

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 ĐƯỢC CHẤT ALLOPURINOL**

Chuyên ngành: Hoá Hữu cơ

Mã số: 9440114

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỮU CƠ

HÀ NỘI – 2024

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: GS.TS. Thái Hoàng – Viện kỹ thuật nhiệt đới
2. Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Vũ Quốc Trung – Đại học sư phạm Hà Nội

Phản biện 1: ...

Phản biện 2: ...

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ..', ngày ... tháng ... năm 202....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

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, (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, Thiệu 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 vây 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, Quyết định số 19627w/QĐ-SHTT.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Trong các hệ polyme y sinh thì hệ polyme hydrogel có nhiều ưu điểm như khả năng tương thích sinh học tốt, tương tác tốt với dược phẩm và có thể kiểm soát giải phóng thuốc và dễ gắn với các loại dược liệu nên hiện đang được chú trọng 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 là hai ứng viên tiềm năng được sử dụng để mang các dược chất.

Car với kích thước nano đặc biệt là hệ nano tổ hợp có nhiều tính chất đặc biệt và được ứng dụng nhiều trong công nghiệp dược phẩm (sản xuất thuốc điều trị như: thuốc chống đông máu, chống ung thư...).

Collagen (C) ứng dụng trong sản xuất thuốc, cầm máu, làm lành vết thương và nuôi cấy mô và tế bào. 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 bò điên, lở mồm long móng ở lợn khiến cho chất lượng collagen thu được không đảm bảo.

Allopurinol (ALP) là chất làm giảm mạnh nồng độ axit uric trong máu. Nên ALP được sử dụng là thuốc để điều trị bệnh gút và tăng axit 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 vây cá) mang dược chất allopurinol*” nhằm thu được collagen từ vây cá nước ngọt ở Việt Nam, đồng thời sử dụng C thu được kết hợp với Car để chế tạo vật liệu mang dược chất ALP để hỗ trợ điều trị bệnh gút.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

+ Xây dựng được quá trình trích ly collagen từ vây 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 allopurinol dạng màng và dạng hạt bằng 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 allopurinol.

3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

- 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 vảy cá) mang ALP để thu được tổ hợp polyme mang dược chất ở dạng màng và dạng hạt bằng phương pháp dung dịch và phương pháp gel – ion hóa.

- Nghiên cứu sự giải phóng dược 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 vảy cá) chứa ALP đến khả năng giảm acid uric trong máu.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về collagen

Hàm lượng các amino axit trong collagen có nguồn gốc từ cá thấp hơn collagen có nguồn gốc từ động vật. Dựa vào cấu trúc và nguồn gốc collagen gồm các loại sau: Collagen dạng sợi, collagen dạng màng, dạng chuỗi hạt, dạng chuỗi ngắn.

Collagen là loại protein nên có tính chất cơ bản sau: tính hút nước, thủy phân bởi axit – bazơ, biến tính ở nhiệt độ cao, tính tương thích sinh học...

Với nhiều tính chất tốt collagen được nghiên cứu tách chiết từ nhiều nguồn như: da động vật, da cá, xương và vây cá.

Collagen được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau như: Trong sản xuất thực phẩm, y học, dược phẩm, mỹ phẩm.

1.2. Tổng quan về carrageenan

Carrageenan (Car) được chiết xuất từ loài rong đỏ *Chondrus crispus*. Car là một polysaccharid của galactose - galactan. Được cấu tạo từ các gốc *D*-galactose và 3,6-anhydro *D*-galactose liên kết nhau bằng liên kết β -D (1-4) và α -D (1-3) galactosid luân phiên nhau.

Dựa theo cấu trúc carrageenan được chia thành các loại chính: κ -carrageenan, ι -carrageenan, λ -carrageenan.

Hiện nay, Car được nghiên cứu sản xuất từ rong biển bằng các phương pháp khác nhau như: phương pháp hóa học, phương pháp sử dụng enzyme, phương pháp sử dụng vi sóng...

1.3. Tổng quan về polyme thiên nhiên mang dược chất

Các đặc tính sinh học và hóa học của Car là lý do chúng được sử dụng trong các hệ mang thuốc. Cấu trúc hóa học của Car giúp tăng khả năng ứng dụng của nó trong bào chế và sản xuất thuốc, Car được sử dụng trong các dạng bào chế khác nhau bao gồm: viên nén, thuốc đạn, dạng màng, hạt chèn hòa tan nhanh...

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, natri salicylat và chlorpheniramine maleat được đưa vào nền Car với hàm lượng 500 mg.

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...

Nghiên cứu sự giải phóng nano poly(N-isopropylacrylamit) từ màng tổ hợp collagen-sulphat mang hạt nano poly(N-isopropylacrylamit) trong mạch máu. Nghiên cứu ảnh hưởng của composite collagen/poly(vinyl alcohol) dạng hydrogel (C/PVA) đến khả năng giải phóng hormon tăng trưởng GH.

Ảnh hưởng của hạt nano từ tính (MNPs) và κ -Car đến sự trương nở và giải phóng của thuốc diclofenac natri (DFNa) từ hạt nano hydrogel composite có cấu trúc mạng các mạch polyme đan xen.

Hệ nanogel chế tạo từ collagen, hydroxypropyl metyl cellulose mang curcumin (CNG) và ứng dụng chữa lành vết thương.

Ngoài ra, hệ hydrogel gồm carrageenan và collagen mang hydroxyapatite (HAp) được dùng trong nghiên cứu điều trị phát triển mô xương.

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

Allopurinol (ALP) là một chất ức chế xanthine oxidase, thường được sử dụng trong điều trị bệnh gút và tăng axit uric máu. Thời gian bán hủy sinh học là 1–3 giờ, điều này cho thấy rõ ràng nhu cầu phát triển các công thức giải phóng kéo dài.

Dược lực: Giảm nồng độ axit uric trong máu. Axit uric tạo thành các tinh thể trong mô cơ thể gây viêm gout. Axit uric tăng cũng gây sỏi thận. Nếu sử dụng trực tiếp ALP có thể gây tác dụng phụ trên da (phát ban) hoặc gây sốt, run rẩy và viêm mạch dẫn đến tổn thương thận và gan.

ALP được thải trừ qua nước tiểu dưới dạng đã chuyển hóa, thời gian bán thải khoảng 1 giờ (oxypurinol là 18 - 20 giờ). Khoảng 20% ALP đã uống được thải trừ trong phân.

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), bào chế dạng viên nén từ polyoxyetylen (PEO), cải thiện sinh khả dụng của ALP.

Hạt nano siêu thuận từ chitosan mang ALP (A-CNPs) trong điều trị tăng axit uric trong máu đã được nghiên cứu chế tạo. 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.

Từ các nghiên cứu và trình bày ở trên, có thể thấy giải pháp xử lý một cách có hệ thống vảy cá để hạn chế ô nhiễm môi trường, đồng thời thu collagen chưa được quan tâm thỏa đáng. Các nghiên cứu về polyme mang được 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

Ca(OH)₂, KCl, axit citric, KH₂PO₄, HCl 37%, H₂SO₄ đặc, H₃PO₄, NaOH rắn, CH₃COOH đặc, NaCl rắn: sản phẩm thương mại của Trung Quốc.

Carrageenan, allopurinol, polyethylene oxide (PEO): Sản phẩm của hãng Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ).

2.2. Trích ly collagen từ vẩy cá (họ cá chép ở miền Bắc nước ta)

Bước 1 – Vẩy cá hỗn hợp gồm: vẩy cá trắm, cá trôi, cá chép, cá rô phi được rửa sạch phơi khô. Ở các bước xử lý tiếp theo, vẩy ngâm trong các dung dịch khảo sát đều được tiến hành ở 4 °C.

Bước 2 – Ngâm vẩy cá trong dung NaOH.

Bước 3 – Ngâm vẩy cá đã rửa sạch ở bước 2 trong các dung dịch hỗn hợp axit H₂SO₄ và HCl ở các nồng độ khác nhau

Bước 4 – Ngâm vẩy cá trong dung dịch CH₃COOH 0,5 M trong 24 giờ. Kết tủa collagen bằng NaCl, lọc và thẩm tích trong 48 giờ thu được collagen tinh khiết.

2.3. Chế tạo tổ hợp carragennan/collagen/allopurinol

Hòa tan Car trong 40 mm nước ở 80 °C trong 15 phút, để nguội thêm dung dịch KCl và khuấy từ trong 15 phút (cốc A).

Hòa tan collagen trong dung dịch CH₃COOH 0,5 M (cốc B).

Hòa tan ALP trong dung dịch NaOH 0,5M (cốc C)

Đổ từ từ cốc (C) vào cốc (A) thu được dung dịch (D). Khuấy cốc D trên máy khuấy từ trong 30 phút. Nhỏ từ từ đến hết dung dịch (B) vào dung dịch (D), kết hợp khuấy siêu âm với tốc độ 20.000 vòng/trên phút. Tiếp tục khuấy hỗn hợp trên 60 phút. Sau đó, khuấy siêu âm với tốc độ 20.000 vòng/phút (3 lần, 10 phút/lần).

Hỗn hợp được nều đổ ra đĩa petri và để bay hơi tự nhiên thu được các màng tổ hợp. Nếu ly tâm đem đông khô thu được dạng hạt.

2.5. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp hiển vi điện tử quét (SEM): đo trên máy FESEM S-4800, Hitachi, Nhật Bản.

Phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS): được đo trên thiết bị Zetasizer Ver 620.

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR): được ghi bằng thiết bị Fourier Nexus 670 (Hoa Kỳ).

Phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD): được ghi trên máy D8 ADVANCE, Brucker.

Phương pháp nhiệt lượng quét vi sai (DSC): được ghi trên thiết bị DSC131 (Setaram, Pháp).

Phương pháp phân tích nhiệt khối lượng (TGA): được ghi trên thiết bị DTG 60H.

Phương pháp phổ hấp thụ tử ngoại – khả kiến (UV-Vis): Sử dụng thiết bị quang phổ UV – Vis (Cintra 40, GBC, Mỹ).

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC): được thực hiện tại Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia (phương pháp thử H.HD.QT.046 và H.HD.QT.112).

Phương pháp điện di SDS-PAGE và phương pháp sắc ký nano đa chiều và khối phổ (nanoLC-MS/MS) thực hiện tại Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Thử nghiệm *in vivo* sử dụng hạt tổ hợp carrageenan/collagen/allopurinol trên chuột.

2.6. Nghiên cứu giải phóng ALP từ vật liệu tổ hợp Car/C mang ALP trong các môi trường pH khác nhau

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

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

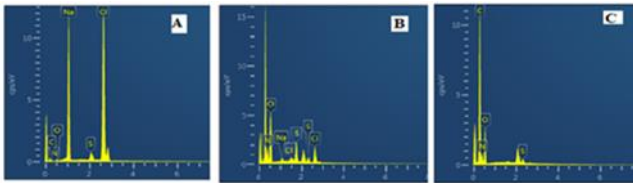
Kết quả xử lý vẩy cá theo thời gian và nồng độ dung dịch NaOH. Ta thấy dung dịch NaOH 0,5 M, thời gian ngâm 8 giờ là thích hợp nhất, vẩy sạch hết bụi bẩn và protein.

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

Vẩy cá sau khi được xử lý sơ bộ và xử lý kiềm được tiến hành các bước xử lý tiếp theo với các điều kiện trích ly thu collagen được trình bày trong Bảng 3.3. Khối lượng collagen thu được khi xử lý vẩy cá với dung dịch hỗn hợp axit 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 axit khác. Thấm tích trong 48 giờ thu được collagen tinh khiết.

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

Hình 3.1 là phổ EDX của mẫu collagen. Với collagen chưa thấm tích chứa các nguyên tố C, O, N, S, Na và Cl. Sau 24 giờ thấm tích, hàm lượng các nguyên tố Na và Cl và S giảm. Sau 48 giờ thấm tích đã loại hết NaCl và hầu hết S.



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

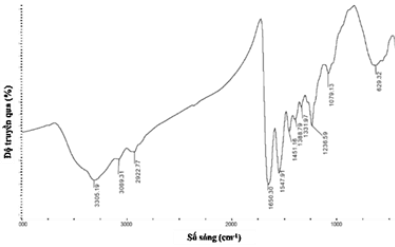
Bảng 3.5 trình bày kết quả nghiên cứu thành phần axit amin trong collagen trích ly từ vẩy cá Việt Nam chứa 18 axit amin.

Bảng 3.5. Hàm lượng các axit amin trong dung dịch collagen tinh thu được từ vây cá

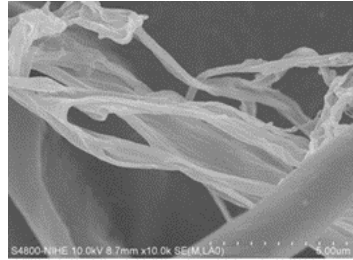
		Collagen từ vây cá Chép		Collagen vây cá Chép hòa tan trong axit		Collagen vây cá Chép	
TT	Axit amin	mg/ml	%	Cặn thô/10 ³	%	Cặn thô/10 ³	%
1	Threonine	1,704	39,79	21	2,05	23	2,25
2	Proline	0,487	11,37	110	10,74	115	11,23
3	Glutamic axit	0,550	12,84	77	7,52	76	7,42
4	Arginine	0,425	9,92	50	4,88	55	5,37
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 axit	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	Phenylalanin	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	Methyoline	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	Hydroxyprolin	-	-	89	8,69	77	7,52
20	Hydroxylysin	-	-	-	-	8	0,87
21	Collagen	0,29	6,77				

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

Hình 3.2 là phổ FT-IR của collagen tinh khiết thu được từ hỗn hợp vây cá. Trên phổ FTIR xuất hiện đầy đủ vân phổ đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm N-H ở số sóng 3305,19 cm⁻¹, dao động biến dạng của amit bậc 1, bậc 2, bậc 3 lần lượt là: 1650,3 cm⁻¹; 1547,91 cm⁻¹ và 1236,59 cm⁻¹.



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



Hình 3.4. Ảnh SEM của collagen tinh sau khi thẩm tích 48 giờ

Đặc trưng nhiệt của collagen với 1 pic thu nhiệt ở 116 °C ($\Delta H = 3,7$ J/g). Collagen bị tổn hao khối lượng theo 3 bước: Bước 1 - ứng với sự mất nước trong collagen; bước 2 - ứng với sự phân hủy của các protein trong collagen; bước 3 - ứng với sự phân hủy của các vòng thơm trong collagen, sự cháy của C thành CO_2 .

Nhiệt độ biến tính của collagen thu được là ở 32,2 °C.

Kết quả điện di (SDS-PAGE) cho thấy, collagen thu được là loại I với chuỗi $\alpha 1$ và $\alpha 2$ tương ứng với 139 và 129 kDa và một chuỗi β .

Phương pháp điện di SDS-Page nhận diện được 5 protein thuộc nhóm protein da-vảy (collagen) của họ cá có hệ số bắt cặp lớn, trong đó hypothetical protein cypCar_00045321[Cyprinus carpio] điểm số bắt cặp lớn nhất (318).

3.2. Màng tổ hợp carragennan/collagen/Allopurinol

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

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

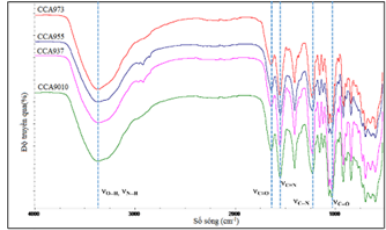
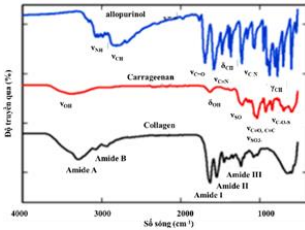
ALP trong dung dịch NaOH 1 M: $\lambda_{max} = 277,98$ nm, phương trình đường chuẩn: $y = 8621,6x + 0,2358$, $R^2 = 0,9962$.

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

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 %.

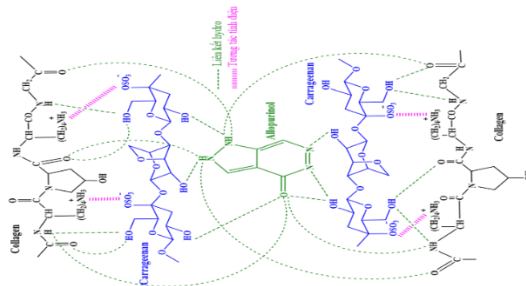
3.2.2. Phổ FTIR của màng tổ hợp Car/C/ALP

Hình 3.10 là phổ FTIR của ALP, Car và collagen. 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). Các vân phổ của Car: vân trong khoảng $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ và ở 1636 cm^{-1} . Vân phổ ở 1223 cm^{-1} của liên kết S=O. Của ALP: vân phổ ở 3165 và 3074 cm^{-1} của NH, vân phổ 3030 cm^{-1} của CH, vân phân phổ ở 1765 và 1694 cm^{-1} của liên kết C=O.



Hình 3.10. Phổ FTIR của ALP, Car và collagen **Hình 3.11.** Phổ FTIR của màng tổ hợp CCA

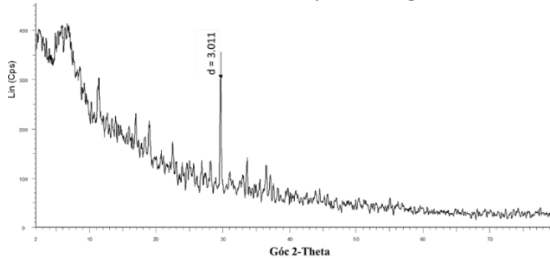
Khi tổ hợp Car/C mang ALP vị trí các vân phổ của các nhóm đặc trưng trong từng phần bị thay đổi. Với Car, vân phổ của nhóm O–H là 3371 cm^{-1} , nhóm C=O từ là 1642 cm^{-1} , nhóm C–O là 1065 cm^{-1} . Với collagen: dao động nhóm O–H là 3371 cm^{-1} , amit bậc 1 là 1642 cm^{-1} . Với ALP: của nhóm N–H là 3371 cm^{-1} , nhóm C=N là 1564 cm^{-1} , nhóm C–N là 1229 cm^{-1} . Điều này cho thấy carrageenan, collagen và ALP có thể tương tác với nhau thông qua liên kết hydro, giả thuyết này được mô tả trong Hình 3.13



Hình 3.13. Một số giả thuyết tương tác trong màng tổ hợp Car/C/ALP

3.2.3. Nhiễu xạ tia X (XRD)

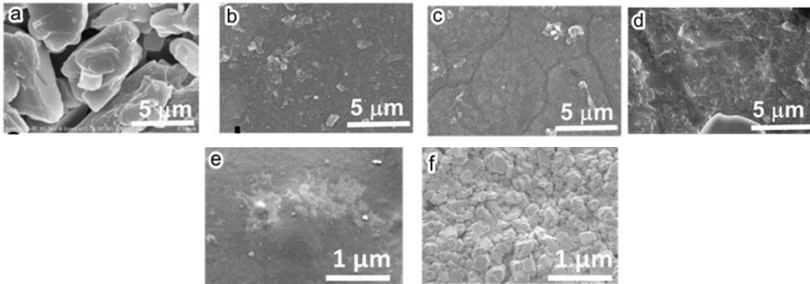
Giải đồ nhiễu xạ tia X (XRD) của ALP. Có thể thấy ALP có cấu trúc tinh thể với sự xuất hiện của góc nhiễu xạ ở $10,66^\circ$; $12,16^\circ$; $14,96^\circ$; $17,46^\circ$; $20,26^\circ$; $21,26^\circ$. Khi được mang bởi tổ hợp Carr/C (95/5) và dùng 1% KCl, các pic, góc nhiễu xạ của ALP có sự dịch chuyển đáng kể.



Hình 3.15. Giải đồ XRD của màng tổ hợp Car/C/ALP ở tỉ lệ carrageenan/collagen 95/5, 1 % chất tạo gel KCl

3.2.4. Ảnh SEM của màng tổ hợp Car/C/ALP

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 và 90/10, màng tổ hợp có cấu trúc không đồng đều. Mẫu màng tổ hợp với tỉ lệ Car/C 95/5 có cấu trúc đồng đều hơn cả. Mẫu chứa lượng collagen khác nhau có kích thước hạt ALP khoảng 50 – 350 nm.



Hình 3.16. 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)

3.2.6. Nghiên cứu giải phóng ALP 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 ALP trong dung dịch đệm pH 2

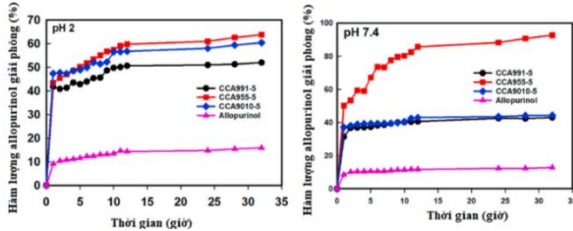
ALP trong dung dịch đệm pH 2 có: $\lambda_{\max} = 274,98 \text{ nm}$, phương trình đường chuẩn là $y = 9756x - 0,326$ ($R^2 = 0,991$).

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

ALP trong dung dịch đệm pH 7,4 có $\lambda_{\max} = 276,69 \text{ nm}$, phương trình đường chuẩn là $y = 9945,3x - 0,4437$ ($R^2 = 0,9901$).

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

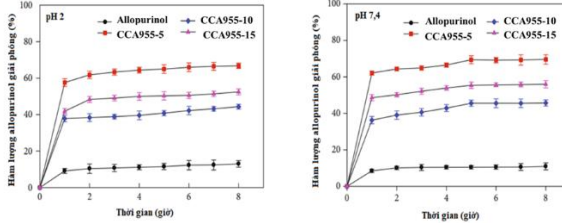
Hầu hết ALP được giải phóng ngay trong giờ đầu tiên. Ở mẫu đối chứng, sau 1 giờ thử nghiệm, có 9,14% ALP giải phóng trong dung dịch đệm pH 2 và tăng lên 15,87% sau 32 giờ. Trong dung dịch đệm pH 7,4 có 8,49 % ALP giải phóng sau 1 giờ và sau 32 giờ là 12,79%. Hàm lượng ALP được giải phóng từ các màng tổ hợp CCA ngược lại, giải phóng trong dung dịch đệm pH 7,4 lớn hơn trong dung dịch đệm pH 2. Như vậy tổ hợp Car/C/ALP giúp kiểm soát giải phóng ALP trong môi trường axit.



Hình 3.20. 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. Tỷ lệ Car/C 95/5 là thích hợp để chế tạo màng tổ hợp CCA giúp kiểm soát tốt giải phóng ALP.

Trên Hình 3.22 cho thấy, 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 giải phóng đã tăng lên 2 đến 3 %, tùy thuộc vào pH của dung dịch trong những giờ tiếp theo.



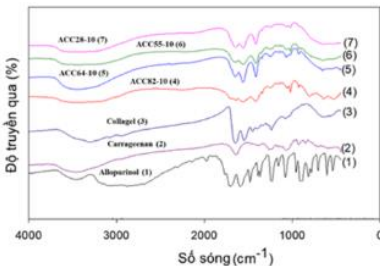
Hình 3.22. Đồ thị giải phóng ALP tinh khiết và từ màng CCA với hàm lượng ALP thay đổi trong dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4

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

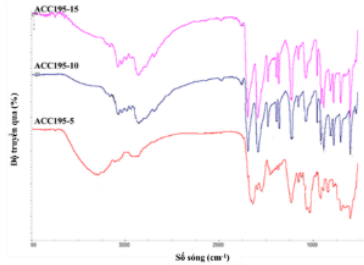
3.3.1. Phổ FTIR của hạt tổ hợp Car/C/ALP (ACC)

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

Hình 3.23 là phổ FTIR của Car, ALP, C và hạt tổ hợp ACC chế tạo ở các tỷ lệ Car/C khác nhau. Trên phổ FTIR của Car xuất hiện đầy đủ các vân phổ đặc trưng: 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} . Trong phổ FTIR của ACC, có vân phổ hấp thụ đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm $-NH$ ở $3305,19\text{ cm}^{-1}$. Ngoài ra, vân phổ đặc trưng cho dao động biến dạng của amit bậc 1 ở $1650,3\text{ cm}^{-1}$, amit bậc 2 ở $1547,91\text{ cm}^{-1}$, amit bậc 3 ở $1236,59\text{ cm}^{-1}$.



Hình 3.23. Phổ FTIR của Car, C, ALP và các hạt tổ hợp ACC ở các tỷ lệ Car/C khác nhau



Hình 3.24. 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

Bảng 3.12 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 trung bình nhỏ nhất là 200,80 nm và hạt ACC19-10 có kích thước trung bình 170,92 nm .

Bảng 3.12. Kích thước hạt trung bình của các hạt tổ hợp nano ACC28-10, ACC55-10 và ACC64-10

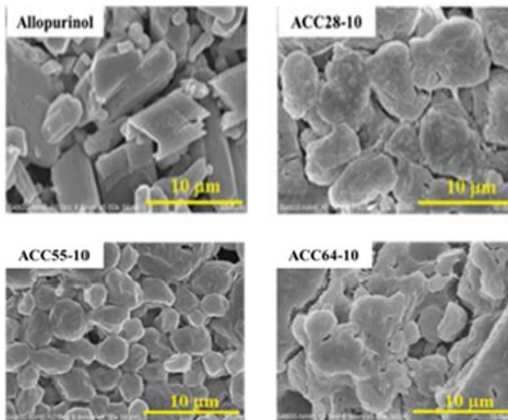
Mẫu	kích thước hạt (nm)	Kích thước hạt trung bình (nm)
ACC28-10	150 – 300	200,80 ± 7,19
ACC55-10	225 – 400	309,10 ± 14,76
ACC64-10	400 – 800	547,00 ± 31,74

Bảng 3.13. 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

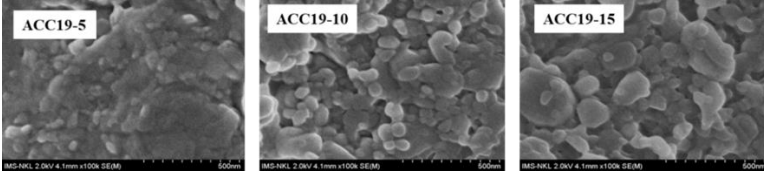
3.3.3. Ảnh SEM của hạt tổ hợp nano ACC

Ảnh SEM của mẫu ACC28, ACC55, ACC64 được trình bày trên Hình 3.26. Có thể thấy các hạt có kích thước không đồng đều từ 2 – 50 μm .



Hình 3.26. Ảnh SEM của ALP và các hạt tổ hợp nano ACC với tỷ lệ Car/C khác nhau

Hình 3.27 là ảnh SEM của các mẫu hạt tổ hợp ACC chế tạo ở các hàm lượng ALP, kích thước hạt khá đồng đều trong khoảng 50 - 250 nm, nhỏ hơn so với ALP.



Hình 3.27. Ảnh SEM của các hạt tổ hợp ACC với hàm lượng ALP khác nhau

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

Bảng 3.15 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.

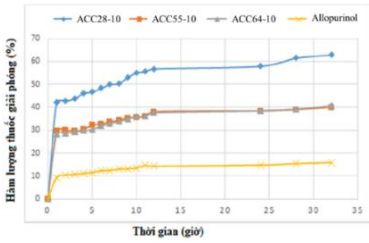
Bảng 3.15. Hiệu suất mang ALP của các hạt tổ hợp ACC và CCA

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

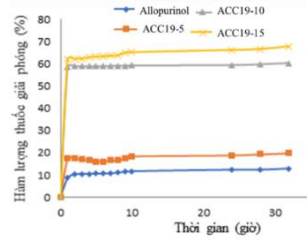
3.3.6. Nghiên cứu giải phóng ALP từ hạt tổ hợp nano Car/C/ALP trong dung dịch đệm pH 2 và pH 7,4

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. 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 và ALP tinh khiết.

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 (hàm lượng ALP thay đổi) và ALP tinh khiết.

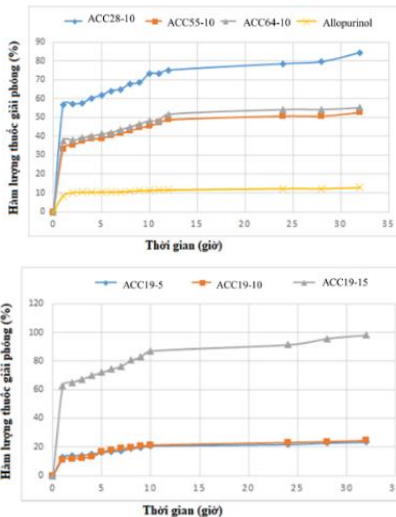


Hình 3.29. Đồ thị giải phóng ALP từ ALP tinh khiết và các hạt tổ hợp nano ACC trong dung dịch đệm pH 2



Hình 3.30. Đồ thị giải phóng ALP từ mẫu ALP tinh khiết và các hạt tổ hợp nano CCA trong dung dịch đệm pH 2

Có thể thấy sự giải phóng ALP 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. Hàm lượng ALP giải phóng từ hạt tổ hợp nano ACCA28-10 sau 32 giờ thử nghiệm lớn hơn so với các hạt tổ hợp nano ACC (hàm lượng ALP thay đổi) và ALP tinh khiết.



Hình 3.31. 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

Hình 3.32. Đồ thị giải phóng ALP từ các hạt tổ hợp nano ACC (hàm lượng ALP khác nhau) trong dung dịch đệm pH 7,4

Hình 3.32 trình bày hàm lượng ALP giải phóng từ các hạt tổ hợp nano ACC với hàm lượng ALP (5 %, 10 % và 15%) và mẫu ALP tinh khiết trong dung dịch đệm pH 2. 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 (hàm lượng ALP thay đổi) và ALP tinh khiết.

3.4. Thử nghiệm *in vivo* sử dụng hạt tổ hợp nano Car/C/ALP trên cơ thể động vật

3.4.1. Xác định độc tính cấp của hạt tổ hợp nano Car/C/ALP trên chuột được thử nghiệm

Kết quả thử độc cấp tính cho thấy hạt tổ hợp nano ACC19-10 pha dò liều cho thấy hạt tổ hợp nano ACC19-10 ở các liều thử nghiệm không gây ra độc tính cấp tính trên chuột.

Kết quả hình ảnh nhu mô gan, thận và lách bình thường cho thấy khi uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 không gây tổn thương hình thái và cấu trúc của gan, thận và lách.

3.4.2. Xác định độc tính bán trường diễn của hạt tổ hợp nano Car/C/ALP trên chuột được thử nghiệm

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

Các chỉ số huyết học cho thấy hạt tổ hợp nano ACC19-10 không ảnh hưởng đến chức năng tạo máu trên động vật thực nghiệm (Bảng 3.21).

Bảng 3.21. 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	132,50±10,50	130,40±12,57	132,50±9,64	p>0,05

chúng				
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 chúng	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 chúng	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	

Bảng 3.22 thể hiện các chỉ số hóa sinh của chuột trước và sau khi uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 14 và 28 ngày. Kết quả cho thấy hạt tổ hợp nano ACC19-10 không ảnh hưởng đến chức năng gan và thận trên động vật thực nghiệm.

Bảng 3.22. 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	Sau 28 ngày	P
<i>Nồng độ AST (UI/L)</i>				
Nhóm chúng	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 chúng	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	5,53±0,62	5,76±0,61	5,83±0,60	p>0,05

chứng				
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	

3.4.3. Khảo sát tác dụng của hạt tổ hợp nano Car/C/Al đến sự giảm nồng độ urat/axit uric trong máu của các nhóm chuột được thử nghiệm

Trong quá trình thử nghiệm, không có chuột chết và cân nặng của chuột tăng bình thường, chỉ gây mô hình tăng axit uric máu cũng như đánh giá tác dụng của hạt tổ hợp nano ACC19-10. Như vậy, mô hình tăng axit uric trên chuột sử dụng kali oxanat là an toàn.

Bảng 3.25 thể hiện nồng độ axit uric máu của chuột ở các nhóm nghiên cứu. Nhóm chứng trắng có nồng độ trong khoảng $40 \div 77 \mu\text{mol/l}$.

Bảng 3.25. Nồng độ axit 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	
	Dao động ($\mu\text{mol/l}$)	TB ($\mu\text{mol/l}$)	Dao động ($\mu\text{mol/l}$)	TB ($\mu\text{mol/l}$)	Dao động ($\mu\text{mol/l}$)	TB ($\mu\text{mol/l}$)	Dao động ($\mu\text{mol/l}$)	TB ($\mu\text{mol/l}$)
Sau 1 giờ	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	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	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	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	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	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

Mức độ giảm nồng độ axit 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. Trong khi, nhóm chuột uống hạt tổ hợp nano ACC19-10 giảm là $29,90 \pm 13,58$ % (Bảng 3.27). Như vậy, hạt tổ hợp nano ACC19-10 ở cùng hàm lượng điều trị có tác dụng làm giảm nồng độ axit uric trong máu chuột mạnh hơn so với nhóm chuột uống ALP.

Bảng 3.27. Tỷ lệ giảm axit 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	$18,88 \pm 18,21$ %	$29,90 \pm 13,58$ %

Từ kết quả này, NCS cần tiếp tục nghiên cứu để ứng dụng tổ hợp Car/C/ALP trên lâm sàng nhằm tăng tác dụng hạ axit 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 nước ngọt Việt Nam. Bằng các tác nhân kiềm và axit thích hợp, collagen được tách bằng dung dịch CH_3COOH 0,5 M, sau đó dùng NaCl rắn để kết tủa collage. Thẩm tích collagen trong 48 giờ thu được collagen tinh loại I, có chứa các chuỗi $\alpha 1$, $\alpha 2$ và β , độ tinh khiết > 99 %, dạng sợi với đường kính sợi 0,5-1 μm , nhiệt độ biến tính 32,3 °C, chứa 20 axit amin.

2. Đã chế tạo được màng tổ hợp Car/C/ALP hàm lượng chất tạo gel thích hợp KCl 1 % và sử dụng nồng độ chất tạo gel này cho các nghiên cứu

tiếp theo. Tỷ lệ Car/C thích hợp 95/5. ALP phân tán trong hỗn hợp Car/C với kích thước 50 – 100 nm, tương tác với carrageenan và collagen bằng các liên kết hydro, tương tác lưỡng cực – lưỡng cực và tương tác tĩnh điện.

3. Đã chế tạo được hạt tổ hợp nano Car/C/ALP ở các tỷ lệ Car/C và hàm lượng ALP khác nhau bằng phương pháp gel ion hóa. Mẫu được làm khô bằng phương pháp đông khô. Tỷ lệ thích hợp Car/C cho hạt tổ hợp nano Car/C/ALP, tỷ lệ Car/C cho hạt tổ hợp 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 23,33 – 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 KP 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 KP 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 ALP làm giảm nồng độ axit uric trong máu chuột mạnh hơn so với chuột được làm tăng axit 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 = 1/9/10 vào điều trị giảm lượng axit 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 vảy 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 °C.
2. Đã chế tạo thành công màng và hạt tổ hợp Car/C/ALP. Các màng tổ hợp có hiệu suất mang ALP 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 KP thích hợp nhất để phản ánh quá trình giải phóng ALP từ màng tổ hợp và các hạt tổ hợp nano carrageenan/collagen/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 axit uric trong máu và không gây độc và tác dụng phụ với liều thử nghiệm (200 mg/kg, 1000 mg/kg và 1500mg/kg).