

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



VŨ QUỐC MẠNH

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VÀ ĐẶC TRƯNG TÍNH CHẤT
CỦA TỔ HỢP CARRAGEENAN/COLLAGEN (TỪ VẢY
CÁ) MANG DƯỢC CHẤT ALLOPURINOL**

Chuyên ngành: Hoá Hữu cơ

Mã số: 9440114

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HOÁ HỮU CƠ

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. GS. TS. Thái Hoàng

2. PGS. TS. Vũ Quốc Trung

HÀ NỘI – 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan những nội dung trong luận án này do tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS. TS. Thái Hoàng và PGS. TS. Vũ Quốc Trung. Một số nhiệm vụ nghiên cứu là thành quả tập thể và đã được các đồng sự cho phép sử dụng.

Các số liệu, kết quả trình bày trong luận án là trung thực và chưa từng được công bố trong các công trình khác.

Tác giả luận án

VŨ QUỐC MẠNH

LỜI CẢM ƠN

Sau một thời gian nghiên cứu, thực hiện đề tài "Nghiên cứu chế tạo và đặc trưng tính chất của tổ hợp carrageenan/collagen (từ vây cá) mang dược chất allopurinol" đã hoàn thành tại Phòng Hoá lý vật liệu phi kim loại – Viện Kỹ thuật nhiệt đới – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và chân thành nhất đến GS. TS. Thái Hoàng và PGS. TS. Vũ Quốc Trung, những người Thầy đã tận tình hướng dẫn và chỉ bảo tôi trong suốt quá trình xây dựng và hoàn thiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn anh, chị, em trong Phòng Hoá lý vật liệu phi kim loại và Viện Kỹ thuật nhiệt đới – nơi tôi thực hiện đề tài, đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc, thầy giáo, cô giáo cùng toàn thể cán bộ phòng Đào tạo Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu Trường Đại học Thành Đô, Ban lãnh đạo cùng toàn thể các đồng nghiệp Khoa Dược đã tạo mọi điều kiện, hỗ trợ, giúp đỡ tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn đề tài Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (Nafosted) – mã số: 104.02-2017.326 giai đoạn 2018–2021 đã hỗ trợ kinh phí để tôi hoàn thành luận án này.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã tạo điều kiện giúp đỡ, chia sẻ và động viên tôi trong quá trình hoàn thành luận án.

Hà Nội, tháng 01 năm 2024

Tác giả luận án

VŨ QUỐC MẠNH

MỤC LỤC

Trang

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	4
1.1. Tổng quan về collagen	4
1.1.1. Cấu tạo và cấu trúc phân tử collagen.....	4
1.1.2. Phân loại collagen.....	6
1.1.3. Tính chất của collagen	10
1.1.4. Tình hình nghiên cứu sản xuất collagen từ cá	12
1.2. Tổng quan về carrageenan	18
1.2.1. Cấu tạo và cấu trúc phân tử carrageenan	18
1.2.2. Tình hình nghiên cứu sản xuất carrageenan	24
1.2.3. Ứng dụng của carrageenan	27
1.3. Tổng quan về polyme thiên nhiên mang dược chất	29
1.3.1. Carrageenan mang dược chất.....	29
1.3.2. Collagen mang dược chất	31
1.3.3. Tổ hợp carrageenan/polyme khác mang dược chất	33
1.3.4. Tổ hợp collagen/polyme khác mang dược chất.....	35
1.3.5. Tổ hợp carragennan/collagen mang dược chất.....	37
1.4. Tổng quan về dược chất allopurinol và polyme mang allopurinol	38
1.4.1. Tính chất chung	38
1.4.2. Dược lực	39
1.4.3. Cơ chế tác dụng	40
1.4.4. Polyme mang allopurinol.....	40
CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM	43
2.1. Hóa chất, dụng cụ	43
2.2. Trích ly collagen từ vảy cá (họ cá chép – Cyprinidae)	43
2.2.1. Xử lý sơ bộ nguyên liệu đầu vào (Bước 1).....	43
2.2.2. Xử lý protein và chất béo bằng dung dịch kiềm (Bước 2)	44

2.2.3. Xử lý khoáng bằng dung dịch hỗn hợp acid khác nhau (Bước 3)	44
2.2.4. Thu collagen thô (Bước 4)	44
2.3. Chế tạo màng tổ hợp carragennan/collagen/allopurinol	47
2.4. Chế tạo hạt tổ hợp carragennan/collagen/allopurinol	48
2.5. Phương pháp nghiên cứu.....	49
2.5.1. Phương pháp hiển vi điện tử quét (SEM)	49
2.5.2. Phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS)	49
2.5.3. Phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)	50
2.5.4. Phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD)	50
2.5.5. Phương pháp nhiệt lượng quét vi sai (DSC) và phân tích nhiệt khối lượng (TGA)	50
2.5.6. Phương pháp phổ hấp thụ tử ngoại – khả kiến (UV-Vis)	50
2.5.7. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).....	51
2.5.8. Phương pháp điện di SDS-PAGE	51
2.5.9. Phương pháp sắc ký nano đa chiều và khối phổ (nanoLC-MS/MS)	52
2.6. Giải phóng allopurinol từ màng và hạt tổ hợp Car/C/ALP trong các môi trường pH khác nhau	53
2.6.1. Xây dựng đường chuẩn của allopurinol trong các dung dịch pH khác nhau	53
2.6.2. Xác định hàm lượng allopurinol được mang bởi tổ hợp Car/C.....	55
2.6.3. Xác định khối lượng thuốc allopurinol giải phóng từ vật liệu tổ hợp Car/C/ALP	55
2.7. Thử nghiệm in vivo sử dụng hạt tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol trên cơ thể động vật (chuột bình thường và chuột được tiêm phúc mạc potassium oxalate)	56
2.7.1. Xác định độc tính cấp của hạt tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol trên chuột được thử nghiệm	56
2.7.2. Xác định độc tính bán trường diễn của hạt tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol trên chuột được thử nghiệm	57
2.7.3. Khảo sát tác dụng của hạt tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol đến sự giảm nồng độ urat/acid uric trong máu của các loại chuột được thử nghiệm	58

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	61
3.1. Trích ly collagen từ vảy cá nước ngọt	61
3.1.1. Ảnh hưởng của dung dịch kiềm đến xử lý vảy cá thu collagen.....	61
3.1.2. Ảnh hưởng của hỗn hợp acid đến xử lý vảy cá thu collagen.....	62
3.1.3. Xác định độ tinh khiết và hàm lượng các acid amin trong collagen thu được từ hỗn hợp vảy cá.....	63
3.1.4. Đặc trưng, tính chất và hình thái cấu trúc của collagen thu được từ hỗn hợp vảy cá họ cá chép.....	66
3.2. Màng tổ hợp carragenan/collagen/allopurinol	72
3.2.1. Hiệu suất mang allopurinol của các màng tổ hợp carrageenan/collagen ..	72
3.2.2. Phổ FTIR của màng tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol	73
3.2.3. Nhiễu xạ tia X (XRD).....	78
3.2.4. Ảnh SEM của màng tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol.....	80
3.2.5. Độ bền nhiệt màng tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol.....	80
3.2.6. Nghiên cứu giải phóng allopurinol từ màng tổ hợp Car/C/ALP (CCA) trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4	83
3.2.7. Mô hình động học giải phóng allopurinol từ màng tổ hợp CCA trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4.....	88
3.3. Hạt tổ hợp carragenan/collagen/allopurinol (ACC)	90
3.3.1. Phổ FTIR của hạt tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol (ACC)	90
3.3.2. Phân bố kích thước hạt của hạt tổ hợp ACC	92
3.3.3. Ảnh SEM của hạt tổ hợp nano ACC.....	93
3.3.4. Đặc trưng nhiệt của hạt tổ hợp nano ACC	94
3.3.5. Hiệu suất mang allopurinol của các hạt tổ hợp nano ACC.....	96
3.3.6. Nghiên cứu giải phóng allopurinol từ hạt tổ hợp nano Car/C/ALP trong dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4.....	97
3.4. Thử nghiệm in vivo sử dụng hạt tổ hợp nano carrageenan/collagen/allopurinol trên cơ thể động vật (chuột bình thường và chuột được tiêm phúc mạc potassium oxalat)	102

3.4.1. Xác định độc tính cấp của hạt tổ hợp nano carrageenan/collagen/allopurinol trên chuột được thử nghiệm	102
3.4.2. Xác định độc tính bán trường diễn của hạt tổ hợp nano carrageenan/collagen/allopurinol trên chuột được thử nghiệm	105
3.4.3. Khảo sát tác dụng của hạt tổ hợp nano carrageenan/collagen/allopurinol đến sự giảm nồng độ urat/acid uric trong máu của các nhóm chuột được thử nghiệm.....	109
KẾT LUẬN	115
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	117
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	118
PHỤ LỤC	1.PL

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

3,6-AG:	3,6-anhydrogalactose
A-CNPs:	Nano siêu thuận từ chitosan mang allopurinol
Ala:	Alanine
ALP:	Allopurinol
Arg:	Arginine
Asp:	Acid aspartic
C:	Collagen
CAF:	Collagen/alginate/sợi
Car:	Carrageenan
CMC:	Carboxymethyl cellulose
CS:	Chitosan
Cur:	Curcumin
DFNa	Diclofenac sodium
DLS:	Tán xạ ánh sáng động
Dox:	Doxorubicin
DSC:	Nhiệt lượng quét vi sai
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic
EDX:	Tán xạ năng lượng tia X
EHE:	Phương pháp đun – thủy phân – chiết
FAD:	Cục quản lý Thực phẩm - Dược phẩm Hoa Kỳ
FO:	Động học bậc 1
FONPs:	Nano oxit sắt từ
FTIR:	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
GH:	Hormone tăng trưởng
Gln:	Glutamine
Glu:	Acid glutamic
Gly:	Glycine
GPC:	Giải phóng chậm

GPN:	Giải phóng nhanh
HAp:	Hydroxyapatite
HC:	Phương trình Hixon-Crowell
HG:	Phương trình Higuchi
HOB:	Nguyên bào xương của người
HPLC:	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
Hyp:	Hydroxyproline
Ile:	Isoleucin
KP:	Phương trình định luật năng lượng Korsmeyer-Peppas
LPS:	Lipopolysaccharide
Lys:	Lysine
Met:	Methionine
MNPs:	Hạt nano từ tính
PAA:	Poly(acid acrylic)
PEG 6000:	Polyetylen glycol 6000
PEO:	Polyetylen oxide
Pro:	Proline
PVA:	Poly(vinyl alcohol)
PVPk30:	Poly(vinylpyrrolidone)
SBF:	Dịch mô phỏng cơ thể người
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
SEM:	Hiển vi điện tử quét
TGA:	Phân tích nhiệt khối lượng
TPP:	Tripolyphosphate
Tris:	Trisaminomethane
UV-Vis:	Phổ hấp thụ tử ngoại – khả kiến
XRD:	Nhiễu xạ tia X
ZO:	Động học bậc 0
β - MIN6:	Tế bào tụy

**TỶ LỆ THÀNH PHẦN VÀ KÍ HIỆU CÁC MẪU MÀNG TỔ HỢP
CARRAGEENAN/COLLAGEN/ALLOPURINOL**

STT	Kí hiệu mẫu màng	Carrageenan (g)	Collagen (g)	Allopurinol (g)	KCl (g)
1	CC955-0	0,095	0,005	0	0,001
2	CCA991-5	0,099	0,001	0,005	0,001
3	CCA973-5	0,097	0,003	0,005	0,001
4	CCA955-5	0,095	0,005	0,005	0,001
5	CCA937-5	0,093	0,007	0,005	0,001
6	CCA9010-5	0,090	0,010	0,005	0,001
7	CCA955-3	0,095	0,005	0,003	0,001
8	CCA955-10	0,095	0,005	0,01	0,001
9	CCA955-15	0,095	0,005	0,015	0,001
10	CaA5	0,1	0	0,005	0,001
11	CoA 5	0	0,1	0,005	0,001

**TỶ LỆ THÀNH PHẦN VÀ KÍ HIỆU CÁC MẪU HẠT TỔ HỢP
CARRAGEENAN/COLLAGEN/ALLOPURINOL**

STT	Kí hiệu mẫu bột	Carrageenan (g)	Collagen (g)	Allopurinol (g)	KCl (g)
1	ACC19-5	0,01	0,09	0,005	0,001
2	ACC19-10	0,01	0,09	0,01	0,001
3	ACC19-15	0,01	0,09	0,015	0,001
4	ACC28-10	0,02	0,08	0,01	0,001
5	ACC55-10	0,05	0,05	0,01	0,001
6	ACC64-10	0,06	0,04	0,01	0,001

DANH MỤC CÁC BẢNG

	<i>Trang</i>
Bảng 1.1.	Cấu trúc các loại collagen [20]7
Bảng 2.1.	Tỷ lệ thành phần và kí hiệu các mẫu màng tổ hợp Car/C/ALP48
Bảng 3.1.	Đánh giá trực quan vảy cá theo thời gian xử lý bằng dung dịch NaOH 0,5 M61
Bảng 3.2.	Đánh giá trực quan vảy cá theo nồng độ dung dịch NaOH sau 8 giờ...61
Bảng 3.3.	Hiệu suất thu collagen được khi xử lý bằng dung dịch acid ở các nồng độ khác nhau62
Bảng 3.5.	Hàm lượng các acid amin trong dung dịch collagen (Kết tinh lần 1) thu được từ vảy cá họ cá Chép tại Việt Nam.....65
Bảng 3.7.	Số sóng (cm^{-1}) đặc trưng của các nhóm chức chủ yếu trong màng tổ hợp CCA tỷ lệ carrageenan và collagen thay đổi.....76
Bảng 3.9.	Các đặc trưng nhiệt của màng tổ hợp CCA82
Bảng 3.10.	Giá trị R^2 của các phương trình động học giải phóng ALP từ các màng tổ hợp CCA trong dung dịch đệm pH 289
Bảng 3.11.	Giá trị R^2 từ các phương trình động học giải phóng ALP từ các màng tổ hợp CCA trong dung dịch đệm pH 7,489
Bảng 3.12.	Giá trị R^2 của các mô hình phương trình động học giải phóng ALP từ các màng tổ hợp CCA (hàm lượng thuốc khác nhau) trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,490
Bảng 3.13.	Kích thước hạt trung bình của các hạt tổ hợp nano ACC28-10, ACC55-10 và ACC64-10.....92
Bảng 3.14.	Kích thước hạt trung bình của các hạt tổ hợp nano ACC19-5, ACC19-10 và ACC19-15.....93
Bảng 3.15.	Các đặc trưng nhiệt của ALP, carrageenan, collagen và hạt tổ hợp nano ACC28-10, ACC55-10 và ACC64-1096
Bảng 3.16.	Hiệu suất mang ALP của các hạt tổ hợp ACC và CCA.....97

Bảng 3.17.	Hệ số R^2 theo các mô hình động học giải phóng ALP và ALP từ các hạt tổ hợp nano ACC (tỷ lệ Car/C khác nhau) trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4.....	101
Bảng 3.18.	Hệ số hồi quy (R^2) theo các mô hình động học giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano CCA (hàm lượng ALP khác nhau) trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4.....	101
Bảng 3.19.	Tình trạng chuột sau 72 giờ uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 ở pha dò liều	103
Bảng 3.20.	Tình trạng chuột sau 72 giờ uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 ở pha thử độc tính.....	103
Bảng 3.21.	Cân nặng của các nhóm chuột trước và sau uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 sau 14 và 28 ngày (gam).....	106
Bảng 3.22.	Chỉ số huyết học của các nhóm chuột trước và sau uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 sau 14 và 28 ngày	106
Bảng 3.23.	Các chỉ số sinh hóa của chuột trước và sau uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 sau 14 và 28 ngày	107
Bảng 3.24.	Trọng lượng gan, thận và lách của chuột sau uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 sau 28 ngày	108
Bảng 3.26.	Nồng độ acid uric ở nhóm chuột chứng trắng; chứng bệnh; uống ALP và nano-ALP.....	111
Bảng 3.27.	Tỷ lệ acid uric tăng ở nhóm chuột sau uống $K_2C_2O_4$	112
Bảng 3.28.	Tỷ lệ giảm acid uric máu ở các nhóm chuột.....	113

DANH MỤC CÁC HÌNH

	<i>Trang</i>
Hình 1.1. Cấu trúc của collagen	4
Hình 1.2. Sự tham gia của hydroxyproline vào liên kết hydro giữa các chuỗi polypeptide	5
Hình 1.3. Cấu trúc xoắn ba của collagen.....	5
Hình 1.4. Một số dạng sinh học của chuỗi xoắn 3 collagen.....	6
Hình 1.5. Sự sắp xếp của collagen dạng sợi	7
Hình 1.6. Sự sắp xếp của một số loại collagen không tạo cấu trúc sợi	9
Hình 1.7. Cấu trúc phân tử và sự chuyên hóa trong môi trường kiềm của các loại carrageenan khác nhau	20
Hình 1.8. Cấu trúc của κ -Car.....	21
Hình 1.9. Cấu trúc của ι -carrageenan Car	21
Hình 1.10. Cấu trúc của λ -carrageenan Car	21
Hình 1.11. Gel carrageenan với Ca^{2+}	23
Hình 1.12. Đồ thị hàm lượng Cur giải phóng từ hệ κ -Car-Cur trong dung dịch pH 5,0 và pH 7,4.....	30
Hình 1.13. (a) Lượng GH giải phóng từ C/PVA (20/80) ở nồng độ khác nhau,.....	33
Hình 1.14. Đồ thị giải phóng thuốc Dox từ màng tổ hợp CoL/Ch/DBC mang thuốc Dox hàm lượng CoL/Ch khác nhau trong các dung dịch đệm pH 7,4 (a), 6,5 (b) và 5,8 (c).....	36
Hình 2.1. Collagen kết tủa (trái), collagen sau khi đông khô (phải)	45
Hình 3.1. Phổ EDX của collagen thô (A); collagen thẩm tích sau 24 giờ (B) và collagen thẩm tích sau 48 giờ (C)Bảng 3.4. Tỷ lệ khối lượng (%) các nguyên tố trong collagen trước và sau khi thẩm tích	63
Hình 3.2. Phổ FTIR của collagen sau thẩm tích 48 giờ	67
Hình 3.3. Ảnh SEM của collagen thô ở độ phóng đại 100.000 lần.....	68
Hình 3.4. Ảnh SEM ở các độ phóng đại 1.000 và 10.000 lần của collagen tinh sau khi thẩm tích 48 giờ	68

Hình 3.5.	Giản đồ DSC của mẫu collagen tinh	69
Hình 3.6.	Giản đồ TG và DTG của mẫu collagen tinh.....	69
Hình 3.7.	Kết quả điện di SDS-Page của collagen.....	70
Hình 3.8.	Đồ thị phản ánh sự phụ thuộc của phần độ nhớt của collagen vào nhiệt độ	72
Hình 3.9.	Phổ FTIR của ALP, Car và C.....	74
Hình 3.10.	Phổ FTIR của màng tổ hợp CCA	75
Hình 3.11.	Phổ FTIR của màng tổ hợp CCA ở các tỉ lệ Car/C và ALP khác nhau	77
Hình 3.12.	Một số giả thuyết tương tác trong màng tổ hợp Car/C/ALP.....	78
Hình 3.13.	Giản đồ XRD của ALP.....	79
Hình 3.14.	Giản đồ XRD của màng tổ hợp Car/C/ALP ở tỉ lệ Car/C = 95/5, 1% KCl	79
Hình 3.15.	Ảnh SEM của các màng tổ hợp Car/C/ALP, chất tạo gel KCl 1 %: ALP (a), CCA991-5 (b), CCA955-5 (c), CCA9010-5 (d), CCA955-3 (e) và CCA955-10 (f).....	80
Hình 3.16.	Giản đồ DSC của màng tổ hợp Car/C/ALP (5 %).....	81
Hình 3.17.	Đồ thị giải phóng ALP từ màng tổ hợp CCA trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4.....	84
Hình 3.18.	Đồ thị giải phóng ALP từ mẫu màng CoA-5, CaA-5 và màng tổ hợp CCA khi hàm lượng ALP thay đổi trong dung dịch đệm pH 7,4 ..	86
Hình 3.19.	Đồ thị giải phóng ALP tinh khiết và từ màng CCA với hàm lượng ALP thay đổi trong dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4.....	87
Hình 3.20.	Phổ FTIR của Car, C, ALP và các hạt tổ hợp ACC ở các tỷ lệ Car/C khác nhau.....	91
Hình 3.21.	Phổ IR của các hạt tổ hợp ACC19-5, ACC19-10 và ACC19-15	92
Hình 3.22.	Giản đồ phân bố kích thước hạt của các hạt tổ hợp nano ACC28-10, ACC55-10, ACC64-10.....	93
Hình 3.23.	Ảnh SEM của ALP các hạt tổ hợp nano ACC với tỷ lệ Car/C khác nhau	94
Hình 3.24.	Ảnh SEM của các hạt tổ hợp ACC với hàm lượng ALP khác nhau	94

Hình 3.25. Giảm đồ DSC của ALP, carrageenan, collagen và hạt tổ hợp ACC64-10.....	95
Hình 3.26. Đồ thị giải phóng ALP các hạt tổ hợp nano ACC và ALP tinh khiết trong dung dịch đệm pH 2.....	97
Hình 3.27. Đồ thị giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano CCA và mẫu ALP tinh khiết trong dung dịch đệm pH 2.....	98
Hình 3.28. Đồ thị giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano ACC (tỷ lệ Car/C khác nhau) trong dung dịch đệm pH 7,4	99
Hình 3.29. Đồ thị giải phóng allopurinol từ các hạt tổ hợp nano ACC (hàm lượng ALP khác nhau) trong dung dịch đệm pH 7,4	100
Hình 3.30. Hình ảnh chuột sau 72 giờ uống hạt tổ hợp nano ACC19-10	102
Hình 3.31. Hình ảnh đại thể của gan, lách và thận của chuột sau 72 giờ uống hạt tổ hợp nano ACC19-10.....	103
Hình 3.32. Mô học gan, thận và lách của chuột ở các nhóm.....	104
Hình 3.33. Hình ảnh vi thể nhu mô gan, thận và lách ở các nhóm chuột thử nghiệm ..	109
Hình 3.34. Sự khác nhau về nồng độ acid uric giữa các nhóm chuột nghiên cứu	114
Sơ đồ 2.1. Quy trình trích ly và tinh chế collagen từ hỗn hợp vảy cá (họ cá chép) tại Việt Nam.....	46

MỞ ĐẦU

Polyme thiên nhiên, nhân tạo hoặc tổng hợp có sử dụng trong y học được gọi là vật liệu polyme y sinh. Chúng được sử dụng với các mục đích khác nhau như: điều trị bệnh, thay thế các cơ quan bị tổn thương giúp phục hồi chức năng hoặc tăng cường một chức năng nào đó trong cơ thể [1].

Các polyme y sinh dùng làm vật liệu thay thế cần có các tính chất sau [1, 2]: Tương hợp sinh học và không độc hại; có thể khử trùng; dễ chế tạo. Loại vật liệu thường sử dụng làm các bộ phận thay thế trong cơ thể là sợi carbon, polyglycolide, poly *L*-lactic, poly caprolactone...

Với polyme y sinh làm vật liệu mang, dẫn thuốc trong dược phẩm, người ta chia làm 2 loại: dùng làm tá dược mang thuốc và dùng làm truyền dẫn điều trị tại đích [3, 4]. Trong đó, các polyme y sinh ở dạng hạt nano nhạy với nhiệt độ và pH để mang và giải phóng thuốc một cách tự nhiên từ các phần tử của thuốc vào cơ thể con người theo những chương trình được thiết lập sẵn. Như vậy, nồng độ thuốc trong máu và thời gian tác dụng của thuốc có thể kiểm soát một cách dễ dàng, tránh hiện tượng giải phóng cục bộ và có thể kéo dài thời gian điều trị cho một lần sử dụng thuốc.

Trong các hệ polyme y sinh, hệ polyme hydrogel có nhiều ưu điểm như: khả năng tương thích sinh học tốt, tương tác tốt với dược phẩm, dễ kiểm soát giải phóng thuốc và dễ gắn với các loại dược liệu. Vì vậy, chúng đang được chú trọng nghiên cứu để ứng dụng vào bào chế các dạng thuốc mới trong điều trị bệnh. Trong số các polyme phổ biến dùng để chế tạo dạng hydrogel, carrageenan (Car) và collagen (C) là hai ứng viên tiềm năng được sử dụng để mang các dược chất. Carrageenan được chiết xuất từ rong đỏ, có thể phân huỷ sinh học và an toàn với cơ thể người. Các sản phẩm của Car với kích thước nano đặc biệt là hệ nano tổ hợp có nhiều tính chất và được ứng dụng nhiều trong công nghiệp dược phẩm [5, 6] (làm tá dược sản xuất các loại thuốc điều trị như: thuốc chống đông máu, ngừa ung thư, ... [7, 8]). Collagen có tác dụng bảo vệ thuốc kháng các yếu tố gây biến đổi dược chất như: ánh sáng, oxy... Tuy nhiên, nguồn collagen hiện nay được sản xuất chủ yếu từ da động vật. Trong đó động vật có thể bị nhiễm một số bệnh như: bệnh bò điên, bệnh não xốp ở bò, lở mồm long móng, ... khiến cho chất lượng collagen thu được không đảm bảo.

Gần đây, collagen được trích ly từ vảy cá được quan tâm nghiên cứu như một loại vật liệu sinh học mới thay thế collagen từ động vật vì nguồn collagen từ vảy cá an toàn, giúp xử lý chất phế thải của ngành thủy sản, đồng thời mang lại hiệu quả kinh tế cho ngành thủy sản. Cho đến thời điểm này, chưa có đề tài nào nghiên cứu xử lý vảy cá nước ngọt (họ cá chép: cá chép, cá trôi, các trắm cỏ, cá rô phi) ở Việt Nam thu collagen một cách có hệ thống cũng như sử dụng tổ hợp carrageenan và collagen từ vảy cá làm vật liệu mang, dẫn thuốc.

Acid uric là sản phẩm chuyển hóa của purine trên người [9]. Khoảng 2/3 lượng acid uric được sinh ra từ chuyển hóa nội sinh và các loại thức ăn giàu purine như thịt, hải sản... [10]. Phần lớn acid uric được đào thải qua đường tiết niệu và một phần qua mật. Sự mất cân bằng trong chuyển hóa acid uric và rối loạn đào thải qua thận sẽ dẫn đến tăng acid uric máu [11]. Allopurinol (ALP) là một chất ức chế enzyme xanthine oxidase (enzym oxy hóa xanthine thành acid uric), do đó có tác dụng làm giảm mạnh nồng độ acid uric trong máu được sử dụng làm thuốc điều trị bệnh gút và tăng acid uric máu. Vì vậy, nghiên cứu sinh lựa chọn đề tài: “**Nghiên cứu chế tạo và đặc trưng tính chất của tổ hợp carrageenan/collagen (từ vảy cá) mang được chất allopurinol**” nhằm thu được collagen từ quá trình xử lý, chiết tách vảy cá nước ngọt ở Việt Nam (cá chép, cá trôi, các trắm, cá rô phi), đồng thời sử dụng collagen từ vảy cá thu được kết hợp với carrageenan để chế tạo vật liệu mang được chất mô hình là ALP để hỗ trợ điều trị bệnh gút, nhằm kiểm soát sự hấp thu và thải trừ của thuốc ALP, qua đó kéo dài thời gian tác dụng của thuốc.

➤ Mục tiêu nghiên cứu

- Xây dựng được quá trình trích ly collagen từ vảy cá nước ngọt Việt Nam (cá chép - *Cyprinus carpio*, cá trôi - *Labeo rohita*, cá trắm cỏ - *Ctenopharyngodon idella*, cá rô phi - *Oreochromis niloticus*).

- Chế tạo được tổ hợp polyme thiên nhiên carrageenan/collagen (từ vảy cá) chứa ALP dạng màng và dạng hạt bằng phương pháp dung dịch và phương pháp gel – ion hóa.

- Đánh giá được khả năng làm giảm acid uric trong máu từ việc sử dụng tổ hợp polyme thiên nhiên carrageenan/collagen (từ vảy cá) chứa ALP.

➤ Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu điều kiện trích ly collagen từ vảy cá nước ngọt Việt Nam (cá

chép - *Cyprinus carpio*, cá trôi - *Labeo rohita*, cá trắm cỏ - *Ctenopharyngodon idella*, cá rô phi - *Oreochromis niloticus*).

- Nghiên cứu điều kiện chế tạo và tỉ lệ thành phần giữa các polyme carrageenan và collagen (từ vây cá) mang ALP để thu được tổ hợp polyme mang được chất ở dạng màng và dạng hạt bằng phương pháp dung dịch và phương pháp gel – ion hóa.

- Nghiên cứu sự giải phóng được chất ALP từ tổ hợp polyme Car/C/ALP.

- Nghiên cứu thử nghiệm *in vivo* trên chuột sử dụng tổ hợp polyme thiên nhiên Car/C (từ vây cá) chứa ALP đến khả năng giảm acid uric trong máu.

➤ **Bố cục luận án**

Luận án bao gồm: Phần mở đầu, ba chương nội dung chính của luận án, kết luận, các đóng góp mới của luận án, danh mục các công bố liên quan đến luận án, danh mục tài liệu tham khảo và phụ lục.

Phần Mở đầu: Nêu tính cấp thiết của luận án, khái quát chung về nội dung và mục đích nghiên cứu của luận án.

Chương 1. Tổng quan: Giới thiệu về các đối tượng nghiên cứu, phương pháp nghiên cứu cũng như các nghiên cứu trong và ngoài nước liên quan đến các đối tượng và phương pháp nghiên cứu.

Chương 2. Thực nghiệm: Trình bày về vật liệu và các phương pháp chế tạo, nghiên cứu.

Chương 3. Kết quả và thảo luận: Đánh giá về những kết quả nghiên cứu đã đạt được của luận án.

Các đóng góp mới

Danh mục các công bố liên quan đến luận án

Tài liệu tham khảo: Liệt kê các tài liệu tham khảo đã sử dụng để nghiên cứu và thực hiện luận án.

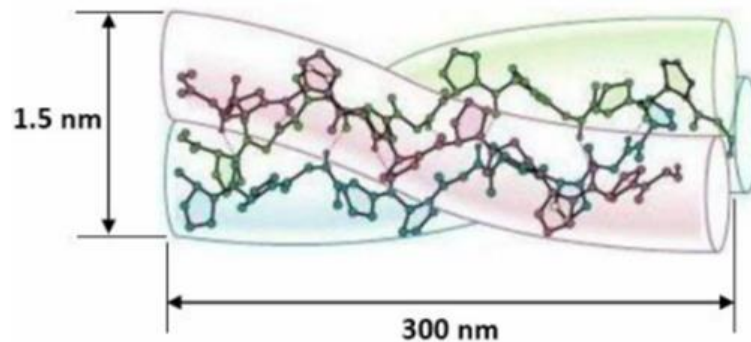
Phụ lục: Trình bày các bảng biểu số liệu đo đạc liên quan tới kết quả của luận án.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về collagen

1.1.1. Cấu tạo và cấu trúc phân tử collagen

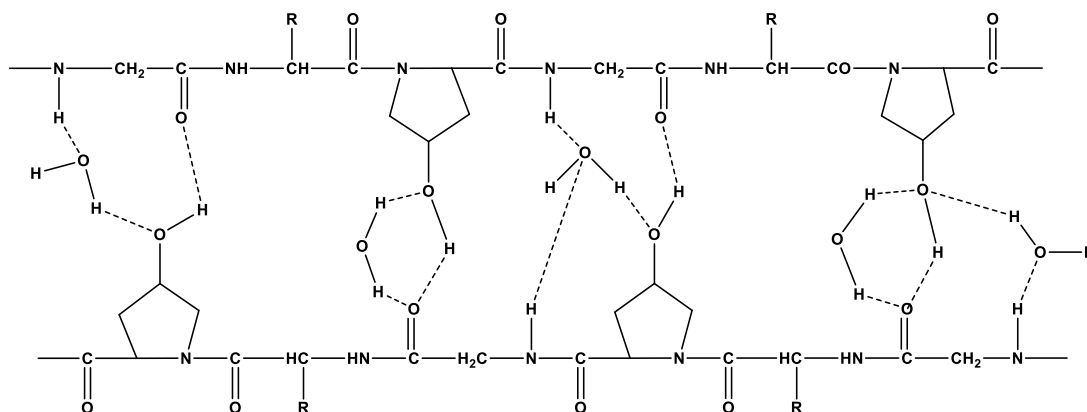
Đơn vị cấu trúc cơ bản của collagen là tropocollagen có chiều dài khoảng 300 nm, đường kính khoảng 1,5 nm, gồm ba chuỗi polypeptide xoắn lại với nhau (Hình 1.1). Các chuỗi trong collagen được ổn định bởi liên kết hydro giữa các nhóm $-CO-$ và $-NH-$ kế liền nhau trên mạch polypeptide [12].



Hình 1.1. Cấu trúc của collagen

Mỗi chuỗi polypeptide chứa khoảng 1050 amino acid, trong đó chủ yếu là glycine (khoảng 33%), proline (25%) và hydroxyproline. Trong mỗi chuỗi polypeptide của collagen, các amino acid có sự lặp lại của bộ ba amino acid Gly-X-Y, (X thường là prolin, Y thường là hydroxyprolin hoặc hydroxylysin). Với những collagen không có cấu trúc sợi, sự lặp lại của bộ ba Gly-X-Y có thể bị gián đoạn ở những vị trí xác định trong những đoạn xoắn ba [13].

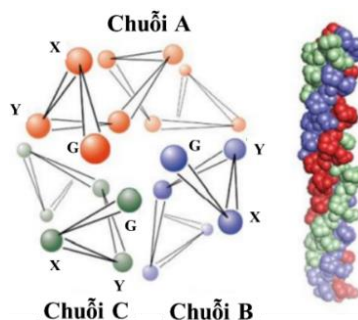
Hàm lượng các amino acid trong collagen có nguồn gốc từ cá thấp hơn collagen có nguồn gốc từ động vật. Amino acid trong collagen của cá ở môi trường ấm cao hơn môi trường lạnh. Các amino acid này giúp ổn định cấu trúc xoắn của collagen bởi nhóm hydroxyl của hydroxyprolin do hình thành liên kết hydro với nhóm carbonyl của chuỗi peptid kế bên và một phân tử nước làm cầu nối trung gian (Hình 1.2).



Hình 1.2. Sự tham gia của hydroxyproline vào liên kết hydro giữa các chuỗi polypeptide

Persikov đã nghiên cứu sự ổn định của phân tử collagen dựa trên trình tự Gly-X-Hyp và Gly-Pro-Y, từ đó xác định được các amino acid trên các vị trí X và Y, ở vị trí của X thường gặp các amino acid: Pro, Glu, Ala, Lys, Arg, Gln, và Asp; ở vị trí Y thường gặp các amino acid là: Hyp, Arg, Met, Ile, Gln, và Ala; các amino acid thơm và Gly ít ổn định ở cả hai vị trí X và Y [14].

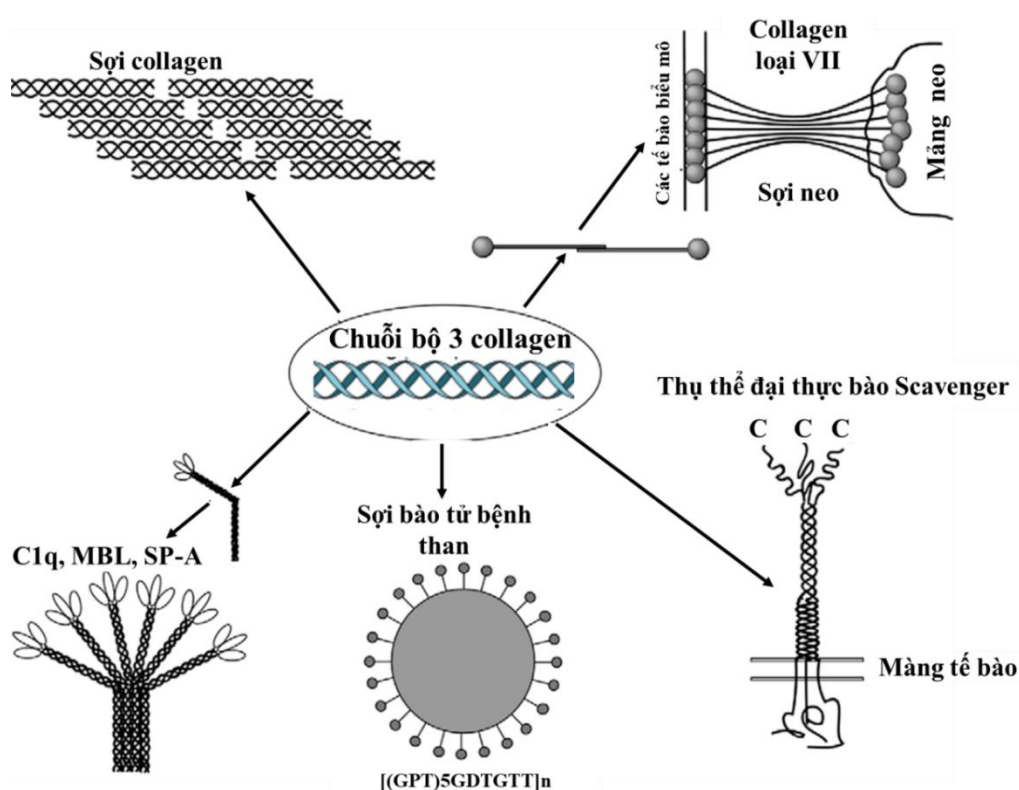
Độ ổn định nhiệt của collagen được tăng lên nhờ hydroxyprolin. Sakikabara đã nghiên cứu (1973) chỉ ra sự ổn định của mạch polypeptide (Pro-Hyp-Gly)₁₀ ($T_m = 58^\circ\text{C}$) cao hơn so với mạch polypeptide (Pro-Pro-Gly)₁₀ ($T_m = 24^\circ\text{C}$) [15]. Sự bền nhiệt này là do nhóm hydroxyl của Hyp hướng ra phía bề mặt ngoài cấu trúc xoắn ốc, không tham gia vào liên kết hydro bên trong cấu trúc nên nhóm này sẽ tham gia hình thành liên kết hydro nhờ cầu nối trung gian là phân tử nước [15]. Lúc này, nhóm hydroxyl đóng vai trò liên kết với phân tử H₂O nội và ngoại phân tử thành những cầu nước liên tục nhau [16]. Do đó, sự lặp lại của bộ ba amino acid Gly-X-Y trong mỗi chuỗi polypeptide cho phép hình thành cấu trúc xoắn ba với amino acid glycine cuộn vào bên trong lõi xoắn ốc còn các amino acid X và Y lộ ra phía bề mặt ngoài (Hình 1.3) [12].



Hình 1.3. Cấu trúc xoắn ba của collagen

Trong thành phần cấu tạo của collagen, số lượng các amino acid có tính acid gần bằng số lượng các amino acid có tính base. Vì vậy, collagen vẫn giữ được trạng thái cân bằng về điện trong những điều kiện sinh lý khác nhau [17]. Các phương pháp thường được dùng để tách các phân tử collagen từ các bó sợi là dùng các enzyme (như pepsin) để phân cắt các chuỗi polypeptide ra khỏi phân tử collagen (loại bỏ được các liên kết ngang ngoại phân tử), do đó dễ dàng thu hồi collagen [17].

Trong động vật, các phân tử collagen sẽ kết tụ với nhau tạo thành vi sợi (microfibril). Các vi sợi là đơn vị cấu trúc để hình thành các sợi, bó sợi lớn hơn và các mạng lưới có trong mô, xương và các màng cơ bản (Hình 1.4) [18].



Hình 1.4. Một số dạng sinh học của chuỗi xoắn 3 collagen

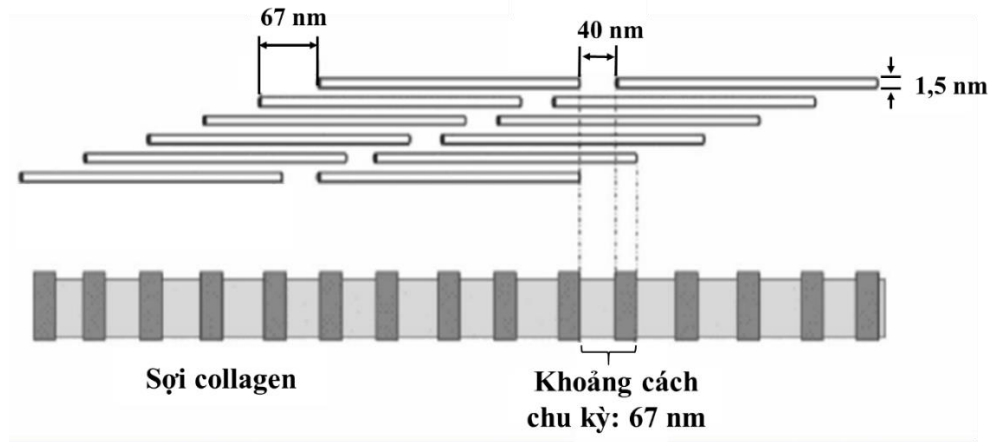
1.1.2. Phân loại collagen

Trong cơ thể người, tồn tại 28 loại collagen được liệt kê trong Bảng 1.1. Chúng gồm hai nhóm chính: dạng sợi và không phải dạng sợi gồm: collagen dạng màng, chuỗi hạt, chuỗi ngắn, dạng chuyển màng và một số loại khác.

1.1.2.1. Collagen dạng sợi

Là dạng phổ biến với hàm lượng hơn 90% lượng collagen trong cơ thể. Collagen dạng sợi có chiều dài chu kỳ khoảng 64-67 nm, được lặp đi lặp lại. Mỗi sợi

collagen tạo bởi các đại phân tử tropocollagen với kích thước: dài 300 nm, rộng 15 nm và được sắp xếp so le nhau. Hai phân tử liên tiếp cách nhau 40 nm (Hình 1.5) [19].



Hình 1.5. Sự sắp xếp của collagen dạng sợi

Nhóm dạng sợi gồm: collagen loại I (có nhiều trong da, gân, xương, giác mạc, phổi, mạch máu); collagen loại II (thành phần quan trọng của sụn); collagen loại III (có tính chất đàn hồi do vậy có nhiều trong mô liên kết như : như phổi, da, mạch máu); collagen loại V được liên kết với loại I (có trong giác mạc); collagen loại XI được liên kết với loại II (có trong cấu tạo của sụn) (Bảng 1.1). Collagen dạng sợi có mỗi chuỗi α , có vùng xoắn ốc dài và lặp lại liên tục của bộ ba (Gly-X-Y)_n, (n = 337–343, tùy thuộc loại collagen) [20].

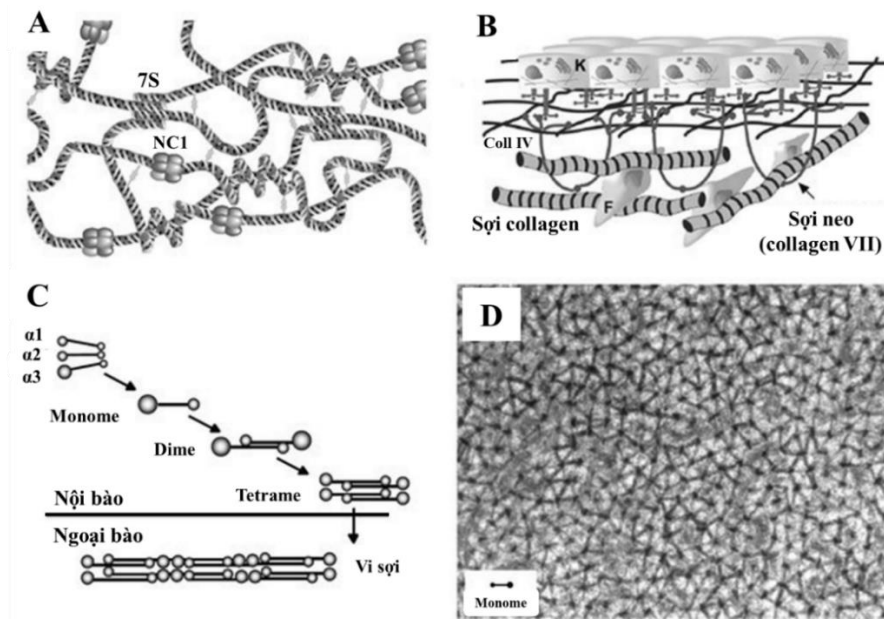
Bảng 1.1. Cấu trúc các loại collagen [20]

Dạng collagen	Loại	Cấu trúc phân tử
Dạng sợi	I	$[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2(\text{I})$
	II	$[\alpha 1(\text{II})]_3$
	III	$[\alpha 1(\text{III})]_3$
	V	$[\alpha 1(\text{V})]_3; [\alpha 1(\text{V})]_2\alpha 2(\text{V}); \alpha 1(\text{V})\alpha 2(\text{V}) \alpha 3(\text{V})$
	XI	$\alpha 1(\text{XI})\alpha 2(\text{XI})\alpha 3(\text{XI})$
	XXIV	$[\alpha 1(\text{XXIV})]_3$
	XXVII	$[\alpha 1(\text{XXVII})]_3$
Dạng màng	IV	$[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV}); \alpha 3(\text{IV})\alpha 4(\text{IV}) \alpha 5(\text{IV});$ $[\alpha 5(\text{IV})]_2\alpha 6(\text{IV})$

	VII	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$
	XV	$[\alpha 1(\text{XV})]_3$
	XVIII	$[\alpha 1(\text{XVIII})]_3$
Dạng chuỗi hạt	VI	$\alpha 1(\text{VI})\alpha 2(\text{VI})\alpha 3(\text{VI}); \alpha 1(\text{VI})\alpha 2(\text{VI})\alpha 4(\text{VI})$
Dạng chuỗi ngắn	VIII	$[\alpha 1(\text{VIII})]_3; [\alpha 2(\text{VIII})]_3; [\alpha 1(\text{VIII})]_2\alpha 2(\text{VIII})$
	X	$[\alpha 1(\text{X})]_3$
FACIT collagen	IX	$\alpha 1(\text{IX})\alpha 2(\text{IX})\alpha 3(\text{IX})$
	XII	$[\alpha 1(\text{XII})]_3$
	XIV	$[\alpha 1(\text{XIV})]_3$
	XVI	$[\alpha 1(\text{XVI})]_3$
	XIX	$[\alpha 1(\text{XIX})]_3$
	XX	$[\alpha 1(\text{XX})]_3$
	XXI	$[\alpha 1(\text{XXI})]_3$
	XXII	$[\alpha 1(\text{XXII})]$
Collagen chuyển màng	XIII	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$
	XVII	$[\alpha 1(\text{XVII})]_3$
	XXIII	$[\alpha 1(\text{XXIII})]_3$
	XXV	$[\alpha 1(\text{XXV})]_3$
Các loại collagen khác	XXVI	$[\alpha 1(\text{XXVI})]_3$
	XXVIII	$[\alpha 1(\text{XXVIII})]_3$

1.1.2.2. Collagen dạng màng [12]

Collagen loại IV là dạng phổ biến nhất, là thành phần màng phân cách giữa các cơ quan, màng trong, hạ bì, mô cơ và tế bào thần kinh và mô cơ. Collagen IV dài hơn và bị gián đoạn một số vị trí trong chu trình lặp bộ ba Gly-X-Y. Phân tử có hai đầu đầu 7S và NC1 khác với dạng sợi là không có hai đầu teleopeptide N và C. Phân tử collagen IV kết tụ lại với nhau nhờ vào sự hình thành liên kết tại hai vùng 7S và NC1, sự tương tác tại các vùng xoắn ốc và tương tác giữa các thành phần khác của màng để hình thành lên cấu trúc mạng lưới (Hình 1.6A).



Hình 1.6. Sự sắp xếp của một số loại collagen không tạo cấu trúc sợi

Trong số collagen của động vật thì vùng xoắn ốc của collagen VII là dài nhất (chiều dài 420 nm) và bị gián đoạn tại các điểm ở hai đầu vùng NC1 và NC2. Collagen này có ở ranh giới nối giữa lớp trung và biểu bì, với chức năng sợi neo giữ các cấu trúc (Hình 1.6B). Collagen loại XVIII và XV có nhiều đoạn kết tụ lại với nhau, gọi là loại hỗn hợp. Hai loại này tạo liên kết với các màng và liên kết cộng hoá trị với các chuỗi glycosaminoglycan gọi là các proteoglycan.

1.1.2.3. Collagen chuỗi hạt

Collagen chuỗi hạt là loại phổ biến đóng vai trò duy trì hình dạng và trạng thái các mô. Các phân tử chuỗi hạt có các vùng xoắn ốc ngắn (bằng 1/3 so với dạng sợi). Phân tử collagen VI liên kết với nhau tạo chuỗi hạt, có chiều dài chu kỳ 110 nm (Hình 1.6 C).

1.1.2.4. Collagen chuỗi ngắn

Gồm collagen loại X và VIII, là thành phần của tế bào sụn và biểu bì. Vùng xoắn ba có chiều dài bằng 1/2 dạng sợi và có nhiều vùng gián đoạn. Hai loại này tham gia hình thành giác mạc (collagen VIII) và sụn (collagen X) (Hình 1.6 D).

1.1.2.5. FACIT collagen

Là loại collagen đầu tiên được tìm thấy. Loại này có collagen IX, là thành phần chính của sợi collagen trong sụn. Collagen IX là heterotrime dạng $\alpha 1(\text{IX})\alpha 2(\text{IX})\alpha 3(\text{IX})$ gồm: phân tử glycosaminoglycan liên kết với chuỗi $\alpha 2(\text{IX})$ nên

gọi là proteoglycan. Trên bề mặt các collagen II và XI liên kết với collagen IX có trong sụn bằng với các dẫn xuất của lysin bằng liên kết cộng hoá trị.

Collagen sợi không liên kết với collagen XVI, XIX và XXII mà được phân bố trong các mô khác nhau, như collagen XXII có ở màng biên giữa các mô; collagen collagen loại I liên kết với XII có trong dây chằng, giác mạc, gân, và da.

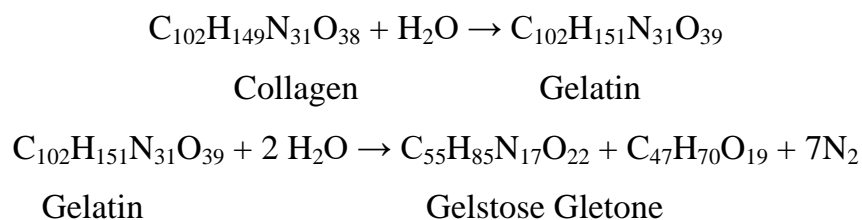
1.1.3. Tính chất của collagen

1.1.3.1. Sự hút ẩm của collagen

Collagen không tan trong H₂O nhưng hút ẩm làm tăng thể tích, độ bền liên kết giảm. Khi hút nước, collagen bị ion hóa do tương tác giữa các nhóm phân cực khác với kiểu Van der Waals. Phân tử H₂O phân cực gây ảnh hưởng đến liên kết hydro của chuỗi polypeptide trong collagen làm yếu liên kết. Collagen liên kết với H₂O và dẫn nở làm tăng độ dày lên khoảng 25% mà độ dài không tăng kết quả tổng thể tích phân tử collagen tăng lên [19].

Tỉ lệ giãn nở của collagen có giới hạn (7 % cho sợi ướt và 5 % cho sợi khô). Ở 60 °C, dưới tác động của chất điện ly, collagen hút ẩm, trương nở và co ngắn bằng 1/3 - 1/4 chiều dài ban đầu. Tiếp tục đun nóng, collagen bị thủy phân thành gelatin. Collagen tan trong glycerin, acetic acid, dung dịch ure và không tan trong H₂O lạnh. Độ bền kéo đứt của collagen lớn dùng làm băng gạc trong y học, xương, gân, dây chằng, sụn và da. Kết hợp với keratin làm tăng độ mềm, độ dẻo dai của da. Trong quá trình lão hóa, collagen bị thoái hóa sẽ gây ra nếp nhăn trên da [21].

Đun sôi dung dịch collagen tạo thành gelatin, khi đó vòng xoắn ba mở xoắn do phá vỡ các liên kết hydro. Gelatin và galactose là các sản phẩm thủy phân của gelatin. Tỷ lệ giữa gelatin/gelaton/galatose phụ thuộc vào thời gian đun và nhiệt độ đun. Enzym trysin và pepsin có tác dụng thủy phân chậm collagen và thủy phân nhanh gelatin. Collagen bị kết tủa tạo sợi dày khi bổ sung alcohol, acetone hoặc muối đặc biệt là heparin [21].



1.1.3.2. Sự tương tác của collagen với acid và kiềm

Collagen là chất lưỡng tính, nó có thể tác dụng với acid và kiềm do trên mạch của phân tử collagen tồn tại các gốc carboxyl và amino [21]. Trong môi trường acid, ion H^+ tác dụng với nhóm amino tạo thành ion $-NH_3^+$. Ngược lại, trong môi trường kiềm nhóm $-COOH$ bị chuyển hoá thành $-COO^-$. Ngoài ra acid và kiềm có thể thủy phân liên kết peptide trong collagen tạo thành chuỗi peptide ngắn hơn và các acid amin tự do.

1.1.3.3. Một số tính chất khác của collagen [22]

Tùy thuộc nguồn gốc, mỗi loại collagen sẽ có những đặc điểm khác nhau và chúng được mô tả bởi nhiều tính chất đặc trưng cho nguồn gốc trích ly như:

+ Nhiệt độ biến tính collagen: là nhiệt độ tại đó cấu trúc xoắn ba của collagen bắt đầu bị biến đổi thành những cuộn xoắn ngẫu nhiên. Do đó, biết được tính chất này sẽ giúp việc ứng dụng collagen được hiệu quả và thích hợp.

+ Thành phần amino acid của collagen: là tính chất rất quan trọng, giúp đánh giá được mặt dinh dưỡng của collagen, là nền tảng để dự đoán các tính chất hoá học, lý học và sinh học... của collagen.

+ Khối lượng phân tử collagen: là thông số gián tiếp giúp nhận biết mức độ nguyên vẹn của mạch phân tử collagen thu được (mỗi phân tử collagen có khối lượng khoảng 300 kDa).

+ Phổ hồng ngoại (IR): mỗi amide có độ hấp thụ ở bước sóng riêng biệt, do vậy phổ IR giúp phát hiện và xác định mẫu phân tích có tồn tại cấu trúc xoắn hay không.

+ Khả năng tạo nhũ tương: Là một protein không tan, collagen là chất nhũ hóa yếu nhưng tốt hơn sữa gầy.

+ Sự biến tính: dưới tác dụng hóa học của acid, base, muối, ancol... cấu trúc các bậc (trừ bậc 1) của collagen bị phá vỡ do sự phân hủy các liên kết ion, giữ nguyên liên kết peptide (cấu trúc bậc một của protein). Do vậy, tính chất của protein bị thay đổi, gọi là hiện tượng biến tính protein. Sau biến tính, protein thường giảm độ hòa tan, mất hoạt tính sinh học, nhạy cảm với enzyme protease, độ nhớt nội tại tăng lên và không kết tinh [23].

1.1.4. Tình hình nghiên cứu sản xuất collagen từ cá

1.1.4.1. Trên thế giới

Theo Caruso và cộng sự [24], ước tính rằng hơn 50% bộ phận của cá, bao gồm vây, đầu, da và nội tạng, bị loại bỏ dưới dạng “chất thải”, vượt quá 20 triệu tấn sản phẩm phụ mỗi năm. Do đó, việc khai thác các sản phẩm phụ từ cá biển như một nguồn cung cấp collagen mới ngày càng thu hút được sự chú ý [25, 26] do collagen thu được từ các phụ phẩm này dễ chiết xuất, hàm lượng cao, dễ hấp thụ, tương thích sinh học, Không lây nhiễm một số mầm bệnh như collagen từ động vật. Do vậy, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc trích ly và đánh giá các đặc tính của collagen từ da của các loài cá khác nhau, chẳng hạn như vây và vây của *Catla catla* và *Cirrhinus mrigala* [27], cá nhám mè đốm nhỏ (*Scyliorhinus canicula*) [28], cá da trơn (*Silurus triostegus*) [29].

Nghiên cứu của Huang và cộng sự [30] cho thấy áp suất cao được sử dụng trong quá trình tách collagen từ vây cá rô phi cho sản lượng collagen từ 7,5 đến 12,3%, cao gấp 2–3 lần so với sản lượng của quy trình chiết xuất sử dụng acetic acid thông thường.

Sử dụng acid khi chiết tách collagen cũng được nghiên cứu. Acetic acid là một trong những acid phổ biến nhất được dùng trong chiết xuất collagen từ cá, nồng độ của dung dịch thường dùng từ 0,5 đến 1M. Tan và cộng sự [31] đã nghiên cứu ảnh hưởng của các loại acid khác nhau (acetic acid, acid clohydric, acid citric và acid lactic, W:V = 1:50), tỷ lệ chất lỏng/chất rắn và độ pH khác nhau (1,8; 2,1; 2,4 ; 2,7 và 3,0) đến quá trình chiết xuất collagen từ da cá da trơn bằng các phương pháp khác nhau (phương pháp chiết xuất bằng acid, đồng nhất hóa và hỗ trợ pepsin). Phương pháp pepsin và hỗ trợ đồng nhất hóa thể hiện khả năng thu hồi protein cao nhất (64,19% ở pH 2,4 bằng HCl). Về phương pháp chiết xuất acid, tỷ lệ thu hồi protein tách từ da bằng HCl ở pH 2,4 là 42,36% (cao nhất), tiếp theo là chiết xuất bằng acetic acid pH 2,7 (39,45%).

Tác dụng của acetic acid nồng độ khoảng 0,2–1,0 M đối với quá trình chiết xuất collagen từ da cá được Arumugam và cộng sự nghiên cứu [32]. Kết quả thu được sản lượng collagen tăng dần khi tăng nồng độ acetic acid, lượng collagen tối

đa thu được là 15,968 mg/g ở 0,6M acetic acid. Tuy nhiên, vượt quá 0,6 M, sản lượng collagen giảm do lượng acid dư có tác dụng thủy phân collagen.

Yang và cộng sự nghiên cứu tách chiết collagen từ da cá có sử dụng acetic acid. Hàm lượng collagen thu được phụ thuộc nồng độ acetic acid sử dụng, nồng độ của collagen tăng từ 0,518 lên 1,581 mg/mL khi thay đổi nồng độ acetic acid từ 0,1 đến 2,0 M [33].

Masahiro Ogawa và cộng sự (2004) đã nghiên cứu các tính chất hoá sinh của collagen tách chiết từ xương và vảy của cá trống đen (*Pogonia cromis*) cận nhiệt đới và cá sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). Collagen được trích ly bằng cách sử dụng acetic acid và sử dụng enzyme pepsin kết hợp với acetic acid. Collagen loại I với nhiệt độ biến tính lớn hơn 34°C [34].

Năm 2006, L.S. Senaratne và các cộng sự đã nghiên cứu tách chiết và xác định các tính chất đặc trưng của collagen từ da cá lưng nâu toadfish (*Lagocephalus glover*). Các tác giả đưa ra quy trình tách: Đầu tiên khử protein phi collagen bằng cách ngâm da cá trong dung dịch NaOH 0,1N trong 3 ngày. Sau đó loại chất béo bằng ancol butylic 10% trong 24 giờ. Da cá sau khi loại bỏ chất béo tiếp tục được ngâm trong acetic acid 0,5M trong 3 ngày và được xử lý bằng enzyme pepsin trong 48 giờ để tách collagen. Thêm NaCl vào dung dịch thu được để kết tủa collagen. Phương pháp này cho hiệu suất tách chiết là 54,3% theo khối lượng khô, cấu trúc phân tử của collagen gồm ba chuỗi α_1 , α_2 , α_3 , nhiệt độ biến tính của collagen là 28 °C, thấp hơn 9 °C so với collagen từ da lợn [35].

Lin Wang và các cộng sự (2008) cũng nghiên cứu tách chiết và xác định các tính chất đặc trưng của collagen từ da, vảy và xương của cá đở (*Sebastes mentella*). Quá trình tách chiết được thực hiện qua các bước khử protein phi collagen bằng NaOH 1M; khử khoáng bằng ethylenediaminetetraacetic (EDTA) 0,5M và khử chất béo bằng hexan. Các quá trình khử đều được thực hiện trong 24 giờ. Sau đó các phần đều được ngâm trong acetic acid 0,5M (trong 48 giờ) để chiết collagen và kết tủa collagen bằng NaCl. Hiệu suất thu hồi và nhiệt độ biến tính collagen từ da, vảy và xương lần lượt là 47,5 %; 6,8 %; 10,3 % và 16,7°C; 17,7°C; 17,5°C [36].

Nhóm tác giả Chun Yung Huang – Đài Loan (2016) đã nghiên cứu sử dụng

phương pháp đun – thủy phân – chiết (EHE) để tách collagen từ vảy cá rô phi. Phương pháp EHE được ứng dụng nhiều trong công nghiệp thực phẩm với nhiều ưu điểm như dễ vận hành, sản xuất liên tục, năng suất cao và ít chất thải. Quá trình đun được sử dụng để làm đứt các liên kết giữa collagen và hydroxyapatite trong vảy cá và giúp cho sự trích ly collagen từ vảy cá bằng cách tách với nước được dễ dàng hơn. Hơn nữa, quá trình đun cũng giúp làm giảm bớt mùi khó chịu của vảy cá để thu được collagen có mùi dễ chịu hơn. Collagen thu được là collagen loại I, có độ tinh sạch cao. Hiệu suất của phương pháp EHE cao hơn 2-3 lần so với phương pháp chiết/ép. Tất cả các chiết xuất thu được, đặc biệt là collagen loại I có các tính chất hóa lý tốt và là ứng viên tiềm năng trong sản xuất các sản phẩm thương mại [37].

P. K. Bhagwat và cộng sự đã nghiên cứu đặc trưng của collagen được trích ly từ vảy cá chép theo 2 bước [23]. Đầu tiên, vảy cá sau khi sơ chế được tách khoáng bằng hỗn hợp dung dịch chứa NaCl 1M, Tris HCl 0,05M, EDTA 20 mM trong 48 giờ. Sau đó, ngâm vảy cá trong dung dịch EDTA 0,5M trong 48 giờ và được rửa lại với nước sạch, thu được vảy cá đã tách khoáng. Vảy cá sau khi tách khoáng được ngâm trong dung dịch CH₃COOH 0,5M trong 48 giờ, sau đó lọc, loại bỏ phần vảy cá. Thêm NaCl (tối nồng độ 0,9M) vào dịch lọc và khuấy liên tục trong 24 giờ. Sau đó, ly tâm hỗn hợp trong 20 phút ở tốc độ 8000 vòng/phút thu được kết tủa. Quá trình trên được lặp lại hai lần để thu được collagen có độ tinh khiết cao hơn. Collagen sau đó được thẩm tích trong 24 giờ trước khi tiến hành đông khô.

Năm 2022, Rasmi Zakiah Oktarlina và cộng sự đã nghiên cứu quy trình trích ly micro-collagen từ vảy cá chép (*Cyprinus carpio*). Kết quả thu được cho thấy hiệu suất trích ly collagen từ vảy cá chép là 8,62%, collagen thu được có màu trắng vàng, cấu trúc dạng sợi với các liên kết amide A, B, I, II và III. Kích thước của micro-collagen trong khoảng 668 – 1581nm với kích thước chủ yếu là 1146 nm [38].

Cũng trong năm 2022, Robert Gál và cộng sự đã nghiên cứu quá trình tách collagen từ xương của cá chép sau đó chế tạo gelatin. Thí nghiệm nghiên cứu hai yếu tố của quy trình là nồng độ HCl (tương ứng 0,5 ; 1,0 và 2,0 % khối lượng nguyên liệu) trong quá trình khử khoáng của nguyên liệu ban đầu và hàm lượng enzyme (tương ứng 0,0 ; 0,1 và 0,2 % khối lượng nguyên liệu) trong quá trình thu

collagen. Tùy thuộc vào các điều kiện, gelatin thu được bằng cách chiết xuất nhiều giai đoạn từ nguyên liệu ban đầu với tổng hiệu suất là 18,7–55,7%. Gelatin thu được có độ nhớt trung bình thấp (1,1– 4,9 mPa.s) và thích hợp cho một số ứng dụng trong thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm [39].

1.1.4.2. Ở Việt Nam

Trên thế giới, việc trích ly collagen từ da cá đã được nghiên cứu từ năm 1990, nhưng ở Việt Nam, đến nay chưa có công trình nghiên cứu trích ly collagen được đưa vào ứng dụng. Các nghiên cứu gần đây mới chỉ dừng lại ở quy mô phòng thí nghiệm như: nghiên cứu tách chiết gelatin từ da cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) của các tác giả Nguyễn Đỗ Quỳnh, Nguyễn Lê Anh Đào, Trường Đại học Cần Thơ [40]. Kết quả thu được cho thấy da cá được khử 19%N phi protein khi được ngâm trong dung dịch NaOH 0,1M với thời gian 30 phút và khử 47,5% khoáng khi xử lý bằng dung dịch CH₃COOH 0,07M trong 3 giờ. Sau đó, gelatin được trích ly ở nhiệt độ 80 °C/30 phút. Hiệu suất đạt 5,57% và độ nhớt dung dịch sản tốt nhất là 2,04 mPas. Gellatin được sấy khô ở 37°C trong 24 giờ. Độ bền gel của gelatin thu được (157,40 g) cao gấp 1,5 lần so với độ bền gel của gelatin từ da cá Trung Quốc (107,2 g). Độ nhớt gelatin từ da cá tra (3,34 cP) cao hơn độ nhớt của gelatin từ Trung Quốc (1,88 cP).

Trần Thị Huyền và cộng sự, bằng phương pháp hóa học đã tách chiết collagen từ da cá tra. Để tăng hiệu quả cho quá trình trích ly collagen, da cá tra được ngâm trong dung dịch NaOH 0,2M (tỷ lệ khối lượng/thể tích = 1/10) trong 20 giờ, thay dung dịch xử lý 2 giờ một lần. Sau đó, xử lý bằng dung dịch acid citric 0,003M (tỷ lệ khối lượng/thể tích = 1/8) trong 30 phút. Tiếp tục ngâm trong dung dịch acetic acid 0,5M (tỷ lệ khối lượng/thể tích = 1/10) trong 34 giờ để trích ly collagen. Dịch chiết được kết tủa bằng dung dịch NaCl 2,5M thu được collagen. Sử dụng dung dịch Na₂HPO₄ 0,02M để làm sạch collagen. Hiệu suất đạt 76,9% (tính theo % khối lượng khô), hút nước của collagen tăng 415%, collagen có nhiệt độ biến tính 39°C. Trong collagen có 4 loại protein với khối lượng phân tử đạt :105 kDa, 156 kDa, 217 kDa và 185 kDa [41].

Võ Quốc Văn và Hà Thanh Toàn (2008) đã sử dụng phương pháp hoá học để

chiết tách gelatin từ da cá Tra. Quá trình chiết tách được thực hiện ở 50°C trong 3 giờ trong dung dịch acetic acid 0,05M. Gelatin thu được có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 95-138 kDa, chứa 14 loại amino acid, trong đó proline chiếm tỷ lệ cao nhất (13,73%) [42].

Tác giả Trần Thanh Nhân đã sử dụng enzyme alcalase với nồng độ 0,05 % để chiết tách gelatin từ da cá Basa trong 25 phút ở 43°C với pH môi trường bằng 8 [43].

Năm 2021, Trương Thị Mộng Thu và cộng sự đã nghiên cứu điều kiện tiền xử lý và chiết tách collagen từ da cá lóc (*Channa striata*) bằng pepsin. Kết quả thu được cho thấy, da cá lóc được xử lý loại lipid bằng cách ngâm trong dung dịch butyl alcohol 10% trong 72 giờ. Sau đó, chiết tách collagen được thực hiện với pepsin 0,45% trong 24 giờ. Collagen thu được là collagen loại I, có 20 loại acid amin, hòa tan tốt trong khoảng pH 1 – 4 và dung dịch NaCl từ 0,2 – 0,6M [44].

1.1.5. Ứng dụng của collagen

1.1.5.1. Trong công nghệ thực phẩm

Trong công nghiệp thực phẩm, collagen được dùng để làm màng bọc kẹo, vỏ bao xúc xích, thực phẩm chức năng... Collagen được sử dụng làm bền hệ nhũ tương của xúc xích và giảm bông sẽ làm tăng khả năng giữ ẩm. Do đó, làm giảm được hao hụt khối lượng trong suốt quá trình chế biến. Nhờ vào cấu trúc có thứ bậc của collagen đã tạo cho lớp vỏ độ bền và độ ổn định trong suốt quá trình chế biến, tuy nhiên vẫn giữ được độ mềm cần thiết cho sản phẩm hoàn thiện. Vỏ bao bằng collagen có nhiều ưu điểm hơn so với màng bao bằng ruột động vật như: dễ vệ sinh hơn, dễ dàng bảo quản, chất lượng ổn định, dễ dàng tạo màu sắc... Polyphenol và tanin trong rượu bị kết tủa cùng collagen nên được sử dụng trong ngành công nghiệp đồ uống như rượu vang giúp loại bỏ các thành phần độc hại [45].

1.1.5.2. Trong y dược

Trong y - dược, do khả năng phân hủy, tạo màng và tạo gel, collagen được sử dụng rộng rãi. Collagen còn được sử dụng nhiều y dược do không gây dị ứng và được hấp thụ triệt để trong cơ thể; ngoài ra tính tương thích sinh học cũng như khả năng cầm máu của collagen nên nó có thể được chế tạo thành những dạng bào chế khác nhau. Dựa vào các tính chất trên của collagen có thể được ứng dụng trong các

lĩnh vực sau: sản xuất thuốc, sản xuất vật liệu cầm máu và làm lành vết thương, máu nhân tạo, sản xuất môi trường nuôi cấy tế bào và mô.

Có nhiều polyme tự nhiên và nhân tạo được ứng dụng như là các loại vật liệu sinh học, nhưng các tính chất của collagen khác với các tính chất của polyme tổng hợp chủ yếu ở cách thức nó tương tác với cơ thể. Collagen có tính chất hoạt động bề mặt, có khả năng phân huỷ tốt, có tính kháng nguyên yếu và có khả năng tương thích sinh học cao hơn so với các polyme khác như albumin và gelatin [46, 47]. Những ứng dụng chính của collagen trong lĩnh vực y dược làm hệ thống vận chuyển thuốc bao gồm:

+ Màng mỏng collagen: màng collagen có tác dụng làm màng vận chuyển thuốc, các thành phần thuốc được đưa vào các màng nhờ liên kết hydro và liên kết cộng hoá trị. Các màng collagen được dùng trong điều trị nhiễm trùng mô, nhiễm trùng giác mạc...

+ Lưới collagen sử dụng trong nhãn khoa: lưới collagen có tác dụng bảo vệ biểu mô giác mạc khỏi hoạt động chớp mắt của mí mắt, đồng thời nó thúc đẩy quá trình chữa lành biểu mô sau khi cấy ghép giác mạc. Dược phẩm được vận chuyển phụ thuộc vào khả năng nạp và giải phóng dược phẩm của lưới collagen. Lưới collagen khi được đưa vào trong mắt sẽ tạo ra một lớp dung dịch collagen có khả năng tương thích sinh học và nó có tác dụng bôi trơn bề mặt trong của mắt, làm giảm sự cọ xát của mí mắt với giác mạc, và thúc đẩy quá trình lành biểu mô.

+ Băng, gạc collagen: Băng gạc collagen có nhiều ưu điểm như: (1) Có khả năng thấm hút một lượng lớn dịch tiết của mô, bám dính tốt vào vết thương ướt do đó bảo vệ vết thương khỏi sự lây nhiễm vi sinh vật. (2) Gạc collagen có khả năng kết hợp với các thành phần thúc đẩy phát triển tế bào và kết hợp với các hợp chất kháng khuẩn, làm cho quá trình chữa lành vết thương diễn ra nhanh chóng hơn. (3) Hơn nữa để đạt được hiệu quả phục hồi nhanh hơn, gạc collagen được kết hợp với một số thành phần khác như: elastin, fibronectin và glycosaminoglycan...

+ Trong kỹ thuật cấy ghép da, collagen được sử dụng là chất vận chuyển các tế bào da được nuôi cấy hoặc là chất vận chuyển các thành phần thuốc cho quá trình

thay thế da và điều trị vết bỏng. Trong kỹ thuật nuôi cấy da thay thế, màng collagen có tác dụng thúc đẩy sự phát triển của biểu mô.

1.1.5.3. Trong mỹ phẩm

Trong cấu trúc của da có đến 70% thành phần là collagen, được phân bố nhiều ở lớp hạ bì. Collagen đóng vai trò trong việc tạo hệ thống nâng đỡ, tăng cường các đặc tính cơ học của da như độ đàn hồi, sức căng, độ mịn của da và độ ẩm của da... Khi số lượng, chất lượng và hàm lượng collagen bị suy giảm dẫn đến giảm độ đàn hồi, độ căng mịn của da và khả năng giữ ẩm của da... Ngoài 30 tuổi, tốc độ tổng hợp collagen giảm và tăng quá trình lão hóa, phân hủy của collagen. Hàng năm, trung bình lượng collagen trong cơ thể bị tổn hao khoảng 1,5 %. Hàm lượng collagen mất đi làm thay đổi các đường nét trên khuôn mặt, làn da bị chảy nhão, trũng xuống và xuất hiện các nếp nhăn. Vì vậy, bổ sung collagen thường xuyên giúp cải thiện cấu trúc của da, phục hồi tế bào tổn thương, tăng khả năng giữ ẩm và kích thích tái tạo làn da. Do đó, collagen là thành phần chính của các sản phẩm làm đẹp như: kem dưỡng, mặt nạ collagen, sữa tắm... Collagen được sử dụng làm thuốc tiêm căng da, và được FDA (Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ) chứng nhận và cho phép tiêm vào các nếp nhăn, vết sẹo trong điều trị thẩm mỹ. Thuốc tiêm chứa collagen được tiêm vào lớp hạ bì giúp điều chỉnh các nếp gấp, nếp nhăn giúp khôi phục lại vẻ bề ngoài mềm mại, căng mịn và trẻ hóa làn da. Thuốc tiêm collagen có tác dụng trong 1 – 2 năm do collagen cũng bị cơ thể hấp thu [56].

1.2. Tổng quan về carrageenan

1.2.1. Cấu tạo và cấu trúc phân tử carrageenan

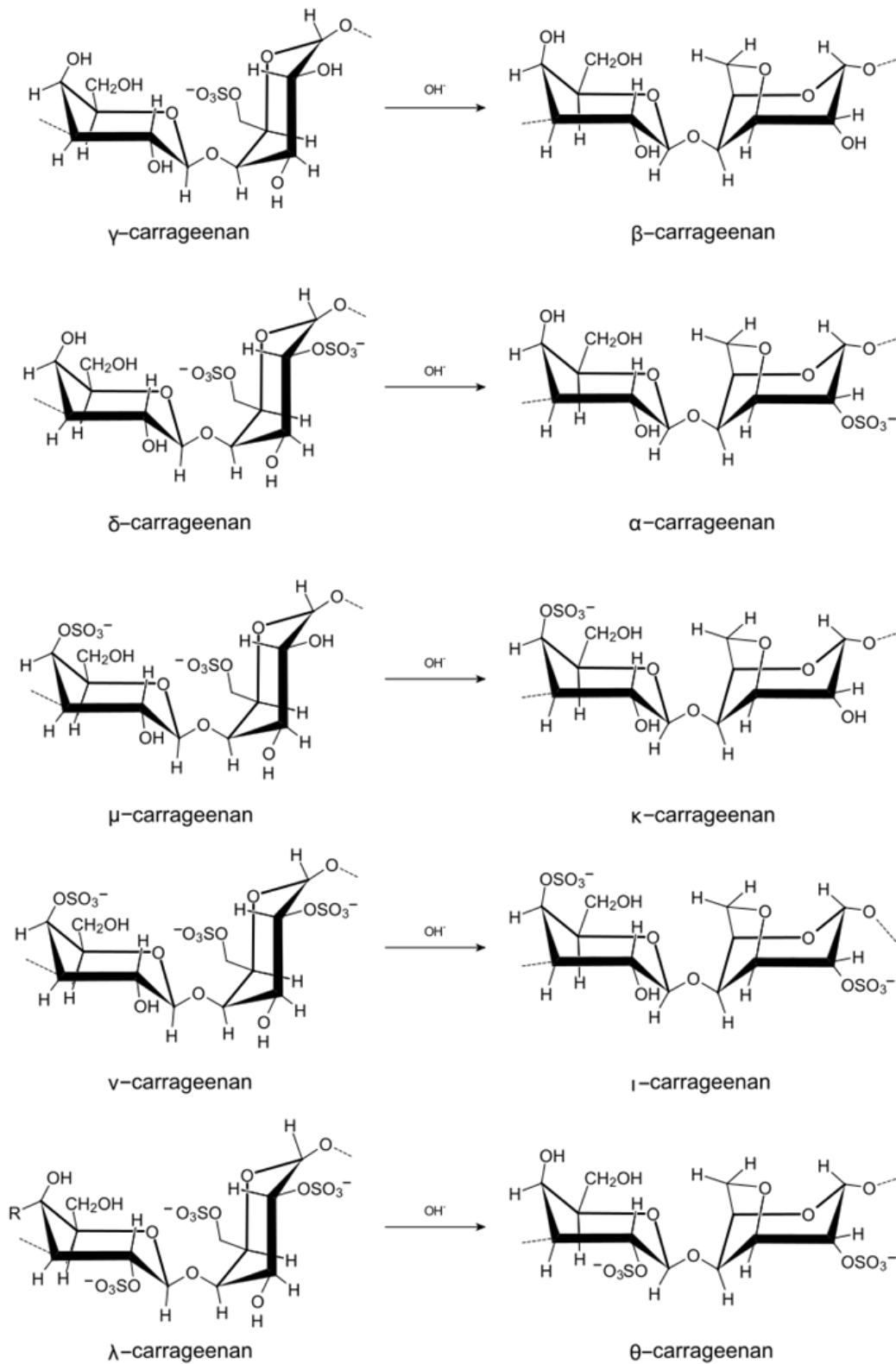
1.2.1.1. Thành phần, cấu tạo và cấu trúc phân tử carrageenan

Carrageenan (Car) sớm được sử dụng từ cách đây 600 năm, được chiết tách từ rêu Irish moss (Loài rong đỏ *Chondrus crispus*) tại một ngôi làng trên bờ biển phía Nam Ireland mang tên Carraghen. Vào khoảng những năm 1930, Car được dùng trong công nghiệp hồ sệt và bia. Cũng trong thời kỳ này những nghiên cứu về cấu trúc hóa học của Car được đẩy mạnh. Hiện nay, sản xuất Car với quy mô công

nghiệp được mở rộng, mà nguồn rong đỏ thuộc ngành *Rhodophyta* sử dụng phổ biến hơn. Những loài này gọi chung là Carrageenophyt. Từ nhiều công trình nghiên cứu, đã có hàng chục loài rong biển được khai thác tự nhiên hay nuôi trồng để sản xuất Car.

Car là một polysaccarid của galactose - galactan. Được cấu tạo từ các gốc *D*-galactozơ liên kết với 3,6-anhydro *D*-galactozơ bằng liên kết α -D (1-3) và β -D (1-4) galactorid luân phiên nhau. Trên mạch polysaccarid còn có các nhóm sulfat được gắn vào Car ở các vị trí với số lượng khác nhau. Vì vậy, Car không chỉ là một polysaccarid đơn lẻ mà có cấu trúc là các galactan sulfate. Mỗi galactan sulfate có cấu trúc riêng và được ký hiệu riêng. Như: κ -, λ -, ν -, ι -Car (Hình 1.7) [48].

Car trong nội bào và thành tế bào rong biển, Car là một polysaccharit cao phân tử với hàm lượng este-sulfate từ 15% - 40%. Với các đơn vị mắt xích cơ bản là: galactose liên kết 3,6-anhydrogalactose (3,6-AG) bằng các liên kết β -(1,4) glycosid và α -(1,3), các đơn vị này đều có thể được hoặc không được sulfat hóa. Số lượng và vị trí nhóm este sulfat cũng như hàm lượng 3,6-AG là nguyên nhân gây nên sự khác nhau giữa các κ -, λ -, ν -, ι -Car. κ -Car có lượng este sulfat từ 25% đến 30% và khoảng 28% đến 35% lượng 3,6-AG. ι -Car có lượng este sulfat từ 28% đến 30% và lượng 3,6-AG từ 25% đến 30%. λ -Car có lượng este sulfat trong khoảng 32% đến 39% và không có 3,6-AG [48]. Hàm lượng este sulfat lớn làm nhiệt độ hòa tan thấp và độ bền gel thấp [49].

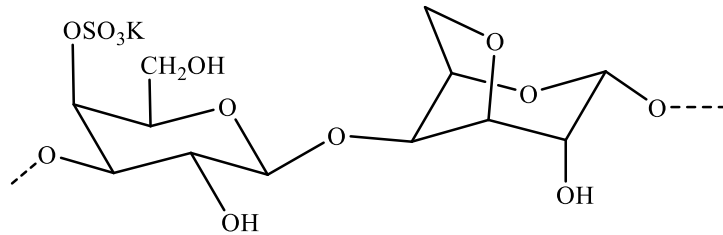


Hình 1.7. Cấu trúc phân tử và sự chuyển hóa trong môi trường kiềm của các loại carrageenan khác nhau

1.2.1.2. Phân loại carrageenan

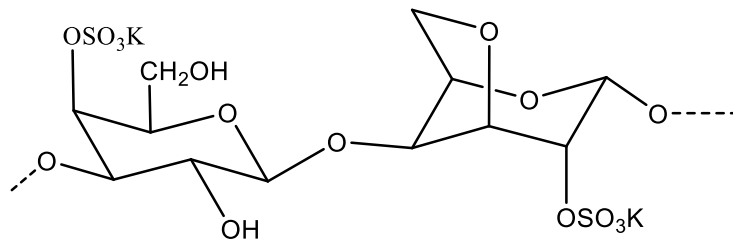
Dựa theo cấu trúc carrageenan được chia thành các loại [48]:

κ -Car: Là một loại polymer mạch ngắn có sự xen kẽ giữa D-galactose-4-sulphate và 3,6-AG. Cấu trúc phân tử κ -carrageenan là một vòng chuỗi xoắn kép bậc 3 (Hình 1.8).



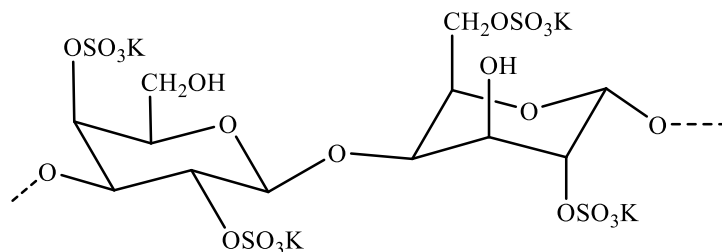
Hình 1.8. Cấu trúc của κ -Car

ι -Car: Giống như κ -Car nhưng gốc 3,6-AG lại ở vị trí cacbon số 2. ι -Car có cấu trúc vòng xoắn kép bậc 2. Gel ι -Car có tính đàn hồi tốt (Hình 1.9).



Hình 1.9. Cấu trúc của ι -carrageenan Car

λ -Car: Có các đơn vị monome được xen kẽ nhau: đơn vị D-galactose-2-sulphat và D-galactose-2,6-disulphat trong phân tử của (Hình 1.10).



Hình 1.10. Cấu trúc của λ -carrageenan Car

1.2.1.3. Tính chất của carrageenan

Các loại carrageenan khác nhau có các tính chất khác nhau như: độ tan; tính tạo gel và tạo độ nhớt của dung dịch; khả năng liên kết với protein cũng như liên kết với các polysaccharid khác. Do vậy, ở các trạng thái khác nhau, carrageenan có những tính chất khác nhau đặc trưng cho từng dạng sản phẩm.

** Độ tan*

Car tan trong nước nóng (40,0 – 70,0°C) khi nhiệt độ cao hơn nhiệt độ chảy của gel. Độ tan của Car phụ thuộc vào số lượng, số loại các ion trong cấu trúc và nồng độ dung dịch Car.

Trong nước lạnh, chỉ có λ -Car và muối sodium của κ - và ι -Car là bị hòa tan. Muối potassium và calci của κ - và ι -Car không tan, khả năng trương nở của car phụ thuộc vào theo nồng độ và kiểu cation có mặt trong nước. Trong nước lạnh khi có mặt ion K^+ và Ca^{2+} , κ -Car trương nở kém.

Tất cả các kiểu Car hòa tan trong sữa nóng ở 80 °C. Tuy nhiên, sự hòa tan của một số kiểu Car bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của Ca^{2+} . Các dung dịch chứa Car này sau khi làm lạnh đều hình thành gel. Độ chắc của gel và tính đồng nhất của chúng phụ thuộc vào nồng độ dung dịch và độ nhạy của Car với Ca^{2+} [49]

ι - và κ -Car không hòa tan trong sữa lạnh ở 20 °C, tuy nhiên chúng được dùng như chất tạo gel và làm đặc dung dịch sữa lạnh khi có mặt của gốc photphat (tetrasodium pyrophotphat) [49]. λ -Car được sử dụng như chất làm đặc đối với sữa lạnh và khả năng này phụ thuộc vào sự xuất hiện của ion K^+ và Ca^{2+} .

ι - và λ -Car hòa tan trong dung dịch muối NaCl 10% có sự gia nhiệt. κ -Car không hòa tan trong dung dịch này [50].

** Độ nhớt*

Độ nhớt của dung dịch Car xác định được khi dung dịch Car không tạo gel. Khi dung dịch Car thay đổi nhiệt độ từ cao xuống thấp sẽ làm tăng độ nhớt đến khi xuất hiện gel. Độ nhớt tăng khi bắt đầu hình thành gel. Vì vậy, quá trình đo độ nhớt của dung dịch Car được tiến hành ở nhiệt độ cao (75,0°C) để tránh sự gel hóa. Với nồng độ Car là 1,5%, độ nhớt của dung dịch khoảng 5 tới 800 cP ở 75,0°C.

Độ nhớt dung dịch Car phụ thuộc vào nhiệt độ, nồng độ và sự xuất hiện của ion khác trong dung dịch, khối lượng và loại Car [56]. Độ nhớt tăng khi nồng độ dung dịch Car tăng hoặc khối lượng phân tử Car lớn. Độ nhớt dung dịch Car giảm khi tăng nhiệt độ và ngược lại [50].

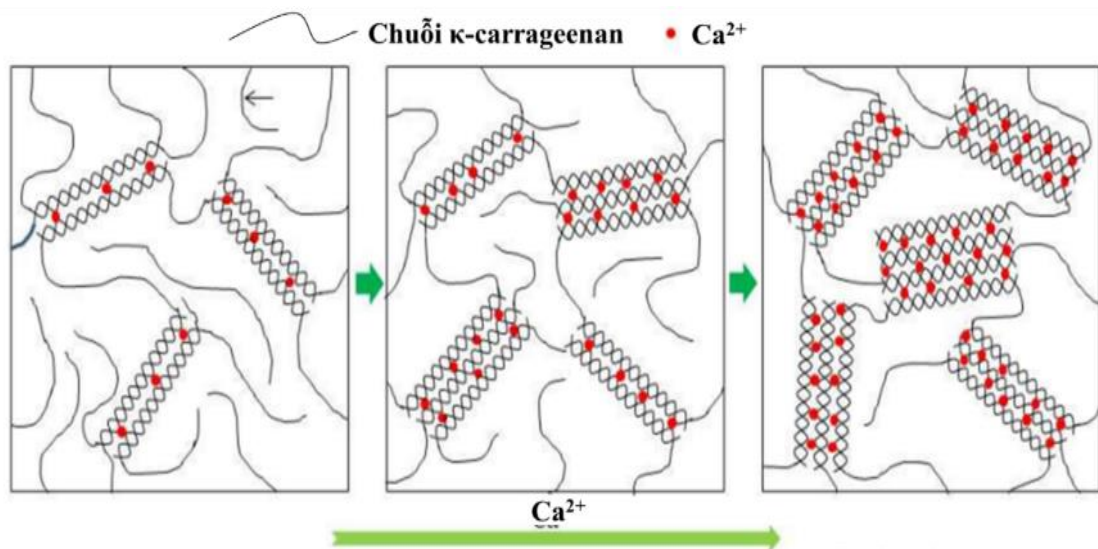
Dung dịch Car có độ nhớt thấp nên dễ dàng xử lý [51]. Do gel nước κ -Car không ở dạng thixotrovin phổ. Khi κ -Car được sử dụng trong sữa với nồng độ nhỏ, chúng có đặc tính tương tự ι -Car trong nước. Vì vậy, gel yếu được tạo bởi hỗn hợp

protein sữa và κ -Car dễ bị phá vỡ khi có lực tác động, khi đó chế độ chảy của gel trở thành giả dẻo. Khi lực tác động giảm, gel tái hình thành và chế độ chảy lại trở về bản chất tự nhiên là thixotropic.

* *Tạo gel*

Khi làm lạnh, dung dịch κ -, ι -Car tạo thành gel. Hiện tượng này phụ thuộc vào cấu trúc xoắn đôi của Car. Ở nhiệt độ lớn hơn nhiệt độ chảy lỏng của gel, Car tồn tại ở trạng thái cuộn ngẫu nhiên trong dung dịch. Khi hạ nhiệt độ dung dịch, hình thành cấu trúc không gian 3 chiều, hình thành các điểm xoắn đôi tại điểm giao nhau của chuỗi polyme. Khi hạ nhiệt độ xuống dưới nhiệt độ nóng chảy sẽ tạo điều kiện cho các mắt xích của Car đính kết để tạo gel với cấu trúc 3 chiều. Sự xuất hiện của liên kết trong cấu trúc cũng như kiểu, số lượng và vị trí nhóm este sulfat sẽ ảnh hưởng đến tính tạo gel của Car. Cơ chế gel hóa cơ bản dựa trên dung dịch κ - và ι -Car.

κ -Car tạo gel rắn với K^+ trong khi ι - và λ - ít không ảnh hưởng bởi K^+ hơn. ι -Car tương tác với Ca^{2+} để hình thành gel mềm nhưng muối calci không ảnh hưởng tới đặc tính của λ -Car (Hình 1.11) [52].



Hình 1.11. Gel carrageenan với Ca^{2+}

Các cation tăng cường sự gel hóa của Car, giúp ổn định cấu trúc xoắn của Car thông qua việc chặn/khóa nhóm sulfat, ngoài ra các cation có thể tham gia liên kết phối trí giữa các phân tử [53].

Ở $25^\circ C$, gel κ -Car thể hiện đặc tính lưu biến kiểu rắn. Độ cứng của gel κ -Car phụ thuộc vào nồng độ KCl, khi tăng nồng độ KCl làm tăng độ cứng của gel κ -Car.

κ -Car tinh khiết hình thành gel yếu ở nồng độ từ 0,7 – 1,4%. Khi có mặt đồng thời 2 ion K^+ và Ca^{2+} trong dung dịch κ -Car sẽ hình thành gel đặc [54].

Độ đàn hồi của gel Car là do số lượng nhóm sulfat thá [55], do nhóm sulfat không tạo cấu trúc lập thể, do vậy quá trình chuyển hóa cấu trúc của Car bị dừng lại và quá trình gel hóa bị gián đoạn vì monome không được gel hóa [56].

Gel ι -Car nhạy với Ca^{2+} và gel hình thành mềm và đàn hồi. ι -Car không có khả năng đông đặc. Độ chắc gel tỷ lệ thuận với nồng độ Car và ion trong dung dịch. Gel được hình thành dạng gel nhiệt khôi phục và có ít sự biến đổi khichúng tham gia quá trình thay đổi nhiệt độ khi ở môi trường trung tính. Nhiệt độ gel hóa và nóng chảy của Car phụ thuộc vào nồng độ cation. Khi tăng nồng độ muối K^+ hoặc Ca^{2+} trong dung dịch, nhiệt độ gel hóa của dung dịch carrageenan tăng. Độ chắc gel có thể được đánh giá thông qua mô đun đàn hồi. Mô đun đàn hồi tăng khi tăng nồng độ Car [57, 58].

1.2.2. Tình hình nghiên cứu sản xuất carrageenan

1.2.2.1. Trên thế giới

Để thu được Car, rong biển được chiết xuất bằng cách sử dụng nước nóng hoặc dung dịch kiềm (KOH hoặc $Ca(OH)_2$). Rong biển được rửa sạch, loại bỏ tạp chất và sấy khô, ngâm trong dung dịch kiềm (3–10%) đun ở nhiệt độ cao (70–100 °C) trong 4 giờ [59]. Dung dịch kiềm phá vỡ màng tế bào của rong biển giúp giải phóng các chất trong tế bào rong biển. Hơn nữa, các anion OH^- giúp chuyển hóa các tiền chất của carrageenan. Sau khi chiết kiềm, hàm lượng sulfat sẽ giảm [60]. Vì lý do này việc chiết xuất Car bằng kiềm gọi là khử lưu huỳnh.

Chiết xuất Car cũng có thể thực hiện bằng nước nóng. So với chiết xuất kiềm, phương pháp nước nóng cho hiệu suất cao hơn [61]. Nhược điểm, độ bền gel được tạo ra bởi nhiệt độ nóng nước thấp hơn so với sử dụng dung dịch kiềm. Độ bền gel thấp hơn do hàm lượng sunfat cao hơn và hàm lượng 3,6-AG thấp hơn so với trong chiết kiềm. Vì lý do này, chiết kiềm thường được sử dụng trong quy mô công nghiệp Car.

Andi Hasiah và các cộng sự đã chiết xuất Car từ *Eucheuma spinosum* bằng cách sử dụng nhiệt điện trở. Kết quả cho thấy hiệu suất chiết thay đổi từ 29,6-62,4%

với độ nhớt và độ bền gel thay đổi lần lượt từ 259-290 cP và 42,54-70,41 g/cm². Hiệu suất chiết xuất tối ưu (61,59%), độ bền gel (53,48 g/cm²) và độ nhớt (284,51 cP) đạt được ở nhiệt độ chiết xuất 95 °C, thời gian chiết 240 phút, nồng độ KOH 0,4M, tỷ lệ dung dịch so với rong biển là 45/1 [61].

Trước đó, Webber và cộng sự cũng nghiên cứu để tối ưu hóa quá trình chiết tách Car từ rong bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Nghiên cứu xác định được điều kiện chiết xuất tối ưu là 74°C trong 4 giờ, hiệu suất chiết tách carrageenan là 31,17%, độ bền gel 158,27 g/cm² và độ nhớt 29,5 cP [62].

Car chiết xuất từ *Kappaphycus alvarezii* đã được Anisuzzaman và cộng sự nghiên cứu. Rong biển được xử lý kiềm và sử dụng kỹ thuật phun sấy để thu được bột Car. Quy trình chiết tối ưu cho kỹ thuật sấy phun cho kết quả ở nồng độ KOH 6,70% và thời gian chiết 74,70 phút. Ở điều kiện tối ưu, độ nhớt của gel là 111,80 cP và kích thước hạt của bột là 86,88 µm. Độ bền của gel được tối ưu hóa ở mức 85,60 g/cm² [63].

Trong số các nghiên cứu về phương pháp chiết xuất Car thì phương pháp xử lý bằng enzyme cho nhiều hứa hẹn hơn và thân thiện với môi trường [64]. Mặc dù công nghệ này có tiềm năng được sử dụng ở quy mô công nghiệp nhưng có rất ít thay đổi trong việc sử dụng enzyme để sản xuất Car từ rong biển. Enzyme cellulase là một trong những enzyme được sử dụng rộng rãi nhất để chiết xuất carrageenan. Kết quả cho thấy hiệu suất thu Car khi sử dụng cellulase là 45%, trong khi đó phương pháp đun sôi đạt hiệu suất 37,5% [65]. Enzyme xenluloze được thêm vào hỗn hợp (bao gồm rong biển xay và nước cất), đun sôi cách thủy có máy lắc ở 50°C trong 1 giờ. Các huyền phù được ly tâm tách lấy các chất nổi trên bề mặt và cho vào propan-2-ol, polysacarit kết tủa thành sợi dài. Cách sử dụng cellulase đạt hiệu quả cao vì cellulose là thành phần chính của thành tế bào rong biển. Endo-cellulase, exo-cellulase và β -glucosidase là ba loại enzyme cellulose chính và quá trình thủy phân hoàn toàn các vi sợi cellulose trong thành tế bào có thể được thực hiện bằng cách kết hợp ba loại enzyme này [66].

Gần đây, nhằm giảm thiểu việc sử dụng hóa chất các nghiên cứu về phương pháp sử dụng ít dung môi hơn, tốn ít năng lượng và thời gian chiết xuất

nhanh hơn so với các phương pháp truyền thống đã được xem xét nhiều hơn [67, 68]. Phương pháp chiết xuất Car sử dụng vi sóng đã được nghiên cứu. Quá trình chiết xuất Car từ *S. skottsbergii* có sử dụng vi sóng đạt hiệu suất lên tới 63–64% [69]. Rong biển *E. spinosum* và *E. cottonii* được xử lý kiềm, sau đó chiết xuất có sử dụng vi sóng ở công suất 800W và tần số 2450 MHz thu được ι -Car và κ -Car [70]. Quá trình chiết xuất Car từ *Hypnea musciformis* có sử dụng lò vi sóng cho thấy ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết xuất Car, nhiệt độ tối đa sử dụng trong phương pháp này là 105 °C [71].

1.2.2.2. Ở Việt Nam

Ở Việt Nam, các nhà khoa học cũng bước đầu nghiên cứu tách chiết Car từ các loại rong biển trong nước. Đào Trọng Hiếu đã tối ưu hóa quy trình công nghệ tách chiết Car từ Rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*). Kết quả cho thấy, với giai đoạn xử lý kiềm: sử dụng NaOH 6 %, ở nhiệt độ 30 °C, trong 40 phút; sang giai đoạn đun nấu chiết: tỷ lệ nước/rong = 52/1, đun ở 102 °C, trong 65 phút. Bổ sung KCl vào dịch lọc với nồng độ 0,06%. Kết thúc quá trình thu được Car có độ tinh khiết cao, màu trắng sáng [72].

Nguyễn Thị Thu Thùy và cộng sự nghiên cứu chiết tách Car từ giống sụn Ninh Thuận và đưa ra được điều kiện tối ưu: Giai đoạn xử lý kiềm: Ngâm rong trong dung dịch KOH 6,5%, thời gian ngâm 80 phút; giai đoạn nấu chiết: Đun ở 95°C trong 60 phút, tỉ lệ nước/rong = 10/1 (m/m). Hiệu suất chiết tách đạt 48,31%, chất lượng sản phẩm – Car: Độ nhớt dung dịch Car 1% ở 70°C là 1110 cPs [73].

Trần Thị Luyện tiến hành nghiên cứu quy trình sản xuất Car bán tinh chế từ rong sụn *Kappaphycus alvarezii* Cam Ranh – Khánh Hòa. Giai đoạn xử lý kiềm bằng KOH 15%, xử lý tại 90 °C, trong 120 giờ. Ngâm rong trong H₂O₂ 10% trong 15 phút để tẩy màu, tỷ lệ dung dịch/rong = 3/1. Kết thúc quá trình thu được bột Car bán tinh chế màu trắng ngà có độ tan 79%, hiệu suất quá trình 70% [74].

Lê Thị Thúy Hằng và cộng sự sử dụng Viscozyme L trong sản xuất Car từ Rong sụn (*Kappaphycus Alvarezii* (Doty) Doty). Viscozyme L được sử dụng là endo-beta-glucanase có tác dụng thủy phân liên kết (1-4)- hoặc (1-3)- trong β -D-glucan nên có thể dùng để xử lý rong sụn trước khi chiết tách Car thay cho xử dụng

hóa chất để xử lý. Kết quả thu được: tỷ lệ enzyme/rong = 1,45%; nhiệt độ đun 42 °C tại pH 5,1 trong 60 phút thu được Car có màu trắng sáng [75].

1.2.3. Ứng dụng của carrageenan

1.2.3.1. Trong công nghệ thực phẩm

Carrageenan là phụ gia thực phẩm lý tưởng do khả năng tạo gel và nhũ hóa. Car làm chất phụ gia trong thực phẩm có vai trò làm thay đổi kết cấu, giảm chất béo và muối, tăng cường tính ổn định và hương vị bảo quản, hàm lượng chất xơ, hoạt động chống oxy hóa và kháng khuẩn.

Al-Baarri và cộng sự xác định ảnh hưởng của κ - và ι -Car trong một loại bánh sử dụng bột sắn biến tính, đường và sữa dừa. Các bước chế biến bị bộ bánh: trộn bột sắn biến tính, đường nâu, nước cốt dừa và thêm κ - hoặc ι -Car (tối đa 2%); Nào bột nóng ($\pm 80^\circ\text{C}$ trong 5 phút) [76]. Các đặc tính như độ cứng, độ kết dính, độ đàn hồi và độ bám dính của thực phẩm được đánh giá. Các kết quả thu được cho thấy các mẫu bột bánh khi thêm κ -Car có độ cứng, độ kết dính và đàn hồi cao hơn so với ι -Car [77].

Car ở mức 0,25 đến 0,75% đã giúp chả giò heo xay ít chất béo và độ ẩm cao hơn. Tuy nhiên, các đặc tính chức năng của Car trong các sản phẩm thực phẩm phụ thuộc vào loại Car. Các đặc tính này cũng bị ảnh hưởng bởi các điều kiện của quá trình chế biến như nhiệt độ, pH, cường độ ion, cation... ι -Car tạo một loại gel khi đã bị phá vỡ sẽ tái tạo nếu không bị xáo trộn. ι -Car thường được sử dụng trong các món tráng miệng lạnh. Car cũng ổn định trong quá trình đóng và rã đông mà vẫn giữ được kết cấu và tính chất cảm quan của sản phẩm [78, 79].

Tương tự, κ -Car làm tăng hương vị trong công thức có chứa hỗn hợp gia vị, protein thực vật thủy phân và muối [80]. Car ở nồng độ 0,5 đến 0,7% có thể được sử dụng để tăng hàm lượng chất xơ của thực phẩm ít chất xơ và cải thiện kết cấu của chúng [81]. κ -Car và oligosacarit của nó cũng tác dụng chống oxy hóa đáng kể của thực phẩm làm thực phẩm lâu bị ôi thiu [82, 83].

1.2.3.2. Trong y dược

Trong vài năm qua, các nhà nghiên cứu đã nỗ lực rất nhiều để tìm kiếm các loại thuốc chống ung thư hiệu quả từ sinh vật biển [84]. Kết quả nhiều nghiên cứu cho thấy nhiều hợp chất có nguồn gốc từ rong biển có hoạt tính chống ung thư bằng

cách ức chế sự phát triển của tế bào ung thư và gây chết tiêu diệt tế bào ung thư [84]. Cicinskas và cộng sự nghiên cứu tác dụng chống khối u của Car và sản phẩm biến tính của nó đối với các dòng tế bào ung thư thực quản ở người (KYSE30 và FLO1). Kết quả thu được, các sản phẩm thoái hóa với khối lượng phân tử thấp hiệu quả tốt hơn đối với các tế bào FL01 (đặc biệt là λ -Car biến tính). Tuy nhiên, Car có hiệu quả hơn đối với KYSE30 và λ -Car biến tính có tác dụng yếu nhất đối với quá trình chuyển hóa tế bào của nó [85]. Nghiên cứu của Poupard đã xác định rằng sự hình thành mạch có thể cung cấp đủ oxy và chất dinh dưỡng cho các tế bào khối u. Car có tiềm năng lớn trong ứng dụng lâm sàng vì nó có hoạt tính chống tạo mạch tốt hơn so với hợp chất tiêu chuẩn suramin [84]. Yao và các cộng sự phát hiện ra rằng oligosacarit κ -carrageenan có thể ức chế sự tăng sinh, di căn và hình thành ống trong mô hình ECV304 và CAM [86]. Tương tự, Chen và cộng sự đã xác minh rằng λ -carrageenan có thể ức chế hiệu quả sự hình thành mạch trong mô hình CAM và ngăn chặn sự xâm lấn và di căn của các tế bào nội mô tĩnh mạch rốn ở người bằng cách điều chỉnh hoạt tính enzym proteinase của nội bào [87]. Trong quá trình phát triển khối u, heparanase được biểu hiện quá mức trong các tế bào khối u và làm suy giảm các proteoglycan nền ngoại bào thông qua sự phân cắt của heparin sulfat (HS) cũng như giải phóng các phân tử đặc hiệu gắn với HS, cho phép tế bào ung thư di chuyển, xâm lấn và hình thành mạch [88].

Việc giải phóng quá mức các yếu tố gây độc tế bào từ các tế bào vi mô cũng có thể dẫn đến suy giảm tế bào thần kinh hơn nữa. Yao cùng cộng sự chỉ ra rằng oligosacarit κ -Car có chức năng điều hòa miễn dịch bằng cách bảo vệ các tế bào vi mô khỏi bị kích hoạt bởi lipopolysaccharide (LPS) và hoạt động này có liên quan nhiều đến hàm lượng của nhóm sulfat [89]. Ai và cộng sự đã chỉ ra rằng tiền xử lý oligomeric κ -và ι -Car ở 125–500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ có thể làm giảm đáng kể mức độ TNF- α được tiết ra bởi các tế bào BV-2 microglia được xử lý bằng LPS [90]. Do đó, các oligosacarit Car thể hiện tác dụng điều hòa miễn dịch và tác dụng này có liên quan nhiều đến hàm lượng sunfat. Tuy nhiên, tác dụng điều hòa miễn dịch của Car cần được nghiên cứu thêm.

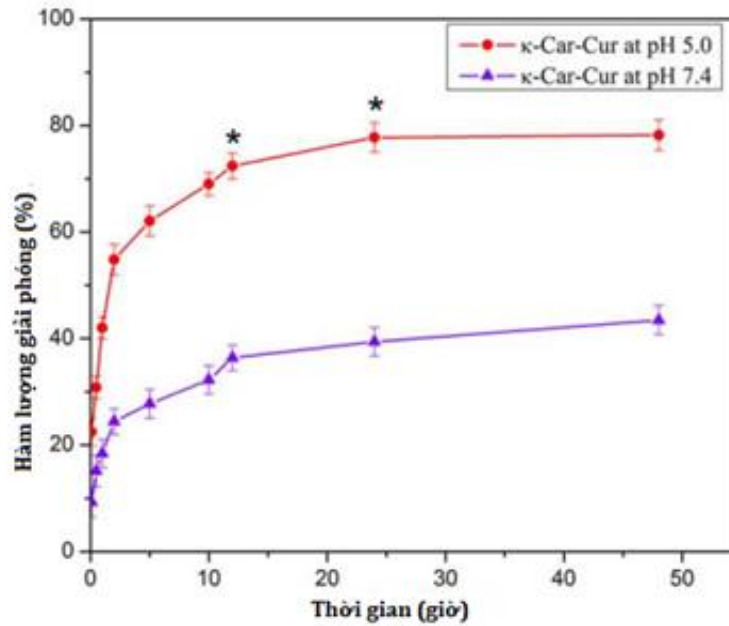
1.3. Tổng quan về polyme thiên nhiên mang dược chất

1.3.1. Carrageenan mang dược chất

Ban đầu, tá dược hầu như chỉ được sử dụng như những thành phần góp phần vào quy trình sản xuất các dạng dược phẩm. Nhờ sự bùng nổ của các nghiên cứu về việc tinh chế và sử dụng các hợp chất có khả năng phân hủy sinh học, tương thích sinh học và không độc hại trong dược phẩm, đã dẫn đến sự biến đổi về nghiên cứu vai trò của polyme sinh học trong bào chế và sản xuất thuốc [91]. Do đó, tầm quan trọng y sinh của Car trong công nghiệp dược càng được khẳng định. Các đặc tính sinh học và hóa học của Car là lý do chúng được sử dụng trong các hệ thống mang thuốc. Cấu trúc hóa học của Car giúp tăng khả năng ứng dụng của nó trong bào chế và sản xuất thuốc: liên kết glycosid của Car bị phân cắt bởi enzyme hydrolase, do vậy tăng khả năng phân hủy sinh học; các nhóm sunfat trong Car giúp tăng cường hoạt động của polyelectrolytes; các nhóm hydroxyl giúp tăng các tương tác cần thiết, tạo các biến đổi hóa học. Car được áp dụng trong các dạng bào chế khác nhau bao gồm: viên nén [92], thuốc đạn [93], hạt nano [94 – 96], hạt chèn hòa tan nhanh [97],...

Khả năng mang và kiểm soát giải phóng thuốc của ι -Car và λ -Car trong bào chế viên nén giải phóng có kiểm soát đã được nghiên cứu. Theophylline, sodium salicylate và chlorpheniramine maleate được đưa vào nền Car với hàm lượng 500 mg. Khi nghiên cứu tác dụng của thuốc theo tỷ lệ thuốc/Car ở tỷ lệ 13,5% và 16,9%, kết quả cho thấy vật liệu Car mang thuốc giải phóng có kiểm soát trong khoảng 8 – 12 giờ, phù hợp với mô hình động học giải phóng bậc 0 [98].

Việc gắn curcumin (Cur) vào κ -Car đã được thực hiện thành công bằng phương pháp bay hơi dung môi, tiếp theo là sấy khô và nghiên cứu ức chế các tế bào ung thư phổi (A549). Các tác giả đã chỉ ra hiệu suất mang Cur của κ -Car khá cao, hạt tổ hợp có tính ổn định cao và Cur giải phóng có kiểm soát. Hàm lượng Cur giải phóng từ hệ κ -Car-Cur trong dung dịch pH 5,0 cao hơn trong dung dịch đệm pH 7,4 (Hình 1.12). Điều này là thuận lợi khi sử dụng hệ κ -Car-Cur điều trị trong môi trường khối u [99].



Hình 1.12. Đồ thị hàm lượng Cur giải phóng từ hệ κ -Car-Cur trong dung dịch pH 5,0 và pH 7,4

Tetracyclines là một trong những nhóm kháng sinh quan trọng nhất và chúng được sản xuất bằng phương pháp lên men thông thường ở quy mô công nghiệp [100] nhờ nuôi cấy vi khuẩn *Streptomyces aureofaciens* trong κ -Car với mục đích tăng hiệu suất sản xuất tetracycline và chlorotetracycline.

Nghiên cứu chất mang mới dựa trên hỗn hợp carboxymethyl cellulose (CMC) và κ -Car để nuôi vi khuẩn đường ruột có ích đã được thực hiện. Tế bào khuẩn sữa *plantarum* ATCC: 13643 (*L. plantarum*) đã được gắn lên hệ tổ hợp CMC/ κ -Car bằng phương pháp ép đùn. κ -Car được sử dụng làm chất phủ giúp tăng hiệu quả của việc cố định các tế bào *L. plantarum* lên CMC. κ -Car và CMC được liên kết với nhau nhờ các ion K^+ và Ca^{2+} . Kết quả khảo sát khả năng tồn tại của các tế bào *L. plantarum* sau khi được cố định lên tổ hợp CMC/ κ -Car trong dịch vị dạ dày và dịch mật cho thấy tổ hợp CMC/ κ -Car có thể bảo vệ các tế bào *L. plantarum* chống lại các điều kiện bất lợi của dịch dạ dày và dịch mật. Sau khi tiếp xúc với dịch vị dạ dày trong 2 giờ, gần như các tế bào *L. plantarum* tự do đã chết hoàn toàn. Tuy nhiên, số lượng tế bào *L. plantarum* gắn trên CMC và CMC/ κ -Car còn sống là 5,20 và 7,30 CFU/g. Kết quả của nghiên cứu này đưa ra một phương pháp phù hợp để cung cấp các vi khuẩn có ích đến ruột [100].

Raman và cộng sự (2015) đã chứng minh các hạt nanocomposit từ tính ι -Car có khả năng ức chế các tế bào ung thư [101].

Năm 2015, Shanmuga và đồng nghiệp cũng chế tạo hạt nano κ -Car từ tính cho nghiên cứu hướng đích [102]. Ngoài ra, cũng có một số nghiên cứu đã kết hợp các hạt vàng và nano từ tính trong các hệ polyme carrageenan từ tính [103 – 105].

R. Bettini và cộng sự nghiên cứu khả năng mang thuốc diltiazem HCl hoặc metoprolol tartrat bởi của λ -Car. Kết quả giải phóng dược chất của các phức hợp cho thấy diltiazem tạo phức với Car ít hòa tan và ổn định hơn so với metoprolol. Phức hợp metoprolol kém ổn định hơn nên dễ bị ăn mòn và hòa tan, trong khi diltiazem tương tác mạnh với Car làm phức hợp trở nên bền vững và kém hòa tan. Các tác giả đề xuất hai phức hợp mang thuốc cũng giải phóng theo hai cách khác nhau: với metoprolol tartrate/Car bị hòa tan theo kiểu cổ điển (thuốc bị rã và hòa tan vào dung dịch) do tương tác yếu giữa metoprolol với Car, các phân tử tương tác mạnh với nước, phức hợp hút nước mạnh và trương nở; với diltiazem HCl tương tác mạnh với Car nên phức hợp bền vững và hòa tan theo kiểu khuếch tán [106].

Một nghiên cứu khác báo cáo cơ chế giải phóng thuốc cation (doxazosin mesylate) từ viên nén trên λ -Car. Các thí nghiệm được thực hiện trong các dung dịch có nồng độ ion khác nhau và bổ sung chất hoạt động bề mặt anion như sodium dodecyl sulfate (SDS). Kết quả cho thấy, sự giải phóng thuốc phụ thuộc tỷ lệ thuốc/polyme và bổ sung SDS ở nồng độ dưới nồng độ mixen tới hạn làm chậm quá trình giải phóng thuốc do phần kỵ nước của SDS đã tương tác với phức hợp thuốc/polyme làm giảm khả năng hòa tan của phức hợp. Trong khi ở nồng độ cao hơn nồng độ mixen tới hạn, SDS lại kéo doxazosin mesylate ra khỏi phức hợp và hình thành các hạt mixen giúp đẩy nhanh quá trình giải phóng thuốc [107].

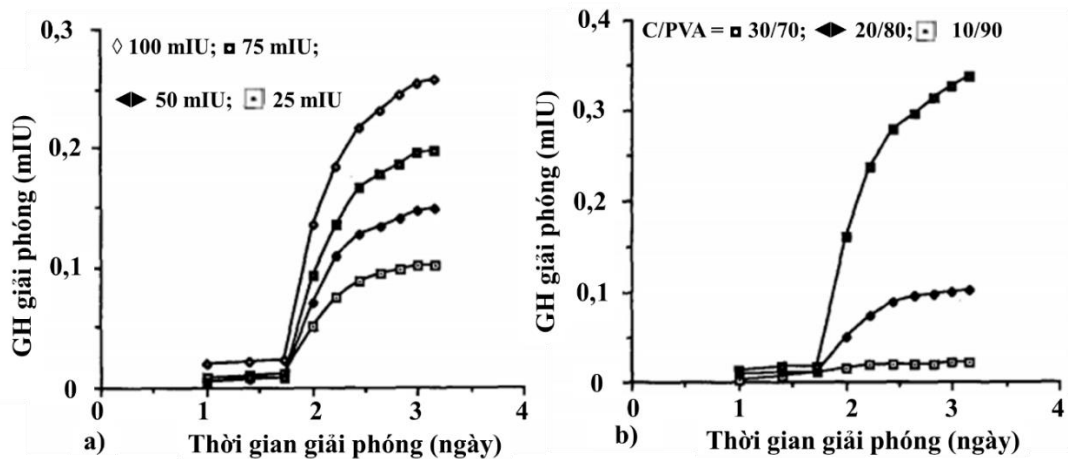
1.3.2. Collagen mang dược chất

Trong những năm gần đây, đã có một số công trình khoa học nghiên cứu về collagen mang một số loại thuốc như: doxycycline, triphala, tobramycin hoặc ciprofloxacin, gentamicin [108]...

Nghiên cứu sự giải phóng nano poly(N-isopropylacrylamit) từ màng tổ hợp

collagen-sulfate mang hạt nano poly(N-isopropylacrylamit) trong mạch máu. Tổ hợp này có tác dụng giảm sự kết dính tế bào và tiểu cầu với bề mặt collagen. Các nghiên cứu *in vitro* cho thấy các hạt nano có liên kết với collagen và có thể mang và giải phóng các peptide chống viêm, với các hạt làm giảm viêm trong các tế bào cơ nội mô 30% và cơ trơn 40%. Khi kết hợp với collagen, các hạt nano poly(N-isopropylacrylamide) tăng sự di chuyển trong nội mô, đồng thời tránh sự hấp thu bởi các tế bào cơ trơn, chúng có thể thúc đẩy tái tạo lớp nội mô bị tổn thương trong khi vẫn gắn với collagen và giải phóng các peptide chống viêm cục bộ vào vùng bị tổn thương. Kết hợp collagen gắn kết các hạt nano poly(N-isopropylacrylamit) có khả năng làm giảm viêm và đồng thời thúc đẩy tái tạo mô trong nội mạc sau khi bong màng mạch [109].

Cascone và cộng sự đã nghiên cứu ảnh hưởng của composite collagen/poly(vinyl alcohol) dạng hydrogel (C/PVA) đến khả năng giải phóng hormon tăng trưởng GH. Các mẫu hydrogel C/PVA mang GH đã được nghiên cứu giải phóng GH trong dịch mô phỏng cơ thể người (SBF). Kết quả thu được cho thấy GH giải phóng chậm trong 3 ngày đầu tiên, sau đó, giải phóng nhanh. Lượng GH ban đầu không ảnh hưởng đến các mô hình giải phóng, tuy nhiên có ảnh hưởng đến tổng lượng GH giải phóng. Điều này chứng tỏ có một mối quan hệ trực tiếp giữa hàm lượng GH trong hydrogel và tổng lượng GH giải phóng. Hình 1.13a cho thấy các đường cong giải phóng GH từ hydrogel với cùng một lượng collagen (20%) nhưng nồng độ GH khác nhau. Khi tăng hàm lượng collagen trong hydrogel mang cùng một lượng GH (25 mIU) cũng làm tăng tổng lượng GH giải phóng (Hình 1.13b). Mẫu tổ hợp chế tạo ở tỷ lệ C/PVA = 30/70 giải phóng GH nhanh hơn đáng kể hơn so với mẫu tổ hợp chế tạo ở các tỷ lệ C/PVA = 20/80 và 10/90 [110]. Nồng độ GH được giải phóng từ các vật liệu có tác động cục bộ lên sự tăng sinh của tế bào. Tác dụng của GH đã được thử nghiệm *in vitro*, sử dụng các tế bào giống như nguyên bào xương của người (HOB) và đo sự tăng sinh tế bào và hàm lượng alkaline phosphatase sản sinh trong quá trình biệt hóa của tế bào HOB [110] (Hình 1.13).



Hình 1.13. (a) Lượng GH giải phóng từ C/PVA (20/80) ở nồng độ khác nhau, (b) Nồng độ GH (25mLU) giải phóng từ C/PVA ở tỷ lệ khác nhau

1.3.3. Tổ hợp carrageenan/polymer khác mang dược chất

Mahdavinia và đồng nghiệp (2014) nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano từ tính (MNPs) và κ -Car đến sự trương nở và giải phóng của thuốc diclofenac sodium (DFNa) từ hạt nano hydrogel composite có cấu trúc mạng các mạch polymer đan xen. Hydrogel gồm κ -Car, polyvinyl alcohol và nano oxit sắt từ (FONPs). Nghiên cứu giải phóng thuốc DFNa từ hạt nano hydrogel composite cho thấy thuốc giải phóng không chỉ phụ thuộc pH của dung dịch mà còn phụ thuộc vào từ trường [111]. Hàm lượng thuốc giải phóng tăng khi tăng cường độ từ trường ngoài. Tại từ trường thấp, momen từ của MNPs liên kết với nhau làm cho các hạt MNPs có xu hướng kết tụ lại với nhau. Sự kết tụ của MNPs làm giảm kích thước lỗ xốp của hydrogel, do đó, làm giảm sự khuếch tán của thuốc vào trong dung dịch. Ở các dung dịch pH khác nhau, giải phóng thuốc DFNa từ hydrogel là khác nhau do sự khác biệt về độ hòa tan của thuốc. Giải phóng thuốc thấp nhất trong dung dịch đệm phosphate có pH 1,2 vì DS kém tan trong môi trường acid trong khi giải phóng thuốc ở dung dịch đệm pH 7,4 là lớn nhất. Ngoài ra, các tác giả cũng chứng minh sự có mặt κ -Car trong hạt nanohydrogel composite làm cho các hạt nano này có khả năng ức chế các vi khuẩn *Gram (+)*.

Năm 2013, Bardajee và đồng nghiệp đã chế tạo nanocomposite κ -Car-g-poly(acid acrylic)/SPION (hạt nano oxit sắt siêu thuận từ) mang deferasirox.

Nanocomposite chế tạo bằng cách thêm cùng lúc SPION và poly(acid acrylic) ghép vào κ -Car (κ C-g-PAA). Hàm lượng thuốc giải phóng từ nanocomposite được cải thiện khi tăng pH và nhiệt độ. Trong điều kiện không có từ trường bên ngoài, lượng thuốc giải phóng từ nanocomposite trong dung dịch pH 7 cao hơn so với khi có mặt của từ trường ngoài. Điều này là do khi có từ trường ngoài, lực hút giữa SPION với các lỗ trống trong cấu trúc của hydrogel tăng mạnh, làm cho cấu trúc của hydrogel chặt chẽ hơn. Nhờ đó, thuốc được lưu giữ chặt chẽ trong hydrogel nên khả năng khuếch tán của thuốc từ hydrogel vào trong dung dịch giảm. Các nghiên cứu cũng cho thấy các hydrogel có tính tương thích sinh học cao và không độc hại, do đó, các hydrogel này rất hữu ích cho các ứng dụng trong y sinh [112].

Buchholz và cộng sự đã nghiên cứu khả năng kiểm soát của hệ κ -Car kết hợp với xenlulose vi tinh thể và lactose với các tỷ lệ khác nhau, có chứa sodium riboflavin 5'-phosphate (vitamin B2). Nghiên cứu hòa tan của vitamin B2 đã được thử nghiệm trong dịch dạ dày (pH 1,2) và đệm photphat (pH 4,5). Kết quả chứng minh động học giải phóng thuốc là phù hợp với mô hình Korsmeyer–Peppas. Hàm lượng lactose có ảnh hưởng đến tính chất cơ học của hệ tổ hợp: khi hàm lượng thấp, độ đàn hồi của hệ tổ hợp giảm, dẫn đến viên nén có tính chất cơ học yếu [113].

Nghiên cứu chế tạo và kiểm soát giải phóng DFNa từ hạt hydrogel chitosan (CS)/Car trong dung dịch mô phỏng dịch của đường tiêu hóa được thực hiện bởi P. Piyakulawat và các cộng sự. Tỷ lệ CS/Car, hàm lượng DFNa, chất liên kết ngang cũng có khả năng ảnh hưởng đến việc giải phóng thuốc. Kết quả thu được tỷ lệ CS/Car = 2/1 và 5% DFNa (khối lượng/thể tích) có khả năng kiểm soát giải phóng DFNa và có thể duy trì sự giải phóng trong khoảng 8 giờ. Việc sử dụng chất liên kết ngang làm tăng thời gian kiểm soát giải phóng DFNa, trong đó sử dụng glutaraldehyde làm tăng thời gian kiểm soát việc giải phóng thuốc của hệ tổ hợp lên đến 24 giờ. Môi trường pH cũng ảnh hưởng đến quá trình giải phóng DFNa, ở môi trường pH 1,2 và pH 6,8 quá trình giải phóng DFNa diễn ra chậm, còn môi trường pH 7,4 quá trình giải phóng DFNa diễn ra nhanh hơn [114].

Trong một nghiên cứu sau đó, các tác giả đã nghiên cứu hệ carboxymethyl chitosan/ κ -Car để mang và giải phóng thuốc sodium diclofenac. Kết quả giải phóng

thuốc trong ống nghiệm từ các hạt cho thấy quá trình giải phóng phụ thuộc vào độ pH. Hàm lượng thuốc được giải phóng thấp ở pH 1,2 trong khi ở pH 7,4 hàm lượng DFNa được giải phóng đã tăng lên đáng kể [115].

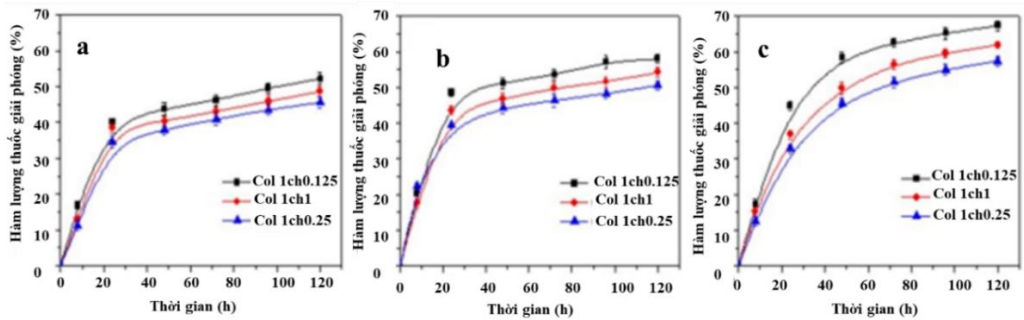
Trong những năm gần đây, các hạt nano Car/CS mang thuốc đã được nghiên cứu rộng rãi. Chúng thường được điều chế bằng phương pháp gel hóa ion hoặc hình thành các phức hợp polyelectrolyte bằng cách trộn Car với các polyme cation [116]. Khả năng liên kết của κ -, ι -, λ -Car và CS để tạo thành một tổ hợp mang glucose oxyase (GOD) và giải phóng có kiểm soát đã được nghiên cứu. Các phức hợp CS/ κ -Car ở tỷ lệ 3/5 có thể mang GOD với hiệu suất 79 %. Hiệu suất mang GOD của phức hợp CS/ κ -Car phụ thuộc vào loại Car (κ - > ι - > λ -). Phức CS/ κ -Car có khả năng bảo toàn 80,2% hoạt tính GOD trong dung dịch pH 1,2; 73,3% trong dung dịch chitosanase và 66,4% trong dung dịch pepsin. Quá trình giải phóng GOD từ phức hợp CS/ κ -Car có tốc độ thấp nhất do sự hút nước làm trương nở của phức hợp CS/ κ -Car [117].

1.3.4. Tổ hợp collagen/polyme khác mang dược chất

Montalbano và cộng sự tiến hành tổng hợp hydrogel sinh học collagen/alginate/sợi (CAF) cho kỹ thuật mô mềm. Hydrogel điều chế từ các polyme thiên nhiên có khả năng bắt chước cấu trúc ngoại bào của tế bào gốc và cung cấp môi trường vi mô để duy trì chức năng của tế bào, kích thích hình thành mô mới. Hydrogel CAF có khả năng liên kết với các mô mềm ban đầu, tương thích sinh học với tế bào L929, tế bào tủy β -MIN6 và tế bào gốc trung mô ở người (hMSCs). Hydrogel CAF, đặc biệt với 2,5% (khối lượng/thể tích) collagen, làm tăng khả năng hình thành enzym alkaline phosphatase trong tế bào hMSCs cho thấy khả năng thúc đẩy hoạt động tạo xương. Ngoài ra, hydrogel CAF cũng tăng hoạt động trao đổi chất của β -MIN6 và thúc đẩy quá trình hồi phục tế bào hình cầu với kích thước từ 50 đến 150 μ m vào ngày thứ 7. Các kết quả trên đã chứng minh tiềm năng ứng dụng của hydrogel CAF trong điều trị bệnh tiểu đường [118].

Ming-Mao Chen và cộng sự (2015) đã nghiên cứu chế tạo và xác định đặc trưng, tính chất của màng collagen/chitosan có chứa các hạt nano glycol chitosan biến đổi cholesteol (DBC) (CoL/Ch/DBC) mang thuốc doxorubicin (Dox). Khả năng kiểm soát giải phóng thuốc Dox được các tác giả khảo sát trong các dung dịch

đệm phosphat pH 7,4; 6,5 và 5,8 (Hình 1.14). Dox giải phóng nhanh từ tất cả các mẫu màng tổ hợp trong giai đoạn đầu và sau đó giải phóng chậm dần. Ở cùng một pH khảo sát, tốc độ giải phóng Dox từ các màng tăng lên khi giảm hàm lượng chitosan trong màng. Tốc độ giải phóng thuốc tăng trong các môi trường pH thấp cho thấy giải phóng thuốc Dox từ các màng này rất nhạy với độ pH của môi trường [119].



Hình 1.14. Đồ thị giải phóng thuốc Dox từ màng tổ hợp CoL/Ch/DBC mang thuốc Dox hàm lượng CoL/Ch khác nhau trong các dung dịch đệm pH 7,4 (a), 6,5 (b) và 5,8 (c)

Pathan và cộng sự (2018) đã nghiên cứu chế tạo nanogel trên cơ sở collagen được chiết tách từ vảy cá, hydroxypropyl methyl cellulose mang curcumin (CNG) và ứng dụng nanogel này làm vật liệu chữa lành vết thương. Các thử nghiệm *ex-vivo* và *in-vivo* đã chứng minh nanogel CNG khá ổn định và có khả năng chữa lành vết thương hiệu quả [120].

Các hydrogel trên cơ sở collagen loại I có chứa các hạt nano chitosan mang insulin đã được chế tạo nhằm thúc đẩy quá trình tái tạo thần kinh ngoại biên. Các hydrogel này giúp tăng tỷ lệ tăng sinh của các tế bào Schwann. Dựa trên các xét nghiệm trên chuột Wistar, các tác giả chỉ ra rằng hydrogel mang insulin với liều 1000 IU có khả năng thúc đẩy quá trình tái tạo các khuyết tật thần kinh [121].

Ảnh hưởng của tỷ lệ thành phần, tỷ lệ pha dầu/pha nước, tốc độ khuấy và một số yếu tố khác đến quá trình chế tạo và tính chất của hạt vi cầu collagen/carboxymethyl chitosan mang ligustrazine hydrochloride đã được nghiên cứu bởi Qiang Lin và cộng sự [122]. Các tác giả tìm được điều kiện thích hợp để chế tạo hạt vi cầu là tỷ lệ carboxymethyl chitosan/collagen là 1/2, tỷ lệ thuốc/vật liệu là 1/2, tỷ lệ pha dầu/pha nước là 5/1, nồng độ span80 là 0,5%, tốc độ khuấy là 600 vòng/phút, thể tích của tác nhân liên kết ngang là 3 mL, thời gian xử lý liên kết ngang là 3 giờ. Các vi hạt thu được có đường kính từ 0,05-1,25 mm, hiệu suất mang

thuốc đạt 86,09 %. Tốc độ giải phóng ligustrazine hydrochloride từ hạt vi cầu trong dung dịch đệm pH = 1,0 đạt 66% trong vòng 1 giờ, sau đó ổn định trong vòng 5 giờ tiếp theo [122].

1.3.5. Tổ hợp carragennan/collagen mang dược chất

Do tính tương thích sinh học cao, dễ phân huỷ và không gây độc nên tổ hợp carragennan/collagen đã được quan tâm nghiên cứu làm vật liệu mang thuốc, dược chất. Nghiên cứu của Wenpo Feng (2017) và cộng sự cho thấy composite collagen-hydroxyapatite/ κ -carrageenan (C-HAp/ κ -Car) có cấu trúc tương tự như cấu trúc của xương tự nhiên [123]. Kết quả nghiên cứu XRD và SEM của vật liệu tổ hợp cho thấy HAp được phân tán tốt trong các polyme sinh học. Phổ FT-IR chỉ ra rằng các nhóm N-H và COO- của collagen đã liên kết với HAp. κ -Car có vai trò là chất liên kết ngang, làm giảm khả năng hút ẩm và khả năng phân huỷ sinh học của C-HAp. Nghiên cứu các tính chất gồm tính chất cơ học, khả năng hút ẩm, khả năng phân huỷ sinh học, khả năng gây độc tế bào của vật liệu composite C-HAp/ κ -Car đã chỉ ra rằng vật liệu này có tiềm năng trong điều trị tái tạo xương [123].

Nogueira và cộng sự (2019) cũng nghiên cứu vật liệu màng lai vô cơ và hữu cơ C/ ι -Car/HAp trong việc tái tạo xương. Hydrogel đã được chế tạo bằng cách hòa tan collagen thuỷ phân và ι -Car trong hỗn hợp dung dịch nước có chứa CaCl_2 và H_3PO_4 . pH được tăng dần bằng cách thêm dung dịch NH_3 25% để kết tủa khoáng vào hydrogel. Sau đó, màng được chế tạo bằng phương pháp đúc dung môi là phương pháp khuôn được ngâm vào dung dịch chứa hydrogel, sau khi dung môi bay hơi hết sẽ thu được màng C/ ι -Car/HAp. Phổ IR và giản đồ XRD cho thấy HAp đã được hình thành trong hydrogel với kích thước tinh thể khoảng 12 nm, nhỏ hơn so với kích thước apatit trong xương. Các đặc tính bề mặt của màng C/ ι -Car/HAp gồm độ ẩm bề mặt và năng lượng bề mặt (γ_s) được đánh giá bằng phương pháp đo góc tiếp xúc (θ_c). θ_c thấp ($8,5$ - $16,8^\circ$) chỉ ra rằng màng lai là ưa nước, trong khi giá trị γ_s cao, khoảng $70,6 \text{ mJ.m}^{-2}$ có thể tạo điều kiện thuận lợi cho sự kết hợp phân tử sinh học vào bề mặt màng C/ ι -Car/HAp [124].

Nogueira và cộng sự sử dụng collagen loại I kết hợp với κ -Car để chế tạo bộ khung khoáng hóa mô phỏng môi trường vi mô của xương tự nhiên. Hình ảnh SEM

cho thấy trên C/ κ -Car các sợi collagen đồng nhất và sắp xếp đan xen nhau. Các nguyên bào xương MC3T3-E1 được nuôi cấy trong khung collagen và có khả năng tồn tại sau tối đa 7 ngày nuôi cấy, cả khi có và không có κ -Car. Sự có mặt của κ -Car trong khung collagen đã kích thích sự khoáng hóa của các tế bào, cũng như khả năng khoáng hóa chất nền ngoại bào sau 14 và 21 ngày nuôi cấy. Từ các kết quả thu được cho thấy hệ C/ κ -Car có vai trò trong quá trình tổng hợp tái tạo tế bào xương [125].

Nogueira và cộng sự tổng hợp các màng lai HAp/C/Polysacarit và nghiên cứu khả năng kháng khuẩn và tác dụng của chúng đối với nuôi cấy nguyên bào xương. HAp được đưa lên màng C/Polysacarit bằng phương pháp insitui (phương pháp 1) hoặc tổng hợp HAp rồi mới đưa lên màng C/Polysacarit (phương pháp 2). Polysacarit được sử dụng trong nghiên cứu là CS hoặc Car. Sự có mặt của HAp đã cải thiện tính chất cơ học của màng, tăng khả năng thấm ướt và năng lượng tự do bề mặt. Các phân tích XRD, Raman và SEM cho thấy rằng các màng lai được tạo ra bằng phương pháp 1 có hình thái đồng nhất. Ngoài ra, các tính chất lý, hóa và cơ học phụ thuộc vào thành phần của màng polyme. Trên thực tế, lượng HAp được tạo thành khi có mặt CS cao hơn κ -Car. Màng chứa CS không độc đối với nguyên bào xương, trong khi màng chứa κ -Car làm giảm khả năng sống của tế bào sau khi nuôi cấy trong 24 và 72 giờ. Điều này có thể liên quan đến tốc độ phân hủy cao, độ ổn định thấp và tính toàn vẹn thấp của màng chứa κ -Car trong môi trường nuôi cấy tế bào. Sau khi hạt AgNP được thêm vào màng giúp màng có tác dụng kháng khuẩn chống lại *E. coli*, *S. aureus* và *P. aeruginosa*. Tác dụng này phụ thuộc vào tốc độ giải phóng AgNP. Nhìn chung, những kết quả này mở ra những con đường đơn giản và đầy hứa hẹn để phát triển một thế hệ màng lai mới với tốc độ phân hủy và đặc tính kháng khuẩn có thể kiểm soát được [126].

1.4. Tổng quan về dược chất allopurinol và polyme mang allopurinol

1.4.1. Tính chất chung

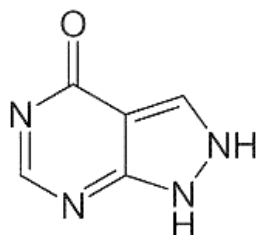
Allopurinol (ALP) là thuốc tổng hợp dạng bột mịn màu trắng. Ít tan trong nước, ethanol, tan tốt trong dung dịch NaOH 1M (50 mg/mL).

Công thức phân tử của ALP là $C_5H_4N_4O$.

Khối lượng phân tử: 136,11g/mol.

Tên theo hệ thống IUPAC: 1,2-dihydropyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one

Công thức cấu tạo của allopurinol:



ALP có tác dụng ức chế xanthine oxidase, thường được sử dụng trong điều trị bệnh gút và tăng acid uric máu. Nó có tính acid yếu (pKa 9,4), vẫn kết hợp trong môi trường acid dạ dày dẫn đến sự hấp thụ nhanh hơn từ dạ dày. Vị trí chính để hấp thụ ALP là tá tràng và hồi tràng trên, trong khi sự hấp thụ của nó chậm hơn và không đầy đủ ở hồi tràng dưới. Thời gian bán hủy sinh học của ALP là 1–3 giờ, điều này cho thấy rõ ràng nhu cầu phát triển các công thức giải phóng kéo dài. Trong nghiên cứu so sánh sinh khả dụng của 5 công thức ALP, Jaeger và cộng sự [127] đã phát hiện ra rằng các công thức giải phóng chậm cho thấy sinh khả dụng cao hơn đáng kể so với các công thức thông thường, do lượng ALP giải phóng ít hơn ở vùng dạ dày và ruột non. Mặc dù ALP thường được sử dụng để giảm uric acid, nhưng người ta ước tính rằng khoảng 10% số người được điều trị bằng ALP phát triển các phản ứng bất lợi nhỏ thường biến mất sau khi ngừng sử dụng ALP [128]. Các tác dụng phụ phổ biến nhất của ALP là rối loạn tiêu hóa, phản ứng quá mẫn và phát ban da [129].

1.4.2. Dược lực

Giảm nồng độ acid uric trong máu (ức chế quá trình tổng hợp acid uric và tăng bài tiết qua nước tiểu). Acid uric chuyển hóa thành muối urat dạng tinh thể, muối này tích trữ trong khớp xương nhỏ gây viêm gout. Acid uric tăng cũng gây sỏi thận. ALP cũng dùng ngăn ngừa và điều trị sỏi thận, bệnh leishmania và viêm khớp cấp [1].

Ngoài ra, nếu sử dụng trực tiếp ALP có thể gây tác dụng phụ trên da như phát ban da) hoặc gây sốt, run rẩy và viêm mạch dẫn đến tổn thương thận và gan. Ngoài tác dụng phụ trên, ALP còn gây nôn mửa và tiêu chảy, giảm bạch cầu, vàng da, thiếu máu, rụng tóc, suy tủy [1].

- Hấp thụ: ở ống tiêu hóa, ALP được hấp thụ gần như hoàn toàn, nồng độ đạt đỉnh sau khi uống 4 giờ.

- Phân bố: ALP thuốc ít liên kết với protein huyết tương, thể tích phân bố 0,6 L/kg.
- Chuyển hóa: ALP chuyển hóa thành oxypurinol còn hoạt tính.
- Thải trừ: thuốc ALP chuyển hóa thành oxypurinol và thải trừ qua nước tiểu, thời gian bán thải khoảng 1 giờ (oxypurinol là 18 - 20 giờ).

ALP tăng hoạt tính sau khi uống và được hấp thu ở ống tiêu hóa. Các nghiên cứu đã chứng minh sau khi uống ALP 30 - 60 phút, thuốc được hấp thu vào máu. Sinh khả dụng của ALP thay đổi trong khoảng từ 67 đến 90%. Sau khi uống 1,5 giờ thì hàm lượng ALP trong huyết tương đạt đỉnh và giảm mạnh sau đó và không còn sau 6 giờ. Hàm lượng oxypurinol trong huyết tương đạt đỉnh sau khi uống 3 – 5 giờ và kéo dài lâu hơn.

ALP ít gắn vào protein huyết tương do vậy việc thay đổi về gắn kết với huyết tương không làm thay đổi hệ số thanh thải của All. Thể tích biểu kiến của sự phân bố ALP khoảng 1,6 L/kg cho thấy sự phân bố tương đối mạnh trong mô. Khoảng 20% ALP được thải trừ trong phân sau khi uống. thời gian bán thải của ALP trong huyết tương khoảng 1 đến 2 giờ. Oxypurinol ức chế xanthine oxydase yếu hơn ALP nhưng thời gian bán thải trong huyết tương của oxypurinol lại dài hơn (13 – 30 giờ) [130]. Do vậy, sự ức chế hiệu quả xanthine oxydase được duy trì trong 24 giờ với một liều đơn All. Với có chức năng thận bình thường thì bệnh nhân thường tích lũy dần oxypurinol đến khi đạt được nồng độ ở trạng thái ổn định. Những bệnh nhân như vậy, liều dùng 100 mg ALP/ngày thường có nồng độ oxypurinol huyết tương từ 5 đến 10 mg/L.

1.4.3. Cơ chế tác dụng

ALP và chất chuyển hóa của nó, oxypurinol, có hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxydase, ngăn chặn sự chuyển đổi các tiền chất oxypurin, hypoxanthine và xanthine thành acid uric nhờ đó mà nồng độ acid uric trong máu giảm [131].

1.4.4. Polyme mang allopurinol

Cho đến nay, nhiều hệ tổ hợp khác nhau đã được nghiên cứu chế tạo để mang và giải phóng ALP có kiểm soát. Các chất mang thuốc ưa nước như polyvinylpyrrolidon (PVPk30), polyetylen glycol 6000 (PEG 6000) đã được sử dụng với các tỷ lệ 1:1, 1:2 và 1:4 (thuốc:chất mang). Khả năng hòa tan trong nước của

ALP tăng khi kết hợp cả hai polyme PVPk30 và PEG 6000. Sharma đã phát triển và bào chế dạng viên nén từ polyoxyetylen (PEO), Carbopol 934P và sodium carboxymethyl cellulose, cho thấy các đặc tính giải phóng mong muốn và cải thiện sinh khả dụng của ALP [132]. El-Gibaly và Abdel-Ghaffar (2005) đã chế tạo các hạt bằng sáp ong và hexacosanol để giải phóng ALP một cách bền vững, và phát hiện ra rằng sự kết hợp của hexacosanol trong hệ tổ hợp đã kéo dài đáng kể thời gian giải phóng ALP trong dịch mô phỏng dịch dạ dày và mô phỏng dịch ruột [133]. Một miếng dán ngoài da hai lớp gồm ketoprofen và ALP dùng để điều trị viêm khớp cũng được thiết kế để giải phóng ALP bền vững bởi Arshad và cộng sự [134]. Tuy nhiên, có rất ít nghiên cứu về quá trình tổ hợp và giải phóng ALP trong các sợi nano, đặc biệt là trong các sợi nano polyme sinh học. Trong nghiên cứu trước đây, các sợi nano gelatin/zein sử dụng chất liên kết ngang glucose đã được chế tạo và khả năng kháng dung môi được cải thiện so với các sợi không liên kết ngang [135]. Ở đây, ALP đã được bọc trong sợi nano gelatin/zein liên kết ngang bởi glucose để giải phóng ALP bền vững. Ngoài ra, tác dụng ức chế *in vitro* chống lại xanthine oxidase đã được nghiên cứu [136].

Trong nghiên cứu của Karima Badis, các tổ hợp mang ALP, đã được chế tạo bằng quá trình bay hơi dung môi. Các chất mang được sử dụng như ethylcellulose, poly(ϵ -caprolactone), β -cyclodextrin và hydroxypropylmethyl cellulose. Ảnh hưởng của tỷ lệ thành phần và điều kiện chế tạo đến hiệu suất mang thuốc và động học giải phóng thuốc đã được nghiên cứu. Tùy theo tốc độ khuấy và thành phần của các vi hạt, tải lượng hoạt chất nằm trong khoảng từ $10,46 \pm 1,45$ đến $46,40 \pm 0,5\%$. Các vi cầu có dạng hình cầu và đường kính trung bình (d_{32}) của các vi hạt thu được là nhỏ hơn và nằm trong khoảng từ 47,71 đến 151,01 μm . Kết quả giải phóng thuốc cho thấy tốc độ giải phóng bị ảnh hưởng bởi đặc tính của các vi hạt; cụ thể là tốc độ khuấy và thành phần của các vi hạt. Cơ chế giải phóng được xác định bằng cách lập mô hình Higuchi và Korsmeyer-Peppas [137].

Một nghiên cứu khác về kỹ thuật điều chế các hạt albumin được phủ ALP có kích thước nhỏ từ 1 đến 5 μm . Sự kết hợp này của các hợp chất có thể hữu ích cho quá trình điều trị đột quy do thiếu máu cục bộ. Thuốc có tác dụng ngăn ngừa sự hình thành các cục máu đông, các phản ứng oxy hóa và bắt đầu tái tạo tế bào [138].

Gurpreet Kandav và cộng sự (2019) đã chế tạo hạt nano siêu thuận từ chitosan

mang ALP (A-CNPs) trong điều trị tăng acid uric trong máu. Kích thước hạt thu được trong khoảng 46,40–91,65 nm. Các nghiên cứu *in-vivo* về A-CNPs cho thấy sự hấp thu ALP ở thận tăng gấp 19,07 so với ALP tinh khiết sau 2 giờ dùng thuốc ở chuột [139].

Trong điều trị viêm niêm mạc, dung dịch hoặc hỗn dịch của ALP được đưa vào khoang miệng để tác động trực tiếp lên chỗ viêm. Vì vậy, ALP cần phải được giải phóng ngay khi tiếp xúc với nước bọt, được tiết ra từ các tuyến nước bọt. Yoshifumi và cộng sự đã nghiên cứu chế tạo màng mang ALP từ sodium alginate với độ dày 50 μm . Tác giả đã thử nghiệm ngâm màng trong 10 mL dung dịch nước muối sinh lý và quan sát thấy màng trương nở nhanh và tự tan trong vòng 20–30 phút. Đặc biệt, tất cả ALP đã được giải phóng hết trong vòng 10 phút [140].

Tomoda và cộng sự đã chế tạo hạt vi cầu chứa ALP được mang bởi hạt ι -Car và κ -Car bằng phương pháp phun sấy. Các vi cầu có đường kính trung bình vào khoảng 10 μm , hiệu suất mang thuốc hơn 70%. ALP được giải phóng khỏi các vi cầu trong 400 phút khi được mang bởi ι -Car và có tác dụng kéo dài đến 600 phút khi sử dụng κ -Car [141].

Hanawa đã chế tạo nước súc miệng chứa Car/PEO/ALP trong điều trị viêm niêm mạc khoang miệng. Sản phẩm thu được tăng tính bám dính trên niêm mạc miệng so với sử dụng ALP, từ đó làm tăng hiệu quả điều trị [142].

Từ các nghiên cứu và trình bày ở trên, có thể thấy giải pháp xử lý một cách có hệ thống vầy cả để hạn chế ô nhiễm môi trường, đồng thời thu collagen chưa được quan tâm thỏa đáng. Các nghiên cứu về polyme mang dược chất ALP chủ yếu là các polyme bán tổng hợp như PEG 6000, PVPk30, poly(etyl-cyanoacrylat), polymethylmetacrylat... Có rất ít nghiên cứu sử dụng các polyme thiên nhiên (như chitosan, carrageenan, collagen) làm chất mang thuốc ALP. Đặc biệt là, cho đến nay, chế tạo tổ hợp carrageenan/collagen (Car/C) làm chất mang ALP chưa được tập trung nghiên cứu. Sự kết 2 polyme Car/C sẽ phát huy hiệu quả trong điều trị bệnh gút nhờ những ưu điểm của các polyme này. Hydrogel Car/C giúp kiểm soát và giải phóng thuốc ALP dễ dàng hơn nhờ các tương tác vật lý giữa ALP với carrageenan và collagen, đồng thời cải thiện khả năng hoà tan của ALP, tăng sinh khả dụng của thuốc khi sử dụng. Vì vậy, đề tài có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn.

CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, dụng cụ

Potassium chloride (KCl) rắn, potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) rắn, hydrochloric acid (HCl) 37 %, sulfuric acid (H_2SO_4) đặc, phosphoric acid (H_3PO_4), sodium hydroxide (NaOH) rắn, acetic acid (CH_3COOH) đặc, sodium chloride (NaCl) rắn, citric acid ($\text{C}(\text{OH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2\text{COOH}$): sản phẩm thương mại của Trung Quốc

Carrageenan được cung cấp bởi hãng Sigma Aldrich (Mỹ) ở dạng bột màu trắng ngà, độ pH (1,5 % trong nước) = 7,5-10,5, độ ẩm ≤ 12 %.

Allopurinol: Độ tinh khiết ≥ 98 %; chất bột màu trắng, mịn; không tan trong clorofom, ít tan trong nước, etanol; tan tốt trong dung dịch kiềm, sản phẩm của hãng Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ).

Acetonitrile (CH_3CN): Độ tinh khiết $\geq 99,9$ %; là chất lỏng, không màu; sản phẩm của hãng Sigma Aldrich (Mỹ).

Ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3): Độ tinh khiết ≥ 99 %; là chất rắn màu trắng; nhiệt độ nóng chảy 60 °C; độ tan (ở 20 °C) $79,1$ g/L; sản phẩm của hãng Sigma Aldrich (Mỹ).

Iodoacetamide ($\text{ICH}_2\text{CONH}_2$): Độ tinh khiết ≥ 99 %; là chất rắn kết tinh; nóng chảy ở 95 °C; sản phẩm của hãng Sigma Aldrich (Mỹ).

Formic acid (HCOOH): Độ tinh khiết ≥ 95 %; là chất lỏng, không màu; sản phẩm của hãng Sigma Aldrich (Mỹ).

Thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue R-250: sản phẩm của hãng Biobasic-Canada.

Polyethylene oxide (PEO): chất bột màu trắng; khối lượng phân tử trung bình M_v 200.000 g/mol; khoảng nhiệt độ nóng chảy: $61,7 - 66,65$ °C; độ pH $5,5 - 7,0$ (nồng độ 50 g/L ở 25 °C); sản phẩm của hãng Sigma Aldrich (Mỹ).

2.2. Trích ly collagen từ vây cá (họ cá chép – *Cyprinidae*)

2.2.1. Xử lý sơ bộ nguyên liệu đầu vào (Bước 1)

Vây cá hỗn hợp của họ cá chép bao gồm hỗn hợp vây cá trắm cỏ – *Ctenopharyngodon idella*, vây cá trôi – *Labeo rohita*, vây cá chép – *Cyprinus*

Carpio, vảy cá rô phi – *Oreochromis niloticus* thu từ chợ Nghĩa Tân – Cầu Giấy – Hà Nội và chợ Phúc Yên – Phúc Yên – Vĩnh Phúc được rửa sạch bằng nước thường và nước cất sau đó phơi khô dưới điều kiện tự nhiên. Quá trình này nhằm loại bỏ một phần lượng protit và tạp chất bám trên da cá. Tất cả các bước xử lý tiếp theo, vảy ngâm trong các dung dịch khảo sát đều được tiến hành ở 4 °C.

2.2.2. Xử lý protein và chất béo bằng dung dịch kiềm (Bước 2)

Ngâm 5 gam vảy cá trong dung NaOH: trong công đoạn này, tiến hành khảo sát thời gian ngâm và nồng độ NaOH thích hợp để đạt được hiệu quả cao. Theo đó, ngâm vảy cá trong dung dịch NaOH 0,2 – 1M với tỷ lệ 1/20 (khối lượng vảy cá/khối lượng dung dịch) kết hợp khuấy từ trong thời gian 5 – 12 giờ, giúp loại bỏ mùi tanh của vảy cá nhằm làm sạch hoàn toàn các tạp chất bản, lipid, máu, mùi tanh, chất nhờn và cắt đứt các liên kết hydro của collagen làm cho các mạch này trở nên lỏng lẻo, tạo điều kiện cho quá trình chiết collagen được dễ dàng.

Rửa sạch vảy cá, cắt nhỏ cỡ milimet nhằm tạo diện tích tiếp xúc lớn giữa nguyên liệu và dung môi chiết, tăng hiệu quả tách hydroxyapatite (HAp) và chiết collagen ở bước sau.

2.2.3. Xử lý khoáng bằng dung dịch hỗn hợp acid khác nhau (Bước 3)

Ngâm vảy cá đã rửa sạch ở bước 2 trong các dung dịch hỗn hợp acid với các nồng độ khác nhau (Bảng 3.3). Khuấy từ liên tục hỗn hợp trên trong 20 phút (khi tăng thời gian khuấy, khối lượng HAp thu được không đổi), tỉ lệ ngâm 1:20 (khối lượng vảy cá: khối lượng dung dịch). Sau khi khuấy, thu được hai phần: phần dung dịch chứa HAp hòa tan và phần vảy cá đã xử lý.

2.2.4. Thu collagen thô (Bước 4)

Vảy cá sau xử lý acid (ở Bước 3) tiếp tục được rửa với nước thường, rửa tiếp bằng nước cất đến môi trường trung tính (dùng giấy quỳ thử đến pH 7). Sau đó, ngâm vảy cá thu được trong dung dịch CH_3COOH 0,5 M trong 24 giờ. Với tỉ lệ ngâm khối lượng vảy cá/khối lượng dung dịch là 1/10.

Sau khi ngâm vảy cá 24 giờ với dung dịch acid CH_3COOH 0,5 M, lọc ta thu được dung dịch chứa collagen hòa tan. Kết tủa collagen bằng NaCl rắn với khối lượng NaCl/khối lượng dung dịch = 10 % trong nước đá. Sau đó, chiết tách thu được collagen thô (phần kết tủa trắng bông nổi ở phía trên cốc – Hình 2.1).

Collagen thô được hòa tan lại trong dung dịch acid CH_3COOH 0,5 M sau đó kết tinh lại để thu được collagen có độ tinh khiết cao.

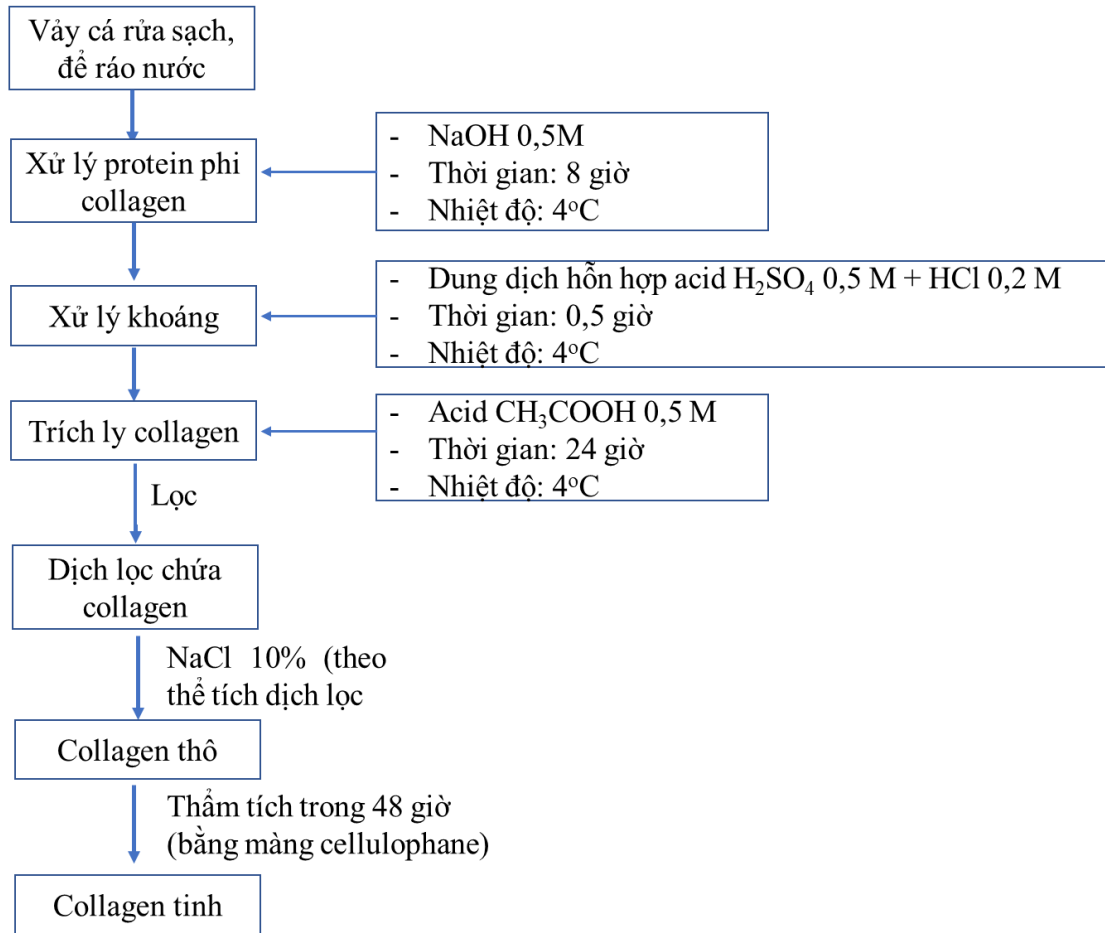
Cho phần collagen kết tủa vào túi thẩm tích (Trọng lượng phân tử: 14.000 Daltons, chiều ngang: 44mm, chiều dài : 100mm), sau đó ngâm trong nước cất và khuấy trên máy khuấy từ trong 48 giờ (sau 1- 2 giờ thay nước cất một lần). Đem collagen sau thẩm tích đổ ra khay kính rồi để đóng đá trong tủ lạnh. Sau đó, tiến hành đông khô collagen sau thẩm tích trên thiết bị FreeZone 2.5 (Labconco, Mỹ) tại Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Sản phẩm collagen tinh thu được được bảo quản lạnh trong túi PE kín.

Hàm lượng tương đối của collagen thu được từ vảy cá được tính theo tỷ lệ giữa khối lượng collagen thu được so với khối lượng vảy cá ban đầu:

$$\% m_{\text{collagen}} = \frac{m_{\text{collagen}}}{m_{\text{vảy cá}}} \cdot 100\%$$



Hình 2.1. Collagen kết tủa (trái), collagen sau khi đông khô (phải)



Sơ đồ 2.1. Quy trình trích ly và tinh chế collagen từ hỗn hợp vảy cá (họ cá chép) tại Việt Nam

2.2.5. Nhận diện collagen thu được từ vảy cá

2.2.5.1. Xử lý mẫu

Mẫu dạng khô: được bổ sung SDS-PAGE Sample Loading Buffer 1X cho vào biến tính ở 95°C, 10 phút. Tiến hành điện di protein trên SDS-PAGE [143].

Mẫu dạng dung dịch: bổ sung hạt Nano kim cương (ND) (10μg/μL) vào mẫu (mẫu đã được pha loãng 10 lần với PBS 1X). Ủ phản ứng trong vòng 10 phút. Ly tâm với lực ly tâm 13000 xg, sau 5 phút thu kết tủa. Rửa tủa với PBS 1X, siêu âm 5-10 phút, sau đó ly tâm với lực ly tâm 13000 xg, sau 5 phút thu kết tủa. Bổ sung SDS-PAGE Sample Loading Buffer 1X tới phức hợp tủa protein-ND, siêu âm trong 15 phút để tái hòa tan phức hợp mẫu. Tiến hành biến tính và chạy điện di protein trên SDS-PAGE [143].

2.2.5.2. Thủy phân protein bằng trypsin

Sau khi điện di SDS-PAGE, dựa vào kết quả điện di chúng tôi tiến hành rửa gel và cắt các băng protein quan tâm. Rửa các mảnh gel với dung dịch rửa (acetonitrile 50%, NH_4HCO_3 100mM) (dung dịch A) ở 30 °C cho đến khi loại bỏ hết màu xanh của thuốc nhuộm Coomassie. Bổ sung acetonitrile (ACN) 100% để loại nước trong gel trong 5 phút, làm khô gel. Sau đó các mảnh gel được khử bằng dung dịch khử (dithiothrietol 10mM, NH_4HCO_3 100mM) ở 56 °C trong 45 phút rồi được làm lạnh ở nhiệt độ phòng. Sau khi khử các cầu nối disulfide giữa các gốc cysteine trong phân tử protein, các mảnh gel được alkyl hóa bằng dung dịch iodoacetamide 50mM trong NH_4HCO_3 100mM. Tiếp tục ủ gel ở nhiệt độ phòng trong tối 45 phút. Sau đó làm sạch gel bằng dung dịch rửa (dung dịch A). Bổ sung acetonitrile 100% để loại nước trong gel trong 5 phút, làm khô gel. Gel được hòa lại bằng dung dịch thủy phân (10 ng/ μL trypsin trong NH_4HCO_3 50mM, ACN 10%) và ủ trong đá lạnh trong 30 phút, tiếp tục bổ sung NH_4HCO_3 50mM và ủ ở 30 °C trong 18 tiếng. Cho axit formic vào mẫu thủy phân (sao cho nồng độ axit formic cuối cùng là 1%) để dừng phản ứng thủy phân bằng enzym. Chuyển dịch nổi sang một ống eppendorf sạch. Bổ sung dịch chiết (acetonitrile 50%, axit formic 5%) vào gel, để 45 phút rồi siêu âm 5 phút. Chuyển dịch nổi sang ống eppendorf ở bước trên. Lặp lại bước này một lần nữa, sau đó bổ sung acetonitrile 90% / axit formic 5 % để trong 5 phút rồi chuyển dịch nổi sang ống eppendorf ở bước trên (tổng cộng 3 lần chiết). Hỗn hợp dịch chiết peptide được làm khô bằng máy SpeedVac. Hỗn hợp peptide được loại muối bằng cột Ziptip C18 trước khi phân tích bằng khối phổ.

2.3. Chế tạo màng tổ hợp carragennan/collagen/allopurinol

Cân một lượng carrageenan đã xác định và cho vào cốc có mỏ 100 mL, thêm 40 mL nước cất vào cốc. Khuấy hỗn hợp trên máy khuấy từ đồng thời gia nhiệt từ từ đến 80 °C trong 15 phút. Sau đó, để nguội dung dịch đến 50 °C, nhỏ dung dịch chất tạo gel KCl và khuấy từ trong 15 phút để dung dịch đồng nhất. Để nguội hỗn hợp đến nhiệt độ phòng (cốc A).

Hòa tan một lượng collagen đã xác định trong dung dịch CH_3COOH 0,5 M, khuấy trên máy khuấy từ (cốc B) tại nhiệt độ phòng.

Hòa tan một lượng ALP đã xác định trong dung dịch NaOH 0,5M, khuấy trên máy khuấy từ (cốc C) tại nhiệt độ phòng.

Đổ từ từ cốc (C) vào cốc (A) thu được dung dịch (D). Khuấy cốc D trên máy khuấy từ (400 vòng/phút) trong 30 phút. Đổ dung dịch (B) vào buret, nhỏ từ từ đến hết dung dịch (B) vào dung dịch (D) (với tốc độ 3 mL/phút), kết hợp khuấy đồng hóa tốc độ cao với tốc độ 20.000 vòng/phút. Tiếp tục khuấy hỗn hợp trên trên máy khuấy từ trong 60 phút (tốc độ 400 vòng/phút). Sau đó, hỗn hợp được đem đi đồng hóa với tốc độ 20.000 vòng/phút (3 lần, 10 phút/Lần). Cuối cùng đổ hỗn hợp ra đĩa petri và để bay hơi tự nhiên thu được các màng tổ hợp (Bảng 2.1).

Bảng 2.1. Tỷ lệ thành phần và kí hiệu các mẫu màng tổ hợp Car/C/ALP

STT	Kí hiệu mẫu màng	Carrageenan (g)	Collagen (g)	Allopurinol (g)	KCl (g)
1	CC955-0	0,095	0,005	0	0,001
2	CCA991-5	0,099	0,001	0,005	0,001
3	CCA973-5	0,097	0,003	0,005	0,001
4	CCA955-5	0,095	0,005	0,005	0,001
5	CCA937-5	0,093	0,007	0,005	0,001
6	CCA9010-5	0,090	0,010	0,005	0,001
7	CCA955-3	0,095	0,005	0,003	0,001
8	CCA955-10	0,095	0,005	0,01	0,001
9	CCA955-15	0,095	0,005	0,015	0,001
10	CaA5	0,1	0	0,005	0,001
11	CoA 5	0	0,1	0,005	0,001

2.4. Chế tạo hạt tổ hợp carragennan/collagen/allopurinol

Các mẫu được chuẩn bị tương tự phương pháp tạo màng phần 2.3. Sử dụng chất tạo gel KCl với hàm lượng 1 %.

Đổ từ từ (cốc C) vào (cốc A) thu được dung dịch (D). Khuấy dung dịch trên máy khuấy từ (400 vòng/phút) trong 30 phút. Đổ cốc (B) vào buret, nhỏ giọt đến hết

dung dịch (B) vào dung dịch (D) (với tốc độ 3 mL/phút) kết hợp khuấy đồng hóa tốc độ cao với tốc độ 20.000 vòng/phút. Tiếp tục khuấy hỗn hợp trên máy khuấy từ (400 vòng/phút) trong 60 phút. Sau đó, đồng hóa hỗn hợp với tốc độ 20.000 vòng/phút (3 lần, 10 phút/Lần). Cuối cùng, đổ hỗn hợp dung dịch ra đĩa petri, để đóng đá trong ngăn đá tủ lạnh sau đó tiến hành đông khô ở -4°C trong thiết bị FreeZone 2.5 (Labconco, Mỹ) tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam thu được các hạt sản phẩm dạng bột (Bảng 2.2).

Bảng 2.2. Tỷ lệ thành phần và kí hiệu các mẫu hạt tổ hợp Car/C/ALP

STT	Kí hiệu mẫu bột	Carrageenan (g)	Collagen (g)	Allopurinol (g)	KCl (g)
1	ACC19-5	0,01	0,09	0,005	0,001
2	ACC19-10	0,01	0,09	0,01	0,001
3	ACC19-15	0,01	0,09	0,015	0,001
4	ACC28-10	0,02	0,08	0,01	0,001
5	ACC55-10	0,05	0,05	0,01	0,001
6	ACC64-10	0,06	0,04	0,01	0,001

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Phương pháp hiển vi điện tử quét (SEM)

Hình thái, cấu trúc của màng và hạt tổ hợp Car/C/ALP được quan sát và ghi ảnh trên thiết bị hiển vi điện tử quét trường phát xạ (FESEM) (FESEM S-4800, Hitachi, Nhật Bản) trong môi trường khí trơ tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trước khi tiến hành, mẫu được phủ một lớp platin mỏng để không bị tích điện trên bề mặt mẫu.

2.5.2. Phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS)

Các hạt tổ hợp Car/C/ALP được xác định phân bố kích thước hạt trên thiết bị Zetasizer Ver 620 tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Thiết bị dùng một hệ quang học gồm 1 nguồn sáng laser rắn bán dẫn có bước sóng 32 nm và công suất 10 mW, vân phổ đo kích thước 0,6 nm – 6 μm , vân phổ đo thế zeta từ -200 mV đến +200 mV.

2.5.3. Phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của màng và hạt tổ hợp Car/C/ALP được ghi bằng thiết bị phổ hồng ngoại biến đổi Fourier Nexus 670 (Hoa Kỳ) tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các mẫu được quét phổ ở vùng phổ từ 400 cm^{-1} đến 4000 cm^{-1} , với độ phân giải 8 cm^{-1} , số lần quét là 3240 lần. Phổ FTIR được ghi dưới dạng đường cong sau khi đã bù trừ phổ nền của không khí (khi ghi phổ ở dạng màng) hoặc nền KBr (khi ghi phổ ở dạng hạt).

2.5.4. Phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD)

Giản đồ nhiễu xạ tia X của các hạt nano Car/C/ALP được ghi trên máy D8 ADVANCE của hãng Bruker tại Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên – Đại học Quốc gia Hà Nội với bước nhảy $0,03^\circ$, từ 5° đến 70° ở nhiệt độ phòng với anot đồng.

2.5.5. Phương pháp nhiệt lượng quét vi sai (DSC) và phân tích nhiệt khối lượng (TGA)

Giản đồ DSC của màng và hạt tổ hợp Car/C/ALP được ghi trên thiết bị phân tích nhiệt DSC131 (Setaram, Pháp) tại Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên – Đại học Quốc gia Hà Nội trong khoảng nhiệt độ từ nhiệt độ phòng đến 200°C , tốc độ gia nhiệt $10^\circ\text{C}/\text{phút}$, môi trường khí nitơ. Lượng mẫu đo khoảng 6 mg đến 40 mg được cho vào chén bằng nhôm trong thiết bị DSC.

Giản đồ TGA của vật liệu hạt tổ hợp Car/C/ALP (ACC) được ghi trên thiết bị phân tích nhiệt DTG 60H tại Khoa Hóa học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội trong khoảng nhiệt độ từ nhiệt độ phòng đến 600°C , tốc độ gia nhiệt $10^\circ\text{C}/\text{phút}$, môi trường khí nitơ. Giản đồ TGA của collagen được đo từ nhiệt độ phòng đến 600°C , tốc độ gia nhiệt $10^\circ\text{C}/\text{phút}$, môi trường khí nitơ.

2.5.6. Phương pháp phổ hấp thụ tử ngoại – khả kiến (UV-Vis)

Sử dụng thiết bị quang phổ UV – Vis (Cintra 40, GBC, Mỹ) tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam để xây dựng đường chuẩn allopurinol trong các dung dịch đệm và dung dịch NaOH, xác định hiệu suất mang và nồng độ allopurinol được giải phóng từ các mẫu vật liệu tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol trong các dung dịch đệm pH khác nhau và trong dung dịch NaOH.

2.5.7. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là một phương pháp chia tách trong đó pha động là chất lỏng và pha tĩnh chứa trong cột là chất rắn đã được phân chia dưới dạng tiểu phân hoặc một chất lỏng phủ lên một chất mang rắn hay một chất mang đã được biến tính bằng liên kết hóa học với các nhóm chức hữu cơ.

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với các mẫu collagen (trong các điều kiện chiết tách khác nhau từ vảy cá) được thực hiện tại Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia. Mẫu collagen được hòa tan trong acid acetic trước khi ghi phổ sắc ký đồ HPLC (phương pháp thử H.HD.QT.046 và H.HD.QT.112).

Mẫu phân tích sử dụng cột Zorbax Eclipse-AAA và hệ thống HPLC Agilent 1260. Hệ dung môi: Dung môi A - dung dịch đệm Na_2HPO_4 40mM; Dung môi B - hệ ACN:MeOH:H₂O = 40:45:15 (theo thể tích). Nhiệt độ cột 40 °C; tốc độ dòng 1mL/phút.

2.5.8. Phương pháp điện di SDS-PAGE

Điện di trên gel SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE), được thực hiện theo Laemmli [143]. Quá trình điện di được thực hiện với gel acrylamide 12,6%. Kỹ thuật SDS-PAGE cho phép phân tách protein dựa trên chiều dài mạch polypeptide hay nói cách khác là dựa trên khối lượng phân tử. Để làm được điều này, cần sử dụng sodium dodecyl sulfate (SDS) để protein chuyển về cấu trúc bậc 1 và tạo điện tích âm tỷ lệ thuận theo khối lượng (mass-to-charge ratio). Điện tích âm tỷ lệ thuận theo khối lượng sẽ giúp loại bỏ ảnh hưởng của điện tích đến quá trình điện di. Phương pháp được tiến hành tại phòng Hóa sinh protein – viện Công nghệ sinh học, viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Thiết bị và hóa chất cho SDS-PAGE do Bio-Rad (CA, USA) cung cấp.

Để kiểm tra kết quả tách chiết collagen, các bản gel được nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue (CBB). Sau khi ủ với dung dịch nhuộm [0,1% (w/v) CBB, 30% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid] trong 30 phút, bản gel được tẩy rửa bằng dung dịch tẩy [30% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid] cho đến khi có thể quan sát thấy các băng protein. Thành phần và các dung dịch đệm cho phương pháp SDS-PAGE được trình bày trong Bảng 2.3.

Bảng 2.3. Thành phần và các dung dịch đệm SDS-PAGE

Gel gom mẫu 5%	2 mL: 0,5 mL Tris-HCl 0,5 M (pH = 6,8); 10 μ L SDS 10% (w/v); 0,35 mL acrylamide 30% (w/v); 1,3 mL H ₂ O; 20 μ L APS 10% (w/v); 2 μ L TEMED.
Gel phân tách 12,5%	4,5 mL: 1,125 mL Tris-HCl 0,5 M (pH = 6,8); 45 μ L SDS 10% (w/v); 0,9 mL glycerol 50% (v/v); 1,89 mL acrylamide 30% (w/v); 0,55 mL H ₂ O; 30 μ L APS 10% (w/v); 3 μ L TEMED.
Đệm mẫu 5x	60 mM Tris-HCl (pH = 6,8); 2% (w/v) SDS; 25% (v/v) glycerol; 14,4 mM β -mercaptoethanol; 0,1% (v/v) bromophenol blue.
Thang protein chuẩn	β -galactosidase (116); albumin huyết thanh bò (66,2); ovalbumin (45); lactate dehydrogenase (35); endonuclease giới hạn (25); lysozyme (14,4).

2.5.9. Phương pháp sắc ký nano đa chiều và khối phổ (nanoLC-MS/MS)

Các peptide được hòa tan lại trong 30 μ l acid formic 0,1% và được nạp vào cột sắc ký trao đổi cation mạnh (SCX) (LC package, Dionex, Hà Lan) với tốc độ dòng 30 μ l/phút để phân tách ở chiều thứ nhất. Sau đó, các peptide bám cột được rửa giải bằng gradient amonium acetate từ nồng độ từ 10 mM đến 2M (10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM, 1M và 2M). Sau khi loại muối và cô đặc trên cột C18 (LC Packing, Dionex, Netherland), các peptide được nạp vào cột pha đảo C18 (RP) (GraceVydac, Hesperia, CA, USA) với các pha động gồm 0,1% acid formic trong nước (dung dịch đệm A) và acid formic 0,1% trong 85% acetonitril (dung dịch đệm B). Sau đó, các peptide được rửa giải bằng gradient tuyến tính của dung dịch đệm B từ 0% đến 100% với tốc độ dòng 0,2 μ l/phút trong 90 phút.

Phân tích khối phổ đồng thời được thực hiện bằng thiết bị tứ cực/TOF phân mảnh MS/MS sử dụng thiết bị ABI QSTAR®XL (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Ontario, Canada) được trang bị nguồn ion nano-ESI. Thiết bị MS được vận hành ở chế độ ion dương với điện áp phun 2,5 kV. Phạm vi quét của mỗi MS đầy đủ là từ 400 đến 1200 amu, sau đó là sự phân mảnh MS/MS của ba ion peptide tiền chất

manh nhất trong mỗi 1 giây. Phổ MS và MS/MS được ghi lại và xử lý ở chế độ IDA (Thu thập phụ thuộc thông tin) được điều khiển bởi phần mềm Analyst QS (Matrix Science Ltd., London, UK). Protein được tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu NCBIprot.

Phương pháp được tiến hành tại phòng Hóa sinh protein – viện Công nghệ sinh học, viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.6. Giải phóng allopurinol từ màng và hạt tổ hợp Car/C/ALP trong các môi trường pH khác nhau

2.6.1. Xây dựng đường chuẩn của allopurinol trong các dung dịch pH khác nhau

2.6.1.1. Phương trình đường chuẩn của allopurinol trong dung dịch đệm pH 2

pH 2 là pH tương tự pH trong dịch dạ dày. Để xây dựng đường chuẩn của ALP trong dung dịch đệm pH 2, tiến hành ghi phổ UV-VIS của dung dịch ALP trong các dung dịch đệm pH khác nhau trong khoảng bước sóng 200 – 400 nm để xác định bước sóng hấp thụ cực đại (λ_{\max}) của ALP.

Pha dung dịch đệm pH 2: Cân chính xác 5,913 g KCl cho vào bình định mức 500 mL đã được rửa sạch và sấy khô và có sẵn 100 mL nước cất để hòa tan KCl. Sau đó, thêm 1,722 mL dung dịch HCl đặc. Thêm nước cất đến vạch định mức, lắc đều, bảo quản dung dịch đệm trong lọ thủy tinh sạch, tránh ánh nắng trực tiếp.

Cân 0,0068 g ALP và hút 100 mL dung dịch đệm pH 2 cho vào cốc 250 mL đã được rửa sạch và sấy khô (cốc A). Đặt cốc lên máy khuấy từ và tiến hành khuấy liên tục trên máy khuấy tốc độ 400 vòng/phút trong 48 giờ đến khi lượng thuốc trong cốc tan hết. Lấy 6 cốc 100 mL sạch đã được sấy khô.

- Cốc thứ 1: Hút 5 mL dung dịch trong cốc A.
- Cốc thứ 2 (pha loãng 1/2): Hút 5 mL dung dịch trong cốc A thêm 5 mL dung dịch đệm pH 2 đã pha ở trên.
- Cốc thứ 3 (pha loãng 1/3): Hút 5 mL dung dịch trong cốc A thêm 10 mL dung dịch đệm pH 2 đã pha ở trên.
- Cốc thứ 4 (pha loãng 1/4): Hút 5 mL dung dịch trong cốc A thêm 15 mL dung dịch đệm pH 2 đã pha ở trên.
- Đến cốc thứ 5 (pha loãng 1/5): Hút 5 mL dung dịch trong cốc A thêm 20 mL dung dịch đệm pH 2 đã pha ở trên.
- Đến cốc thứ 6 (pha loãng 1/6): Hút 5 mL dung dịch trong cốc A thêm 25 mL dung dịch đệm pH 2 đã pha ở trên.

Tiến hành ghi phổ UV-Vis của ALP trong các dung dịch đệm pH 2 trong khoảng bước sóng 200 – 400 nm để xác định bước sóng hấp thụ cực đại (λ_{\max}) của ALP.

Kết quả thu được bước sóng hấp thụ cực đại của ALP trong dung dịch đệm pH 2 như sau:

Trong dung dịch đệm pH 2; $\lambda_{\max} = 274,98$ nm.

Mật độ quang của ALP trong dung dịch đệm có pH 2 xác định theo phương pháp thêm chuẩn.

2.6.1.2. Xây dựng đường chuẩn của allopurinol trong các dung dịch đệm pH 7,4

pH 7,4 tương tự pH trong dịch ruột. Tương tự như trên, tiến hành xây dựng đường chuẩn của ALP trong dung dịch đệm pH 7,4. Mật độ quang của ALP trong dung dịch đệm pH 7,4 được xác định theo phương pháp thêm chuẩn.

Pha dung dịch đệm pH 7,4: Cân 3,816 g KH_2PO_4 và 0,878 g NaOH vào cốc 500 mL chứa sẵn 300 mL nước cất. Đặt cốc lên máy khuấy từ và tiến hành khuấy liên tục trên máy khuấy tốc độ 400 vòng/phút đến khi lượng chất trong cốc tan hết. Chuyển dung dịch vào bình định mức 500 mL, thêm nước cất đến 500 mL. Lắc đều, bảo quản dung dịch đệm trong lọ thủy tinh sạch, tránh ánh nắng trực tiếp.

Cân 0,0068 g ALP và hút 100 mL dung dịch đệm pH 7,4 cho vào cốc 250 mL đã được rửa sạch và sấy khô (cốc A). Đặt cốc lên máy khuấy từ và tiến hành khuấy liên tục trên máy khuấy tốc độ 400 vòng/phút trong 48 giờ đến khi lượng thuốc trong cốc tan hết. Lần lượt được pha loãng thành 6 cốc như đã nêu ở mục 2.6.1.1.

Tiến hành ghi phổ UV-Vis của ALP trong dung dịch đệm pH 7,4 trong khoảng bước sóng 200 – 400 nm để xác định bước sóng hấp thụ cực đại (λ_{\max}) của ALP trong dung dịch đệm pH 7,4.

Kết quả thu được bước sóng hấp thụ cực đại của ALP trong dung dịch đệm pH 7,4 như sau:

Trong dung dịch đệm pH 7,4; $\lambda_{\max} = 276,69$ nm.

Mật độ quang của ALP trong dung dịch đệm có pH 7,4 xác định theo phương pháp thêm chuẩn.

2.6.1.3. Xây dựng đường chuẩn của allopurinol trong các dung dịch NaOH 1M

Pha dung dịch NaOH 1M: Cân chính xác 20 g NaOH dạng rắn và đong 300 mL

nước cất vào cốc 500 mL đã được rửa sạch và sấy khô. Đặt cốc lên máy khuấy từ và tiến hành khuấy liên tục trên máy khuấy tốc độ 400 vòng/phút đến khi lượng chất trong cốc tan hết. Chuyển dung dịch vào bình định mức 500mL, thêm nước cất đến vạch định mức, lắc đều. Bảo quản dung dịch trong lọ thủy tinh sạch, tránh ánh nắng trực tiếp.

Cân 0,0068 g ALP và hút 100 mL dung dịch NaOH 1 M cho vào cốc 250 mL đã được rửa sạch và sấy khô (cốc A). Đặt cốc lên máy khuấy từ và tiến hành khuấy liên tục trên máy khuấy tốc độ 400 vòng/phút trong 30 phút đến khi lượng thuốc trong cốc tan hết. Lần lượt được pha loãng thành 8 cốc như đã nêu ở mục 2.6.1.1.

Tiến hành ghi phổ UV-Vis của ALP trong dung dịch NaOH 1 M trong khoảng bước sóng 200 – 400 nm để xác định bước sóng hấp thụ cực đại (λ_{\max}) của ALP trong dung dịch NaOH 1 M.

Kết quả xác định bước sóng hấp thụ cực đại của ALP trong dung dịch NaOH 1 M là $\lambda_{\max} = 277,98$ nm.

2.6.2. Xác định hàm lượng allopurinol được mang bởi tổ hợp Car/C

Xác định hiệu suất mang thuốc: Cân chính xác 0,05 g các mẫu vật liệu tổ hợp đã được chế tạo từ trước cho vào cốc 250 mL có chứa 200 mL dung dịch NaOH 1M và tiến hành khuấy từ liên tục 48 giờ với tốc độ 400 vòng/ phút.

Sau khi khuấy 48 giờ liên tục, hút chính xác 10 mL dung dịch tiến hành ghi phổ UV-Vis. Dung dịch nêu trên được ghi phổ UV-Vis. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần lấy giá trị trung bình. Từ số liệu thu được trên phổ UV-Vis, dựa vào phương trình đường chuẩn của ALP trong dung dịch NaOH 1M và bằng phần mềm Excel, tiến hành xác định hàm lượng ALP được mang bởi Car/C.

2.6.3. Xác định khối lượng thuốc allopurinol giải phóng từ vật liệu tổ hợp Car/C/ALP

Cân chính xác 0,05 g ALP cho vào bình nón đựng 200 mL dung dịch đệm. Tiến hành khuấy từ liên tục trong 2 ngày trên máy khuấy từ với tốc độ 400 vòng/phút. Ghi phổ UV-Vis của ALP ở các nồng độ khác nhau bằng cách thêm chuẩn (cách 1 giờ xác định hàm lượng thuốc 1 lần). Cụ thể, sau khi khuấy 1 giờ, hút chính xác 10 mL dung dịch tiến hành ghi phổ UV-Vis, đồng thời bù thêm vào đó 10 mL dung dịch đệm.

Từ số liệu thu được trên phổ UV-Vis, dựa vào phương trình đường chuẩn của ALP trong các dung dịch đệm và bằng phần mềm Excel, ta xác định được hàm lượng ALP trong các dung dịch đệm đó.

Giải phóng ALP từ các màng và hạt tổ hợp được thực hiện đối với các mẫu vật liệu tổ hợp Car/C/ALP trong các dung dịch đệm có pH 2 và pH 7,4. Một lượng nhất định vật liệu tổ hợp được đưa vào trong 200 mL dung dịch đệm ở 37 °C và tiến hành khuấy từ liên tục trong 32 giờ với tốc độ 400 vòng/phút.

Sau khi khuấy 1 giờ, hút chính xác 10mL dung dịch tiến hành ghi phổ UV-Vis, đồng thời bù thêm vào đó 10 mL dung dịch đệm. Sau đó, đo mật độ quang dung dịch đã lọc ở các bước sóng λ_{\max} của ALP các dung dịch đệm. Khối lượng của ALP đã giải phóng được tính theo phương trình đường chuẩn của ALP trong các dung dịch có pH 2 và pH 7,4 (tương ứng với môi trường dịch vị trong dạ dày (pH 2) và ruột non (pH 7,4)).

Phần trăm ALP giải phóng từ các mẫu vật liệu tổ hợp tại thời điểm (t) được tính theo công thức:

$$\% \text{ ALP} = \frac{m_{\text{ALP}}^t}{m_{\text{ALP}}^0} \cdot 100\%$$

Trong đó: m_{ALP}^0 : Khối lượng ALP trong mẫu tổ hợp ban đầu

m_{ALP}^t : Khối lượng ALP giải phóng từ mẫu tổ hợp tại thời điểm t

2.7. Thử nghiệm *in vivo* sử dụng hạt tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol trên cơ thể động vật (chuột bình thường và chuột được tiêm phúc mạc potassium oxalate)

2.7.1. Xác định độc tính cấp của hạt tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol trên chuột được thử nghiệm

2.7.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Chuột nhắt trắng chủng Swiss (18-22 g) được sử dụng trong nghiên cứu này. Chuột không bị hạn chế về thức ăn và nước uống, được nuôi trong phòng thoáng mát và đảm bảo thời gian sáng/tối là 12 giờ. Mọi quy trình thực hiện trong nghiên cứu này tuân thủ đúng hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của Học viện Quân y.

2.7.1.2. Phương pháp nghiên cứu

* Pha dò liều

Tiến hành dò liều theo phương pháp của PGS. Đỗ Trung Đàm (2014) [144]. Cụ thể, cho 2 chuột uống đồng thời liều duy nhất 200 mg/kg hạt tổ hợp Car/C/ALP, theo dõi tình trạng của chuột trong 72 giờ. Kết quả 2 chuột này không chết và không có dấu hiệu nhiễm độc. Do đó, chúng tôi tiếp tục sử dụng 2 chuột tiếp theo và cho mỗi chuột uống liều duy nhất 500 mg/kg hạt tổ hợp Car/C/ALP, theo dõi trong 72 giờ. Do chuột không chết nên chúng tôi tiếp tục cho 2 chuột khác uống một liều duy nhất 1000 mg/kg hạt tổ hợp Car/C/ALP và theo dõi 72 giờ tiếp theo. Sau 72 giờ, cả 2 chuột trên không chết nên chúng tôi tiếp tục cho uống liều tan tối đa của tổ hợp Car/C/ALP là 1500 mg/kg trên 2 chuột nhất trắng khác, theo dõi tình trạng chuột sau 72 giờ. Sau 72 giờ, chuột không có dấu hiệu nhiễm độc hay chết nên chúng tôi chuyển sang bước tiếp theo.

* Pha thử độc tính

30 chuột nhất được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm (mỗi nhóm 10 con). Chuột ở mỗi nhóm được uống hạt tổ hợp Car/C/ALP ở các liều duy nhất là 200 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg và 1500 mg/kg. Theo dõi tình trạng nhiễm độc hoặc tỷ lệ chết trên chuột ở các nhóm trong thời gian 72 giờ. Sau đó, chuột được phẫu thuật lấy gan, thận và lách để đánh giá hình ảnh đại thể và vi thể.

2.7.2. Xác định độc tính bán trường diễn của hạt tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol trên chuột được thử nghiệm

2.7.2.1. Đối tượng nghiên cứu

30 chuột cống trắng chủng Wistar (trọng lượng 170-240 g) do Trung tâm Động vật, Học viện Quân y cung cấp. Chuột được nuôi trong phòng thí nghiệm thoáng mát với chu kỳ sáng/tối 24 giờ và không hạn chế thức ăn và nước uống. Chuột được đưa về phòng thí nghiệm trước khi thử nghiệm 5-7 ngày để làm quen với môi trường mới. Mọi qui trình nghiên cứu tuân thủ theo hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của Học viện Quân y.

2.7.2.2. Phương pháp nghiên cứu.

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm:

- Nhóm 1 (n=10): nhóm chứng, chuột được cho uống nước muối sinh lý.
- Nhóm 2 (n=10): nhóm trị 1, chuột được uống hạt tổ hợp Car/C/ALP với liều 200 mg/kg (chứa 20 mg/kg ALP).

- Nhóm 3 (n=10): nhóm trị 2, chuột được uống hạt tổ hợp Car/C/ALP với liều 1000 mg/kg (chứa 1000 mg/kg ALP).

Chuột được cho uống hạt tổ hợp hàng ngày vào 8 giờ sáng bằng dụng cụ chuyên dụng cho chuột uống thuốc. Chuột được cho uống thuốc và uống nước muối sinh lý với thể tích tương đương nhau (0,1 mL cho 20 g thể trọng).

Theo dõi tình trạng chuột trong 10 phút, 30 phút, 60 phút và 4 giờ đầu đầu tiên và theo dõi hàng ngày trong 28 ngày liên tiếp. Ngày thứ 29, chuột được phẫu thuật để đánh giá hình ảnh đại thể và vi thể gan, thận và lách.

2.7.2.3. Các chỉ tiêu nghiên cứu

Tình trạng chung của chuột: vận động, đi lại, tình trạng lông, đặc biệt là sự phát triển cân nặng trước và sau uống hạt tổ hợp. Các chỉ số này được theo dõi 2 tuần một lần.

Chỉ số huyết học: Số lượng hồng cầu, nồng độ hemoglobin, số lượng bạch cầu, công thức máu, hematocrits, các chỉ số hồng cầu, số lượng tiểu cầu. Các chỉ số huyết học được đánh giá trước và sau 14 ngày và 28 ngày sau uống hạt tổ hợp.

Chỉ số sinh hóa: men gan (ALT và AST huyết tương) và men thận (ure và creatinin huyết tương). Các chỉ số sinh hóa được đánh giá trước và sau 14 ngày và 28 ngày sau uống hạt tổ hợp.

Mô học: Hình ảnh đại thể và vi thể của gan, thận và lách sau uống hạt tổ hợp 28 ngày.

2.7.2.4. Phân tích số liệu

Cân nặng cơ thể, các chỉ số huyết học và sinh hóa được phân tích bằng phương pháp so sánh thống kê phương sai hai nhân tố có lặp.

Cân nặng cơ thể, cân nặng gan, thận và lách, các chỉ số huyết học và sinh hóa được phân tích bằng phương pháp so sánh thống kê phương sai hai nhân tố có lặp.

2.7.3. Khảo sát tác dụng của hạt tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol đến sự giảm nồng độ urat/acid uric trong máu của các loại chuột được thử nghiệm

2.7.3.1. Đối tượng nghiên cứu

240 chuột nhắt trắng chủng Swiss (cân nặng 18-23 g) được cung cấp bởi Trung tâm động vật, Học viện Quân y. Chuột được đưa về nuôi tại phòng thí nghiệm 1 tuần trước khi gây mô hình tăng acid uric và đánh giá tác dụng. Chuột không bị hạn chế về thức ăn và nước uống trong quá trình thí nghiệm. Mọi quy trình

thí nghiệm đều tuân theo hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật của Học viện Quân y.

2.7.3.2. Phân nhóm động vật nghiên cứu

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm nghiên cứu như sau:

- Nhóm 1, nhóm chứng trắng (n=60): Chuột được uống nước muối sinh lý.
- Nhóm 2, nhóm chứng bệnh (n=60): Chuột được uống potassium oxalate liều 250 mg/kg để tăng uric máu.
- Nhóm 3, nhóm ALP (n=60): Chuột được uống potassium oxalate liều 250 mg/kg, sau 1 giờ cho uống ALP 30 mg/kg.
- Nhóm 4, nhóm nano-ALP (n=60): Chuột được uống potassium oxalate liều 250 mg/kg, sau 1 giờ cho uống hạt tổ hợp Car/C/ALP 30 mg/kg.

2.7.3.3. Phương pháp gây tăng acid uric trên thực nghiệm

Chuột được cho uống dung dịch Potassium oxalate liều 250 mg/kg vào khoảng 8 giờ sáng hàng ngày, theo phương pháp của Fei và cộng sự (2016) [145]. Chuột được uống potassium oxalate liên tục 7 ngày. Ở ngày thứ 7, một giờ sau khi uống potassium oxalate, chuột được cho uống ALP liều 30 mg/kg, hạt tổ hợp Car/C/ALP liều 30 mg/kg (tính theo ALP) hoặc nước muối sinh lý. Ở các thời điểm 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 16 giờ và 24 giờ sau uống thuốc hoặc nước muối sinh lý, 10 chuột ở mỗi nhóm được lấy tối đa máu từ hốc mắt chuột, ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ 4 °C và được định lượng acid uric bằng máy sinh hóa tự động tại Viện nghiên cứu Y Dược học, Học viện Quân y.

2.7.3.4. Các chỉ số nghiên cứu

Các chỉ số được phân tích liên quan đến tác dụng của tổ hợp Car/C/ALP so với ALP đến nồng độ acid uric máu gồm:

- Sự thay đổi cân nặng ở các nhóm nghiên cứu
- Tỷ lệ chuột chết trong quá trình làm thí nghiệm
- Khoảng dao động và nồng độ acid uric máu trung bình ở các nhóm nghiên cứu.
- Mức tăng nồng độ acid uric máu ở nhóm chứng bệnh (gây mô hình), được xác định bằng công thức:

$$\text{Mức tăng acid uric} = \frac{C_{uric}}{C_{uric}^0}$$

Trong đó: C_{uric} : Nồng độ acid uric nhóm chứng bệnh.

C_{uric}^0 : Nồng độ acid uric nhóm chứng trắng.

- Phần trăm gây giảm acid uric máu ở nhóm ALP và nhóm nano-ALP được xác định theo công thức:

$$\% \text{ Giảm acid uric} = \frac{C_{uric/ALP} - C_{uric}}{C_{uric}^0} \times 100 \%$$

Trong đó: $C_{uric/ALP}$: Nồng độ acid uric nhóm ALP (nano).

- Sự thay đổi nồng độ acid uric máu giữa các nhóm nghiên cứu.

2.7.3.5. Phân tích số liệu

Các chỉ số nghiên cứu được phân tích bằng thuật toán thống kê phù hợp trên phần mềm SPSS20.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được xác định với $p < 0,05$.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Trích ly collagen từ vẩy cá nước ngọt

3.1.1. Ảnh hưởng của dung dịch kiềm đến xử lý vẩy cá thu collagen

Các Bảng 3.1 và 3.2 là kết quả đánh giá trực quan vẩy cá theo thời gian xử lý và nồng độ dung dịch NaOH.

- Từ kết quả khảo sát 5 mẫu hỗn hợp vẩy cá ở Bảng 3.1 bằng trực quan có thể thấy mẫu số 3 (thời gian xử lý là 8 giờ) có nhiều ưu điểm hơn cả: vẩy cá sạch, lượng collagen thu được tương đương với mẫu 4 nhưng tiết kiệm được thời gian hơn.

- Quá trình xử lý vẩy bằng máy khuấy cơ có nhiều thuận lợi hơn máy khuấy từ: Tốc độ khuấy lớn, dung dịch đồng đều hơn, diện tích tiếp xúc lớn hơn so với sử dụng máy khuấy từ, không cần phải cắt nhỏ vẩy cá tiết kiệm thời gian và công sức hơn.

Bảng 3.1. Đánh giá trực quan vẩy cá theo thời gian xử lý bằng dung dịch NaOH 0,5 M

STT	Khối lượng hỗn hợp vẩy cá (g)	Thời gian xử lý (giờ)	Kết quả thu được
1	5	5	Vẩy không sạch
2	5	6	Vẩy tương đối sạch. lượng collagen thu được ít
3	5	8	Vẩy sạch, trắng. Lượng collagen thu được nhiều hơn
4	5	10	Vẩy sạch, trắng. Lượng collagen thu được tương đương mẫu 3
5	5	12	Vẩy sạch, trắng, mềm. Thu được rất ít collagen

Từ Bảng 3.2 ta thấy sử dụng dung dịch NaOH 0,5 M, thời gian ngâm 8 giờ là thích hợp nhất, vẩy sạch hết bụi bẩn và protein, lượng kiềm sử dụng và thải ra môi trường ít hơn so với sử dụng dung dịch NaOH 1 M.

Bảng 3.2. Đánh giá trực quan vẩy cá theo nồng độ dung dịch NaOH sau 8 giờ

STT	Khối lượng hỗn hợp vẩy cá (g)	Nồng độ NaOH (M)	Kết quả thu được
1	5	0,2	Vẩy không sạch
2	5	0,5	Vẩy sạch
3	5	1,0	Vẩy sạch, mềm

3.1.2. Ảnh hưởng của hỗn hợp acid đến xử lý vẩy cá thu collagen

Vẩy cá nước ngọt Việt Nam sau khi được xử lý sơ bộ và xử lý kiềm được tiến hành các bước xử lý tiếp theo (các bước 3 – 4) với các điều kiện trích ly thu collagen được trình bày trong Bảng 3.3. Có thể thấy khối lượng collagen thu được khi xử lý 5 g vẩy cá với dung dịch hỗn hợp acid H_2SO_4 0,5 M + HCl 0,2 M và dung dịch CH_3COOH 0,5 M lớn hơn so với các nồng độ dung dịch acid khác. Vì vậy, dung dịch hỗn hợp acid H_2SO_4 0,5 M + HCl 0,2 M và dung dịch CH_3COOH 0,5 M là các dung dịch có nồng độ thích hợp cho quá trình xử lý vẩy cá thu collagen (Bảng 3.3).

Bảng 3.3. Hiệu suất thu collagen được khi xử lý bằng dung dịch acid ở các nồng độ khác nhau

Mẫu	Hỗn hợp acid sử dụng ở bước 3 (thu HAp)	Acid sử dụng ở bước 4 (thu collagen thô)	m_{Collagen} (g)	H_{Collagen} (%)
Mẫu 1	H_2SO_4 0,75 M+ HCl 0,1 M	CH_3COOH 0,5 M	0,185	3,70
Mẫu 2	H_2SO_4 0,5 M+ HCl 0,2 M		0,450	9,00
Mẫu 3	H_2SO_4 1 M + citric 1 M		0,043	0,86
Mẫu 4	H_2SO_4 0,5 M+ HCl 0,075 M		0,208	4,16
Mẫu 5	H_3PO_4 0,5 M + HCl 0,075 M		0,202	2,00
Mẫu 6	H_3PO_4 0,5 M + HCl 0,5 M		0,226	4,50
Mẫu 7	H_3PO_4 0,5 M + H_2SO_4 0,5 M		0,210	4,20

Quá trình thẩm tích trong vòng 48 giờ loại bỏ hầu hết lượng muối ăn và các ion kim loại còn lẫn trong collagen, do vậy, thu được collagen có độ tinh khiết cao hơn.

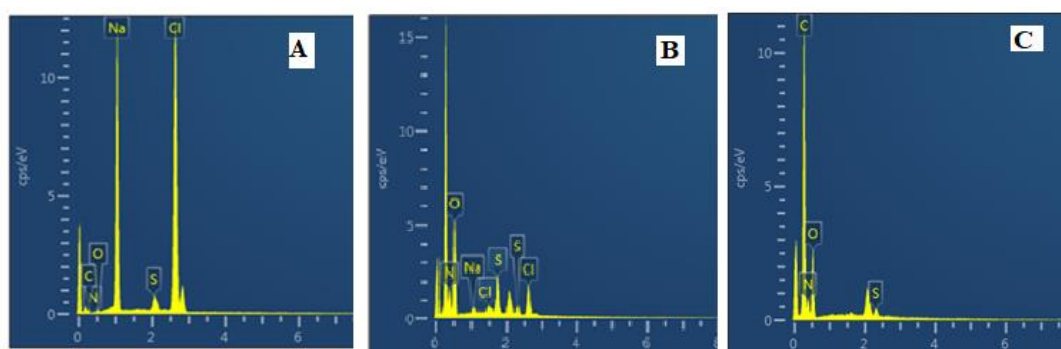
Hiệu suất thu collagen thô thu được là 9,00 % khi xử lý vẩy cá bằng hỗn hợp dung dịch NaOH 0,5 M trong bước 2, dung dịch gồm H_2SO_4 0,5 M và HCl 0,2 M trong bước 3 và dung dịch CH_3COOH 0,5 M trong bước 4. Do đó, lựa chọn dung dịch NaOH 0,5 M trong bước 2, dung dịch gồm H_2SO_4 0,5 M và HCl 0,2 M trong bước 3 và dung dịch CH_3COOH 0,5 M trong bước 4 để xử lý vẩy cá nhằm giảm thời gian xử lý vẩy cá, giảm lượng chất thải ra môi trường và tiết kiệm chi phí sản xuất.

3.1.3. Xác định độ tinh khiết và hàm lượng các acid amin trong collagen thu được từ hỗn hợp vảy cá

Để xác định độ tinh khiết của collagen thu được từ hỗn hợp vảy cá, sử dụng phương pháp phổ tán xạ năng lượng tia X (EDX) để xác định thành phần các nguyên tố trong mẫu. Hình 3.1 là phổ EDX của mẫu collagen thu được từ quá trình xử lý vảy cá. Tỷ lệ khối lượng các nguyên tố trong collagen thô được thống kê trong Bảng 3.4.

Ngoài các nguyên tố chính C, O và N, trong thành phần của collagen thô còn có cả các nguyên tố S, Na và Cl. Điều này là do các tinh thể NaCl sử dụng trong quá trình kết tinh bị kết tinh cùng vào trong các sợi collagen nên mẫu collagen thu được vẫn ở dạng thô, lượng tạp chất còn nhiều. Hàm lượng NaCl lẫn vào collagen thô lên tới 84,24 %. Ngoài ra, ichthylepidin – một protein trong vảy cá, tỷ lệ giữa collagen và ichthylepidin khoảng 4:1 – 3:1 [146] có chứa nguyên tố S nên hàm lượng nguyên tố S = 0,5 % chứng tỏ ichthylepidin cũng được kết tủa cùng collagen trong quá trình chiết tách collagen.

Sau 24 giờ thẩm tích, ngoài các nguyên tố chính C, O và N, trong thành phần của protein – collagen vẫn còn có các nguyên tố Na và Cl và S. Hàm lượng S giảm từ 0,50 % xuống còn 0,28 % cho thấy ichthylepidin đã bị thẩm tích một phần. Tuy nhiên, hàm lượng NaCl vẫn còn tới 33,58 %. Sau 48 giờ thẩm tích đã loại bỏ hết lượng NaCl và hầu hết S, như vậy trong mẫu protein không còn lẫn NaCl và ichthylepidin (một protein chứa S và có trong vảy cá).



Hình 3.1. Phổ EDX của collagen thô (A); collagen thẩm tích sau 24 giờ (B) và collagen thẩm tích sau 48 giờ (C)

Bảng 3.4. Tỷ lệ khối lượng (%) các nguyên tố trong collagen trước và sau khi thẩm tích

Nguyên tố	Collagen thô	Collagen thẩm tích 24 giờ	Collagen thẩm tích 48 giờ
C	11,38	40,86	55,41
O	2,23	10,76	28,55
N	1,65	6,91	15,46
S	0,50	0,28	0,08
Cl	50,56	20,87	0
Na	33,68	12,71	0
Tổng	100,00	100,00	100

Bảng 3.5 trình bày kết quả nghiên cứu thành phần acid amin trong collagen trích ly từ vây cá họ cá chép Việt Nam (Kết tinh lần 1) và so sánh với collagen từ các nguồn vây cá khác được hòa tan trong acid chiết xuất từ vây cá chép Trung Quốc [147, 148]. Theo Muiyonga cùng cộng sự [149] và Sira cùng cộng sự [150], môi trường sống của cá ảnh hưởng mạnh đến thành phần acid amin trong collagen chiết xuất từ các loài cá. Phương pháp thử nghiệm H.HD.QT.046 (HPLC); H.HD.QT.112 (HPLC) (chỉ đối với tryptophan) và H.HD.QT.046 (HPLC) (xác định hàm lượng collagen) cho thấy protein thu được từ vây cá chép Việt Nam có chứa collagen và 18 acid amin (chưa định lượng hydroxyproline) với hàm lượng cao là threonine, proline, acid glutamic, arginine, serine, alanine và glycine; cũng như một lượng rất thấp methionine, tryptophan và tyrosine. Mặc dù hàm lượng glycine là cao nhất và xuất hiện trong cả da, xương và vây cá, nó tồn tại chủ yếu trên da cá [151]. Collagen chiết xuất từ vây cá chép có thể chứa cysteine hoặc không, do sự khác biệt về môi trường sống. Collagen chiết xuất từ vây cá (họ cá Chép tại Việt Nam) có sự khác biệt về thành phần acid amin so với các collagen vây cá chép khác; sự xuất hiện của tryptophan ít gặp nhất trong tất cả 20 amino acid và có thể là thành phần của collagen [148, 149]. Hàm lượng cao acid glutamic, arginine và hàm lượng trung bình của glyxin và alanin tương tự với collagen của cá Thu thu được bởi Sun và cộng sự [152]. Các acid amin thiết yếu đều có trong collagen thu được từ vây cá (họ cá Chép tại Việt Nam) như threonine (39,79 %), cysteine (1,38 %), lysine (1,00 %), leucine và isoleucine (0,91 % và 0,51 %), phenylalanine (0,65 %), valine (0,61 %), methionine (0,47 %).

Bảng 3.5. Hàm lượng các acid amin trong dung dịch collagen (Kết tinh lần 1) thu được từ vảy cá họ cá Chép tại Việt Nam

STT	Acid amin	Collagen từ vảy cá họ cá Chép tại Việt Nam		Collagen vảy cá Chép hòa tan trong acid [148]		Collagen vảy cá Chép Trung Quốc [149]	
		mg/mL	%	Cặn thô/1000	%	Cặn thô/1000	%
1	Threonine	1,704	39,79	21	2,05	23	2,25
2	Proline	0,487	11,37	110	10,74	115	11,23
3	Glutamic acid	0,550	12,84	77	7,52	76	7,42
4	Arginine	0,425	9,92	50	4,88	55	5,37
5	Serine	0,357	8,34	38	3,71	35	3,42
6	Alanine	0,218	5,09	117	11,43	119	11,62
7	Glycine	0,140	3,27	306	29,88	336	32,81
8	Aspartic acid	0,099	2,31	49	4,79	48	4,69
9	Cysteine	0,059	1,38	32	3,13	-	-
10	Histidine	0,047	1,10	6	0,59	5	0,49
11	Lysine	0,047	1,00	26	2,54	26	2,54
12	Leucine	0,039	0,91	24	2,34	21	2,05
13	Phenylalanine	0,028	0,65	15	1,46	12	1,17
14	Valine	0,026	0,61	19	1,86	19	1,86
15	Isoleucine	0,022	0,51	12	1,17	9	0,88
16	Methyline	0,020	0,47	12	1,17	14	1,37
17	Tryptophan	0,012	0,28	-	-	-	-
18	Tyrosine	0,007	0,16	21	2,05	3	0,20
19	Hydroxyproline	-	-	89	8,69	77	7,52
20	Hydroxylysine	-	-	-	-	8	0,87
21	Collagen	0,29	6,77				

Từ Bảng 3.5 có thể thấy hàm lượng glycine có trong mẫu collagen thu được từ vảy cá họ cá Chép tại Việt Nam sau khi kết tinh lần 1 thấp hơn so với hàm lượng glycine có trong collagen của vảy cá chép Trung Quốc điều này có thể do trong collagen thu được từ vảy cá họ cá chép Việt Nam còn lẫn một phần nhỏ protein khác. Do vậy, để thu được collagen có độ tinh khiết cao hơn tiến hành kết tinh lại 2 lần và tiến hành kiểm tra tỷ lệ hàm lượng glycine/proline thu được kết quả như Bảng 3.6.

Từ Bảng 3.6 nhận thấy tỷ lệ giữa glycine/proline $\approx 2,81$ (có trong collagen kết tinh lần 2), tỷ lệ này phù hợp với tỷ lệ giữa glycine/proline có trong collagen vảy cá Chép hòa tan trong acid (tỷ lệ glycine/proline $\approx 2,78$) [148] và có trong collagen vảy cá Chép Trung (tỷ lệ glycine/proline $\approx 2,92$) Quốc [149]. Phép thử không xác định tryptophan, nên cũng chưa kết luận được tryptophan có trong thành phần collagen hay không. Như vậy để thu được collagen có độ tinh khiết cao, collagen tách từ vảy cá họ cá Chép tại Việt Nam cần được kết tinh lại 2 lần và thẩm tích 48 giờ để loại bỏ tạp chất.

Bảng 3.5. Tỷ lệ các acid amin (theo diện tích peak) trong collagen kết tinh lần 2 thu được từ vảy cá họ cá Chép tại Việt Nam

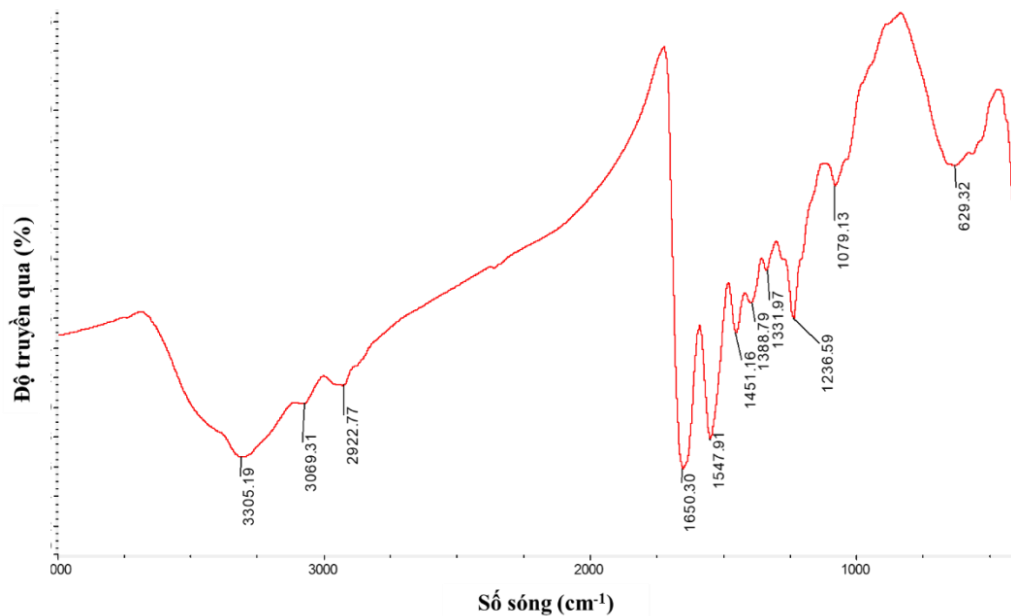
STT	Acid amin	Thời gian lưu (giây)	Tỷ lệ theo diện tích peak (%)	STT	Acid amin	Thời gian lưu (giây)	Tỷ lệ theo diện tích peak (%)
1	Aspartate	3,386	2,388	10	Cystine	26,963	0,585
2	Glutamate	7,328	2,222	11	Valine	29,474	0,260
3	Serine	13,178	0,963	12	Methionine	30,172	3,326
4	Histidine	16,865	1,205	13	Phenylalanine	33,241	0,613
5	Glycine	17,244	2,911	14	Isoleucine	33,647	1,967
6	Threonine	17,582	1,419	15	Leusine	34,998	1,788
7	Arginine	20,545	7,184	16	Lysine	37,075	0,400
8	Alanine	20,857	16,612	17	Proline	41,984	1,035
9	Tyrosine	24,838	1,508				

3.1.4. Đặc trưng, tính chất và hình thái cấu trúc của collagen thu được từ hỗn hợp vảy cá họ cá chép

3.1.4.1. Phổ hồng ngoại biến đổi (FT-IR)

Hình 3.2 là phổ FT-IR của collagen tinh (đã thẩm tích sau 48 giờ) thu được từ hỗn hợp vảy cá. Có thể nhận thấy vân phổ hấp thụ đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm N-H ở số sóng $3305,19 \text{ cm}^{-1}$. Ngoài ra, vân đặc trưng cho dao động biến dạng của amide bậc 1, bậc 2 và bậc 3 lần lượt là $1650,3 \text{ cm}^{-1}$; $1547,91 \text{ cm}^{-1}$ và $1236,59 \text{ cm}^{-1}$. Cường độ tín hiệu của amide bậc 1 là tín hiệu của cấu trúc bậc 2 của chuỗi peptide và liên kết hydro giữa N-H (vị trí X) và C=O (Gly); amide bậc 2 là tương ứng cho dao động uốn của liên kết N-H kết hợp với dao động kéo của liên

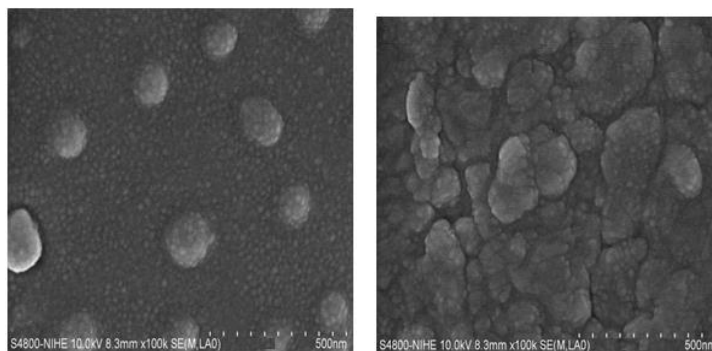
kết C–N và C–H; amide bậc 3 là tín hiệu dao động uốn của liên kết N–H kết hợp với dao động kéo của liên kết C–N và dao động của cấu trúc xoắn ba của collagen [153]. Các vân phổ hấp thụ này của collagen thu được là tương tự như những vân phổ hấp thụ của collagen khác [147, 150, 154]. Mặt khác, dao động hóa trị và dao động biến dạng của C–H được tìm thấy ở các pic 2934,38 cm^{-1} , 1452,06 cm^{-1} và 1337,66 cm^{-1} . Các pic của dao động hóa trị và dao động biến dạng của collagen là thấp hơn dao động N–H tự do. Điều này cho thấy các nhóm amit tham gia vào các liên kết hydro trong mỗi phân tử collagen và độ hấp thụ giữa amit bậc 3 và liên kết CH đã chứng minh cấu trúc xoắn của collagen vẫn được duy trì [147].



Hình 3.2. Phổ FTIR của collagen sau thâm tích 48 giờ

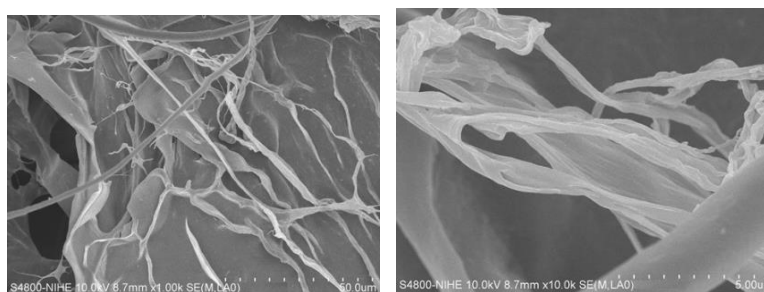
3.1.4.2. Hình thái cấu trúc của collagen

Ảnh SEM của collagen thô ở độ phóng đại 100.000 lần được trình bày trên Hình 3.3. Có thể thấy collagen có cấu trúc không đồng nhất do lượng muối ăn còn lẫn quá nhiều, trong đó, có hình dạng của các tinh thể muối ăn (các hạt nhỏ lấm tấm trên bề mặt) do sử dụng nhiều NaCl trong quá trình kết tinh và NaCl bị lẫn giữa các sợi trong cấu trúc của collagen.



Hình 3.3. Ảnh SEM của collagen thô ở độ phóng đại 100.000 lần

Hình 3.4 là ảnh SEM của collagen tinh sau khi thẩm tích 48 giờ. Có thể thấy collagen thu được không còn NaCl và có cấu trúc dạng sợi điển hình [147, 155], đường kính sợi 0,5 – 1 μm , các sợi collagen tập trung thành bó sợi, kích thước 2,5 – 4 μm .



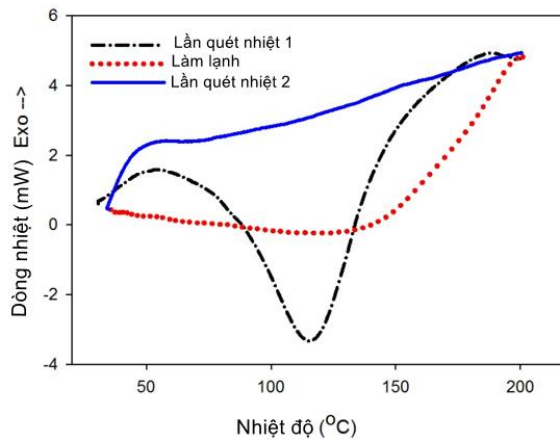
Hình 3.4. Ảnh SEM ở các độ phóng đại 1.000 và 10.000 lần của collagen tinh sau khi thẩm tích 48 giờ

3.1.4.3. Tính chất nhiệt của collagen tinh thu được từ vây cá

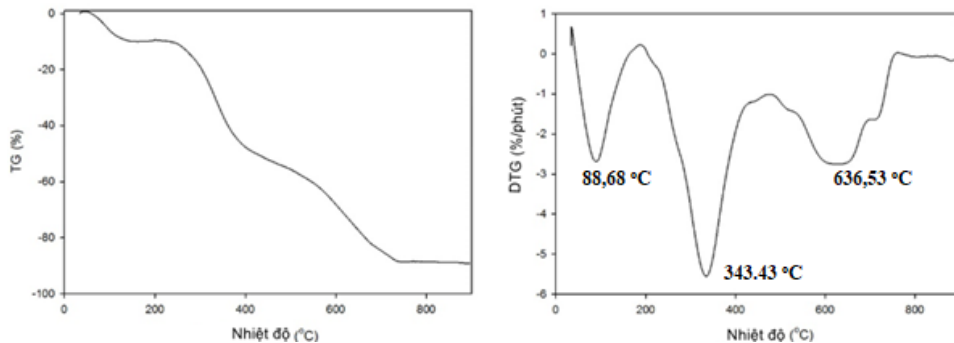
Giản đồ DSC của collagen và các đặc trưng nhiệt của collagen được trình bày trên Hình 3.5 với 1 pic thu nhiệt ở 116 $^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 3,7 \text{ J/g}$), tương ứng với quá trình chuyển cấu trúc của collagen từ dạng chuỗi xoắn 3 chiều sang dạng rối cuộn. Kết quả này tương tự như sự chuyển đổi cấu trúc thu nhiệt của collagen khô từ dạng xoắn ốc sang dạng trạng thái cuộn trong nghiên cứu của Capella-Monsonís và cộng sự ở nhiệt độ 108,97 $^{\circ}\text{C}$ và thu nhiệt cao nhất ở 116,94 $^{\circ}\text{C}$ [155].

Giản đồ TG và DTG của collagen trên Hình 3.6 cho thấy collagen bị tổn hao khối lượng theo 3 bước. Bước đầu tiên có nhiệt độ phân hủy cực đại ở 88,68 $^{\circ}\text{C}$, tổn hao 10,32 % khối lượng, tương ứng với sự mất nước trong collagen. Bước thứ 2 có nhiệt độ phân hủy cực đại ở 334,43 $^{\circ}\text{C}$, tổn hao 44,32 % khối lượng, tương ứng với sự phân hủy của các protein trong collagen. Bước thứ 3 có nhiệt độ phân hủy cực đại ở 636,53 $^{\circ}\text{C}$, tổn hao 34,55 % khối lượng, tương ứng với sự phân hủy của các

vòng thơm trong các amino acid mạch vòng trong collagen, sự cháy của C thành CO₂ [156, 157].



Hình 3.5. Giải đồ DSC của mẫu collagen tinh

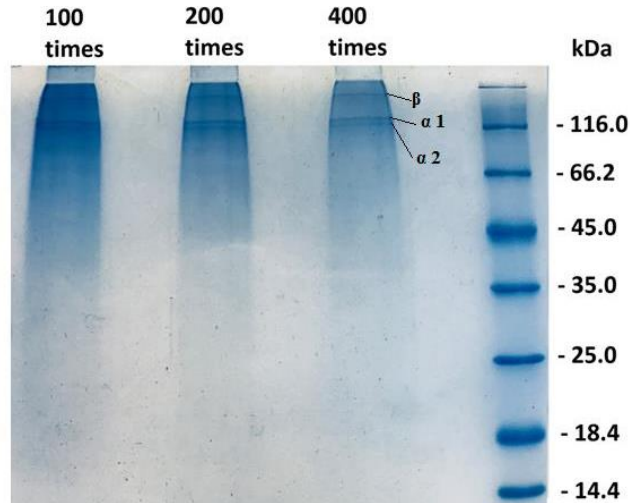


Hình 3.6. Giải đồ TG và DTG của mẫu collagen tinh

3.1.4.4. Nhận diện collagen thu được từ vảy cá

Kết quả điện di (SDS-PAGE) mẫu collagen cho thấy, collagen thu được là collagen loại I với chuỗi $\alpha 1$ và $\alpha 2$ tương ứng với 139 và 129 kDa và một chuỗi β . Cường độ tương đối của vân phổ $\alpha 1$ cao hơn của vân phổ $\alpha 2$, vì vậy, có thể đề xuất rằng collagen thu được từ vảy cá (họ cá chép) là collagen loại I có thành phần là $(\alpha 1)2\alpha 2$. Sự tồn tại của một chuỗi β trong collagen là phổ biến ở các loại cá trên, chuỗi β có thể được tạo thành từ liên kết chéo giữa hai mạch alpha do vậy, khối lượng phân tử của chuỗi β lớn hơn hẳn so với hai chuỗi α (khối lượng ngoài thang đo nên chưa xác định được chính xác). Collagen vảy cá là collagen loại I và bao gồm chuỗi $\alpha 1$ (132,04 kDa) và $\alpha 2$ (120,06 kDa) (loại $(\alpha 1)2\alpha 2$) [154]. Collagen vảy cá chép Trung Quốc cũng được xếp vào loại collagen loại I (loại $(\alpha 1)2\alpha 2$) với 2 chuỗi α ($\alpha 1 = 117,3$ kDa và $\alpha 2 = 107,4$ kDa) [148]. Trong một tài liệu khác,

collagen được trích ly từ vây cá chép Trung Quốc là collagen loại I với 2 chuỗi $\alpha 1$ và $\alpha 2$ chuỗi, trong đó khối lượng phân tử của $\alpha 2$ chính xác là 116 kDa [147]. Sự khác biệt về khối lượng phân tử của 2 chuỗi α trong collagen có thể là do các nguồn khác nhau của vây cá (Hình 3.7).



Hình 3.7. Kết quả điện di SDS-Page của collagen

3.1.4.5. Trình tự acid amin trong collagen tinh thu được từ vây cá

Kết quả xác định trình tự acid amin bằng phương pháp điện di SDS-Page kết hợp phổ khối lượng dựa trên cơ sở dữ liệu NCBIprot đã xác định và nhận diện được 5 protein thuộc nhóm protein da-vây (collagen) của họ cá có hệ số bắt cặp lớn, trong đó hypothetical protein cypCar_00045321[Cyprinus carpio] có chỉ số bắt cặp lớn nhất (318).

- Protein: hypothetical protein cypCar_00045321, partial [Cyprinus carpio]

- + Số protein trong cơ sở dữ liệu: KTF73577.1
- + Điểm số protein: 318
- + Khối lượng (M_r) (Da): 115674
- + pI được tính toán: 9,18

- Protein: collagen type I alpha 2 [Carassius auratus]

- + Số protein trong cơ sở dữ liệu: BAG72201.1
- + Điểm số protein: 294
- + Khối lượng (M_r): 127652
- + pI được tính toán: 9,41

- Protein: collagen type I alpha 1 [Ctenopharyngodon idella]

- + Số protein trong cơ sở dữ liệu: ADK35755.1
- + Điểm số protein: 231
- + Khối lượng (M_r): 138104
- + pI được tính toán: 5.44

- Protein: collagen alpha-1(I) chain isoform XI [Pygocentrus nattereri]

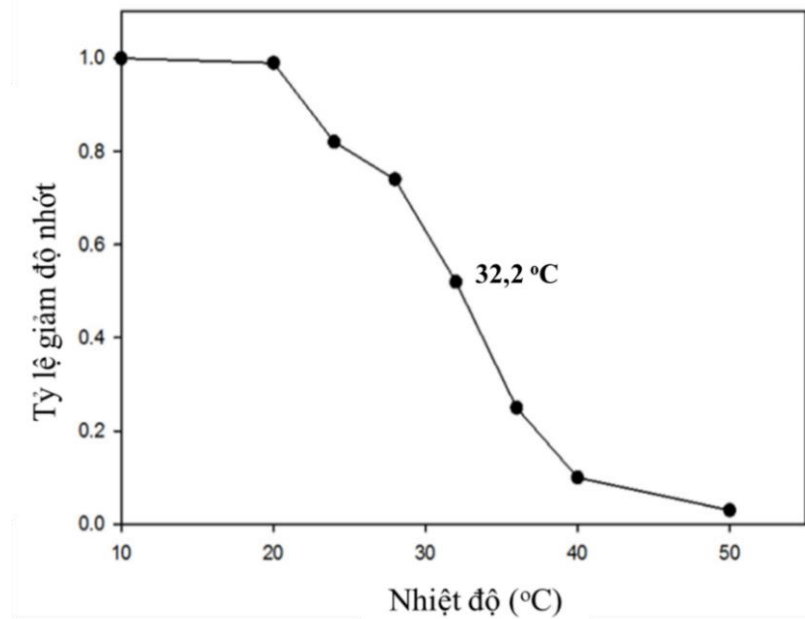
- + Số protein trong cơ sở dữ liệu: XP_017540674.1
- + Điểm số protein: 149
- + Khối lượng (M_r): 137928
- + pI được tính toán: 5,46

- Protein: hypothetical protein cypCar_00006571 [Cyprinus carpio]

- + Số protein trong cơ sở dữ liệu: KTG43775.1
- + Điểm số protein: 101
- + Khối lượng (M_r): 136996
- + pI được tính toán: 5,60

3.1.4.6. Nhiệt độ biến tính của collagen tinh thu được từ vây cá

Nhiệt độ biến tính của collagen là nhiệt độ tại đó độ nhớt của dung dịch collagen giảm xuống một nửa [137, 138]. Xác định nhiệt độ biến tính của collagen tinh khiết theo phương pháp của Nagai và cộng sự [159]. Có thể thấy collagen thu được có nhiệt độ biến tính ở 32,2 °C (Hình 3.8). Giá trị này tương tự như nhiệt độ biến tính của collagen hòa tan trong acid của vây cá chép vùng nhiệt đới 32,9 °C [136] nhưng khác với collagen hòa tan trong acid của vây cá chép vùng nước lạnh 28 °C [137]. Sự khác biệt về nhiệt độ biến tính của các loài cá nhiệt đới và các loài cá nước lạnh được giải thích bằng sự khác nhau về nhiệt độ cơ thể và môi trường sống của cá. Nhiệt độ biến tính collagen của một số loài cá nhiệt đới khác như cá hồng mắt to và cá hồng sọc nâu được xác định ở 30,4 °C và 31,5 °C [140]. Collagen thu được từ vây cá họ cá chép có nhiệt độ biến tính khá cao có khả năng ứng dụng đầy hứa hẹn trong ngành công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.



Hình 3.8. Đồ thị phản ánh sự phụ thuộc của phần độ nhớt của collagen vào nhiệt độ

Từ kết quả về đặc trưng, tính chất của collagen thu được từ hỗn hợp vảy cá họ cá chép ở Việt Nam ta thấy collagen có độ tinh khiết cao (> 98%), chứa 18 loại acid amin và có nhiệt độ biến tính khá cao. Loại collagen này được sử dụng để chế tạo các mẫu tổ hợp carrageenan/collagen mang allopurinol sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Màng tổ hợp carragennan/collagen/allopurinol

3.2.1. Hiệu suất mang allopurinol của các màng tổ hợp carrageenan/collagen

3.2.1.1. Đường chuẩn của allopurinol trong dung dịch NaOH 1 M

Kết quả xác định bước sóng hấp thụ cực đại của ALP trong dung dịch NaOH 1 M là $\lambda_{max} = 277,98$ nm.

Dựa vào phần mềm Excel, tìm được phương trình đường chuẩn của ALP trong dung dịch NaOH 1 M là $y = 8621,6x + 0,2358$. Trong đó, x là nồng độ của ALP trong dung dịch NaOH 1 M (mol/L), y là mật độ quang A. Hệ số hồi quy tuyến tính $R^2 = 0,9962$ (≈ 1) cho thấy sự phụ thuộc tuyến tính mật độ quang theo nồng độ dung dịch NaOH 1 M tại $\lambda_{max} = 277,98$ nm. Vì vậy, có thể sử dụng phương trình đường chuẩn này để tiến hành khảo sát hiệu suất mang thuốc ALP trong các mẫu tổ hợp Car/C/ALP.

3.2.1.2. Xác định hiệu suất mang allopurinol của màng tổ hợp Car/C/ALP

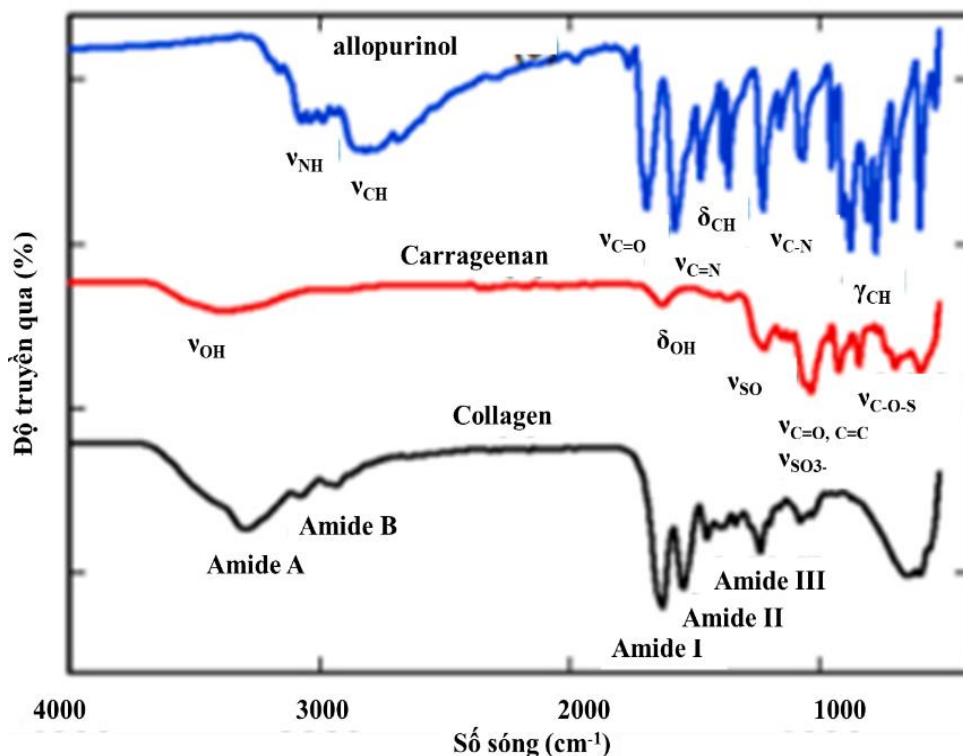
Để xác định hiệu suất mang ALP của màng tổ hợp Car/C/ALP, mẫu màng được hòa tan trong dung dịch NaOH 1 M sau đó tiến hành ghi phổ UV – Vis. Kết quả xác định hiệu suất mang ALP của các mẫu màng tổ hợp Car/C với 5% khối ALP (theo tổng khối lượng polyme) chế tạo ở các hàm lượng chất tạo gel KCl (0,5 %; 1 %; 2% và 5 %) khác nhau lần lượt là 28,35 %; 74,31 %; 46,3 % và 47,42 %. Có thể thấy hàm lượng KCl có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất mang ALP của màng tổ hợp. Hiệu suất mang của mẫu màng sử dụng chất tạo gel KCl 1% cao hơn hẳn so với các mẫu màng tổ hợp còn lại. Điều này có thể do 1 % KCl là hàm lượng tối ưu để tạo liên kết ngang với carrageenan và hình thành hệ gel carrageenan. Với hàm lượng KCl cao hơn có thể làm gel bị cứng do dư thừa các ion K^+ và ion này phân tán và hệ gel làm giảm khả năng hấp phụ ALP. Còn với hàm lượng nhỏ hơn 1 % KCl, lượng ion tạo gel thấp làm hệ gel trở lên kém bền vững. Do đó, lựa chọn hàm lượng KCl là 1 % cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Phổ FTIR của màng tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol

Hình 3.9 là phổ FTIR của ALP, Car và C. Các vân phổ đặc trưng cho dao động của nhóm amide của collagen xuất hiện ở 3294 cm^{-1} (amide A), 3076 cm^{-1} (amide B), 1630 cm^{-1} (amide I), 1546 cm^{-1} (amide II) và 1236 cm^{-1} (amide III) trên phổ IR của collagen [153, 155]. Quan sát phổ FTIR của Car trong Hình 3.9, một vân phổ rộng nằm trong khoảng $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ và một vân phổ sắc nét ở 1636 cm^{-1} là tín hiệu dao động hóa trị và dao động biến dạng của liên kết O-H trong nhóm hydroxyl trong Car trong khi các vân phổ yếu ở 2950 cm^{-1} và 1373 cm^{-1} đặc trưng cho dao động kéo dãn và dao động biến dạng của liên kết C-H. Vân phổ hấp thụ mạnh ở 1223 cm^{-1} là của dao động kéo dài của liên kết S=O trong nhóm este sulfate của Car. Ngoài ra, các vân phổ ở 843 cm^{-1} đặc trưng cho liên kết của nhóm C–O–SO₃ của D-galactose-4-sulfate trong Car. Mặt khác, dao động hóa trị của liên kết C–C và C–O được tìm thấy ở 1036 và 1154 cm^{-1} . Một vân phổ ở 925 cm^{-1} có thể được quy cho liên kết C–O của 3,6-anhydro-D-galactose [22, 109, 160].

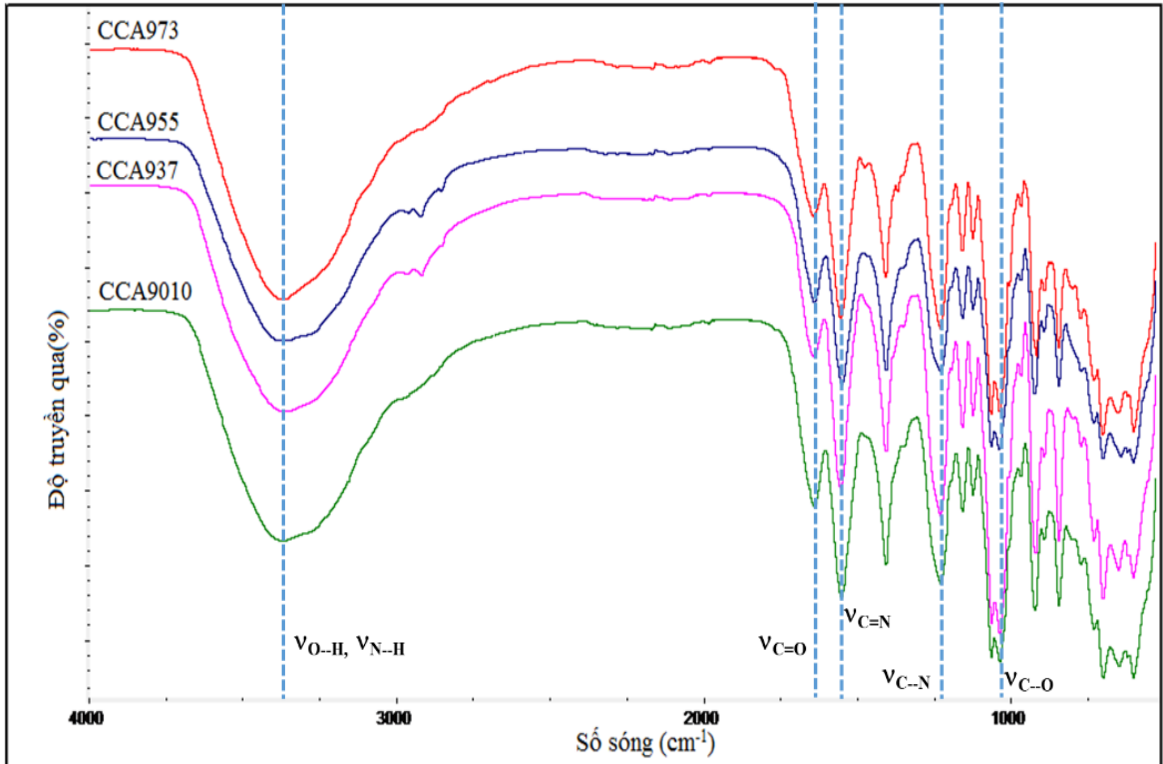
Phổ hồng ngoại của ALP (Hình 3.9) xuất hiện vân phổ của nhóm đặc trưng cho ALP: vân phổ hấp phụ ở 3165 và 3074 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của

NH, vân phổ 3030 cm^{-1} là dao động kéo dài của CH trong vòng pyrimidine, các vân phổ ở 1765 và 1694 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C=O của ketone, dao động của liên kết C-N ở 1226 cm^{-1} và các vân phổ ở $1476, 951, 878, 777\text{ cm}^{-1}$ là dao động biến dạng của các liên kết CH [162].



Hình 3.9. Phổ FTIR của ALP, Car và C

Hình 3.10 là phổ FTIR của các màng tổ hợp Car/C/ALP với các tỉ lệ Car/C 97/3, 95/5, 93/7, 90/10 cùng sử dụng KCl 1% và mang 5% ALP. Có thể thấy vị trí các vân đặc trưng cho các nhóm chức trong phổ FTIR của các mẫu màng này tương tự nhau. Như vậy, KCl không ảnh hưởng nhiều đến dao động của các nhóm đặc trưng trong màng tổ hợp. Tuy nhiên, có sự khác biệt nhỏ với mẫu màng tổ hợp sử dụng KCl 1%. Trên phổ FTIR mẫu màng tổ hợp CCA973 với các vân phổ hấp thụ đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm O-H, N-H của amit bậc 2 ở 3371 cm^{-1} , nhóm C=O ở 1642 cm^{-1} , nhóm C=N ở 1564 cm^{-1} , nhóm C-N ở 1229 cm^{-1} , C-O ở 1065 cm^{-1} . Như vậy, từ phổ FTIR có thể thấy, trong màng tổ hợp CCA973, có tương tác hydro giữa nhóm amide trong collagen với các nhóm hydroxyl, amine trong Car và ALP rõ và mạnh hơn so với các mẫu còn lại.



Hình 3.10. Phổ FTIR của màng tổ hợp CCA

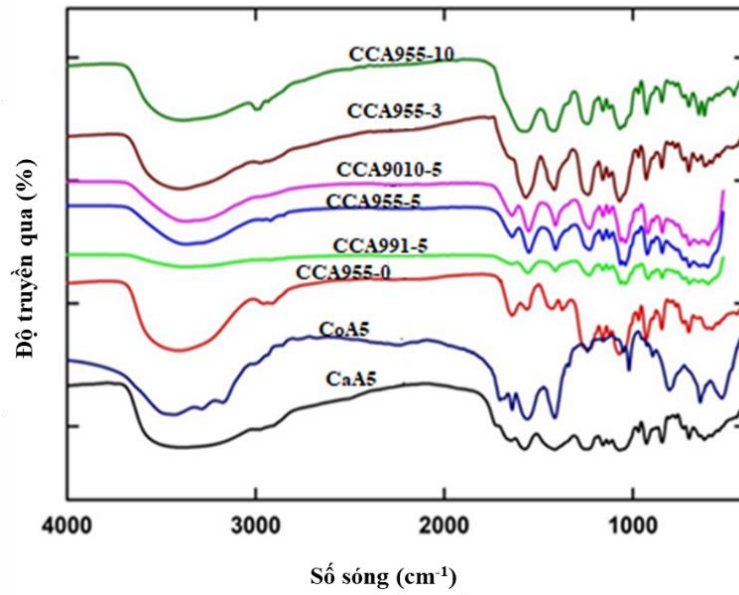
Khi tổ hợp Car/C mang ALP vị trí các vân phổ của các nhóm đặc trưng trong từng phần bị thay đổi, cụ thể như sau: Với carrageenan, dao động hóa trị của nhóm O–H từ 3392 cm^{-1} dịch chuyển xuống 3371 cm^{-1} , dao động hóa trị nhóm C=O từ 1636 cm^{-1} dịch chuyển lên 1642 cm^{-1} , nhóm C–O từ 1154 cm^{-1} dịch chuyển xuống 1065 cm^{-1} . Với collagen: dao động hóa trị nhóm O–H từ 3294 cm^{-1} dịch chuyển lên 3371 cm^{-1} , dao động biến dạng của nhóm amit bậc 1 từ 1630 cm^{-1} dịch chuyển lên 1642 cm^{-1} . Với ALP: dao động hóa trị của nhóm N–H từ 3169 cm^{-1} dịch chuyển lên 3371 cm^{-1} , nhóm C=N ở 1580 cm^{-1} dịch chuyển xuống 1564 cm^{-1} , nhóm C–N ở 1226 cm^{-1} dịch chuyển lên 1229 cm^{-1} . Sự dịch chuyển vị trí các vân phổ của các nhóm đặc trưng trong phổ FTIR của màng tổ hợp CCA liên quan tới các tương tác giữa collagen, carrageenan, ALP như liên kết hydro và tương tác lưỡng cực–lưỡng cực giữa nhóm amin và OH trong ALP và collagen với nhóm cacboxyl và nhóm sulfate trong carrageenan.

Bảng 3.7. Số sóng (cm^{-1}) đặc trưng của các nhóm chức chủ yếu trong màng tổ hợp CCA tỷ lệ carrageenan và collagen thay đổi

	$\nu_{\text{O-H}}, \nu_{\text{N-H}}$	$\nu_{\text{C=O}}$	$\nu_{\text{C=N}}$	$\nu_{\text{C-N}}$	$\nu_{\text{C-O}}$
CCA973-5	3371	1642	1564	1229	1065
CCA955-5	3370	1640	1551	1231	1040
CCA937-5	3362	1642	1555	1236	1039
CCA9010-5	3372	1640	1553	1239	1039

Ngoài ra, vân phổ nhọn đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm S=O ở 2360 cm^{-1} trong Car có dạng tù hơn với đỉnh vân phổ ở vị trí 2165 cm^{-1} trong màng tổ hợp. Điều này chứng tỏ nhóm sulfate trong Car đã hình thành tương tác tĩnh điện với nhóm amine được proton hóa của collagen. Khi thay đổi hàm lượng collagen, vị trí số sóng đặc trưng cho các nhóm chức trong màng tổ hợp có sự chênh lệch nhỏ. Mẫu chứa 5% collagen có sự chuyển dịch số sóng đặc trưng của các nhóm như C=O, C=N, C-O là lớn nhất. Có thể, trong màng tổ hợp chứa 5 % collagen, khả năng hình thành tương tác giữa collagen với Car và ALP là mạnh nhất.

Tương tự, phổ FTIR của màng tổ hợp với các tỉ lệ Car/C và hàm lượng ALP khác nhau trên Hình 3.11 cũng cho thấy phổ FTIR của màng 3 thành phần với tỷ lệ khác nhau của Car/C/ALP. Vân phổ đặc trưng của các nhóm chức trong Car, collagen và ALP trong các màng tổ hợp đều xuất hiện đầy đủ. Các vân phổ đặc trưng cho dao động của các nhóm amide trong collagen không có trong phổ FTIR của CaA-5 trong khi chúng xuất hiện trong phổ IR của CoA-5. Vân phổ đặc trưng cho dao động của nhóm carbonyl trong ALP không xuất hiện trong phổ IR của CC955-0. Nói chung, dao động của các nhóm chức trong màng tổ hợp sinh học CCA giống nhau nhưng vị trí và diện tích vân phổ thay đổi thay đổi so với collagen nguyên chất, Car và ALP (Bảng 3.8). Điều này cho thấy Car, collagen và ALP có thể tương tác với nhau thông qua liên kết hydro, giả thuyết này được mô tả trong Hình 3.12. Tỷ lệ Car/C có ảnh hưởng không đáng kể đến sự dao động của các nhóm chức trong màng tổ hợp CCA trong khi sự gia tăng hàm lượng ALP có thể tăng độ truyền qua của nhóm carbonyl.

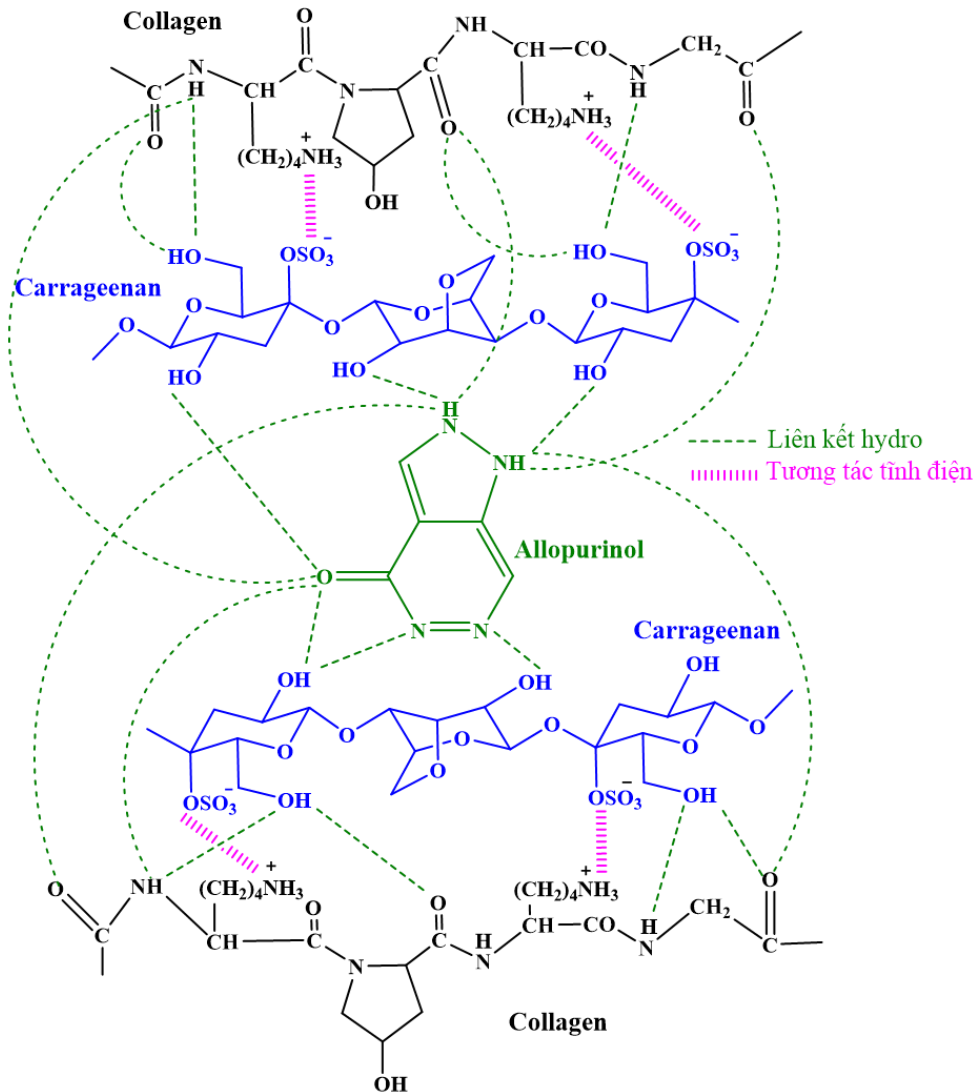


Hình 3.11. Phổ FTIR của màng tổ hợp CCA ở các tỉ lệ Car/C và ALP khác nhau

Bảng 3.8. Số sóng (cm^{-1}) đặc trưng của các nhóm chức chủ yếu trong màng tổ hợp

Car/C/ALP

Mẫu	$\nu_{\text{OH, NH}}$, $\nu_{\text{amide A}}$	ν_{CH} , δ_{CH} $\nu_{\text{amide B}}$	$\nu_{\text{C=O, C=C}}$, $\nu_{\text{amide I, II}}$, δ_{OH}	$\nu_{\text{C=N}}$, $\nu_{\text{amide II}}$	$\nu_{\text{S=O, C-N}}$, $\nu_{\text{amide III}}$	$\nu_{\text{C=O}}$, $\nu_{\text{C-C}}$	$\nu_{\text{C-O-SO}_3}$
Car	3000 - 3600	2950, 1373	1636	-	1223	1154, 1036	843
Collagen	3294	3076, 2934, 1452	1630	1546	1236	1079, 1032	-
ALP	3165, 3074	3030, 1476	1765, 1694	1580	1226	-	-
CoA-5	3431, 3288	1413	1704, 1639	1557	1240	1068, 1020	-
CaA-5	3168, 3380	2918, 2851, 1425	1638	1558	1225	1157, 1036	843
CCA9550	3405	2960, 1429, 1375	1640	1563	1232	1159, 1071	846
CCA9915	3371	2922, 2851, 1411	1645	1556	1230	1158, 1040	844
CCA9555	3370	2921, 2848, 1409	1640	1551	1230	1158, 1040	844
CCA90105	3372	2950, 1410	1640	1553	1229	1158, 1039	844
CCA9553	3397	2972, 1416	1761, 1652	1567	1237	1158, 1069	846
CCA95510	3388	3000, 2932, 1416	-	1572	1238	1158, 1068	846

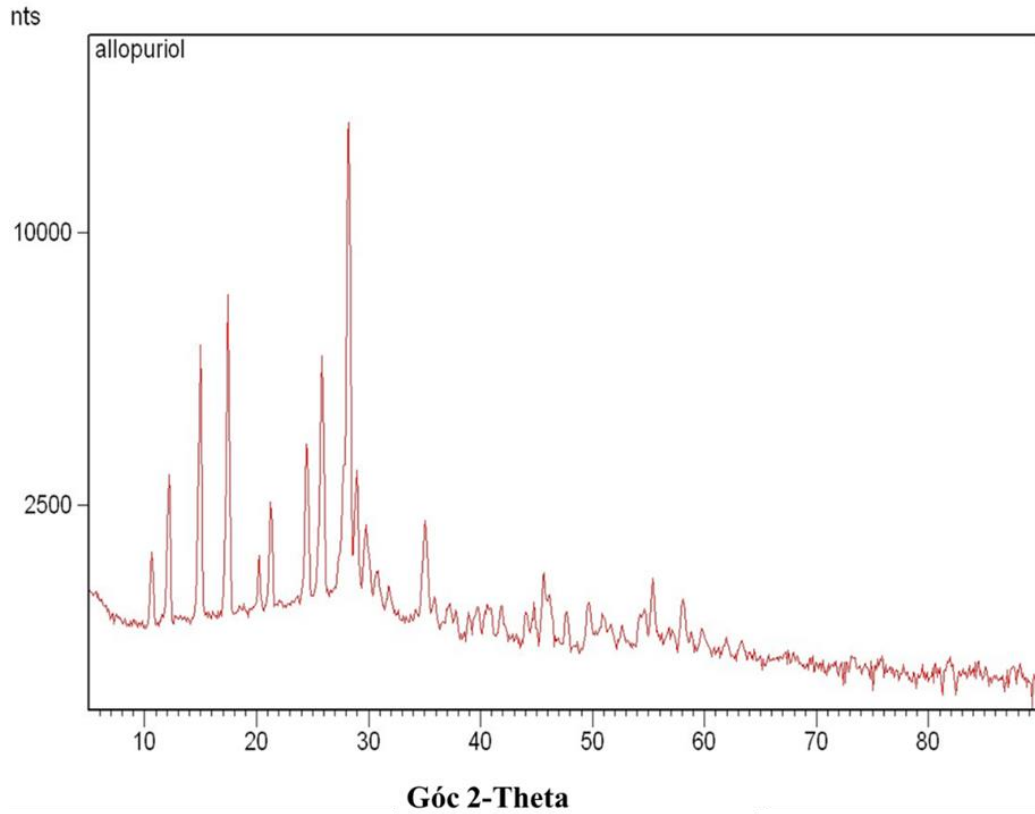


Hình 3.12. Một số giả thuyết tương tác trong màng tổ hợp Car/C/ALP

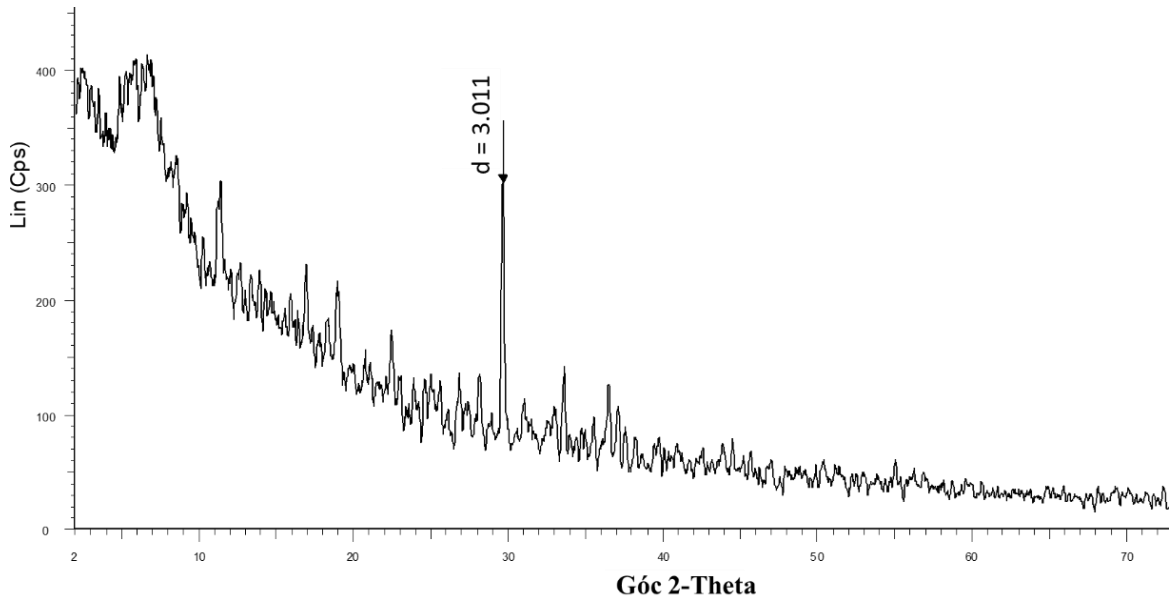
3.2.3. Nhiễu xạ tia X (XRD)

Hình 3.13 là giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD) của ALP. Có thể thấy ALP có cấu trúc tinh thể với sự xuất hiện của góc nhiễu xạ ở $10,66^\circ$; $12,16^\circ$; $14,96^\circ$; $17,46^\circ$; $20,26^\circ$; $21,26^\circ$; $24,46^\circ$; $25,86^\circ$; $28,26^\circ$; $35,06^\circ$, phù hợp với kết quả công bố của Gurpreet [157].

Khi được mang bởi tổ hợp Car/C (95/5) và dùng 1% chất tạo gel KCl, các pic, góc nhiễu xạ của ALP có sự dịch chuyển đáng kể (Hình 3.14). Điều này cho thấy ALP đã được mang bởi tổ hợp Car/C và có dạng vô định hình dễ hòa tan [158]. Các polyme và ALP đã tương tác với nhau thông qua các tương tác vật lý như liên kết hydro và tương tác lưỡng cực – lưỡng cực.



Hình 3.13. Giản đồ XRD của ALP

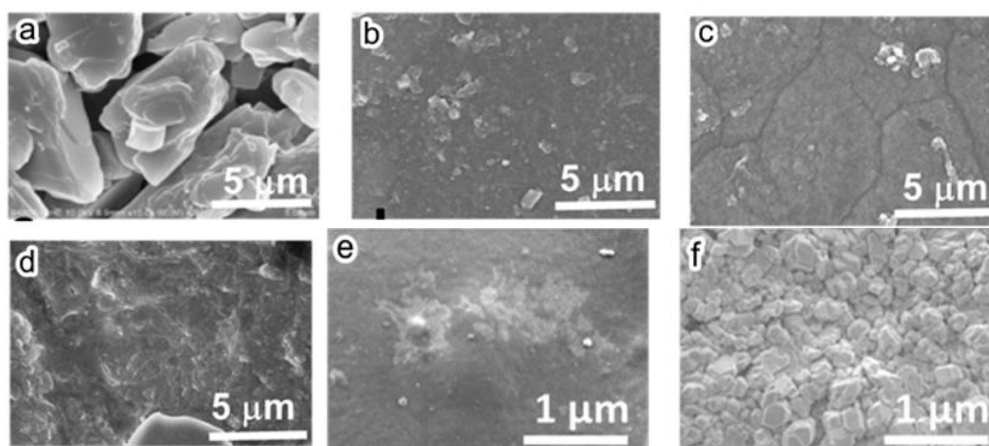


Hình 3.14. Giản đồ XRD của màng tổ hợp Car/C/ALP ở tỉ lệ Car/C = 95/5, 1% KCl

3.2.4. Ảnh SEM của màng tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol

Quan sát Hình 3.15, có thể thấy ALP phân tán trong màng tổ hợp Car/C/ALP với kích thước khoảng 50 nm – 100 nm. Với tỉ lệ Car/C = 99/1 (Hình 3.15 b) và 90/10 (Hình 3.15 d), màng tổ hợp có cấu trúc không đồng đều, một số hạt màu sáng hơn xuất hiện trên bề mặt màng. Mẫu màng tổ hợp với tỉ lệ Car/C = 95/5 có cấu trúc đồng đều hơn cả, không xuất hiện các hạt sáng trên bề mặt màng tổ hợp. Đối với mẫu chứa 1% collagen (Hình 3.15 b), kích thước hạt ALP phân tán trong các polyme của màng tổ hợp với kích thước khoảng 50 – 350 nm. Đối với mẫu chứa 5 % collagen: kích thước hạt ALP phân tán trong các polyme của màng tổ hợp khoảng 100 nm. Đối với mẫu chứa 10 % collagen (Hình 3.15 d): kích thước hạt ALP phân tán trong các polyme của màng tổ hợp khoảng 50 nm.

Khi thay đổi hàm lượng ALP trong màng tổ hợp, hình thái cấu trúc của màng bị ảnh hưởng đáng kể. Mẫu chứa 5 % ALP (Hình 3.15 c) có cấu trúc đồng đều hơn so với mẫu chứa 3 % (Hình 3.15 e) và 10 % ALP (Hình 3.15 f), đặc biệt là mẫu chứa 10 % ALP, thuốc và polyme tương tác kém với nhau nên ALP có xu hướng kết tụ dưới dạng hình khối với mật độ lớn phân tán trong nền polyme (Hình 3.15 f).

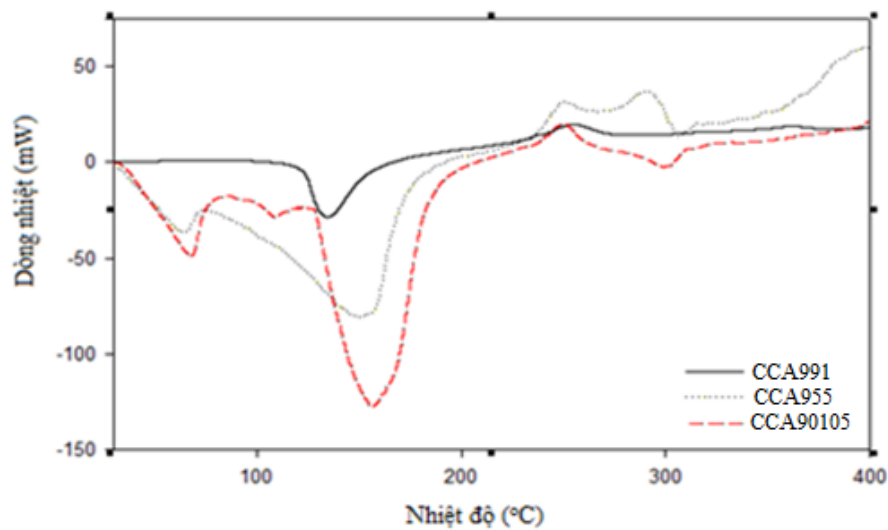


Hình 3.15. Ảnh SEM của các màng tổ hợp Car/C/ALP, chất tạo gel KCl 1 %: ALP (a), CCA991-5 (b), CCA955-5 (c), CCA9010-5 (d), CCA955-3 (e) và CCA955-10 (f)

3.2.5. Độ bền nhiệt màng tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol

Hình 3.16 là giản đồ DSC của của màng tổ hợp Car/C/ALP ở các tỉ lệ Car/C 99/1; 95/1 và 90/10, chất tạo gel KCl 1 %. Có thể thấy khi tăng hàm lượng collagen trong mẫu, cường độ pic thu nhiệt ở khoảng 40 – 70 °C tăng lên. Tỷ lệ Car/C có ảnh

hưởng đáng kể đến các đặc trưng nhiệt của mẫu màng tổ hợp Car/C/ALP. Ở hàm lượng 1 % collagen, không quan sát thấy sự bay hơi của ẩm và sự nóng chảy của collagen. Có thể do hàm lượng collagen quá nhỏ nên thiết bị đo không xác định được. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng collagen lên 5 và 10 %, pic đặc trưng cho sự bay hơi ẩm và nóng chảy của collagen thể hiện rõ ràng lần lượt ở 61 °C và 66 °C. Đối với mẫu chỉ chứa 1 % collagen, pic thu nhiệt đặc trưng cho sự nóng chảy của carrageenan xuất hiện ở 134 °C. Khi tăng hàm lượng collagen trong mẫu, vị trí pic nóng chảy dịch chuyển lên 150 °C và 155 °C, tương ứng với mẫu chứa 5 và 10 % collagen. Nhiệt độ phân hủy của carrageenan và collagen giảm khi tăng hàm lượng collagen trong mẫu. Cụ thể, với mẫu chứa 1 % collagen, nhiệt độ phân hủy của mẫu là 254 °C. Khi tăng hàm lượng collagen lên 5 và 10 %, nhiệt độ phân hủy của mẫu tương ứng là 250 °C và 249 °C. Ngoài ra, ở hàm lượng 10 % collagen, xuất hiện pic thu nhiệt ở 299 °C, tương ứng với sự nóng chảy của ALP.



Hình 3.16. Giản đồ DSC của màng tổ hợp Car/C/ALP (5 %)

Quan sát giản đồ DSC trên Hình 3.16 và dữ liệu ở Bảng 3.9, có thể thấy sự thay đổi nhiệt độ nóng chảy của các thành phần trong các mẫu màng tổ hợp như sau:

Pic thu nhiệt 1 xuất hiện trong tất cả các mẫu màng 3 thành phần tương ứng với nhiệt độ biến tính của collagen. Giá trị này ứng với mẫu collagen tinh khiết là 73,01 °C. Mẫu chứa 1 % collagen có nhiệt độ biến tính cao nhất ở 73,47 °C, sau đó đến mẫu chứa 10 % collagen (nhiệt độ biến tính 66,37 °C) và mẫu chứa 5%

collagen có nhiệt độ biến tính thấp nhất (61,19 °C). Điều này cho thấy mẫu 5 % collagen có sự tương tác mạnh hơn với carrageenan nên nhiệt độ biến tính của collagen thay đổi nhiều hơn.

Píc thu nhiệt thứ 2 trên giản đồ DSC của màng tổ hợp Car/C/ALP tương ứng với sự nóng chảy của carrageenan. Giá trị này ứng với carrageenan ban đầu là 118,05 °C. Khi thay đổi hàm lượng collagen trong mẫu, giá trị nhiệt nóng chảy của carrageenan cũng thay đổi. Cụ thể, mẫu chứa 1 %, 5 % và 10 % collagen, nhiệt độ nóng chảy của carrageenan trong màng tổ hợp lần lượt là 151,45 °C; 157,90 °C; và 153,67 °C. Rõ ràng là collagen có tương tác với carrageenan dẫn đến sự thay đổi nhiệt độ nóng chảy của carrageenan trong các mẫu (tăng nhiệt độ nóng chảy và nhiệt nóng chảy của carrageenan trong màng tổ hợp).

Píc thu nhiệt thứ 3 trên giản đồ DSC của các màng tổ hợp tương ứng với sự nóng chảy của ALP. Ở dạng nguyên chất, ALP có nhiệt độ nóng chảy ở 390 °C nhưng khi đưa vào màng tổ hợp, nhiệt độ nóng chảy của ALP giảm xuống còn 276,71 °C (ở mẫu chứa 5 % collagen), 287,10 °C (ở mẫu chứa 10 % collagen), 311,09 °C (ở mẫu chứa 1 % collagen). Điều này là do tương tác giữa ALP và carrageenan như trình bày ở mục 3.2.2. Ngoài ra, ALP, carrageenan và collagen cũng đã tương tác với nhau nên khi thay đổi hàm lượng collagen, nhiệt độ nóng chảy của ALP và carrageenan đều thay đổi.

Trên giản đồ DSC của các mẫu màng tổ hợp 3 thành phần cũng quan sát thấy 1 píc tỏa nhiệt tương ứng với sự phân hủy của carrageenan và collagen trong vật liệu tổ hợp. Nhiệt độ phân hủy của mẫu màng tổ hợp chứa 5 % collagen là cao nhất chứng tỏ mẫu màng này bền nhiệt hơn so với các mẫu còn lại.

Bảng 3.9. Các đặc trưng nhiệt của màng tổ hợp CCA

Mẫu	Píc thu nhiệt 1		Píc thu nhiệt 2		Píc tỏa nhiệt		Píc thu nhiệt 3
	T _{nc} (°C)	ΔH (J/g)	T _{nc} (°C)	ΔH(J/g)	T _p (°C)	ΔH(J/g)	T _{nc} (°C)
CCA991-5	–	–	134,56	604,46	254,19	-174,24	-
CCA955-5	63,00	51,946	150,67	788,70	250,34	-148,13	289,95
CCA9010-5	66,77	137,022	155,921	865,54	249,83	-62,451	299,64

3.2.6. Nghiên cứu giải phóng allopurinol từ màng tổ hợp Car/C/ALP (CCA) trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4

3.2.6.1. Phương trình đường chuẩn của allopurinol trong dung dịch đệm pH 2

Dung dịch đệm pH 2 có môi trường pH tương tự trong dịch dạ dày. Để xây dựng đường chuẩn của ALP trong dung dịch đệm pH 2, tiến hành ghi phổ UV-VIS của dung dịch ALP trong dung dịch đệm pH 2 trong khoảng bước sóng từ 200 – 400 nm để xác định bước sóng hấp thụ cực đại (λ_{\max}) của ALP. Kết quả thu được bước sóng hấp thụ cực đại của ALP trong dung dịch đệm pH 2 là $\lambda_{\max} = 274,98$ nm.

Dựa vào phần mềm Excel, xác định được phương trình đường chuẩn của ALP trong dung dịch đệm pH 2 là $y = 9756,9x - 0,3267$ với hệ số hồi quy tuyến tính $R^2 = 0,991$. Trong đó, x là nồng độ của ALP (mol/Lit) trong dung dịch đệm, y là mật độ quang A.

Giá trị hệ số hồi quy $R^2 = 0,991$ (≈ 1) cho thấy sự phụ thuộc tuyến tính mật độ quang theo nồng độ dung dịch tại $\lambda_{\max} = 274,98$ nm. Vì vậy, có thể sử dụng phương trình đường chuẩn này để tiến hành khảo sát nồng độ ALP giải phóng từ vật liệu tổ hợp Car/C/ALP sau các khoảng thời gian ngâm mẫu trong dung dịch đệm pH 2.

3.2.6.2. Phương trình đường chuẩn của allopurinol trong dung dịch đệm pH 7,4

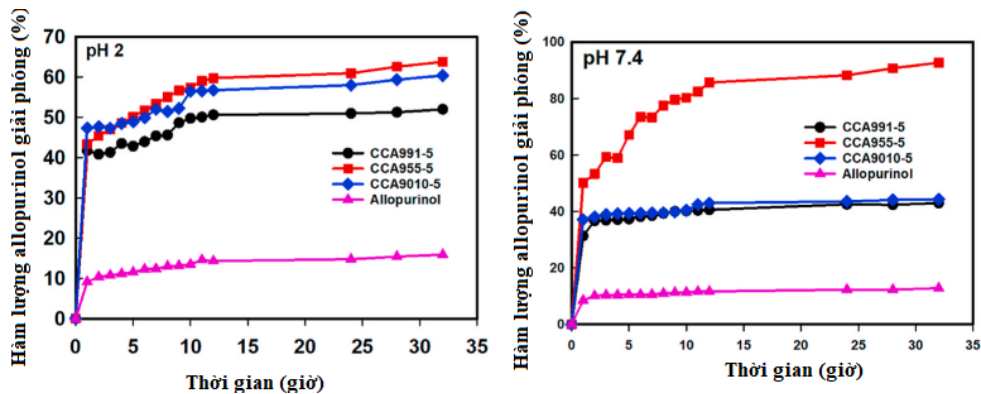
Dung dịch đệm pH 7,4 có môi trường pH tương tự trong dịch ruột. Tương tự như trên, tiến hành xây dựng đường chuẩn của ALP trong dung dịch đệm pH 7,4. Mật độ quang của ALP trong dung dịch đệm pH 7,4 xác định tương tự như với dung dịch đệm pH 2. Kết quả thu được bước sóng hấp thụ cực đại của ALP trong dung dịch đệm pH 7,4 là $\lambda_{\max} = 276,69$ nm.

Dựa vào phần mềm Excel, xác định được phương trình đường chuẩn của ALP trong dung dịch đệm pH 7,4 là $y = 9945,3x - 0,4437$ với hệ số hồi quy tuyến tính $R^2 = 0,990$. Trong đó, x là nồng độ của ALP (mol/Lit) trong dung dịch đệm, y là mật độ quang A.

Giá trị hệ số hồi quy $R^2 = 0,990$ cho thấy sự phụ thuộc tuyến tính của độ hấp phụ quang vào nồng độ ALP trong dung dịch đệm pH 7,4 ứng với giá trị $\lambda_{\max} = 276,69$ nm. Vì vậy, có thể sử dụng các phương trình đường chuẩn này để tiến hành khảo sát nồng độ ALP giải phóng từ vật liệu tổ hợp Car/C/ALP trong dung dịch đệm pH 7,4.

3.2.6.3. Hàm lượng allopurinol giải phóng từ màng tổ hợp Car/C/ALP (CCA) trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4

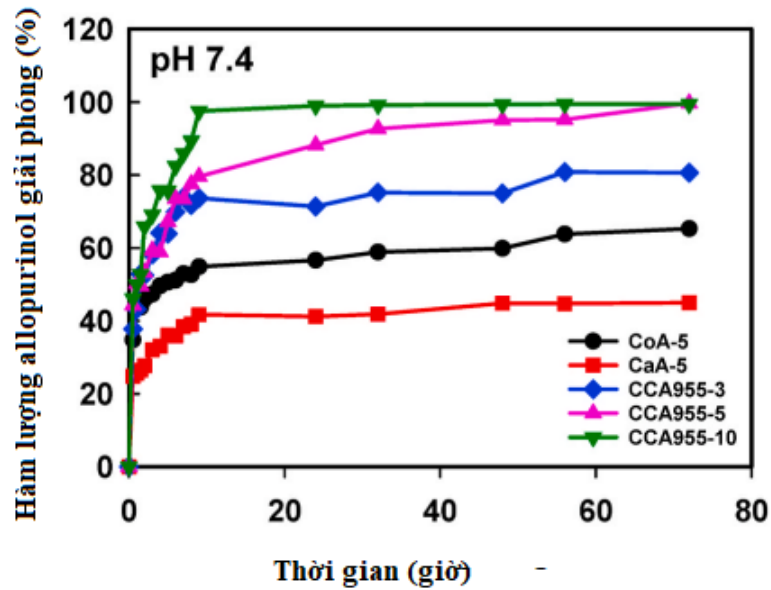
Hình 3.17 thể hiện hàm lượng ALP được giải phóng khỏi màng tổ hợp Car/C/ALP (CCA) với tỷ lệ Car/C khác nhau so với mẫu đối chứng (tinh thể ALP) ở dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4. ALP được giải phóng từ từ khỏi màng tổ hợp ở cả 2 dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4. Hầu hết ALP được giải phóng ngay trong giờ đầu tiên. Ở mẫu đối chứng, sau 1 giờ thử nghiệm, phần trăm ALP giải phóng là 9,14% trong dung dịch đệm pH 2 và tăng lên 15,87% sau 32 giờ. Trong dung dịch đệm pH 7,4, hàm lượng ALP giải phóng sau 1 giờ và 32 giờ lần lượt là 8,49% và 12,79%. Như vậy, trong môi trường acid, ALP giải phóng nhanh hơn do phản ứng của proton H^+ trong dung dịch với các nhóm amin trong phân tử ALP, dẫn đến tăng sự khuếch tán của ALP vào dung dịch. Trong khi đó, hàm lượng ALP được giải phóng từ các màng tổ hợp CCA thể hiện xu hướng ngược lại, hàm lượng ALP giải phóng trong dung dịch đệm pH 7,4 lớn hơn trong dung dịch đệm pH 2. Trong những giờ đầu, thuốc được giải phóng từ màng tổ hợp CCA xảy ra nhanh và chậm lại trong những giờ thử nghiệm tiếp theo. Điều này là do quá trình giải phóng của ALP trên bề mặt của vật liệu tổ hợp, cũng như sự trao đổi của proton H^+ trong môi trường acid với các cation K^+ (chất tạo gel) của màng tổ hợp, dẫn đến giảm sự kết tụ của chuỗi xoắn α của carrageenan, ảnh hưởng đến sự tương tác của polyme với ALP làm thay đổi mô hình giải phóng thuốc. Kết quả này cho phép khẳng định rằng sử dụng tổ hợp Car/C mang ALP sẽ giúp kiểm soát giải phóng ALP trong môi trường acid. Hàm lượng ALP giải phóng từ màng tổ hợp CCA cao hơn nhiều so với mẫu đối chứng (3,27–7,25 lần).



Hình 3.17. Đồ thị giải phóng ALP từ màng tổ hợp CCA trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4

Mặc dù màng tổ hợp CCA được chế tạo ở cùng một hàm lượng ALP, nhưng ALP được giải phóng từ mẫu CCA955-5 nhanh hơn so với từ các mẫu CCA9010-5 và CCA991-5 trong cả 2 dung dịch đệm pH 7,4 và pH 2. Điều này có thể do cấu trúc và sự tương tác khác nhau của các polyme và ALP khi tỷ lệ các polyme thay đổi. Như vậy, sự kết hợp giữa polyme thiên nhiên và ALP đóng vai trò quan trọng để kiểm soát khả năng hòa tan và giải phóng của thuốc [160]. Tỷ lệ Car/C = 95/5 là thích hợp để chế tạo màng tổ hợp CCA giúp kiểm soát tốt giải phóng ALP.

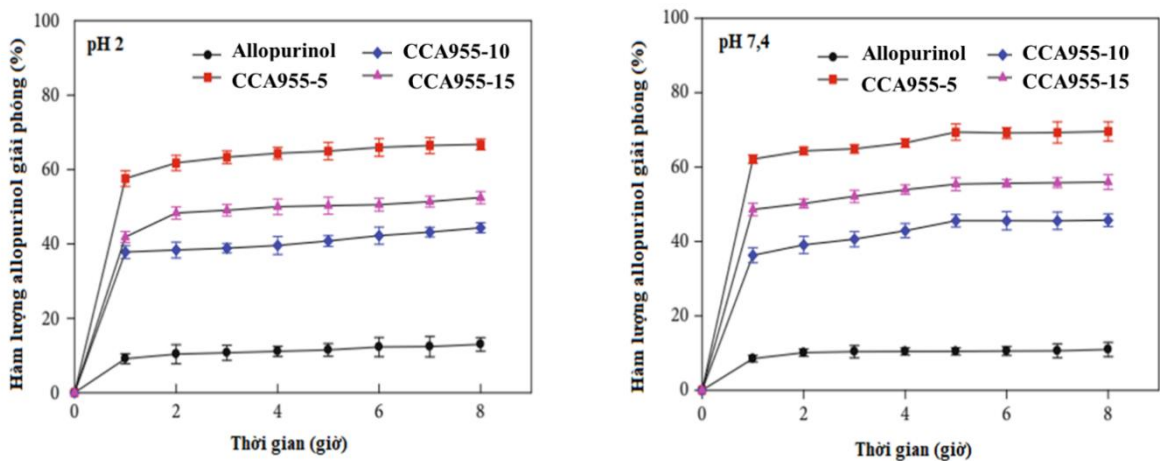
Hình 3.18 trình bày hàm lượng ALP được giải phóng từ màng tổ hợp C/ALP (CoA-5), Car/ALP (CaA-5) và màng tổ hợp CCA khi hàm lượng ALP thay đổi trong dung dịch đệm pH 7,4. Với cùng một hàm lượng ALP, thứ tự hàm lượng ALP giải phóng từ CoA-5, CaA-5 và màng tổ hợp CCA955-5 là $CaA-5 < CoA-5 < CCA955-5$. Hàm lượng ALP giải phóng từ collagen mang ALP cao hơn từ carrageenan mang ALP do sự khác nhau bản chất của polyme. Liên kết hydro hình thành giữa ALP với carrageenan và collagen thông qua các nhóm chức đặc trưng như nhóm $-NH$, $-COOH$ và nhóm sunfate, từ đó, giúp ALP được mang và giải phóng tốt hơn. Liên kết hydro tạo bởi nhóm $-NH-$ (nhóm cho H) trong ALP với nhóm $-OH$ (nhóm nhận) trong carrageenan yếu hơn so với liên kết hydro tạo bởi nhóm $-NH-$ (nhóm cho H) trong ALP với nhóm $C=O$ (nhóm nhận) trong collagen. Điều này có thể được giải thích do mật độ điện tích âm trên O của nhóm $-OH$ tăng lên nhờ hiệu ứng cảm ứng +I của yếu hơn của nhóm $C=O$ từ đó làm mật độ điện tích âm trên O của nhóm $-OH$ nhỏ hơn trên O của nhóm $C=O$. Do đó, khả năng mang và giải phóng ALP từ carrageenan kém hơn so với collagen. Việc kết hợp carrageenan và collagen để mang ALP (màng tổ hợp CCA) giúp tăng tương tác giữa ALP và các polyme, từ đó, làm tăng hiệu quả mang và giải phóng ALP. Tương tác tĩnh điện giữa các nhóm sunfat của carrageenan và proton hóa nhóm amin của collagen cũng như liên kết hydro giữa nhóm $-OH$ trong nhóm carrageenan và cacboxyl và nhóm amin trong collagen có thể làm bền liên kết hydro của ALP với carrageenan và collagen, tạo thành một hệ tổ hợp bền vững hơn [159 – 161].



Hình 3.18. Đồ thị giải phóng ALP từ mẫu màng CoA-5, CaA-5 và màng tổ hợp CCA khi hàm lượng ALP thay đổi trong dung dịch đệm pH 7,4

Hàm lượng ALP giải phóng từ màng tổ hợp CCA tăng khi tăng hàm lượng ALP trong mẫu. Trong quá trình giải phóng thuốc, thuốc trên bề mặt hoặc gần bề mặt của màng tổ hợp được giải phóng nhanh ở mẫu có hàm lượng thuốc cao.

Đồ thị giải phóng ALP từ tinh thể ALP và màng tổ hợp CCA với hàm lượng ALP thay đổi trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4 được thể hiện trên Hình 3.19. Bằng cách so sánh hai nhóm (nhóm 1: Lượng ALP giải phóng trong dung dịch đệm pH 2; nhóm 2: Lượng ALP giải phóng trong dung dịch đệm pH 7,4), có thể thấy không có sự khác biệt ($p = 0,122$) có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm được thử nghiệm. Phần lớn tinh thể ALP đã được hòa tan trong giờ đầu tiên với lượng ALP giải phóng là 8,488 % và 9,135 %, tương ứng trong dung dịch đệm pH 7,4 và pH 2,0. Hàm lượng ALP được giải phóng đã tăng lên 2 đến 3 %, tùy thuộc vào pH của dung dịch trong những giờ tiếp theo. Ví dụ, sau 8 giờ thử nghiệm, lượng ALP giải phóng trong dung dịch đệm pH 7,4 và pH 2 đạt được lần lượt là 10,95 % và 12,99 %. Trong môi trường acid, các nhóm $-NH$ của ALP có thể bị proton hóa, làm cho ALP dễ dàng hòa tan hơn trong dung dịch đệm pH 2 so với trong dung dịch đệm pH 7,4.



Hình 3.19. Đồ thị giải phóng ALP tinh khiết và từ màng CCA với hàm lượng ALP thay đổi trong dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4

Quá trình giải phóng ALP từ màng tổ hợp CCA trong các dung dịch đệm tương tự như quá trình hòa tan ALP như đã nêu ở trên. Các mẫu giải phóng nhanh trong giờ đầu tiên và giải phóng chậm trong những giờ tiếp theo. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lượng ALP được giải phóng từ ALP tinh thể và từ màng tổ hợp CCA ($p = 0,005$) (mẫu CCA5, CCA10 hoặc CCA15) trong dung dịch đệm pH 2,0 và pH 7,4. Hàm lượng ALP giải phóng nhanh từ màng CCA sau 1 giờ thử nghiệm đầu tiên trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4 có thể do sự trương nở và sự thủy phân của mạch polyme (như đã thảo luận ở trên), làm cho một phần thuốc trên bề mặt màng tổ hợp được giải phóng vào dung dịch. Trong những giờ tiếp theo, ALP giải phóng từ các màng CCA được kiểm soát nhờ tương tác giữa các polyme và thuốc, thuốc được khuếch tán từ bên trong polyme vào dung dịch [162].

Trong dung dịch đệm pH 2, lượng ALP được giải phóng từ màng tổ hợp CCA đạt 37,81 % – 57,58 % sau 1 giờ thử nghiệm và 44,36 % – 66,75 % sau 8 giờ thử nghiệm. Trong khi đó, ở dung dịch đệm pH 7,4; sau 1 giờ và 8 giờ thử nghiệm, lượng ALP được giải phóng từ màng CCA lần lượt là 36,23 % – 62,15 % và 45,73 % – 69,59 %. Điều này có nghĩa là sự kết hợp Car/C góp phần vào sự hòa tan nhanh của ALP trong môi trường trung tính. Do proton hóa của nhóm $-NH$ trong ALP với proton H^+ trong dung dịch acid, liên kết giữa polyme và thuốc trong dung dịch trung tính ổn định hơn so với trong điều kiện acid mạnh, dẫn đến kiểm soát giải phóng thuốc tốt hơn việc giải phóng thuốc trong dung dịch đệm pH 7,4 [163, 164].

3.2.7. Mô hình động học giải phóng allopurinol từ màng tổ hợp CCA trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4

Cơ chế và mô hình động học giải phóng thuốc phụ thuộc vào hàm lượng, pH dung dịch, bản chất của thuốc và polyme [27, 182, 183].

(i) Động học bậc không (ZO): $W_t = W_0 + K_1 \cdot t$

(ii) Động học bậc 1 (FO): $\log C = \log C_0 - K_2 \cdot t/2,303$

(iii) Phương trình Hixon-Crowell (HC): $W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_3 \cdot t$

(iv) Phương trình Higuchi (HG): $W_t = K_4 \cdot t^{1/2}$

(v) Phương trình định luật năng lượng Korsmeyer-Peppas (KP): $\frac{M_t}{M_\infty} = K_5 \cdot t^n$

Trong đó:

t: thời gian giải phóng thuốc.

K_5 : là hằng số đặc trưng cho hệ thuốc - polyme.

n: là hằng số khuếch tán, đặc trưng cho cơ chế giải phóng thuốc.

W_t : lượng thuốc giải phóng ở thời điểm t.

W_0 : lượng thuốc giải phóng ở thời điểm ban đầu.

K_1, K_2, K_3, K_4 : hằng số tốc độ phản ứng.

M_t/M_∞ là phần thuốc giải phóng vào môi trường hòa tan.

C_0 : nồng độ thuốc ban đầu.

C: nồng độ thuốc ở thời điểm t.

Khi $n \leq 0,5$, sự giải phóng thuốc tuân theo định luật khuếch tán Fick. Khi $n > 0,5$.

Động học bậc 0 cho thấy quá trình giải phóng thuốc ra khỏi hệ là bất biến, không phụ thuộc vào nồng độ của nó trong hệ. Động học bậc 1 cho thấy quá trình giải phóng thuốc ra khỏi hệ là sự tuyến tính với nồng độ của thuốc trong hệ. Mô hình động học Hixon - Crowell cho thấy khả năng thuốc bị hòa tan khi có sự thay đổi diện tích bề mặt hệ mang thuốc. Mô hình động học Higuchi cho thấy quá trình thuốc giải phóng theo công thức phần trăm thuốc giải phóng tỉ lệ thuận với căn bậc 2 thời gian và nó phụ thuộc vào sự khuếch tán của thuốc ra khỏi hệ. Mô hình động học Korsmeyer - Peppas mô tả cơ chế giải phóng thuốc từ hệ polyme có thể tuân theo định luật khuếch tán Fick (loại I) hoặc cơ chế không Fick (cơ chế Fick II), nó chỉ ra rằng có nhiều hơn một loại hiện tượng xảy ra trong quá trình giải phóng thuốc.

Để tìm mô hình động học phù hợp cho quá trình giải phóng ALP từ các mẫu CCA, hàm lượng thuốc được giải phóng đã được tính toán và xây dựng theo các mô hình (i) đến (v). Hệ số hồi quy tuyến tính (R^2) đánh giá sự phù hợp của các mô hình phương trình động học giải phóng ALP từ các màng tổ hợp CCA trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4. Hệ số R^2 được thống kê trong các Bảng 3.10 và 3.11 cho thấy

ALP từ các màng tổ hợp CCA trong giai đoạn giải phóng thuốc nhanh là cao hơn so với giai đoạn giải phóng thuốc chậm. Trong dung dịch đệm pH 2, quá trình giải phóng thuốc khỏi màng tổ hợp CCA tuân theo phương trình ZO với $n < 0,5$ tương ứng với sự khuếch tán thuốc tuân theo định luật Fick.

Bảng 3.10. Giá trị R^2 của các phương trình động học giải phóng ALP từ các màng tổ hợp CCA trong dung dịch đệm pH 2

Mẫu		ZO	FO	HG	HC	KP	n
CCA991-5	GPN	0,8589	0,1456	0,7737	0,8589	0,6634	0,3988
	GPC	0,8916	0,9107	0,8859	0,8916	0,8804	0,4670
CCA955-5	GPN	0,9994	0,9393	0,9836	0,9994	0,9402	0,4202
	GPC	0,9072	0,6429	0,9030	0,9072	0,8967	0,4945
CCA9010-5	GPN	0,8708	0,7466	0,9394	0,9059	0,7443	0,4615
	GPC	0,8645	0,3616	0,9092	0,9549	0,9138	0,4989

Trong dung dịch đệm pH 7,4, quá trình giải phóng ALP từ hầu hết các mẫu tuân theo phương trình KP với sự khuếch tán thuốc tuân theo định luật Fick ($n < 0,5$). Cơ chế giải phóng ALP từ các mẫu CCA ở dung dịch đệm pH 7,4 phức tạp với sự kết hợp của nhiều hiện tượng như trương nở polyme, phân tán thuốc trong cấu trúc polyme, sự khuếch tán của thuốc, tương tác của thuốc và polyme, tương tác của thuốc và thuốc.... Kết quả giá trị R^2 của các phương trình động học giải phóng ALP từ các màng tổ hợp CCA trong dung dịch đệm pH 7,4 được thống kê trong Bảng 3.11.

Bảng 3.11. Giá trị R^2 từ các phương trình động học giải phóng ALP từ các màng tổ hợp CCA trong dung dịch đệm pH 7,4

Mẫu		ZO	FO	HG	HC	KP	n
CCA991-5	GPN	0,9487	0,9134	0,8974	0,9487	0,8327	0,3468
	GPC	0,9674	0,1310	0,9780	0,9674	0,9839	0,3510
CCA955-5	GPN	0,9009	0,9194	0,9009	0,9009	0,8509	0,3360
	GPC	0,9458	0,5660	0,9472	0,9458	0,9449	0,3128
CCA9010-5	GPN	0,7694	0,9495	0,8711	0,7694	0,9482	0,3693
	GPC	0,6955	0,2568	0,7153	0,6955	0,7242	0,3623

Bảng 3.12 liệt kê các giá trị R^2 , n của mô hình động học phản ánh quá trình giải phóng ALP từ màng tổ hợp CCA (với hàm lượng ALP thay đổi) vào dung dịch

đệm pH 2 và pH 7,4. Mô hình KP có R^2 cao nhất cho thấy mô hình này phù hợp với cơ chế giải phóng ALP từ các màng tổ hợp CCA vào các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4 cho hầu hết tất cả các mẫu nghiên cứu. Các kết quả này tuân theo quy luật giải phóng một số loại thuốc từ các polyme [164, 165] vì quá trình giải phóng ALP từ màng CCA là một quá trình phức tạp bao gồm trương nở, phân hủy, proton hóa, khuếch tán, hòa tan và bào mòn. Các giá trị của hằng số khuếch tán (n) thu được từ mô hình KP nằm trong khoảng từ 0,361 đến 0,619, tùy thuộc vào tỷ lệ thành phần của mẫu và pH của dung dịch. Điều này cho thấy giải phóng ALP từ CCA955-10 và CCA955-15 ở cả dung dịch đệm pH 2,0 và pH 7,4 theo cơ chế khuếch tán Fick, trong khi giải phóng thuốc từ mẫu CCA955-5 là sự khuếch tán không đều và không tuân theo định luật Fick [166].

Bảng 3.12. Giá trị R^2 của các mô hình phương trình động học giải phóng ALP từ các màng tổ hợp CCA (hàm lượng thuốc khác nhau) trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4

Mẫu	ZO	FO	HG	HC	KP	n
pH 2						
CCA955-5	0,848	0,970	0,929	0,848	0,977	0,582
CCA955-10	0,972	0,824	0,911	0,972	0,824	0,367
CCA955-15	0,707	0,828	0,803	0,707	0,874	0,435
pH 7,4						
CCA955-5	0,883	0,932	0,931	0,883	0,942	0,619
CCA955-10	0,873	0,939	0,936	0,873	0,962	0,361
CCA955-15	0,878	0,970	0,942	0,878	0,965	0,483

3.3. Hạt tổ hợp carragennan/collagen/allopurinol (ACC)

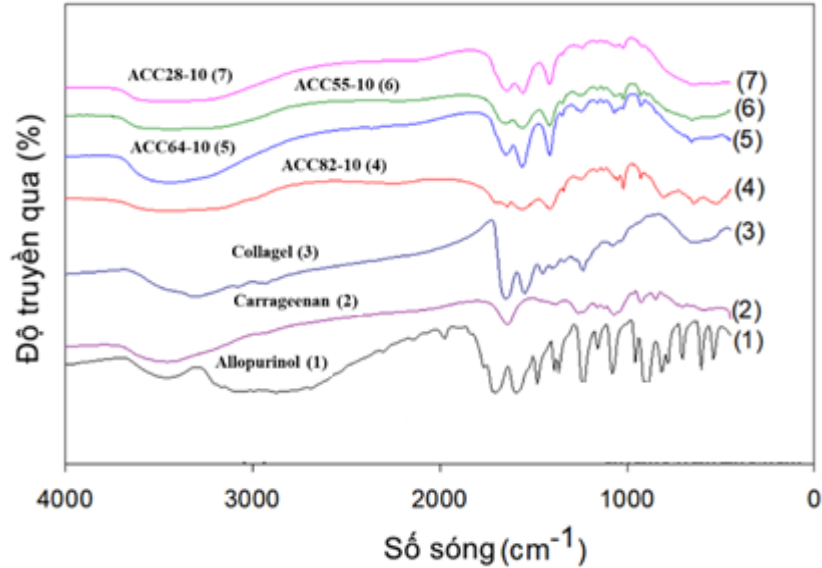
3.3.1. Phổ FTIR của hạt tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol (ACC)

3.3.1.1. Phổ FTIR của các hạt tổ hợp Car/C/ALP 10% với tỷ lệ Car/C khác nhau

Hình 3.20 là phổ FTIR của carrageenan, collagen, ALP và hạt tổ hợp ACC chế tạo ở các tỷ lệ Car/C khác nhau. Có thể thấy vân phổ hấp thụ đặc trưng cho dao động hóa trị của các nhóm chức trong carrageenan trên phổ FTIR của Car. Cụ thể, dao động hóa trị các nhóm $-OH$ ở 3450 cm^{-1} , nhóm $C=O$ ở 1600 cm^{-1} , nhóm $C-O$ ở 1200 cm^{-1} và nhóm $S=O$ (trong nhóm este sunfat) ở 1100 cm^{-1} [166].

Trong phổ FTIR của ACC, có vân phổ hấp thụ đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm $-NH$ ở số sóng $3305,19\text{ cm}^{-1}$. Ngoài ra, vân phổ đặc trưng cho dao

động biến dạng của amit bậc 1 xuất hiện ở $1650,3\text{ cm}^{-1}$, amit bậc 2 ở $1547,91\text{ cm}^{-1}$, amit bậc 3 ở $1236,59\text{ cm}^{-1}$. Vân phổ đặc trưng cho dao động hóa trị và dao động biến dạng của liên kết C–H ở $2931,83\text{ cm}^{-1}$ và $1451,16\text{ cm}^{-1}$, $1397,05\text{ cm}^{-1}$ [154].



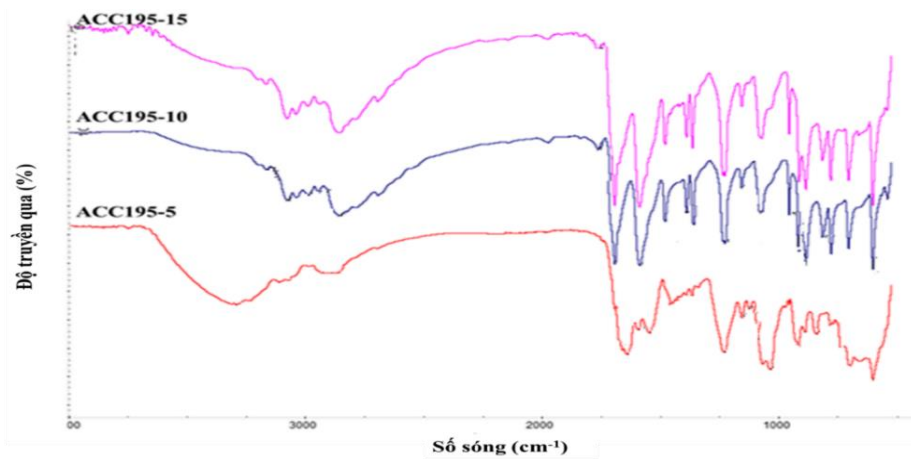
Hình 3.20. Phổ FTIR của Car, C, ALP và các hạt tổ hợp ACC ở các tỷ lệ Car/C khác nhau

Từ phổ FTIR của ALP có thể thấy, vân phổ hấp thụ đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm $-\text{CO}-\text{NH}-$ ở 3500 cm^{-1} , nhóm $-\text{NH}$ của amin bậc 2 ở 3470 cm^{-1} , amin bậc 3 ở 2780 cm^{-1} , nhóm cacbodi amit $-\text{N}=\text{C}-\text{N}$ ở 2050 cm^{-1} , nhóm $\text{C}=\text{O}$ ở 1680 cm^{-1} , nhóm $\text{C}=\text{N}$ ở 1560 cm^{-1} , nhóm $\text{C}-\text{N}$ ở 1240 cm^{-1} , dao động biến dạng của nhóm $\text{C}-\text{H}$ ở 1450 cm^{-1} [157].

Quan sát phổ FTIR của các hạt tổ hợp ACC và so sánh với các phổ FTIR của carrageenan, collagen, ALP ta nhận thấy khi kết hợp carrageenan, collagen, ALP trong hạt tổ hợp, vị trí các vân phổ đặc trưng của các nhóm chức trong từng thành phần bị thay đổi. Cụ thể, các vân phổ đặc trưng trên phổ FTIR của mẫu hạt ACC64-10 như sau: vân phổ đặc trưng cho dao động hóa trị nhóm $-\text{NH}$, $-\text{OH}$ trong collagen, carrageenan và ALP hợp thành một vân ở 3430 cm^{-1} , nhóm $\text{C}=\text{N}$ ở 1560 cm^{-1} , vân phổ đặc trưng cho dao động biến dạng của nhóm $-\text{NH}$, $-\text{OH}$ hợp thành một vân ở 1647 cm^{-1} , dao động biến dạng của liên kết $\text{C}-\text{H}$ ở 1414 cm^{-1} . Phổ FTIR của các hạt tổ hợp ACC28-10, ACC55-10, ACC82-10 tương tự như phổ FTIR của mẫu ACC64-10. Tuy nhiên, với các mẫu này có thể quan sát rõ vân phổ ở khoảng 2200 cm^{-1} đặc trưng cho nhóm cacbodi amit $-\text{N}=\text{C}-\text{N}$.

3.3.1.2. Phổ FTIR của hạt tổ hợp ACC với hàm lượng ALP khác nhau

Hình 3.21 là phổ FTIR của các hạt tổ hợp ACC có chứa các hàm lượng ALP 5, 10 và 15 % so với tổng khối lượng polyme (tỷ lệ khối lượng Car/C = 1/9). Có thể thấy, trên phổ FTIR của các mẫu này xuất hiện các vân phổ đặc trưng cho dao động của các nhóm chức hydroxyl, carbonyl, amin, amit, sunfat, các liên kết C-O, C-C, C-H trong carrageenan, collagen và ALP. Ở hàm lượng ALP nhỏ (5 %), không quan sát được vân phổ đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm C=O ở vị trí 1765 cm^{-1} mà chỉ quan sát được vai phổ ở vị trí này. Khi tăng hàm lượng ALP trong mẫu, có thể quan sát được rõ vị trí vân phổ này ở $1766 - 1768\text{ cm}^{-1}$.



Hình 3.21. Phổ IR của các hạt tổ hợp ACC19-5, ACC19-10 và ACC19-15

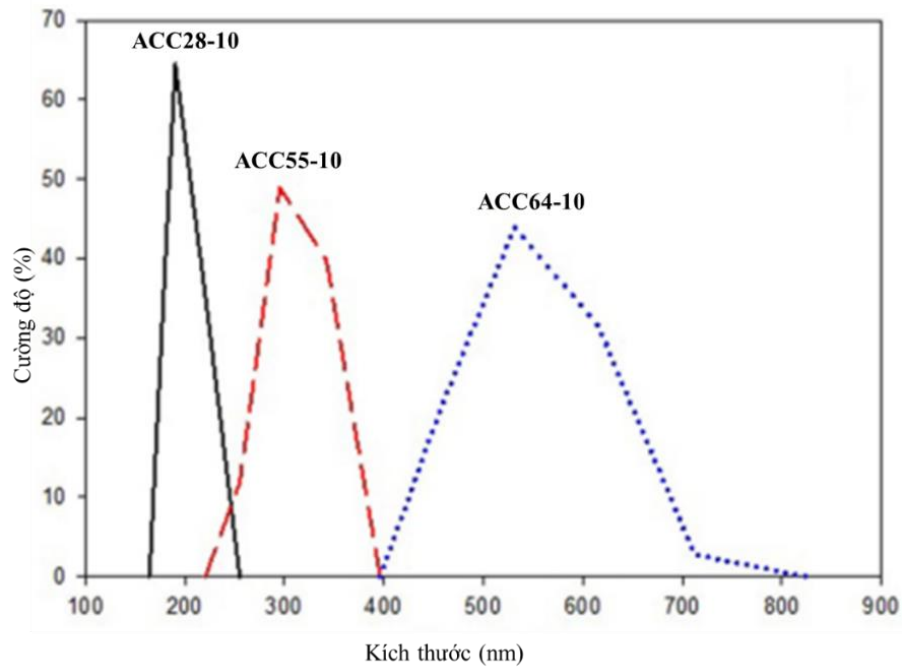
3.3.2. Phân bố kích thước hạt của hạt tổ hợp ACC

3.3.2.1. Phân bố kích thước hạt tổ hợp ACC với tỷ lệ Car/C khác nhau

Từ Hình 3.22 và Bảng 3.13, có thể thấy các hạt tổ hợp ACC với tỷ lệ Car/C khác nhau có kích thước nano, trong đó mẫu ACC28 có kích thước hạt trung bình nhỏ nhất là $200,80\text{ nm}$. Mẫu ACC55-10 có kích thước hạt trung bình là $309,10\text{ nm}$. Mẫu ACC64-10 có kích thước hạt trung bình là $547,00\text{ nm}$. Mẫu ACC28 có kích thước hạt nhỏ nhất nhưng không đồng đều. Các mẫu ACC55-10 và ACC64-10 có kích thước hạt lớn hơn nhưng độ đồng đều của hạt cao hơn so với mẫu ACC28-10.

Bảng 3.13. Kích thước hạt trung bình của các hạt tổ hợp nano ACC28-10, ACC55-10 và ACC64-10

Mẫu	Khoảng phân bố kích thước hạt (nm)	Kích thước hạt trung bình (nm)
ACC28-10	150 – 300	$200,80 \pm 7,19$
ACC55-10	225 – 400	$309,10 \pm 14,76$
ACC64-10	400 – 800	$547,00 \pm 31,74$



Hình 3.22. Biểu đồ phân bố kích thước hạt của các hạt tổ hợp nano ACC28-10, ACC55-10, ACC64-10

3.3.2.2. Phân bố kích thước hạt tổ hợp nano ACC với hàm lượng ALP khác nhau

Bảng 3.14 cho thấy khi tăng hàm lượng ALP trong mẫu, kích thước hạt trung bình của các hạt tổ hợp nano ACC tăng. Điều này là do ALP có tính kỵ nước nên khả năng phân tán vào các polyme của hạt tổ hợp trong nước kém, các hạt tổ hợp có xu hướng kết tụ lại với nhau, dẫn đến kích thước của chúng tăng lên.

Bảng 3.14. Kích thước hạt trung bình của các hạt tổ hợp nano ACC19-5, ACC19-10 và ACC19-15

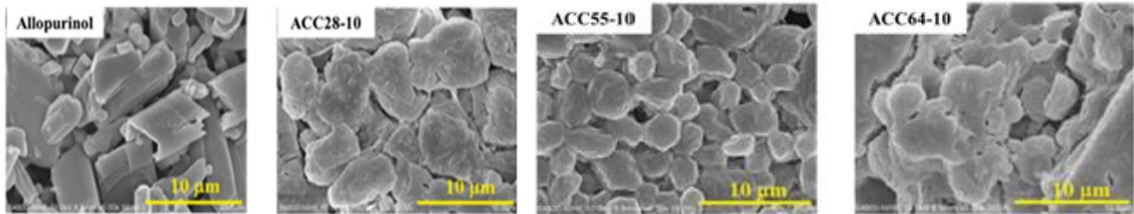
Mẫu	Kích thước hạt trung bình (nm)
ACC19-5	180,55 ± 17,30
ACC19-10	170,92 ± 21,80
ACC19-15	340,00 ± 28,54

3.3.3. Ảnh SEM của hạt tổ hợp nano ACC

3.3.3.1. Ảnh SEM của hạt tổ hợp nano Car/C/ALP 10% với tỷ lệ Car/C khác nhau

Ảnh SEM của mẫu ACC28, ACC55, ACC64 được trình bày trên Hình 3.23. Có thể thấy các hạt có kích thước không đồng đều (mẫu ACC28 khoảng 5-50 μm, mẫu ACC55 khoảng 2-5 μm, mẫu ACC64 khoảng 5-20 μm) và có khuynh hướng

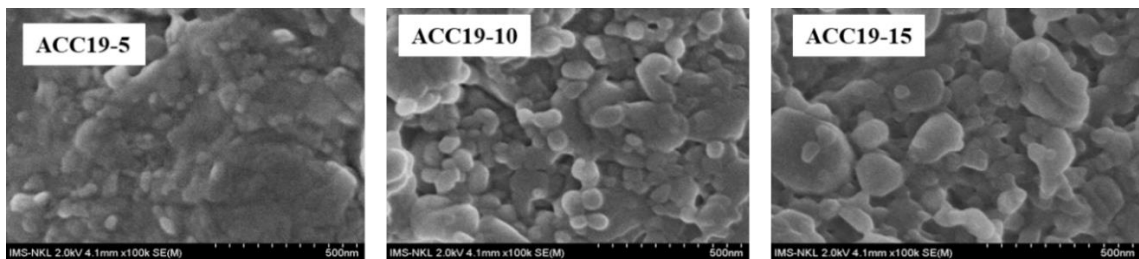
kết tụ lại với nhau để tạo thành các hạt có kích thước lớn hơn. Nguyên nhân là do carrageenan có khả năng tạo gel tốt, độ nhớt cao nên các hạt ALP khó phân tán vào nền polyme hơn và có xu hướng kết dính (vón cục) với nhau, nhất là các hạt chế tạo với tỷ lệ Car/C lớn như mẫu ACC64.



Hình 3.23. Ảnh SEM của ALP các hạt tổ hợp nano ACC với tỷ lệ Car/C khác nhau

3.3.3.2. Ảnh SEM của các hạt tổ hợp nano ACC với hàm lượng ALP khác nhau

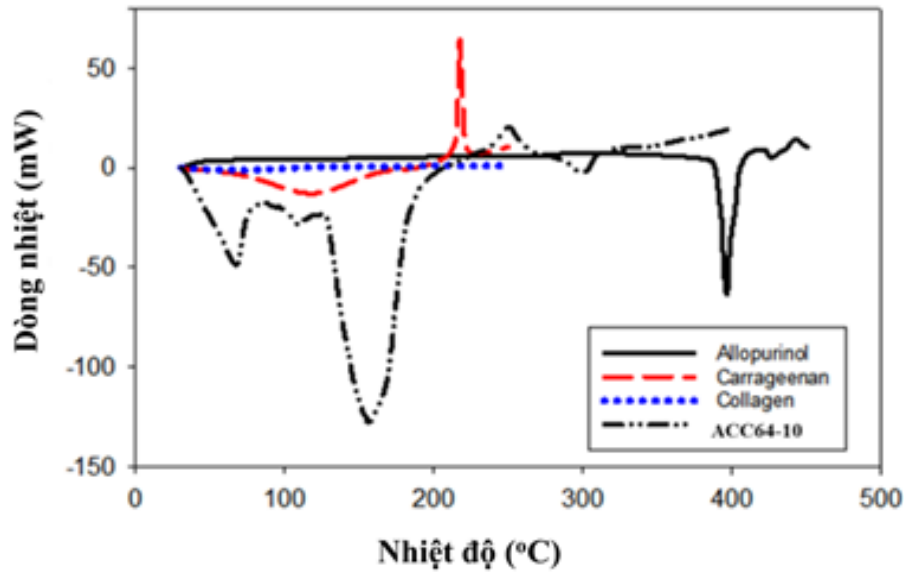
Hình 3.24 là ảnh SEM của các mẫu hạt tổ hợp ACC chế tạo ở các hàm lượng ALP khác nhau. Có thể thấy các hạt tổ hợp có kích thước hạt khá đồng đều trong khoảng 50 - 250 nm, nhỏ hơn so với ALP. Sự phân tán của ALP trong hạt tổ hợp Car/C nhờ các tương tác lưỡng cực - lưỡng cực và liên kết hydro giữa các nhóm amin và carbonyl trong ALP với các nhóm amide và nhóm carboxyl trong collagen, nhóm hydroxyl và sunfat trong carrageenan. Tuy nhiên, các hạt này có xu hướng kết tụ lại với nhau thành các hạt kích thước lớn hơn do sự hình thành liên kết hydro giữa các acid amin trong collagen. Với các hàm lượng ALP khảo sát, mẫu chứa 10 % ALP có kích thước hạt đồng đều nhất.



Hình 3.24. Ảnh SEM của các hạt tổ hợp ACC với hàm lượng ALP khác nhau

3.3.4. Đặc trưng nhiệt của hạt tổ hợp nano ACC

Giản đồ DSC của ALP, carrageenan, collagen và hạt tổ hợp ACC64-10 được thể hiện trên Hình 3.25 và kết quả xác định các đặc trưng nhiệt của chúng được trình bày trong Bảng 3.14.



Hình 3.25. Giản đồ DSC của ALP, carrageenan, collagen và hạt tổ hợp ACC64-10

Từ giản đồ DSC trên Hình 3.25, có thể thấy nhiệt độ bắt đầu nóng chảy, nhiệt độ nóng chảy và nhiệt nóng chảy của các thành phần trong vật liệu tổ hợp đều tăng so với carrageenan, collagen, ALP ban đầu.

Trên giản đồ DSC của ALP, nhiệt độ nóng chảy (T_m) của mẫu là 396,44 °C (enthalpy nóng chảy là 551,49 J/g [167]). T_m của ALP trong các hạt hydrogel Car/C đã dịch chuyển mạnh, giảm từ 396,44°C xuống 299,64°C đối với mẫu ACC64. Sự giảm nhiệt độ nóng chảy, cũng như enthalpy nóng chảy, của ALP trong hạt hydrogel ACC là do ALP đã tương tác với carrageenan và collagen, điều này dẫn đến giảm ở mức độ kết tinh của ALP được mang bởi các hạt hydrogel Car/C. T_m của carrageenan và nhiệt độ biến tính của collagen trong mẫu ACC64 có xu hướng giảm so với các chất ban đầu, tương ứng với 108,30 °C (đối với carrageenan) và 66,77 °C (đối với collagen) [30, 148, 168]. Trên giản đồ DSC của ACC64-10 xuất hiện một pic thu nhiệt ở 155,93 °C (enthalpy nóng chảy của 865,54 J/g) tăng lên so với carrageenan và collagen cho thấy các thành phần carrageenan, ALP và collagen đã tương hợp với nhau. Nhiệt độ phân hủy nhiệt của carrageenan trong mẫu ACC64-10 cũng tăng đến 249,84 °C và nhiệt phân hủy giảm. Điều này cũng khẳng định rằng sự tương tác giữa các thành phần trong ACC hạt hydrogel làm cải thiện sự phân hủy nhiệt của carrageenan.

Bảng 3.15. Các đặc trưng nhiệt của ALP, carrageenan, collagen và hạt tổ hợp nano ACC28-10, ACC55-10 và ACC64-10

Mẫu	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Nhiệt nóng chảy (J/g)	Nhiệt độ phân hủy (°C)	Nhiệt phân hủy (J/g)
Allopurinol	396,44	551,49	-	-
Carrageenan	118,06	280,35	217,28	- 95,77
Collagen	73,02	162,86	-	-
ACC28-10	66,37	130,00	252,35	- 90,65
	153,67	858,83		
	-	-		
ACC55-10	61,20	55,19	254,10	- 45,07
	157,91	599,82		
	-	-		
ACC64-10	66,67	137,02	249,84	- 62,45
	155,93	865,54		
	299,64	32,47		

Kết quả thu được tương tự với các mẫu ACC28-10 và ACC55-10 được trình bày trong Bảng 3.15. T_m của ALP trong mẫu tổ hợp ACC28-10 và ACC55-10 cũng giảm so với ban đầu, điểm giảm nhiệt này có thể trùng với điểm nhiệt phân hủy của Car do vậy trên giản đồ DSC của các mẫu này không xuất hiện điểm nóng chảy thứ 3. Tuy nhiên, so sánh với mẫu ACC64-10 thấy rằng xuất hiện điểm nóng chảy thứ 3 trên đồ thị DSC có thể do các hạt ALP đã không phân tán tốt vào nền tổ hợp, có một phần nhỏ bị kết tụ làm nhiệt độ nóng chảy mẫu ACC64-10 cao hơn. Như vậy tỷ lệ Car/C có ảnh hưởng đến khả năng phân tán của ALP trong tổ hợp, hàm lượng Car tăng làm tăng độ gel hóa của tổ hợp từ đó làm giảm khả năng phân tán của ALP trong tổ hợp.

3.3.5. Hiệu suất mang allopurinol của các hạt tổ hợp nano ACC

Phương trình đường chuẩn của ALP trong dung dịch NaOH 1 M được trình bày ở mục 3.2.1.1.

Bảng 3.16 trình bày kết quả xác định hiệu suất mang ALP của các mẫu hạt tổ hợp nano ACC chế tạo ở các tỷ lệ Car/C khác nhau và hạt nano ACC chế tạo thay đổi theo hàm lượng ALP. Có thể thấy tỷ lệ Car/C có ảnh hưởng nhẹ đến hiệu suất mang ALP của hạt tổ hợp nano ACC. Khi tăng hàm lượng ALP, hiệu suất mang ALP của các hạt tổ hợp nano ACC có xu hướng giảm, tương tự như các màng tổ hợp Car/C/ALP. Điều này có thể giải thích bởi ở hàm lượng ALP cao, các hạt có xu hướng kết tụ tạo thành hạt lớn hơn, do vậy khó phân tán vào hạt tổ hợp hơn.

Bảng 3.16. Hiệu suất mang ALP của các hạt tổ hợp ACC và CCA

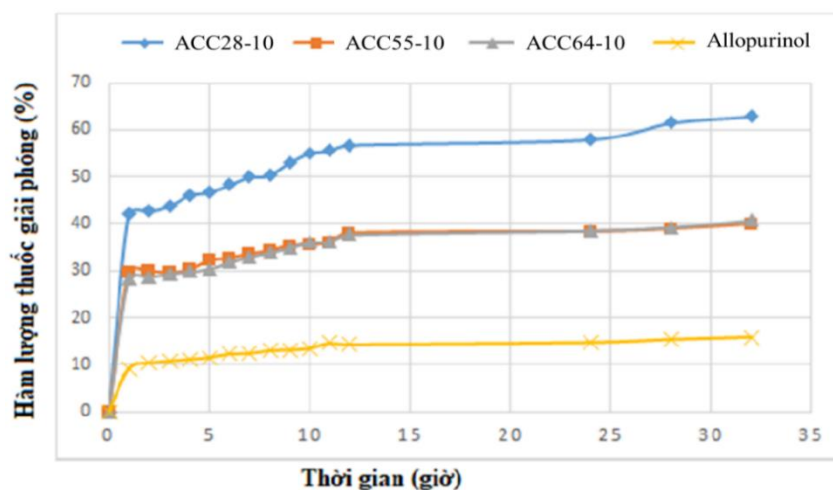
STT	Mẫu	Hiệu suất mang ALP (%)
1	ACC28-10	70,92
2	ACC55-10	66,79
3	ACC64-10	68,10
4	ACC19-5	70,30
5	ACC19-10	80,79
6	ACC19-15	60,55

Mẫu hạt nano ACC19-10 (tỷ lệ Car/C/ALP=1/9/10) có hiệu suất mang thuốc cao nhất, do đó lựa chọn tỷ lệ Car/C/ALP = 1/9/10 để chế tạo các hạt tổ hợp nano ACC cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3.6. Nghiên cứu giải phóng allopurinol từ hạt tổ hợp nano Car/C/ALP trong dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4

3.3.6.1. Hàm lượng ALP giải phóng từ các hạt nano Car/C/ALP (ACC) trong dung dịch đệm pH 2

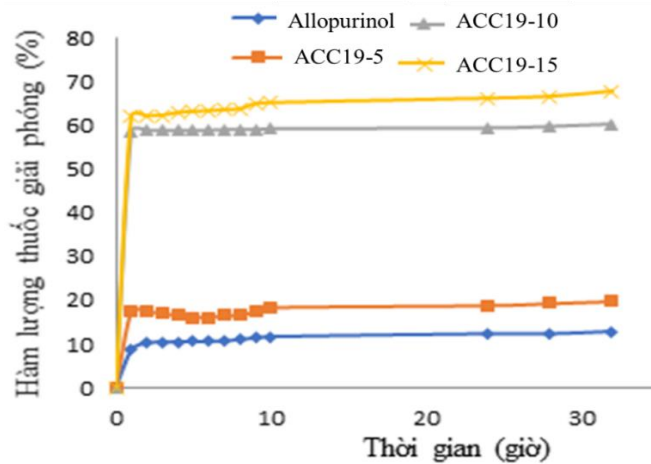
Hình 3.26 trình bày hàm lượng ALP giải phóng từ các hạt tổ hợp nano ACC với các tỷ lệ Car/C khác nhau (ACC28-10, ACC55-10, ACC64-10) trong dung dịch đệm pH 2. Có thể thấy ALP giải phóng từ các hạt tổ hợp nano ACC xảy ra theo 2 giai đoạn: giải phóng nhanh trong 11 giờ đầu và sau đó là giai đoạn giải phóng chậm, có kiểm soát.



Hình 3.26. Đồ thị giải phóng ALP các hạt tổ hợp nano ACC và ALP tinh khiết trong dung dịch đệm pH 2

Tỉ lệ Car/C ảnh hưởng đáng kể đến khả năng giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano ACC trong dung dịch đệm pH 2. Hàm lượng ALP giải phóng từ hạt tổ hợp nano ACC28-10 sau 32 giờ thử nghiệm cao hơn so với các hạt tổ hợp chế tạo với các tỉ lệ Car/C khác và ALP không được mang bởi các polyme (thấp, chỉ đạt 15,87 %). Điều này do hàm lượng collagen trong mẫu ACC28-10 lớn dễ bị cation hóa và thủy phân trong môi trường pH 2, từ đó, giúp ALP được giải phóng.

Hình 3.27 trình bày hàm lượng ALP giải phóng từ các hạt tổ hợp nano với hàm lượng ALP khác nhau (ACC19-5, ACC19-10, ACC19-15) và mẫu ALP tinh khiết trong dung dịch đệm pH 2. Có thể thấy, ALP giải phóng từ các hạt tổ hợp nano ACC cũng xảy ra theo 2 giai đoạn: giải phóng nhanh trong 1 giờ đầu và sau đó là giai đoạn giải phóng chậm, có kiểm soát. Hạt ALP đưa vào hệ tổ hợp Car/C có kích thước nhỏ hơn so với dạng tinh khiết và đặc biệt là tồn tại dạng vô định hình, nên khả năng phân tán vào dung dịch đệm pH 2 tốt hơn. Mặt khác, quá trình phân hủy và rã của polyme nền giúp ALP được giải phóng từ từ, do vậy, hàm lượng ALP giải phóng từ hạt tổ hợp cao hơn so với hàm lượng ALP giải phóng từ mẫu ALP tinh khiết do. Hàm lượng ALP giải phóng từ hạt tổ hợp nano ACCA19-15 sau 32 giờ thử nghiệm lớn hơn so với các hạt tổ hợp nano ACC chế tạo với các hàm lượng ALP khác nhau. Khi tăng hàm lượng ALP trong hạt tổ hợp nano ACC, hàm lượng ALP giải phóng tăng. Điều này có thể do ở hàm lượng ALP lớn, hàm lượng ALP trên bề mặt và gần bề mặt hạt nano ACC được giải phóng cục bộ.

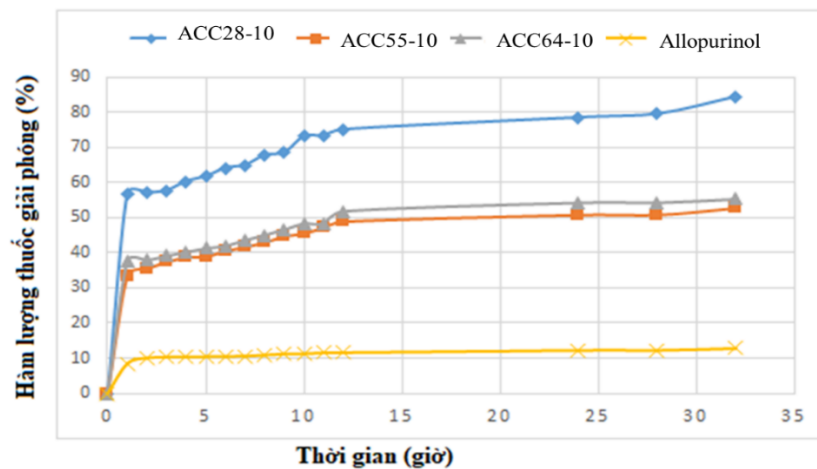


Hình 3.27. Đồ thị giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano CCA và mẫu ALP tinh khiết trong dung dịch đệm pH 2

3.3.6.2. Hàm lượng ALP giải phóng từ các nano ACC trong dung dịch đệm pH 7,4

Hình 3.28 trình bày hàm lượng ALP giải phóng từ các hạt tổ hợp nano ACC28-10, ACC55-10, ACC64-10 trong dung dịch đệm pH 7,4. Có thể thấy sự giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano ACC (10 % ALP) cũng xảy ra theo 2 giai đoạn: giải phóng nhanh trong 11 giờ đầu và sau đó là giai đoạn giải phóng chậm có kiểm soát.

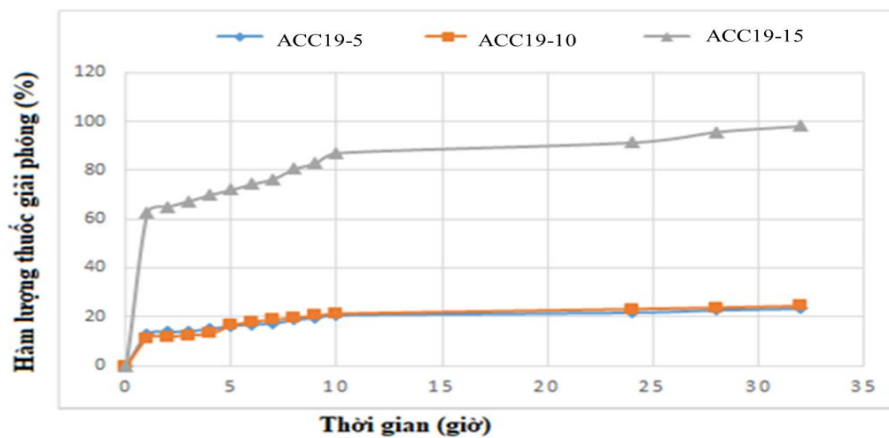
Tỉ lệ Car/C ảnh hưởng đáng kể đến khả năng giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano ACC. Sau 32 giờ thử nghiệm, hàm lượng ALP giải phóng từ các hạt tổ hợp nano ACC28-10, ACC55-10, ACC64-10 trong dung dịch đệm pH 7,4 đạt lần lượt 84,391 %; 52,898 %; 55,254 %, lớn hơn đáng kể so với hàm lượng ALP giải phóng từ mẫu ALP tinh khiết (12,794 %). Sự giải phóng ALP nhanh hơn là do phân bố kích thước hạt nhỏ hơn, thuốc giải phóng từ các hạt tổ hợp nano Car/C dễ dàng hơn. Đồng thời, khi được mang bởi tổ hợp carrageenan/collagen, nhờ các tương tác hydro và tương tác lưỡng cực – lưỡng cực giữa thuốc và các polyme giúp thuốc được hấp phụ trong các polyme và tăng độ tan của thuốc trong dung dịch đệm pH 7,4.



Hình 3.28. Đồ thị giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano ACC (tỷ lệ Car/C khác nhau) trong dung dịch đệm pH 7,4

Hàm lượng ALP ban đầu trong hạt tổ hợp nano cũng ảnh hưởng đến khả năng giải phóng ALP. Tương tự như ở pH 2, ở pH 7,4, hàm lượng ALP giải phóng từ hạt tổ hợp nano cũng lớn hơn đáng kể so với hàm lượng thuốc giải phóng từ mẫu ALP tinh khiết (Hình 3.29). Sau 32 giờ thử nghiệm, hàm lượng ALP giải phóng từ các hạt tổ hợp nano CCA19-5, CCA19-10, CCA19-15 trong dung dịch đệm pH 7,4 đều lớn hơn đáng kể so với hàm lượng ALP giải phóng từ các mẫu

tương ứng trong dung dịch đệm pH 2. Cụ thể, sau 32 giờ thử nghiệm, hàm lượng ALP giải phóng từ các hạt tổ hợp nano CCA19-5, CCA19-10, CCA19-15 trong dung dịch đệm pH 7,4 đạt lần lượt là 23,3 %; 24,4 %; 98,08 %. Trong các hàm lượng ALP khảo sát, mẫu hạt tổ hợp nano Car/C chứa 15% ALP cho hàm lượng ALP giải phóng lớn nhất ở cùng một thời điểm thử nghiệm so với các mẫu còn lại. Kết quả này cho thấy ALP được mang bởi các hạt tổ hợp nano Car/C với hàm lượng thuốc thấp thích hợp cho giải phóng trong môi trường acid tốt hơn môi trường trung tính. Điều này là do trong môi trường acid, có thể xảy ra sự trao đổi ion giữa proton H^+ của môi trường với ion K^+ (tác nhân tạo gel) trong hạt tổ hợp dẫn đến giảm khả năng trương nở của gel carrageenan nên khả năng kiểm soát giải phóng thuốc của hạt tổ hợp nano CCA giảm, thuốc giải phóng vào dung dịch nhanh hơn. Ở hàm lượng 15 % ALP, thuốc chủ yếu được giải phóng cục bộ. Do bản chất ALP ưa kiềm nên trong dung dịch đệm pH 7,4, thuốc được giải phóng nhanh hơn.



Hình 3.29. Đồ thị giải phóng allopurinol từ các hạt tổ hợp nano ACC (hàm lượng ALP khác nhau) trong dung dịch đệm pH 7,4

3.3.7. Mô hình động học giải phóng allopurinol từ các hạt tổ hợp nano ACC trong dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4

Mục 3.2.6 đã đề cập tới các mô hình động học phổ biến phản ánh giải phóng thuốc từ các màng và hạt tổ hợp hoặc hỗn hợp polyme mang thuốc. Phản ánh quá trình giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano Car/C/ALP chế tạo ở các hàm lượng ALP khác nhau (5, 10 và 15 %) trong các dung dịch đệm pH 7,4 và pH 2 được trình

bày trong 2 Bảng 3.17 và Bảng 3.18. Có thể thấy động học giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano ACC trong dung dịch đệm pH 7,4 tuân theo mô hình Higuchi còn trong dung dịch đệm pH 2 tuân theo mô hình Korsmeyer - Peppas.

Bảng 3.17. Hệ số R^2 theo các mô hình động học giải phóng ALP và ALP từ các hạt tổ hợp nano ACC (tỷ lệ Car/C khác nhau) trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4

Mẫu	ZO	HG	KMP	
	R^2		R^2	N
pH 2				
Allopurinol	0,862	0,956	0,988	0,157
ACC28-10	0,912	0,975	0,956	0,127
ACC55-10	0,896	0,956	0,926	0,099
ACC64-10	0,909	0,969	0,945	0,118
pH 7,4				
Allopurinol	0,818	0,896	0,928	0,095
ACC28-10	0,933	0,975	0,936	0,123
ACC55-10	0,902	0,979	0,941	0,129
ACC64-10	0,932	0,979	0,985	0,138

Bảng 3.18. Hệ số hồi quy (R^2) theo các mô hình động học giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano CCA (hàm lượng ALP khác nhau) trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4

Mẫu	ZO		FO		HG		HC		KMP	
	K	R^2	K	R^2	K	R^2	K	R^2	K	R^2
pH 7,4										
CCA19-5	2.10^{-6}	0,110	0,020	0,109	2.10^{-5}	0,185	8.10^{-7}	0,110	0,122	0,259
CCA19-10	6.10^{-6}	0,915	0,032	0,916	5.10^{-6}	0,868	2.10^{-6}	0,915	0,105	0,731
CCA19-15	10^{-5}	0,912	0,009	0,908	8.10^{-5}	0,908	4.10^{-6}	0,912	0,594	0,890
pH 2										
CCA19-5	10^{-6}	0,648	0,009	0,753	6.10^{-6}	0,890	4.10^{-7}	0,781	0,173	0,948
CCA19-10	2.10^{-6}	0,622	0,0007	0,573	10^{-5}	0,760	6.10^{-7}	0,622	0,178	0,906
CCA19-15	0,169	0,941	0,004	0,936	0,002	0,939	2.10^{-6}	0,941	0,608	0,953

Từ kết quả về hiệu suất mang thuốc, tính chất nhiệt, kích thước hạt ALP cũng như hàm lượng ALP giải phóng từ màng và hạt tổ hợp Car/C mang ALP, có thể thấy hạt tổ hợp ACC19-10 có các ưu điểm vượt trội như hiệu suất mang thuốc đạt 80,79 % (màng tổ hợp cao nhất 74,31 %), kích thước hạt nhỏ nhất (170,92 nm), hàm lượng thuốc giải phóng đạt 60,08% so với các tổ hợp có thành phần khác nên thuận lợi để tăng sinh khả dụng của thuốc. Do đó, mẫu ACC19-10 (10 % carrageenan, 90 % collagen và 10 % ALP (so với khối lượng tổng của hệ polyme Car/C)) được lựa chọn để tiến hành thử nghiệm in vivo trên cơ thể động vật (chuột).

3.4. Thử nghiệm in vivo sử dụng hạt tổ hợp nano carrageenan/collagen/allopurinol trên cơ thể động vật (chuột bình thường và chuột được tiêm phúc mạc potassium oxalat)

3.4.1. Xác định độc tính cấp của hạt tổ hợp nano carrageenan/collagen/allopurinol trên chuột được thử nghiệm

3.4.1.1. Tình trạng chuột ở pha dò liều

Hình ảnh chuột thử nghiệm được uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 sau 72 giờ được trình bày trên Hình 3.31.



Hình 3.30. Hình ảnh chuột sau 72 giờ uống hạt tổ hợp nano ACC19-10

Kết quả từ các Bảng 3.19 và Bảng 3.20 cho thấy sau 72 giờ sau uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 ở pha dò liều và pha thử độc tính, chuột ở các nhóm ăn uống, vận động bình thường, không có các dấu hiệu nhiễm độc như nôn, tiêu chảy, co giật hoặc bị chết. Như vậy, hạt tổ hợp nano ACC19-10 ở các liều thử nghiệm không gây ra độc tính cấp tính trên chuột.

Bảng 3.19. Tình trạng chuột sau 72 giờ uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 ở pha dò liều

STT	Liều	Tình trạng chuột
1	200 mg/kg	Bình thường
2	500 mg/kg	Bình thường
3	1000 mg/kg	Bình thường
4	1500 mg/kg	Bình thường

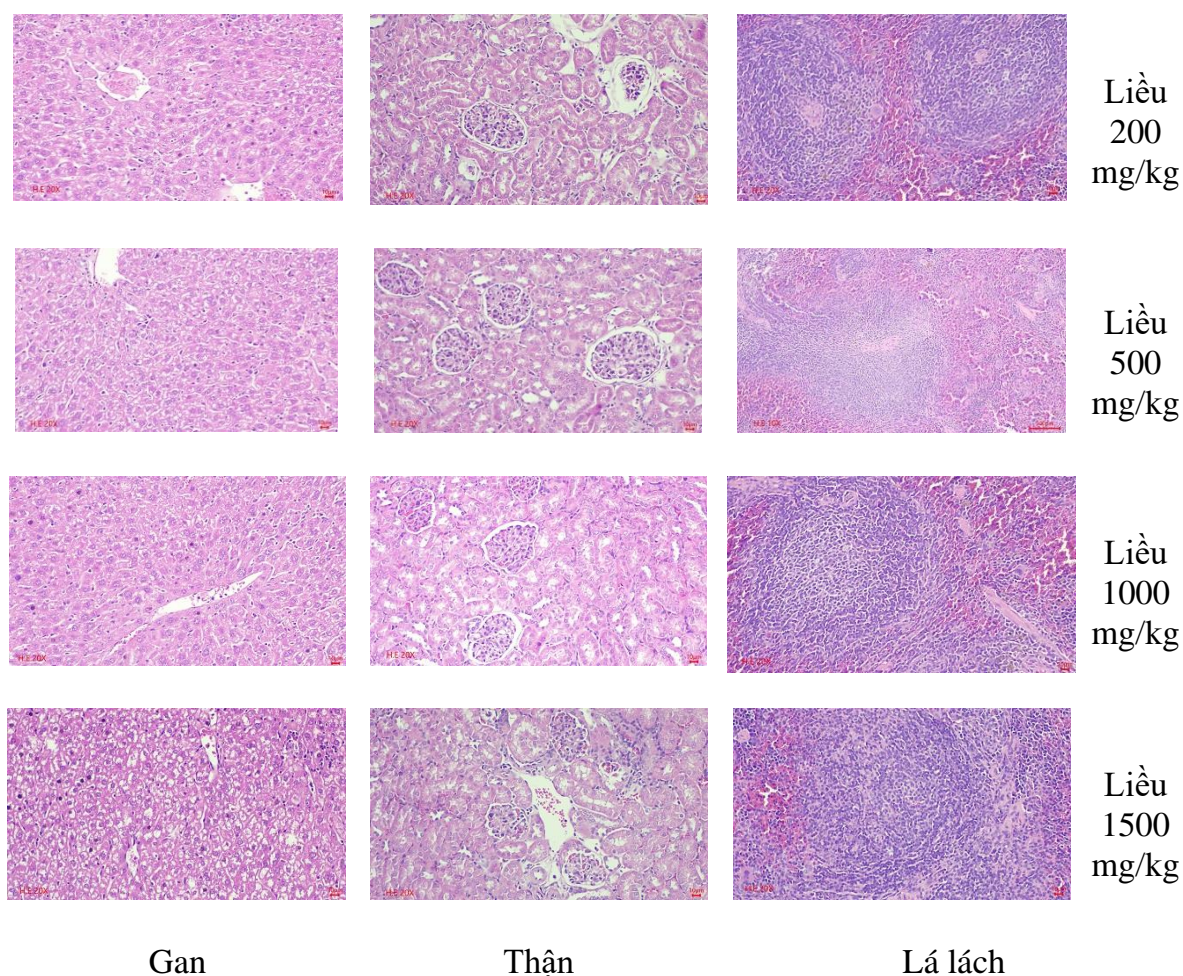
Bảng 3.20. Tình trạng chuột sau 72 giờ uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 ở pha thử độc tính

Dấu hiệu	Liều 500 mg/kg	Liều 1000 mg/kg	Liều 1500 mg/kg
Vận động	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Ăn uống	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Nôn	Không	Không	Không
Tiêu chảy	Không	Không	Không
Co giật	Không	Không	Không
Chết	Không	Không	Không

3.4.1.2. Hình ảnh đại thể và vi thể gan, thận và lách

Hình ảnh đại thể của gan, lách, thận sau 72 giờ uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 và mô học của gan, lách và thận của các nhóm chuột uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 với các liều khác nhau được thể hiện trên các Hình 3.31 và Hình 3.32.

**Hình 3.31.** Hình ảnh đại thể của gan, lách và thận của chuột sau 72 giờ uống hạt tổ hợp nano ACC19-10



Hình 3.32. Mô học gan, thận và lách của chuột ở các nhóm

Nhận xét: từ các hình trên ta nhận thấy:

- Các tế bào gan không bị thoái hóa, sắp xếp thành vân phổ, thành bè, giữa chúng có xoang mạch. Các xoang mạch nan hoa bị sung huyết nhẹ.

- Nhu mô thận gồm có vùng vỏ và vùng tủy, trong vùng vỏ các tiểu cầu thận còn rõ cấu trúc, các tế bào biểu mô ống thận không bị thoái hóa.

Nhu mô lách có vùng tủy đỏ và vùng tủy trắng. Vùng tủy trắng có các nang lympho với động mạch bút lông ở giữa. Vùng tủy đỏ các dây Billroth còn rõ.

Nhận xét chung: Hình ảnh nhu mô gan, thận và lách bình thường. Hình ảnh đại thể và vi thể của gan, thận và lách sau 72 uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 cho thấy không có tổn thương hình thái (đại thể) và cấu trúc (vi thể) của gan, thận và lách.

Tổ hợp hạt nano ACC19-10 không gây độc tính cấp tính trên động vật thực nghiệm ở các liều khảo sát. Kết quả này phù hợp với các báo cáo về độc tính cấp

tính của ALP. Theo thông tin về dược phẩm ZYLOPRIM (hoạt chất là ALP) của Công ty dược phẩm AA PHARMA, Canada thì liều độc tính LD50 của ALP trên chuột cống là lớn hơn 1100 mg/kg và trên chuột nhắt là lớn hơn 953 mg/kg. Tương tự, theo thông tin về độc tính của ALP của Công ty Santa Cruz Biotechnology, liều LD50 theo đường uống trên chuột nhắt là lớn hơn 1000 mg/kg. Như vậy, hạt tổ hợp nano chứa ALP an toàn và không gây ra các động tính cấp tính trên động vật thực nghiệm. Tổ hợp hạt nano ACC, ngoài thành phần ALP, các thành phần carrageenan và collagen đều được tách chiết từ nguồn gốc tự nhiên nên sẽ tương hợp sinh học, không độc. như vậy, sản phẩm hạt tổ hợp nano ACC19-10 hoàn toàn an toàn.

3.4.2. Xác định độc tính bán trường diễn của hạt tổ hợp nano carrageenan/collagen/allopurinol trên chuột được thử nghiệm

3.4.2.1. Tình trạng chung của chuột

30 chuột cống trắng chủng Wistar (trọng lượng 170-240g) do Trung tâm Động vật, Học viện Quân y cung cấp. Chuột được nuôi trong phòng thí nghiệm thoáng mát với chu kỳ sáng/tối 24 giờ và không hạn chế thức ăn và nước uống. Chuột được đưa về phòng thí nghiệm trước khi thử nghiệm 5-7 ngày để làm quen với môi trường mới. Mọi qui trình nghiên cứu tuân thủ theo hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của Học viện Quân y.

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm:

- Nhóm 1 (n=10): nhóm chứng, chuột được cho uống nước muối sinh lý
- Nhóm 2 (n=10): nhóm trị 1, chuột được uống tổ hợp ALP gắn với carrageenan/collagen với liều 200mg/kg (chứa 20mg/kg ALP).
- Nhóm 3 (n=10): nhóm trị 2, chuột được uống tổ hợp ALP gắn với carrageenan/collagen với liều 1000mg/kg (chứa 100mg/kg ALP).

Sau 28 ngày uống hạt tổ hợp nano ACC19-10, chuột ăn uống và vận động bình thường, không có các dấu hiệu nhiễm độc như nôn, tiêu chảy, co giật mà tinh tảo, lông mượt, tăng cân.

Cân nặng của chuột có xu hướng tăng ở cả nhóm chứng và nhóm uống hạt tổ hợp nano mang ALP (nhóm trị 1 và nhóm trị 2). Thống kê cho thấy cân nặng chuột sau 28 ngày uống thuốc tăng có ý nghĩa thống kê so với trước uống thuốc ở cả nhóm chứng và nhóm trị 1 và nhóm trị 2 ($p < 0,01$ và $p < 0,05$) (Bảng 3.21). Kết quả

này cho thấy uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 không ảnh hưởng đến sự phát triển trọng lượng của chuột.

Bảng 3.21. Cân nặng của các nhóm chuột trước và sau uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 sau 14 và 28 ngày (gam)

Nhóm	Trước (1)	Sau 14 ngày (2)	Sau 28 ngày (3)	P
Nhóm chứng	204,99± 21,84	223,90± 20,18	233,63 23,05	P3-1<0,05
Nhóm trị 1	208,07± 26,81	223,54± 26,30	238,35± 23,69	P3-1<0,05
Nhóm trị 2	201,49± 21,85	219,62± 16,70	234,01± 13,58	P3-1<0,01
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	

3.4.2.2. Các chỉ số huyết học của chuột trước và sau uống hạt tổ hợp nano Car/C/ALP

Các chỉ số huyết học gồm số lượng hồng cầu, nồng độ Hg, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu không khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa trước và sau uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 cũng như không có sự khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu ở tất cả thời điểm nghiên cứu (p>0,05). Kết quả này cho thấy hạt tổ hợp nano mang ALP không ảnh hưởng đến chức năng tạo máu trên động vật thực nghiệm (Bảng 3.22).

Bảng 3.22. Chỉ số huyết học của các nhóm chuột trước và sau uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 sau 14 và 28 ngày

Nhóm	Trước (1)	Sau 14 ngày (2)	Sau 28 ngày (3)	P
<i>Số lượng hồng cầu (T/L)</i>				
Nhóm chứng	7,18±0,76	7,05±1,18	7,04±0,40	p>0,05
Nhóm trị 1	7,12±0,87	7,05±0,63	7,10±0,69	p>0,05
Nhóm trị 2	6,93±1,39	6,84±1,27	7,02±0,78	p>0,05
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	
<i>Nồng độ Hg (g/dl)</i>				
Nhóm chứng	132,50±10,50	130,40±12,57	132,50±9,64	p>0,05
Nhóm trị 1	129,50±8,11	130,30±11,14	130,50±10,22	p>0,05
Nhóm trị 2	129,60±6,40	129,40±6,74	129,80±4,64	p>0,05
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	
<i>Số lượng bạch cầu (G/L)</i>				
Nhóm chứng	7,87±1,89	7,74±1,16	7,88±1,95	p>0,05

Nhóm trị 1	7,87±2,08	7,88±2,29	7,83±1,28	p>0,05
Nhóm trị 2	7,71±1,92	7,76±1,47	7,83±2,09	p>0,05
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	
<i>Số lượng tiểu cầu (TC/mL)</i>				
Nhóm chứng	764,40±244,89	785,80±247,02	788,60±261,29	p>0,05
Nhóm trị 1	768,20±209,37	790,80±233,30	766,20±201,79	p>0,05
Nhóm trị 2	779,70±284,57	762,60±262,10	767,10±264,71	p>0,05
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	

3.4.2.3. Các chỉ số sinh hóa của chuột trước và sau uống hạt tổ hợp nano Car/C/ALP

Bảng 3.23 thể hiện các chỉ số hóa sinh của chuột trước và sau khi uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 sau 14 và 28 ngày. Nồng độ các men gan (AST và ALT) cũng như men thận (ure và creatinin) trong huyết tương không có sự khác biệt giữa trước và sau uống hạt tổ hợp nano ACC ở tất cả các nhóm nghiên cứu cũng như không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu ở cả trước và sau uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 sau 14 và 28 ngày (p>0,05). Kết quả này cho thấy hạt tổ hợp nano mang ALP không ảnh hưởng đến chức năng gan và thận trên động vật thực nghiệm.

Bảng 3.23. Các chỉ số sinh hóa của chuột trước và sau uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 sau 14 và 28 ngày

Nhóm	Trước (1)	Sau 14 ngày (2)	Sau 28 ngày (3)	P
<i>Nồng độ AST (UI/L)</i>				
Nhóm chứng	69,90±7,50	70,60±12,47	71,10±11,64	p>0,05
Nhóm trị 1	69,50±14,37	69,60±11,25	69,10±12,07	p>0,05
Nhóm trị 2	69,70±7,78	69,30±8,31	69,10±10,63	p>0,05
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	
<i>Nồng độ ALT (UI/L)</i>				
Nhóm chứng	105,00±6,25	104,10±6,94	103,60±3,34	p>0,05
Nhóm trị 1	107,50±8,96	107,90±8,09	107,60±7,53	p>0,05
Nhóm trị 2	106,90±9,97	108,10±7,23	107,40±10,39	p>0,05
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	
<i>Nồng độ Ure (mmol/L)</i>				
Nhóm chứng	5,53±0,62	5,76±0,61	5,83±0,60	p>0,05

Nhóm trị 1	5,63±1,30	5,77±0,72	5,85±0,96	p>0,05
Nhóm trị 2	5,84±0,57	5,87±0,67	5,69±0,68	p>0,05
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	
<i>Nồng độ Creatinin ($\mu\text{mol/L}$)</i>				
Nhóm chứng	63,80±5,37	63,30±6,55	62,90±4,28	p>0,05
Nhóm trị 1	62,70±6,82	63,50±5,70	62,50±8,25	p>0,05
Nhóm trị 2	62,90±8,52	63,40±6,47	63,60±6,52	p>0,05
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	

3.4.2.4. Trọng lượng gan, thận lách của chuột sau khi uống hạt tổ hợp nano Car/C/ALP

Trọng lượng gan, thận và lách của chuột sau 28 ngày uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa với các nhóm nghiên cứu khác. Kết quả này cho thấy tổ hợp hạt nano mang ALP không làm biến đổi kích thước của gan, thận và lách trên động vật thực nghiệm (Bảng 3.24).

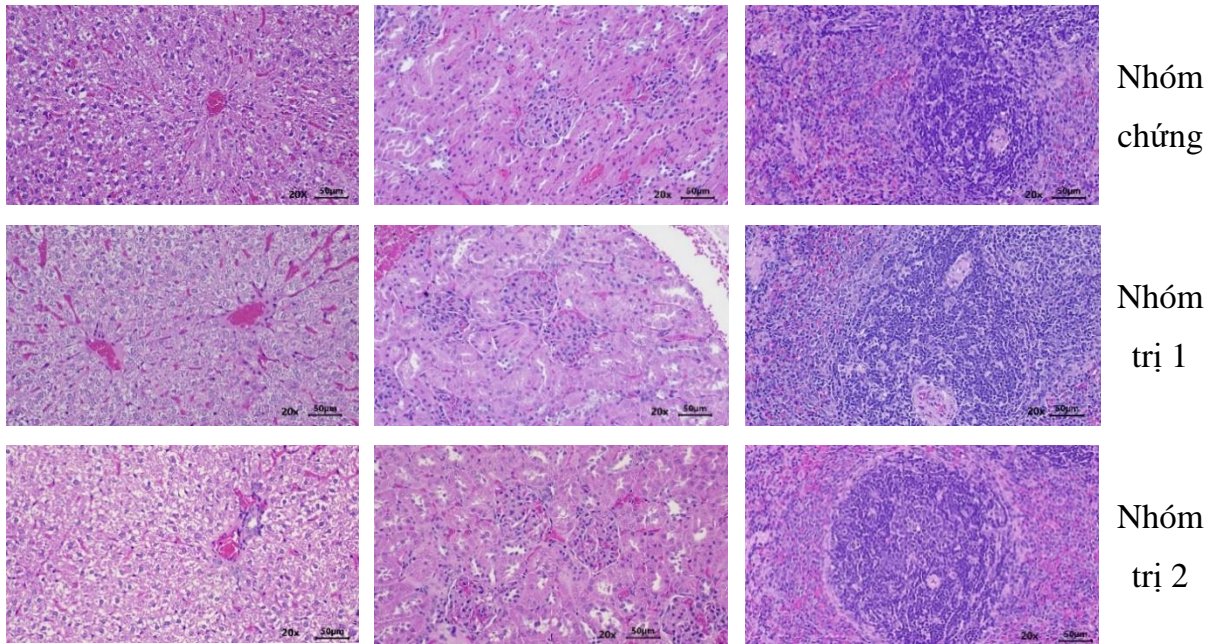
Bảng 3.24. Trọng lượng gan, thận và lách của chuột sau uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 sau 28 ngày

Nhóm	Gan (gram)	Thận (gram)	Lách (gram)
Nhóm chứng	8,83±1,50	1,38±0,35	0,62±0,09
Nhóm trị 1	8,87±2,42	1,48±0,35	0,62±0,16
Nhóm trị 2	8,94±2,28	1,54±0,31	0,62±0,08
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Hình ảnh vi thể của gan, thận và lá lách của chuột trên Hình 3.33 cho thấy:

- Các bề gan và tiểu thùy gan bình thường, không có, thoái hóa, xâm nhập viêm, tĩnh mạch trung tâm không giãn, không xung huyết.
- Nhu mô thận gồm có vùng vỏ và vùng tủy, trong vùng vỏ các tiểu cầu thận còn rõ cấu trúc, các tế bào biểu mô ống thận không bị thoái hóa.
- Nhu mô lách có vùng tủy đỏ và vùng tủy trắng. Vùng tủy trắng có các nang lympho với động mạch bút lông ở giữa.

Như vậy, hình ảnh nhu mô gan, thận và lách bình thường ở tất cả các nhóm chuột nghiên cứu cho thấy tổ hợp hạt nano ACC19-10 không gây độc tính bán trường diễn trên động vật thực nghiệm.



Hình 3.33. Hình ảnh vi thể nhu mô gan, thận và lách ở các nhóm chuột thử nghiệm

3.4.3. Khảo sát tác dụng của hạt tổ hợp nano carrageenan/collagen/allopurinol đến sự giảm nồng độ urat/acid uric trong máu của các nhóm chuột được thử nghiệm

3.4.3.1. Sự thay đổi cân nặng và tỷ lệ chuột chết của các nhóm chuột trong quá trình thử nghiệm

Bảng 3.25 thể hiện sự thay đổi về cân nặng và tỷ lệ chuột chết của các nhóm chuột. Trong quá trình thử nghiệm, không có chuột chết chỉ gây mô hình tăng acid uric máu cũng như đánh giá tác dụng của hạt tổ hợp nano Car/C/ALP. Như vậy, mô hình tăng acid uric trên chuột sử dụng potassium oxalate là an toàn. Cân nặng của các nhóm chuột sau khi điều trị bởi các hạt tổ hợp nano mang ALP so với trước điều trị là không có ý nghĩa thống kê ở tất cả các nhóm chuột nghiên cứu ($p > 0,05$). So sánh cân nặng giữa các nhóm chuột nghiên cứu, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm chuột nghiên cứu ở cả trước và sau điều trị ($p > 0,05$). Kết quả này chứng tỏ hạt tổ hợp nano mang ALP không ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng của chuột thử nghiệm.

Bảng 3.25. Cân nặng và số chuột chết của các nhóm chuột trước và sau khi uống 7 ngày

	Trước uống thuốc	Sau uống thuốc 7 ngày	P	Số chuột chết
Nhóm chứng trắng (n=60)	20,70 ± 1,50	20,58 ± 1,54	p>0,05	0
Nhóm chứng bệnh	20,59 ± 1,85	20,24 ± 1,70	p>0,05	0

(n=60)				
Nhóm allopurinol (n=60)	20,54 ± 1,48	20,31 ± 1,60	p>0,05	0
Nhóm nano-allopurinol (n=60)	20,55 ± 1,29	20,55 ± 1,50	p>0,05	0
P	p>0,05	p>0,05		

3.4.3.3. Giá trị nồng độ acid uric máu ở các nhóm nghiên cứu

Bảng 3.26 thể hiện nồng độ acid uric máu của chuột ở các nhóm nghiên cứu. Nhóm chứng trắng có nồng độ này dao động trong khoảng 40 ÷ 77 $\mu\text{mol/L}$ với giá trị trung bình là $67,32 \pm 8,22 \mu\text{mol/L}$. Nồng độ acid uric máu của chuột ở các thời điểm thử nghiệm tương đồng với nhau.

Bảng 3.26. Nồng độ acid uric ở nhóm chuột chứng trắng; chứng bệnh; uống ALP và nano-ALP

Thời điểm	Nhóm chứng trắng		Nhóm chứng bệnh		Uống ALP		Uống nano-ALP	
	Khoảng dao động ($\mu\text{mol/L}$)	TB ($\mu\text{mol/L}$)	Khoảng dao động ($\mu\text{mol/L}$)	TB ($\mu\text{mol/L}$)	Khoảng dao động ($\mu\text{mol/L}$)	TB ($\mu\text{mol/L}$)	Khoảng dao động ($\mu\text{mol/L}$)	TB ($\mu\text{mol/L}$)
Sau 1 giờ (n=10)	49 ÷ 76	66,90 ± 9,82	88 ÷ 133	97,6 ± 15,90	50 ÷ 88	71,60 ± 12,64	50 ÷ 81	66,80 ± 9,92
Sau 2 giờ (n=10)	50 ÷ 77	66,80 ± 8,53	86 ÷ 133	105,70 ± 19,35	55 ÷ 88	74,80 ± 10,77	50 ÷ 83	69,90 ± 8,49
Sau 4 giờ (n=10)	58 ÷ 77	68,60 ± 5,15	88 ÷ 170	123,60 ± 28,45	50 ÷ 97	76,70 ± 17,02	58 ÷ 75	68,50 ± 4,95
Sau 8 giờ (n=10)	40 ÷ 75	67,30 ± 10,45	88 ÷ 160	119,50 ± 27,80	59 ÷ 108	86,60 ± 15,57	59 ÷ 85	73,70 ± 8,27
Sau 16 giờ (n=10)	45 ÷ 75	66,90 ± 9,82	88 ÷ 146	112,20 ± 18,18	89 ÷ 165	115,70 ± 26,27	55 ÷ 110	83,40 ± 16,17
Sau 24 giờ (n=10)	55 ÷ 76	67,4 ± 6,40	82 ÷ 147	106,9 ± 25,20	81 ÷ 145	112,20 ± 21,36	88 ÷ 132	101,1 ± 13,20
Tổng hợp	40 ÷ 77	67,32 ± 8,22	82 ÷ 170	110,92 ± 23,70	50 ÷ 165	89,60 ± 24,94	50 ÷ 132	77,23 ± 15,88

Ở nhóm chứng bệnh (gây mô hình tăng acid uric máu): Nồng độ acid uric dao động trong khoảng $82 \div 170 \mu\text{mol/L}$ với giá trị trung bình là $110,92 \pm 23,70 \mu\text{mol/L}$. Có sự khác nhau về nồng độ acid uric máu của chuột ở các thời điểm sau uống potassium oxalate và uống nước muối sinh lý. Có thể thấy nồng độ acid uric tăng cao nhất sau 4 giờ uống $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ và uống nước muối sinh lý, sau đó giảm nhẹ ở các thời điểm tiếp theo.

Nồng độ acid uric máu ở chuột nhóm ALP (được uống All) có khoảng dao động là $50 \div 165 \mu\text{mol/L}$ với giá trị trung bình là $89,60 \pm 24,94 \mu\text{mol/L}$, có xu hướng tăng dần sau thời gian uống ALP, tăng gần tương đương với nhóm chứng bệnh ở thời điểm sau uống ALP 16 giờ và 24 giờ.

Với nhóm chuột uống hạt tổ hợp nano-ALP (hạt tổ hợp nano Car/C/All) nồng độ acid uric máu dao động khoảng $50 \div 132 \mu\text{mol/L}$ với giá trị trung bình là $77,23 \pm 15,88 \mu\text{mol/L}$. Nồng độ acid uric ở các thời điểm từ sau uống hạt tổ hợp nano mang allopurinol 1 giờ, 4 giờ và 8 giờ tương đương với nhóm chuột bình thường. Sau 16 giờ và 24 giờ nồng độ acid uric trong máu ở chuột uống hạt tổ hợp nano mang ALP tăng cao hơn so với chuột nhóm chứng trắng nhưng thấp hơn so với chuột gây mô hình tăng acid uric.

3.4.3.4. Tỷ lệ acid uric tăng ở nhóm chuột gây mô hình so với nhóm chứng trắng

Nồng độ acid uric máu của nhóm chuột sau khi uống $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ để gây mô hình tăng acid uric tăng trung bình khoảng $1,65 \pm 0,13$ lần. Ở các thời điểm thử nghiệm khác nhau, mức tăng acid uric của nhóm uống $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ tăng dao động từ 1.46 đến 1.80 lần so với tăng nồng độ acid uric ở nhóm chuột bình thường (Bảng 3.27).

Bảng 3.27. Tỷ lệ acid uric tăng ở nhóm chuột sau uống $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$

Thời điểm	Tỷ lệ tăng trung bình
Sau 1 giờ (n=10)	1,46
Sau 2 giờ (n=10)	1,58
Sau 4 giờ (n=10)	1,80
Sau 8 giờ (n=10)	1,78
Sau 16 giờ (n=10)	1,68
Sau 24 giờ (n=10)	1,59
Trung bình	$1,65 \pm 0,13$

3.4.3.5. Tỷ lệ acid uric giảm ở nhóm uống hạt tổ hợp nano mang ALP so với nhóm gây mô hình

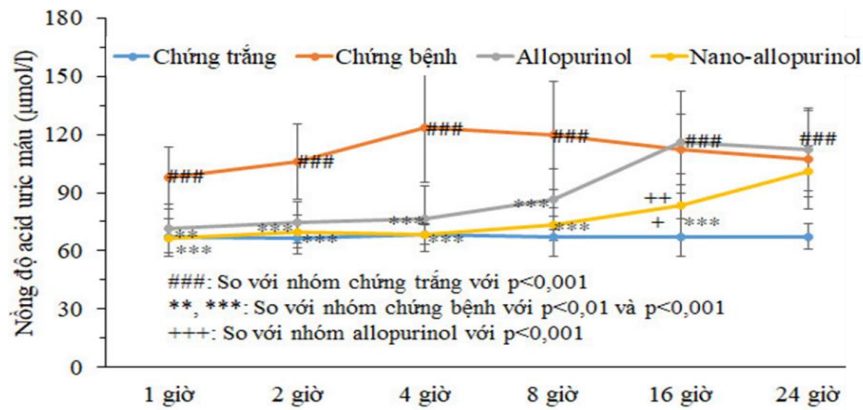
Mức độ giảm nồng độ acid uric máu ở nhóm chuột uống ALP sau 1 giờ đến 8 giờ uống dao động từ 26,64 % đến 37,94 %, sau 16 giờ và 24 giờ không thấy giảm. Điều này do nồng độ ALP đạt đỉnh sau 2 – 6 giờ sau khi uống và thời gian thải trừ của ALP ra khỏi huyết tương sau 15 giờ sau khi uống. Mức độ giảm nồng độ acid trung bình là $18,88 \pm 18,21$ %. Trong khi, ở nhóm chuột uống hạt tổ hợp nano Car/C/ALP, mức độ giảm nồng độ acid uric máu ở các thời điểm sau uống thuốc đều nhiều hơn so với nhóm uống ALP. Mức độ giảm nồng độ acid uric máu ở nhóm chuột uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 là $29,90 \pm 13,58$ % (Bảng 3.28). Như vậy, kết quả này cho thấy hạt tổ hợp nano ACC19-10 ở cùng hàm lượng điều trị có tác dụng làm giảm nồng độ acid uric trong máu chuột mạnh hơn so với nhóm chuột uống ALP.

Bảng 3.28. Tỷ lệ giảm acid uric máu ở các nhóm chuột

Thời điểm	Nhóm ALP	Nhóm nano-ALP
Sau 1 giờ	26,64 %	31,56 %
Sau 2 giờ	29,23 %	33,87 %
Sau 4 giờ	37,94 %	44,58 %
Sau 8 giờ	27,53 %	38,33 %
Sau 16 giờ	-3,11 %	25,67 %
Sau 24 giờ	-4,95 %	5,43 %
Trung bình	$18,88 \pm 18,21$ %	$29,90 \pm 13,58$ %

3.4.3.6. Sự khác nhau về nồng độ acid uric giữa các nhóm chuột nghiên cứu

Nồng độ acid uric ở nhóm chứng bệnh (gây mô hình) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng trắng (chuột bình thường) với $p < 0,001$ ở tất cả thời điểm nghiên cứu. Nồng độ acid uric ở nhóm điều trị bằng ALP và hạt tổ hợp nano Car/C/ALP thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh từ sau uống thuốc từ 1 giờ đến 8 giờ (đối với nhóm uống ALP) và đến 16 giờ (đối với nhóm uống hạt tổ hợp nano carrageenan/collagen/ALP) với $p < 0,001$). Nồng độ acid uric máu ở nhóm uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm uống ALP ở thời điểm sau uống thuốc 16 giờ (Hình 3.34).



Hình 3.34. Sự khác nhau về nồng độ acid uric giữa các nhóm chuột nghiên cứu

Trong đề tài này, mô hình tăng acid uric máu bằng uống dung dịch Potassium oxalate 250 mg/kg phù hợp với mục đích nghiên cứu. Để gây mô hình này, chuột đã được uống potassium oxalate hàm lượng 250 mg/kg trong 7 ngày theo phương pháp của Wang và cộng sự (2016) [169]. Sau 7 ngày uống potassium oxalate, hàm lượng 250 mg/kg, nồng độ acid uric ở nhóm chuột uống potassium oxalate cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chuột bình thường (uống nước muối sinh lý) với mức tăng acid uric dao động khoảng 1,46 – 1,80 lần. Mức tăng này là tương đương với mức tăng acid uric máu khi gây mô hình tăng acid máu của chuột bằng potassium oxalate ở các nghiên cứu trước đây [169 – 173]. Đặc biệt, mức tăng acid uric dao động trong khoảng tương đối hẹp ở các thời điểm sau khi uống potassium oxalate từ 1 giờ đến 24 giờ. Như vậy, mô hình tăng acid uric trên chuột thực nghiệm tương đối ổn định, đảm bảo đánh giá được tác dụng giảm acid uric máu của hạt tổ hợp nano Car/C/ALP. Với thời gian thử nghiệm ngắn, mô hình tăng acid uric của chuột sử dụng potassium oxalate liều 250 mg/kg trong 7 ngày liên tiếp là an toàn và phù hợp.

Trên mô hình tăng acid uric máu bằng potassium oxalate, kết quả đánh giá tác dụng hạ acid uric máu của các nhóm chuột cho thấy nồng độ acid uric máu ở nhóm uống hạt tổ hợp nano Car/C/ALP kéo dài hơn so với nhóm uống allopurinol. Như vậy tổ hợp nano Car/C/ALP có hiệu quả tốt để mang allopurinol, kiểm soát quá trình hấp thu và giải phóng allopurinol từ màng và hạt tổ hợp Car/C/ALP.

Từ kết quả này, NCS sẽ tiếp tục nghiên cứu để ứng dụng tổ hợp Car/C/ALP trên lâm sàng nhằm tăng tác dụng hạ acid uric máu của ALP trong thời gian tới.

KẾT LUẬN

1. Đã lựa chọn được điều kiện thích hợp để trích ly collagen từ hỗn hợp vảy cá thuộc họ cá chép – *Cyprinidae* (ở Việt Nam). Bằng các tác nhân kiềm và acid thích hợp, collagen được tách bằng dung dịch CH_3COOH 0,5 M, được kết tủa bằng NaCl. Thẩm tích collagen trong 48 giờ thu được collagen tinh loại I, có chứa các chuỗi α_1 , α_2 và β ; dạng sợi (đường kính 0,5-1 μm); nhiệt độ biến tính 32,3 °C; chứa 18 acid amin.

2. Đã chế tạo được màng tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol (Car/C/ALP), sử dụng KCl (1% so với khối lượng Car) để tạo gel. Tỷ lệ Car/C thích hợp 95/5. Hạt ALP phân tán trong hỗn hợp Car/C với kích thước khoảng 50 – 100 nm, tương tác trong tổ hợp là liên kết hydro, tương tác lưỡng cực – lưỡng cực và tương tác tĩnh điện.

3. Đã chế tạo được hạt tổ hợp nano carrageenan/collagen/allopurinol (Car/C/ALP) ở các tỷ lệ Car/C và hàm lượng ALP khác nhau bằng phương pháp gel – ion hóa. Tỷ lệ Car/C thích hợp cho hạt tổ hợp nano Car/C/ALP có kích thước nhỏ nhất là 10/90.

4. Kết quả xác định hàm lượng ALP giải phóng từ các mẫu màng và hạt tổ hợp Car/C/ALP trong các dung dịch mô phỏng dịch dạ dày (pH 2), dịch ruột (pH 7,4) cho thấy rằng các giai đoạn, hàm lượng ALP giải phóng từ các hạt tổ hợp nano đều lớn hơn so với từ mẫu ALP tinh khiết (cao hơn 3,27 – 7,25 lần). Quá trình giải thuốc ALP từ hạt tổ hợp tuân theo 2 giai đoạn: giai đoạn giải phóng nhanh và giai đoạn giải phóng chậm, có kiểm soát. Sau 32 giờ thử nghiệm, hàm lượng thuốc ALP giải phóng từ các mẫu hạt tổ hợp chế tạo ở các điều kiện khác nhau trong dung dịch đệm pH 2 đạt từ 19,647 – 67,650 %, trong dung dịch đệm pH 7,4 đạt từ 23,330 – 98,082 %.

5. Quá trình giải phóng ALP từ các màng tổ hợp Car/C/ALP trong các dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4 chủ yếu tuân theo mô hình Kosmeyer – Peppas với hệ số khuếch tán $n = 0,361$. Quá trình giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano chủ yếu tuân theo mô hình Kosmeyer- Peppas với hệ số khuếch tán $n = 0,1863$ (trong pH 2) và mô hình Higuchi (trong pH 7,4).

6. Hạt tổ hợp nano Car/C/ALP ở liều pha thử nghiệm tối đa 1500 mg/kg đã không gây độc tính cấp tính trên chuột thử nghiệm. Hạt tổ hợp nano Car/C/ALP với 2 liều 200 mg/kg và 1000 mg/kg, thử nghiệm trong 28 ngày trên chuột cống trắng không ảnh hưởng đến chức năng tạo máu, cấu trúc và chức năng của gan, thận và lách. Hạt tổ hợp nano Car/C/ALP là an toàn với liều đã thử nghiệm. Hạt nano mang allopurinol làm giảm nồng độ acid uric trong máu chuột mạnh hơn so với chuột được làm tăng acid uric, chuột uống ALP.

KIẾN NGHỊ

1. Nghiên cứu, xây dựng mô hình trích ly collagen từ vảy cá nước ngọt miền Bắc Việt Nam theo quy mô pilot và định hướng sản xuất quy mô công nghiệp.
2. Nghiên cứu bào chế và thử nghiệm lâm sàng tiến tới ứng dụng thuốc trên cơ sở hạt tổ hợp nano Car/C/ALP = 10/90/10 vào điều trị giảm lượng acid uric máu trong điều trị bệnh gút.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đã xây dựng được quy trình trích ly collagen từ vây cá nước ngọt (ở Việt Nam). Collagen thu được là collagen tinh loại I, có chứa các chuỗi $\alpha 1$, $\alpha 2$ và β , dạng sợi với đường kính sợi 0,5-1 μm , nhiệt độ biến tính 32,3 $^{\circ}\text{C}$.
2. Đã chế tạo thành công màng và hạt tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol (Car/C/ALP). Các màng tổ hợp có hiệu suất mang allopurinol 28,35 – 78,03%, tùy thuộc vào điều kiện chế tạo, trong khi các hạt tổ hợp có hiệu suất mang ALP cao hơn 27,11 – 80,79%.
3. Tìm được mô hình Korsmeyer-Peppas thích hợp nhất để phản ánh quá trình giải phóng ALP từ màng tổ hợp và các hạt tổ hợp nano Car/C/ALP pH 2 và pH 7,4.
4. Từ kết quả thử nghiệm *in vivo* trên chuột sử dụng hạt tổ hợp nano Car/C/ALP khẳng định hạt tổ hợp có tác dụng hạ acid uric trong máu và không gây độc và tác dụng phụ với liều thử nghiệm (200 mg/kg, 1000 mg/kg và 1500 mg/kg).

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. **Quoc Manh Vu**, Thuy Chinh Nguyen, Duong My Ngoc Dam, Quoc Trung Vu, Trong Lu Le, Tran Dung Hoang, Thi Kim Ngan Tran, Tuan Anh Nguyen, Phi Hung Nguyen, and Hoang Thai, *A Novel Method for Preparation of Carrageenan/Fish Scale Collagen/Allopurinol Biocomposite Film*, International Journal of Polyme Science, **2021**, Article ID 9960233, 10 pages (Q2-SCIE).
2. Nguyen Thuy Chinh, **Vu Quoc Manh**, Thai Hoang, Kavitha Ramadass, C.I. Sathish, Vu Quoc Trung, Tran Thi Kim Ngan, Ajayan Vinu, *Optimizing the component ratio to develop the biocomposites with carrageenan/collagen/allopurinol for the controlled drug release*, Journal of Drug Delivery Science and Technology, **2022**, 68, 102697, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102697> (Q1-SCIE)
3. Chinh Thuy Nguyen, **Manh Quoc Vu**, Thuy Thi Phan, Trung Quoc Vu, Quan An Vo, Giang Long Bach, Hoang Thai, *Novel pH-sensitive hydrogel beads based on carrageenan and fish scale collagen for allopurinol drug delivery*, Journal of Polymes and the Environment, **2020**, 28, 1795–1810 (Q1-SCIE).
4. Nguyen Thuy Chinh, **Vu Quoc Manh**, Vu Quoc Trung, Tran Dai Lam, Mai Duc Huynh, Nguyen Quang Tung, Nguyen Duy Trinh, Thai Hoang, *Characterization of collagen derived from tropical freshwater carp fish scale wastes and its amino acid sequence*, Natural Product Communications, **2019**, 4(7), 1–12. (Q3-SCIE).
5. Nguyen Thi Phuong, Nguyen Thuy Chinh, **Vu Quoc Manh**, Thai Hoang, Vu Quoc Trung, *Some characteristics and allopurinol release of carrageenan/allopurinol films using polyethylene oxide as a dispersion aid agent*, Vietnam Journal of Science and Technology, **2020**, 58(2), 219-227.
6. Nguyen Thuy Chinh, **Vu Quoc Manh**, Vu Quoc Trung, Tran Do Mai Trang, Thai Hoang, *Extraction of hydroxyapatite and collagen from the Vietnamese tilapia scales*, Vietnam Journal of Chemistry, **2019**, 57(2), 225-228.
7. Tran Thi Mai, Nguyen Thuy Chinh, **Vu Quoc Manh**, Nguyen Thi Thu Trang, Tran Do Mai Trang, Vu Quoc Trung, Ha Van Hang, Thai Hoang, *Effect of fish scale collagen on some characteristics and drug release of carrageenan/collagen/allopurinol film*, Vietnam Journal of Science and Technology, **2019**, 57(3B), 1-8.
8. **Vũ Quốc Mạnh**, Thái Hoàng, Vũ Quốc Trung, Thiều Thị Thắm, Nguyễn Thúy Chinh, *Chế tạo và khảo sát một số đặc trưng của vật liệu tổ hợp carrageenan/collagen mang được chất dạng màng*, Tạp chí Hóa học, **2019**, 57(4e3,4), 168-174.
9. Nguyễn Thúy Chinh, Thái Hoàng, **Vũ Quốc Mạnh**, Nguyễn Vũ Giang, Trần Đại Lâm, Vũ Quốc Trung, *Phương pháp chiết tách collagen từ vảy cá nước ngọt Việt Nam, collagen thu được từ phương pháp này và vật liệu tổ hợp chứa collagen này*, Cục Sở hữu trí tuệ, **2021**, Giải pháp hữu ích số 2775 cấp theo Quyết định số 19627w/QĐ-SHTT, ngày 01/12/2021.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. C. Halberstadt, D.F. Emerich, 2011, *Cellular Transplantation from Laboratory to Clinic*, Elsevier.
2. T.S. Hin, 2004, *Biomaterials Engineering and Processing Series – Vol. 1, Engineering materials for biomedical applications*, World Scientific Publishing Co., <https://doi.org/10.1142/5673>
3. A. Nishimura, T. Hayakawa, Y. Yamamoto, M. Hamori, K. Tabata, K. Seto, N. Shibata, 2012, Controlled release of insulin from self-assembling nanofiber hydrogel, PuraMatrix™: application for the subcutaneous injection in rats, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 45(1-2), pp. 1-7.
4. D.P. Huynh, M.K. Nguyen, B.S. Pi, M.S. Kim, S.Y. Chae, K.C. Lee, B.S. Kim, S.W. Kim, D.S. Lee, 2008, Functionalized injectable hydrogels for controlled insulin delivery, *Biomaterials*, 29(16), pp. 2527-2534.
5. A.K. Khan, A.U. Saba, S. Nawazish, F. Akhtar, R. Rashid, S. Mir, B. Nasir, F. Iqbal, S. Afzal, F. Pervaiz, and G. Murtaza, 2017, Carrageenan Based Bionanocomposites as Drug Delivery Tool with Special Emphasis on the Influence of Ferromagnetic Nanoparticles, *Oxid Med Cell Longev*, Article ID 8158315, <https://doi.org/10.1155/2017/815831>.
6. L. Li, R. Ni, Y. Shao, S. Mao, 2014, Carrageenan and its applications in drug delivery, *Carbohydr. Polym.*, 103, pp. 1–11.
7. V.L. Campo, D.F. Kawano, D.B. Silva, D.I. Carvalho, 2009, Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis-A review, *Carbohydr. Polym.*, 77, pp.167–180.
8. I. Wijesekara, R. Pangestuti, and S.K. Kim, 2011, Biological activities and potential health benefits of sunphated polysaccharides derived from marine algae, *Carbohydr. Polym.*, 84, pp. 14–21.
9. G.K. Glantzounis, E.C. Tsimoyiannis, A.M. Kappas, D.A. Galaris, 2005, Uric acid and oxidative stress, *Curr. Pharm. Des.*, 11(32), pp. 4145–4151.
10. N. Schlesinger, 2005, *Dietary factors and hyperuricemia*, *Curr. Pharm. Des.*, 11(32), pp. 4133–4138.

11. Z. Miao, S. Yan, J. Wang, B. Wang, Y. Li, X. Xing, 2009, Insulin resistance acts as an independent risk factor exacerbating high-purine diet induced renal injury and knee joint gouty lesions, *Inflamm. Res.*, 58(10), pp. 659–668.
12. P. Fratzl, 2008, *Collagen: Structure and mechanics*, Springer.
13. J. Abraham, D.N. Kumar, 2011, *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development*, John Wiley and Sons.
14. A.V. Persikov, J.A.M. Ramshaw, A. Kirkpatrick, and B. Brodsky, 2000, Acid Propensities for the Collagen Triple-Helix, *Biochemistry*, 39, pp. 14960-14967.
15. S. Sakakibara, K. Inouye, K. Shudo, Y. Kishida, Y. Kobayashi and D.J. Prockop, 1973, Synthesis of (Pro-Hyp-Gly)_n of defined molecular weights Evidence for the stabilization of collagen triple helix by hydroxyproline, *Biochim. Biophys. Acta.*, 303, pp. 198-202.
16. K. Marxen, K.H. Vanselow, S. Lippemeier, R. Hintze, A. Ruser, U.P. Hansen, 2007, Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements, *Sensors*, 7, pp. 2080-2095.
17. J.D. Bronzino, 2000, *The Biomedical Engineering Handbook*, CRC Press LLC.
18. B. Brodsky, A.V. Persikov, 2005, Molecular structure of the collagen triple helix, *Adv. Protein Chem.*, 70, pp. 301-339.
19. K. Gelse, E. Pösch, T. Aigner, 2003, Collagens structure, function, and biosynthesis, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 55(12), pp. 1531-1546.
20. M.D. Shoulders and P.T. Raines, 2009, Collagen structure and stability, *Ann. Rev. Biochem.*, 78, pp. 929-958.
21. H.H. Hsu, T. Uemura, I. Yamaguchi, T. Ikoma, and J. Tanaka, 2016, Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on fish scale collagen, *J. Biosci. Bioeng.*, 122, pp. 219-225.
22. N. Kasoju, S.S. Ali, V.K. Dubey and U. Bora, 2010, Exploiting the Potential of Collagen as a Natural Biomaterial in Drug Delivery, *Journal of proteins and proteomics*, 1(1), pp. 9-14.

23. P.K. Bhagwat, P.B. Dandge, 2016, Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, pp. 234-240.
24. G. Caruso, 2015, Fishery wastes and by-products: A resource to be valorized, *Journal of Fisheries Sciences* com, 9(4), pp. 80–83.
25. A. Shavandi, Y. Hou, A. Carne, M. McConnell, A. E. Bekhit, 2019, Chapter Four-Marine Waste Utilization as a Source of Functional and Health Compounds, *Advances in Food and Nutrition Research*, 87, pp. 187–254.
26. Y. Hou, A. Shavandi, A. Carne, A. A. Bekhit, T. B. Ng, R. C. F. Cheung, A. E. Bekhit, 2016, Marine shells: Potential opportunities for extraction of functional and health-promoting materials, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46, pp. 1047–1116.
27. Mahboob S., 2015, Isolation and characterization of collagen from fish waste material-skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*, *Journal of Food Science Technology*, 52, pp. 4296–4305.
28. Blanco M., Vázquez J.A., Pérez-Martín R.I., Sotelo C.G., 2019, Collagen extraction optimization from the skin of the small-spotted catshark (*S. canicula*) by response surface methodology, *Marine Drugs*, 17(1), 40, doi:10.3390/md17010040.
29. Ayat A. Abbas, Khalida A. Shakir and Marie K. Walsh, 2022, Functional Properties of Collagen Extracted from Catfish (*Silurus triostegus*) Waste, *Foods*, 11(5), 633, doi.org/10.3390/foods11050633.
30. Huang C.Y., Kuo J.M., Wu S.J., Tsai H.T., 2016, Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion–hydro-extraction process, *Food Chemistry*, 190, pp. 997–1006.
31. Tan Y., Chang S.K., 2018, Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin, *Food Chemistry*, 242, pp. 147–155.

32. Arumugam G.K.S., Sharma D., Balakrishnan R.M., Ettiyappan J.B.P., 2018, Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 9, pp. 19–26.
33. Yang H., Duan L., Li Q., Tian Z., Li G., 2018, Experimental and modeling investigation on the rheological behavior of collagen solution as a function of acetic acid concentration, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 77, pp. 125–134.
34. M. Ogawa, R. J. Portier, M. W. Moody, JonBell, M. A. Schexnayder, J. N. Losso, 2004, Biochemical properties of bone and sale collagen isolated from subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheeps head Seabream (*Archosargus probatocephalus*), *Food Chemistry*, 88(4), pp. 495-501.
35. L. S. Senaratne, P. J. Park, S. K. Kim, 2006, Isolation and characterisation of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin, *Bioresource Technology*, 97(2), pp. 191-197.
36. L. Wang, X. An, F. Yang, Z. Xin, L. Zhao, Q. Hu, 2008, Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redsh (*Sebastes mentella*), *Food Chemistry*, 108(2), 616-623.
37. C. Y. Huang, J. M. Kuo, S. J. Wu, H. T. Tsai, 2016, Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion–hydro-extraction process, *Food Chemistry*, 190, pp. 997–1006.
38. R. Z. Oktarlina, S. Bahri, A. N. T. Adjeng, 2022, Production and Characterization of Micro-Collagen from Carp Scales Waste (*Cyprinus carpio*), *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 15(5), doi.org/10.52711/0974-360X.2022.00331.
39. R. Gál, P. Mokrejš, J. Pavlačková, D. Janáčová, 2022, Cyprinus carpio Skeleton Byproduct as a Source of Collagen for Gelatin Preparation, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3164.
40. Nguyễn Đỗ Quỳnh, Nguyễn Lê Anh Đào, 2015, Nghiên cứu sản xuất gelatin từ da cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*), *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 40(1), tr. 47-52.

41. Trần Thị Huyền Nguyễn Anh Tuấn, Hoàng Ngọc Anh, Vũ Lê Quyên, 2012, Tách chiết collagen từ da cá tra bằng phương pháp hoá học (*Pangasius hypophthalmus*) bằng phương pháp hoá học, *Tạp chí Khoa học-Công nghệ Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang*, 2, tr. 31-36.
42. Võ Quốc Văn, Hà Thanh Toàn, 2018, Nghiên cứu sản xuất gelatin từ da cá Tra, *Thương mại Thủy sản*, tr. 128-130.
43. Trần Thanh Nhân, Tối ưu hoá quy trình sản xuất gelatin từ da cá Basa bằng phương pháp enzym, 2009, *Tạp chí Y học, Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh*, 13(2), tr. 52-58.
44. T. T. M. Thu, N. Đ. Quỳnh, T. T. Trúc, L. T. M. Thủy, 2021, Nghiên cứu điều kiện tiền xử lý và chiết tách collagen từ da cá lóc (*Channa striata*) bằng pepsin, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 57(6B), tr. 178-188.
45. S. Chen, H. Chen, 2016, *Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of reddrum fish (Sciaenops ocellatus)*, *Food Hydrocolloids*.
46. S. Benjakul, S. Nalinanon, and F. Shahidi, 2012, Chapter 20: Fish Collagen, *Food Biochemistry and Food Processing, John Wiley and Sons, Inc.*
47. C. H. Lee, A. Singla, Y. Lee, 2001, Biomedical applications of collagen, *International Journal of Pharmaceutics*, 221, pp. 1-22.
48. A. K. Khan, A. U. Saba, S. Nawazish, F. Akhtar, R. Rashid, S. Mir, B. Nasir, F. Iqbal, S. Afzal, F. Pervaiz, and G. Murtaza, 2017, Carrageenan Based Bionanocomposites as Drug Delivery Tool with Special Emphasis on the Influence of Ferromagnetic Nanoparticles, *Oxi. Med. Cell. Longev.*, Article ID 8158315.
49. Tan M.U., 2010, Method for producing cold-soluble semi-refined carrageenan and applications of cold-soluble semi-refined carrageenan, *Pub. No.: WO/2010/138004, International Application No.: PCT/PH2009/000006*.
50. Therkelsen G.H., 2012, Carrageenan. In Whistler, R. L. (ed.) *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives, 2nd ed.*, (Academic Press Inc., New York), pp. 146–176.

51. J. P. Doyle, Giannouli, Persephoni, Rudolph, Brian and Morris., R. Edwin, 2010, Preparation, authentication, rheology and conformation of theta carrageenan, *Carbohydrate Polymers*, 80, pp. 648–654.
52. S. Liu, L. Lin, 2016, Thermoreversible gelation and scaling behavior of Ca²⁺-induced κ -carrageenan hydrogels, *Food Hydrocolloids*, 61, pp. 793-800.
53. E.E. Braudo, 1992, Mechanism of galactan gelation, *Food Hydrocoll*, 6, pp. 25-43.
54. Y. Chen, M. L. Liao, and D. E. Dunstan, 2002, The rheology of K⁺ κ -carrageenan as a weak gel, *Carbohydrate Polymers*, 50, pp. 109–116.
55. V. Webber, S. M. Carvalho and P. L. M. Barreto, 2012, Molecular and rheological characterization of carrageenan solutions extracted from *Kappaphycus alvarezii*, *Carbohydrate Polymers*, 90, pp. 1744–1749.
56. L. Hilliou, F. D. S. Larotonda, P. Abreu, A. M. Ramos and A. M. Sereno and M. P. Goncalves, 2006, Effect of extraction parameters on the chemical structure and gel properties of κ - ι hybrid carrageenans obtained from *Mastocarpus stellatus*, *Biomolecular Engineering*, 23, pp. 201-208.
57. L. Kong and G. R. Ziegler, 2013, Fabrication of κ -carrageenan fibers by wet spinning: Addition of ι -carrageenan, *Food Hydrocolloids*, 30, pp. 302-306.
58. M. C. Núñez-Santiago, A. Tecante, C. Garnier and J. L. Doublier, 2011, Rheology and microstructure of κ -carrageenan under different conformations induced by several concentrations of potassium ion, *Food Hydrocolloids*, 25, pp. 32-41.
59. A. A. Al-alawi, I. M. Al-Marhubi, M. S. M. Al-Belushi, B. Soussi, 2011, Characterization of carrageenan extracted from *Hypnea bryoides* in Oman, *Marine Biotechnology (NY)*, 13(5), pp. 893-899.
60. J. M. Dennis, 2003, A Guide to the Seaweed Industry, FAO Fisheries Technical Paper 441, *Food and agriculture organization of the united nations, Rome*.
61. E. Vázquez-Delfín, D. Robledo, Y. Freile-Peigrín, 2014, Microwave-assisted extraction of the Carrageenan from *Hypnea musciformis* (*Cystocloniaceae*, *Rhodophyta*), *Journal of Applied Phycology*, 26(2), pp. 901–907.

62. A. Hasizah, M. Mahendradatta, A. Laga, M. Metusalach, S. Salengke, 2021, Extraction of carrageenan from *Eucheuma spinosum* using ohmic heating: optimization of extraction conditions using response surface methodology, *Food Science and Technology*, 41(4), pp. 928-937.
63. V. Webber, S. M. D. Carvalho, P. J. Ogliari, L. Hayashi, P. L. M. Barreto, 2012, Optimization of the extraction of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* using response surface methodology, *Food Science and Technology (Campinas)*, 32(4), pp. 812-818.
64. S. M. Anisuzzama, A. Bono, D. Krishnaiah, N. A. Hussin, and H. Y. Wong, 2014, Effects of extraction process conditions on semi refined carrageenan produced by using spray dryer, *Journal of Applied Sciences*, 14(12), pp. 1283-1288.
65. K. Tarman, U. Sadi, J. Santoso, L. Hardjito, 2020, Chapter 7: Carrageenan and its enzymatic extraction, *Encyclopedia of Marine Biotechnology (United States: John Wiley and Sons Ltd.)*, pp. 147–159. doi: 10.1002/9781119143802.ch7.
66. S. A. Varadarajan, N. RamLi, A. Ariff, M. Said, S. M. Yasir, 2019, Development of high yielding carragenan extraction method from *Eucheuma cotonii* using cellulase and *Aspergillus niger*, *Presiding Seminar Kimia Bersama UKM-ITB VIII*, pp. 461–469.
67. S. Jayasekara, and R. Ratnayake, 2019, Microbial cellulases: an overview and applications, in *Cellulose. eds. A. R. Pascual and M. E. E. Martín (London: IntechOpen)*, pp. 1–21.
68. C. Ma, L. Yang, Y. Zu, and T. Liu, 2012, Optimization of conditions of solvent-free microwave extraction and study on antioxidant capacity of essential oil from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill, *Food Chem*, 134, pp. 2532–2539.
69. M. Álvarez-Viñas, S. Rivas, M. D. Torres, H. Domínguez, 2023, Microwave-Assisted Extraction of Carrageenan from *Sarcopeltis skottsbergii*, *Marine Drugs*, 21(2), 83. doi: 10.3390/md21020083.

70. S. Y. Uy, A. J. Easteal, M. M. Farid, R. B. Keam, and G. T. Conner, 2005, Seaweed processing using industrial single-mode cavity microwave heating: A preliminary investigation, *Carbohydrate Research*, 340, pp. 1357–1364.
71. E. Vázquez-Delfín, D. Robledo, Y. Freile-Pelegrín, 2016, Microwave-assisted extraction of the Carrageenan from *Hypnea musciformis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta), *Journal of Applied Phycology*, 26, pp. 901–907.
72. Đào Trọng Hiếu, 2007, Tối ưu hóa quy trình công nghệ tách chiết carrageenan từ Rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*), *Thông tin Khoa học Công nghệ - Kinh tế thủy sản*, tr. 25 – 29.
73. Nguyễn Thị Thu Thùy, Lê Thị Liên Thanh, 2015, Nghiên cứu chiết tách carrageenan từ Rong sụn Ninh Thuận, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng*, 11(96), tr. 114 – 118.
74. Trần Thị Luyến, 2010, Nghiên cứu xác lập quy trình sản xuất carrageenan bán tinh chế (*semirefined carrageenan - SRC*) từ Rong sụn *Kappaphycus Alvarezii* Cam Ranh - Khánh Hoà, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 1, tr. 3-10.
75. Lê Thị Thúy Hằng, Vũ Ngọc Bội, 2013, Nghiên cứu sử dụng *Viscozyme L* trong sản xuất carrageenan từ Rong sụn (*Kappaphycus Alvarezii (Doty) Doty*), *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 2, tr. 107 – 111.
76. A. N. Al-Baarri, A. M. Legowo, H. Rizqiaty, Widayat, A. Septianingrum, H. N. Sabrina, L. M. Arganis, R. O. Saraswati and R. C. P. R. Mochtar, 2018, Application of iota and kappa carrageenans to traditional several food using modified cassava flour, *Earth and Environmental Science*, 102, ID:012056.
77. E. García-García, A. Totosaus, 2008, Low-fat sodium-reduced sausages: Effect of the interaction between locust bean gum, potato starch and κ -carrageenan by a mixture design approach, *Meat Science*, 78, pp. 406–411.
78. M. Kumar and B.D. Sharma, 2004, The storage stability and textural, physico-chemical and sensory quality of low-fat ground pork patties with carrageenan as fat replacer, *International Journal of Food Science and Technology*, 39(1), pp. 31–39.

79. S. M. Mahungu, S. L. Hansen and U. E. Artz, 2002, Fat substitutes. In: Food Additives (eds A.L. Brown, P.M. Davidson, S. Salminen and J.H. Thorngate III), *Marcel Dekker, New York*, **2002**, 311.
80. T. G. Chuah, H. H. Nisah, S. Y. T. Choong, N. L. Chin, A. H. N. Sheikh, 2007, Effects of temperature on viscosity of dodol (concoction), *Journal of Food Engineering*, 80, pp. 423-430.
81. A. J. Borderías, I. Sánchez-Alonso, M. Pérez-Mateos, 2006, New applications of fibers in foods: Addition to fishery products, *Trends in Food Science and Technology*, 16, pp. 458–465.
82. H. Yuan, W. Zhang, X. Lu, H. Li, X. Geo and J. Song, 2005, Preparation and in vitro antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives, *Carbohydrate Research*, 340, 685.
83. Venugopal, 2011, Seaweed Polysaccharides - Food Applications, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(2), pp. 541-555.
84. N. Poupard, P. Badarou, F. Fasani, H. Groult, N. Bridiau, 2017, Assessment of heparanase-mediated angiogenesis using microvascular endothelial cells: identification of λ -carrageenan derivative as a potent anti angiogenic agent, *Marine Drugs*, 15(5), 134.
85. E. Cicinskas, A. M. Begun, A. V. Tiasto, A. S. Belousov, V. V. Vikhareva, V. A. Mikhailova, A. A. Kalitnik, 2020, In vitro antitumor and immunotropic activity of carrageenans from red algae *Chondrus armatus* and their low-molecular weight degradation products, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(2), pp. 254–266.
86. Z. Yao, H. Wu, S. Zhang, Y. Du, 2014, Enzymatic preparation of κ -carrageenan oligosaccharides and their anti-angiogenic activity, *Carbohydrate Polymers*, 101, pp. 359–367.
87. H. M. Chen, X. J. Yan, F. Wang, J. Lin, 2007, In vitro anti-angiogenic action of λ -carrageenan oligosaccharides, *Acta Pharmaceutica Sinica*, 42(6), pp. 595–600.

88. L. Jia, S. Ma, 2016, Recent advances in the discovery of heparanase inhibitors as anticancer agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 121, pp. 209–220.
89. Z. Yao, L. Xu, H. Wu, 2014, Immunomodulatory function of κ -carrageenan oligosaccharides acting on LPS-activated microglial cells, *Neurochemical Research*, 39(2), pp. 333–343.
90. L. Ai, Y. Chung, S. Lin, K. Jeng, P. F. H. Lai, Z. Xiong, G. Wang, 2018, Carrageenan polysaccharides and oligosaccharides with distinct immunomodulatory activities in murine microglia BV-2 cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, pp. 633–640.
91. L. Xu, Z. Yao, H. Wu, F. Wang, S. Zhang, 2012, The immune regulation of κ -carrageenan oligosaccharide and its desulfated derivatives on LPS-activated microglial cells, *Neurochemistry International*, 61(5), pp. 689–696.
92. E. M. Pacheco-Quito, R. Ruiz-Caro and M. D. Veiga, 2020, Carrageenan: Drug Delivery Systems and Other Biomedical Applications, *Marine Drugs*, 18, 583, doi:10.3390/md18110583.
93. M. P. Sánchez-Sánchez, A. Martín-Illana, R. Ruiz-Caro, P. Bermejo, M. J. Abad, R. Carro, L. M. Bedoya, A. Tamayo, J. Rubio, A. Fernández-Ferreiro, 2015, Chitosan and Kappa-Carrageenan Vaginal Acyclovir Formulations for Prevention of Genital Herpes. In Vitro and Ex Vivo Evaluation, *Marine Drugs*, 13, pp. 5976–5992.
94. X. Sun, C. Pan, Z. Ying, D. Yu, X. Duan, F. Huang, J. Ling, X. Ouyang, 2020, Stabilization of zein nanoparticles with κ -carrageenan and tween 80 for encapsulation of curcumin, *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, pp. 549–559.
95. S. Vijayakumar, K. Saravanakumar, B. Malaikozhundan, M. Divya, B. Vaseeharan, E. F. Durán-Lara, M. H. Wang, 2020, Biopolymer κ -carrageenan wrapped ZnO nanoparticles as drug delivery vehicles for anti MRSA therapy, *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, pp. 9–18.

96. M. Zhu, X. Li, L. Ge, Y. Zi, M. Qi, Y. Li, D. Li, C. Mu, 2020, Green synthesis of κ -carrageenan@Ag submicron-particles with high aqueous stability, robust antibacterial activity and low cytotoxicity, *Materials Science and Engineering: C*, 106, 110185.
97. W. Huang, L. Wang, Y. Wei, M. Cao, H. Xie, D. Wu, 2020, Fabrication of lysozyme/ κ -carrageenan complex nanoparticles as a novel carrier to enhance the stability and in vitro release of curcumin, *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, pp. 444–452.
98. M. L. Asanza-Teruel, E. Gontier, C. Bienaime, J. E. Nava-Saucedo and J. N. Barbotin, 1997, Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with κ -carrageenan immobilized *Streptomyces aureofaciens*, *Enzyme and Microbial Technology*, 21, pp. 314-320.
99. M. Sathuvan, R. Thangam, M. Gajediran, R. Vivek, S. Balasubramanian, S. Nagaraj, P. Gunasekaran, B. Madhan, R. Rengasamy, 2017, κ -Carrageenan: An effective drug carrier to deliver curcumin in cancer cells and to induce apoptosis, *Carbohydrate Polymers*, 160, pp. 184–193.
100. A. Dafe, H. Etemadi, H. Zarredar, G. R. Mahdavinia, 2017, Development of novel carboxymethyl cellulose/ κ -carrageenan blends as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria, *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, pp. 299–307.
101. M. Raman, V. M. Devi, and M. Doble, 2015, Biocompatible ι -carrageenan- γ -maghemite nanocomposite for biomedical applications-synthesis, characterization and in vitro anticancer efficacy, *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 18.
102. S. Shanmuga, M. Singhal, and S. Sen, 2015, Synthesis and Characterization of Carrageenan Coated Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery Applications, *Translational Biomedicine*, 6(3), 19.
103. H. Hezaveh, I. I. Muhamad, I. Noshadi, L. Shu Fen, and N. Ngadi, 2012, Swelling behaviour and controlled drug release from cross-linked κ -

- carrageenan/NaCMC hydrogel by diffusion mechanism, *Journal of Microencapsulation*, 29(4), pp. 368–379.
104. H. Hezaveh and I. I. Muhamad, 2013, Modification and swelling kinetic study of kappa-carrageenan-based hydrogel for controlled release study, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(2), pp. 182–191.
105. H. Hezaveh and I. I. Muhamad, 2012, The effect of nanoparticles on gastrointestinal release from modified κ -carrageenan nanocomposite hydrogels, *Carbohydrate Polymers*, 89(1), pp. 138–145.
106. R. Bettini, M. C. Bonferoni, P. Colombo, L. Zanelotti, C. Caramella, 2014, Drug Release Kinetics and Front Movement in Matrix Tablets Containing Diltiazem or Metoprolol/ λ -Carrageenan Complexes, *BioMed Research International*, 2014, pp. 1–8.
107. P. Kos, M. Pavli, S. Baumgartner, K. Kogej, 2017, Release mechanism of doxazosin from carrageenan matrix tablets: Effect of ionic strength and addition of sodium dodecyl sulphate, *International Journal of Pharmaceutics*, 529, pp. 557–567.
108. M. G. Albu, 2011, Collagen gels and matrices for biomedical applications, Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Germany.
109. J. McMasters, A. Panitch, 2017, Collagen-binding nanoparticles for extracellular anti-inflammatory peptide delivery decrease platelet activation, promote endothelial migration, and suppress inflammation, *Acta Biomaterialia*, 49, pp. 78–88.
110. M. G. Cascone, L. D. Silvio, B. Sim, S. Downes, M. G. Cascone, 1994, Collagen and hyaluronic acid based polymeric blends as drug delivery systems for the release of physiological concentrations of growth hormone, *Journal of materials science: materials in medicine*, 5, pp. 770 – 774.
111. G. R. Mahdavinia and H. Etemadi, 2014, In situ synthesis of magnetic Carra PVA IPN nanocomposite hydrogels and controlled drug release, *Materials Science and Engineering C*, 45, pp. 250–260.

112. G. R. Bardajee, Z. Hooshyar, and F. Rastgo, 2013, Kappa carrageenan-g-poly (acrylic acid)/SPION nanocomposite as a novel stimuli-sensitive drug delivery system, *Colloid and Polymer Science*, 291(12), pp. 2791–2803.
113. G. Buchholcz, A. Kelemen, T. Sovány, K. Pintye-Hódi, 2015, Matrix tablets based on a carrageenan with the modified-release of sodium riboflavin 50-phosphate, *Pharmaceutical Development and Technology*, 20, pp. 676–683.
114. P. Piyakulawat, N. Praphairaksit, N. Chantarasiri, N. Muangsin, 2007, Preparation and evaluation of chitosan/carrageenan beads for controlled release of sodium diclofenac, *AAPS PharmSciTech*, 8, 120.
115. G. R. Mahdavinia, H. Etemadi, F. Soleymani, 2015, Magnetic/pH-responsive beads based on caboxymethyl chitosan and κ -carrageenan and controlled drug release, *Carbohydrate Polymers*, 128, pp. 112–121.
116. Y. Luo, Q. Wang, 2014, Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery, *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, pp. 353–367.
117. A. V. Briones, T. Sato, 2010, Encapsulation of glucose oxidase (GOD) in polyelectrolyte complexes of chitosan–carrageenan, *Reactive and Functional Polymers*, 70, pp. 19–27.
118. G. Montalbano, S. Toumpaniaria, A. Popova, P. Duana, J. Chena, K. Dalgarno, W.E. Scott, A.M. Ferreira, 2018, Synthesis of bioinspired collagen/alginate/fibrin based hydrogels for soft tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, 91, pp. 236–246.
119. M. M. Chen, Y. Q. H. Cao, Y. Liu, H. Guo, L. S. Chen, J. H. Wang, Q. Q. Zhang, 2015, Collagen/Chitosan film containing biotinylated glycol chitosan nanoparticles for localized drug delivery, *Colloids and Surfaces*, 128, pp. 339–346.
120. I. B. Pathan, S. J. Munde, S. Shelke, W. Ambekar and C. M. Setty, 2019, Curcumin loaded fish scale collagen-HPMC nanogel for wound healing application: Ex-vivo and In-vivo evaluation, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68(4), pp. 165–174.

121. A. Ai, A. Behforouz, A. Ehterami, N. Sadeghvaziri, S. Jalali, S. Farzamfar, A. Yousefbeigi, A. Ai, A. Goodarzi, M. Salehi and J. Ai, 2019, Sciatic nerve regeneration with collagen type I hydrogel containing chitosan nanoparticle loaded by insulin, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68(18), pp. 1133-1141.
122. Q. Lin, Q. Huo, Y. Qin, Z. Zhao and F. Tao, 2016, Development of ligustrazine hydrochloride carboxymethyl chitosan and collagen microspheres: Formulation optimization, characterization, and vitro release, *Bioengineered*, 8(1), pp. 55–60.
123. W. Feng, S. Feng, K. Tang, X. He, A. Jing, G. Liang, 2017, A novel composite of collagen-hydroxyapatite/kappa-carrageenan, *Journal of Alloys and Compounds*, 693, pp. 482-489.
124. F. B. L. Nogueira, C. B. Maniglia, R. T. D. Blácido, P. A. Ramos, 2019, Organic–inorganic collagen/iota-carrageenan/hydroxyapatite hybrid membranes are bioactive materials for bone regeneration, *Journal of Applied Polymer Science*, 136(6), 48004 doi: 10.1002/APP.48004.
125. L. F. B. Nogueira, M. A. E. Cruz, M. T. Melo, B. C. Maniglia, F. Caroleo, R. o Paolesse, H. B. Lopes, M. M. Beloti, P. Ciancaglini, A. P. Ramos, and M. Bottini, 2023, Collagen/ κ -Carrageenan-Based Scaffolds as Biomimetic Constructs for In Vitro Bone Mineralization Studies, *Biomacromolecules*, 24(3), pp. 1258–1266. DOI: 10.1021/acs.biomac.2c01313.
126. L. F. B. Nogueira, M. A. E. Cruz, G. J. Aguilar, D. R. Tapia-Blácido, M. E. S. Ferreira, B. C. Maniglia, M. Bottini, P. Ciancaglini and A. P. Ramos, 2022, Synthesis of Antibacterial Hybrid Hydroxyapatite/Collagen/Polysaccharide Bioactive Membranes and Their Effect on Osteoblast Culture, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7277. Doi.org/10.3390/ijms23137277
127. H. Jaeger, D. Russmann, J. Rasper, J. Blome, 1982, Comparative study of the bioavailability and the pharmacodynamic effect of five allopurinol preparations, *Arzneimittel Forschung*, 32(4), pp. 438–443.

128. Chohan, 2011, Safety and efficacy of febuxostat treatment in subjects with gout and severe allopurinol adverse reactions, *Journal of Rheumatology*, 38(9), pp. 1957–1959.
129. P. Pacher, A. Nivorozhkin, C. Szabó, 2006, Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: Renaissance half a century after the discovery of allopurinol, *Pharmacological Reviews*, 58(1), pp. 87–114;
130. F. Pea, 2005, Pharmacology of drugs for hyperuricemia: mechanisms, kinetics and interactions, *Contributions to Nephrology*, 147, pp. 35–46.
131. D. P. Huynh, B. S. Kim and D. S. Lee, 2009, Controlled release of insulin by a new functionalized injectable hydrogel, *Journal of controll release*, 67, 1357.
132. P. Sharma, M. V. Shah, D. C. Parikh and T. A. Mehta, 2015, Formulation optimization of gastroretentive drug delivery system for allopurinol using experimental design, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(4), pp. 513–524.
133. I. El-Gibaly and S. Abdel-Ghaffar, 2005, Effect of hexacosanol on the characteristics of novel sustained-release allopurinol solid lipospheres (SLS): Factorial design application and product evaluation, *International Journal of Pharmaceutics*, 294(1-2), pp. 33–51.
134. I. Arshad, S. Ali, U. Amin, M. Shabbir, M. Raza, A. Sharif, 2018, Effect of hydrophilic and hydrophobic polymer on the release of ketoprofen and allopurinol from bilayer matrix transdermal patch, *Advances in Polymer Technology*, 37(8), pp. 3076–3083.
135. L. Deng, Y. Li, F. Feng, H. Zhang, 2019, Study on wettability, mechanical property and biocompatibility of electrospun gelatin/zein nanofibers cross-linked by glucose, *Food Hydrocolloids*, 87, pp. 1–10.
136. L. Deng, Y. Li, F. Feng, D. Wu, H. Zhang, 2019, Encapsulation of allopurinol by glucose cross-linked gelatin/zein nanofibers: Characterization and release behavior, *Food Hydrocolloids*, 94, pp. 574–584.
137. K. Badis, H. Merine, Y. RamLi, O. Larbi, C. H. Memou, 2022, Effect of Polymers nature and Stirring Speeds on Physicochemical Properties and the

- Controlled Release of Allopurinol-loaded Microspheres, *Journal of the Mexican Chemical Society*, 66(1), pp. 17-33.
138. H. A. Aganyants, G. Nikohosyan, K. E. Danielyan, 2016, Albumin microparticles as the carriers for allopurinol and applicable for the treatment of ischemic stroke, *International Nano Letters*, 6, pp. 35–40.
139. G. Kandav, D. C. Bhatt, D. K. Jindal, 2019, Targeting kidneys by superparamagnetic allopurinol loaded chitosan coated nanoparticles for the treatment of hyperuricemic nephrolithiasis, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(2), pp. 661–671.
140. Y. Murata, K. Kofuji, N. Nishida, and R. Kamaguchi, 2012, Development of Film Dosage Form Containing Allopurinol for Prevention and Treatment of Oral Mucositis, *ISRN Pharmaceutics*, Article ID 764510, doi:10.5402/2012/764510.
141. K. Tomoda, M. Asahiyama, E. Ohtsuki, T. Nakajima, H. Terada, M. Kanebako, T. Inagi, K. Makino, 2009, Preparation and properties of carrageenan microspheres containing allopurinol and local anesthetic agents for the treatment of oral mucositis, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71, pp. 27–35.
142. T. Hanawa, N. Masuda, K. Mohri, K. Kawata, M. Suzuki, S. Nakajima, 2004, Development of patient-friendly preparations: preparation of a new allopurinol mouthwash containing polyethylene(oxide) and carrageenan, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 30(2), pp. 151-61.
143. Laemmli U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259), pp. 680-685.
144. Đỗ Trung Đàm, 2014. *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
145. Y. Fei, D. Ye, X. F. Fan and F. Q. Dong, 2016, Effect of Dioscorea tokoro Makino extract on hyperuricemia in mice, *Tro. Jou. of Phar.*, 15(19), pp. 1883-1887.
146. Toshiyuki I., Hisatoshi K., Junzo T., Dominic W., Stephen M., 2003, Microstructure, mechanical, and biomimetic properties offish scales from Pagrus major, *Journal of Structural Biology*, 142(3), pp. 327–333.

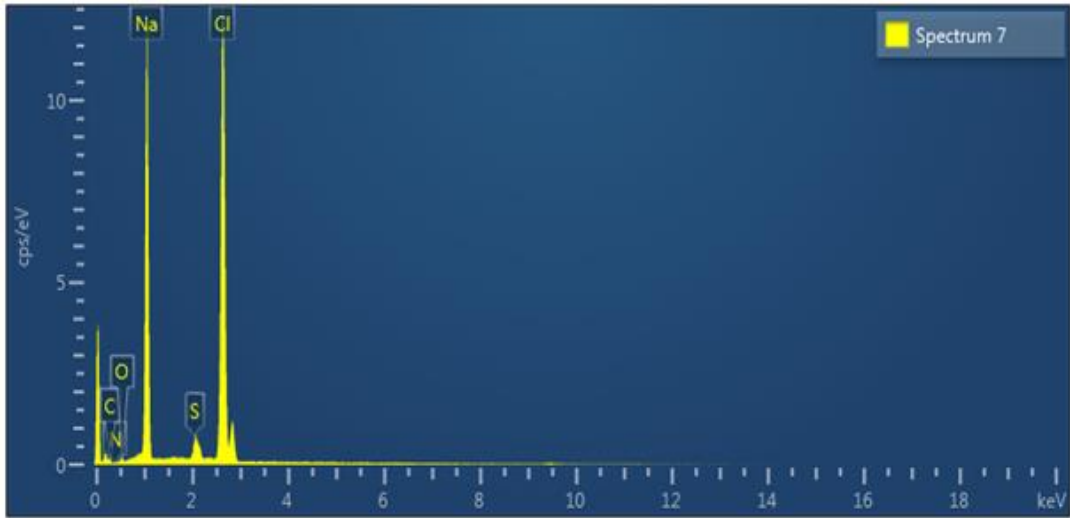
147. Fengxiang Z., Anning W., Zhihua L., Shengwen H., Lijun S., 2011, Preparation and characterisation of collagen from freshwater fish scales, *Food and Nutrition Sciences*, 2(8), pp. 818-823.
148. Rui D., Junjie Z., Xiuqiao D., Xingcun Y., Kunihiko K., 2009, *Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (Cyprinus carpio)*, *Food Chemistry*, 12(3), pp. 702-706.
149. Muyonga J.H., Cole C.G.B., Duodu K.G., 2004, Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*), *Food Chemistry*, 85(1), pp. 81-89.
150. Sira C., Soottawat B., Hideki K., 2015, Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*), *LWT-Food Sci. Technol.*, 63, tr. 71-76.
151. Samantha P.C.F, 2016, *Extraction of collagen from fish wastes, optimization and characterization* [master dissertation/thesis], UTAR, <http://eprints.utar.edu.my/2410>.
152. Y. L. Sun, 2012, Effect of catch areas on chemical composition and heavy metals concentration of chub mackerel (*Scomber japonicus*), *Life Science Journal*, 9(3), pp. 1276-1280.
153. Tehseen R., Rabia Z., Faiza Z., Kanwal I., Nawshad M., Sher Z.S., Abdur R., Syed A.A.R., and Ihtesham U.R., 2018, FTIR analysis of natural and synthetic collagen, *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(9), pp. 703-746.
154. T. Nagai, M. Izumi, M. Ishii, 2004, Fish scale collagen. Preparation and partial characterization, *International Journal of Food Science and Technology*, 39(3), pp. 239-244.
155. H. Capella-Monsonís, J. Q. Coentro, V. Graceffa, Z. Wu, D. I. Zeugolis, 2018, An experimental toolbox for characterization of mammalian collagen type I in biological specimens, *Nature Protocols*, 13(3), pp. 507-529.
156. T. Nagai, N. Suzuki, 2000, Isolation of collagen from fish waste material – skin, bone and fins, *Food Chemistry*, 68(3), pp. 277-281.

157. G. Kandav, D. C. Bhatt, D. K. Jindal, 2019, Formulation and evaluation of allopurinol loaded chitosan nanoparticles, *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 11(3), pp. 49-52.
158. S. S. Shelake, S. V. Patil, S. S. Patil, P. Sangave, 2018, Formulation and evaluation of fenofibrate-loaded nanoparticles by precipitation method, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80, pp. 420-7.
159. A. Bo, L. Yu-Shan, B. Barbara, 2016, Collagen interactions: drug design and delivery, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 97, pp. 69–84.
160. M. C. Bonferoni, G. Sandri, E. Gavini, S. Rossi, F. Ferrari, C. Caramella, A. Lohani, G. Singh, S. S. Bhattacharya, R. R. Hegde, A. Verma, 2016, Tailored interpenetrating polymer network beads of κ -carrageenan and sodium carboxymethyl cellulose for controlled drug delivery, *International Journal of Food Science and Technology*, 31, pp. 53-64.
161. O. Aras, M. Kazanci, 2015, Production of collagen micro- and nanofibers for potential drug-carrier systems, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(6), pp. 1013–1016.
162. A. Sionkowska, B. Kaczmarek, R. Gadzala-Kopciuch, 2016, Gentamicin release from chitosan and collagen composites, *International Journal of Food Science and Technology*, 35, pp. 353–359.
163. Liang, L. Jinfeng, S. Shanshan, W. Linlin, S. Chenjun, S. Yujiao, L. Zhenglin, M. Shirui, 2015, Effect of formulation variables on in vitro release of a watersoluble drug from chitosan-sodium alginate matrix tablets, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(4), pp. 314-321.
164. L. Ochoa, M. Igartua, R. M. Hernández, A. R. Gascón, M. A. Solinis, J. L. Pedraz, 2011, Novel extended release formulation of lovastatin by one-step melt granulation: *in vitro* and *in vivo* evaluation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77, pp. 306-312.
165. M. Rajan, V. Raj, 2013, Formation and characterization of chitosan-poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-gelatin nanoparticles: A novel biosystem for controlled drug delivery, *Carbohydrate Polymers*, 98, 951-958.

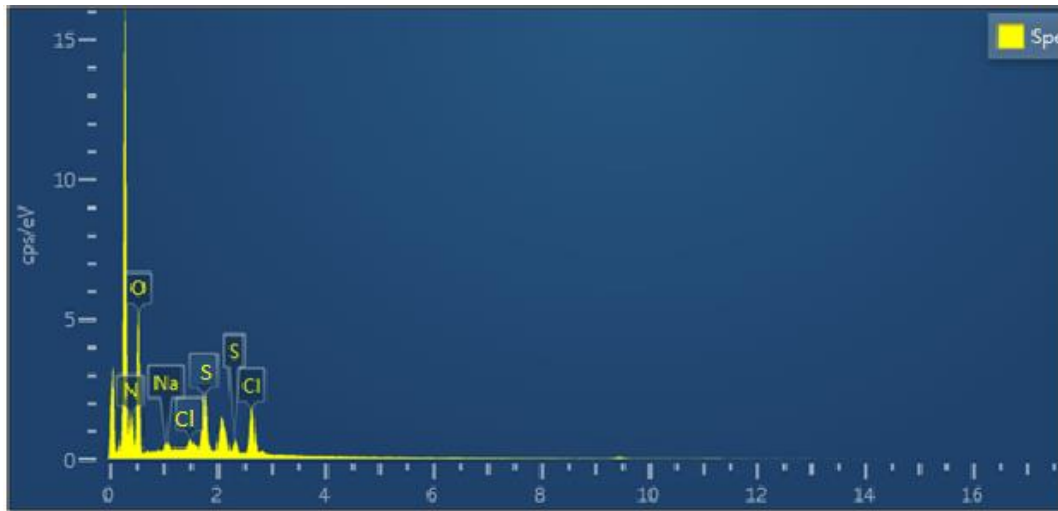
166. A. Aditya, B. Kim, R. D. Koyani, B. Oropeza, M. Furth, J. Kim, N. P. Kim, 2019, Kinetics of collagen microneedle drug delivery system, *International Journal of Food Science and Technology*, 52, pp. 618–623.
167. Swati C.J., Vaibhav U.G., Bhanudas S.K., Aniruddha R.C., 2011, Formulation and in vitro evaluation of taste-masked oro-dispersible dosage form of diltiazem hydrochloride, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(4), pp. 907-916.
168. S. Ma, L. Chen, X. Liu, D. Li, N. Ye, L. Wang, 2012, Thermal Behavior of Carrageenan: Kinetic and Characteristic Studies, *Int. Jou. of Green Ene.*, 9(1), pp. 13 – 21.
169. M. Wang, J. Zhao, N. Zhang and J. Chen, 2016, *Astilbin improves potassium oxonate-induced hyperuricemia and kidney injury through regulating oxidative stress and inflammation response in mice*. *Biomed. Pharmacother.*, 83, pp. 975–988.
170. L. Ma, Y. Liu, N. K. Landry, T. M. El-Achkar, J. C. Lieske, X. R. Wu, 2017, Point mutation in D8C domain of Tamm-Horsfall protein/uromodulin in transgenic mice causes progressive renal damage and hyperuricemia, *PLoS One*, 12(11), e0186769.
171. W.S. Stevenson, C.D. Hyland, J.G. Zhang, P.O. Morgan, T.A. Willson, A. Gill, A.A. Hilton, E.M. Viney, M. Bahlo, S.L. Masters, S. Hennebry, S.J. Richardson, N.A. Nicola, D. Metcalf, D.J. Hilton, A.W. Roberts, and W.S. Alexander, 2010, Deficiency of 5-hydroxyisourate hydrolase causes hepatomegaly and hepatocellular carcinoma in mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), pp. 16625–16630.
172. L. Jie, Y. Xiaoqin, X. Enbo, W. Zhengzong, X. Xueming, J. Zhengyu, J. Aiquan, 2015, *In situ synthesis of new magnetite chitosan/carrageenan nanobiocomposites by electrostatic interactions for protein delivery applications*, *Carbohydrate Polymers*, 131, pp. 98–107.
173. J.S. Changdeo, M. Vinod, K.B. Shankar, C.A. Rajaram, 2011, Physicochemical characterization and solubility enhancement studies of allopurinol solid dispersions, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(3), pp. 513–523.

1.PL

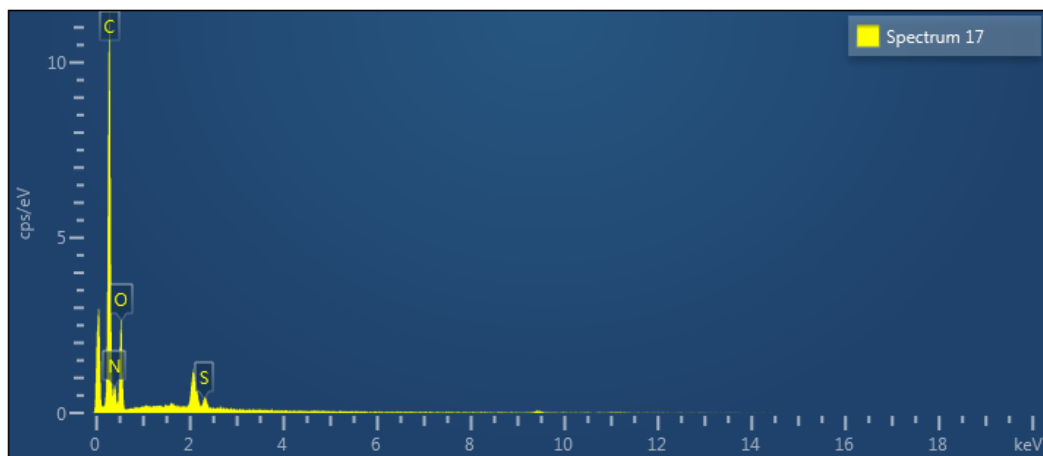
PHỤ LỤC



PL1. Phổ EDX Collagen thô



PL2. Phổ EDX collagen sau thẩm tích 24 giờ



PL3. Phổ EDX collagen sau thẩm tích 48 giờ

2.PL



Số: 21710/PKN-VKNQG

PHIẾU KẾT QUẢ KIỂM NGHIỆM
TEST REPORT

1. Tên mẫu: Collagen
 2. Mã số mẫu: 10174857/DV.1
 3. Mô tả mẫu: Mẫu dạng lỏng đựng trong ống nhựa nắp kín, tên mẫu viết tay dán trên ống, 13ml/mẫu. - Số lượng: 1
 NSX - HSD: Không có ; Không có mẫu lưu
 4. Số lượng mẫu: 01 mẫu
 5. Thời gian lưu mẫu: Không có
 6. Ngày lấy mẫu: Không có
 7. Ngày nhận mẫu: 23/10/2017
 8. Thời gian thử nghiệm: 23/10/2017 - 02/11/2017
 9. Nơi gửi mẫu: Nguyễn Thúy Chinh
 Địa chỉ: Nhà A12 - Số 18 Hoàng Quốc Việt
 10. Kết quả thử nghiệm: Chỉ tiêu Hóa lý

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
10.1*	Hàm lượng Acid aspartic	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,099
10.2*	Hàm lượng Acid glutamic	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,550
10.3*	Hàm lượng Alanine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,218
10.4*	Hàm lượng Arginine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,425
10.5*	Hàm lượng Cystine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,059
10.6*	Hàm lượng Glycine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,140
10.7*	Hàm lượng Histidine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,047
10.8*	Hàm lượng Isoleucine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,022
10.9*	Hàm lượng Leucine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,039
10.10*	Hàm lượng Lysine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,043
10.11*	Hàm lượng Methionine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,020
10.12*	Hàm lượng Phenylalanine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,028
10.13*	Hàm lượng Proline	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,487
10.14*	Hàm lượng Serine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,357
10.15*	Hàm lượng Threonine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	1,704
10.16*	Hàm lượng Tyrosine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,007
10.17*	Hàm lượng Valine	mg/mL	H.HD.QT.046 (HPLC)	0,026
10.18*	Hàm lượng Tryptophan	mg/mL	H.HD.QT.112 (HPLC)	0,012
10.19*	Hàm lượng Collagen	mg/mL	H.HD.QT.205 (HPLC)	0,290

Hà Nội, ngày 02 tháng 11 năm 2017

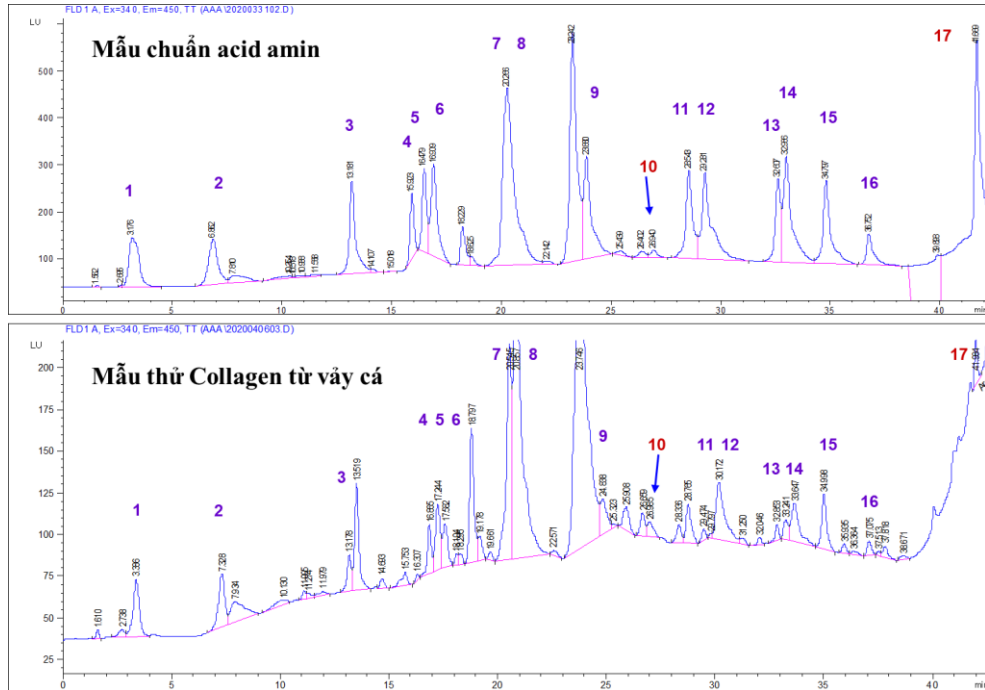
TUQ.VIỆN TRƯỞNG
 TRƯỞNG PHÒNG KHĐT & CĐT

ThS. Nguyễn Thị Thanh Huyền

- Các kết quả thử nghiệm ghi trong phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu thí nghiệm
- Không được trích dẫn một phần phiếu kết quả thử nghiệm nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Viện Kiểm nghiệm ATVSTPQG
- Thông tin về mẫu và khách hàng được ghi theo yêu cầu của nơi gửi mẫu
- Chỉ tiêu đánh dấu * là chỉ tiêu được công nhận VILAS
- Không nhận khiếu nại trong trường hợp không có mẫu lưu hoặc hết thời hạn lưu mẫu theo quy định

PL4. Kết quả phân tích hàm lượng acid amin trong collagen từ vảy cá nước ngọt

3.PL



PL5. Phổ HPLC phân tích một số acid amin trong collagen từ vây cá

309 Nhà A10
18 Hoàng Quốc Việt,
Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
ĐT: 024 37561903
Email: lethao@ibt.ac.vn

Phòng Hóa sinh Protein
Viện Công nghệ Sinh học
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH NHẬN ĐIỆN PROTEIN

Số lượng mẫu: 2
Ngày nhận mẫu: 12/2018
Đặc điểm mẫu: một mẫu protein dạng khô và một mẫu protein dạng dung dịch
Phương pháp phân tích: Phân tích nhận diện protein bằng các phương pháp xử lý mẫu, thủy phân protein bằng trypsin, sắc ký lỏng nanoLC-MS/MS và phân tích Tin sinh học.
Protein: hypothetical protein cypCar_00045321, partial [Cyprinus carpio] với khối lượng 115674 (Da) tương tự như Collagen alpha-2(I) chain (Oncorhynchus mykiss) được nhận diện với điểm số cao nhất.

Hà Nội, ngày 23 tháng 01 năm 2019

Xác nhận của đơn vị
TRƯỞNG PHÒNG
QUẢN LÝ TỔNG HỢP
VIỆN
CÔNG NGHỆ
SINH HỌC
TRẦN HỒ QUANG

Người báo cáo
Trưởng phòng Hóa Sinh Protein

Lê Thị Bích Thảo

PL6. Kết quả nhận diện protein (collagen) từ vây cá nước ngọt

4.PL

PL7. Các loại protein khác trong collagen thu được từ hỗn hợp vảy cá

1/ Protein: hypothetical protein cypCar_00045321, partial [Cyprinus carpio]

+ Số protein trong cơ sở dữ liệu: KTF73577.1

+ Điểm số protein: 318

+ Khối lượng (M_r) (Da): 115674

+ pI được tính toán: 9,18

+ Trình tự acid amin:

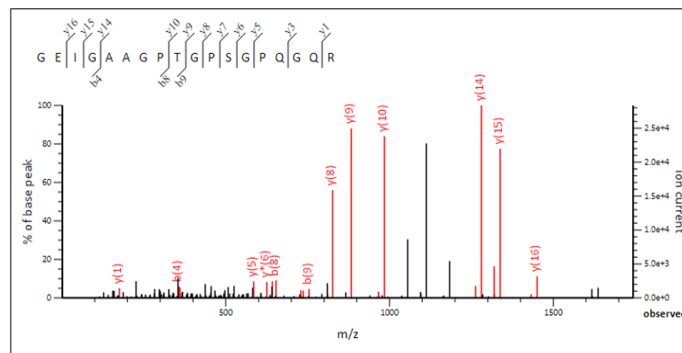
1	MGPQGFQGH	GEPGEPGQAG	AVGSRGPPGP	PGKNGDDGNN	GRPGKPGDRG
51	VPGAQGARGF	PGTPGLPGMK	GHRGYTGLDG	RKGEPGAAGL	KGENGAAGSN
101	GTPGQRGARG	LPGERGRVGP	SGPAGARGAD	GNTGPAGPAG	PLGAAGPPGF
151	PGAPGPKGEI	GPAGPTGPPG	PQQQRGEPGT	NGAVGVPVGP	GNGPGANGING
201	AKGAAGTPGV	AGAPGFPGPR	GGPGPQGPSG	ASGPRGLAGD	PGPVGVKGD
251	GVKGEPGSSG	PQGPPGPSGE	EGKRGSTGEQ	GPTGAVGLRG	PRGMPGARGA
301	TGTPGARGPP	GDAGRAGEPG	LVGARGLPGS	PGSSGPPGKE	GPVGLPGQDG
351	RSGPPGPTGP	RGQPGNIGFP	GPKGASGEAG	KPGEKGPSGP	TGLRGLPGPD
401	GNNGPAGPVG	LAGAPGEKGE	QGPSGAPGFQ	GLPGPAGPVG	EAGKPGDRVS
451	IHGSDSTQLM	QFLVHLHNTG	CIVSCKSLQI	FNISQQGIPG	DQGVSGPAGV
501	KGERGNPGPA	GASGAQGP	ARGVAGTPGP	DGNKGEPGAA	GAAGAPGHQG
551	AAGMPGERGT	AGTPGPKGEK	GELGYRGLEG	NAGRDGARGA	PGPSGPPGPA
601	GANGDKGETG	SFGPPGPAGP	RGSPGERGES	GPAGPSGFAG	PPGADGQTGQ
651	RGEKGPAGGK	GDAGPPGPAG	PVGNTGPLGA	AGPAGPPGAR	GDSGPPGLTG
701	FPGAAGRVGP	PGPAGIVGPP	GLTGAPGKDG	PRGARGDVGP	AGPPGENGLI
751	GPPGLAGEKG	SPGEAGPAGA	PGSAGPQQQL	GSQGFSGPLG	SRGDRGLPGG
801	PGAVGEPGRV	GPAGAPGPRG	PIGNIMPGM	TGPQGEAGRE	GSPGNDGPPG
851	RPGAAGLKGD	RGEPGSPGTA	GPVGAPGPNG	PSGAVGRPGN	RGESGPSGSV
901	GPAGAVGARG	APGPAGPRGE	KGVAGDKGER	GMKGLRGHPG	LQGMPPGNH
951	SGDSGPAGIA	GPAGPRGPAG	PNGPPGKDGS	NGMPGAIGPP	GHRGPPGHVG
1001	PSGPPGSPGL	PGPAGPAGGG	YDTSGGYDEY	RADQASLRAK	DYEVDAIKS
1051	LNTQIENLLS	PEGSKKNPAR	TCRDIRLSHP	EWSSGFYWID	PNQGCAMDAI
1101	KAYCDFSTGQ	TCIHPHPESI	PRKNWYRGSQ	EKKHIWFGET	INGGTEFGYN
1151	DETLSPQSMA	TQLAFMRLLA	NQAVQNITYH	CKNSIAYMDA	ENGNLKKAVL
1201	LQGSNDVELR	AEGNSRFTFS	VLEDGCS		

6.PL

101	QGFQGHAGEP	GEPGQAGAVG	SRGPPGPPGK	NGDDGNNGRP	GKPGDRGVPG
151	AQGARGFPGT	PGLPGMKGHR	GYTGLDGRKG	ELGAAGLKGE	NGAAGANGTP
201	GQRGARGLPG	ERGRVGPSPG	AGARGADGNT	GPAGPAGPLG	AAGPPGFPGA
251	PGPKGEIGAA	GPTGPSGPQG	QRGEPGTNGA	VGPAGPPGNP	GANGINGAKG
301	AAGTPGVAGA	PGFPGPRGGP	GPQGSPGASG	PRGLAGDPGP	VGVKGDSGVK
351	GEPGSSGPQG	PPGPSGEEGK	RGSTGEQGAT	GPAGLRGPRG	AAGTRGLPGM
401	AGRSGPMGMP	GARGATGSPG	ARGPPGDAGR	AGEPGLTGAR	GLPGSPGSSG
451	PPGKEGPVGP	SGQDGRSGPP	GPTGPRQPG	NIGFPGPKGA	TGEAGKPGEK
501	GPAGPTGLRG	LPGPDGNNGP	AGPVGLAGAP	GEKGEQGPSG	APGFQGLPGP
551	AGPVGEAGKP	GDRGIPGEQG	ASGPAGVKGE	RGGPGPAGAA	GAQGPIGARG
601	PAGTPGPDGN	KGEPGAAGAA	GGPGHQGAAG	MPGERGTAGT	PGPKGEKGEQ
651	GYRGLEGNAG	RDGARGAPGP	SGPPGPAGAN	GDKGETGSFG	PPGPAGQRGT
701	PERGESGPA	GPSGFAGPPG	ADGQTGQRGE	KGPAGGKGDV	GPPGPAGPAG
751	NTGPLGAAGP	AGPPGARGDS	GPPGLTGFPG	AAGRVPGGP	AGIVGPSGPT
801	GAPGKDGPRG	ARGDVGPAGP	PGENGLIGPP	GLAGEKGSFG	EPGPQGAPGS
851	AGPQQQLGSQ	GFNGLPGSRG	DRGLPGGPGA	VGEPGRVGA	GAPGPRGPIG
901	NIGMPGMTGP	QGEAGREGSP	GNDGPPGRPG	AAGLKGDGRGE	PGSAGSPSPA
951	GAPGPNPSG	AAGRPGNRGE	SGPSGSAGPA	GAAGARGAPG	PAGPRGEKGV
1001	AGDKGERGMK	GLRGHPGLQG	MPGPNGPSGD	SGPAGIAGPA	GPRGPAGPNG
1051	PPGKDGSNGM	PGAIGPPGQR	GPPGYVGPSG	PPGSPGLPGP	AGPAGGGYDT
1101	SGGYDEYRAD	QGSLRAKDYE	VDATIKSLNT	QIENLLSPEG	SKKNPARTCR
1151	DIRLSHPEWS	SGFYWIDPNQ	GCTMDAIKAY	CDFSTGQTCI	HPHPESIPRK
1201	NWYRGSQEKK	HIWFGETING	GTEFGYNDET	LSPQSMATQL	AFMRLLANQA
1251	VQNITYHCKN	SIAYMDAENG	NLKKAVLLQG	SNDVELRAEG	NSRFTFSVLE
1301	DGCSRHTGQW	SKTVIEYRTN	KPSRLPILDI	APLDIGGADQ	EFGLDIGPVC
1351	FK				

+ Phổ MS/MS của các mảnh peptide đã được nhận diện điện hình

MS/MS Fragmentation of **GEIGAAAGPTGSPGQQR**
 Found in **BAG72201.1** in **NCBIprot**, collagen type 1 alpha 2 [Carassius auratus]
 Match to Query 268: 1635.795648 from(818.905100,2+) intensity(637146.9000) index(263)
 Data file 2019-0116_SampleC.pkl



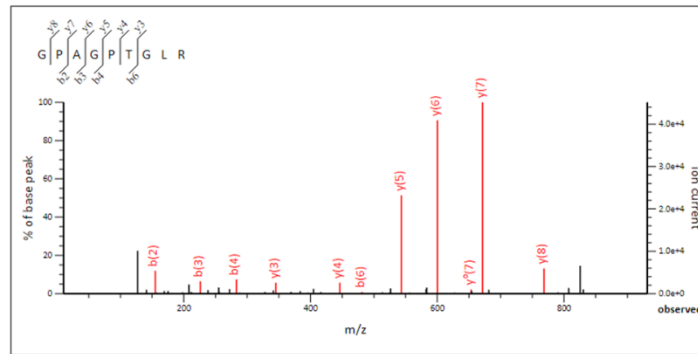
7.PL

MS/MS Fragmentation of GPAGPTGLR

Found in BAG72201.1 in NCBIprot, collagen type I alpha 2 [Carassius auratus]

Match to Query 41: 824.456248 from(413.235400,2+) intensity(722029.5000) index(50)

Data file 2019-0116_SampleC.pkl

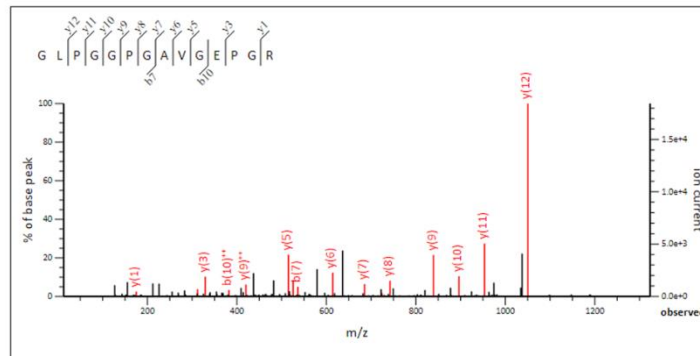


MS/MS Fragmentation of GLPGPGA VGEPR

Found in BAG72201.1 in NCBIprot, collagen type I alpha 2 [Carassius auratus]

Match to Query 139: 1219.636648 from(610.825600,2+) intensity(259267.2000) index(293)

Data file 2019-0116_SampleC.pkl

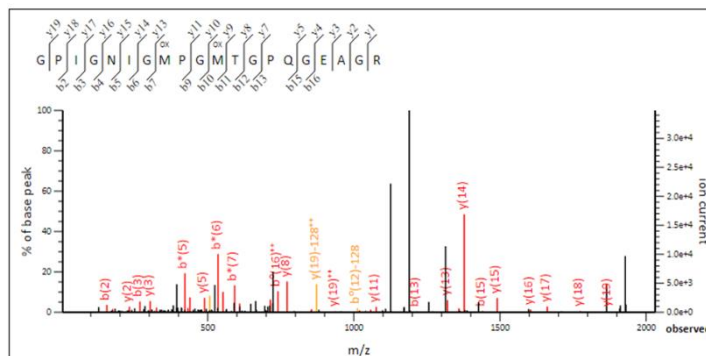


MS/MS Fragmentation of GPIGNIGMTPGQGEAGR

Found in BAG72201.1 in NCBIprot, collagen type I alpha 2 [Carassius auratus]

Match to Query 326: 1927.891848 from(964.953200,2+) intensity(606425.1000) index(128)

Data file 2019-0116_SampleC.pkl



3/ Protein: collagen type I alpha 1 [Ctenopharyngodon idella]

+ Số protein trong cơ sở dữ liệu: ADK35755.1

+ Điểm số protein: 231

+ Khối lượng (M_r): 138104

+ pI được tính toán: 5.44

+ Trình tự acid amin

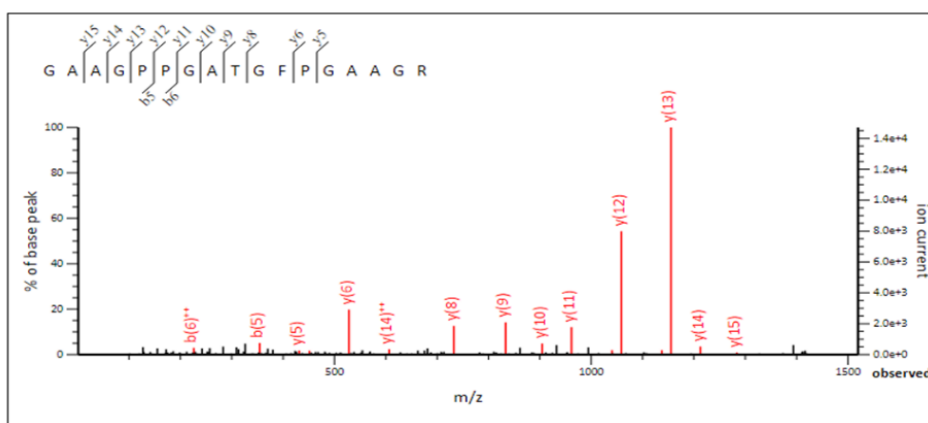
1	MFSFVDIRLA	LLLSATVLLA	RGQGEDDRTG	GSCTLDGQVY	NDRDVWKPEP
51	CQICVCDSGT	VMCDEVICED	TTDCPNPVIP	HDECCPVCPCD	DDFQEPSVEG
101	PRGTPGEKGD	RGPAGPPGND	GIPGQPLPG	PPGPPPPGL	GGNFSPQMSG

8.PL

151	GFDEKSGGAM	AVPGPMGPMG	PRGPPGPPGT	PGPQGFTGPP	GEPGEAGAPG
201	PMGPRGAAGP	PGKNGEDGES	GKPRPGERG	PPGPQGARGF	PGTPGLPGIK
251	GHRGFSGLDG	AKGDTGPSGP	KGEAGAPGEN	GTPGAMGPRG	LPGERGRAGP
301	PGAAGARGND	GAAGAAGPPG	PTGPAGPPGF	PGGPGAKGEV	GPQGARGAEG
351	PQGARGEAGN	PGPAGPAGPA	GNNGADGAAG	PKGSPGTPGI	AGAPGFPGPR
401	GPPGPSGAAG	APGPKGNTGE	VGAPGAKGEA	GAKGEAGAQQ	VQPPGPPGE
451	EGKRGARGEP	GAAGGRPPG	ERGAPGARGF	PGADGSAGPK	GAPGERGGPG
501	VVGPKGATGE	PGRNGEPGMP	GSKGMTGSPG	SPGPDGKTGP	SGTPGQDGRP
551	GPPGPVGARG	QPGVMGFPGP	KGAAGEAGKP	GERGVMGAVG	ATGAPGKDGD
601	VGAPGAPGPA	GPAGERGEQQ	PAGPPGFQGL	PGPQGATGEP	GKSGEQGVP
651	EAGAPGPAGS	RGDRGFPER	GAPGPAGPAG	ARGSPGSAGN	DGAKGDAGAP
701	GAPGAQGPPG	LQGMPGERGA	AGLPGLKGR	GDQGAKGTDG	APGKDGIRGM
751	TGPIGPPGPA	GAPGDKGETG	APGLVGPTGA	RGPPGERGET	GAPGPAGFAG
801	PPGADGLPGA	KGEAGDNGAK	GDAGSPGPAG	ATGAPGPQGP	VGATGPKGAR
851	GAAGPPGATG	FPGAAGR VGP	PGPAGNAGPP	GPPGPGGKEG	QKGNRGETGP
901	AGRTGEVAGP	GPPGAPGEKG	TPGAEGPTGP	AGIPGPQIA	GQRGIVGLPG
951	QRGERGFPL	PGPSGEPGKQ	GPSGSPGERG	PPGPMGPPGL	AGPPGEPGRE
1001	GTPGNEGSAG	RDGAPGPKGD	RGETGAAGTP	GAPGPPGAPG	PVGPAGKTGD
1051	RGESGPAGPA	GAAGPAGPRG	PAGPAGARGD	KGETGEAGER	GMKGHRGFTG
1101	MQGPPGPPGP	SGEPGPAGAS	GPAGPRGPAG	SSGPAGKDGM	SGLPPIGPP
1151	GPRGRNGEIG	PAGPPGAPGP	PGPPGPSGGG	FDIGFIAQPQ	EKAPDPFRHF
1201	RADDANVMRD	RDLEVDTTLK	SLSQQIESIM	SPDGTKKNPA	RTCRDLKMCH
1251	PDWKSGEYWI	DPDQGCNQDA	IKVYCNMETG	ETCVYPTST	IPKKNWYTSK
1301	NIKEKKHVWF	GEAMTDGFQF	EYGSEGSKAE	DVNIQLTFLR	LMSTEASQNI
1351	TYHCKNSIAY	MDQASGNLKK	ALLLQGSNEI	EIRAEGNSRF	TYSVTEGCT
1401	SHTGAWGKTV	IDYKTTKTSR	LPIIDIAPMD	VGAPNQEFGI	EVGPVCFL

+ Phổ MS/MS của các mảnh peptide đã được nhận diện điển hình

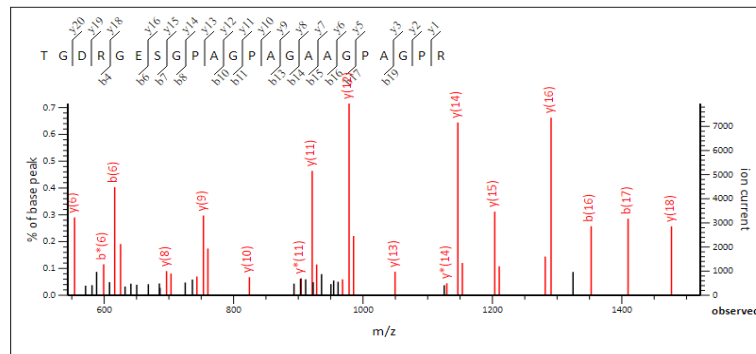
MS/MS Fragmentation of **GAAGPPGATGFPGAAGR**
 Found in **ADK35755.1** in **NCBIprot**, collagen type I alpha 1 [Ctenopharyngodon idella]
 Match to Query 191: 1410.702048 from(706.358300,2+) intensity(299005.0000) index(471)
 Data file 2019-0116_SampleC.pkl



9.PL

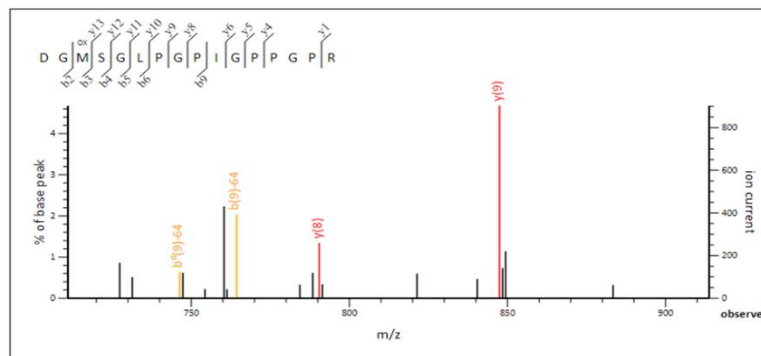
MS/MS Fragmentation of **TGDRGESGPAGAGAAGPAGPR**
 Found in **ADK35755.1** in **NCBIprot**, collagen type I alpha 1 [Ctenopharyngodon idella]

Match to Query 314: 1904.912248 from(953.463400,2+) intensity(3066728.2000) index(244)
 Data file 2019-0116_SampleC.pkl



MS/MS Fragmentation of **DGMSGLPGPIGPPGPR**
 Found in **ADK35755.1** in **NCBIprot**, collagen type I alpha 1 [Ctenopharyngodon idella]

Match to Query 216: 1519.760448 from(760.887500,2+) intensity(65480.4000) index(336)
 Data file 2019-0116_SampleC.pkl



4/ Protein: collagen alpha-1(I) chain isoform X1 [Pygocentrus nattereri]

+ Số protein trong cơ sở dữ liệu: XP_017540674.1

+ Điểm số protein: 149

+ Khối lượng (M_r): 137928

+ pI được tính toán: 5.46

+ Trình tự acid amin

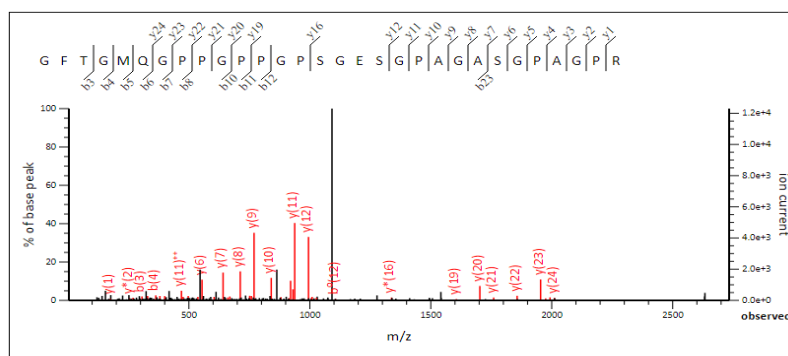
1	MFSFVDIRLA	LLSATVLLA	RGQGEDDRTG	SSCTLDGQVY	NDRDVWKPEP
51	CQICVCDSGT	VMCDEVICED	TSDCANPIIP	PDECCDIRPD	DEYQEPRVEG
101	PKGMPGEKGD	RGPAGPPGND	GIPGQPLPG	PPGPPGPPGL	GGNFSPQMSG
151	GFDEKSGGMP	IPGPMGPMGP	RGPPGPAGIP	GPQGFTGPPG	EPGEAGAPGP
201	MGPRGAAGPP	GKNGEDGESG	KPGRPGERGP	PGPQGARGFP	GTPGLPGIKG
251	HRGFSGLDGA	KGDGGPAGPK	GEPGAAGENG	TPGAMGPRGL	PPERGRAGPP
301	GAAGARGNDG	AAGAAGPPGP	TGPAGPPGFP	GGPGAAGEVG	AQGTRGAEGP
351	QGARGEPGNP	GPAGPAGPAG	NNGADGAPGL	KGAPGASGIA	GAPGFPGPRG
401	PPGAAGTPGA	PGPKGNTGEA	GAPGAKGEAG	VKGESGAPGV	QGPPGPPGEE
451	GKRGARGEPP	AAGVRGPAGE	RGAPGARGFP	GADGAAGPRG	APGERGGPGV
501	VGAKGATGEP	GRNGEPMMPG	SKGMTGSPGS	PGPDGKTGPA	GAPGQDGRPG
551	PPGPGGARGQ	PGVMGFPGPK	GAAGEAGKPG	ERGVMGAIGV	PGAPGKDGDV
601	GAPGAPGPAG	PSGERGEQGP	AGPPGFQQLP	GPQGATGEPG	KSSEQQVPGE
651	AGAPGVAGSR	GDRGFPGERG	APGAAGPAGP	RGSPGAAGND	GAKGETGAAG
701	APGAQGGPGL	QGMPGERGAA	GLPGLKGDRG	DQGAKGADGA	AGKDGIRGMT
751	GPIGPPGPAG	AQGDKGEPGA	GPPVGPPTGAR	GPPGERGETG	APGPAGFAGP

10.PL

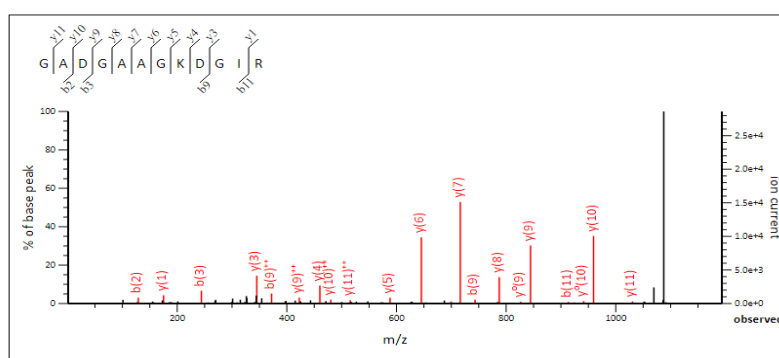
801	PGADGQPGAK	GEPGDTGAKG	DAGAPGAAGA	TGAPGPQGPV	GATGPKGARG
851	AAGPPGATGF	PGAAGRVPGP	GPAGNSGPPG	PPGPSGKEGP	KGNRGETGSP
901	GRPGEIGAAG	PPGPSGEKGT	PGAEGAPGPS	GIPGPQGIAG	QRGIVGLPGQ
951	RGERGFPLP	GSSGEPGKQG	PGGPSGERGP	PGPMGPPGLA	GPPGEPGREG
1001	TPGNEGAAGR	DGAVGPKGDR	GETGASGAPG	APGPPGAPGP	IGPAGKTGDR
1051	GEAGPAGPAG	ASGPAGPRGP	AGPAGARGDK	GETGEAGERG	MKGHRGFTGM
1101	QGPPGPPGPS	GESGPAGASG	PAGPRGPAGS	AGSPGKDGIS	GLPGPIGPPG
1151	PRGRTGEIGP	AGPPGPPGPP	GPPGPSGGGF	DIGFIAQPQE	KAPDPFRHFR
1201	ADDANVMRDR	DLEVDTTLKS	LSQQIESIRS	PDGTKKNPAR	TCRDLKMCHP
1251	DWKSGEYWID	PDQGCNQDAI	KVNCNMETGE	TCVYPAQAEI	PKKNWYTSKN
1301	IKEKKHVWFG	EAMTDGFQFE	YGGEESKAED	VNIQLTFLRL	MSTEASQNT
1351	YHCKNSIAYM	DQATGNLKKA	LLQGSNEIE	IRAEGNSRFT	YSVTEDEGCTS
1401	HTGAWGKTVI	DYKTTKTSRL	PIIDIAPMDV	GAPNQEFIE	VGPVCFL

+ Phổ MS/MS của các mảnh peptide đã được nhận diện điển hình

MS/MS Fragmentation of **GFTGMQPPPPGPSGESGPAGSAGPGR**
 Found in **XP_017540674.1** in **NCBIprot**, PREDICTED: collagen alpha-1(I) chain isoform X1 [Pygocentrus nattereri]
 Match to Query 448: 2631.228372 from(878.083400,3+) intensity(401541.0000) index(124)
 Data file 2019-0116_SampleC.pkl

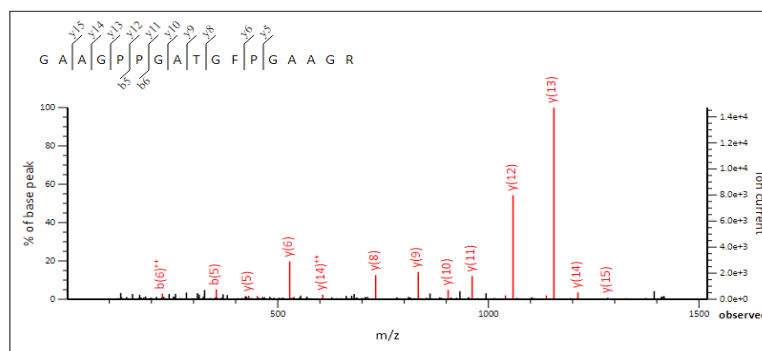


MS/MS Fragmentation of **GADGAAGKDGR**
 Found in **XP_017540674.1** in **NCBIprot**, PREDICTED: collagen alpha-1(I) chain isoform X1 [Pygocentrus nattereri]
 Match to Query 97: 1086.552848 from(544.283700,2+) intensity(900638.9000) index(14)
 Data file 2019-0116_SampleC.pkl



11.PL

MS/MS Fragmentation of **GAAGPPGATGFGAAGR**
 Found in **XP_017540674.1** in **NCBIprot**, PREDICTED: collagen alpha-1(I) chain isoform X1 [Pyrococcus nattereri]
 Match to Query 191: 1410.702048 from(706.358300,2+) intensity(299005.0000) index(471)
 Data file 2019-0116_SampleC.pkl



5/ Protein: hypothetical protein cypCar_00006571 [Cyprinus carpio]

+ Số protein trong cơ sở dữ liệu: KTG43775.1

+ Điểm số protein: 101

+ Khối lượng (M_r): 136996

+ pI được tính toán: 5.60

+ Trình tự acid amin

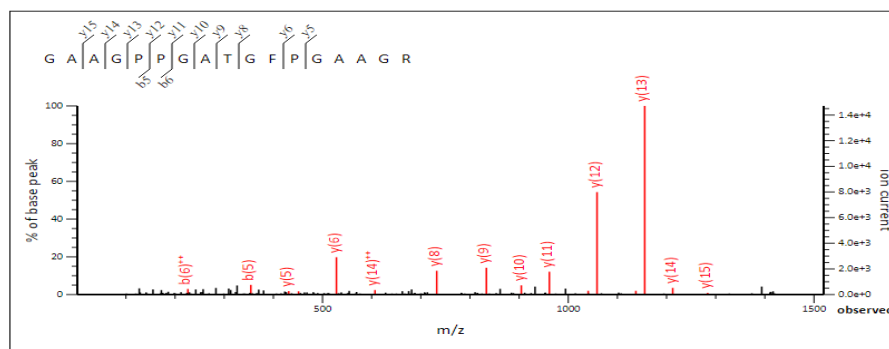
1	MFSFVDIRLA	LLSATVLLA	RGQGEDDRTG	GSCTLDGQVY	NDRDVWKPEP
51	CQICVCDST	VMCDEVICED	TAHCSNPVIP	HDECCPVCPD	DEFKEPGVEG
101	PRGPAGEKGD	RGLPGPPGND	GIPGQPGLPG	PPGPPGPPGL	GGNFSPQMSG
151	GYDEKSGGAM	AVPGPMGPMG	PRGPPGPPGS	SGPQQFTGPP	GEPGEAGAPG
201	PMGPRGAAGP	PGKNGEDGES	GKPGRPPGERG	PPGAQGARGF	PGTPGLPGIK
251	GHRGFSGLDG	AKGDTGPAGP	KGEPGAPGEN	GTPGAMGPRG	LPGERGRAGP
301	PGAAGARGND	GAAGAAGPPG	PTGPAGPSGF	PGGPGAKGEV	GAQGARGAEG
351	PQGARGEPGN	PGPAGAAGPA	GNNGADGAPG	LKGAPGAPGI	AGAPGFPGPR
401	GPSGPAGAAG	APGPKGNTGE	VGAPGAKGEA	GAKGEAGAQQ	VQGPPGPSGE
451	EGKRGRPRGEP	GSAGARGPPG	ERGAPGARGF	PGADGSAGPK	GATGERGGPG
501	IVGPKGATGE	PGRNGEPGMP	GSKGMTGSPG	SPGPDGKTGA	TGTPGQDGRP
551	GPPGPVGARG	QPGVMGFPGP	KGAAGEAGKP	GERGVMGALG	ATGAPGKDGD
601	VGAPGAPGPA	GPTGERGEQG	PAGPPGFQGL	PGPQGATGEP	GKSQEQGVPG
651	EAGAPGPAGS	RGDRGFPPER	GAPGPAGPAG	ARGSPGSAGN	DGAKGDAGAP
701	GAPGAQGPPG	LQGMPGERGA	AGLPGLKGDR	QMNARMAQILK	TDNKFLSKGD
751	QGAKGTDGAP	GKDGIRGMTG	PIGPPGPAGA	PGDKGETGAP	GLVGPNGARG
801	PPGERGETGA	PGPAGFAGPP	GADGLPGAAG	EPGDNGAKGD	SGPPGPAGAT
851	GAPGPQGPVG	STGPKGARGA	AGPPGATGFP	GAAGR VGPPG	PAGNAGPPGP
901	SGAPKKEGQK	GNRGETGPSG	RTGEIGAAGP	PGAPGEK GTP	GAEGPPGSAG
951	IPGPQGIAGQ	RGIVGLPGQR	GERGFPLPG	QSKVGILCIN	HGKAFILFI
1001	MPFRESLANK	DLLVPLVNVD	LLDPWDPLDW	LDLLVSLVVR	ELQVMRVLLD
1051	VMVLLDQRVT	VVRLALLALP	VLLDLLVLLD	PLALLERLVI	VESLALLVLP
1101	VLLALLVPVD	PLCNVFIQGP	AGARGDRGET	GEAGERGMKG	HRGFTGMQGP
1151	PGPPGPSGEP	GPAGASGPAG	PRGPGGSSGA	AGKDGMSGLP	GPIGPPGPRG
1201	RNGEIGPAGP	PGPPGLPGPP	GPSGGGFDIG	FIAQPVEKAP	DPFRSYRADD

12.PL

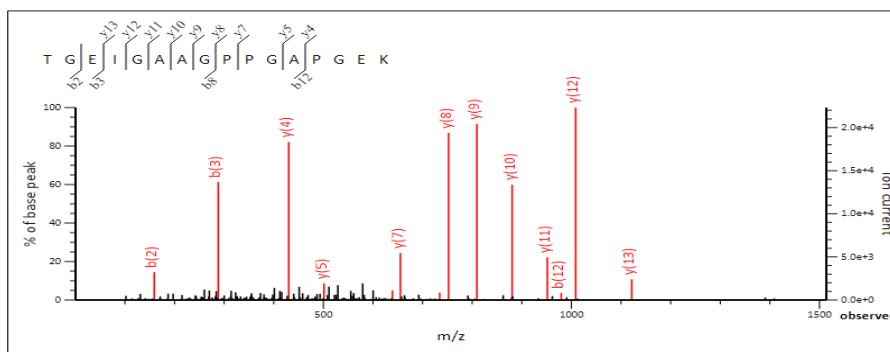
1251 ANVMRDRDLE VDTTLKSLSQ QIESIIPDG TTKNPARTCR DLKMCHPDWK
1301 SGEYWIDPDQ GCNQDAIKVY CNMETGETCV YPAESSIPKK NWYTSKNIKE
1351 KKHVWFGEAM TDGFQSHTGA WGKTVIDYKT TKTSRLPIID IAPMDVGAPN
1401 QEFGIEVGPV CFL

+ Phổ MS/MS của các mảnh peptide đã được nhận diện điển hình

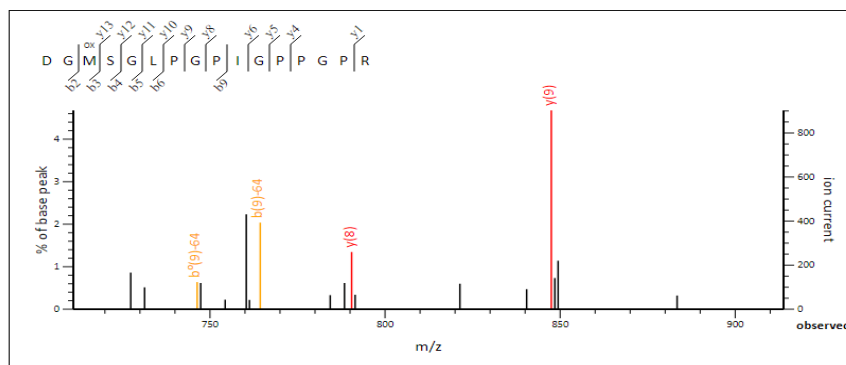
MS/MS Fragmentation of **GAAGPPGATGFPGAAGR**
 Found in **KTG43775.1** in **NCBIprot**, hypothetical protein cypCar_00006571 [Cyprinus carpio]
 Match to Query 191: 1410.702048 from(706.358300,2+) intensity(299005.0000) index(471)
 Data file 2019-0116_SampleC.pkl




MS/MS Fragmentation of **TGEIGAGPPGAPGEK**
 Found in **KTG43775.1** in **NCBIprot**, hypothetical protein cypCar_00006571 [Cyprinus carpio]
 Match to Query 190: 1407.704848 from(704.859700,2+) intensity(1057856.9000) index(71)
 Data file 2019-0116_SampleC.pkl



MS/MS Fragmentation of **DGMSGLPGPIPPGR**
 Found in **KTG43775.1** in **NCBIprot**, hypothetical protein cypCar_00006571 [Cyprinus carpio]
 Match to Query 216: 1519.760448 from(760.887500,2+) intensity(65480.4000) index(336)
 Data file 2019-0116_SampleC.pkl




BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH
Số: 2775

Tên giải pháp hữu ích: PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH COLAGEN TỪ VÂY CÁ NƯỚC NGỌT VIỆT NAM, COLAGEN THU ĐƯỢC TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY VÀ VẬT LIỆU TỔ HỢP CHỨA COLAGEN NÀY

Chủ Bằng độc quyền: Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
 Nhà A13, 18 đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

Tác giả: 1. Nguyễn Thủy Chinh (VN)
 2. (Danh sách kèm theo)

Số đơn: 2-2021-00287


Ngày nộp đơn: 19/10/2018


Số điểm yêu cầu bảo hộ: 038 **Số trang mô tả:** 19

Cấp theo Quyết định số: 19627w/QĐ-SHTT, ngày: 01/12/2021

Có hiệu lực từ ngày cấp đến hết 10 năm tính từ ngày nộp đơn (Hiệu lực bảo hộ cần duy trì hàng năm).

KT. CỤC TRƯỞNG
PHÓ CỤC TRƯỞNG


 Phan Ngân Sơn


 VN 02775

BẰNG ĐỘC QUYỀN GIẢI PHÁP HỮU ÍCH SỐ: 2775

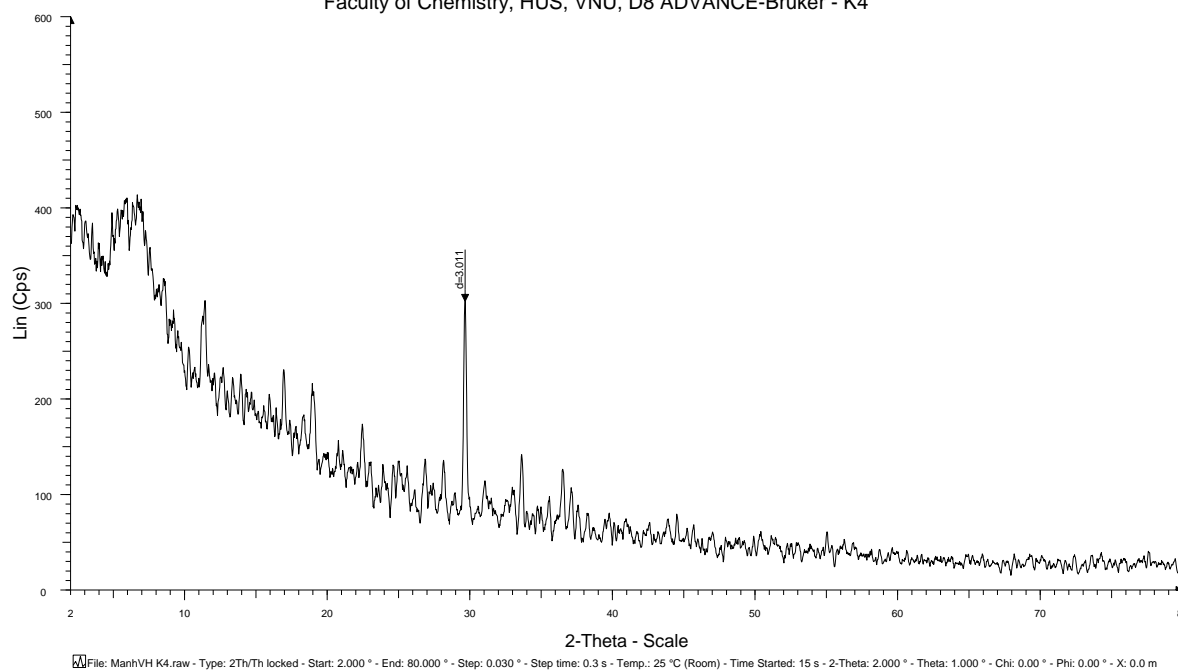
Danh sách các Tác giả tiếp theo:

2. Thái Hoàng (VN)
3. Vũ Quốc Mạnh (VN)
4. Nguyễn Vũ Giang (VN)
5. Trần Đại Lâm (VN)
6. Vũ Quốc Trung (VN)

PL8. Giải pháp hữu ích về phương pháp chiết tác collagen từ vây cá nước ngọt

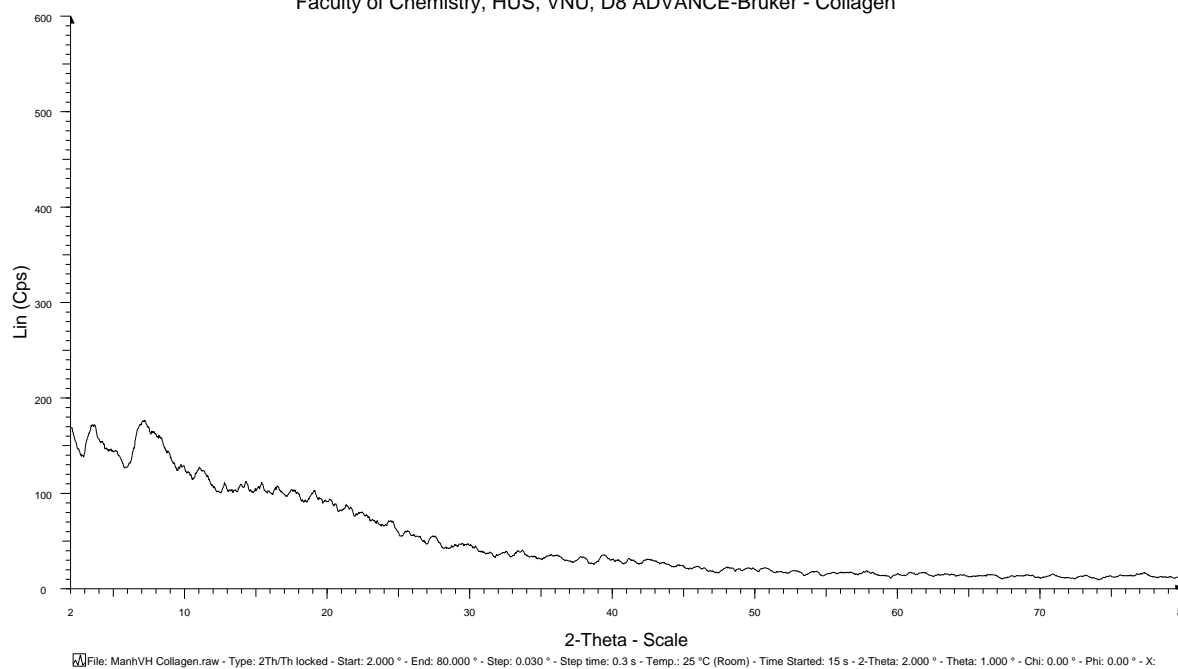
14.PL

Faculty of Chemistry, HUS, VNU, D8 ADVANCE-Bruker - K4



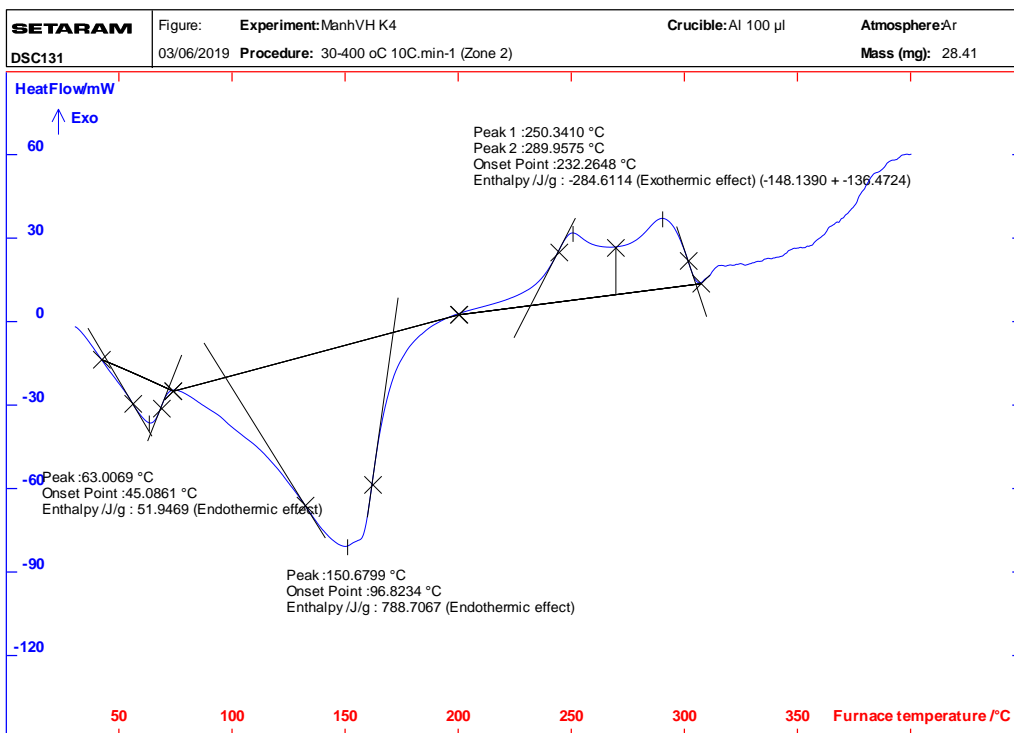
PL9. Giải đồ XRD của màng tổ hợp CCA955-10 chất tạo gel KCl 1 %.

Faculty of Chemistry, HUS, VNU, D8 ADVANCE-Bruker - Collagen

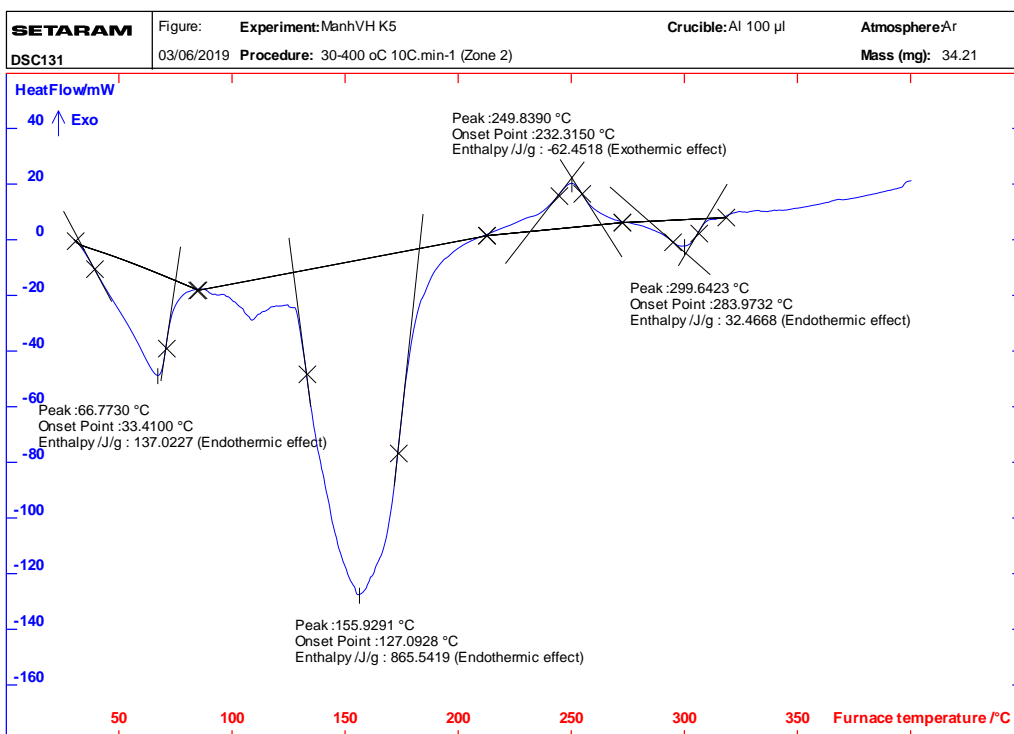


PL10. Giải đồ XRD của collagen

15.PL

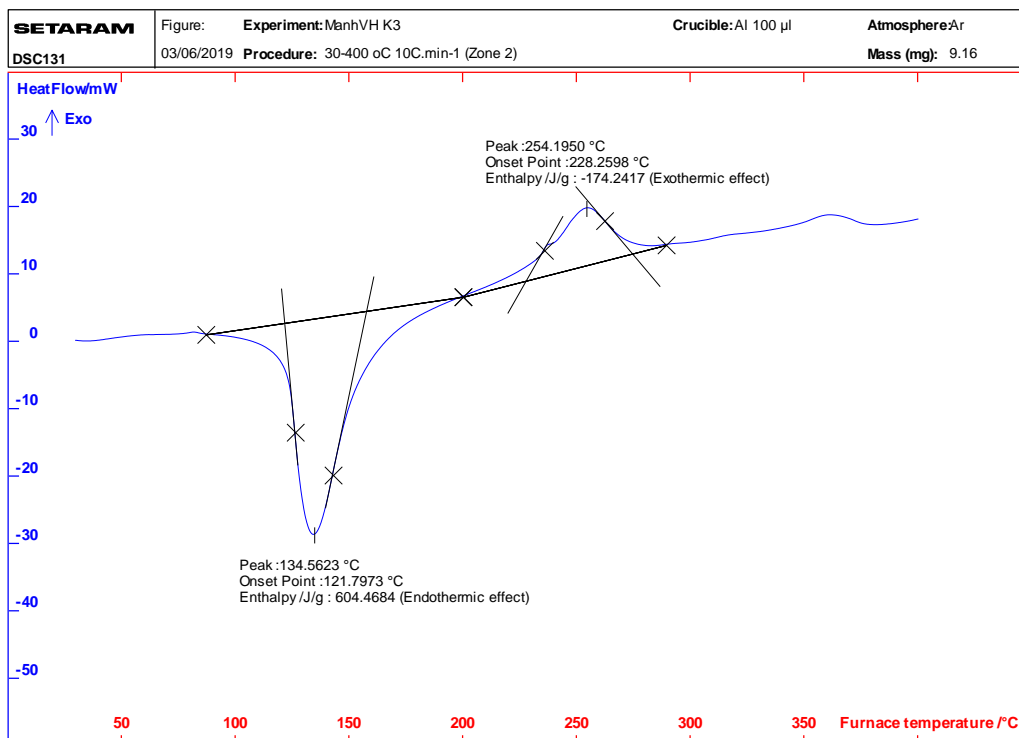


PL11. Giải đồ DSC mẫu CCA955

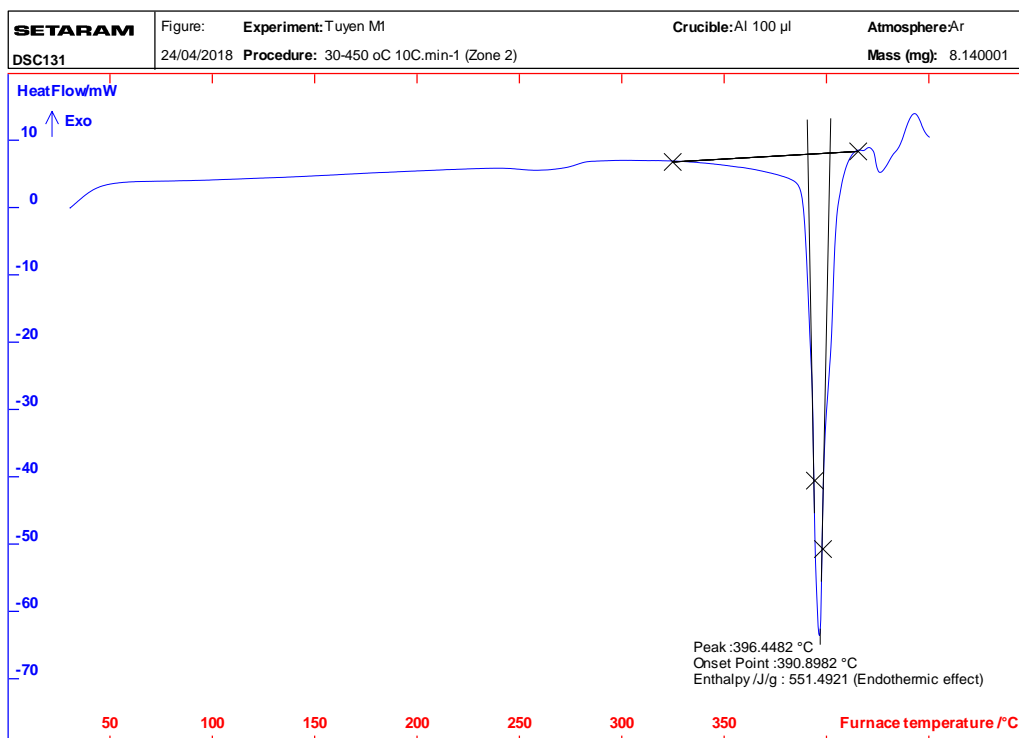


PL12. Giải đồ DSC mẫu CCA9010

16.PL



PL13. Giảm đồ DSC mẫu CCA991



PL14. Giảm đồ DSC allopurinol

Size Distribution Report by Volume

v2.1



Sample Details

Sample Name: Mau 1 2-8 1

SOP Name: Nano.sop

General Notes:

File Name: 11042018.dts

Dispersant Name: Water

Record Number: 1

Dispersant RI: 1.330

Material RI: 1.00

Viscosity (cP): 0.8872

Material Absorbtion: 0.00

Measurement Date and Time: Wednesday, April 11, 2018 9...

System

Temperature (°C): 25.0

Duration Used (s): 70

Count Rate (kcps): 109.2

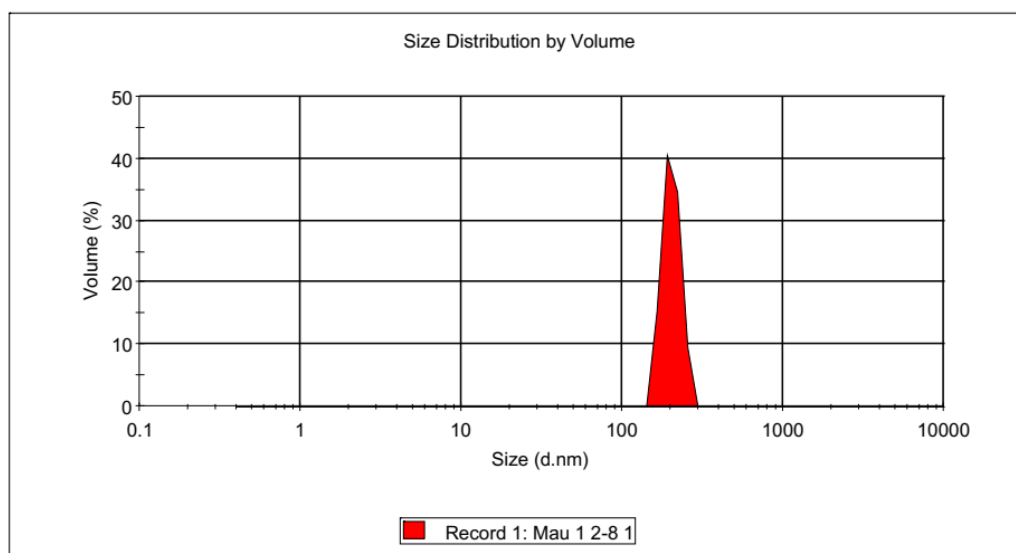
Measurement Position (mm): 3.00

Cell Description: Disposable micro cuvette (40µl)

Attenuator: 9

Results

	Size (d.nm):	% Volume	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 748.5	Peak 1: 202.7	100.0	25.70
Pdl: 0.651	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.957	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Refer to quality report			



PL15. Phân bố kích thước hạt ACC28-10

Size Distribution Report by Number

v2.1



Sample Details

Sample Name: Mau 2 5-5 1

SOP Name: Nano.sop

General Notes:

File Name: 11042018.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 2	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.00	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.00	Measurement Date and Time: Wednesday, April 11, 2018 9...

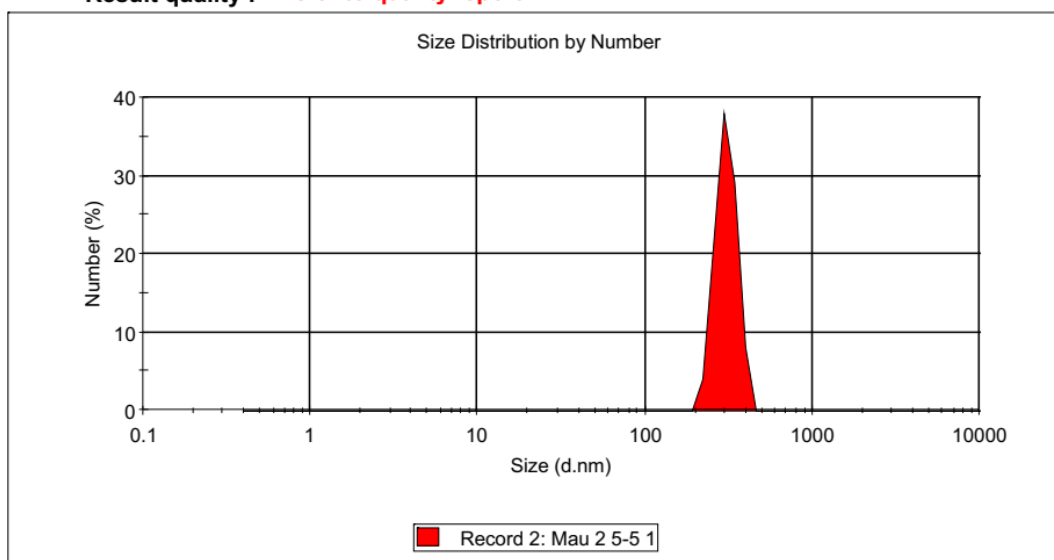
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 120
Count Rate (kcps): 71.7	Measurement Position (mm): 3.00
Cell Description: Disposable micro cuvette ...	Attenuator: 8

Results

	Size (d.nm):	% Number	Width (d.nm...)
Z-Average (d.nm): 715.8	Peak 1: 305.6	100.0	43.76
PdI: 0.624	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.894	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : **Refer to quality report**



PL16. Phân bố kích thước hạt ACC55-10

Size Distribution Report by Number

v2.1



Sample Details

Sample Name: Mau 3 6-4 1

SOP Name: Nano.sop

General Notes:

File Name: 11042018.dts

Dispersant Name: Water

Record Number: 3

Dispersant RI: 1.330

Material RI: 1.00

Viscosity (cP): 0.8872

Material Absorbtion: 0.00

Measurement Date and Time: Wednesday, April 11, 2018 9...

System

Temperature (°C): 25.1

Duration Used (s): 50

Count Rate (kcps): 411.0

Measurement Position (mm): 3.00

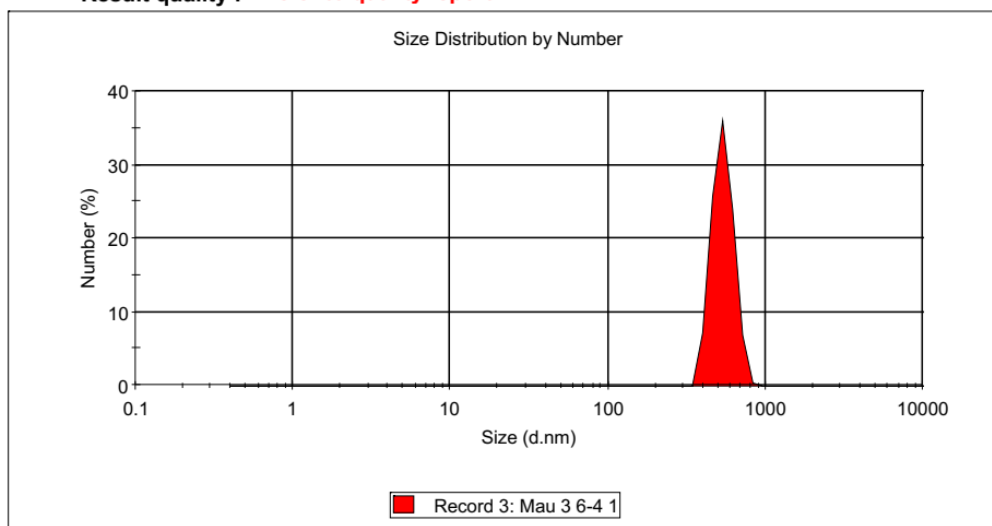
Cell Description: Disposable micro cuvette ...

Attenuator: 10

Results

	Size (d.nm):	% Number	Width (d.nm...)
Z-Average (d.nm): 1050	Peak 1: 536.5	100.0	83.14
PdI: 0.539	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.879	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : **Refer to quality report**



PL17. Phân bố kích thước hạt ACC64-10