bảng 2.3.

Mẫu cao ớt: Cân chính xác khoảng 10 mg cao ớt vào bình định mức 20 mL, thêm methanol đến định mức, lắc đều. Lấy chính xác 1 mL dung dịch vừa pha, thêm methanol và định mức thành 10 mL, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Tiến hành làm 3 lần. Kết quả biểu thị bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

Bảng 2.3 Chuẩn bị các dung dịch chuẩn để xây dựng đường tuyến tính

Dung dịch	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Cách pha	
		Thể tích dung dịch S (mL)	Thể tích methanol (mL)
STD 1	10	0,5	Vừa đủ 10 mL
STD 2	20	1	
STD 3	40	2	
STD 4	60	3	
STD 5	80	4	
STD 6	100	5	

2.2.1.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

Khả năng gây độc tế bào *in vitro* đối với dòng tế bào ung thư vú MCF-7 của cao ớt được đánh giá sử dụng thử nghiệm WST-1. Phương pháp được mô tả ở phần 2.2.4 về đánh giá hoạt tính sinh học của nanoliposome mang cao ớt có so sánh với cao ớt tự do [12],[46].

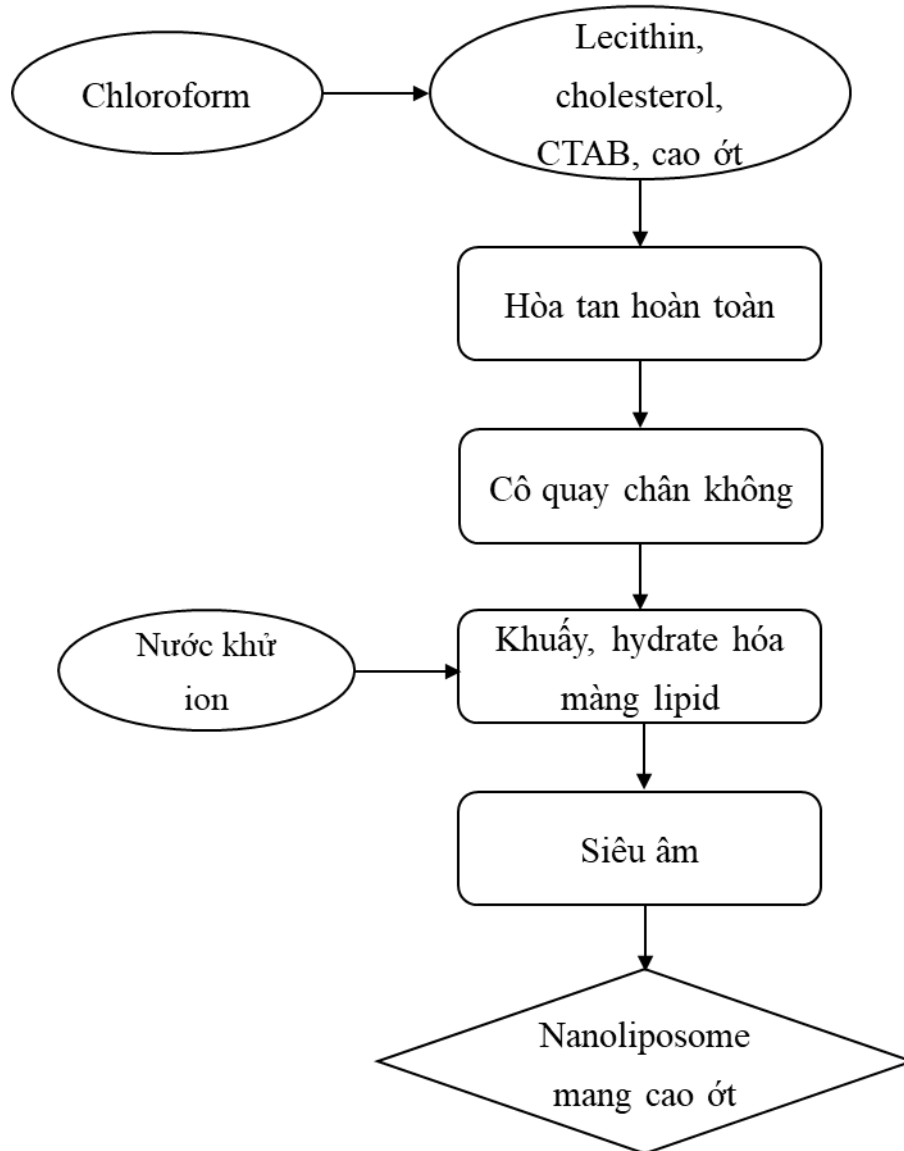
2.2.2. Nghiên cứu tổng hợp hệ nanoliposome mang cao ớt

2.2.2.1. Khảo sát thông số quy trình ảnh hưởng đến đặc tính lý hóa của liposome mang cao ớt

Hệ nanoliposome mang cao ớt được tổng hợp dựa trên quy trình tổng hợp nanoliposome của Nguyễn Đại Hải và cộng sự [8],[12],[46,47], sử dụng lecithin, cholesterol, CTAB và cao ớt bằng phương pháp hydrate hóa màng lipid, kết hợp giảm và đồng nhất kích thước hạt bằng siêu âm. Bên cạnh dựa theo các thông số của quy trình tổng hợp liposome của nhóm nghiên cứu trước đó, nghiên cứu có khảo sát thêm ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến các đặc tính lý hóa của hệ liposome mang cao ớt. Thiết bị siêu âm sử dụng là bể siêu âm Elmasonic S 80H (Đức), tần số siêu âm 37 kHz, công suất 100%. Mẫu được

lấy tại các thời điểm siêu âm sau 15, 30, 45, 60, 90 phút. Pha loãng mẫu 2 lần với nước cất và đo kích thước hạt, PDI sử dụng kỹ thuật tán xạ ánh sáng động trên thiết bị Horiba SZ-100 (Nhật Bản) tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng [49,50].

Quy trình nang hóa cao ốt vào hệ nanoliposome được trình bày trong hình 2.3.



Hình 2.3 Quy trình tổng hợp hệ nanoliposome mang cao ốt

Quy trình tổng hợp hệ nanoliposome mang cao ốt được diễn giải như sau:

Bước 1: Cân lecithin, cholesterol, CTAB theo tỉ lệ 90:10:1,5 (w/w/w) và cao ốt tinh chế theo hàm lượng khảo sát vào bình cầu, thêm 20 mL chloroform, lắc đều đến khi tan hoàn toàn.

Bước 2: Cô quay dung dịch trên ở 50 °C trong 2 giờ để loại hết dung môi và tạo lớp màng lipid mỏng.

Bước 3: Thêm 10 mL nước deion vào bình cầu, thực hiện hydrate hóa màng lipid tạo liposome bằng khuấy từ, sau đó bằng siêu âm ở 60 °C theo thời gian khảo sát.

Bước 4: Dung dịch liposome mang cao ốt được phân tích kích thước hạt, PDI, thế zeta, được bảo quản ở 4 – 8 °C trong suốt quá trình phân tích.

Sau khi đã xác định được thời gian siêu âm phù hợp, tiến hành khảo sát hàm lượng của cao ốt có thể nang hóa vào liposome.

2.2.2.2. *Khảo sát hàm lượng của cao ốt có thể nang hóa vào liposome*

Hàm lượng cao ốt được khảo sát để nang hóa vào liposome là 10, 20, 30, 40 và 50 (w/w). Các công thức được trình bày trong bảng 2.6.

Bảng 2.6 Các công thức liposome mang cao ốt được khảo sát

Công thức	LC0	LC1	LC2	LC3	LC4	LC5
Thành phần						
Lecithin	90	90	90	90	90	90
Cholesterol	10	10	10	10	10	10
CTAB	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Cao ốt	0	10	20	30	40	50

Sau tổng hợp, các công thức nanoliposome mang cao ốt được đánh giá độ ổn định thông qua đánh giá cảm quan, sự phân tích kích thước hạt, PDI và thế zeta (có so sánh với nanoliposome không mang cao ốt) để chọn ra công thức ổn định tối ưu cho những nghiên cứu tiếp theo.

2.2.3. **Đánh giá các đặc trưng lý hóa của hệ nanoliposome mang cao ốt**

2.2.3.1. *Phương pháp đánh giá cảm quan*

So sánh màu sắc, độ đục trong của các hỗn dịch liposome tạo thành và sự lắng cặn, tách pha, kết tụ của hỗn dịch nếu có [49,51].

2.2.3.2. *Phương pháp đánh giá hình thái, cấu trúc liposome*

Phương pháp chụp hiển vi điện tử truyền qua (Transmission Electron Microscopy, TEM) được dùng để xác định hình thái, cấu trúc liposome tạo thành [51,52] sử dụng thiết bị kính hiển vi điện tử truyền qua Jeol JEM – 1400 (Mỹ) tại Viện 69, Hà Nội.

Chuẩn bị mẫu đo TEM: Nhỏ 1 giọt mẫu lên miếng film (formvar support film) của thiết bị TEM, sau đó nhỏ 1 giọt dung dịch nhuộm âm PTA 1% (phosphotungstic acid) đã chuẩn bị lên. Để khô trong không khí trước khi đo.

Phương pháp quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier được dùng để phân tích những thay đổi có thể có trong cấu trúc của nanoliposome mang cao ốt [51] sử dụng thiết bị quang phổ hồng ngoại Nicolet iS10 (Thermo scientific, Mỹ) tại Trường Đại học Trà Vinh.

Chuẩn bị mẫu đo FTIR: Mẫu liposome và liposome mang cao ốt được đông khô, sử dụng thiết bị đông khô Eyela FDU-1200 (Nhật Bản) tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng trước khi tiến hành phân tích phổ FTIR.

2.2.3.3. *Phương pháp đánh giá kích thước hạt, độ đa phân tán và thế zeta*

Kích thước hạt (Z-average), độ đa phân tán (PDI) và điện thế zeta (zeta potential) được đo bằng kỹ thuật tán xạ ánh sáng động (Dynamic Light Scattering, DLS) [49,50] trên thiết bị Horiba SZ-100 (Nhật Bản) tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng. Mỗi mẫu đo lặp lại 3 lần, kết quả biểu diễn bằng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn.

Chuẩn bị mẫu: Pha loãng mẫu 2 lần với nước cất, lắc đều trước khi đo.

2.2.3.4. *Phương pháp xác định hiệu suất nang hóa và hàm lượng tải của hệ nanoliposome mang cao ốt*

Hiệu suất nang hóa và hàm lượng tải của hệ nanoliposome mang cao ốt được xác định bằng phương pháp màng thẩm tách để loại cao ốt tự do không được nang hóa trong hỗn dịch liposome.

Mô tả phương pháp: Cân 2 g mẫu liposome mang cao ốt cho vào túi thẩm tách (MWCO = 3,5 kDa), ngâm túi chứa mẫu trong 20 mL nước cất, khuấy 100 rpm trong 2 giờ, lặp lại 4 lần [31].

Hàm lượng capsaicin nang hóa trong liposome được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao [24],[39] sử dụng thiết bị HPLC Ultimate 3000

(Thermo scientific, Mỹ) tại Trường Đại học Trà Vinh với điều kiện sắc ký đã được mô tả trước đó.

Chuẩn bị mẫu liposome mang cao ớt: Cân chính xác khoảng 1 g liposome mang cao ớt vào bình định mức 20 mL, thêm methanol đến định mức, lắc đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Chuẩn bị mẫu liposome mang cao ớt sau khi loại cao ớt tự do: Cân chính xác khoảng 1 g liposome mang cao ớt sau khi loại cao ớt tự do vào bình định mức 25 mL, thêm methanol đến định mức, lắc đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Hiệu suất nang hóa (EE) và hàm lượng tải (LC) của hệ nanoliposome mang cao ớt được tính theo công thức:

$$EE (\%) = \frac{\text{Lượng capsaicin nang hóa trong liposome}}{\text{Lượng capsaicin ban đầu}} \times 100$$

$$LC (\%) = \frac{\text{Lượng capsaicin nang hóa trong liposome}}{\text{Khối lượng tổng của liposome mang cao}} \times 100$$

2.2.3.5. Đánh giá sự ổn định của hệ nanoliposome nang hóa cao ớt

Hệ nanoliposome nang hóa cao ớt được đánh giá độ ổn định trong suốt 4 tuần bảo quản ở 2 – 8 °C thông qua việc theo dõi sự thay đổi kích thước hạt, độ đa phân tán và điện thế zeta theo thời gian lần lượt là 1, 7, 14, 21 và 28 ngày, sử dụng kỹ thuật tán xạ ánh sáng động trên thiết bị Horiba SZ-100 (Nhật Bản) tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng [49],[50].

Chuẩn bị mẫu: Pha loãng mẫu 2 lần với nước cất, lắc đều trước khi đo.

2.2.3.6. Đánh giá khả năng phóng thích của nanoliposome mang cao ớt

Hồ sơ phóng thích thuốc của hệ liposome mang cao ớt được đánh giá bằng phương pháp màng thẩm tách.

Mô tả phương pháp: Cân 5 g mẫu liposome mang cao ớt (LC4) cho vào túi thẩm tách (MWCO = 3,5 kDa), ngâm túi chứa mẫu vào trong 25 mL dung dịch muối đệm PBS pH 7,4 với ethanol theo tỉ lệ 1:1 (v/v), duy trì nhiệt độ môi trường phóng thích 37 °C, tốc độ khuấy 100 rpm. Mẫu so sánh, cân 20 mg cao ớt chứa tương đương lượng capsaicin trong hệ liposome mang cao ớt. Tại các thời điểm 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 giờ, lấy 1,5 mL mẫu ra khỏi dung dịch và 1,5 mL môi trường mới được thêm vào [31].

Hàm lượng capsaicin được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao [24],[39] sử dụng thiết bị Ultimate 3000 (Thermo scientific, Mỹ).

Chuẩn bị mẫu đo HPLC: Các mẫu lấy theo giờ được pha loãng 3 lần với methanol, lắc đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Phần trăm lượng capsaicin phóng từ nanoliposome tại thời điểm t được tính sử dụng công thức:

$$\text{CR}(\%) = \sum_{t=0}^t \frac{P_t}{P_0} \times 100$$

Trong đó, CR (cumulative release) là % capsaicin phóng thích tích lũy; P_t là lượng capsaicin được giải phóng tại thời gian t và P_0 là lượng tổng capsaicin trong công thức liposome mang cao ốt ban đầu.

2.2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học của hệ nanoliposome mang cao ốt

Khả năng gây độc tế bào in vitro đối với dòng tế bào ung thư vú MCF-7 của nanoliposome mang cao ốt được đánh giá sử dụng thử nghiệm WST-1. Tất cả các đánh giá hoạt tính có đối chiếu với cao ốt tự do và hệ nanoliposome trắng không mang cao ốt [12],[46].

Phương pháp được mô tả như sau: Cây tế bào MCF-7 vào đĩa 96 giếng với mật độ tế bào 5×10^5 tế bào/giếng. Sau 24 giờ nuôi cấy, loại bỏ môi trường nuôi cấy, bổ sung mẫu thí nghiệm: liposome, cao ốt, liposome mang cao ốt với nồng độ thử nghiệm khác nhau và mẫu chứng: DMEM, PBS. Tiếp tục ủ mẫu 48 giờ, và chụp hình mẫu. Sau đó, cho 10 μL WST-1 vào mỗi giếng, ủ 4 giờ và đo độ hấp thụ của mẫu ở bước sóng 450 nm bằng thiết bị đọc vi đĩa. Các tế bào được nuôi cấy chỉ với môi trường được sử dụng làm đối chứng và được chỉ định cho tỷ lệ sống sót 100%.

Kết quả được biểu thị bằng khả năng sống sót của tế bào (cell viability, CV) bằng cách sử dụng phương trình sau:

$$\text{CV} (\%) = \frac{\text{Độ hấp thụ}_{\text{mẫu}} - \text{Độ hấp thụ}_{\text{mẫu trắng}}}{\text{Độ hấp thụ}_{\text{chứng}} - \text{Độ hấp thụ}_{\text{mẫu trắng}}} \times 100$$

2.2.5. Phân tích thống kê

Mỗi phép đo đặc tính lý hóa lặp lại 3 lần. Sử dụng công cụ phân tích dữ liệu trong excel để phân tích thống kê. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. Sự khác biệt giữa các giá trị có ý nghĩa thống kê khi $p \leq 0,05$ [31].

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ TRÍCH LY, ĐÁNH GIÁ CÁC ĐẶC TÍNH HÓA LÝ VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO ỚT

3.1.1. Kết quả điều chế cao ớt

3.1.1.1. Đánh giá cảm quan cao chiết

Cao ớt là chất lỏng đồng nhất, có độ sánh, màu đỏ hơi sẫm, mùi xốc, vị cay, gây nóng đỏ da khi tiếp xúc (hình 3.1).



Hình 3.1 Sản phẩm cao ớt chiết được

3.1.1.2. Hiệu suất điều chế cao

Hiệu suất chiết được đánh giá bằng hàm lượng capsaicin chiết được trong 1 g bột ớt, kết quả thu được là $2,0591 \pm 0,0193$ mg capsaicin/1g bột ớt. Sau khi loại bớt tạp chất màu và chất béo, hàm lượng capsaicin trong cao ớt thu được là $37,28 \pm 0,20\%$ (w/w). Kết quả được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1 Hiệu suất điều chế cao ớt

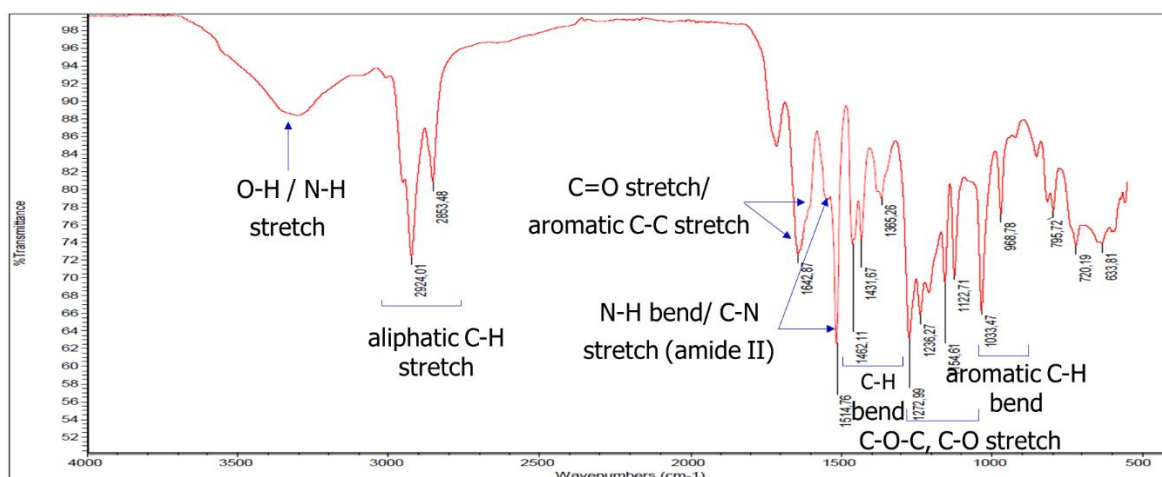
Mẻ	Hàm lượng capsaicin/ 1g bột ớt khô (mg/g)	Hàm lượng capsaicin trong cao ớt (%) (w/w)
1	$2,0370 \pm 0,0116$	$38,92 \pm 0,24$
2	$2,0813 \pm 0,0269$	$35,48 \pm 0,16$
Trung bình	$2,0591 \pm 0,0193$	$37,28 \pm 0,20$

Hiệu suất chiết cao ớt thấp hơn so với nghiên cứu của Võ Đỗ Minh Hoàng và cộng sự (3,408 mg capsaicin/1 g bột ớt) [24]. Nguyên nhân do ớt khô được bảo quản trong thời gian dài (từ năm 2020) làm capsaicin hao hụt đáng kể.

3.1.2. Kết quả đánh giá các đặc tính hóa lý của cao ớt

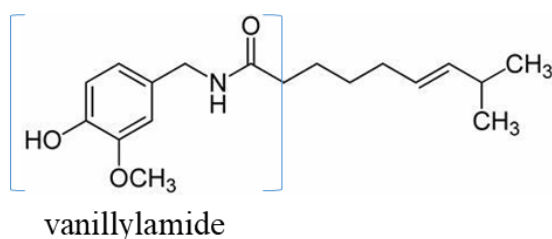
3.1.2.1. Kết quả đánh giá đặc trưng cấu trúc bằng FTIR

Tiến hành phân tích phổ FTIR của cao ớt thu được phổ đồ như hình 3.2.



Hình 3.2 Phổ FTIR của cao ớt đo trên thiết bị NICOLET iS10

Các nhóm chức/ liên kết được biện giải trong phổ hồng ngoại là phù hợp với các thành phần của cao ớt (capsaicinoid, carotenoid, triterpenoid, alkaloid, chất béo, chất khử, acid hữu cơ,...) [24]. Trong đó, 2 peak 1642 và 1514 cm^{-1} được xác định là đặc trưng cho nhóm liên kết C=O/ C-C vòng thơm và N-H/ C-N của cấu trúc vanillylamide trong các capsaicinoid (hình 3.3) [48]. Điều này được chứng minh khi kết hợp đối chiếu với phổ liposome và liposome mang cao ớt thì 2 peak này không xuất hiện trong phổ của liposome trắng, nhưng xuất hiện trong phổ của liposome mang cao ớt (hình 3.16) và qua phân tích cấu trúc hóa học của các thành phần trong liposome (hình 1.5) thì không có cấu trúc nào chứa nhóm liên kết C-C vòng thơm và N-H/ C-N (amide II).

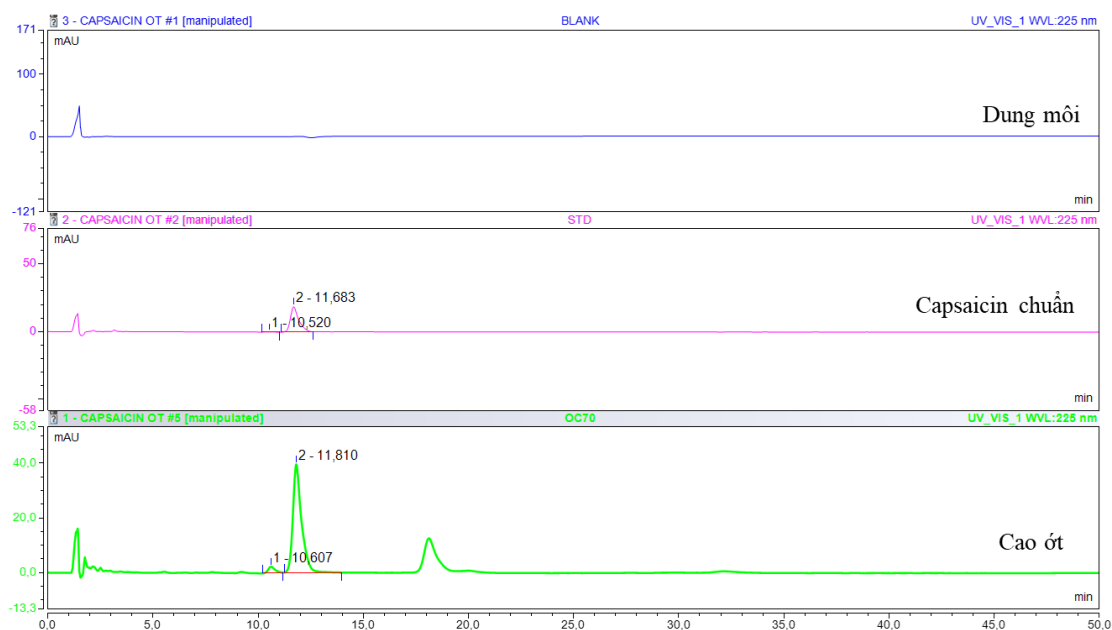


Hình 3.3 Cấu trúc vanillylamide trong các capsaicinoid

3.1.2.2. Kết quả định lượng capsaicin trong cao ớt bằng phương pháp HPLC

➤ **Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu:**

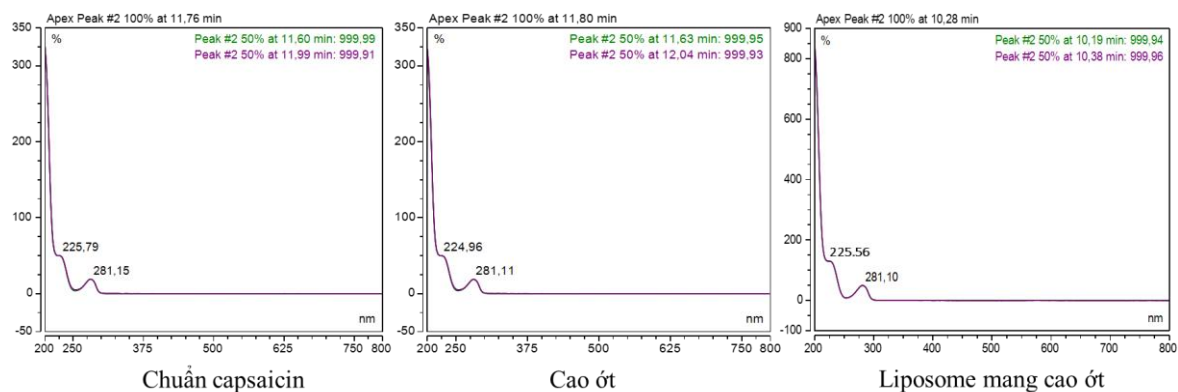
Tham khảo quy trình định lượng capsaicin theo Dược điển Hoa Kỳ USP41, tiến hành kiểm tra tính đặc hiệu của quy trình và kết quả thể hiện trong hình 3.4 đến 3.6.



Hình 3.4 Tính đặc hiệu của phương pháp định lượng capsaicin trong cao ớt



Hình 3.5 Tính đặc hiệu của phương pháp định lượng capsaicin trong liposome mang cao ớt



Hình 3.6 Phổ UV-Vis của mẫu chuẩn capsaicin và các mẫu thử

Hình 3.4 và 3.5 cho thấy: Sắc ký đồ của mẫu dung môi và mẫu liposome không xuất hiện peak tại thời điểm thời gian lưu tương ứng của capsaicin trong mẫu chuẩn ($t_r = 11,683$ phút). Sắc ký đồ của mẫu mẫu cao ớt và liposome mang cao ớt) tại bước sóng phát hiện 225 nm cho peak có thời gian lưu (t_r lần lượt là 11,810 và 11,863 phút), tương tự với peak chính trong sắc ký đồ mẫu chuẩn ($t_r = 11,683$ phút). Peak tạp trong sắc ký đồ mẫu thử tách hoàn toàn với peak capsaicin với độ phân giải $R_s > 1,8$ (bảng 3.2).

Hình 3.6 cho thấy phổ UV-Vis của capsaicin trong sắc ký đồ mẫu thử trùng với Phổ UV-Vis của capsaicin trong sắc ký đồ mẫu chuẩn. Peak capsaicin trong sắc ký đồ mẫu thử cho thấy đạt độ tinh khiết.

Tất cả những phân tích trên cho thấy quy trình đạt tính đặc hiệu.

➤ **Kết quả kiểm tra tính tương thích hệ thống:**

Tiến hành tiêm 6 lần mẫu capsaicin chuẩn vào hệ thống HPLC để kiểm tra tính tương thích hệ thống, kết quả được trình bày trong bảng 3.2.

Bảng 3.2 Kết quả kiểm tra tính tương thích hệ thống

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak (mAU)	Độ phân giải	Số đĩa lý thuyết
1	11,763	8,6381	1,98	4878
2	11,757	8,7247	1,96	4814
3	11,777	8,7066	1,86	4773
4	11,743	8,5784	2,02	4643
5	11,777	8,5789	1,98	4662
6	11,803	8,6171	1,88	4728
Trung bình	11,770	8,6406	Đạt	Đạt
RSD %	0,18	0,73		

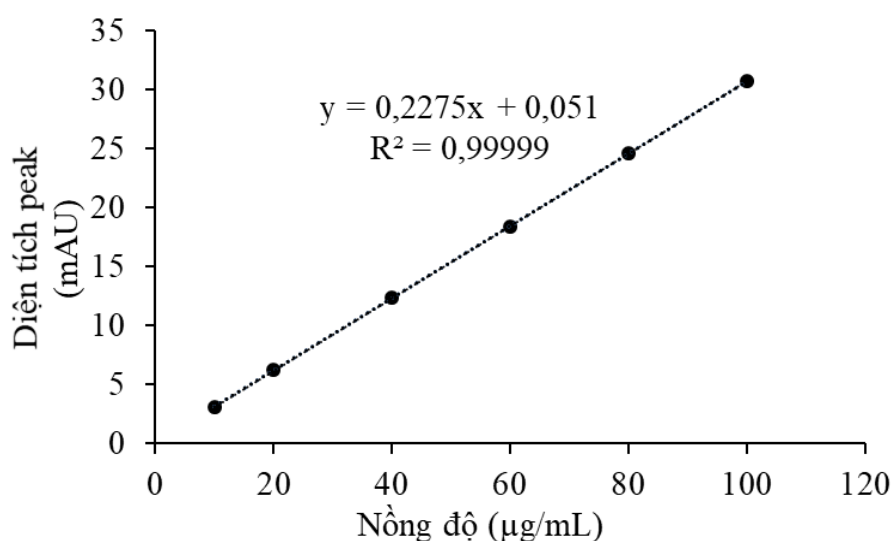
Bảng 3.3 cho thấy độ phân giải giữa peak capsaicin và peak tạp > 1,8; số đĩa lý thuyết > 4600; giá trị RSD % của thời gian lưu và diện tích peak của capsaicin không quá 2,0%. Như vậy, quy trình đạt tính phù hợp hệ thống.

➤ **Kết quả xây dựng đường chuẩn:**

Tiến hành định lượng capsaicin bằng phương pháp xây dựng đường chuẩn với khoảng nồng độ từ 10 ppm đến 100 ppm, kết quả được trình bày trong bảng 3.3 và hình 3.7.

Bảng 3.3 Mối liên hệ giữa nồng độ và diện tích peak của các mẫu chuẩn

STT	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích peak (mAU)
1	10	3,0991
2	20	6,1978
3	40	12,3302
4	60	18,4243
5	80	24,6052
6	100	30,6988
Phương trình hồi quy		$y = 0,2275x + 0,0510$
Hệ số tương quan R^2		0,99999



Hình 3.7 Đường biểu diễn mối liên hệ giữa nồng độ và diện tích peak của capsaicin

Qua phân tích thống kê sử dụng phần mềm excel cho thấy cho thấy: $t_a = 2,849599$, $t_b = 1039,145 > t_{\alpha} = 2,570582$ nên hệ số a,b có ý nghĩa; $F = 1079822 > F_{\alpha} = 230,1619$ nên phương trình có sự tương quan; với $R^2 = 0,99999$, khoảng tuyến tính 10 – 100 $\mu\text{g/mL}$. Như vậy, quy trình đạt tính tuyến tính với $R^2 = 0,99999$, khoảng tuyến tính là 10 – 100 $\mu\text{g/mL}$.

➤ **Kết quả định lượng capsaicin trong cao ớt được trình bày trong bảng 3.4:**

Bảng 3.4 Kết quả định lượng capsaicin trong cao ớt

Mẫu thử	Khối lượng cân (mg)	Diện tích peak (mAU)	Lượng capsaicin (mg)	Hàm lượng capsaicin (%)
1	9,64	4,3461	3,7759	39,17
2	9,64	4,2949	3,7309	38,70
3	9,64	4,3145	3,7481	38,88
Trung bình				38,91
SD				0,24

Hàm lượng capsaicin trong cao ớt là $38,91 \pm 0,24\%$. Cao ớt này được dùng để nang hóa vào liposome trong tất cả các thí nghiệm.

3.1.3. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học của cao ớt

Cao ớt có khả năng ức chế tế bào ung thư MCF-7 thể hiện qua tỉ lệ sống của tế bào giảm dần khi nồng độ capsaicin tăng dần. Tại nồng độ thấp của capsaicin, cụ thể, tại capsaicin $10 \mu\text{g/mL}$, tỉ lệ sống của tế bào trong mẫu chứa cao ớt là $56,56 \pm 1,7\%$. Tại nồng độ cao hơn, capsaicin không thể hiện rõ hiệu quả gây độc tế bào, ví dụ, tại capsaicin $50 \mu\text{g/mL}$, tỉ lệ tế bào sống trong mẫu chứa cao ớt là $55,41 \pm 3,2\%$, không khác biệt đáng kể so với tại nồng độ $10 \mu\text{g/mL}$.

Biểu đồ được trình bày ở phần 3.4 về kết quả thử nghiệm *in vitro* hoạt tính gây độc tế bào MCF-7 của liposome mang cao ớt, có đối chiếu với cao ớt tự do.

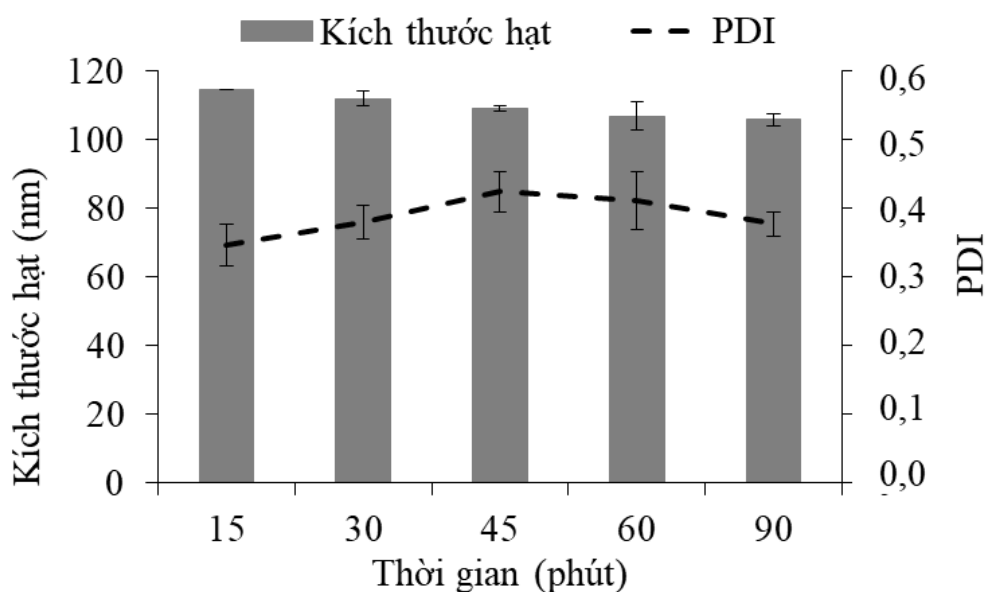
3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP HỆ NANOLIPOSOME NANG HÓA CAO ỚT

3.2.1. Kết quả ảnh hưởng thời gian siêu âm đến kích thước hạt và PDI của liposome mang cao ớt

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến kích thước hạt và PDI của mẫu liposome mang 30% cao ớt cho kết quả được trình bày ở bảng 3.5 và hình 3.8.

Bảng 3.5 Kết quả ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến kích thước hạt và PDI của liposome mang 30% cao ớt

Lần	15 phút		30 phút		45 phút		60 phút		90 phút	
	Kích thước (nm)	PDI	Kích thước (nm)	PDI	Kích thước (nm)	PDI	Kích thước (nm)	PDI	Kích thước (nm)	PDI
1	114,5	0,382	113,4	0,353	109,9	0,402	110,6	0,404	104,4	0,391
2	114,6	0,333	113,1	0,386	109,1	0,413	102,6	0,457	107,9	0,358
3	114,5	0,325	109,6	0,400	108,6	0,457	107,7	0,374	105,3	0,382
Trung bình	114,5	0,347	112,0	0,380	109,2	0,424	107,0	0,412	105,9	0,377
SD	0,1	0,031	2,1	0,024	0,7	0,029	4,1	0,042	1,8	0,017



Hình 3.8 Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến kích thước hạt và PDI của liposome mang 30% cao ốt

Bảng 3.5 cho thấy thời gian siêu âm càng tăng thì kích thước hạt của nanoliposome mang cao ốt có giảm nhưng không đáng kể, từ $114,5 \pm 0,1$ nm đến $105,9 \pm 1,8$ nm. Độ đa phân tán theo thời gian siêu âm dao động trong khoảng hẹp từ $0,347 \pm 0,031$ đến $0,424 \pm 0,029$. Tuy nhiên về cảm quan, mẫu sau 15 phút siêu âm vẫn còn nhưng mảng màng lipid bám trên thành bình tổng hợp. Để tiết kiệm năng lượng và rút ngắn thời gian tổng hợp, thời gian siêu âm 30 phút được chọn cho những nghiên cứu tổng hợp liposome mang cao ốt tiếp theo.

3.2.2. Kết quả khảo sát hàm lượng cao ốt nang hóa vào liposome

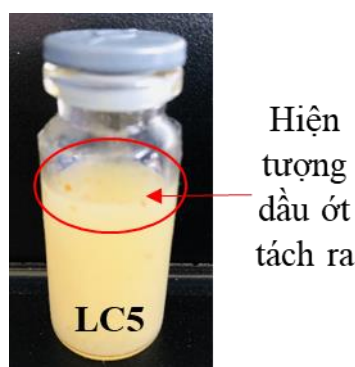
3.2.2.1. Kết quả đánh giá cảm quan

Tất cả mẫu liposome mang cao ốt với các hàm lượng cao ốt khác nhau từ 0, 10, 20, 30, 40 và 50%, tương ứng trong các công thức LC0, LC1, LC2, LC3, LC4, LC5 sau khi được tổng hợp có trạng thái đồng nhất, không tách lớp, lắng cặn, màu cam đậm dần khi tăng hàm lượng cao ốt (hình 3.9).



Hình 3.9 Các mẫu sản phẩm nanoliposome mang cao ốt với hàm lượng cao ốt khác nhau

Tuy nhiên trong quá trình bảo quản, công thức liposome mang 50% cao ốt (LC5) có hiện tượng dầu ốt xuất hiện trong dung dịch liposome, cho thấy công thức này kém ổn định (hình 3.10). Như vậy, hàm lượng cao ốt tối đa liposome có thể mang là không quá 50%.



Hình 3.10 Hiện tượng kém bền của mẫu liposome mang 50% cao ốt (LC5)

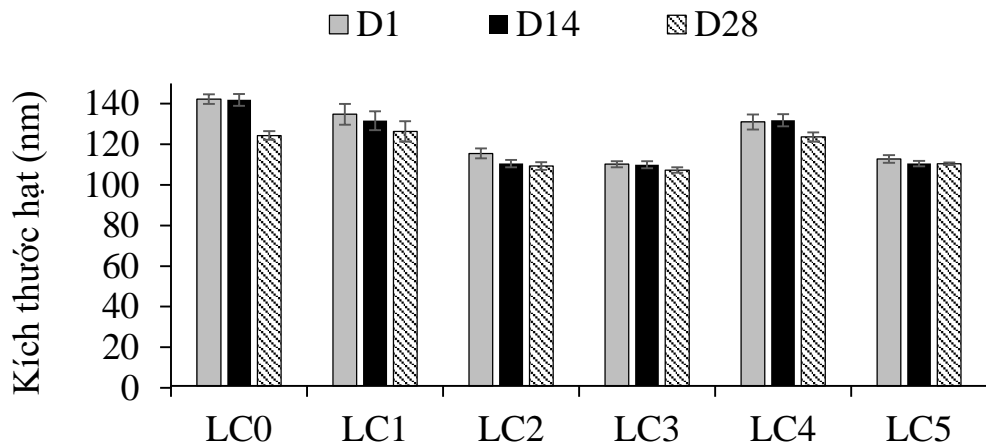
3.2.2.2. Kết quả phân tích kích thước hạt, PDI và thế zeta

Tiến hành phân tích kích thước hạt, PDI, thế zeta của các mẫu liposome mang cao ốt tại các thời điểm sau 1 ngày (D1), 14 ngày (D14), 28 ngày (D28) sử dụng kỹ thuật DLS cho kết quả được trình bày ở bảng 3.6, hình 3.11 đến 3.13.

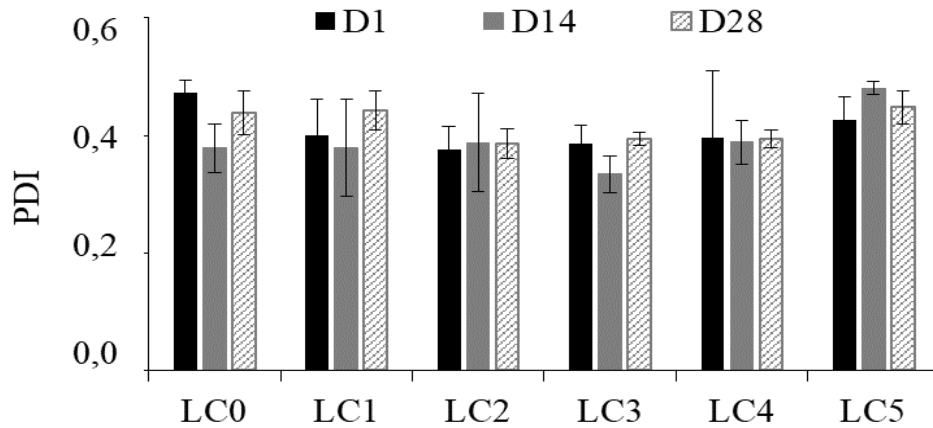
Bảng 3.6 Kết quả khảo sát kích thước hạt, PDI, thế zeta của các mẫu liposome mang cao ốt với hàm lượng cao ốt khác nhau theo thời gian

Mẫu	Lần	Ngày 1		Thế zeta (mV)	Ngày 14		Thế zeta (mV)	Ngày 28		Thế zeta (mV)
		Kích thước (nm)	PDI		Kích thước (nm)	PDI		Kích thước (nm)	PDI	
LC0	1	144,9	0,468	-77,1	139,5	0,359	-60,8	122,6	0,395	-50,6
	2	141,7	0,457		145,1	0,278		126,6	0,463	
	3	140,1	0,496		141,1	0,315		123,6	0,456	
	Trung bình	142,2	0,474		141,9	0,317		124,3	0,438	
	SD	2,4	0,020		2,88	0,041		2,1	0,037	
LC1	1	132,7	0,446	-71,9	134,9	0,292	-54,5	129,9	0,475	-44,6
	2	140,6	0,332		126,4	0,456		120,5	0,409	
	3	131,1	0,424		133,6	0,389		128,6	0,445	
	Trung bình	134,8	0,401		131,6	0,379		126,3	0,443	
	SD	5,1	0,060		4,58	0,082		5,1	0,033	
LC2	1	117,6	0,398	-68,5	110,5	0,395	-53,7	109,2	0,362	-49,6
	2	112,7	0,400		108,8	0,468		111,3	0,383	
	3	116,1	0,330		112,3	0,300		107,5	0,413	
	Trung bình	115,5	0,376		110,5	0,388		109,3	0,386	
	SD									

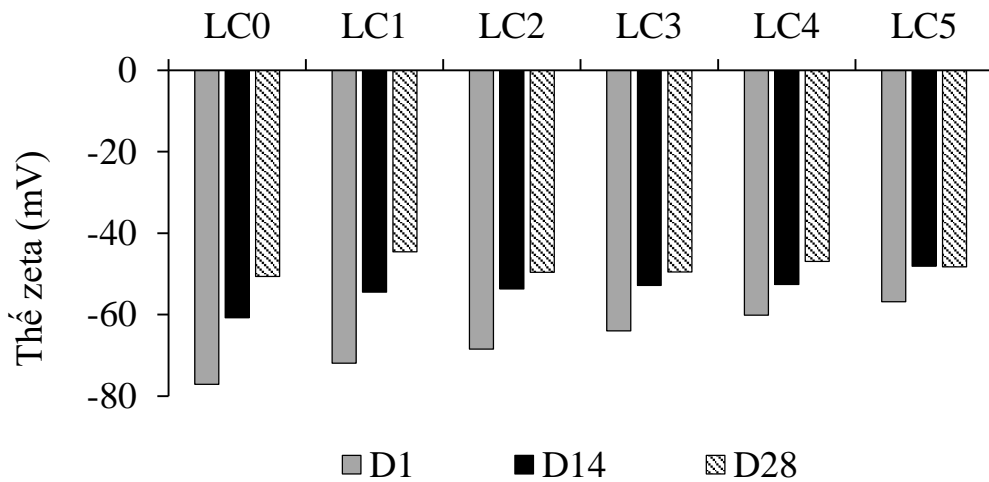
	SD	2,5	0,040		1,75	0,084		1,9	0,026
	1	111,9	0,421		108,4	0,368		106,8	0,400
	2	109,4	0,375		109,5	0,305		108,7	0,381
LC3	3	109,2	0,363	-64	111,7	0,329	-52,8	106,1	0,400
	Trung bình	110,2	0,386		109,9	0,334		107,2	0,394
	SD	1,5	0,031		1,68	0,032		1,3	0,011
	1	128,1	0,510		132,6	0,370		121,1	0,411
	2	135,2	0,285		134,4	0,363		124,1	0,392
LC4	3	129,7	0,395	-60,1	128,6	0,432	-52,6	125,6	0,381
	Trung bình	131,0	0,397		131,9	0,388		123,6	0,395
	SD	3,7	0,113		2,97	0,038		2,3	0,015
	1	114,3	0,453		112,0	0,493		111,0	0,446
	2	113,1	0,381		109,9	0,474		109,9	0,476
LC5	3	110,6	0,445	-56,8	109,7	0,473	-48,1	110,3	0,421
	Trung bình	112,7	0,426		110,5	0,480		110,4	0,448
	SD	1,9	0,039		1,27	0,011		0,6	0,028



Hình 3.11 Kích thước hạt của các mẫu liposome mang cao ốt với hàm lượng cao ốt khác nhau theo thời gian



Hình 3.12 PDI của các mẫu liposome mang cao ốt với hàm lượng cao ốt khác nhau theo thời gian



Hình 3.13 Thế zeta của các mẫu liposome mang cao ốt với hàm lượng cao ốt khác nhau theo thời gian

Hình 3.11, 3.12 cho thấy trong thời gian khảo sát 28 ngày, kích thước hạt, PDI của các mẫu liposome mang cao ốt không thay đổi đáng kể, cho thấy các mẫu liposome mang cao ốt ổn định trong quá trình bảo quản 28 ngày. Hình 3.13 cho thấy thế zeta giảm dần khi hàm lượng mang cao ốt càng cao, giảm từ -71.9 xuống -56.8 mV khi hàm lượng cao ốt tăng từ 10 đến 50%. Trong thời gian khảo sát 28 ngày, thế zeta có xu hướng giảm nhẹ ở tất cả các mẫu liposome mang cao ốt nhưng hệ vẫn ổn định trong khoảng quá trình bảo quản 28 ngày.

Như vậy, thông qua sự ổn định về cảm quan, kích thước hạt, PDI và thế zeta thì công thức liposome mang 40% cao ốt (LC4) được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.

3.3. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ CÁC ĐẶC TÍNH CỦA HỆ NANOLIPOSOME NANG HÓA CAO ỚT

3.3.1. Kết quả đánh giá các đặc tính hóa lý

3.3.1.1. Kết quả đánh giá cảm quan

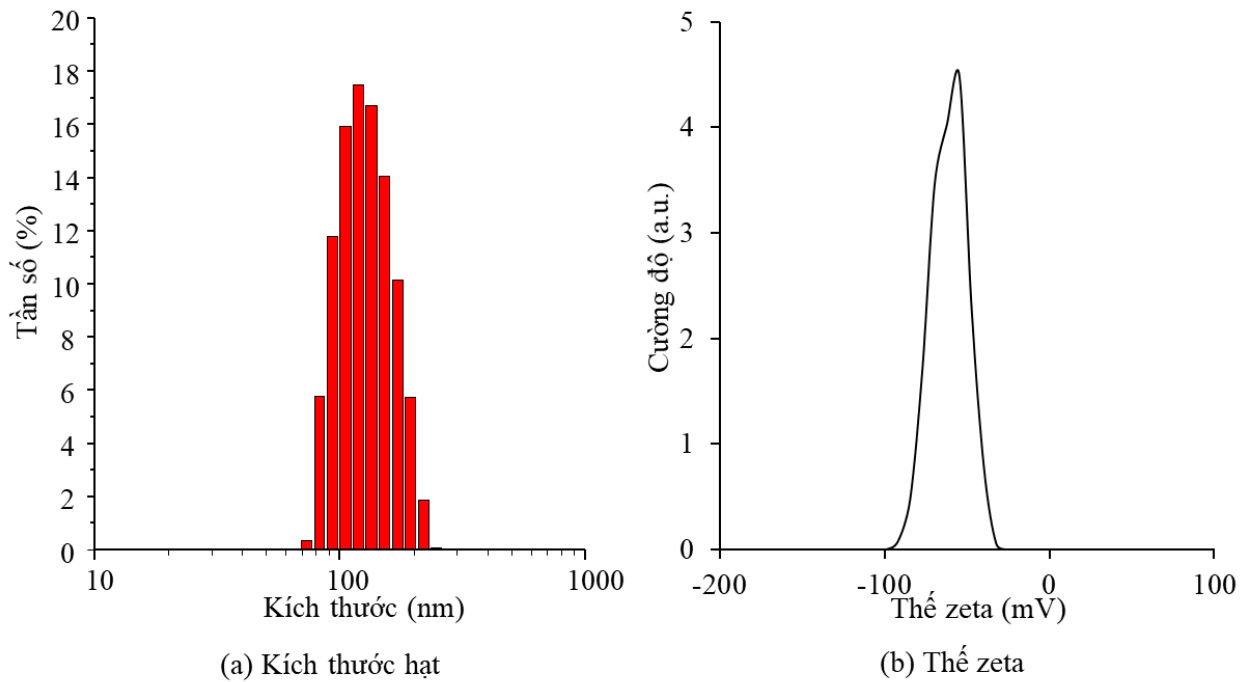
Liposome mang 40% cao ốt (LC4) sau khi được tổng hợp có trạng thái đồng nhất, không tách lớp, lắng cặn, có độ đục của liposome và màu cam đặc trưng của cao ốt (hình 3.9).

3.3.1.2. Xác định kích thước hạt, chỉ số PDI và thế zeta

Mẫu liposome mang cao ốt được đánh giá kích thước hạt, độ đa phân tán (PDI), thế zeta sử dụng kỹ thuật DLS như mô tả trước đó. Mỗi phép đo lặp lại 3 lần. Kết quả được trình bày ở bảng 3.7 và hình 3.14.

Bảng 3.7 Kết quả kích thước hạt, PDI và thế zeta của mẫu liposome mang 40% cao ốt (LC4)

Số lần đo	Kích thước (nm)	PDI	Thế Zeta (mV)
1	128,1	0,510	
2	135,2	0,285	-60,1
3	129,7	0,395	
Trung bình	131,0 ± 3,7	0,397 ± 0,110	- 60,1

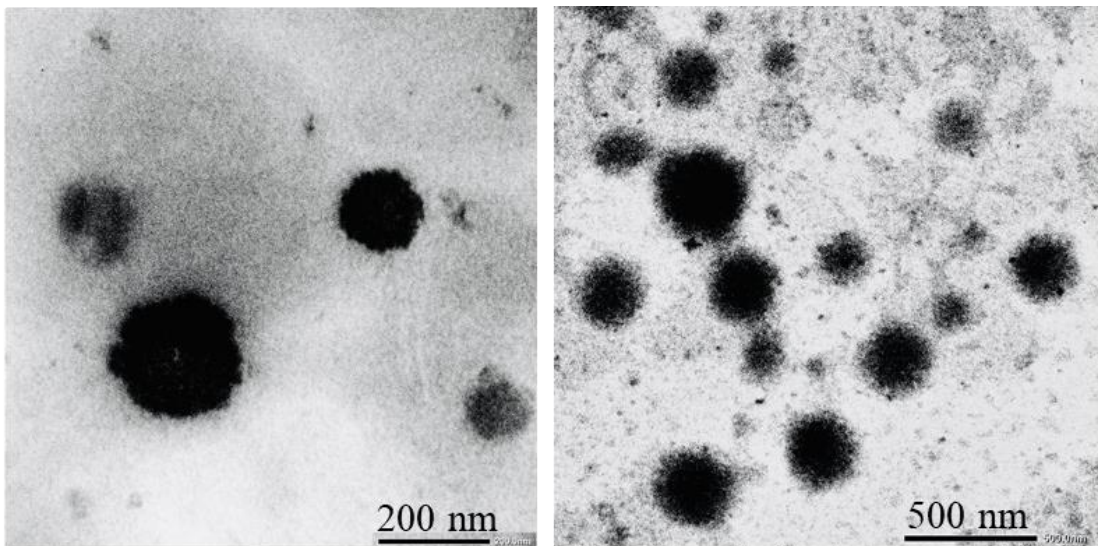


Hình 3.14 Các đặc tính lý hóa của mẫu liposome 40% mang cao ốt (LC4)

a) Kích thước hạt; b) Thế zeta

3.3.1.3. Kết quả đánh giá hình thái, cấu trúc liposome

Sử dụng phương pháp hiển vi điện tử truyền qua (transmission electron microscopy, TEM) để xác định hình thái, cấu trúc liposome tạo thành. Kết quả được trình bày ở hình 3.15.

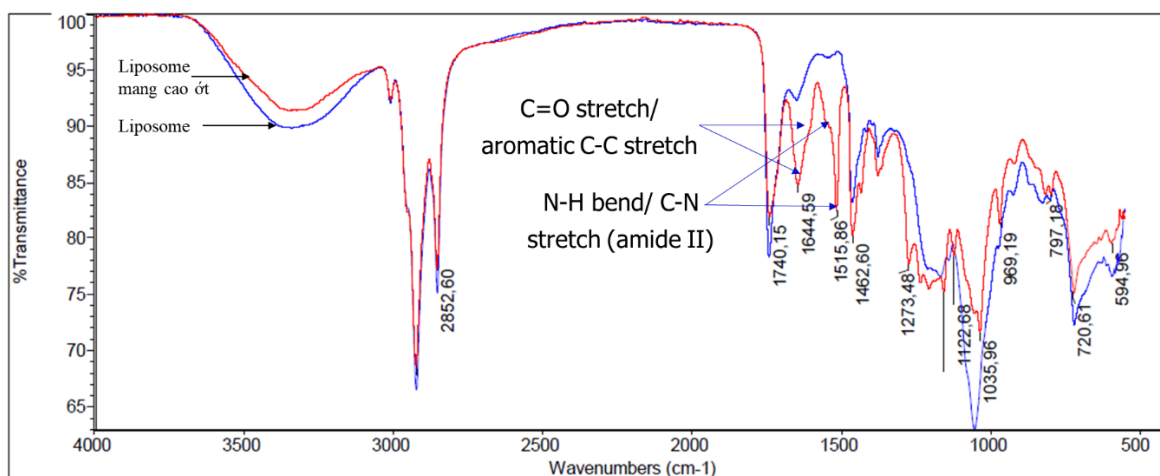


Hình 3.15 Ảnh TEM của mẫu liposome mang 40% cao ốt (LC4)

Ảnh chụp TEM cho thấy liposome mang cao ốt là những tiểu phân hình cầu, có kích thước phân bố chủ yếu trong khoảng từ 100nm đến 200 nm, tương đồng với kích thước hạt phân bố phân tích được trong biểu đồ DLS như hình 3.14.a.

Phổ hồng ngoại FTIR

Phổ hồng ngoại được dùng để đánh giá những thay đổi có thể có trong cấu trúc của liposome mang cao ốt bằng cách đối chiếu phổ của liposome mang cao ốt với phổ của liposome và phổ của cao ốt trước đó. Kết quả phổ IR được trình bày trong hình 3.16.



Hình 3.16 Phổ FTIR của liposome và liposome mang cao ốt

Khi kết hợp đối chiếu với phổ liposome và liposome mang cao ốt thì 2 peak 1644 và 1515 cm^{-1} không xuất hiện trong phổ của liposome, nhưng xuất hiện trong phổ của liposome mang cao ốt (hình 3.16). Và qua phân tích cấu trúc hóa học của các thành phần liposome (hình 1.5) thì không có cấu trúc nào chứa nhóm liên kết C-C vòng thơm và N-H/ C-N (amide II). Do đó, 2 peak này được xác định là đặc trưng cho nhóm C=O/ C-C vòng thơm và N-H/ C-N của cấu trúc vanillylamide trong các capsaicinoid như đã phân tích trước đó trong phổ của cao ốt (hình 3.2) [48]. So sánh các peak còn lại trong phổ của liposome và liposome mang cao ốt cho thấy chúng hoàn toàn phù hợp về vị trí peak, hình dạng và cường độ peak. Như vậy chứng minh tác động thấp của việc nang hóa cao ốt lên cấu trúc phân tử của liposome và cao ốt.

3.3.2. Kết quả xác định hiệu suất nang hóa và hàm lượng tải cao ớt của hệ nanoliposome

Sau khi tiến hành loại cao ớt tự do trong mẫu liposome mang cao ớt bằng phương pháp màng thấm tách. Hàm lượng capsaicin trong liposome mang cao ớt trước và sau khi loại cao ớt tự do được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao và kết quả được trình bày ở bảng 3.8.

Bảng 3.8 Kết quả định lượng capsaicin trong mẫu liposome mang 40% cao ớt (LC4) trước và sau khi loại cao ớt tự do

Mẫu thử	Liposome mang cao				Liposome mang cao đã loại cao ớt tự do			
	Khối lượng cân (mg)	Diện tích peak (mAU)	Lượng capsaicin (mg)	Hàm lượng capsaicin (%)	Khối lượng cân (mg)	Diện tích peak (mAU)	Lượng capsaicin (mg)	Hàm lượng capsaicin (%)
1	1012	17,7950	1,5599	0,154	1012	12,9953	1,4244	0,140
2	1012	17,5687	1,5400	0,152	1012	12,9782	1,4205	0,140
3	1012	17,6369	1,5460	0,153	1012	12,9084	1,4129	0,139
Trung bình			1,5486	0,153	Trung bình		1,4186	0,140
SD			0,01	0,001	SD		0,01	0,001

Từ bảng 3.8, lượng capsaicin trong liposome mang 40% cao ớt (LC4) là $1,5486 \pm 0,01$ mg và sau khi đã loại cao ớt tự do là $1,4186 \pm 0,01$ mg.

- Hiệu suất nang hóa (EE) được tính theo công thức sau:

$$EE (\%) = \frac{\text{Khối lượng capsaicin nang hóa trong liposome}}{\text{Khối lượng capsaicin ban đầu}} \times 100$$

$$EE (\%) = \frac{1,4186}{1,5486} \times 100 = 91,60\%$$

- Hàm lượng tải capsaicin được xác định bằng phương trình sau:

$$LC (\%) = \frac{\text{Khối lượng capsaicin nang hóa trong liposome}}{\text{Khối lượng tổng của liposome mang cao}} \times 100$$

$$LC (\%) = \frac{1,4186}{1012,97} \times 100 = 0,14 \%$$

(Khối lượng tổng của mẫu liposome mang cao ốt ban đầu là 1012,97 mg)

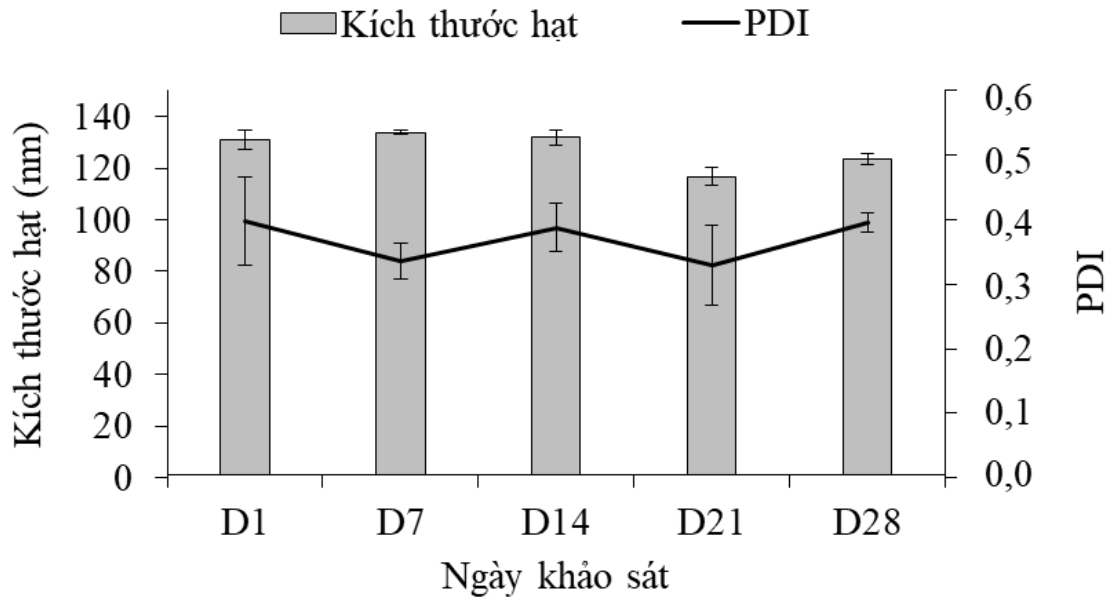
Như vậy, hiệu suất nang hóa và hàm lượng tải capsaicin trong mẫu liposome mang 40% cao ốt (LC4) lần lượt là 91,60% và 0,14%.

3.3.3. Kết quả đánh giá sự ổn định của hệ nanoliposome nang hóa cao ốt

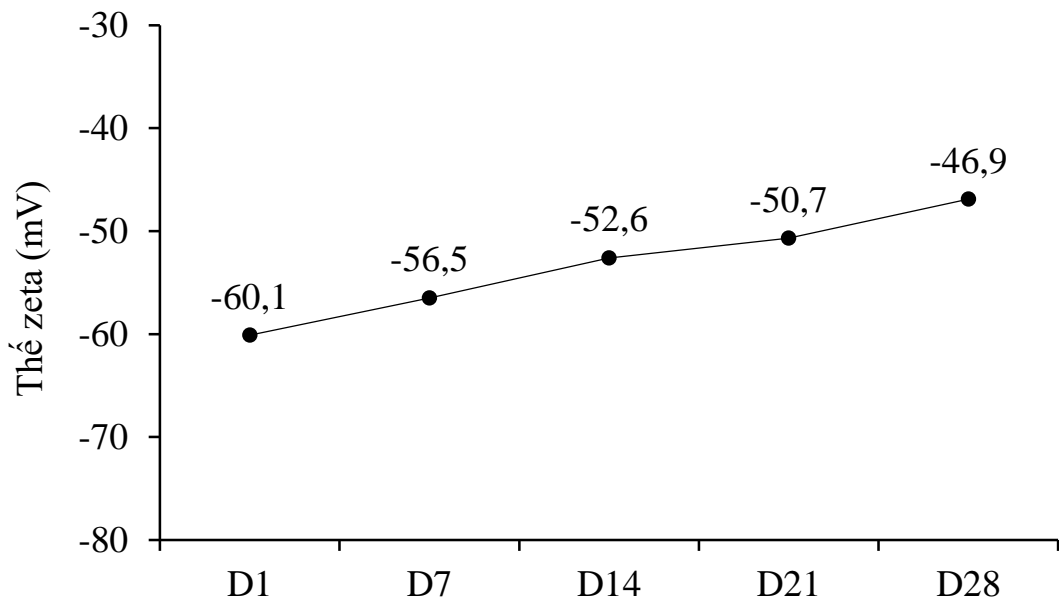
Độ ổn định của hệ nanoliposome mang cao ốt được đánh giá qua sự ổn định về kích thước hạt, thế zeta, và PDI trong thời gian 28 ngày. Kết quả được trình bày ở bảng 3.9 và hình 3.17, 3.18.

Bảng 3.9 Kết quả kích thước hạt, PDI và thế zeta của mẫu liposome mang 40% cao ốt (LC4)

Ngày	Kích thước hạt (nm)	PDI	Thế zeta (mV)
D1	131,0 ± 3,7	0,397 ± 0,068	-60,1
D7	133,9 ± 0,6	0,336 ± 0,028	-56,5
D14	131,9 ± 2,97	0,388 ± 0,038	-52,6
D21	116,8 ± 3,5	0,330 ± 0,062	-50,7
D28	123,6 ± 2,3	0,395 ± 0,015	-46,9



Hình 3.17 Kích thước hạt và PDI của mẫu liposome mang 40% cao ốt (LC4) theo thời gian



Hình 3.18 Thế zeta của mẫu liposome mang 40% cao ốt (LC4) theo thời gian

Bảng 2.10 cho thấy mẫu nanoliposome mang 40% cao ốt có độ ổn định tốt trong thời gian khảo sát 28 ngày, có kích thước hạt dao động từ $116,8 \pm 3,5$ nm đến $133,9 \pm 0,6$ nm; PDI ổn định trong khoảng hẹp từ $0,330 \pm 0,062$ đến $0,397$

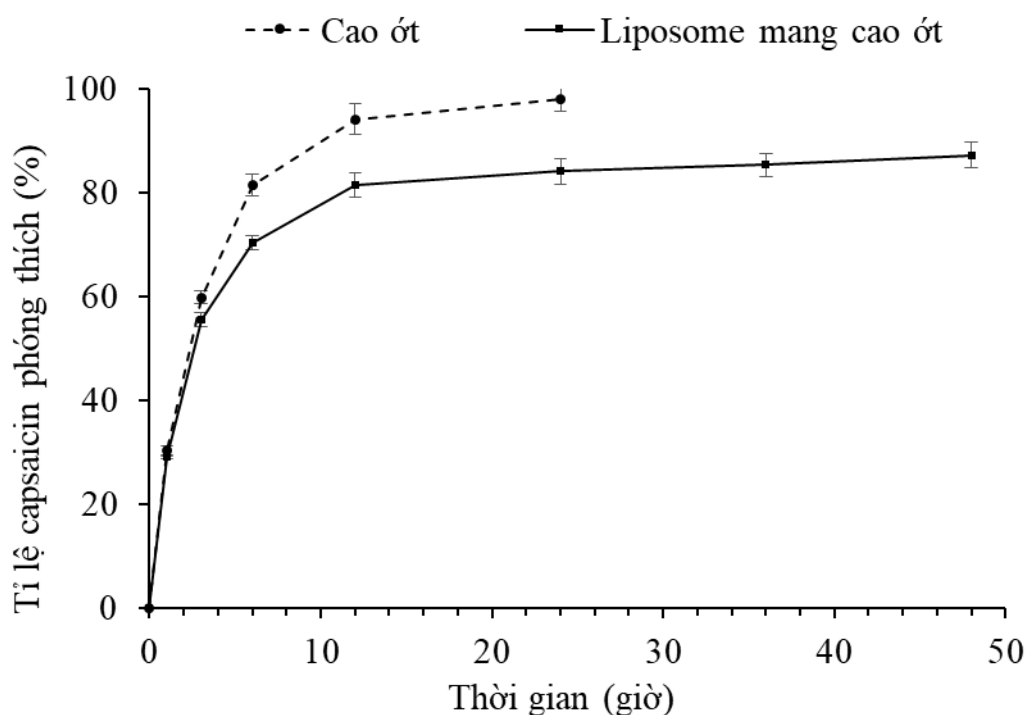
$\pm 0,112$. Thế zeta của công thức liposome mang cao ốt LC4 có giảm dần theo thời gian, từ -60,1 xuống -46,9 mV sau 28 ngày khảo sát. Nhưng thế zeta vẫn duy trì trong mức cao, và mẫu vẫn ổn định trong thời gian bảo quản. Như vậy cho thấy mẫu liposome mang 40% cao ốt ổn định tốt trong thời gian khảo sát 28 ngày.

3.3.4. Kết quả đánh giá khả năng phóng thích capsaicin của hệ nanoliposome mang cao ốt

Khả năng phóng thích capsaicin của hệ nanoliposome mang cao ốt có so sánh với cao ốt tự do được đánh giá bằng phương pháp màng thấm tách kết hợp với định lượng capsaicin bằng phương pháp HPLC. Kết quả được trình bày ở bảng 3.10 và hình 3.19.

Bảng 3.10 Tỷ lệ phóng thích capsaicin của hệ nanoliposome mang cao ốt so với cao ốt tự do

Thời gian (h)	Cao ốt			Liposome mang cao ốt		
	Diện tích peak (mAU)	Lượng capsaicin P_t (μg)	% CR capsaicin	Diện tích peak (mAU)	Lượng capsaicin P_t (μg)	% CR capsaicin
0	0	0	0	0	0	0
1	6,9543	2296	30,27	7,059	2305	29,20
3	13,445	4539	59,83	13,049	4391	55,64
6	17,647	6179	81,45	15,611	5550	70,31
12	19,509	7147	94,22	17,457	6429	81,46
24	19,150	7447	98,16	17,077	6642	84,16
36	-	-	-	16,313	6741	85,42
48	-	-	-	15,799	6889	87,29



Hình 3.19 Khả năng phóng thích của liposome mang cao ớt và cao ớt tự do

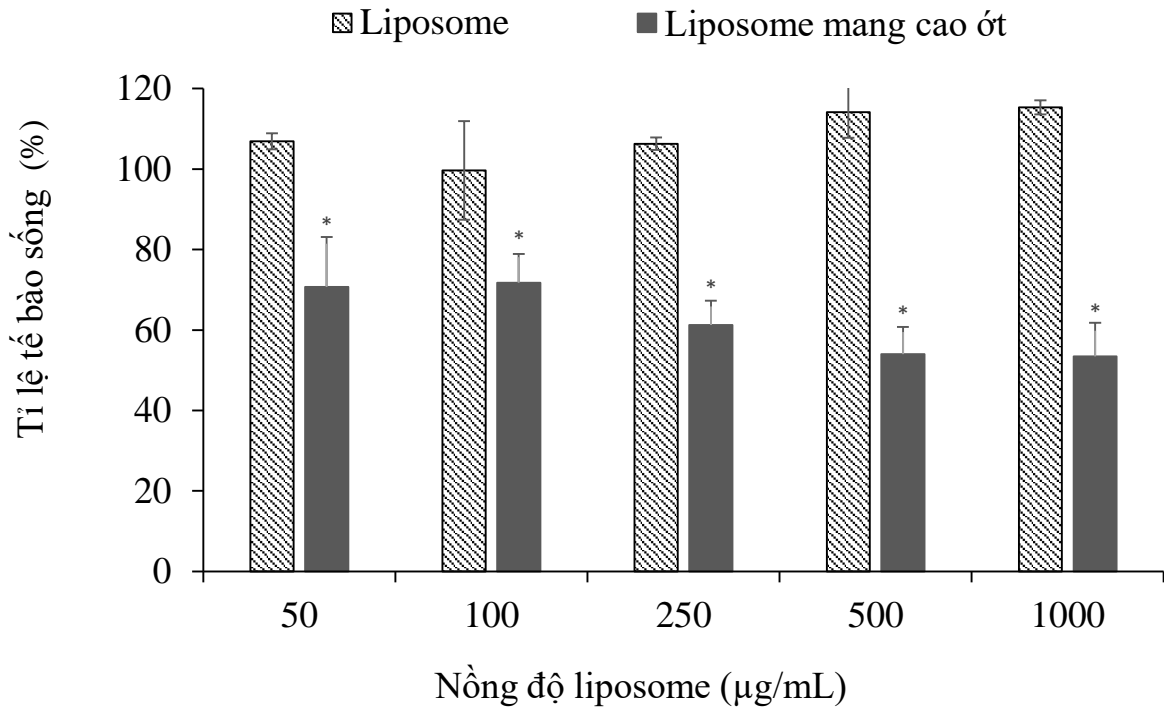
Trong môi trường thẩm tách pH 7,4 : ethanol (1:1 v/v), capsaicin được nang hóa trong liposome có khả năng phóng thích chậm hơn qua màng thẩm tách so với trong cao ớt tự do. Sau 24h, cao ớt phóng thích gần như hoàn toàn lượng capsaicin $98,16 \pm 2,5\%$, trong khi liposome mang cao ớt phóng thích $84,16 \pm 2,5\%$ và 24 giờ tiếp theo lượng capsaicin trong mẫu liposome mang cao ớt có tiếp tục phóng thích nhưng tăng không đáng kể.

3.4. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA HỆ NANOLIPOSOME MANG CAO ỚT

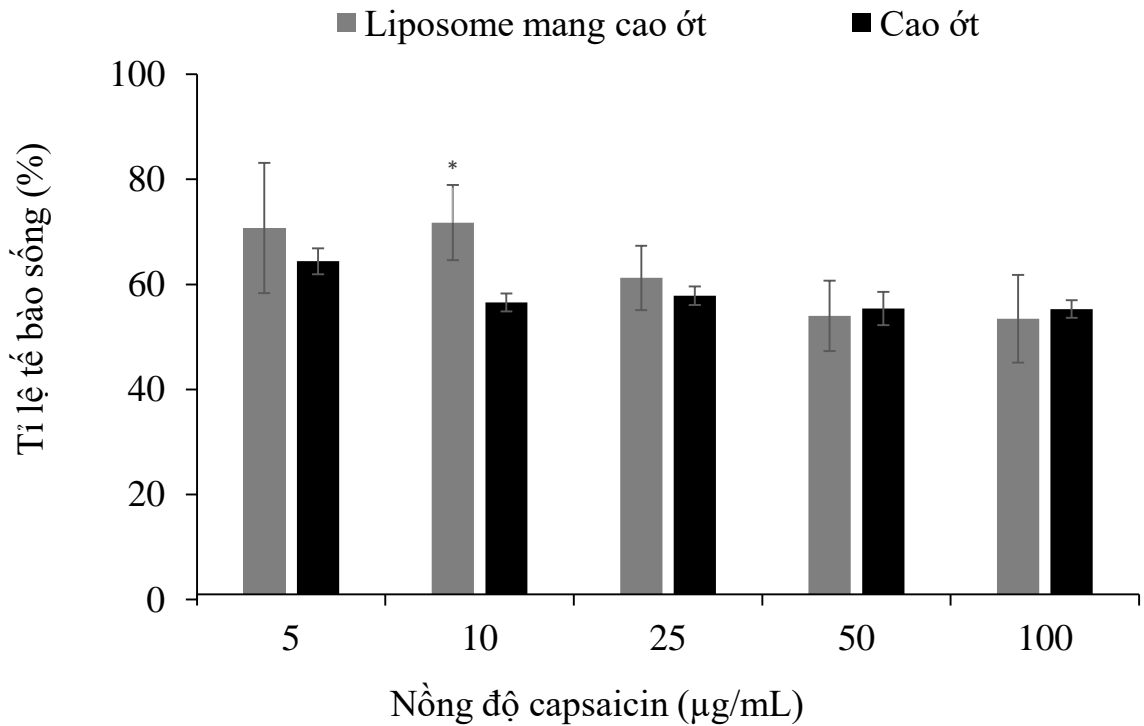
Tiến hành đánh giá khả năng gây độc tế bào in vitro đối với dòng tế bào ung thư vú MCF-7 của nanoliposome mang cao ớt có đối chiếu với cao ớt tự do và hệ nanoliposome trắng không mang cao ớt sử dụng thử nghiệm WST-1. Kết quả trình bày ở bảng 3.11, hình 3.20 đến 3.22.

Bảng 3.11 Tỷ lệ sống của tế bào MCF-7 dưới tác dụng của liposome, cao ớt và liposome mang cao ớt

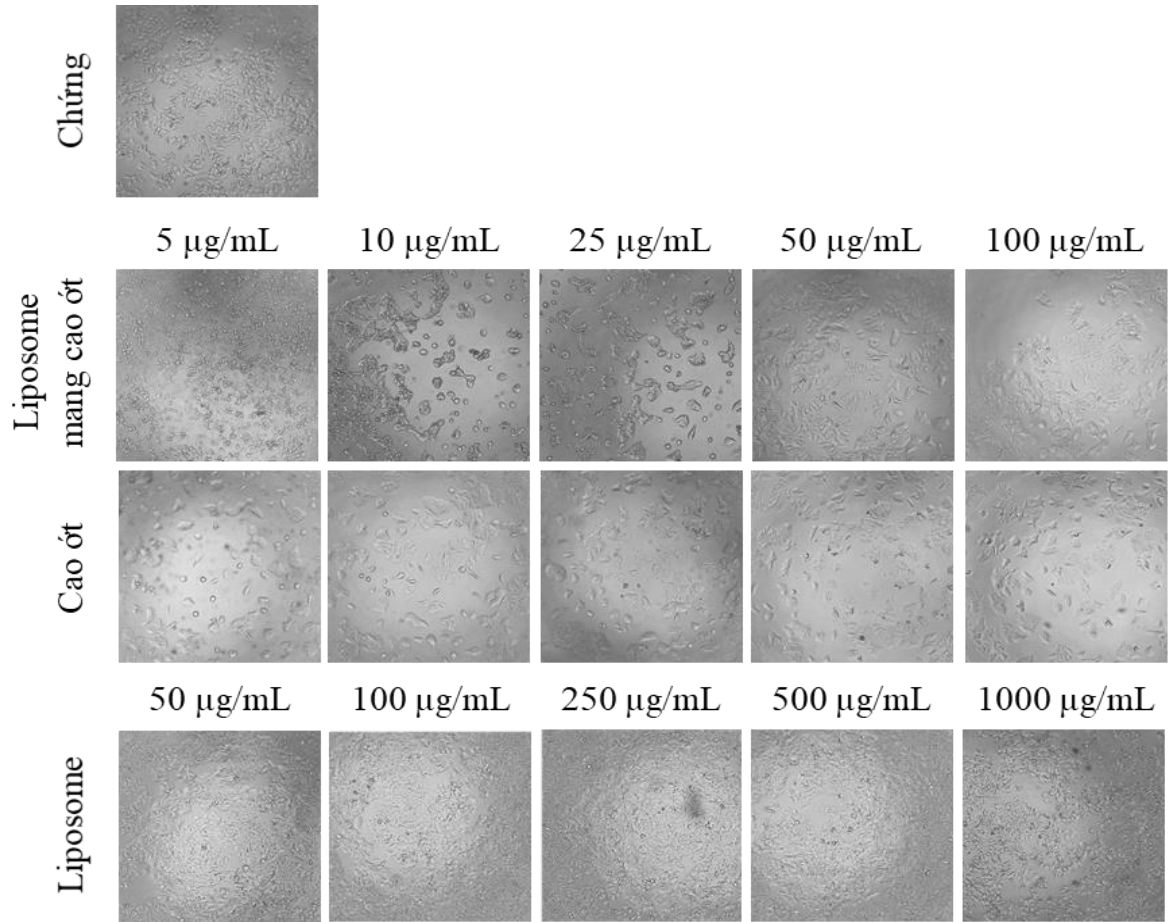
Mẫu liposome					
Nồng độ liposome ($\mu\text{g/mL}$)	50	100	250	500	1000
Tỷ lệ tế bào sống (%) trong mẫu liposome	106,9 \pm 2,0	99,6 \pm 12,3	106,3 \pm 1,6	114,1 \pm 6,3	115,3 \pm 1,8
Mẫu cao ớt và liposome mang cao ớt					
Nồng độ capsaicin ($\mu\text{g/mL}$)	5	10	25	50	100
Tỷ lệ tế bào sống (%) trong mẫu cao ớt	64,4 \pm 2,5	56,6 \pm 1,7	57,9 \pm 1,8	55,4 \pm 3,2	55,3 \pm 1,7
Tỷ lệ tế bào sống (%) trong mẫu liposome mang cao ớt	70,7 \pm 12,4	71,8 \pm 7,1	61,2 \pm 6,1	54,0 \pm 6,7	53,4 \pm 8,3



Hình 3.20 Tỷ lệ tế bào MCF-7 sống dưới tác dụng của liposome và liposome mang cao ớt. (*) $p < 0,05$ so sánh với liposome

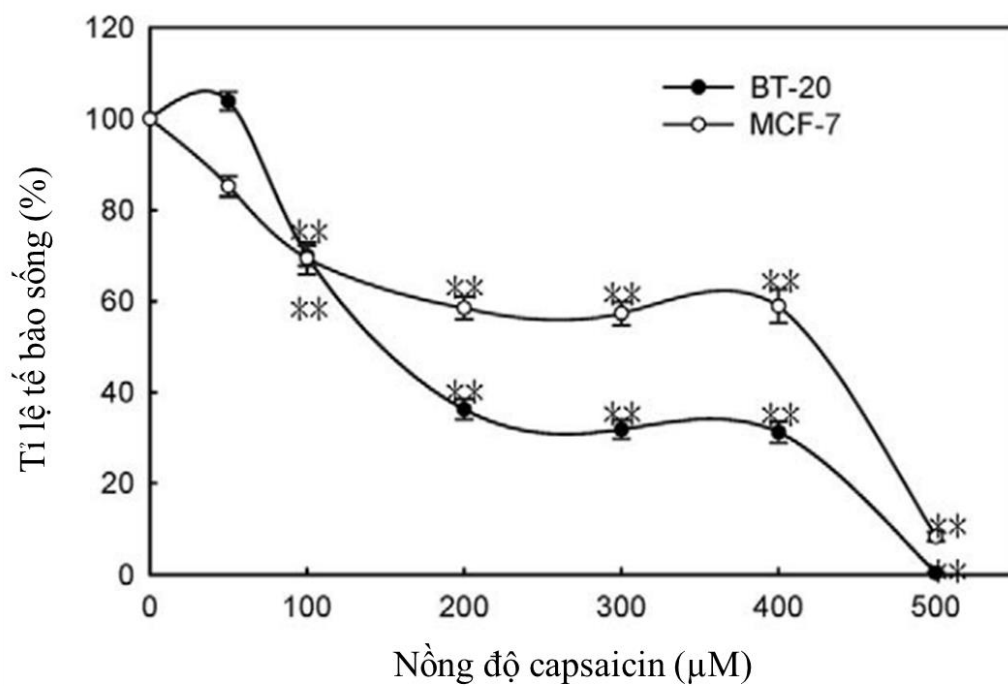


Hình 3.21 Tỷ lệ tế bào MCF-7 sống dưới tác dụng của cao ớt và liposome mang cao ớt. (*) $p < 0,05$ so sánh với cao ớt



Hình 3.22 Ảnh tế bào MCF-7 sống dưới tác dụng của liposome, cao ớt và liposome mang cao ớt

Liposome gây độc tế bào không đáng kể ở nồng độ tương đương nồng độ liposome trong liposome mang cao ớt. Cao ớt và liposome mang cao ớt có khả năng tiêu diệt tế bào MCF-7. Tỷ lệ tế bào MCF-7 sống giảm dần khi nồng độ capsaicin tăng dần. So sánh hiệu quả gây độc tế bào giữa cao ớt và liposome mang cao, ở nồng độ thấp, 10 µg/mL, tỷ lệ tế bào sống trong cao ớt thấp hơn trong liposome mang cao, $56,6 \pm 1,7\%$ so với $71,8 \pm 7,1\%$. Ở nồng độ cao, 50 µg/mL, tỷ lệ tế bào sống trong cao ớt và liposome mang cao không khác biệt đáng kể, $55,4 \pm 3,2\%$ và $54,02 \pm 6,7\%$. Kết quả thử độc tế bào thu được là phù hợp với nghiên cứu của Chang (2011), tỷ lệ tế bào MCF-7 sống $58,50 \pm 2,5\%$ tại nồng độ capsaicin 200 µM (tương đương 61 µg/mL) (hình 3.23) [53].



Hình 3.23 Tỷ lệ tế bào MCF-7 sống dưới tác dụng của capsaicin theo nghiên cứu của Chang (2011)

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

1. Đã bào chế được cao ethanol ớt bằng phương pháp chiết siêu âm kết hợp với một số phương pháp loại tạp chất đơn giản. Hiệu suất của quá trình chiết xuất thu được $2,0591 \pm 0,0193$ mg capsaicin/ 1 g bột ớt. Hàm lượng capsaicin trong cao ớt là $37,28 \pm 0,2\%$.

2. Đã định lượng được capsaicin trong cao ớt và trong nanoliposome mang cao ớt bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao trong điều kiện thiết bị phù hợp.

3. Đã khảo sát ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến kích thước hạt, PDI của hệ nanoliposome mang cao ớt, từ 15, 30, 45, 60, 90 phút. Kết quả đã xác định thời gian siêu âm 30 phút là phù hợp hướng đến tiết kiệm năng lượng và rút ngắn thời gian tổng hợp.

4. Đã tổng hợp được hệ nanoliposome mang cao ớt bằng phương pháp hydrate hóa màng lipid với các nồng độ cao ớt khác nhau (10, 20, 30, 40, 50% w/w) có độ ổn định đáng kể trong thời gian khảo sát 28 ngày thông qua sự ổn định về kích thước hạt, PDI và thế zeta được đo bằng kỹ thuật tán xạ ánh sáng động.

5. Đã xác định được công thức nanoliposome mang 40% cao ớt là tối ưu. Công thức có hiệu suất nang hóa và hàm lượng tải capsaicin tương ứng là 91,60% và 0,14%; có kích thước hạt $131,0 \pm 3,7$ nm; PDI $0,397 \pm 0,110$; điện thế zeta -60,1 mV. Phân tích FTIR đã chứng minh tác động thấp của việc nang hóa hoạt chất lên cấu trúc phân tử của liposome và hoạt chất. Phân tích TEM cho thấy liposome mang cao ớt có cấu trúc hình cầu đều đặn có kích thước phù hợp với kích thước ghi nhận được từ kỹ thuật DLS. Nanoliposome mang cao ớt được chứng minh có độ ổn định tốt trong thời gian khảo sát 28 ngày, có kích thước hạt từ $116,8 \pm 3,5$ nm đến $133,9 \pm 0,6$ nm; PDI ổn định trong khoảng hẹp từ $0,330 \pm 0,062$ đến $0,397 \pm 0,112$; thế zeta từ -60,1 mV đến -46,9 mV.

6. Đã xây dựng được hồ sơ phóng thích capsaicin của hệ nanoliposome mang cao ớt bằng phương pháp màng thẩm tách, có so sánh với cao ớt tự do. Kết quả cho thấy hệ nanoliposome mang cao ớt có khả năng phóng thích capsaicin chậm so với dạng chiết xuất tự do, cụ thể, sau 24 giờ, cao ớt phóng

thích hoàn toàn $98,16 \pm 2,5\%$ lượng capsaicin so với $84,16 \pm 2,5\%$ lượng capsaicin được phóng thích trong liposome mang cao ớt.

7. Đã thử nghiệm độc tính tế bào bằng phương pháp WST - 1 đã chứng minh hệ nanoliposome mang cao ớt có tác dụng gây độc trên dòng tế bào MCF-7. Với nồng độ capsaicin $50 \mu\text{g/mL}$, tỉ lệ tế bào sống trong mẫu liposome chứa cao ớt là $54,0 \pm 6,7\%$, tương đương so với mẫu chứa cao ớt là $55,4 \pm 3,2\%$.

4.2. KIẾN NGHỊ

1. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào của hệ nanoliposome mang cao ớt hoặc mang capsaicinoid trên các dòng tế bào ung thư khác như Hela, ung thư da hoặc hoạt tính phân giải tế bào mỡ.

2. Nghiên cứu tác dụng *in vivo* và độc tính bán trường diễn của hệ nanoliposome mang cao ớt hoặc mang capsaicinoid trên chuột.

3. Nghiên cứu tổng hợp hệ nanoliposome mang cao ớt hoặc mang capsaicinoid đa chức năng nhằm nâng cao hiệu quả trong điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Thi, T. T. H., Nguyen, T. N. Q., Hoang, D. T., & Nguyen, D. H. (2019). Functionalized mesoporous silica nanoparticles and biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 99, 631-656.
- [2] Thi, T. T. H., Suys, E. J., Lee, J. S., Nguyen, D. H., Park, K. D., & Truong, N. P. (2021). Lipid-based nanoparticles in the clinic and clinical trials: from cancer nanomedicine to COVID-19 vaccines. *Vaccines*, 9(4), 359.
- [3] Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, 8(1), 1-9.
- [4] Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International journal of nanomedicine*, 10, 975.
- [5] Samad, A., Sultana, Y., & Aqil, M. (2007). Liposomal drug delivery systems: an update review. *Current drug delivery*, 4(4), 297-305.
- [6] Immordino, M. L., Dosio, F., & Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International journal of nanomedicine*, 1(3), 297.
- [7] Le, N. T. T., Nguyen Thi, Y. N., Pham Thi, B. L., Hoang, N. L., Nguyen, C. K., & Nguyen, D. H. (2020). *Nanoliposomes as an efficient drug carrier system for paclitaxel delivery. 7th International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam (BME7) Translational Health Science and Technology for Developing Countries 7* (193-196). Springer.
- [8] Le, N. T. T., Nguyen, C. K., & Nguyen, D. H. (2020). Carboplatin delivery system based on poly (ethylene glycol) methyl ether–cholesterol modified soy lecithin liposomes. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 11(4), 045016.
- [9] Nguyen, D. H., Lee, J. S., Choi, J. H., Lee, Y., Son, J. Y., Bae, J. W., . . . Park, K. D. (2015). Heparin nanogel-containing liposomes for intracellular RNase delivery. *Macromolecular Research*, 23, 765-769.
- [10] Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in pharmacology*, 6, 286.

- [11] Kraft, J. C., Freeling, J. P., Wang, Z., & Ho, R. J. (2014). Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(1), 29-52.
- [12] Nguyen, T. L., Nguyen, T. H., & Nguyen, D. H. (2017). Development and in vitro evaluation of liposomes using soy lecithin to encapsulate paclitaxel. *International journal of biomaterials*, 2017.
- [13] Briuglia, M.-L., Rotella, C., McFarlane, A., & Lamprou, D. A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug delivery and translational research*, 5, 231-242.
- [14] Bangham, A. D., & Horne, R. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of molecular biology*, 8(5), 660-IN610.
- [15] Zhang, H. (2023). Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation *Liposomes: Methods and Protocols* (pp. 57-63): Springer.
- [16] Sheoran, R., Khokra, S. L., Chawla, V., & Dureja, H. (2019). Recent patents, formulation techniques, classification and characterization of liposomes. *Recent Patents on Nanotechnology*, 13(1), 17-27.
- [17] Domazou, A. S., & Luigi Luisi, P. (2002). Size distribution of spontaneously formed liposomes by the alcohol injection method. *Journal of liposome research*, 12(3), 205-220.
- [18] Ray, A. (2012). Liposome in Drug delivery system. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science*, 2(2), 41-44.
- [19] Huang, Z., Li, X., Zhang, T., Song, Y., She, Z., Li, J., & Deng, Y. (2014). Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 9(4), 176-182.
- [20] Trang Le, N. T., Nguyen, N. H., Hoang, M. C., Khoa Nguyen, C., Hai Nguyen, D., & Tran, D. L. (2022). Preparation of liposomal nanocarrier by extruder to enhance tumor accumulation of paclitaxel. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 37(1), 3-16.
- [21] Fang, J., Nakamura, H., & Maeda, H. (2011). The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced drug delivery reviews*, 63(3), 136-151.

- [22] Le, N. T. T., Vu, M. T., Nguyen, N. H., Nguyen-Huu, A.-M., & Nguyen, D. H. (2021). Preparation and in vitro evaluation of PEGylated liposomes as effective nanocarrier for delivery of oxaliplatin. *Journal of Materials Research*, 36, 475-486.
- [23] Le, N. T. T., Pham, L. P. T., Nguyen, D. H. T., Le, N. H., Tran, T. V., Nguyen, C. K., & Nguyen, D. H. (2019). Liposome-based nanocarrier system for phytoconstituents *Novel Drug Delivery Systems for Phytoconstituents* (pp. 45-68): CRC Press.
- [24] Nguyen, D. T. D., Vo, M. T., Truong, C. T., Nguyen, D. H., Nguyen Thi, T.-A., Huynh Truc, T. N., . . . Vo Do, M. H. (2021). Optimal Extraction Process and In Vivo Anti-Inflammatory Evaluation of High Purity Oily Capsicum Oleoresin for Pharmaceutical Applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021.
- [25] Teixeira, M. J., Menezes, L. M. B., Silva, V., Galhardoni, R., Sasson, J., Okada, M., . . . Andrade, D. C. d. (2015). Liposomal topical capsaicin in post-herpetic neuralgia: a safety pilot study. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 73, 237-240.
- [26] Fraenkel, L., Bogardus, S. T., Concato, J., & Wittink, D. R. (2004). Treatment options in knee osteoarthritis: the patient's perspective. *Archives of internal medicine*, 164(12), 1299-1304.
- [27] Montani, M. S. G., D'Eliseo, D., Cirone, M., Di Renzo, L., Faggioni, A., Santoni, A., & Velotti, F. (2015). Capsaicin-mediated apoptosis of human bladder cancer cells activates dendritic cells via CD91. *Nutrition*, 31(4), 578-581.
- [28] Dwivedi, V., Shrivastava, R., Hussain, S., Ganguly, C., & Bharadwaj, M. (2011). Cytotoxic potential of Indian spices (extracts) against esophageal squamous carcinoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(8), 2069-2073.
- [29] Zimmer, A. R., Leonardi, B., Miron, D., Schapoval, E., de Oliveira, J. R., & Gosmann, G. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: from traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(1), 228-233.
- [30] Desai, P. R., Marepally, S., Patel, A. R., Voshavar, C., Chaudhuri, A., & Singh, M. (2013). Topical delivery of anti-TNF α siRNA and capsaicin via

novel lipid-polymer hybrid nanoparticles efficiently inhibits skin inflammation in vivo. *Journal of controlled release*, 170(1), 51-63.

[31] Truong, C. T., Nguyen, D. T. D., Vo, M. T., Huynh, B. T., Thi, T.-A. N., Do, M. H. V., . . . Nguyen, D. H. (2022). Development of topical gel containing Capsicum oleoresin encapsulated Tamanu nanocarrier and its analgesic and anti-inflammatory activities. *Materials Today Communications*, 31, 103404.

[32] Kim, J.-Y., Lee, M.-S., Jung, S., Joo, H., Kim, C.-T., Kim, I.-H., . . . Kim, Y. (2014). Anti-obesity efficacy of nanoemulsion oleoresin capsicum in obese rats fed a high-fat diet. *International journal of nanomedicine*, 9, 301.

[33] Lee, M.-S., Jung, S., Shin, Y., Lee, S., Kim, C.-T., Kim, I.-H., & Kim, Y. (2017). Lipolytic efficacy of alginate double-layer nanoemulsion containing oleoresin capsicum in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Food & nutrition research*, 61(1), 1339553.

[34] Jeon, G., Choi, Y., Lee, S.-M., Kim, Y., Jeong, H.-S., & Lee, J. (2010). Anti-obesity activity of methanol extract from hot pepper (*Capsicum annum* L.) seeds in 3T3-L1 adipocyte. *Food Science and Biotechnology*, 19, 1123-1127.

[35] Careaga, M., Fernández, E., Dorantes, L., Mota, L., Jaramillo, M. E., & Hernandez-Sanchez, H. (2003). Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 83(3), 331-335.

[36] Chen, X., Zhang, G., Zhang, Q., Zhan, X., & Chen, F. (2015). Preparation and performance of amphiphilic polyurethane copolymers with capsaicin-mimic and peg moieties for protein resistance and antibacteria. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54(15), 3813-3820.

[37] Peng, J., & Li, Y.-J. (2010). The vanilloid receptor TRPV1: role in cardiovascular and gastrointestinal protection. *European journal of pharmacology*, 627(1-3), 1-7.

[38] Choi, A.-J., Kim, C.-J., Cho, Y.-J., Hwang, J.-K., & Kim, C.-T. (2011). Characterization of capsaicin-loaded nanoemulsions stabilized with alginate and chitosan by self-assembly. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1119-1126.

[39] Tran, K. A., Nguyen, T. T. N., & Le, P. T. K. (2016). Application And Comparison Of Different Extraction Methods of capsaicin from chili,

- Capsicum annum L. *VNUHCM Journal of Science and Technology Development*, 19(2), 44-51.
- [40] Stoica, R.-M., Moscovici, M., Tomulescu, C., & Băbeanu, N. (2016). Extraction and analytical methods of capsaicinoids-a review. *Sci Bull Ser F Biotechnol*, 20, 93-98.
- [41] Phương, C. H. (2018). *Định lượng capsaicinoid trong quả ớt việt nam bằng HPLC*. (Luận văn thạc sỹ dược học), Trường Đại học Dược Hà Nội.
- [42] H.V. Lương, N. V. L., C.V. MẾN, N.T.T. Hương, P.T.T. Hương. (2014). Nghiên cứu định lượng capsaicin và dihydrocapsaicin trong quả ớt bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. *Tạp chí Y – Dược học Quân sự*, số 5-2014. .
- [43] de Aguiar, A. C., dos Santos, P., Coutinho, J. P., Barbero, G. F., Godoy, H. T., & Martínez, J. (2014). Supercritical fluid extraction and low pressure extraction of Biquinho pepper (*Capsicum chinense*). *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 1239-1246.
- [44] Boonkird, S., Phisalaphong, C., & Phisalaphong, M. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum frutescens* on a lab-and pilot-plant scale. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(6), 1075-1079.
- [45] Yan, R., Zhao, L., Tao, J., Zou, Y., & Xu, X. (2018). Preparative isolation and purification of capsaicin and dihydrocapsaicin from *Capsici Fructus* using supercritical fluid extraction combined with high speed countercurrent chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(7), 2498-2506.
- [46] Vu, M. T., Le, N. T. T., Pham, T. L.-B., Nguyen, N. H., & Nguyen, D. H. (2020). Development and characterization of soy lecithin liposome as potential drug carrier systems for codelivery of letrozole and paclitaxel. *Journal of Nanomaterials*, 2020, 1-9.
- [47] Le, N. T. T., Nguyen, D. T. D., Nguyen, N. H., Nguyen, C. K., & Nguyen, D. H. (2021). Methoxy polyethylene glycol–cholesterol modified soy lecithin liposomes for poorly water-soluble anticancer drug delivery. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(7), 49858.
- [48] El Kaaby Ekhlas, A., Al Hattab Zahra, N., & Al-Anny Jenan, A. (2016). FT-IR identification of capsaicin from callus and seedling of chilli pepper plants *Capsicum annum* L. in vitro. *Int J Multidiscip Curr Res*, 4, 1145-1146.

- [49] Guo, D., Liu, J., Fan, Y., Cheng, J., Shi, Y., Zou, J., & Zhang, X. (2020). Optimization, characterization and evaluation of liposomes from *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. extracts. *Journal of liposome research*, 30(4), 366-376.
- [50] Bouarab, L., Maherani, B., Kheirrolomoom, A., Hasan, M., Aliakbarian, B., Linder, M., & Arab-Tehrany, E. (2014). Influence of lecithin–lipid composition on physico-chemical properties of nanoliposomes loaded with a hydrophobic molecule. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 115, 197-204.
- [51] Savaghebi, D., Barzegar, M., & Mozafari, M. R. (2020). Manufacturing of nanoliposomal extract from *Sargassum boveanum* algae and investigating its release behavior and antioxidant activity. *Food science & nutrition*, 8(1), 299-310.
- [52] Ruozi, B., Belletti, D., Tombesi, A., Tosi, G., Bondioli, L., Forni, F., & Vandelli, M. A. (2011). AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. *International journal of nanomedicine*, 557-563.
- [53] Chang, H., Chen, S., Chien, S., Kuo, S., Tsai, H., & Chen, D. (2011). Capsaicin may induce breast cancer cell death through apoptosis-inducing factor involving mitochondrial dysfunction. *Human & experimental toxicology*, 30(10), 1657-1665.

DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC

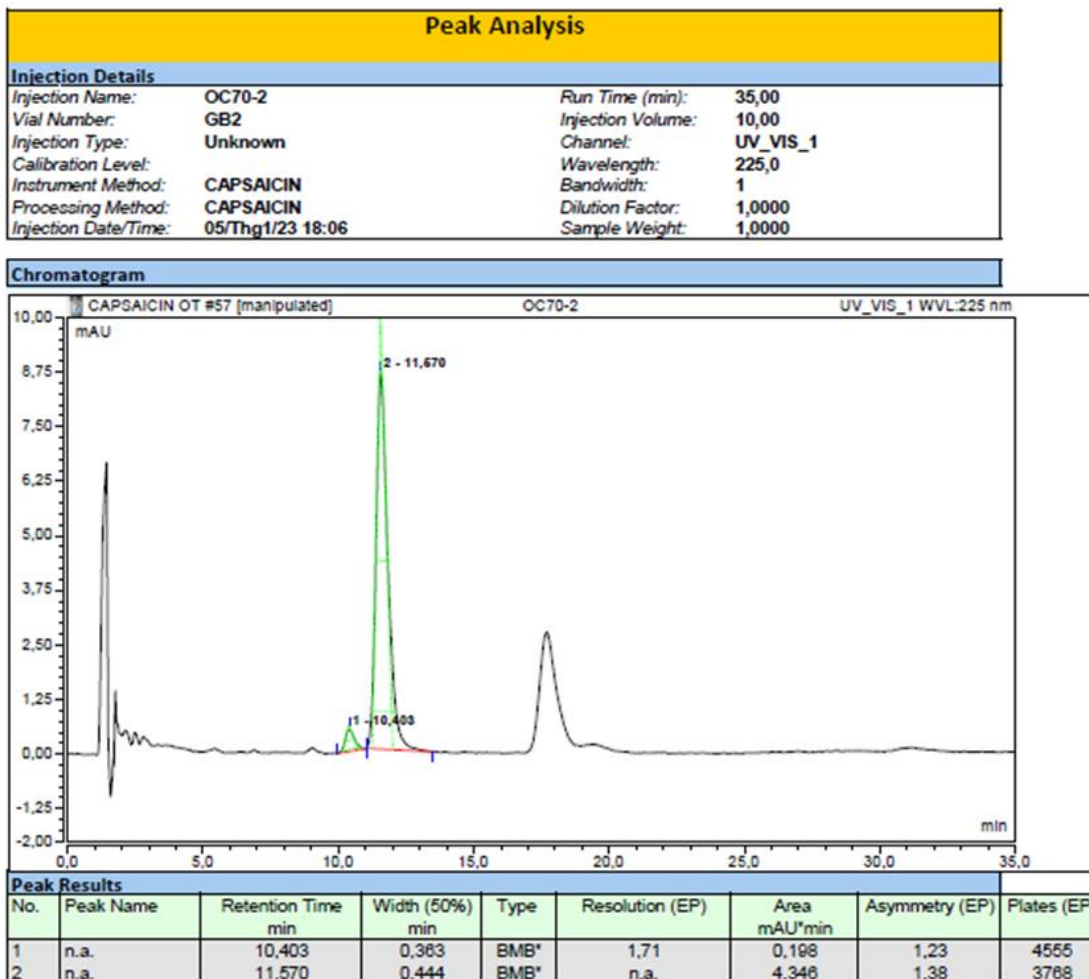
Phụ lục 1. Kết quả định lượng capsaicin trong cao ớt mẽ 1 bằng HPLC	67
Phụ lục 2. Kết quả định lượng capsaicin trong cao ớt mẽ 2 bằng HPLC	68
Phụ lục 3. Kết quả định lượng capsaicin trong liposome mang 40% cao ớt bằng HPLC sau khi loại cao ớt tự do	69
Phụ lục 4. Kết quả phân tích HPLC dung dịch chuẩn capsaicin STD 1	70
Phụ lục 5. Kết quả phân tích HPLC dung dịch chuẩn capsaicin STD2	71
Phụ lục 6. Kết quả phân tích HPLC dung dịch chuẩn capsaicin STD3	72
Phụ lục 7. Kết quả phân tích HPLC dung dịch chuẩn capsaicin STD4	73
Phụ lục 8. Kết quả phân tích HPLC dung dịch chuẩn capsaicin STD5	74
Phụ lục 9. Kết quả phân tích HPLC dung dịch chuẩn capsaicin STD6	75
Phụ lục 10. Phổ DLS kích thước hạt của liposome không mang cao ớt (LC0)	76
Phụ lục 11. Phổ DLS kích thước hạt của liposome mang 40% cao ớt (LC4)	77
Phụ lục 12. Phổ DLS kích thước hạt của liposome mang 40% cao ớt (LC4) sau 7 ngày	78
Phụ lục 13. Phổ DLS kích thước hạt của liposome mang 40% cao ớt (LC4) sau 14 ngày	79
Phụ lục 14. Phổ DLS kích thước hạt của liposome mang 40% cao ớt (LC4) sau 21 ngày	80
Phụ lục 15. Phổ DLS kích thước hạt của liposome mang 40% cao ớt (LC4) sau 28 ngày	81
Phụ lục 16. Phổ DLS thế zeta của liposome mang 40% cao ớt (LC4)	82
Phụ lục 17. Phổ DLS thế zeta của liposome mang 40% cao ớt (LC4) sau 7 ngày	83

Phụ lục 18. Phổ DLS thể zeta của liposome mang 40% cao ốt (LC4) sau 14 ngày	84
Phụ lục 19. Phổ DLS thể zeta của liposome mang 40% cao ốt (LC4) sau 21 ngày	85
Phụ lục 20. Phổ DLS thể zeta của liposome mang 40% cao ốt (LC4) sau 28 ngày	86
Phụ lục 21. Phổ FTIR của liposome	87
Phụ lục 22. Phổ FTIR của cao ốt	88
Phụ lục 23. Phổ FTIR của liposome mang 40% cao ốt (LC4)	89

PHỤ LỤC

Instrument:HPLC-R Sequence:CAPSAICIN OT

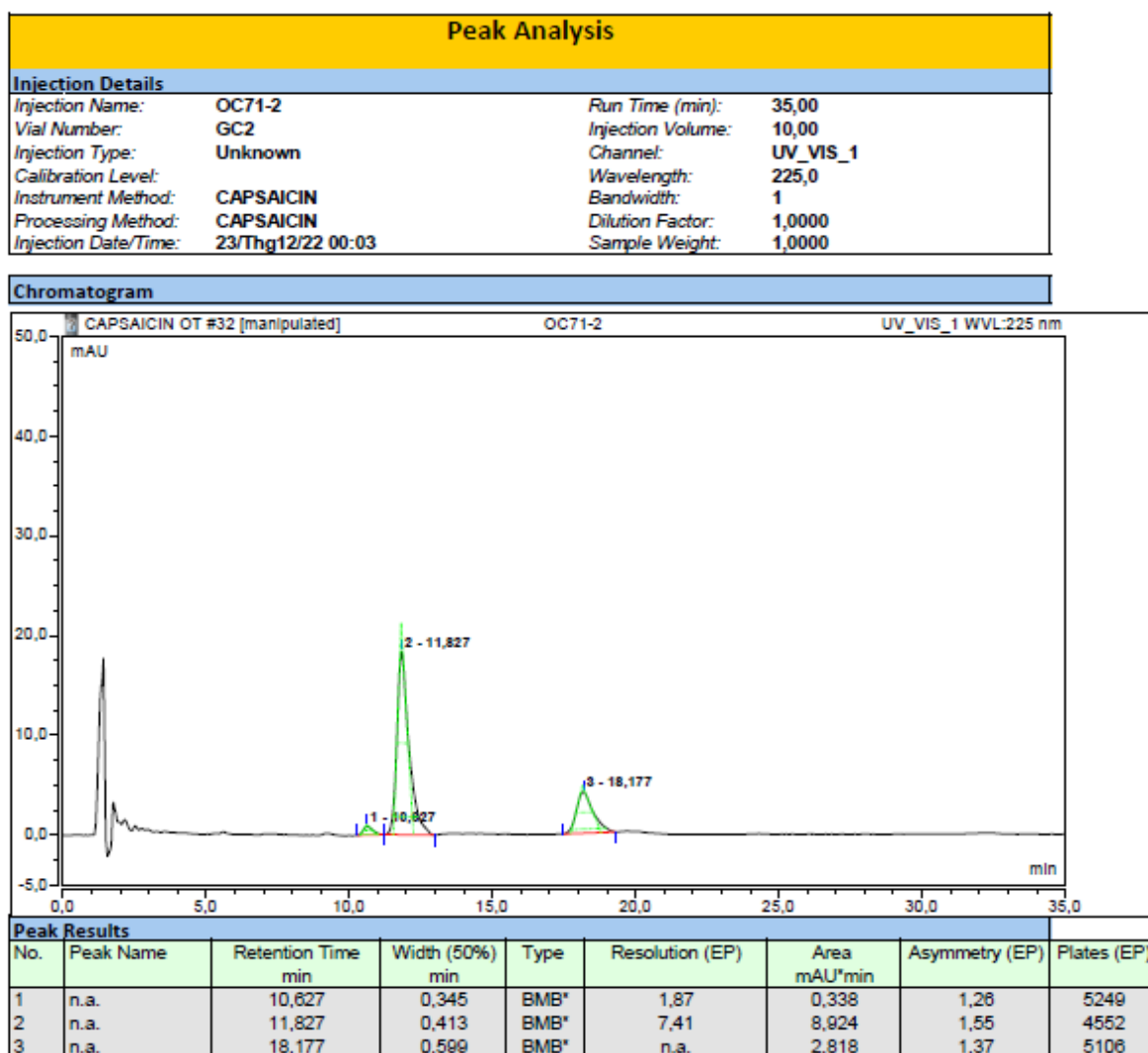
Page 1 of 1



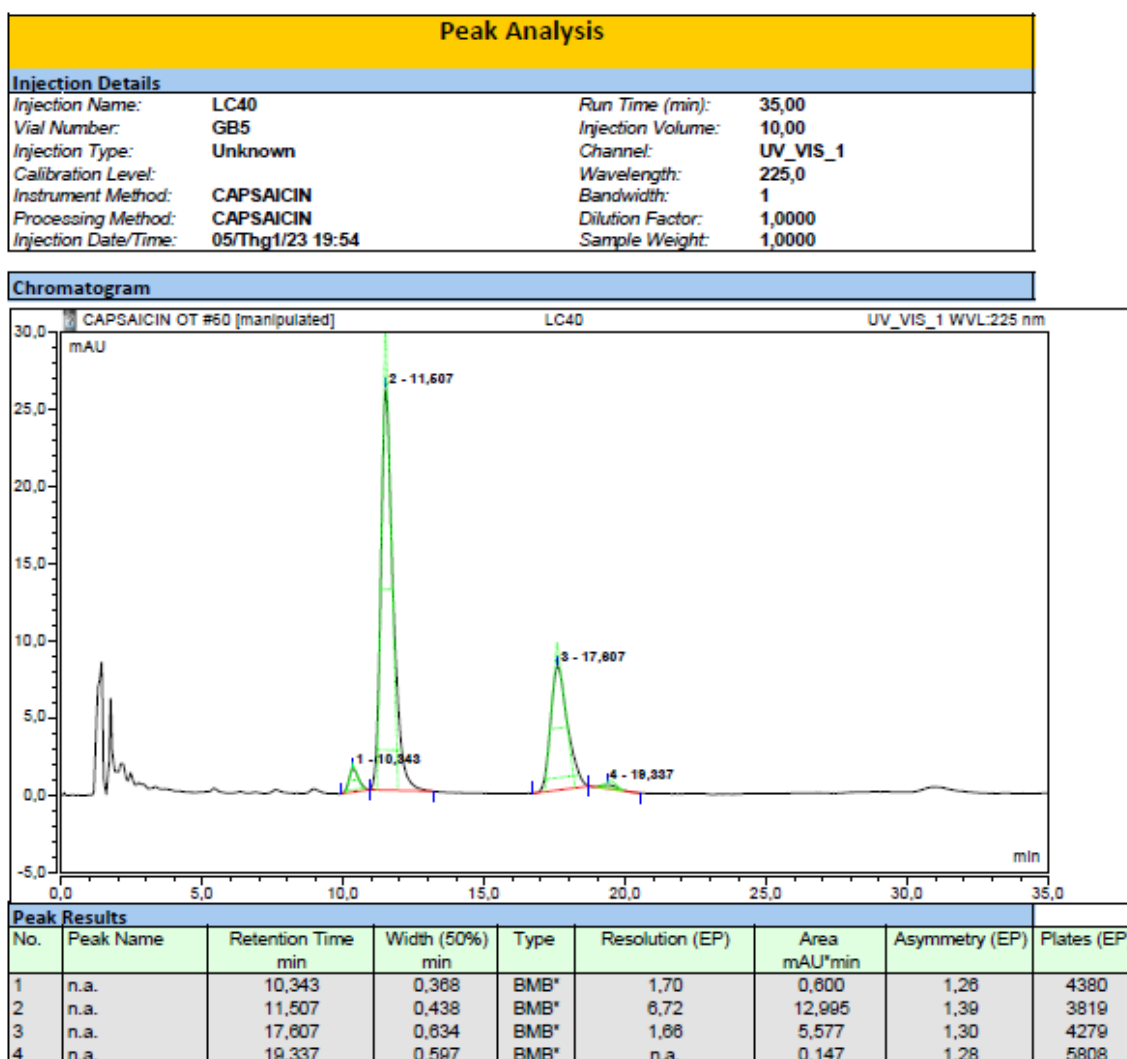
Default/Peak Analysis

Chromleon (c) Dionex
Version 7.2.2.6686

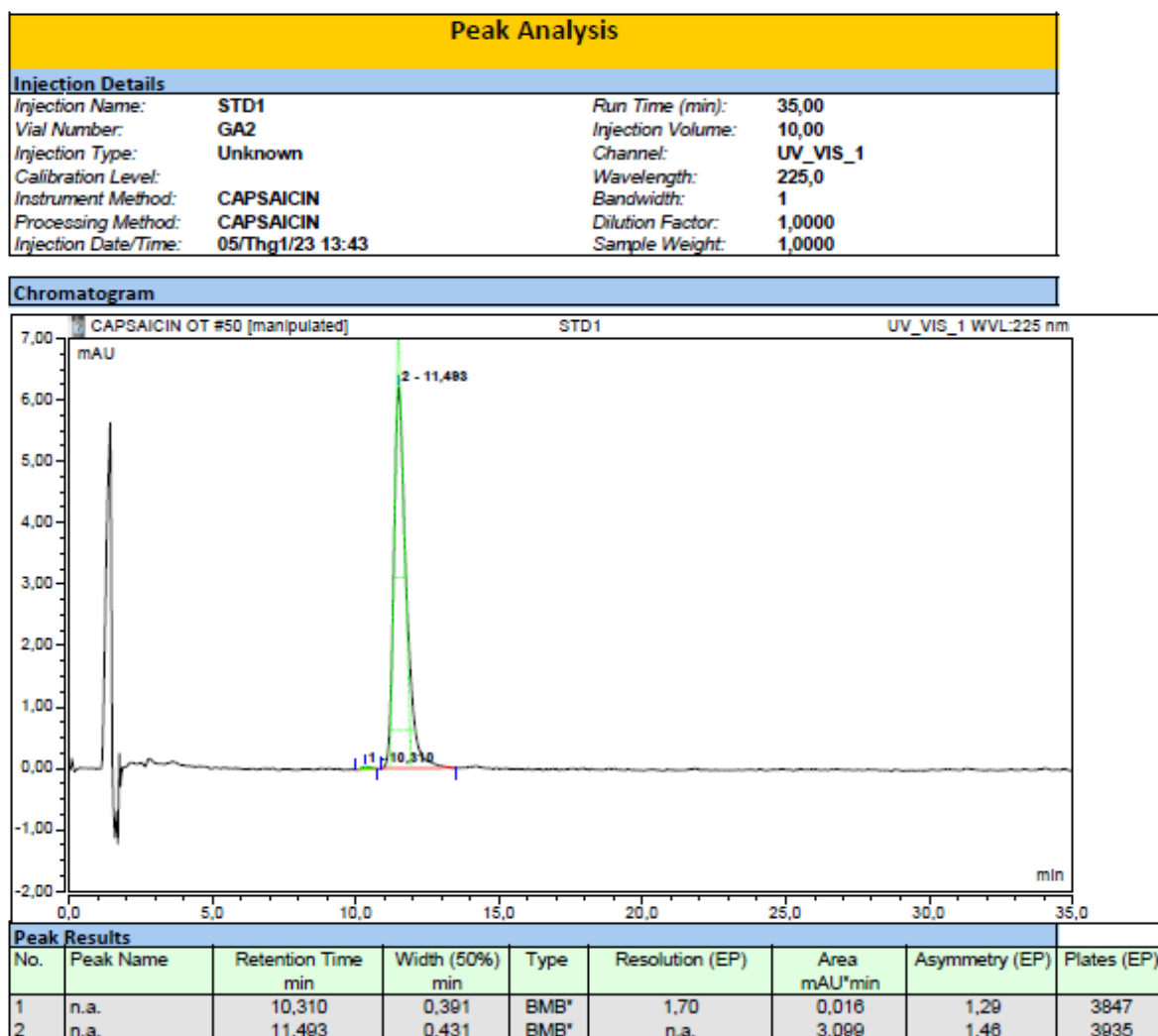
Phụ lục 1. Kết quả định lượng capsaicin trong cao ớt mề 1 bằng HPLC

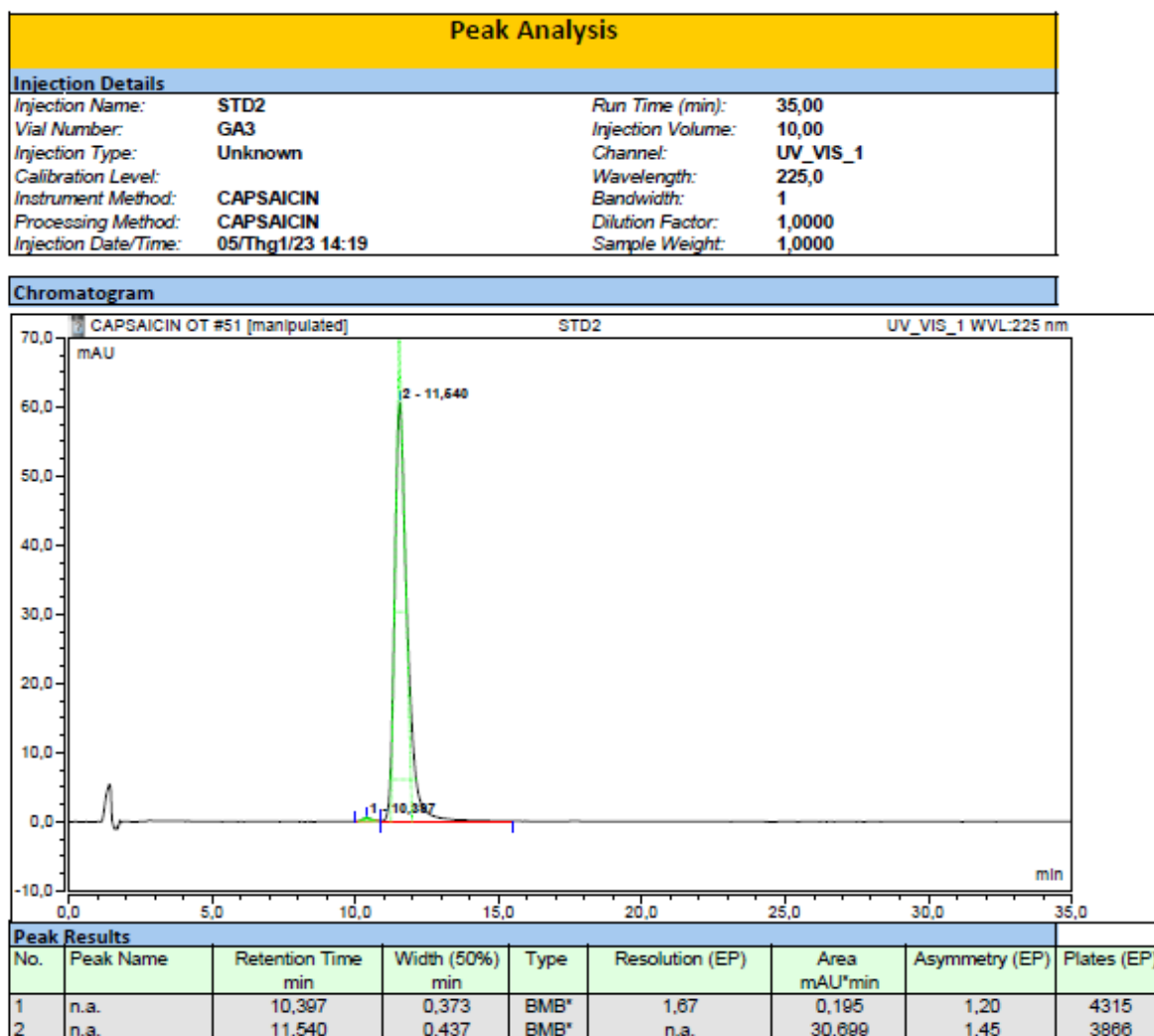


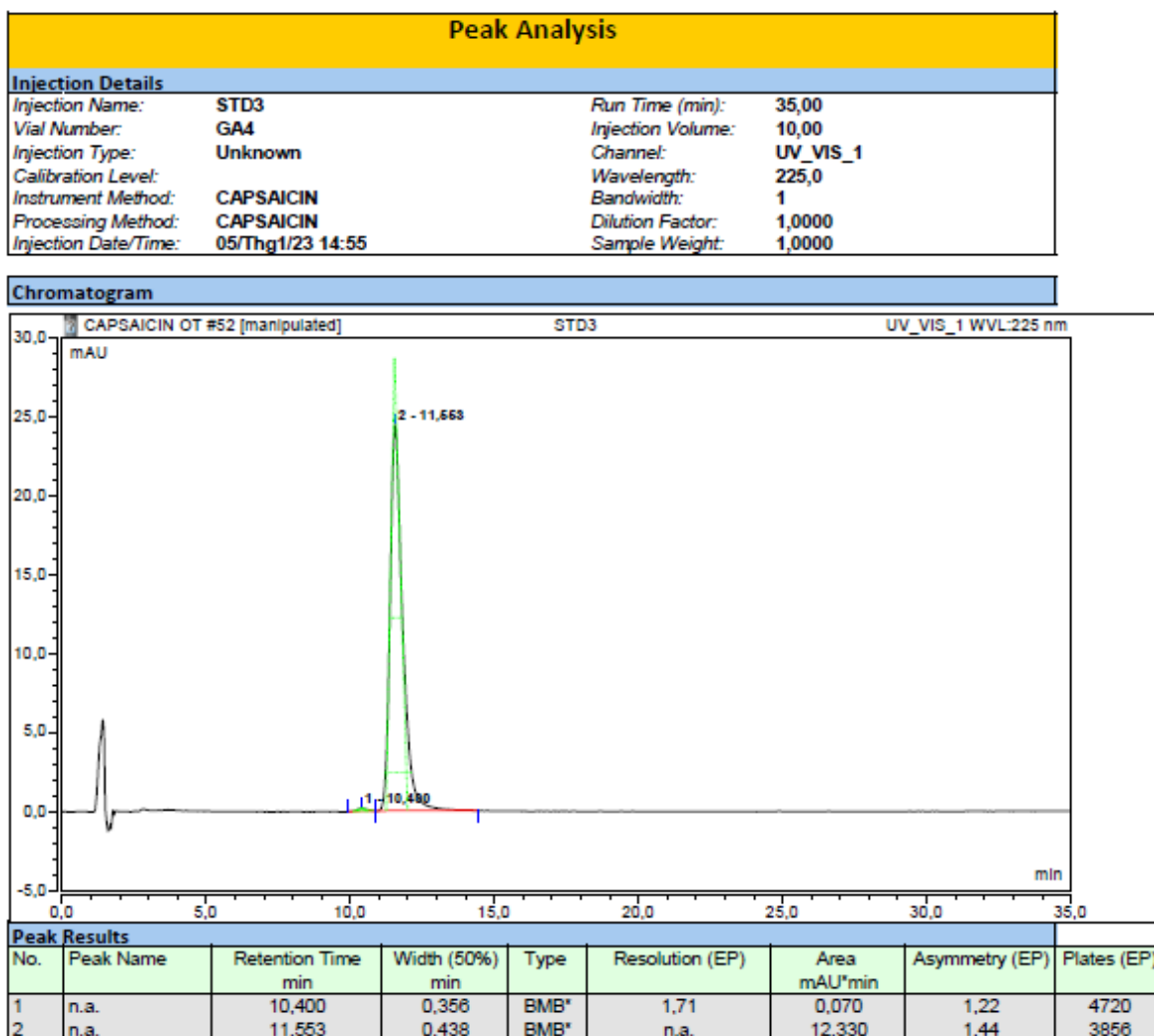
Phụ lục 2. Kết quả định lượng capsaicin trong cao ớt mề 2 bằng HPLC

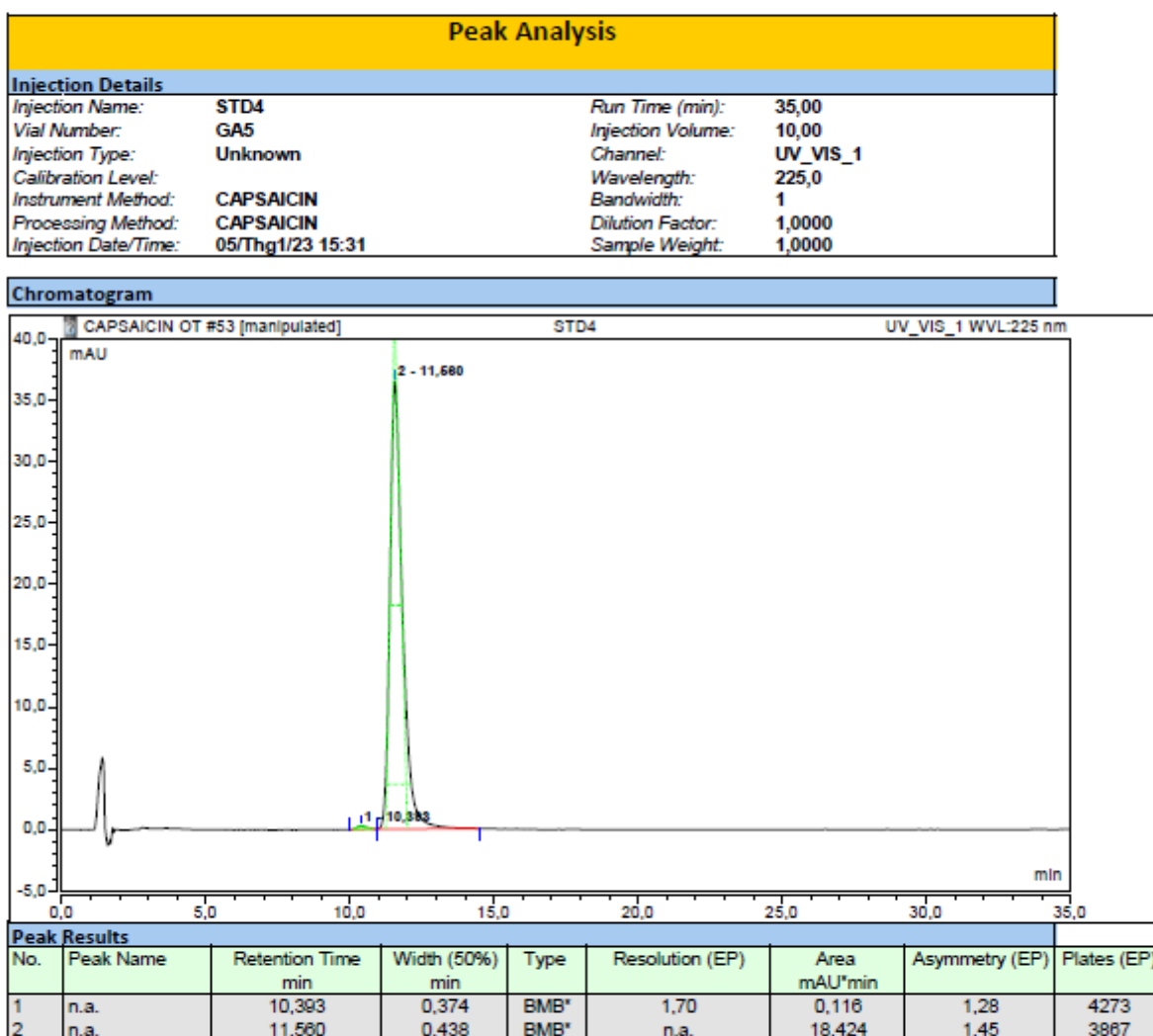


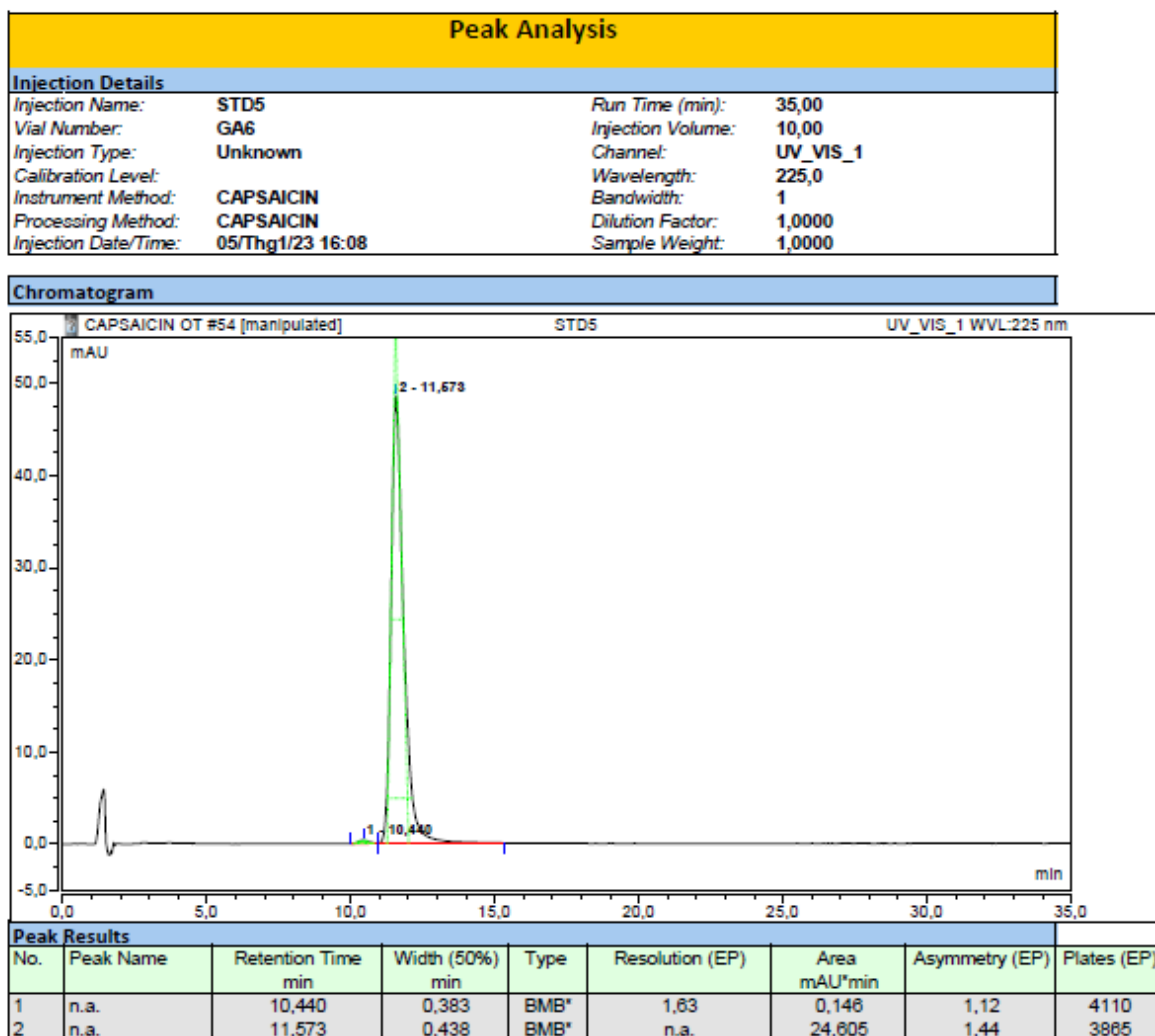
Phụ lục 3. Kết quả định lượng capsaicin trong liposome mang 40% cao ốt bằng HPLC sau khi loại cao ốt tự do



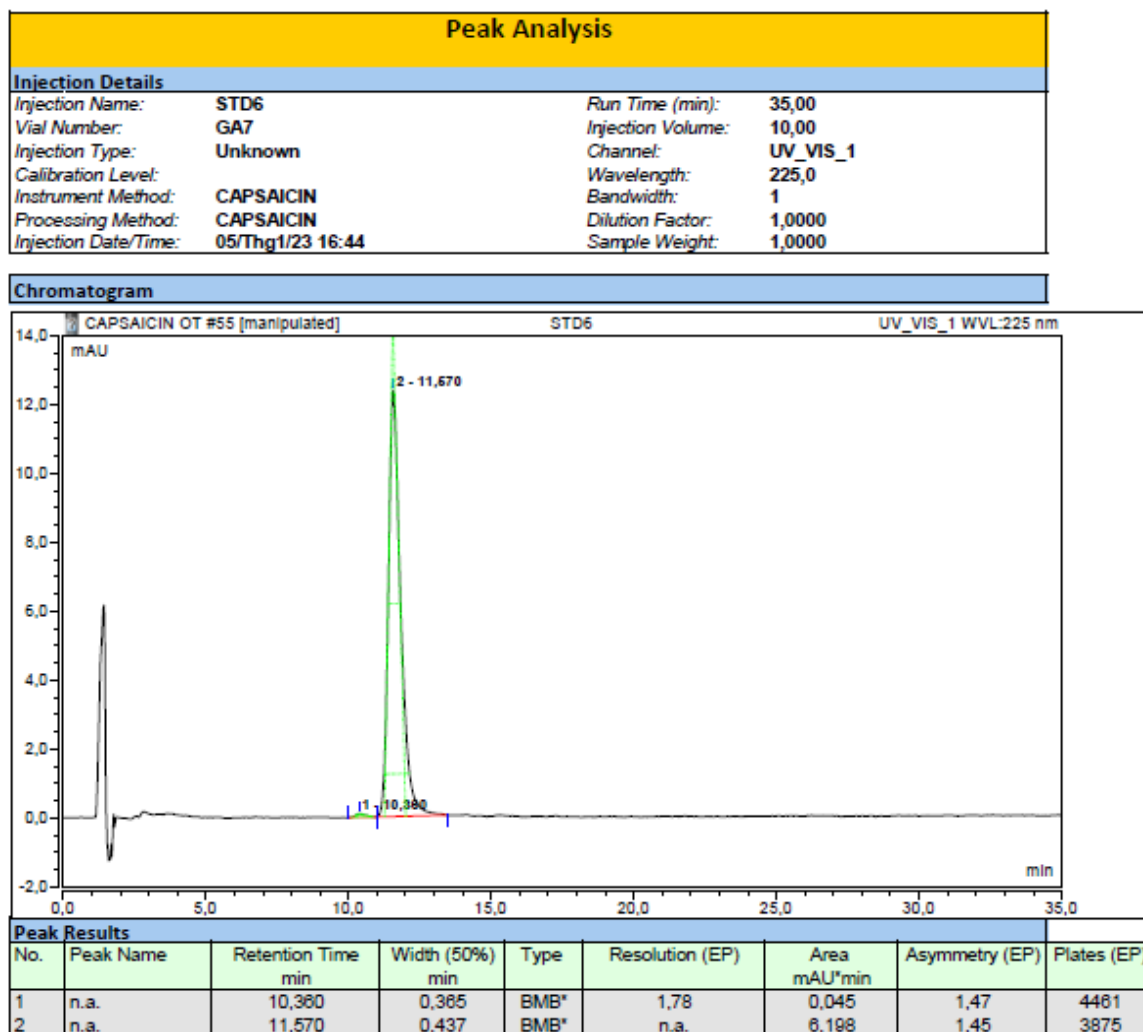








Phụ lục 8. Kết quả phân tích HPLC dung dịch chuẩn capsaicin STD5



Measurement Results

Date : Friday, February 17, 2023 14:30:20 PM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : LC0/3(1:1)
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 24.9 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.897 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 8
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1601 kCPS

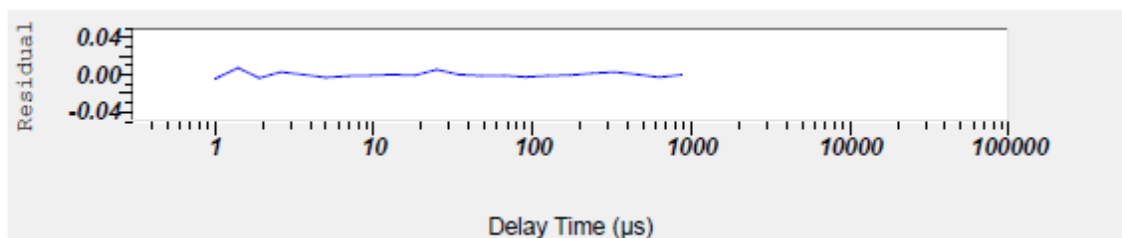
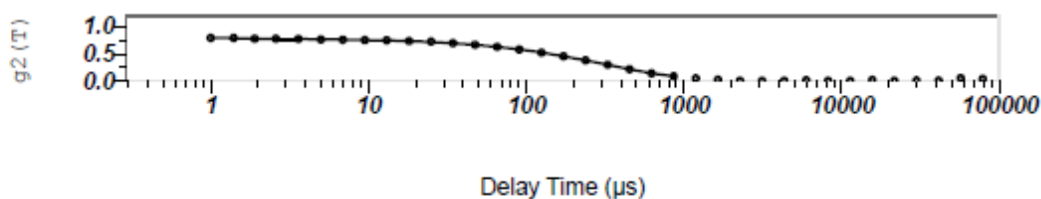
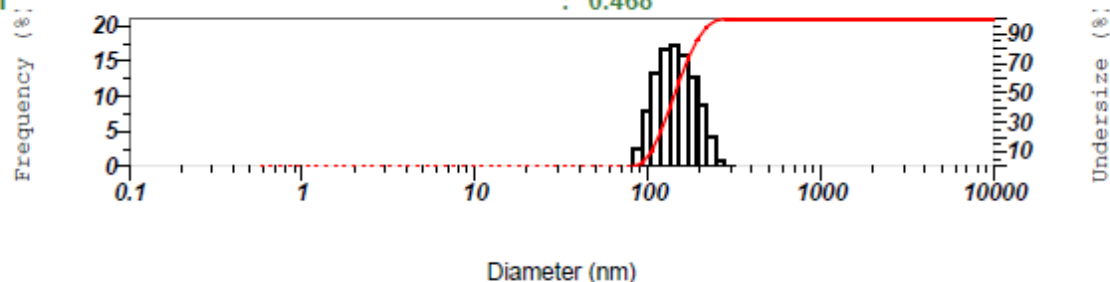
Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	149.4 nm	37.8 nm	142.3 nm
2	--	-- nm	-- nm	-- nm
3	--	-- nm	-- nm	-- nm
Total	1.00	149.4 nm	37.8 nm	142.3 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 144.9 nm

PI : 0.468



Phụ lục 10. Phổ DLS kích thước hạt của liposome không mang cao ốt (LC0)



Measurement Results

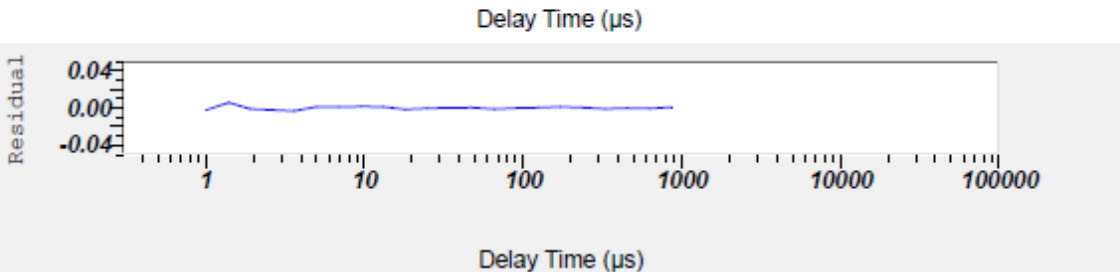
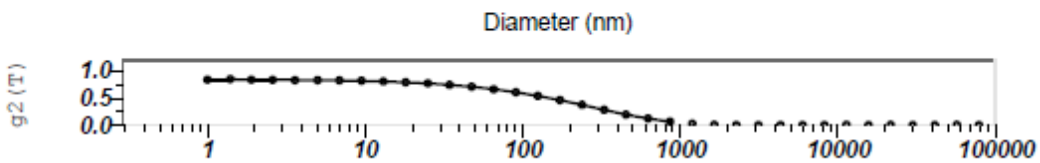
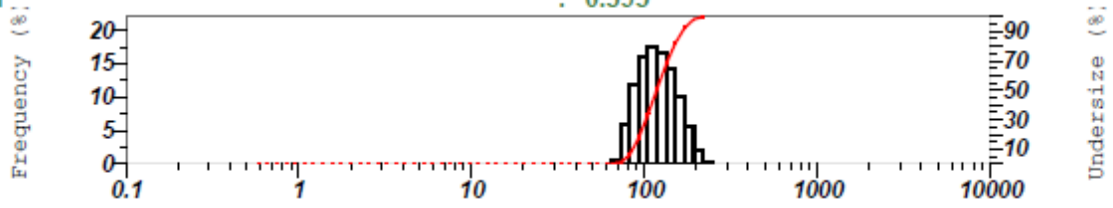
Date : Friday, February 17, 2023 14:55:49 PM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : LC4/2(1:1)
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.895 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 422
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1325 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	122.3 nm	30.6 nm	112.0 nm
2	---	--- nm	--- nm	--- nm
3	---	--- nm	--- nm	--- nm
Total	1.00	122.3 nm	30.6 nm	112.0 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 129.7 nm
 PI : 0.395



Phụ lục 11. Phổ DLS kích thước hạt của liposome mang 40% cao ốt (LC4)

HORIBA
Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.20

SZ-100

LC4_002.nsz

Measurement Results

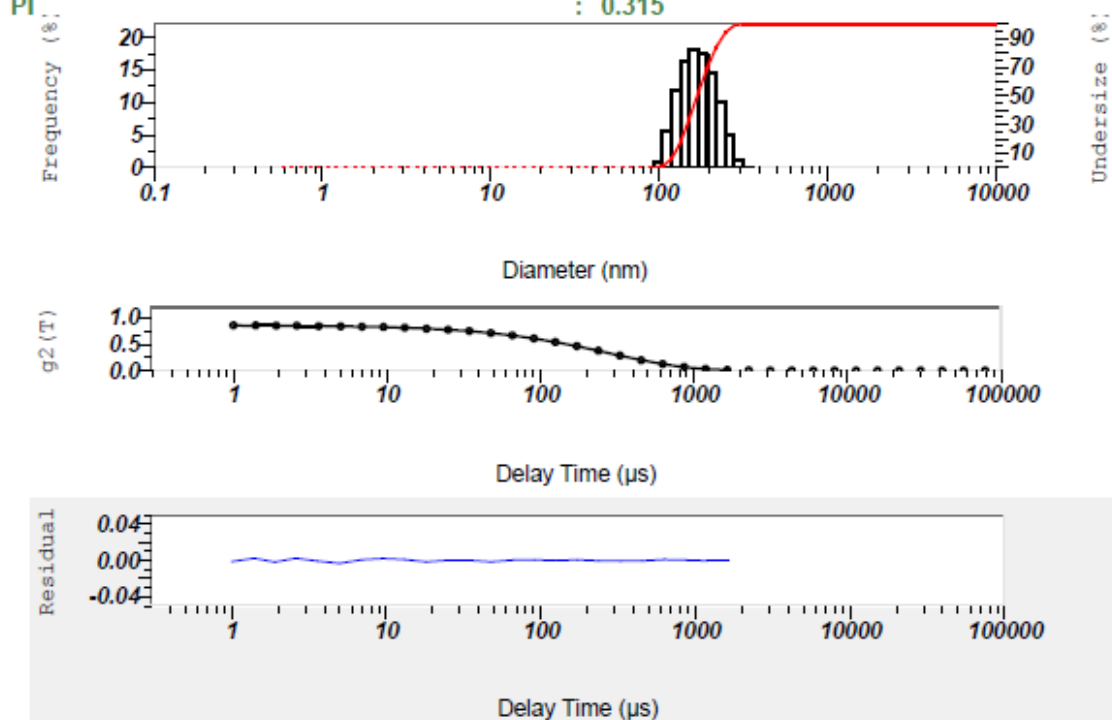
Date : Thursday, February 23, 2023 10:19:19 AM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : LC4
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.896 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 39
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 2212 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	174.5 nm	41.9 nm	161.7 nm
2	--	-- nm	-- nm	-- nm
3	--	-- nm	-- nm	-- nm
Total	1.00	174.5 nm	41.9 nm	161.7 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 132.6 nm
 PI : 0.315



Explore the future

Automotive Test Systems | Process & Environmental | Medical | Semiconductor | Scientific

HORIBA

1/1

Phụ lục 12. Phổ DLS kích thước hạt của liposome mang 40% cao ốt (LC4) sau 7 ngày

SZ-100

LC4_014.nsz

Measurement Results

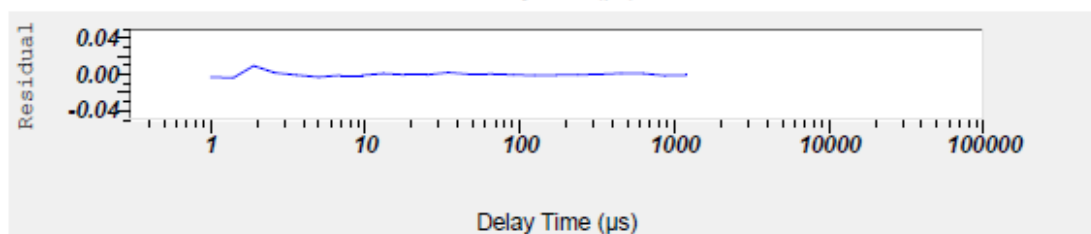
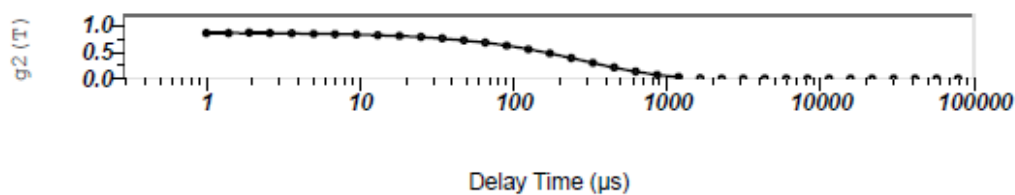
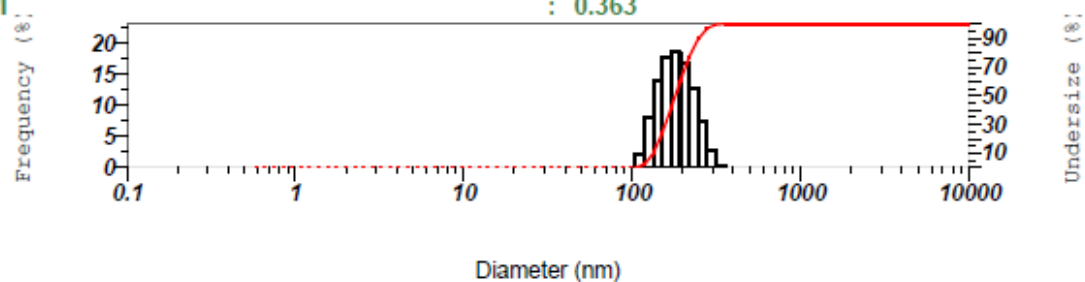
Date : Thursday, March 2, 2023 9:36:31 AM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : LC4
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 24.9 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.897 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 1327
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1671 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	186.5 nm	44.0 nm	181.3 nm
2	--	-- nm	-- nm	-- nm
3	--	-- nm	-- nm	-- nm
Total	1.00	186.5 nm	44.0 nm	181.3 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 134.4 nm
 PI : 0.363



Phụ lục 13. Phổ DLS kích thước hạt của liposome mang 40% cao ốt (LC4) sau 14 ngày

SZ-100

LC4_013.nsz

Measurement Results

Date : Friday, March 10, 2023 14:53:15 PM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : LC4
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 1.085 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 1812
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1864 kCPS

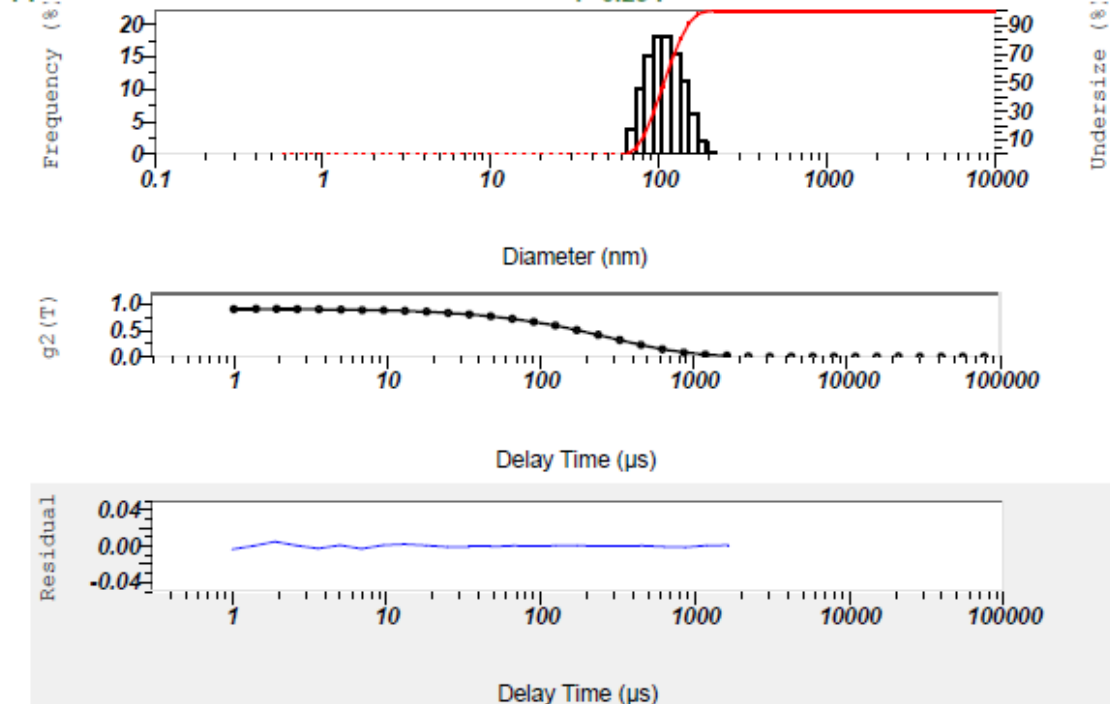
Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	111.1 nm	26.7 nm	99.8 nm
2	--	-- nm	-- nm	-- nm
3	--	-- nm	-- nm	-- nm
Total	1.00	111.1 nm	26.7 nm	99.8 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 120.4 nm

PI : 0.294



Phụ lục 14. Phổ DLS kích thước hạt của liposome mang 40% cao ốt (LC4) sau 21 ngày



SZ-100

LC4_014.nsz

Measurement Results

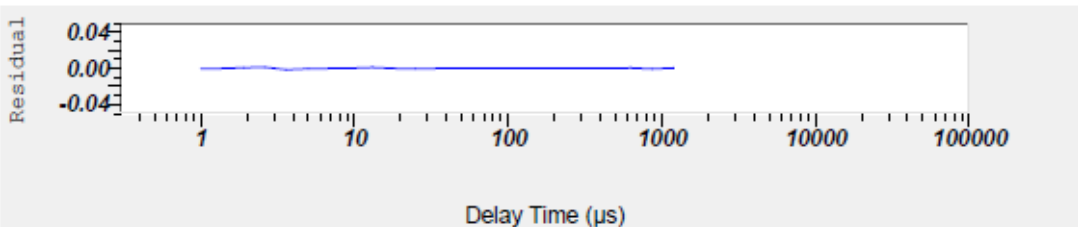
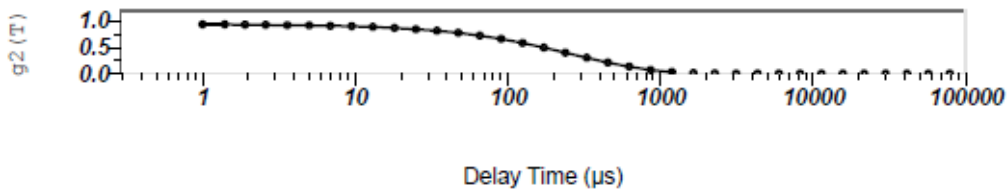
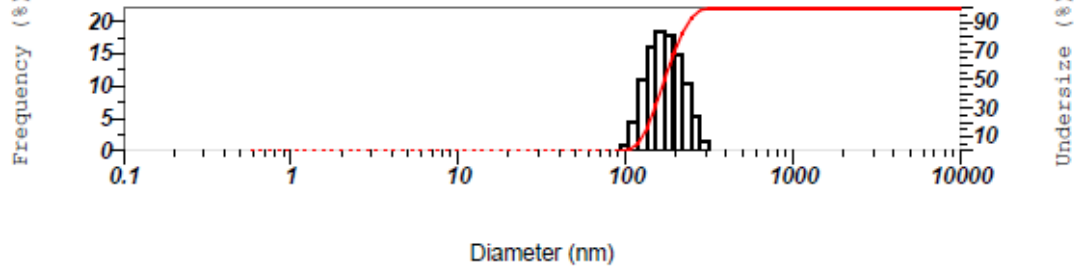
Date : Wednesday, March 15, 2023 10:10:50 AM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : LC4
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.896 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 4618
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 2897 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	177.0 nm	42.3 nm	162.1 nm
2	---	--- nm	--- nm	--- nm
3	---	--- nm	--- nm	--- nm
Total	1.00	177.0 nm	42.3 nm	162.1 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 125.6 nm
 PI : 0.381



Phụ lục 15. Phổ DLS kích thước hạt của liposome mang 40% cao ốt (LC4) sau 28 ngày

SZ-100

Measurement Results

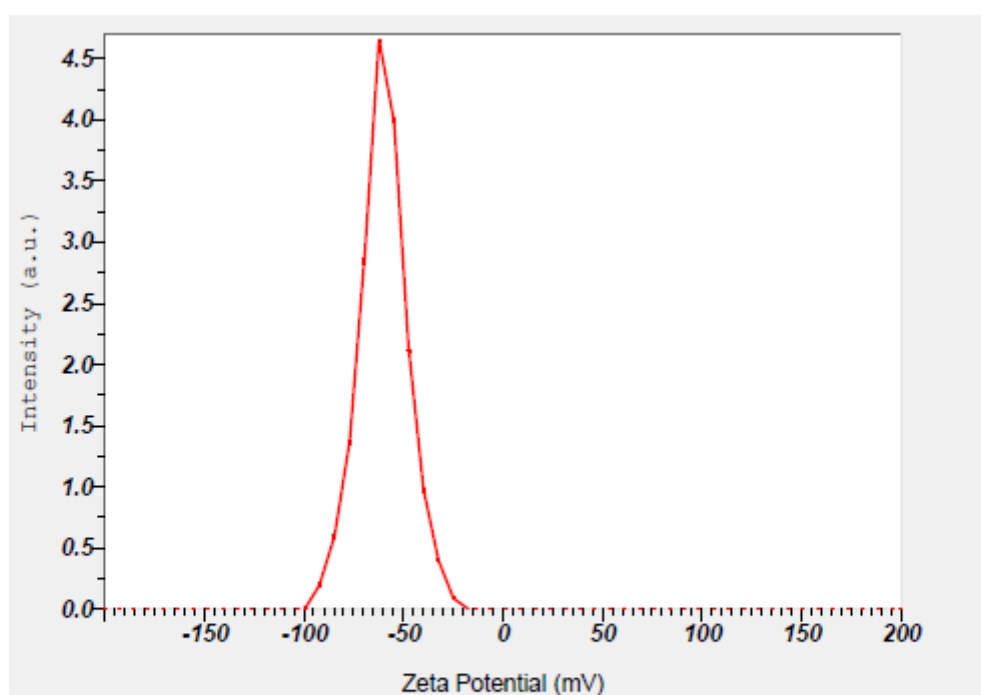
Measurement Results

Date : Friday, February 17, 2023 15:43:22 PM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : LC4
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.894 mPa·s
 Conductivity : 0.153 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.3 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-60.1 mV	-0.000466 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -60.1 mV
 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000466 cm²/Vs



SZ-100

Measurement Results

LC4_006.nzt

Measurement Results

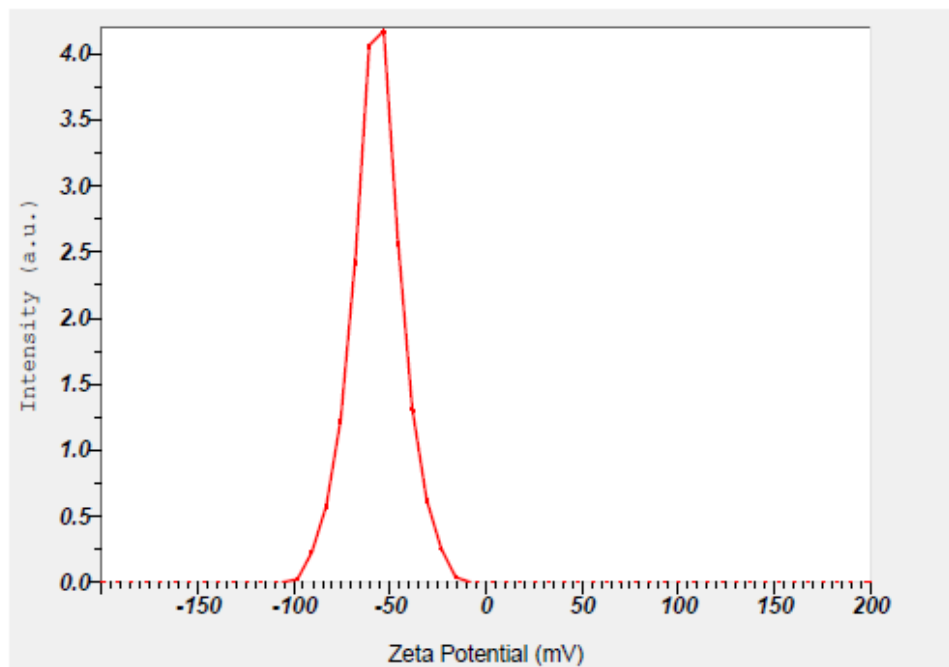
Date : Thursday, February 23, 2023 14:24:18 PM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : LC4
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.896 mPa·s
 Conductivity : 0.137 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.3 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-56.5 mV	-0.000437 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -56.5 mV

Electrophoretic Mobility Mean : -0.000437 cm²/Vs



Phụ lục 17. Phổ DLS thế zeta của liposome mang 40% cao ót (LC4) sau 7 ngày

SZ-100

Measurement Results

LC4_005.nzt

Measurement Results

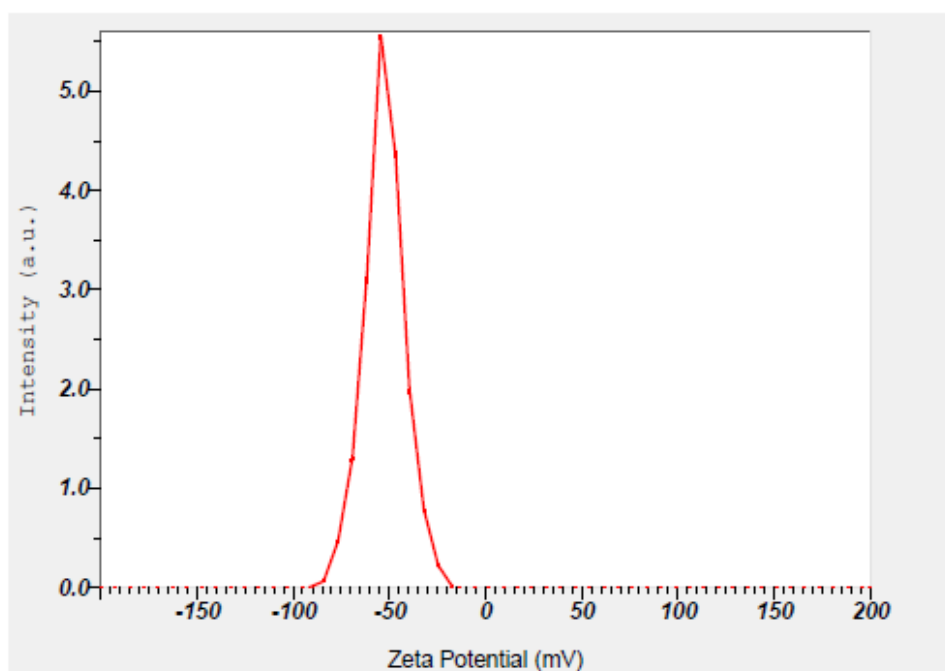
Date : Thursday, March 2, 2023 10:36:53 AM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : LC4
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.894 mPa·s
 Conductivity : 0.126 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.4 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-52.6 mV	-0.000407 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -52.6 mV

Electrophoretic Mobility Mean : -0.000407 cm²/Vs



Phụ lục 18. Phổ DLS thế zeta của liposome mang 40% cao ốt (LC4) sau 14 ngày

SZ-100

Measurement Results

LC4_004.nzt

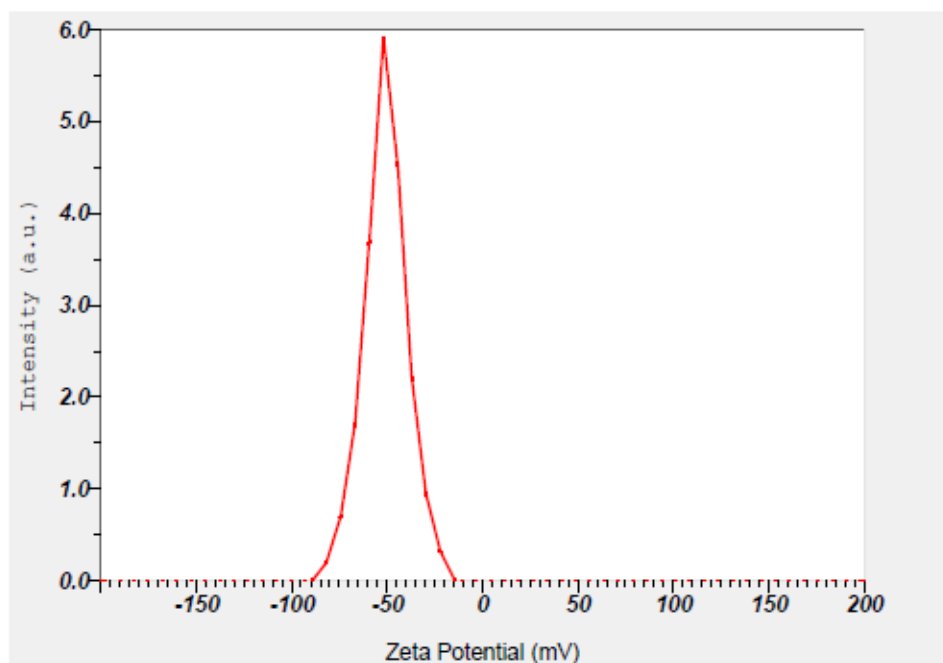
Measurement Results

Date : Friday, March 10, 2023 15:40:45 PM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : LC4
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.895 mPa·s
 Conductivity : 0.121 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.4 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-50.7 mV	-0.000393 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -50.7 mV
 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000393 cm²/Vs



Phụ lục 19. Phổ DLS thế zeta của liposome mang 40% cao ốt (LC4) sau 21 ngày

SZ-100

Measurement Results

LC4_005.nzt

Measurement Results

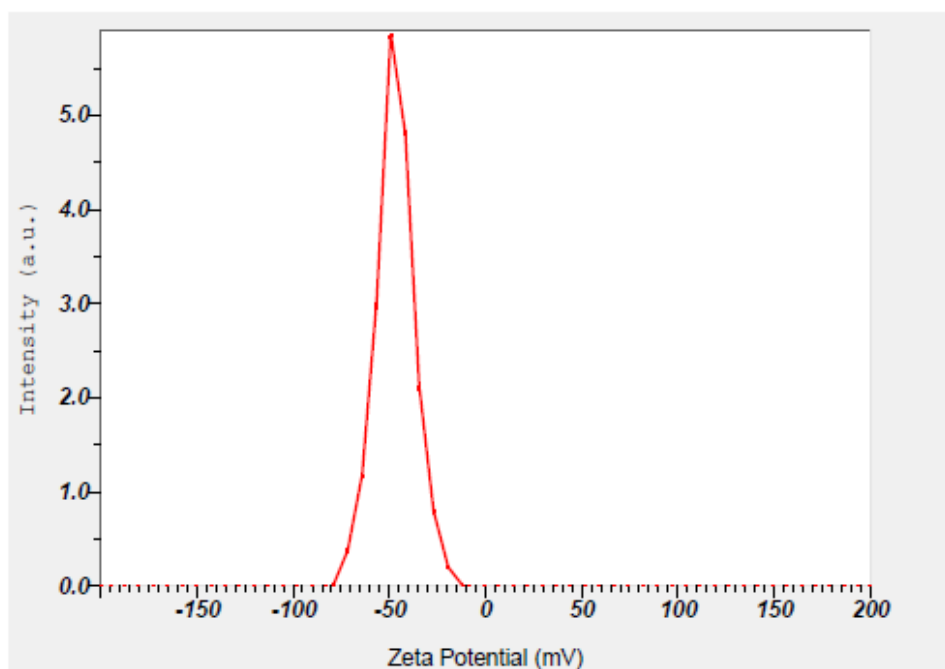
Date : Wednesday, March 15, 2023 11:06:26 AM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : LC4
 Temperature of the Holder : 24.9 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.897 mPa·s
 Conductivity : 0.128 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.4 V

Calculation Results

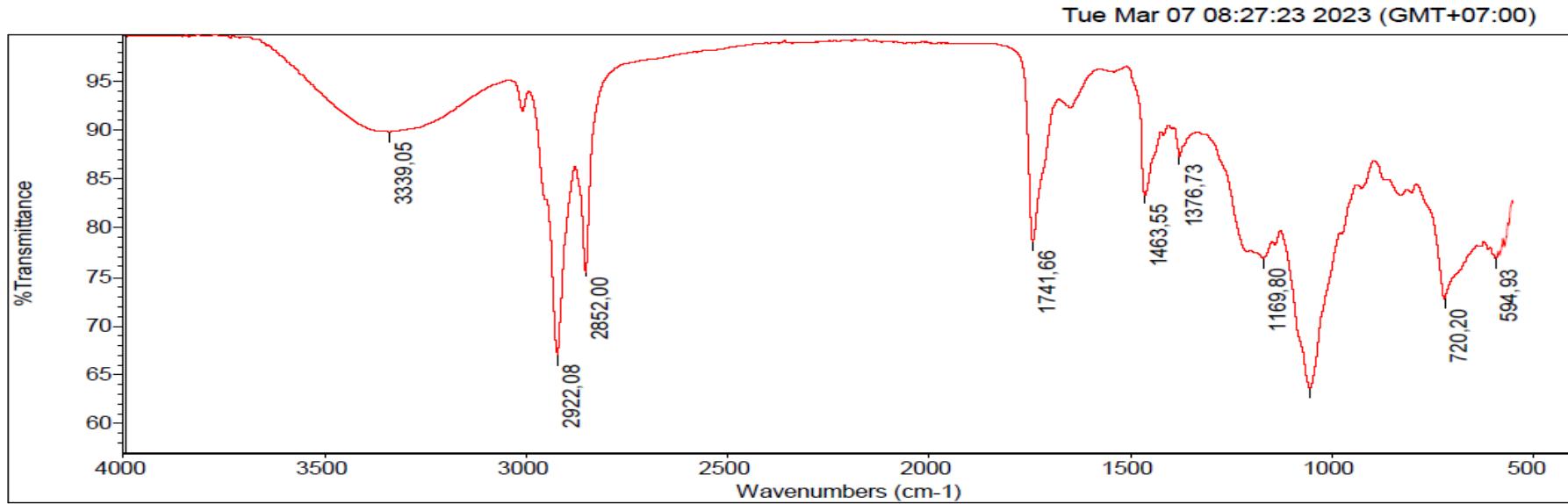
Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-46.9 mV	-0.000363 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -46.9 mV

Electrophoretic Mobility Mean : -0.000363 cm²/Vs



Phụ lục 20. Phổ DLS thế zeta của liposome mang 40% cao ốt (LC4) sau 28 ngày



Tue Mar 07 08:21:45 2023 (GMT+07:00)

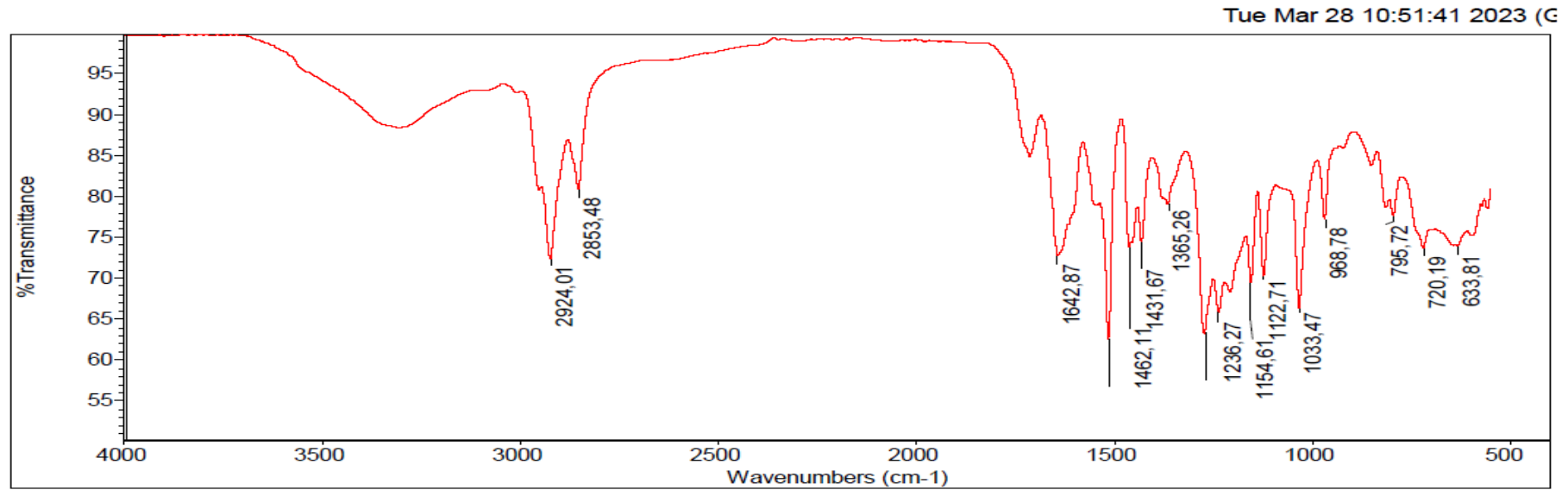
FIND PEAKS:

Spectrum: LCO
 Region: 4000,00 400,00
 Absolute threshold: 90,293
 Sensitivity: 50

Peak list:

Position	Intensity
594,93	76,884
720,20	72,681
1053,51	63,615
1169,80	76,911
1376,73	87,250
1463,55	83,350
1741,66	78,585
2852,00	75,459
2922,08	67,039
3339,05	89,792

Phụ lục 21. Phổ FTIR của liposome



Collection time: Tue Mar 28 10:50:41 2023 (GMT+0;

Tue Mar 28 10:51:27 2023 (GMT+07:00)

FIND PEAKS:

Spectrum: Tue Mar 28 10:50:19 2023 (GMT+07:00)

Region: 4000,00 400,00

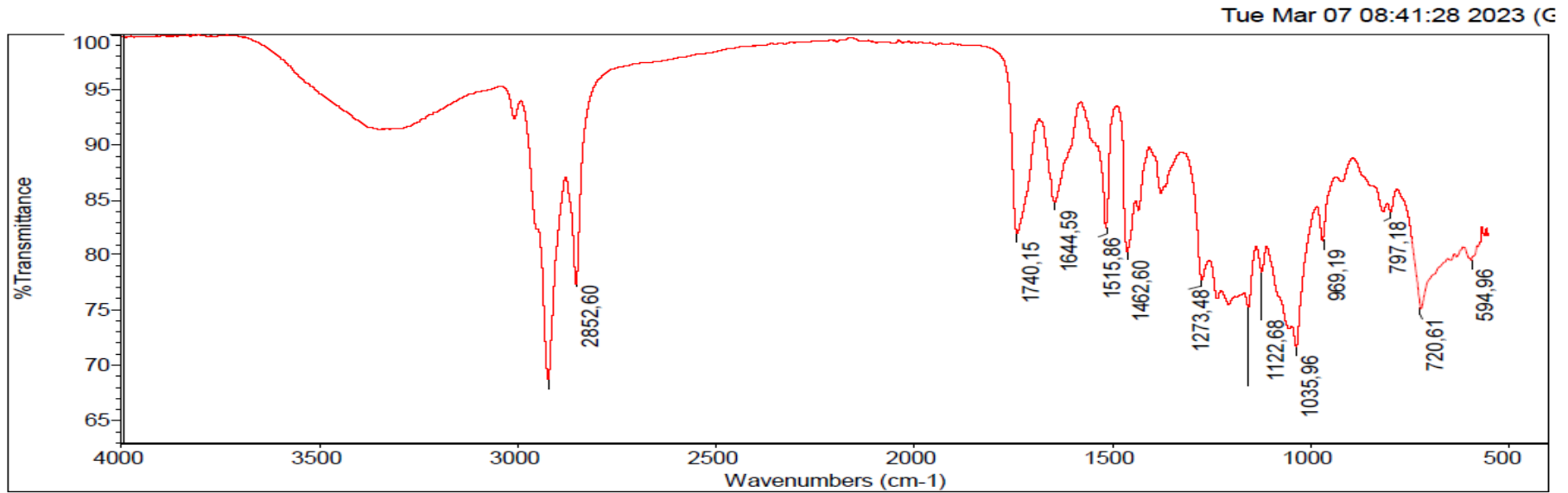
Absolute threshold: 81,395

Sensitivity: 50

Peak list:

Position:	633,81	Intensity:	73,899
Position:	720,19	Intensity:	73,679
Position:	795,72	Intensity:	77,590
Position:	968,78	Intensity:	77,203
Position:	1033,47	Intensity:	66,310
Position:	1122,71	Intensity:	70,281
Position:	1154,61	Intensity:	69,408
Position:	1236,27	Intensity:	65,816
Position:	1272,99	Intensity:	63,214
Position:	1365,26	Intensity:	79,002
Position:	1431,67	Intensity:	74,437
Position:	1462,11	Intensity:	73,787
Position:	1514,76	Intensity:	62,543
Position:	1642,87	Intensity:	72,759
Position:	2853,48	Intensity:	80,889
Position:	2924,01	Intensity:	72,422

Phụ lục 22. Phổ FTIR của cao ốt



Collection time: Tue Mar 07 08:37:27 2023 (GMT+0)

Tue Mar 07 08:39:14 2023 (GMT+07:00)

FIND PEAKS:

Spectrum: LC1
 Region: 4000,00 400,00
 Absolute threshold: 84,789
 Sensitivity: 50

Peak list:

Position:	Intensity:
594,96	79,495
720,61	75,092
797,18	83,875
969,19	81,257
1035,96	71,588
1122,68	78,446
1156,67	75,261
1273,48	77,703
1462,60	80,287
1515,86	82,445
1644,59	84,781
1740,15	81,947
2852,60	77,320
2922,76	68,653

Phụ lục 23. Phổ FTIR của liposome mang 40% cao ốt (LC4)