

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Lê Hồng Nhung**

**NGHIÊN CỨU LIPOSOME HOÁ HOẠT CHẤT  $\alpha$ -MANGOSTIN  
VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT**

**Hà Nội – 2024**

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Lê Hồng Nhung**

**NGHIÊN CỨU LIPOSOME HOÁ HOẠT CHẤT  $\alpha$ -MANGOSTIN  
VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT**

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 8 44 01 14

Người hướng dẫn khoa học:

**PGS.TS. Trần Quốc Toàn**

**Hà Nội – 2024**

## LỜI CAM ĐOAN

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

**Tác giả luận văn**



**Lê Hồng Nhung**

## LỜI CẢM ƠN

Luận văn được hoàn thành tại Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên và Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong quá trình nghiên cứu, tác giả đã nhận được sự giúp đỡ quý báu của các thầy cô, đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Tôi bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc, cảm phục và kính trọng nhất tới **PGS.TS. Trần Quốc Toàn**, người thầy đã hướng dẫn tận tình, chu đáo và tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp đỡ tôi trong thời gian thực hiện luận văn.

Tôi chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên, Học viện Khoa học và Công nghệ và cán bộ các phòng ban đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành các thủ tục trong quá trình thực hiện và bảo vệ luận văn.

Tôi trân trọng cảm ơn các cán bộ Trung tâm Phát triển Sản phẩm thiên nhiên và Công nghệ - Thiết bị, Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên đânhiệt tình giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi trong quá trình làm thực nghiệm và hoàn thành luận văn.

Cuối cùng, tôi bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới gia đình, bạn bè và người thân đã luôn quan tâm, động viên, khích lệ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi trân trọng cảm ơn!

*Tác giả luận văn*



**Lê Hồng Nhung**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vii
DANH MỤC CÁC ĐỒ THỊ.....	x
<b>Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Giới thiệu chung về a-Mangostin.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Hệ thống dẫn truyền thuốc (Drug delivery system - DDS) .....</b>	<b>4</b>
<i>1.2.1. Giới thiệu chung về DDS .....</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2. Một số hệ dẫn truyền thuốc.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.3. Tiềm năng ứng dụng hệ thống dẫn truyền thuốc hướng đích .....</i>	<i>10</i>
<b>1.3. Liposome vận chuyển thuốc .....</b>	<b>10</b>
<i>1.3.1. Giới thiệu về Liposome .....</i>	<i>10</i>
<i>1.3.2. Các phương pháp tổng hợp liposome vận chuyển thuốc .....</i>	<i>14</i>
<i>1.3.3. Các ứng dụng của liposome trong vận chuyển thuốc hướng đích ...</i>	<i>16</i>
<b>1.4. Giải phóng thuốc khỏi Endosome.....</b>	<b>17</b>
<i>1.4.1. Giới thiệu quá trình Endosome.....</i>	<i>17</i>
<i>1.4.2. Giới thiệu về polymer thay đổi điện tích.....</i>	<i>18</i>
<i>1.4.3. Cơ chế giải phóng khỏi endosome của polymer thay đổi điện tích ...</i>	<i>18</i>
<b>Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Đối tượng nghiên cứu.....</b>	<b>21</b>
<i>2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....</i>	<i>21</i>
<i>2.1.2. Vật liệu, hoá chất và dung môi nghiên cứu.....</i>	<i>21</i>
<b>2.2. Phương pháp nghiên cứu.....</b>	<b>22</b>
<i>2.2.1. Phân lập a-Mangostin từ vỏ quả măng cụt.....</i>	<i>22</i>

2.2.1.1. Xây dựng quy trình tiền xử lý nguyên liệu.....	22
2.2.1.2. Xây dựng quy trình chiết xuất, phân lập hợp chất $\alpha$ -Mangostin .....	23
2.2.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ đến hiệu suất quá trình chiết xuất $\alpha$ -Mangostin.....	24
2.2.1.4. Xác định $\alpha$ -Mangostin bằng các phương pháp phổ.....	24
<b>2.2.2. Tổng hợp Polymer thay đổi điện tích.....</b>	<b>25</b>
2.2.2.1. Tổng hợp N- Succinimidyl Tocopheryl Succinate .....	25
2.2.2.2. Tổng hợp Poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) (PBLA) .....	25
2.2.2.3. Tổng hợp Poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) Tocopherol ( PPLA -Toc).....	25
2.2.2.4. Tổng hợp Pasp(DET)-Toc .....	26
2.2.2.5. Tổng hợp PAsp(DET-Cit)-Toc .....	26
<b>2.2.3. Tổng hợp liposome chứa <math>\alpha</math> -Mangostin có CCP.....</b>	<b>27</b>
2.2.3.1. Tổng hợp Liposome chứa $\alpha$ -Mangostin có CPP .....	27
2.2.3.2. Xác định đặc điểm hóa lý của hệ liposome theo phương pháp đo tán xạ ánh sáng động (DLS).....	27
2.2.3.3. Xác định hiệu suất bao gói và hàm lượng thuốc .....	28
2.2.3.4. Xác định tốc độ giải phóng.....	28
<b>2.2.4. Đánh giá độc tính tế bào của CCP-Liposome .....</b>	<b>29</b>
2.2.4.1. Đánh giá độc tính tế bào.....	29
2.2.4.2. Xác định khả năng giải phóng thuốc khỏi endosome .....	29
<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ đến hiệu suất chiết xuất.....</b>	<b>30</b>
3.1.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu tới hiệu suất chiết xuất	30
3.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tới hiệu suất chiết xuất.....	31
3.1.3. Ảnh hưởng của công suất siêu âm tới hiệu suất chiết xuất.....	33

3.1.4.	<i>Ảnh hưởng của thời gian chiết xuất tới hiệu suất chiết xuất</i> .....	35
3.1.5.	<i>Xây dựng quy trình chiết xuất và phân lập <math>\alpha</math>-Mangostin ở điều kiện tối ưu</i> .....	37
3.1.6.	<i>Xác định cấu trúc hoạt chất <math>\alpha</math>-Mangostin thu được</i> .....	39
3.2.	<b>Kết quả tổng hợp Polymer thay đổi điện tích</b> .....	43
3.2.1.	<i>Tổng hợp N- Succinimidyl Tocopheryl Succinate</i> .....	43
3.2.2.	<i>Tổng hợp PBLA</i> .....	44
3.2.3.	<i>Tổng hợp PBLA -Toc</i> .....	48
3.2.4.	<i>Tổng hợp PAsp(DET)-Toc</i> .....	51
3.2.5.	<i>Tổng hợp PAsp(DET-Cit) – Toc</i> .....	52
3.3.	<b>Tổng hợp và đặc điểm của CCP- Liposome</b> .....	53
3.4.	<b>Tỷ lệ giải phóng và hiệu suất bao gói của CCP-Liposome</b> .....	56
3.5.	<b>Khả năng giải phóng thuốc khỏi thể nội bào (endosome)</b> .....	57
3.6.	<b>Độc tính tế bào in vitro</b> .....	59
	<b>KẾT LUẬN</b> .....	61
	<b>KIẾN NGHỊ</b> .....	62
	<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ</b> .....	63
	<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	64

**DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT**

Ký hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
DDS	Drug delivery system	Hệ thống dẫn truyền thuốc
GSH	Glutathione	
CMC	carboxymethyl CS	
CS	Chitosan	
NP	Nanoparticle	
MtNP		Hạt nano kim loại
Tz	Trastuzumab	
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholine	
CHCL3	Chloroform	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	
FBS	Fetal Bovine Serum	
PS	Penicillin-Streptomycin	
NHS	N-hydroxysuccinimide	
DMF	N,N-dimethylformamide	
DCM	Dicloromethane	
MeOH	Methanol	
DET	Diethylenetriamine	
NMP)	N-methyl-2-pyrrolidone	
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride	
BLA–NCA	Benzyl-L-aspartate N-carboxy-anhydride	
Lec	Lecithin	Lecithin đậu nành
Toc	Tocopherol	
HepG2		Tế bào ung thư gan
HPL	High-Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
EtOAc	Ethyl acetate	
TLC		Sắc ký lớp mỏng
PBLA	Poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate	
PPLA -Toc	Poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) Tocopherol	
CCP	CCP–liposome	
DLS	Đo tán xạ ánh sáng động	
MTT	MTT Assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	



**DANH MỤC CÁC BẢNG**

<i>Bảng 3. 1: Kết quả khảo sát tỷ lệ dung môi/nguyên liệu chiết xuất đến hiệu suất thu hồi <math>\alpha</math> – mangostin và hàm lượng cao chiết tổng .....</i>	<i>30</i>
<i>Bảng 3. 2: Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết xuất đến hiệu suất thu hồi <math>\alpha</math> – Mangostin và hàm lượng cao chiết tổng.....</i>	<i>32</i>
<i>Bảng 3. 3: Kết quả khảo sát công suất siêu âm đến hiệu suất thu hồi <math>\alpha</math>-mangostin và hàm lượng cao chiết tổng.....</i>	<i>33</i>
<i>Bảng 3. 4: Kết quả khảo sát thời gian chiết xuất đến hiệu suất thu hồi <math>\alpha</math> – Mangostin và hàm lượng cao chiết tổng.....</i>	<i>35</i>
<i>Bảng 3. 5: Dữ liệu phổ <math>^1H</math> và <math>^{13}C</math>-NMR của <math>\alpha</math>-Mangostin trong dung môi <math>CDCl_3</math>.....</i>	<i>42</i>
<i>Bảng 3. 6: Tổng hợp PBLA polymers.....</i>	<i>46</i>
<i>Bảng 3. 7: Tổng hợp PBLA-Toc .....</i>	<i>50</i>

## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1. 1: Hoạt chất $\alpha$ -Mangostin.....	3
Hình 1. 2: Các hạt nano vận chuyển thuốc.....	5
Hình 1. 3: Cấu trúc của Liposome.....	11
Hình 1. 4: Cấu trúc màng lipid của Liposome tương đồng với cấu trúc màng..	12
Hình 1. 5: Khả năng tập trung tại mô đích của Liposome dựa trên hiệu ứng EPR .....	13
Hình 1. 6: Sự khác biệt giữa mạch máu ở mô bình thường và mô ung thư.....	14
Hình 2. 1: Vỏ quả măng cụt.....	21
Hình 2. 3: Sơ đồ quy trình tiền xử lý nguyên liệu.....	22
Hình 2. 4: Sơ đồ quy trình chiết xuất, phân lập hợp chất $\alpha$ -Mangostin.....	23
Hình 3. 1: Phổ $^{13}\text{C}$ -NMR của $\alpha$ -Mangostin trong dung môi $\text{CDCl}_3$ .....	40
Hình 3. 2: Phổ $^1\text{H}$ -NMR của $\alpha$ -Mangostin trong dung môi $\text{CDCl}_3$ .....	41
Hình 3. 3: Tổng hợp N-Succinimidyl Tocopheryl succinate.....	43
Hình 3. 4: Phổ $^1\text{H}$ -NMR của Tocopheryl succinate (A) và N-Succinimidyl Tocopheryl succinate (B) trong $\text{CDCl}_3$ ở $25^\circ\text{C}$ .....	44
Hình 3. 5: Tổng hợp PBLA thông qua polymer hóa mở vòng của BLA-NCA....	44
Hình 3. 6: Theo dõi quá trình polymer hóa thông qua các đỉnh đặc trưng của BLA-NCA bằng phép đo IR.....	45
Hình 3. 7: (A) Phổ $^1\text{H}$ NMR của PBLA (DP = 20) trong $\text{DMSO}-d_6$ ở $80^\circ\text{C}$ và (B) phép đo sắc ký thẩm thấu gel-GPC.....	46
Hình 3. 8: Phổ $^1\text{H}$ NMR của PBLA trong $\text{DMSO}-d_6$ ở $80^\circ\text{C}$ và phép đo sắc ký thẩm thấu gel-GPC với DP = 32 (A), DP = 73 (B), DP = 106 (C).....	48
Hình 3. 9: Tổng hợp PBLA-Toc thông qua liên kết amide.....	48
Hình 3. 10: Phổ $^1\text{H}$ NMR của PBLA (DP = 20) trong $\text{DMSO}-d_6$ ở $80^\circ\text{C}$ (A) và phép đo GPC (B).....	49
Hình 3. 11: Phép đo sắc ký thẩm thấu gel-GPC của PBLA-Toc với các DP khác nhau (32, 73, 106).....	50
Hình 3. 12: Tổng hợp PAsp(DET)-Toc thông qua phản ứng amin hóa với DET .....	51
Hình 3. 13: Phổ $^1\text{H}$ NMR của PAsp(DET)-Toc (DP = 20) trong $\text{D}_2\text{O}$ ở $80^\circ\text{C}$ (A) và biểu đồ HPLC (10 mM AcOH, nhiệt độ $25^\circ\text{C}$ , pH 4,7, 2 mg/ml, phát hiện RI và UV) (B).....	52
Hình 3. 14: Tổng hợp PAsp(DET-Cit)-Toc.....	52
Hình 3. 15: Phổ $^1\text{H}$ NMR của PAsp(DET-Cit)-Toc (DP = 20) trong $\text{D}_2\text{O}$ ở $80^\circ\text{C}$ .....	53
Hình 3. 16: (A) Phân bố điện tích bề mặt được thể hiện thông qua kích thước, PDI và thế zeta của CCP-liposome và (B) Hình ảnh CCP-liposome chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) ở các độ phóng đại khác nhau. Thanh tỷ lệ chỉ ra kích thước 500 nm.....	54

<i>Hình 3. 17: Đánh giá tính ổn định của CCP–liposome trong vòng 35 ngày bằng cách theo dõi sự thay đổi về kích thước trung bình và chỉ số đa phân tán (PDI).</i>	54
<i>Hình 3. 18: Kiểm tra sự thay đổi kích thước và thế zeta của CCP–liposome trong các dung dịch có pH khác nhau trong khoảng thời gian 5 giờ. Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (SD) (n = 3).</i>	55
<i>Hình 3. 19: Khả năng giải phóng thuốc</i>	57
<i>Hình 3. 20: CLSM được sử dụng để theo dõi sự di chuyển nội bào của liposome và CCP–liposome. Cyanine 3 (màu đỏ) được sử dụng để hiển thị hình ảnh, trong khi nhân tế bào được nhuộm với Hoechst 33342 (màu xanh lam). Thanh tỷ lệ biểu thị kích thước 20 <math>\mu\text{m}</math>.</i>	58

## DANH MỤC CÁC ĐỒ THỊ

<i>Đồ thị 3. 1: Kết quả khảo sát tỷ lệ dung môi/nguyên liệu chiết xuất đến hiệu suất thu hồi <math>\alpha</math> – mangostin và hàm lượng cao chiết tổng.....</i>	31
<i>Đồ thị 3. 2: Kết quả khảo sát tỷ lệ dung môi/nguyên liệu chiết xuất đến hiệu suất thu hồi <math>\alpha</math> – Mangostin và hàm lượng cao chiết tổng .....</i>	33
<i>Đồ thị 3. 3: Kết quả khảo sát công suất siêu âm đến hiệu suất thu hồi <math>\alpha</math>-mangostin và hàm lượng cao chiết tổng.....</i>	34
<i>Đồ thị 3. 4: Kết quả khảo sát thời gian chiết xuất đến hiệu suất thu hồi <math>\alpha</math> – Mangostin và hàm lượng cao chiết tổng.....</i>	36
<i>Đồ thị 3. 5: Biểu thị khả năng tải thuốc, hiệu suất bao gói và khả năng nhả thuốc của CCP-Liposome .....</i>	56
<i>Đồ thị 3. 6: Khả năng sống sót của tế bào bệnh.....</i>	60

## DANH MỤC SƠ ĐỒ

<i>Sơ đồ 3. 1: Quy trình chiết xuất và phân lập <math>\alpha</math> – Mangostin ở điều kiện tối ưu .....</i>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
--	-------------------------------------

## MỞ ĐẦU

Theo thống kê của tổ chức Y tế thế giới (WHO), trên thế giới hiện nay có trên 14 triệu người mắc ung thư và số người tử vong hàng năm do ung thư là 8,2 triệu người/năm. Việt Nam hiện nay là một trong những nước có tốc độ mắc ung thư ngày càng cao với trung bình mỗi ngày có trên 300 người chết vì ung thư. Cùng với sự phát triển của các phương pháp điều trị ung thư mới sử dụng các kỹ thuật và thiết bị hiện đại, các thuốc & chế phẩm điều trị, hỗ trợ điều trị và phòng ngừa ung thư mới luôn là yêu cầu cấp thiết được đặt ra cho các nhà nghiên cứu. Trong đó, cả hai hướng nghiên cứu là tìm kiếm các hoạt chất mới và nghiên cứu phát triển các dạng bào chế dựa trên các vật liệu khác nhau luôn là hướng nghiên cứu được ưu tiên hàng đầu.

Trong lĩnh vực nghiên cứu tìm kiếm, phát triển các hoạt chất có hiệu lực phòng ngừa và điều trị các bệnh ung thư ở Việt Nam trong những năm qua có những bước phát triển nhất định. Từ các nguồn nguyên liệu thiên nhiên và tổng hợp, đã phát hiện được hàng ngàn hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào, có tiềm năng phát triển thành nguyên liệu để sản xuất các sản phẩm điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư. Trong lĩnh vực phát triển các thuốc generic, Việt Nam đã sản xuất thành công ở quy mô pilot một số các thuốc chống ung thư hàng đầu thế giới như taxol, taxotere, vinblastin ... Theo xu hướng này, các nhà khoa học Việt Nam hiện nay tiếp tục các nghiên cứu tìm kiếm để phát hiện các hoạt chất mới có tác dụng phòng ngừa và hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư.

Tại Việt Nam công nghệ nano còn là một lĩnh vực còn khá mới mẻ nhưng đã thu hút được sự quan tâm của khá nhiều nhà khoa học và đã thu được một số thành tựu trong trong các ngành vật liệu điện tử, quang điện tử, vật liệu từ... Tuy vậy, ứng dụng trong lĩnh vực Sinh học và Y học, công nghệ Nano vẫn còn khá mới mẻ và được quan tâm nghiên cứu cách đây chưa lâu (2010 đến nay) trong một số chương trình Nhà nước (như đề tài NCCB, NCCB định hướng ứng dụng, các chương trình KC như KC 02, KC04, KC 10...). Những nghiên cứu này tập trung phần lớn theo hướng vận chuyển thuốc đến các tế bào bệnh ở mức phân tử, trong đó việc tận dụng hạt nano làm "vật tải" trong việc mang thuốc và nhả thuốc đúng "địa chỉ" trở thành hướng nghiên cứu "nóng" trong nghiên cứu phát triển thuốc chống ung thư thế hệ mới.

Đi theo hướng nghiên cứu này chúng ta có thể mạnh dạn đề xuất một số ý tưởng nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano liposome để cải thiện khả năng hấp thu một số hoạt chất có hoạt tính sinh học cao nhưng khả năng hấp thu vào cơ thể lại rất thấp do đặc tính kỵ nước, khó hòa tan trong nước. Chính vì vậy, trong đề tài này, chúng tôi tiến hành “Nghiên cứu liposome hóa hoạt chất  $\alpha$ -Mangostin và đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư”

Mục đích nghiên cứu:

- Phân lập thành công hoạt chất  $\alpha$ -Mangostin từ vỏ quả măng cụt với hiệu suất tối ưu.
- Tổng hợp Charge Conversion Polymer
- Tổng hợp được hệ liposome mang  $\alpha$ -mangostin có Charge Conversion Polymer và nghiên cứu đặc điểm của hệ.
- Thử nghiệm đánh giá được khả năng điều trị ung thư của hệ liposome mang  $\alpha$ -mangostin thông qua thử nghiệm *in vitro*.

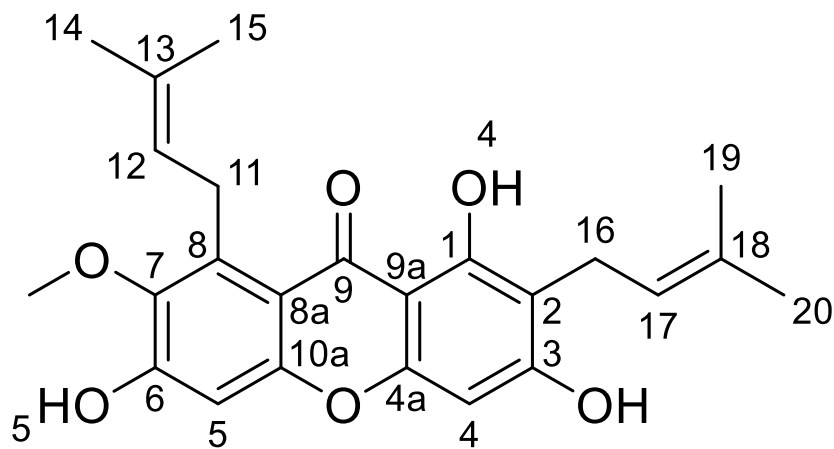
Nội dung nghiên cứu:

1. Xây dựng quy trình chiết xuất và phân lập hợp chất  $\alpha$ -Mangostin ở điều kiện tối ưu.
2. Tổng hợp Charge Conversion Polymer
3. Tổng hợp Liposome chứa  $\alpha$ -Mangostin có gắn CCP và đánh giá hệ
4. Đánh giá độc tính tế bào ung thư của liposome chứa  $\alpha$ -mangostin có gắn CCP

## Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. Giới thiệu chung về $\alpha$ -Mangostin

$\alpha$ -Mangostin là một trong những dẫn xuất xanthone có trong vỏ của *Garcinia mangostana* L. – cây măng cụt được trồng chủ yếu ở Thái Lan, Việt Nam, Indonesia và các nước nhiệt đới khác. Hợp chất này đóng vai trò chính trong hầu hết các hoạt động sinh học của *Garcinia mangostana* được sử dụng rộng rãi trong các loại thuốc cổ truyền. Trước đây, nhiều nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* đã chứng minh rằng  $\alpha$ -mangostin có nhiều lợi ích tới sức khỏe và  $\alpha$ -Mangostin được biết đến nhiều nhất trong việc chống ung thư.



**Hình 1. 1:Hoạt chất  $\alpha$ -Mangostin**

$\alpha$ -Mangostin có công thức phân tử là  $C_{24}H_{26}O_6$  và cấu trúc xanthone với một nhóm methoxy tại C7 và ba nhóm hydroxy tại C1, C3, C6. Cấu trúc này là cơ sở cho hoạt tính sinh học mạnh mẽ của hợp chất trong việc ức chế các gốc tự do và các quá trình viêm nhiễm liên quan đến ung thư.

Hàm lượng  $\alpha$ -Mangostin trong vỏ măng cụt dao động từ 5-10% khối lượng khô, và một số giống măng cụt có thể đạt đến 17% hàm lượng [1].

Quy trình chiết xuất  $\alpha$ -Mangostin phổ biến nhất là sử dụng dung môi ethanol hoặc methanol. Quy trình bắt đầu bằng việc rửa sạch, làm khô và nghiền nhỏ vỏ măng cụt thành bột mịn. Bột này sau đó được ngâm trong dung môi ethanol ở nhiệt độ khoảng  $60^{\circ}C$ , với thời gian chiết xuất tối ưu khoảng 1 giờ. Dịch chiết sau đó được lọc để loại bỏ bã, và cô đặc để thu được  $\alpha$ -Mangostin tinh khiết. Các điều kiện như tỷ lệ dung môi/dược liệu và thời gian chiết xuất có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu hồi  $\alpha$ -Mangostin. Nghiên cứu của Huỳnh Thị Như Quỳnh và cộng sự (2024) cho thấy việc sử dụng ethanol 90%, tỷ lệ dung môi/dược

liệu là 8:1, nhiệt độ chiết xuất ở mức 60°C và thời gian chiết xuất 1 giờ giúp tăng hiệu suất chiết xuất lên đến 85,01% [2]. Việc tối ưu hóa quy trình không chỉ nâng cao hiệu suất mà còn giảm thiểu chi phí, cho phép ứng dụng  $\alpha$ -Mangostin trong các sản phẩm chăm sóc sức khỏe với mức giá hợp lý.

Về ứng dụng y học,  $\alpha$ -Mangostin đã được thử nghiệm trên các dòng tế bào ung thư như ung thư gan, phổi, và đặc biệt là ung thư vú. Nghiên cứu tiền lâm sàng cho thấy  $\alpha$ -Mangostin có thể ức chế tăng sinh tế bào ung thư vú MCF-7 với hiệu quả lên đến 70% ở liều điều trị tiêu chuẩn [3]. Thử nghiệm trên chuột cho thấy  $\alpha$ -Mangostin giảm kích thước khối u trung bình 40-50% sau 4 tuần sử dụng với liều 20 mg/kg [4], cho thấy tiềm năng lớn trong điều trị ung thư.

Tuy nhiên,  $\alpha$ -Mangostin cũng gặp phải một số hạn chế. Độ tan trong nước của hợp chất rất thấp (khoảng 0.05 mg/mL), gây khó khăn trong việc hấp thu qua đường tiêu hóa và dẫn đến khả năng sinh khả dụng kém trong cơ thể [5]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng việc sử dụng  $\alpha$ -Mangostin ở liều cao có thể gây độc tính cho gan và thận, đồng thời một số dòng tế bào ung thư có thể phát triển cơ chế kháng lại  $\alpha$ -Mangostin sau thời gian dài điều trị [6].

## **1.2. Hệ thống dẫn truyền thuốc (Drug delivery system - DDS)**

### **1.2.1. Giới thiệu chung về DDS**

Hệ thống dẫn truyền thuốc (Drug delivery system - DDS) là một cơ chế giúp cung cấp thuốc vào cơ thể thông qua các con đường khác nhau như miệng, tiêm, hít, hoặc tiêm trực tiếp vào vùng bị ảnh hưởng. Đây là một công nghệ quan trọng trong lĩnh vực y tế và được sử dụng rộng rãi trong điều trị các bệnh lý khác nhau.

Các hệ thống cung cấp thuốc có thể được thiết kế để cung cấp thuốc ở dạng rải rác hoặc lỏng thông qua đường miệng hoặc tiêm trực tiếp vào cơ thể. Các hệ thống này có thể được tùy chỉnh để cung cấp liều thuốc chính xác vào thời điểm và vị trí cần thiết, giúp giảm thiểu tác dụng phụ và tăng hiệu quả điều trị. Một số hệ thống cung cấp thuốc phổ biến bao gồm: thuốc dạng viên, thuốc tiêm, thuốc bột hít và thuốc da. Các hệ thống này có thể được thiết kế để cung cấp thuốc trong khoảng thời gian ngắn hoặc dài hạn, tùy thuộc vào mục đích điều trị [7].



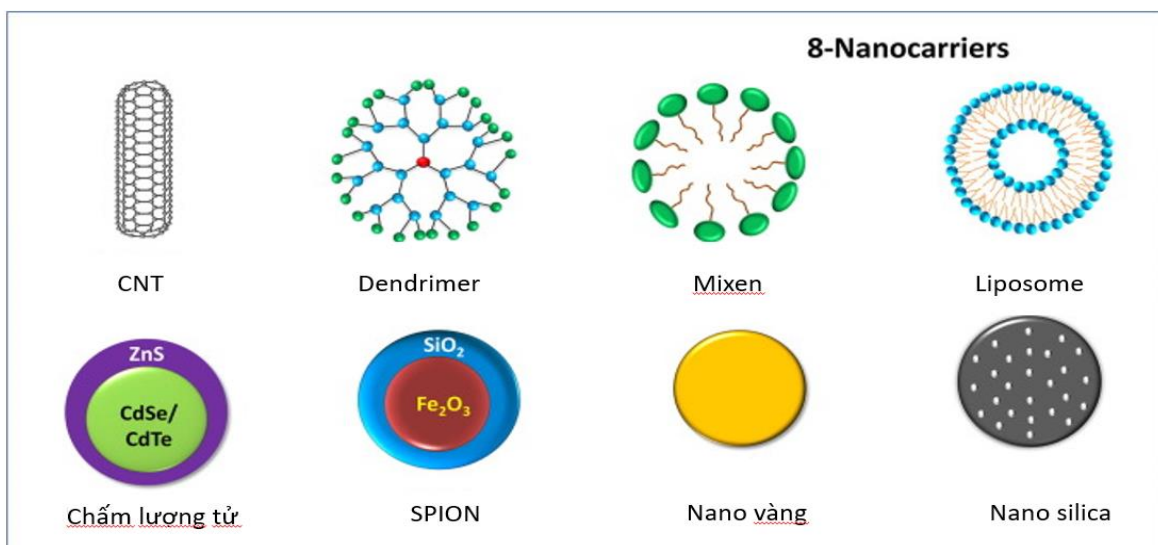
Hiện nay, hệ thống dẫn truyền thuốc hướng đích đã trở thành một công nghệ quan trọng trong việc điều trị nhiều bệnh lý khác nhau như ung thư, tiểu đường, bệnh tim mạch và bệnh Parkinson. Nó đã giúp cải thiện chất lượng cuộc sống của nhiều bệnh nhân và là một phần không thể thiếu trong lĩnh vực y tế [8].

### 1.2.2. Một số hệ dẫn truyền thuốc

Hệ thống vận chuyển thuốc nano được chia thành nhiều loại khác nhau dựa trên điểm xuất phát sử dụng thuốc như mắt, mũi, miệng, da hoặc mục tiêu phân phối thuốc trực tiếp hay gián tiếp. Các hệ thống vận chuyển thuốc được ứng dụng nhiều nhất là liposome, mixen, dendrimer, hạt nano silica, hạt nano vàng, hạt nano oxit sắt siêu thuận từ (SPION), ống nano carbon và hạt lượng tử [9]. Tùy vào các đặc tính khác nhau của mỗi hợp chất có hoạt tính sinh học mà các hệ thống phân phối thuốc phù hợp được cân nhắc và sử dụng.

#### *Hạt nano phi kim*

Silic và cacbon là những phi kim gắn liền với đời sống con người. Do các đặc tính vật lý/hóa học cũng như lợi thế về chi phí thấp và khả năng tương thích sinh học cao, chúng có thể được sử dụng để tạo ra các chất mang nano giúp chẩn đoán và điều trị ung thư [10]. Những năm gần đây, các NP phi kim loại như NP silicon (SiNP), SiNP xốp (PSiNP), graphene và graphene oxide (GO) đã nổi lên như một lĩnh vực mới, đặc biệt là để phát triển các hệ thống phân phối thuốc trong điều trị ung thư [11].



**Hình 1. 2: Các hạt nano vận chuyển thuốc**

### ***Hạt nano kim loại***

Kim loại là các nguyên tố tự nhiên trên Trái đất được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như công nghiệp, nông nghiệp, y học và cuộc sống hàng ngày của chúng ta. Về vật liệu nano, kim loại cũng đã được sử dụng để tổng hợp các hạt nano kim loại (MtNP) [12]. AgNP, AuNP, ZnONP, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NP, CuONP và Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NP là những vật liệu phổ biến nhất được sử dụng để tổng hợp MtNP [13]. MtNP, không chỉ có các đặc tính hóa lý đặc trưng của riêng chúng mà còn chứa các đặc tính kháng khuẩn, chống ung thư, xúc tác, quang học, điện tử và từ tính; đã được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực khác nhau như sinh học, thực phẩm, nông nghiệp, kỹ thuật, điện tử, mỹ phẩm và y học; và cũng đã được sử dụng trong thực phẩm và các thiết bị y sinh [14]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng AgNP và AuNP được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu ung thư vì tính gây độc tế bào của chúng [15]. Ngoài việc được sử dụng một mình, các NP này cũng có thể kết hợp với các chất phân tử sinh học như peptide, kháng thể và DNA/RNA hoặc oligonucleotide, v.v. [16]. Zhou và cộng sự (2016) đã nghiên cứu các đầu dò nano AgNPs@MnO<sub>2</sub>-DOX-Apt dựa trên AgNPs@MnO<sub>2</sub> nạp DOX được biến đổi bằng aptamer (Apt) AS1411 (một aptamer (Apt) giàu phosphodiester giàu G có khả năng chống tăng sinh) có thể nhắm mục tiêu nucleolin trên bề mặt của các tế bào HeLa [17]. Sau khi được đưa vào tế bào, AgNPs@MnO<sub>2</sub>-DOX-Apt có thể giải phóng AgNPs và DOX thông qua glutathione (GSH) khử MnO<sub>2</sub> thành Mn<sup>+2</sup>. Nghiên cứu cho thấy rằng cả AgNP và DOX đều có thể gây độc tế bào và xác minh rằng độc tính chủ yếu là do quá trình chết theo chương trình của các loại oxy phản ứng (ROS) gây ra từ ty thể. So với AgNPs@MnO<sub>2</sub>-Apt và MnO<sub>2</sub>-DOX-Apt, AgNPs@MnO<sub>2</sub>-DOX-Apt có hiệu quả điều trị mạnh hơn do sự hiệp lực của AgNPs và DOX.

### ***Hạt nano từ polymer tự nhiên***

Glycan (chitosan) hoặc protein (albumin và ferritin) là vật liệu phân tử tự nhiên thường được sử dụng để tạo ra các chất mang vận chuyển [10]. Chitosan (CS), một dẫn xuất của chitin, là một polyme sinh học tự nhiên có khả năng tương thích sinh học, khả năng phân hủy sinh học, không độc hại, hoạt tính kháng khuẩn, khả năng chữa lành vết thương và đặc tính chống ung thư [11]. Do những đặc tính này, nó có nhiều ứng dụng như vật liệu sinh học cho kỹ thuật mô và chữa

lành vết thương, và là chất mang để vận chuyển thuốc, gen và polypeptide [13]. Tuy nhiên, khả năng hòa tan kém của CS trong nước làm hạn chế ứng dụng của nó. Để khắc phục khiếm khuyết này, các nhóm chức của CS đã được biến đổi bởi các nhóm hydroxyl và amino để tạo thành các dẫn xuất của CS như carboxymethyl CS (CMC) giúp cải thiện khả năng hòa tan của CS bằng cách carboxymethyl hóa như một biến đổi ưa nước có nhiều ứng dụng y sinh như chữa lành vết thương, hình ảnh sinh học, kỹ thuật mô và phân phối thuốc/gen [14]. Hơn nữa, các NP CMC đã thu được bằng liên kết ngang ion của CMC với TPP hoặc  $\text{CaCl}_2$  [15]. Các NP được điều chế bởi các dẫn xuất CS và CS thường có điện tích bề mặt dương và đặc tính kết dính niêm mạc có thể bám vào màng nhầy và giải phóng lượng thuốc một cách bền vững [16]. Các NP dựa trên CS có nhiều ứng dụng khác nhau trong việc cung cấp thuốc ngoài đường tiêu hóa để điều trị ung thư. Các NP CS cũng thể hiện khả năng giải phóng thuốc phụ thuộc vào pH do khả năng hòa tan của CS. Các dẫn xuất CS làm thay đổi quá trình giải phóng thuốc từ các NP, đủ khả năng giải phóng thuốc có thể điều chỉnh được và tác động đến đặc tính dược động học của thuốc được nạp [10]. Để cải thiện hơn nữa hiệu quả phân phối và tính đặc hiệu của bệnh ung thư, người ta đã nhấn mạnh vào việc phát triển các NP dựa trên CS với khả năng nhắm mục tiêu khối u tích cực. Nhắm mục tiêu tích cực có thể đạt được bằng cách chức năng hóa CS và các dẫn xuất của nó với các phối tử nhắm mục tiêu khối u, chẳng hạn như axit folic (FA), kháng thể, peptide, biotin và avidin, có thể nhận biết và liên kết với các thụ thể cụ thể dành riêng cho tế bào ung thư [11]. FA-OCMCS có thể xây dựng một hệ thống phân phối RNA can thiệp nhỏ (siRNA) thông qua tương tác tĩnh điện cùng với N-2-HACC. N-2-HACC có thể đóng gói siRNA một cách hiệu quả vào FA-OCMCS, phù hợp cho quá trình nội hóa tế bào. Ở đây, các NP FA-OCMCS/N-2-HACC/siSTAT3 của hệ thống nhắm mục tiêu kép được chuẩn bị bằng cách tự lắp ráp điện tử bao gồm OCMCS liên hợp FA và N-2-HACC/siSTAT3, nhắm vào các thụ thể folate được biểu hiện quá mức trên bề mặt của cả tế bào LLC và đại thực bào loại M2. Các NP gây ra quá trình chết theo chương trình của tế bào khối u và chất mang FA-OCMCS/N-2-HACC bảo vệ siSTAT3 khỏi sự thoái biến của huyết thanh [12].

### *Exosomes*

Exosome là các túi ngoại bào được tiết ra bởi các tế bào động vật có vú. Chúng bao gồm một màng tế bào lớp kép phospholipid, là các cấu trúc hình cốc có kích thước nano (50 đến 100 nm) dưới kính hiển vi điện tử truyền qua [7]. Có nhiều loại protein và protein phối tử được dán nhãn khác nhau trên bề mặt của exosome, bao gồm ALIX, tetraspanin (CD9, CD63, CD81), integrins và các phân tử bám dính tế bào (CAM) phản ánh nguồn gốc nội sinh của chúng, các phân tử này gắn vào và vận chuyển tải trọng của chúng tới tế bào mục tiêu [18]. Exosome có tính ổn định, khả năng tương thích sinh học, khả năng miễn dịch thấp và độc tính thấp trong lưu thông và có thể được sử dụng để nhắm mục tiêu các mô và/hoặc cơ quan bệnh dựa trên đặc tính và nguồn gốc của chúng với xu hướng tế bào cụ thể [19]. Gần đây, các NP mô phỏng sinh học exosome, được xây dựng bởi exosome dưới dạng vật liệu sinh học tự nhiên và các NP có chức năng, đã thu hút nhiều sự chú ý như một nền tảng phân phối thuốc hiệu quả [9]. Nói chung, các NP mô phỏng sinh học exosome được hợp nhất bằng các chu kỳ ép đùn vật lý hoặc đóng băng/tan băng lặp đi lặp lại, điều này có thể ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của protein trên màng exosome, gây trở ngại cho liệu pháp điều trị ung thư [7]. Ở đây, các P-SiNP phát quang đã được sử dụng để tổng hợp một tế bào khối u tương thích sinh học - các P-SiNP mô phỏng sinh học exosome (E-P-SiNP) đã được loại bỏ tế bào như một chất mang thuốc cho hóa trị liệu ung thư nhằm mục tiêu nhờ khả năng tải thuốc tuyệt vời, khả năng tương thích sinh học cao và khả năng phân hủy sinh học [19]. Có thể sử dụng các P-SiNP được nạp DOX có vỏ bọc exosome (DOX@E-P-SiNP) làm vật mang để phân phối nhắm mục tiêu DOX. Trong ống nghiệm, DOX@E-P-SiNP có thể gây ra biểu hiện thấp của protein đa kháng P-glycoprotein (P-gp), dẫn đến giảm tính lưu động của màng tế bào, giúp tăng cường khả năng lưu giữ nội bào và khả năng nhắm mục tiêu của nó đến các tế bào khối u được điều chỉnh bởi CD54 (ICAM1), làm cho chúng thể hiện sự hấp thu tế bào mạnh mẽ [9]. So với DOX hoặc DOX@P-SiNP miễn phí, DOX@E-P-SiNP có khả năng gây độc tế bào tuyệt vời hơn đối với tế bào gốc ung thư (CSC). *In vivo*, sau khi tiêm tĩnh mạch, DOX @ E-P-SiNP cho thấy sự tích lũy khối u tăng cường, sự xâm nhập của khối u và sự hấp thu tế bào phản ứng chéo của các tế bào ung thư số lượng lớn và CSC, dẫn đến làm giàu DOX tăng cường trong tổng số tế bào khối u và tế bào dân số bên, điều này có thể tiếp tục cải thiện hiệu quả chống ung thư [10].

## *Dendrimers*

Donald A Tomalia đã thành công trong việc tạo ra dendrimer poly (amidoamine) (PAMAM) đầu tiên vào năm 1979 và lần đầu tiên xuất bản tác phẩm có ảnh hưởng lớn của mình vào năm 1985 [10]. Dendrimers là một loại polyme đuôi gai tổng hợp tương đối mới với cấu trúc nano đại phân tử tổng hợp bậc thang (1–100 nm) ba chiều, phân nhánh, phân tán cao, tổng hợp từng bước [12]. Cấu trúc dendrimer đưa ra một chiến lược mới để hòa tan các thuốc không tan trong nước và có ba vị trí chính để bẫy thuốc bằng cách sử dụng các cơ chế khác nhau, bao gồm các khoảng trống (bằng bẫy phân tử), các điểm phân nhánh (bằng liên kết hydro) và các nhóm bề mặt bên ngoài (bằng điện tích– tương tác điện tích), cung cấp một thuộc tính vật chứa nano duy nhất để vận chuyển thuốc [13]. Nó cũng cung cấp một nền tảng đa trị để liên kết nhiều mục tiêu sinh học cải thiện hiệu quả điều trị, đã được sử dụng để sản xuất một loại thuốc nano mới cho các phương pháp điều trị kháng vi-rút và chống viêm [18]. Dendrimers đã được báo cáo là làm tăng khả năng thẩm thấu qua da và nhắm mục tiêu thuốc cụ thể [20]. Là một phương pháp phân phối hấp dẫn cho các chiến lược điều trị chống viêm tiềm năng, dendrimers đã phân phối thành công indomethacin qua đường thẩm thấu qua da như một chất tăng cường thẩm thấu qua da [20,21]. Tuy nhiên, về điều trị ung thư, phân phối nhắm mục tiêu dựa trên dendrimers là công cụ không thể thiếu được sử dụng rộng rãi nhất và có khả năng tương thích sinh học cao với tác dụng phụ thấp đối với tế bào bình thường, chức năng miễn dịch và các thành phần máu, đồng thời tăng cường khả năng hòa tan, ổn định và khả dụng sinh học đường uống. của các loại thuốc chống ung thư khác nhau [21]. Các dendrimer ghép với Trastuzumab (TZ) đã được tổng hợp để đạt được khả năng phân phối DTX hiệu quả đến các tế bào ung thư vú dương tính với thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì 2 (HER2) ở người, đồng thời chọn lọc hơn và có hoạt tính kháng tăng sinh cao hơn so với các tế bào âm tính HER2 [19]. So với các dendrimer không liên hợp, các dendrimer liên hợp TZ thể hiện khả năng nhắm mục tiêu mạnh hơn và quá trình nội hóa tế bào cao hơn, đồng thời độc tính tán huyết thấp hơn và thời gian bán hủy lưu thông dài hơn [19]. Hơn nữa, mức độ ROS, tiềm năng màng ty thể, phân bố chu kỳ tế bào và hoạt động của caspase 3/7, 8 và 9 của liên hợp PAMAM-DTX-TZ đã được xác định và so sánh với DTX tự

do. Những phát hiện này có thể giúp phát triển hồ sơ điều trị tốt hơn đối với bệnh ung thư vú dương tính với HER2 đối với DTX [22].

### **1.2.3. Tiềm năng ứng dụng hệ thống dẫn truyền thuốc hướng đích**

Ứng dụng của hệ thống cung cấp thuốc là rất đa dạng. Một trong những ứng dụng phổ biến nhất là điều trị ung thư. Hệ thống cung cấp thuốc giúp đưa các loại thuốc trực tiếp vào vùng ung thư, giảm thiểu tác dụng phụ của thuốc và tăng hiệu quả điều trị [21]. Các hệ thống cung cấp thuốc được sử dụng để cung cấp các loại thuốc hóa trị, bao gồm cả các loại thuốc mới như siRNA và DNAzyme, cho phép việc chế tạo thuốc trực tiếp tại vị trí bị ảnh hưởng [7].

Hệ thống cung cấp thuốc cũng được sử dụng để điều trị bệnh tiểu đường. Các loại thuốc có thể được cung cấp qua đường tiêm, dưới dạng viên, hay thông qua các thiết bị tiêm insulin tự động. Hệ thống này giúp đưa thuốc trực tiếp vào cơ thể, giảm thiểu tác dụng phụ và tăng hiệu quả điều trị [19].

Trong lĩnh vực bệnh tim mạch, hệ thống cung cấp thuốc được sử dụng để điều trị các bệnh lý như suy tim và bệnh mạch vành. Các loại thuốc có thể được cung cấp qua đường tiêm, thông qua các thiết bị tạo dòng chảy liên tục, hoặc được cung cấp qua màng nhân tạo [9]. Hệ thống này giúp đưa thuốc trực tiếp vào cơ thể và giảm thiểu tác dụng phụ của thuốc.

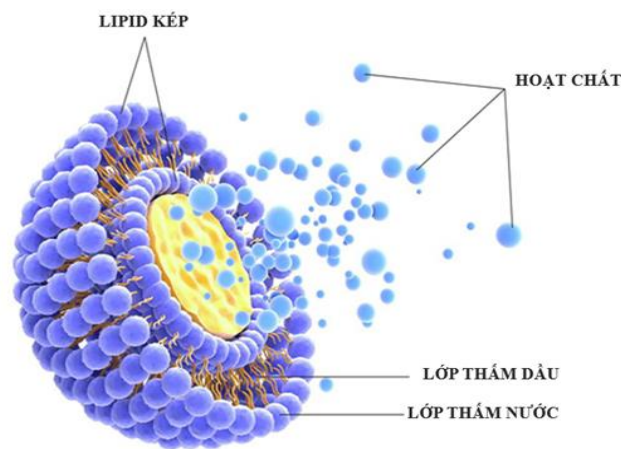
Hệ thống cung cấp thuốc cũng được sử dụng để điều trị bệnh Parkinson. Các loại thuốc có thể được cung cấp qua đường miệng hoặc qua thiết bị tiêm insulin tự động. Hệ thống này giúp đưa thuốc trực tiếp vào cơ thể và giảm thiểu tác dụng phụ của thuốc [10].

## **1.3. *Liposome vận chuyển thuốc***

### **1.3.1. *Giới thiệu về Liposome***

Liposome được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực bào chế thuốc nhờ 4 tính năng: Hòa tan hiệu quả các khoáng chất khó tan như sắt, magie, kẽm...; tăng khả năng hấp thu của màng tế bào với hoạt chất; giảm thiểu tác dụng phụ của thuốc điều trị ung thư với cơ thể; cung cấp phospholipid giúp bảo vệ dạ dày, tá tràng khỏi viêm loét [23]. Liposome được phát minh vào năm 1965 bởi nhà khoa học người Anh tên là Alec Douglas Bangham. Ban đầu, nó có cấu trúc khá đơn giản và còn nhiều khuyết điểm. Trải qua nhiều năm, công nghệ Liposome ngày càng

hoàn thiện và hiện nay, nó được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như mỹ phẩm, dược mỹ phẩm và dược phẩm [23,24]. Liposome là những hạt có cấu trúc hình cầu, bao gồm một nhân nước ở giữa, bao bọc bởi vỏ phospholipid gồm một hay nhiều lớp được mô tả lần đầu vào giữa những năm 60 bởi Bangham. Trải qua hơn 40 năm tiếp tục nghiên cứu, phát triển và cải biến dạng ban đầu, liposome ngày càng được khẳng định là một hệ mang thuốc, phân phối thuốc hàng đầu, đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành các dạng thuốc nhằm cải thiện hiệu quả điều trị.



**Hình 1. 3: Cấu trúc của Liposome**

### ***Thành phần chính của liposome***

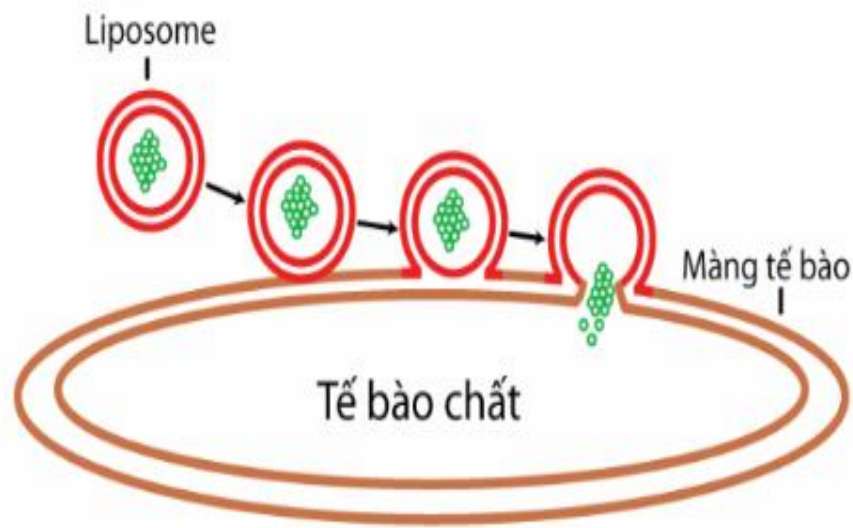
Thành phần chính của liposome bao gồm phospholipid, cholesterol và một số chất hoạt động bề mặt, có sự phù hợp sinh học cao [25].

**Phospholipid:** Chiếm tỷ lệ lớn trong thành phần cấu tạo của liposome là phospholipid. Đây là một loại lipid chứa phospho và có cấu trúc lưỡng tính bao gồm đầu phosphate ưa nước và đuôi hydrocarbon kỵ nước được liên kết với gốc alcohol. Bản chất lưỡng tính lý giải cho khả năng tự lắp ráp của phospholipid khi đưa vào phân tán trong môi trường nước, tạo thành lớp màng lipid kép, như hoá để ổn định nhũ tương. Phospholipid cũng là thành phần chính của màng tế bào. Do đó, liposome có tính tương hợp cao với tế bào và mô. Nhờ cấu trúc khép kín có một đầu ưa nước, một đầu kỵ nước mà các hợp chất này có khả năng cuộn lại thành các hạt hình cầu với cấu trúc lớp màng phospholipid kép [24].

Nguồn gốc của phospholipid được sử dụng trong các công thức tổng hợp

có thể là tự nhiên, tổng hợp hoặc bán tổng hợp. Liposome tổng hợp từ phospholipid tự nhiên thường có độ tương hợp sinh học cao hơn các loại khác [25].

Sử dụng Liposome làm hệ vận chuyển thuốc trong cơ thể là một hướng đi mới. Công nghệ Liposome được áp dụng đối với thuốc chống ung thư, các đoạn gene, protein tái tổ hợp... Nhờ đặc điểm dược động học của Liposome, các hoạt chất sẽ được vận chuyển đến tế bào đích chính xác, giúp nâng cao hiệu quả điều trị, giảm độc tính so với dạng thuốc truyền thống [26].



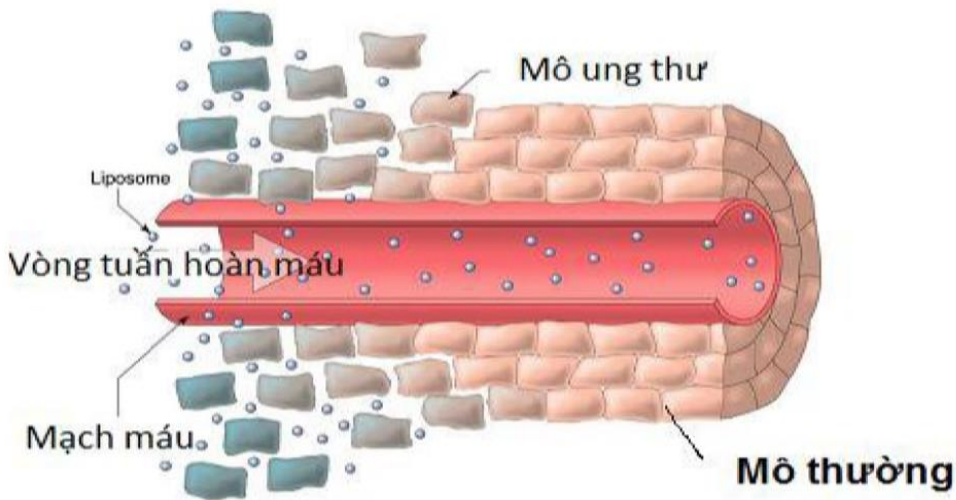
**Hình 1. 4: Cấu trúc màng lipid của Liposome tương đồng với cấu trúc màng**

Trong điều chế dược phẩm, công nghệ Liposome còn giúp các hoạt chất kém tan thẩm thấu vào thành ruột non, giúp cơ thể hấp thu nhanh và tăng hiệu quả điều trị. Sắt là một trong những chất khó tan có thể ứng dụng công nghệ Liposome, khiến người uống không cảm thấy vị tanh đặc trưng của kim loại. Ngoài ra, các hiện tượng khó chịu thường gặp khi uống viên sắt như ợ nóng, buồn nôn, táo bón... cũng giảm đáng kể [27].

Khi các phân tử này được đóng gói trong cấu trúc liposome thì sự tích tụ tại khối u tăng gấp 2-3 lần. Các thuốc được đóng gói trong liposome dễ dàng tăng khả năng tuần hoàn trong máu đồng thời tăng cường lắng đọng tại các khối u, bảo vệ thuốc tránh các quá trình chuyển hóa cũng như là phân phối thuốc đến các mô ung thư, hạn chế đến các mô lành, tăng cường hấp thụ trong các cơ quan giàu đơn

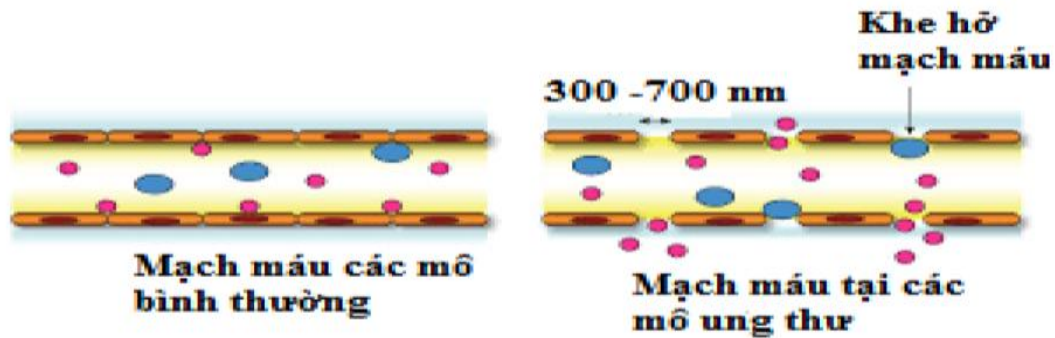


bào, đại thực bào đơn nhân và hệ thống lưới nội môi (gan, lá lách, tụy xương) và giảm hấp thu tại thận, cơ tim và não. Để đạt mục tiêu là các khối u, liposome phải tồn tại lâu trong vòng tuần hoàn máu, tiếp cận khối u theo cơ chế thụ động bằng cách đi qua các khe hở thành mạch của các mô ung thư và cuối cùng là tập trung tại các mô đích. Khả năng tập trung tại mô đích của các liposome này được gọi là hiệu ứng tăng tính thấm và tính lưu giữ (enhance permeability and retention effect- EPR) [28].



**Hình 1. 5: Khả năng tập trung tại mô đích của Liposome dựa trên hiệu ứng EPR**

Hiệu ứng EPR dựa trên sự khác biệt giữa cấu trúc của các mô ung thư và các mô thường. Các khối u thường chứa một lượng lớn các mao mạch giữa các tế bào nội mô. Các mạch máu nuôi khối u thường có hình dạng bất thường và có những khe hở. Các khe hở của lớp tế bào lót mảng trong mạch máu thường có đường kính vượt quá 400 nm. Các phân tử thuốc liposome có đường kính nhỏ hơn 400nm sẽ vượt qua được những khe hở này đi vào khối u và phóng thích thuốc. Kích thước các khe hở ở những mạch máu của các mô bình thường có đường kính nhỏ hơn 10 nm, không cho các phân tử thuốc liposome đi qua, vì vậy ngăn chặn thuốc đến các mô lành và gây hại [27]. Chính nhờ đặc tính này mà các hạt kích thước nano có thể dễ dàng thoát mạch và tích tụ tại khối u. Ngược lại các mô bình thường các tế bào nội mô kết hợp chặt chẽ dẫn đến ngăn ngừa sự khuếch tán của các hạt nano bên ngoài các mạch máu [28].



Hình 1. 6: Sự khác biệt giữa mạch máu ở mô bình thường và mô ung thư

### 1.3.2. Các phương pháp tổng hợp liposome vận chuyển thuốc

**Phương pháp hydrate hoá màng mỏng lipid:** được Alec Douglas Bangham đưa ra vào năm 1964 và là một trong những phương pháp phổ biến nhất hiện nay dùng để tổng hợp liposome. Cơ chế hình thành liposome theo phương pháp Bangham là tạo lớp màng phospholipid mỏng bằng phương pháp cô quay chân không và bao bọc lấy dược chất trong quá trình hydrat hóa. Dược chất ưa nước thì hòa vào dung môi nước, dược chất kỵ nước thì cho vào dung môi hữu cơ [23].

**Tạo màng lipid:** Hoà tan hỗn hợp lipid trong dung môi thích hợp, tỉ lệ 10 - 20 mg lipid/1 ml dung môi, sau đó bốc hơi dung môi để tạo thành màng mỏng lipid sử dụng thiết bị cô quay chân không hoặc đông khô lipid. Dược chất có thể phối hợp và hoà tan vào dung môi hữu cơ cùng với các lipid để quá trình bốc hơi dung môi cũng tạo điều kiện cho dược chất liên kết với lipid [25].

**Hydrate hoá:** Hydrate hoá lipid với môi trường hydrate, ở nhiệt độ và thời gian thích hợp, kết hợp quay tốc độ cao tăng hòa tan để tạo thành hỗn dịch liposome. Môi trường hydrate hoá tùy theo loại lipid và mục đích mang thuốc có thể là nước, dung dịch NaCl 0,9 %, dung dịch đệm (citrat, phosphat, Hespes...), dung dịch đường (glucose, dextrose, sucrose...). Môi trường hydrate hoá có thể chứa muối, chất ổn định, dược chất. Quá trình hydrate hóa nên được tiến hành ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ chuyển pha của lipid  $T_c$  khoảng  $10^\circ\text{C}$  nhằm

đảm bảo tính linh động trong quá trình sắp xếp hệ mang thuốc, thông thường từ 50ss-60 °C. Thời gian hydrate hoá phụ thuộc vào loại phospholipid [23,25].

**Phương pháp tiêm ethanol:** được Batzri và Korn mô tả năm 1973, còn được gọi là phương pháp pha loãng ethanol hay tiêm ethanol. Quy trình bào chế gồm các bước: hòa tan phospholipid và các thành phần tạo màng vào ethanol, bơm nhanh dung dịch này vào môi trường nước cất hoặc hệ đệm Tris hydrochloric, kết hợp khuấy trộn. Do thay đổi dung môi tạo thành các SUV có kích thước khoảng 25 nm. Sử dụng siêu lọc để loại ethanol và tinh chế liposome. Liposome thu được có kích thước nhỏ (30 - 110 nm) khá đồng nhất mà không phải trải qua quá trình siêu âm. Ưu điểm của phương pháp này là sử dụng dung môi không quá độc như ethanol và dễ dàng mở rộng quy mô [29].

**Phương pháp tiêm ether:** Hòa tan dược chất trong nước, đun cách thủy để duy trì nhiệt độ khoảng 55 – 65 °C. Hòa tan các thành phần tạo màng liposome vào ether hoặc diethyl ether/methanol. Bơm từ từ dung dịch ether vào dung dịch nước từ phía đáy, khi tiếp xúc với pha nước, ether bốc hơi dưới áp suất giảm tạo thành liposome không đồng nhất có kích thước 200 – 1000 nm. Phương pháp tiến hành nhanh nhưng hiệu suất tạo liposome thấp, dược chất phải tiếp xúc với nhiệt độ và dung môi, có thể ảnh hưởng tới độ ổn định của chế phẩm [25].

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

albumin. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp là tạo ra các liposome có kích thước lớn, không đồng nhất, trong quá trình bào chế sử dụng nhiều dung môi hữu cơ, cần có biện pháp loại và kiểm soát dung môi tồn dư và những khó khăn để mở rộng quy mô [30].

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

**Phương pháp siêu âm:** Liposome đa lớp kích thước lớn có thể phân chia và tái tạo thành các liposome đơn lớp kích thước nhỏ từ năng lượng siêu âm sử dụng thanh siêu âm hoặc bể siêu âm. Thanh siêu âm cho hiệu quả cao nhưng chỉ tác dụng với thể tích nhỏ và dễ làm nóng hoặc đưa tạp vào mẫu, còn bể siêu âm có thể áp dụng cho lượng lớn mẫu nhưng khó kiểm soát được kích thước và độ đồng nhất kích thước do khó kiểm soát được các thông số siêu âm [24].

**Phương pháp nén/ đẩy qua màng:** Nguyên tắc của phương pháp là đẩy liposome qua màng (polycarbonate) có kích thước lỗ xốp phù hợp. Do đó liposome đa lớp lớn có thể biến dạng và trở thành liposome đơn lớp hoặc nanoliposome tùy theo kích thước của màng. Thông thường cần đẩy nhiều chu kỳ và sử dụng màng có kích thước từ lớn đến nhỏ dần. Ở quy mô nhỏ, sử dụng thiết bị cầm tay. Với quy mô lớn, sử dụng thiết bị nén áp suất cao với khí trợ (còn gọi là đồng nhất hoá áp suất cao) dựa trên nguyên tắc sử dụng áp suất làm nhiễu loạn dòng chảy của hệ phân tán, tăng tốc độ va chạm của các giọt dẫn tới các tiểu phân được phân chia nhỏ hơn [24,28].

So sánh giữa phương pháp siêu âm và phương pháp đẩy qua màng với thể tích nhỏ cho thấy phương pháp siêu âm có thể nhanh chóng cho kích thước nhỏ, còn phương pháp đẩy qua màng cần lặp lại nhiều chu kỳ mới giảm được kích thước nhưng độ đồng nhất cao hơn. Ngoài ra, liposome có thể được đồng hóa bằng phương pháp đông lạnh - giải đông (freeze- thawed) hoặc phương pháp vi hóa lỏng (microfluidization) [28].

### 1.3.3. Các ứng dụng của liposome trong vận chuyển thuốc hướng đích

#### *Cơ chế vận chuyển hướng đích của liposome*

Liposome có thể được thiết kế để tập trung vào các tế bào đích nhờ việc gắn các ligand bề mặt, như kháng thể hoặc peptide, giúp chúng nhận diện và liên kết với các thụ thể đặc hiệu trên màng tế bào mục tiêu. Một ví dụ là liposome gắn kháng thể chống HER2, cho phép thuốc nhắm vào các tế bào ung thư vú có biểu hiện quá mức thụ thể HER2 [25].

### ***Ứng dụng liposome trong điều trị ung thư***

Các thuốc chống ung thư như doxorubicin đã được bào chế dưới dạng liposome, giúp tăng khả năng hấp thu vào các tế bào ung thư và giảm tác dụng phụ trên tế bào lành. Liposome Doxil, một sản phẩm chứa doxorubicin, cho thấy hiệu quả cao trong điều trị ung thư buồng trứng và các loại ung thư khác với ít tác dụng phụ hơn [31].

### ***Ứng dụng liposome trong điều trị các bệnh nhiễm trùng***

Liposome có khả năng cải thiện hiệu quả của kháng sinh bằng cách tăng cường khả năng thâm nhập vào các tế bào nhiễm khuẩn. Một nghiên cứu cho thấy liposome gắn amikacin, một kháng sinh điều trị nhiễm khuẩn lao, giúp tăng hiệu quả diệt khuẩn khi sử dụng với các mô phổi bị nhiễm [32].

### ***Hạn chế và hướng cải tiến của liposome***

Dù liposome có nhiều lợi ích, chúng vẫn gặp phải hạn chế về độ bền và thời gian lưu hành ngắn trong máu. Các kỹ thuật cải tiến như gắn PEG (polyethylene glycol) giúp kéo dài thời gian lưu hành của liposome và giảm sự nhận diện bởi hệ miễn dịch. Các liposome PEGylated đã cho thấy hiệu quả vượt trội trong việc phân phối thuốc hướng đích [33].

## ***1.4. Giải phóng thuốc khỏi Endosome***

### ***1.4.1. Giới thiệu quá trình Endosome***

Endosome là một bào quan nội bào quan trọng trong quá trình vận chuyển và phân loại các phân tử được tế bào hấp thu từ môi trường ngoại bào. Quá trình hình thành endosome bắt đầu từ khi các phân tử, như protein, lipid hoặc thuốc, gắn kết với các thụ thể đặc hiệu trên màng tế bào, kích hoạt quá trình nhập bào (endocytosis). Trong giai đoạn đầu, các endosome sớm hình thành từ màng tế bào, có pH tương đối trung tính (khoảng 6.0–6.5). Các endosome sớm hoạt động như một trạm phân loại, đưa một số phân tử quay trở lại màng tế bào hoặc chuyển vào các endosome muộn [25].

Khi chuyển sang giai đoạn endosome muộn, các túi này dần di chuyển sâu vào bên trong tế bào và pH của chúng giảm xuống khoảng 5.0–6.0. Cuối cùng, endosome muộn hợp nhất với lysosome – bào quan chứa enzyme tiêu hóa có pH rất thấp (4.5–5.0), để phân giải các phân tử ngoại lai và thải ra các thành phần không cần thiết hoặc gây hại cho tế bào. Đối với các hệ thống vận chuyển thuốc, quá trình chuyển đổi pH trong endosome tạo ra thách thức đáng kể vì phần lớn các loại thuốc có thể bị phân hủy hoặc bất hoạt trong môi trường axit của lysosome trước khi đạt đến đích điều trị nội bào [34]. Do đó, để tăng hiệu quả điều trị, việc phát triển các hệ thống có khả năng giải phóng thuốc khỏi endosome trước khi bị phân giải là cần thiết và là một lĩnh vực nghiên cứu quan trọng trong dược học và sinh học tế bào.

#### ***1.4.2. Giới thiệu về polymer thay đổi điện tích***

Polymer thay đổi điện tích (charge-conversion polymer - CCP) là loại polymer có khả năng thay đổi điện tích bề mặt của mình khi gặp các điều kiện pH khác nhau, đặc biệt từ pH trung tính sang pH axit. Ở pH trung tính (khoảng 7.4, như trong máu), các polymer này thường mang điện tích âm để giảm thiểu tương tác không mong muốn với các protein huyết thanh và hạn chế sự loại bỏ của hệ thống miễn dịch, giúp duy trì sự ổn định của hệ thống vận chuyển trong tuần hoàn máu. Tuy nhiên, khi vào bên trong endosome – môi trường có pH axit hơn – các nhóm chức trên polymer hấp thụ proton ( $H^+$ ), chuyển đổi polymer từ điện tích âm sang điện tích dương.

Một ví dụ điển hình là polymer PAsp(DET-Cit), trong đó các nhóm chức chứa citraconic anhydride được gắn vào chuỗi bên của polymer. Khi môi trường trở nên axit, nhóm citraconic anhydride sẽ thủy phân, giải phóng nhóm amino và làm tăng điện tích dương trên bề mặt polymer. Sự thay đổi điện tích này không chỉ làm tăng tương tác với màng endosome mà còn giúp phá vỡ màng endosome, tạo điều kiện để hệ thống giải phóng thuốc trực tiếp vào bào tương của tế bào đích [34]. Polymer chuyển đổi điện tích không chỉ có tiềm năng trong vận chuyển thuốc điều trị ung thư mà còn ứng dụng rộng rãi trong điều trị các bệnh lý đòi hỏi tính chính xác cao như điều trị gen và các bệnh tự miễn dịch.

#### ***1.4.3. Cơ chế giải phóng khỏi endosome của polymer thay đổi điện tích***

Cơ chế giải phóng thuốc khỏi endosome của polymer thay đổi điện tích dựa vào quá trình chuyển đổi điện tích bề mặt của polymer từ âm sang dương khi gặp môi trường axit trong endosome. Sau khi hệ thống vận chuyển chứa polymer thay đổi điện tích được hấp thụ vào tế bào qua quá trình nhập bào, nó sẽ được bao bọc trong các túi endosome. Trong endosome sớm, pH khoảng 6.0–6.5 giúp duy trì điện tích âm của polymer, làm giảm tương tác với màng nội bào và tránh sự tương tác không mong muốn với các cấu trúc khác trong tế bào [34].

Khi endosome chuyển sang endosome muộn và pH giảm xuống còn khoảng 5.0–6.0, các nhóm citraconic anhydride trên polymer bắt đầu thủy phân, giải phóng nhóm amino, từ đó làm tăng điện tích dương của polymer. Sự tích lũy điện tích dương trên bề mặt polymer tạo ra áp lực đẩy lên màng endosome, làm giãn nở màng và thậm chí gây ra lỗ hổng trong màng endosome. Quá trình này cho phép hệ thống vận chuyển và thuốc thoát ra khỏi endosome trước khi chúng hợp nhất với lysosome [34,25]. Điều này đặc biệt hữu ích đối với các hoạt chất như  $\alpha$ -mangostin, một hợp chất chống ung thư, giúp nó giải phóng vào môi trường bào tương để tác động lên tế bào đích mà không bị phân hủy trong môi trường axit [25].

Nghiên cứu của Tan et al. (2018) đã chứng minh rằng polymer PAsp(DET-Cit) có khả năng tạo ra sự chuyển đổi điện tích rõ rệt trong môi trường axit, giúp tăng khả năng phá vỡ màng endosome và giải phóng thuốc vào bào tương [34]. Khi pH của môi trường giảm từ 7.4 xuống 5.0, thế zeta của hệ thống chuyển đổi từ âm ( $-22.31 \pm 2.4$  mV) sang dương, tạo lực đẩy mạnh với màng endosome và gây ra sự phá vỡ màng, giúp thuốc thoát ra ngoài. Hình ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) cho thấy các hạt liposome chứa polymer PAsp(DET-Cit) có hình thái cầu ổn định trong máu, nhưng khi vào môi trường axit của endosome, hình thái và điện tích của chúng thay đổi, tạo điều kiện cho sự giải phóng thuốc [24].

Ngoài ra, các kết quả nghiên cứu khác cho thấy polymer chuyển đổi điện tích không chỉ nâng cao hiệu quả giải phóng thuốc mà còn giúp tăng cường tính ổn định của hệ thống vận chuyển trong tuần hoàn máu. Các nghiên cứu trên dòng tế bào ung thư cho thấy tỷ lệ thuốc được giải phóng từ hệ thống PAsp(DET-Cit)-Toc đạt đến 80% sau 24 giờ trong môi trường endosome mô phỏng, so với tỷ lệ chỉ 30–40% ở các polymer không có khả năng chuyển đổi điện tích [34,24]. Kết

quả này chứng minh rằng polymer PAsp(DET-Cit) có khả năng tối ưu hóa quá trình giải phóng thuốc nhờ cơ chế chuyển đổi điện tích trong môi trường axit, mở ra tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong các hệ thống vận chuyển thuốc hướng đích trong điều trị ung thư và các bệnh lý khác [28].

Polymer chuyển đổi điện tích PAsp(DET-Cit) không chỉ chứng minh tính hiệu quả trong việc giải phóng thuốc khỏi endosome mà còn đáp ứng được yêu cầu an toàn và ổn định trong cơ thể. Cơ chế chuyển đổi điện tích giúp tăng hiệu quả điều trị, giảm thiểu sự phân hủy của thuốc trong lysosome và bảo vệ các hoạt chất nhạy cảm khỏi các enzyme tiêu hóa [25,28]. Các nghiên cứu tiếp tục nhấn mạnh tiềm năng của polymer này trong việc cải thiện tính hiệu quả và an toàn cho các liệu pháp điều trị hiện đại, đặc biệt là các liệu pháp cần độ chính xác cao như điều trị gen và miễn dịch.



## Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

#### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu



*Hình 2. 1: Vỏ quả măng cụt*

- Vỏ quả măng cụt được thu thập trên thị trường, có nguồn gốc Việt Nam.

#### 2.1.2. Vật liệu, hoá chất và dung môi nghiên cứu

- Các dung môi *n*-hexane và ethyl acetate được mua từ Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), Chloroform (CHCL<sub>3</sub>), Dulbecco's Modified EagleMedium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS) và Penicillin-Streptomycin (PS) được  $\alpha$ -mangostin của Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). N-hydroxysuccinimide (NHS), *N,N*-dimethylformamide (DMF), dicloromethane (DCM), methanol

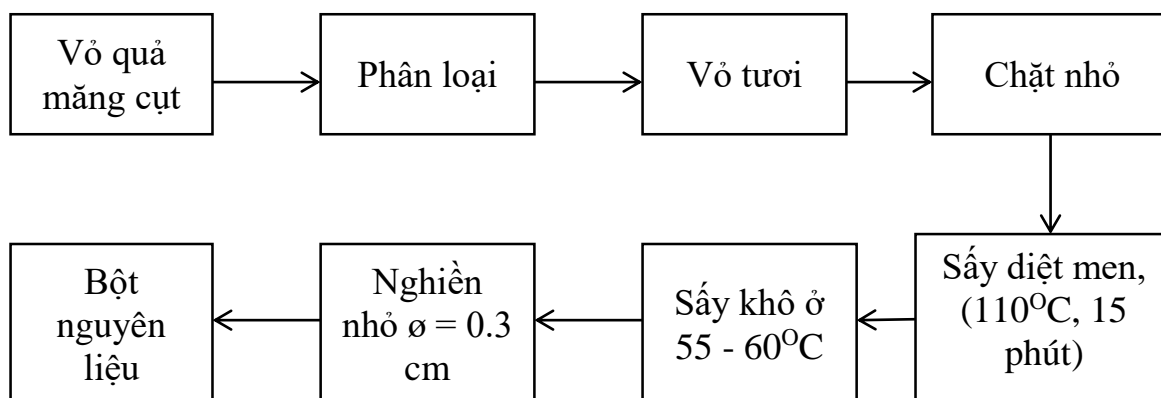
(MeOH), diethylenetriamine (DET), và *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) đều được cung cấp bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Các hóa chất khác được sử dụng đều đạt chất lượng phân tích, và các màng polycarbonate được cung cấp bởi Whatman Inc. Kính hiển vi laser đồng tiêu TCS SP5 AOBS cũng được sử dụng để quan sát và đánh giá.

- Tocopheryl succinate, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC), Benzyl-L-aspartate *N*-carboxy-anhydride (BLA–NCA), *n*-butylamine, citraconic anhydride của hãng Sigma Aldrich (Hoa Kỳ).
- Lecithin đậu nành (Lec) được tách chiết từ hạt đậu nành và Tocopherol (Toc) được  $\alpha$ -mangostin của hãng Sigma Aldrich (Hoa Kỳ). Màng polycarbonate kích thước lỗ 100 nm được cung cấp bởi Avanti® Polar Lipids (Alabaster, US).  $\alpha$ -MG được phân lập từ vỏ măng cụt trong phòng thí nghiệm. Nước cất của hãng Sartorius (Đức), màng thấm tách kích thước lỗ 14.000 Da của hãng Sigma Aldrich (Hoa Kỳ).
- Tế bào ung thư gan (HepG2) được cung cấp bởi American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA).

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phân lập $\alpha$ -Mangostin từ vỏ quả măng cụt

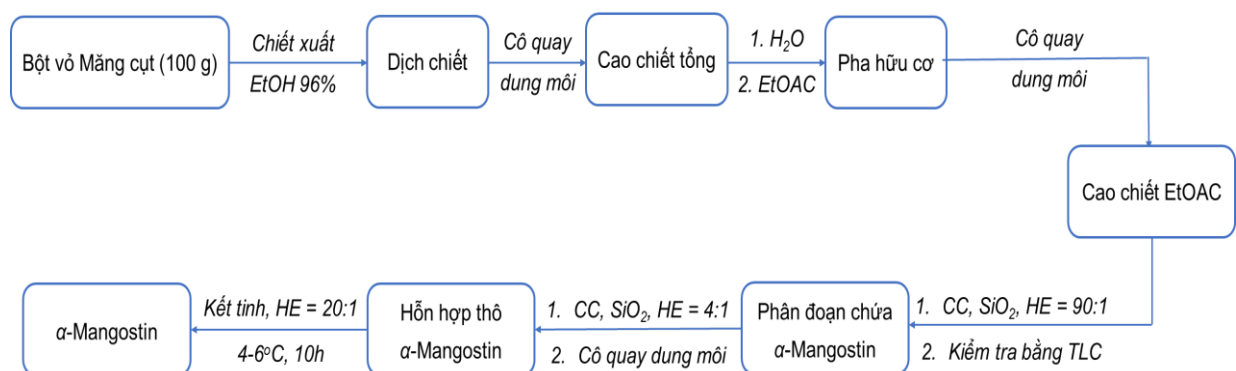
#### 2.2.1.1. Xây dựng quy trình tiền xử lý nguyên liệu



**Hình 2. 2:** Sơ đồ quy trình tiền xử lý nguyên liệu

Mẫu vỏ măng cụt sau khi được thu mua được đem xử lý trước khi chiết tách và phân lập  $\alpha$  - mangostin. Đầu tiên mẫu được phân loại để bỏ đi những phần thối hỏng, tiếp đến mẫu được rửa sạch và chặt thành từng đoạn khoảng 3-5cm. Mẫu sau đó tiếp tục được đem đi sấy khô. Giai đoạn sấy gồm 2 công đoạn, trước tiên là sấy diệt men được tiến hành trong 15 phút ở nhiệt độ  $110^{\circ}\text{C}$ . Sau đó mẫu được sấy khô ở nhiệt độ  $60 \pm 5^{\circ}\text{C}$  tới hàm ẩm nhỏ hơn 10%. Mẫu khô được đem đi nghiền bằng máy nghiền búa có đường kính lỗ sàng  $\phi = 0.3 \text{ mm}$ , ta thu được bột nguyên liệu rễ cây com rượu trái hẹp. Bột nguyên liệu này được đem đi chiết tách để thu  $\alpha$  - mangostin.

### 2.2.1.2. Xây dựng quy trình chiết xuất, phân lập hợp chất $\alpha$ -Mangostin



**Hình 2. 3: Sơ đồ quy trình chiết xuất, phân lập hợp chất  $\alpha$ -Mangostin**

Bột vỏ măng cụt thu được ở giai đoạn trước tiếp tục được mang đi chiết xuất và phân lập hợp chất  $\alpha$  - Mangostin. 100g bột nguyên liệu được chiết xuất với dung môi ethanol 96<sup>0</sup>. Sau khi chiết xuất, dịch chiết được cô quay đuổi dung môi ta thu được cao chiết. Hàm lượng  $\alpha$ -Mangostin kiểm tra bằng HPLC và hàm lượng cao chiết thu được để đánh hiệu quả chiết xuất và thực hiện tối ưu hóa các thông số công nghệ của quá trình. Cao chiết tổng này tiếp tục được hòa tan với 1 lượng tối thiểu nước, rồi chiết phân bố với EtOAc. Thu lấy pha hữu cơ. Tiến hành cô quay ở áp suất giảm ta thu được cao chiết EtOAc. Cao chiết này được tiến hành sắc ký cột gradient với hệ dung môi triển khai là *n*-hexan/EtOAc (90/1, v/v). Kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) cho đến khi trên cột không còn vết của  $\alpha$  - mangostin. Sử dụng TLC để kiểm tra các phân đoạn thu được sau khi kết thúc sắc ký cột, gom các phân đoạn có chứa  $\alpha$ -Mangostin sau đó tiến hành sắc ký cột lần 2 với hệ đẳng dung môi *n*-hexan/EtOAc (4/1). Cô quay đuổi dung môi ta thu được hỗn hợp có chứa  $\alpha$  -

Mangostin thô. Hỗn hợp này được kết tinh lại trong hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc (20/1,v/v) trong 10 giờ ở nhiệt độ 4-6<sup>0</sup>C.

### 2.2.1.3. *Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ đến hiệu suất quá trình chiết xuất $\alpha$ -Mangostin*

Các thông số công nghệ gồm nhiệt độ chiết xuất, công suất siêu âm, thời gian chiết xuất và tỷ lệ dung môi trên nguyên liệu sẽ được khảo sát đơn biến và đánh giá, lựa chọn điều kiện phù hợp bằng hàm lượng  $\alpha$ -mangostin (%) trong cao chiết và hiệu suất thu hồi cao chiết (%).

- Độ thu hồi  $\alpha$ -Mangostin được tính bằng công thức:

$$\text{Độ thu hồi } \alpha\text{-Mangostin} = \frac{\text{Tổng lượng } \alpha\text{-Mangostin trong cao chiết}}{\text{Tổng lượng } \alpha\text{-Mangostin trong dược liệu}} \times 100\%$$

- Hiệu suất chiết cao toàn phần được xác định bằng công thức:

$$\text{Hiệu suất chiết} = \frac{\text{Khối lượng cao chiết thu được}}{\text{Khối lượng dược liệu}} \times 100\%$$

Bảng kinh nghiệm chiết xuất các loại dược liệu. Ban đầu chúng tôi lựa chọn điểm gốc cho các yếu tố công nghệ như sau:

- + Nhiệt độ chiết xuất: 50<sup>0</sup>C
- + Thời gian chiết xuất: 240 phút
- + Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu: 6/1
- + Công suất siêu âm 2,5 w/cm<sup>3</sup>

Khi khảo sát sự phụ thuộc của từng biến độc lập thì các biến còn gọi được giữ cố định ở các mức gốc hoặc mức tốt nhất ở khảo sát trước đó.

### 2.2.1.4. *Xác định $\alpha$ -Mangostin bằng các phương pháp phổ*

Các hợp chất sau khi phân lập được tiến hành xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ hiện đại như phổ 1 chiều (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR) và đối chiếu với TLTK.

+ Phổ proton <sup>1</sup>H-NMR: Trong phổ <sup>1</sup>H-NMR, mỗi loại proton cộng hưởng ở một trường khác nhau từ đó dựa vào độ dịch chuyển hoá học của các proton cho biết loại proton và số lượng proton của mỗi loại [35].

+ Phổ carbon <sup>13</sup>C-NMR: Trong phổ <sup>13</sup>C-NMR, mỗi nguyên tử cacbon sẽ cộng hưởng và cho một tín hiệu phổ khác nhau, từ đó giúp phân biệt tất cả các loại cacbon

và cung cấp thông tin bộ khung cacbon của hợp chất. Độ dịch chuyển hoá học cho biết loại nhóm chức [35].

## 2.2.2. Tổng hợp Polymer thay đổi điện tích

### 2.2.2.1. Tổng hợp *N*- Succinimidyl Tocopheryl Succinate

Tocopheryl succinate (1,74 g, 3,28 mmol) với *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (0,38 g, 3,28 mmol) và xúc tác là 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) (0,64 g, 3,38 mmol) trong 50 ml dung môi dichloromethane (DCM). Hỗn hợp được khuấy đều trong điều kiện môi trường khí argon trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi phản ứng kết thúc, dung dịch được rửa sạch bằng 100 ml nước cất trước khi chiết pha hữu cơ. Sử dụng dung môi dichloromethane (DCM), pha nước được chiết ngược hai lần, mỗi lần 50ml. Sau khi lọc, pha hữu cơ hỗn hợp được làm khô bằng  $MgSO_4$  và cô đặc bằng phương pháp bay hơi, thu được gel màu vàng (1,9 g, hiệu suất 91%). Sản phẩm *N*-succinimidyl tocopheryl succinate này được xác minh bằng phổ  $^1H$ -NMR để xác định cấu trúc và tỷ lệ chuyển đổi của nhóm carboxyl.

### 2.2.2.2. Tổng hợp Poly( $\beta$ -benzyl *L*-aspartate) (PBLA)

*n*-Butylamine được sử dụng để trùng hợp mở vòng benzyl-*L*-aspartate *N*-carboxyanhydride (BLA–NCA), dẫn đến sự tổng hợp poly( $\beta$ -benzyl *L*-aspartate) (PBLA). BLA–NCA (2,49 g, 10 mmol) được cân và bảo quản trong túi argon để tránh tiếp xúc với nước, sau đó được hòa tan trong hỗn hợp Dimethylformamide (DMF) (10,0 mL) và dichloromethane (DCM) (100 mL) ở 40°C. Dung môi DCM được sử dụng để pha loãng *n*-butylamine (14,6 mg, 200 mmol) trước khi thêm vào dung dịch BLA–NCA. Phản ứng trùng hợp được tiến hành trong 48 giờ ở 40°C dưới môi trường argon.

Sau khi phản ứng hoàn tất, sản phẩm được kết tủa ba lần trong diethyl ether để tinh chế và sau đó được lọc trước khi đông khô bằng cách sử dụng benzen làm dung môi. Để kiểm tra độ tinh khiết và xác định mức độ polymer hóa của PBLA sử dụng phổ  $^1H$ -NMR.

### 2.2.2.3. Tổng hợp Poly( $\beta$ -benzyl *L*-aspartate) Tocopherol ( PPLA -Toc)

Sự liên hợp của nhóm kỵ nước  $\alpha$ -tocopherol vào đầu mạch của poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) (PBLA) đơn chuỗi được thực hiện thông qua phản ứng giữa PBLA và axit tocopheryl succinate được kích hoạt bằng *N*-hydroxysuccinimide. PBLA đã đông khô (DP = 20; m = 150 mg, 0,0375 mmol) được hòa tan trong 10 mL dicloromethane (DCM). Dung dịch này sau đó được thêm vào 50 lần lượng *N*-succinimidyl tocopheryl succinate (1,2 mg, 1,875 mmol) hòa tan trong 7 mL DCM. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ dưới áp suất argon. Sản phẩm được thu bằng cách kết tủa trong 300 mL diethyl ether, sau đó đông khô để thu sản phẩm bột trắng (167,2 mg, hiệu suất 98%). Sản phẩm PBLA-Toc được kiểm tra bằng phổ  $^1\text{H}$  NMR để xác định sự hình thành thành công của liên kết amide.

#### 2.2.2.4. Tổng hợp Pasp(DET)-Toc

Phản ứng aminolysis của poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) (PBLA) với Diethylenetriamine (DET) trong điều kiện khan và trung bình được sử dụng để đưa các nhóm amin vào mạch nhánh của PBLA. PBLA-Toc đã đông khô (DP = 20, m = 150 mg, 0,65 mmol benzyl-L-aspartate(BLA)) được hòa tan trong *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) (10 mL) (dung dịch A). DET (V = 3,5 mL, 32,5 mmol, hoặc gấp 50 lần BLA) được pha loãng trong NMP (5 mL) (dung dịch B). Cả hai dung dịch được làm lạnh xuống 4°C trước khi nhỏ giọt dung dịch A vào dung dịch B. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 4°C trong 4 giờ. Dung dịch thu được sau đó được trung hòa dần bằng HCl 0,5 N sử dụng hỗn hợp muối và đá để kiểm soát nhiệt độ dưới 2°C. Dung dịch trung hòa được thẩm tách qua dung dịch axit hydrochloric 0,01 N (4 lần) và nước cất (1 lần). Bột trắng PAsp(DET)-Toc được thu dưới dạng muối hydrochloride sau khi đông khô. Sản phẩm PAsp(DET)-Toc được kiểm tra bằng phổ  $^1\text{H}$  NMR để xác định sự hình thành thành công.

#### 2.2.2.5. Tổng hợp PAsp(DET-Cit)-Toc

PBLA (DP = 20, m = 50 mg, 0,22 mmol Asp(DET)) được hòa tan trong 450 mL dung dịch đệm  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M (pH = 8,92). Cis-aconitic anhydride (m = 1,75 g, 11,1 mmol, tương đương gấp 50 lần Asp(DET)) được thêm dần vào dung dịch này. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 4°C trong 4 giờ. Dung dịch cuối cùng được tinh chế 3 lần bằng nước cất qua các đơn vị lọc Amicon Ultra (MWCO = 3000; Millipore,

Billerica, MA, USA). Sản phẩm thu được sau khi đông khô dưới dạng bột trắng (67 mg, hiệu suất 78%). Sự hình thành thành công của PAsp(DET-Cit)–Toc được xác minh bằng phổ  $^1\text{H-NMR}$  và phân tích kích thước hạt qua Dynamic Light Scattering (DLS).

### **2.2.3. Tổng hợp liposome chứa $\alpha$ -Mangostin có CCP**

#### *2.2.3.1. Tổng hợp Liposome chứa $\alpha$ -Mangostin có CPP*

Quy trình chế tạo liposome  $\alpha$ -mangostin tải CCP (CCP–liposome) được thực hiện qua phương pháp hydrat hóa màng phim kết hợp với đùn (extrusion). Đầu tiên, dung dịch gồm 0.3 mL PAsp(DET-Cit)–Toc 0.01 M, 2.5 mL DOPC 0.025 M và 1 mL  $\alpha$ -mangostin 0.02 M trong chloroform được chuẩn bị. Hỗn hợp này được khuấy đều trong 2 phút và chuyển vào bình bay hơi đáy phẳng để loại bỏ dung môi. Quá trình bay hơi thực hiện trên Rotavapor R-100 ở nhiệt độ  $40^\circ\text{C}$ , áp suất 250 mBar và tốc độ quay 2 vòng/phút. Sau đó, thêm 3 mL nước cất vào hỗn hợp và siêu âm ở  $40^\circ\text{C}$  trong 30 giây, tạo thành huyền phù chứa CCP–liposome  $\alpha$ -mangostin và  $\alpha$ -mangostin tự do chưa bao bọc và được thẩm tách (MWCO = 14.000 Da, 2 L nước cất, 24 giờ) để loại bỏ  $\alpha$ -mangostin không được bao gói.

Tiếp theo, sản phẩm được lọc qua màng polycarbonate kích thước 100 nm (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA) để tạo ra các hạt liposome có kích thước đồng đều. Sau đó, các liposome  $\alpha$ -mangostin tải CCP được tách khỏi  $\alpha$ -mangostin tự do bằng phương pháp sắc ký loại bỏ kích thước (size exclusion chromatography) trên cột PD10 Sephadex® G-25. Liposome trống (không có  $\alpha$ -mangostin và CCP) và CCP–liposome (không có  $\alpha$ -mangostin) được tổng hợp bằng quy trình tương tự mà không thêm nguyên liệu.

#### *2.2.3.2. Xác định đặc điểm hóa lý của hệ liposome theo phương pháp đo tán xạ ánh sáng động (DLS)*

Các liposome chứa  $\alpha$ -mangostin ( $\alpha$ -MG) được bảo quản và theo dõi kích thước hạt cũng như độ phân tán của kích thước hạt sau 1 ngày, 4 ngày, 7 ngày và 10 ngày bằng kỹ thuật tán xạ ánh sáng động sử dụng máy Horiba SZ-100 ở nhiệt độ  $25^\circ\text{C}$ . Sử dụng nguyên lý tán xạ ánh sáng bởi các hạt trong dung dịch, cho phép tính

toán đường kính hydrodynamic của CCP–liposome, thế zeta, chỉ số đa phân tán và độ ổn định của liposome.

### 2.2.3.3. *Xác định hiệu suất bao gói và hàm lượng thuốc*

Để xác định hiệu suất bao gói (EE%) và hàm lượng thuốc (DL%), mẫu được chuyển từ lọ dram sang bình đáy tròn 100 mL, sau đó được quay bay hơi (nhiệt độ bể 45°C, áp suất bình 0 mbar, tốc độ quay mức 3) cho đến khi toàn bộ nước bị loại bỏ và một màng mỏng còn lại trong bình. Màng lipid/ $\alpha$ -mangostin được hòa tan trong 3,5 mL dung dịch MeOH/CHCl<sub>3</sub> [3:1, (v/v)] và được siêu âm trong bể trong 2 phút để phá vỡ các huyền phù liposome và giải phóng  $\alpha$ -mangostin đã bao gói. Sau đó, 100  $\mu$ L dung dịch này được hút từ bình, kết hợp với 2900  $\mu$ L dung dịch MeOH/CHCl<sub>3</sub> [3:1, (v/v)] trong ống eppendorf, và lắc trong 30 giây. Hỗn hợp này sau đó được chuyển sang cuvet thủy tinh và độ hấp thụ của mẫu được đo ở bước sóng 243 nm so với chuẩn MeOH/CHCl<sub>3</sub> [3:1, (v/v)] bằng máy quang phổ Hitachi U-2900 (Hitachi, Tokyo, Nhật Bản). EE% và DL% có thể được tính toán như sau:

$$EE\% = \frac{(\text{lượng } \alpha - \text{mangostin trong liposome } (\mu\text{mol}))}{\text{tổng lượng } \alpha - \text{mangostin} (\mu\text{mol})} \times 100$$

$$DL\% = \frac{(\text{khối lượng } \alpha - \text{mangostin trong liposome } (\mu\text{g}))}{(\text{khối lượng liposome mang } \alpha - \text{mangostin} (\mu\text{g}))} \times 100$$

### 2.2.3.4. *Xác định tốc độ giải phóng*

Giải phóng  $\alpha$ -Mangostin từ CCP–liposome được xác định bằng phương pháp thẩm tách. CCP–liposome chứa  $\alpha$ -mangostin được hòa tan trong nước cất (ddH<sub>2</sub>O) và chuyển vào ống thẩm tách (MWCO = 1400 Da), sau đó nhúng vào dung dịch đệm phosphate (PBS, 0,1 M, pH 7,4) và dung dịch đệm acetate (0,1 M, pH 5,0 và 6,0) ở tốc độ khuấy 110 vòng/phút, 37°C. Mỗi điều kiện mẫu được thử nghiệm ba lần. Ở các khoảng thời gian xác định, một thể tích dung dịch giải phóng được thay thế bằng dung dịch đệm mới cùng thể tích. Lượng  $\alpha$ -mangostin được giải phóng từ CCP–liposome được tính toán bằng cách đo cường độ hấp thụ ở 480 nm sử dụng máy quang phổ UV (Hitachi U-2900, Hitachi, Tokyo, Nhật Bản).



## 2.2.4. Đánh giá độc tính tế bào của CCP-Liposome

### 2.2.4.1. Đánh giá độc tính tế bào

Tế bào HepG2 được nuôi cấy qua đêm ở 37°C trong môi trường 5% CO<sub>2</sub> trên đĩa 96 giếng với DMEM. Độc tính tế bào của  $\alpha$ -Mangostin, CCP-liposome trống, và CCP-liposome tải thuốc được đánh giá bằng phương pháp MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], là phương pháp gián tiếp xác định hoạt tính của chất thử qua khả năng ức chế enzyme oxidoreductase phụ thuộc NAD(P)H của tế bào. Enzyme này xúc tác phản ứng khử thuốc nhuộm tetrazolium MTT thành dạng formazan không hoà tan (màu tím), qua đó phản ánh tương quan số lượng tế bào đang phát triển khi đo ở bước sóng  $\lambda = 570\text{nm}$ . Độ hấp thụ ở bước sóng 570 nm của mỗi giếng được đo bằng thiết bị Spectramax M5 Microtiter Plate Luminometer (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

### 2.2.4.2. Xác định khả năng giải phóng thuốc khỏi endosome

Tế bào HepG2 được tiếp xúc trực tiếp với CCP-liposome và ủ trong điều kiện 5% CO<sub>2</sub> ở 37°C. Sau khi xử lý bằng Triton X và cố định bằng formaldehyde 4%, tế bào được nhuộm trong 30 phút với Cyanine 3 (bước sóng kích thích/phát xạ = 555/569 nm) và Hoechst 33342 (bước sóng kích thích/phát xạ = 352/454 nm). Hình ảnh huỳnh quang tế bào được thu và phân tích trên kính hiển vi huỳnh quang đồng tiêu laser Nikon A1. Trên kính hiển vi huỳnh quang đ, tế bào HepG2 (10<sup>5</sup> tế bào/mL) được xử lý trước với Cyanine 3 và Hoechst 33342 trong 30 phút, sau đó ủ với chất thử trong 1 giờ, trong 30 phút trước với Cyanine 3 và Hthể nội bào (endosome), kit thử LysoTracker Green (bucyanine 3 và Hoechst 33342) (bước sóng kích thích/phát xạ = 504/511 nm) để phân tích hình ảnh thu được, ngưỡng tín hiệu hình ảnh đồng xuất hiện/chồng lấn (colocalization threshold) được thiết lập và phân tích với công cụ Coloc2 – plugin trên phần mềm phân tích hình ảnh ImageJ dựa trên hệ số tương quan Pearson (R).

### CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ đến hiệu suất chiết xuất

##### 3.1.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu tới hiệu suất chiết xuất

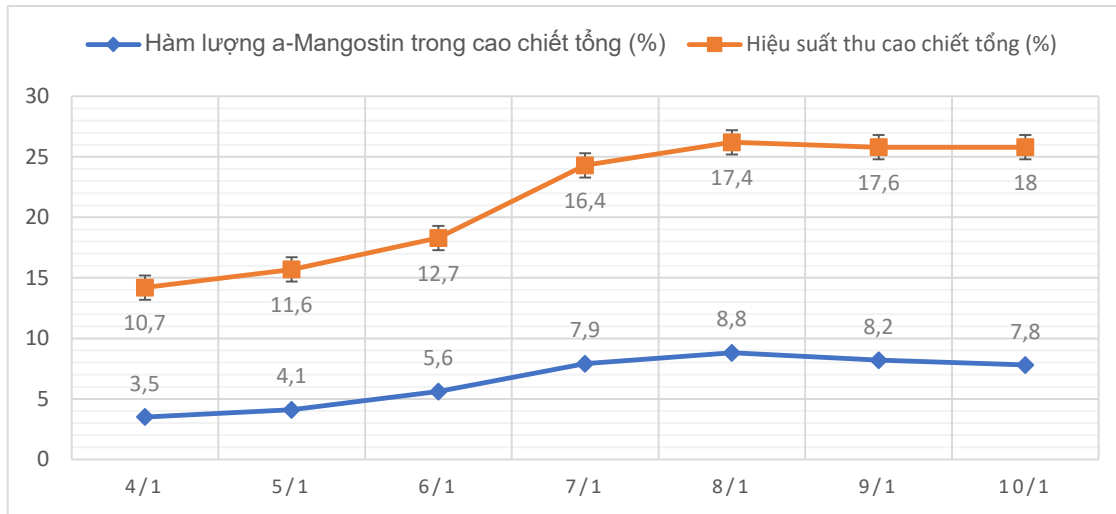
Bố trí các thí nghiệm chiết xuất vỏ quả măng cụt với dung môi etanol 96%, siêu âm ở công suất  $2,5\text{w/cm}^3$  tại nhiệt độ  $50^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 4h. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu tới hiệu suất chiết xuất thu  $\alpha$ -mangostin được thể hiện ở bảng 3.1 và đồ thị 3.1.

**Bảng 3. 1: Kết quả khảo sát tỷ lệ dung môi/nguyên liệu chiết xuất đến hiệu suất thu hồi  $\alpha$  – mangostin và hàm lượng cao chiết tổng**

TT	Tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu (ml/g)	Hàm lượng $\alpha$ – mangostin trong cao chiết tổng (%)	Hiệu suất thu cao chiết tổng (%)
1	4/1	$3,5 \pm 0,15$	$10,7 \pm 0,11$
2	5/1	$4,1 \pm 0,19$	$11,6 \pm 0,18$
3	6/1	$5,6 \pm 0,22$	$12,7 \pm 0,19$
4	7/1	$7,9 \pm 0,24$	$16,4 \pm 0,23$
5	8/1	$8,8 \pm 0,21$	$17,4 \pm 0,22$
6	9/1	$8,2 \pm 0,21$	$17,6 \pm 0,31$
7	10/1	$7,8 \pm 0,21$	$18,0 \pm 0,28$

Từ kết quả chỉ ra ở bảng 3.1 và đồ thị 3.1 ta thấy rằng tỷ lệ dung môi/nguyên liệu chiết cùng với công suất siêu âm, nhiệt độ và thời gian chiết xuất là các yếu tố ảnh hưởng chính tới khả năng chiết xuất  $\alpha$  - mangostin và hiệu suất thu cao chiết tổng. Trong quá trình thí nghiệm ta thấy ở tỷ lệ dung môi/nguyên liệu hấp (tỷ lệ 4/1, 5/1 và 6/1) thì hiệu quả quá trình chiết xuất còn thấp. Ở tỷ lệ 4/1 thì hiệu suất thu cao chiết tổng là 10,7% và hàm lượng  $\alpha$  - mangostin là  $3,5 \pm 0,15$  % trong cao chiết tổng; Ở tỷ lệ 5/1 hiệu suất thu cao chiết tổng là  $11,6 \pm 0,18\%$  và hàm lượng  $\alpha$  - mangostin là  $4,1 \pm 0,19$  % trong cao chiết tổng; Tại tỷ lệ 6/1 hiệu suất thu cao chiết tổng là  $12,7 \pm 0,19$  % và hàm lượng  $\alpha$  - mangostin là  $5,6 \pm 0,22$  % trong cao chiết tổng. Điều này có thể giải thích là ở tỷ lệ dung môi thấp, nồng độ cao chiết trong

dung môi nhanh đạt đến trạng thái bão hòa hơn vì vậy cản trở quá trình trích ly các hợp chất trong dược liệu, vì vậy hiệu suất chiết sẽ thấp hơn ở các tỷ lệ cao hơn.



**Đồ thị 3.1: Kết quả khảo sát tỷ lệ dung môi/nguyên liệu chiết xuất đến hiệu suất thu hồi  $\alpha$  – mangostin và hàm lượng cao chiết tổng**

Khi ta tăng tỷ lệ chiết xuất lên 7/1 và 8/1 thì hiệu suất chiết tiếp tục tăng lên đáng kể, hiệu suất thu cao chiết tổng lần lượt ở mức  $16,4 \pm 0,23\%$  và  $17,4 \pm 0,22\%$  còn hàm lượng  $\alpha$  – mangostin lần lượt đạt mức  $7,9 \pm 0,24$  và  $8,8 \pm 0,21\%$ . Tiếp tục tăng tỷ lệ dung môi/nguyên liệu lên 9/1 và 10/1 thì kết quả thu được không thay đổi nhiều, hiệu suất thu cao chiết tổng vẫn chỉ tăng rất nhẹ là  $17,6 \pm 0,31\%$  và  $18,0 \pm 0,28$ , tuy nhiên hàm lượng  $\alpha$  – mangostin lại giảm với hàm lượng trong cao chiết tổng lần lượt là  $8,2 \pm 0,21\%$  và  $7,8 \pm 0,21\%$ . Do đó, chúng tôi chọn tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 8/1 làm mức gốc để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

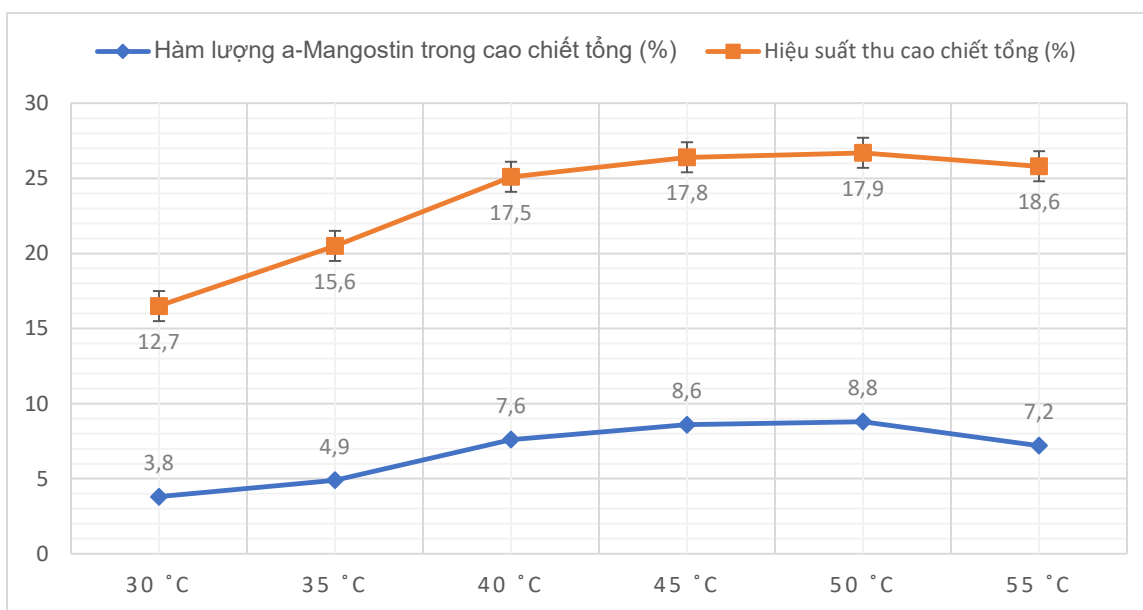
### 3.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tới hiệu suất chiết xuất

Bố trí các thí nghiệm chiết xuất vỏ quả măng cụt với dung môi etanol 96%, siêu âm ở công suất  $2,5\text{w}/\text{cm}^3$  với tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu là 8/1 (ml/g) trong thời gian 4h.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu suất chiết xuất thu cao chiết tổng và hàm lượng  $\alpha$  – mangostin trong cao chiết tổng được thể hiện ở bảng 3.2 và đồ thị 3.2 sau:

**Bảng 3. 2: Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết xuất đến hiệu suất thu hồi  $\alpha$  – Mangostin và hàm lượng cao chiết tổng**

TT	Nhiệt độ ( $^{\circ}\text{C}$ )	Hàm lượng $\alpha$ – Mangostin trong cao chiết tổng (%)	Hiệu suất thu cao chiết tổng (%)
1	30	$3,8 \pm 0,12$	$12,7 \pm 0,15$
2	35	$4,9 \pm 0,17$	$15,6 \pm 0,18$
3	40	$7,6 \pm 0,25$	$17,5 \pm 0,19$
4	45	$8,6 \pm 0,21$	$17,8 \pm 0,23$
5	50	$8,8 \pm 0,21$	$17,9 \pm 0,22$
6	55	$7,2 \pm 0,25$	$18,6 \pm 0,31$



**Đồ thị 3. 2: Kết quả khảo sát tỷ lệ dung môi/nguyên liệu chiết xuất đến hiệu suất thu hồi  $\alpha$  – Mangostin và hàm lượng cao chiết tổng**

Dựa vào kết quả ở bảng 3.2 và đồ thị 3.2, ta thấy nhiệt độ ảnh hưởng khá nhiều tới khả năng chiết xuất  $\alpha$  - mangostin cũng như hiệu suất thu cao chiết tổng. Ở nhiệt độ chiết xuất từ 30 - 40 $^{\circ}\text{C}$ , hiệu suất thu cao chiết tổng có sự tăng mạnh cũng như hàm lượng  $\alpha$  - mangostin. Cụ thể, tại 30 $^{\circ}\text{C}$  hiệu suất thu cao chiết tổng thu được là  $12,7 \pm 0,15\%$  với hàm lượng  $\alpha$  – mangostin là  $3,8 \pm 0,12\%$ , ở 35 $^{\circ}\text{C}$  hiệu suất thu cao chiết tổng thu được là  $15,6 \pm 0,18\%$  với hàm lượng  $\alpha$  – mangostin là  $4,9 \pm 0,17\%$ .

Từ 40°C đến 50°C, hàm lượng cao chiết tổng và lượng  $\alpha$  – mangostin trong cao chiết tổng thu được có xu hướng tăng nhưng với tốc độ chậm và đạt đỉnh trong khoảng 45-50°C với lần lượt là tại 40 °C hiệu suất thu cao chiết tổng thu được là  $17,5 \pm 0,19\%$  với hàm lượng  $\alpha$  – mangostin là  $7,6 \pm 0,25\%$ , tại 45 °C hiệu suất thu cao chiết tổng thu được là  $17,8 \pm 0,23\%$  với hàm lượng  $\alpha$  – mangostin là  $8,6 \pm 0,21\%$  và tại 50 °C hiệu suất thu cao chiết tổng thu được là  $17,9 \pm 0,22\%$  với hàm lượng  $\alpha$  – mangostin là  $8,8 \pm 0,21\%$ .

Khi tiếp tục tăng nhiệt độ chiết xuất lên 55°C, hiệu suất thu cao chiết tổng vẫn tăng nhẹ, tuy nhiên hàm lượng  $\alpha$  – mangostin có xu hướng giảm. Điều này có thể giải thích khi tăng nhiệt độ sẽ làm tăng khả năng hòa tan một số hợp chất khác có trong vỏ quả măng cụt như tanin hoặc lignin, trong khi đó hàm lượng  $\alpha$  – mangostin đã đạt đến mức tối đa. Do đó chúng tôi chọn khoảng nhiệt độ 45 – 50°C làm mức gốc để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.1.3. Ảnh hưởng của công suất siêu âm tới hiệu suất chiết xuất

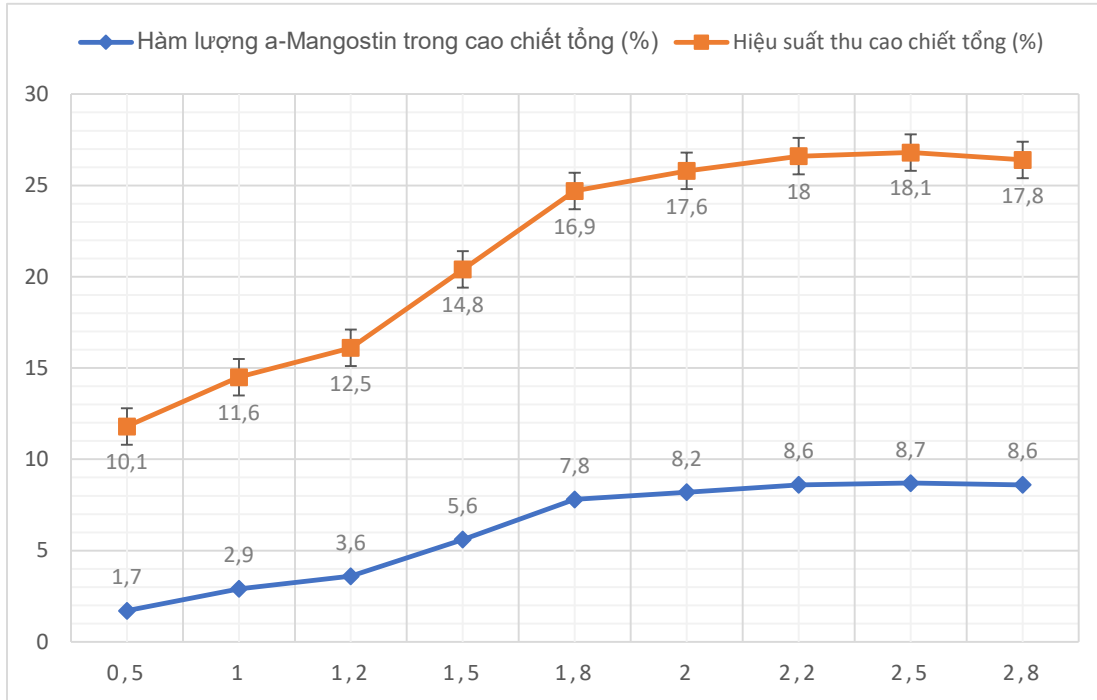
Bố trí các thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của công suất siêu âm tới hiệu suất của quá trình chiết xuất ở điều kiện tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 8/1, nhiệt độ chiết xuất ở 45-50°C và thời gian chiết xuất là 4h.

Kết quả thu được trình bày trong bảng 3.3 và đồ thị 3.3 như sau:

**Bảng 3. 3: Kết quả khảo sát công suất siêu âm đến hiệu suất thu hồi  $\alpha$ -mangostin và hàm lượng cao chiết tổng**

TT	Công suất siêu âm (w/cm <sup>3</sup> )	Hàm lượng $\alpha$ -mangostin trong cao chiết tổng (%)	Hiệu suất thu cao chiết tổng (%)
1	0,5	$1,7 \pm 0,12$	$10,1 \pm 0,12$
2	1,0	$2,9 \pm 0,15$	$11,6 \pm 0,12$
3	1,2	$3,6 \pm 0,25$	$12,5 \pm 0,18$
4	1,5	$5,6 \pm 0,22$	$14,8 \pm 0,25$
5	1,8	$7,8 \pm 0,28$	$16,9 \pm 0,23$
6	2,0	$8,2 \pm 0,25$	$17,6 \pm 0,31$

7	2,2	$8,6 \pm 0,27$	$18,0 \pm 0,25$
8	2,5	$8,7 \pm 0,12$	$18,1 \pm 0,21$
9	2,8	$8,6 \pm 0,35$	$17,8 \pm 0,42$



**Đồ thị 3. 3: Kết quả khảo sát công suất siêu âm đến hiệu suất thu hồi  $\alpha$ -mangostin và hàm lượng cao chiết tổng**

Dựa vào kết quả ở bảng 3.3 và đồ thị 3.3 ở trên, ta thấy công suất siêu âm ảnh hưởng lớn tới khả năng chiết xuất  $\alpha$  - mangostin cũng như hiệu suất thu cao chiết tổng. Ở công suất 0,5 – 1,8 W/cm<sup>3</sup>, hiệu suất thu cao chiết tổng có sự tăng mạnh cũng như hàm lượng  $\alpha$  – mangostin biến đổi đáng kể. Cụ thể, tại 0,5 W/cm<sup>3</sup>, hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $10,1 \pm 0,12\%$  với hàm lượng  $\alpha$  – mangostin là  $1,7 \pm 0,12\%$ . Tại 1W/cm<sup>3</sup>, hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $11,6 \pm 0,12\%$  với hàm lượng  $\alpha$  – mangostin là  $2,9 \pm 0,15\%$ . Tại 1,2 W/cm<sup>3</sup>, hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $12,5 \pm 0,18\%$  với hàm lượng  $\alpha$  – mangostin là  $3,6 \pm 0,25\%$ . Tại 1,5W/cm<sup>3</sup>, hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $16,9 \pm 0,23\%$  với hàm lượng  $\alpha$  – mangostin là  $7,8 \pm 0,28\%$ . Tại 1,8W/cm<sup>3</sup>, hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $11,6 \pm 0,12\%$  với hàm lượng  $\alpha$  – mangostin là  $2,9 \pm 0,15\%$ .

Từ 1,8 đến 2,22W/cm<sup>3</sup>, hàm lượng cao chiết tổng và lượng  $\alpha$  – mangostin trong cao chiết tổng thu được có xu hướng tăng nhưng với tốc độ chậm và đạt đỉnh ở 2,2W/cm<sup>3</sup> với lần lượt là tại 2W/cm<sup>3</sup> hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $17,6 \pm 0,31\%$  với hàm lượng  $\alpha$  – mangostin là  $8,2 \pm 0,25\%$  và tại 2,2 W/cm<sup>3</sup> hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $18,0 \pm 0,25\%$  với hàm lượng  $\alpha$  – mangostin là  $8,6 \pm 0,27\%$ . Tiếp tục tăng công suất lên các mức 2,5 và 2,8W/cm<sup>3</sup>, hiệu suất thu cao chiết tổng và hàm lượng  $\alpha$  – mangostin hầu như không thay đổi. Vì vậy chúng tôi chọn mức công suất 2,2 w/cm<sup>3</sup> cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.1.4. Ảnh hưởng của thời gian chiết xuất tới hiệu suất chiết xuất

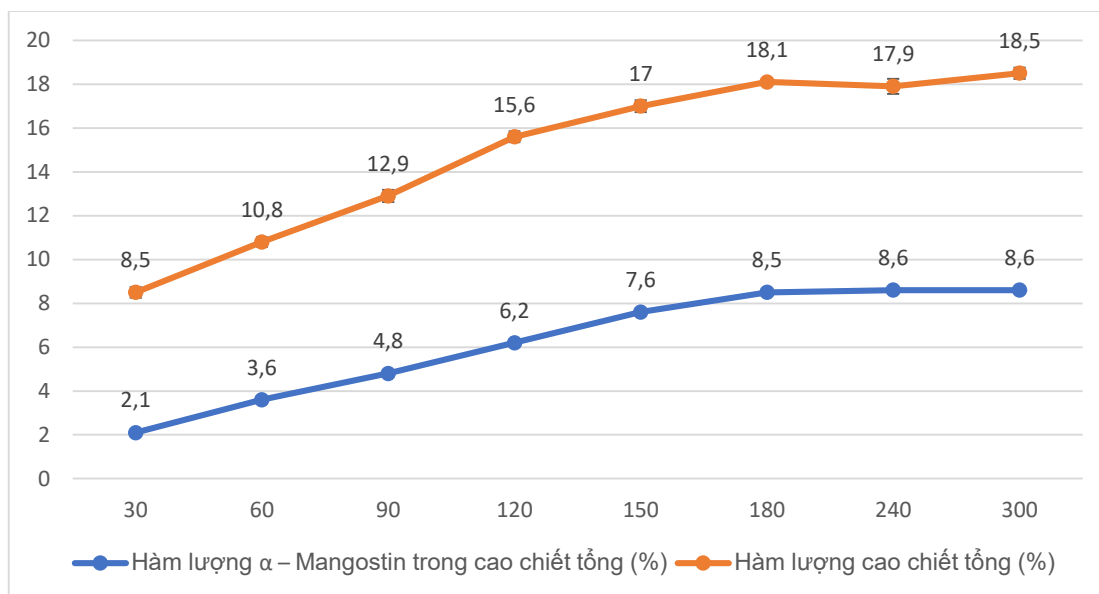
Bố trí các thí nghiệm với các thông số:

- + Tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 8/1
- + Công suất siêu âm 2,2 w/cm<sup>3</sup>
- + Nhiệt độ 45-50<sup>0</sup>C

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian tới hiệu suất chiết xuất thu cao chiết tổng giàu  $\alpha$  – mangostin được thể hiện ở bảng 3.4 và đồ thị 3.4 như sau:

**Bảng 3. 4: Kết quả khảo sát thời gian chiết xuất đến hiệu suất thu hồi  $\alpha$  – Mangostin và hàm lượng cao chiết tổng**

TT	Thời gian (Phút)	Hàm lượng $\alpha$ – Mangostin trong cao chiết tổng (%)	Hàm lượng cao chiết tổng (%)
1	30	$2,1 \pm 0,24$	$8,5 \pm 0,18$
2	60	$3,6 \pm 0,22$	$10,8 \pm 0,24$
3	90	$4,8 \pm 0,28$	$12,9 \pm 0,23$
4	120	$6,2 \pm 0,25$	$15,6 \pm 0,31$
5	150	$7,6 \pm 0,27$	$17,0 \pm 0,25$
6	180	$8,5 \pm 0,12$	$18,1 \pm 0,21$
7	240	$8,6 \pm 0,35$	$17,9 \pm 0,42$
8	300	$8,6 \pm 0,25$	$18,5 \pm 0,18$



**Đồ thị 3. 4: Kết quả khảo sát thời gian chiết xuất đến hiệu suất thu hồi  $\alpha$  - Mangostin và hàm lượng cao chiết tổng**

Dựa vào kết quả ở bảng 3.4 và đồ thị 3.4 ở trên, ta thấy thời gian ảnh hưởng lớn tới khả năng chiết xuất  $\alpha$  - mangostin cũng như hiệu suất thu cao chiết tổng. Ở khoảng thời gian 30 – 120 phút, hiệu suất thu cao chiết tổng có sự tăng mạnh cũng như hàm lượng  $\alpha$  - mangostin biến đổi đáng kể. Cụ thể, ở mức 30 phút, hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $8,5 \pm 0,18\%$  với hàm lượng  $\alpha$  - mangostin là  $2,1 \pm 0,24\%$ . Ở mức 60 phút, hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $10,8 \pm 0,24\%$  với hàm lượng  $\alpha$  - mangostin là  $3,6 \pm 0,22\%$ . Ở mức 90 phút, hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $12,9 \pm 0,23\%$  với hàm lượng  $\alpha$  - mangostin là  $4,8 \pm 0,28\%$ . Ở mức 120 phút, hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $15,6 \pm 0,31\%$  với hàm lượng  $\alpha$  - mangostin là  $6,2 \pm 0,25\%$ .

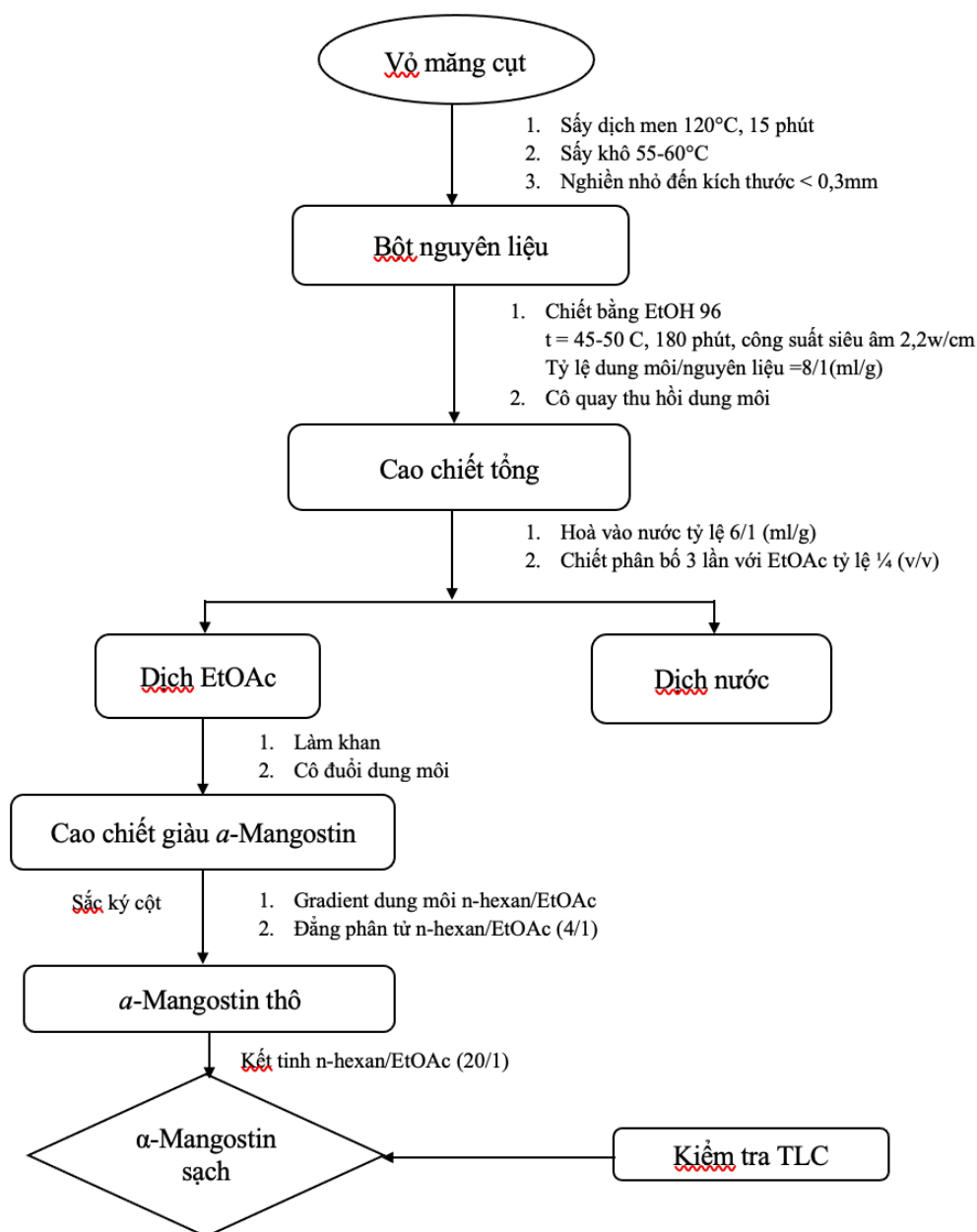
Từ 120 đến 180 phút, hàm lượng cao chiết tổng và lượng  $\alpha$  - mangostin trong cao chiết tổng thu được có xu hướng tăng nhưng với tốc độ chậm và đạt đỉnh ở 180 phút với lần lượt là tại mức 120 phút hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $15,6 \pm 0,31\%$  với hàm lượng  $\alpha$  - mangostin là  $6,2 \pm 0,25\%$ , tại mức 150 phút hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $17,0 \pm 0,25\%$  với hàm lượng  $\alpha$  - mangostin là  $7,6 \pm 0,27\%$ , tại mức 180 phút hiệu suất thu cao chiết tổng thu được chỉ là  $18,1 \pm 0,21\%$  với hàm lượng  $\alpha$  - mangostin là  $8,5 \pm 0,12\%$ . Tiếp tục tăng thời gian lên đến



240 và 300 phút, hiệu suất thu cao chiết tổng và hàm lượng  $\alpha$  – mangostin hầu như không thay đổi. Vì vậy chúng tôi chọn mức thời gian 180 phút cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.1.5. Xây dựng quy trình chiết xuất và phân lập $\alpha$ -Mangostin ở điều kiện tối ưu

- Quy trình chiết xuất và phân lập  $\alpha$  – Mangostin ở điều kiện tối ưu



Sơ đồ 3. 1: Quy trình chiết xuất và phân lập  $\alpha$  – Mangostin ở điều kiện tối ưu

**Các bước thực hiện:*****Bước 1: Chuẩn bị nguyên vật liệu và thiết bị***

- + Cân chính xác bột nguyên liệu (bột vỏ quả măng cụt khô có độ ẩm ~10%).
- + Chuẩn bị dung môi ethanol 96%.
- + Chuẩn bị bình cầu, sinh hàn hồi lưu, bể điều nhiệt.
- + Chuẩn bị bộ phát sóng siêu âm

***Bước 2: Tiến hành chiết xuất***

- + Nạp bột nguyên liệu vào bình cầu.
- + Thêm vào bình cầu dung môi ethanol 96%.
- + Lắp sinh hàn, bật nước, bật thiết bị siêu âm và điều nhiệt.
- + Tiến hành chiết xuất ở 45-50°C trong thời gian 180 phút với mức công suất phát siêu 2,2 w/cm<sup>3</sup>.

***Bước 3: Kết thúc quá trình chiết xuất, thu cao chiết***

- + Tắt bếp điện, ngắt nước sinh hàn.
- + Lọc thu dịch chiết bằng phễu buchner.
- + Cô đặc dịch chiết bằng máy cô quay áp suất giảm.
- + Thu cao chiết.

***Bước 4: Chiết phân bố với EtOAc***

- + Hòa cao chiết bằng 1 lượng vừa đủ nước theo tỉ lệ 1/5 (g/ml), khuấy thật đều
- + Tiến hành chiết phân bố dung dịch trên với EtOAc. Chiết 3 lần; tỷ lệ chiết mỗi lần (v/v = 1/4). Thu lấy phase không tan trong nước, làm khan bằng Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- + Cô đặc bằng máy cô quay áp suất giảm thu cao chiết giàu  $\alpha$  – mangostin.

***Bước 5: Tiến hành sắc ký cột***

- + Chuẩn bị cột sắc ký silica gel pha thường

+ Dung môi rửa giải là hệ *n*-hexan/EtOAc gradient dung môi (v/v, 90/1 đến 1/1). Kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng, gom các phân đoạn chứa  $\alpha$  – mangostin.

+ Sắc ký cột silica gel pha thường với hệ đẳng dung môi *n*-hexan/EtOAc (v/v = 4/1)

+ Thu hứng dung dịch ra khỏi cột, kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng (TLC)

+ Gom các phân đoạn chứa  $\alpha$  – mangostin sạch.

+ Cô quay thu hỗn hợp chứa  $\alpha$  – mangostin với độ tinh sạch khoảng 80%.

***Bước 6: Kết tinh thu  $\alpha$  – mangostin tinh sạch***

+ Hòa tan hoàn toàn hỗn hợp 1 vào dung dịch *n*-hexan/EtOAc (v/v, 20/1).

+ Kết tinh lại ở nhiệt độ 4-6<sup>0</sup>C, thời gian 10 giờ.

***Bước 7: Thu sản phẩm***

+ Lọc rửa tinh thể bằng *n*-hexan.

+ Sấy khô dung môi *n*-hexan thu được  $\alpha$  – mangostin.

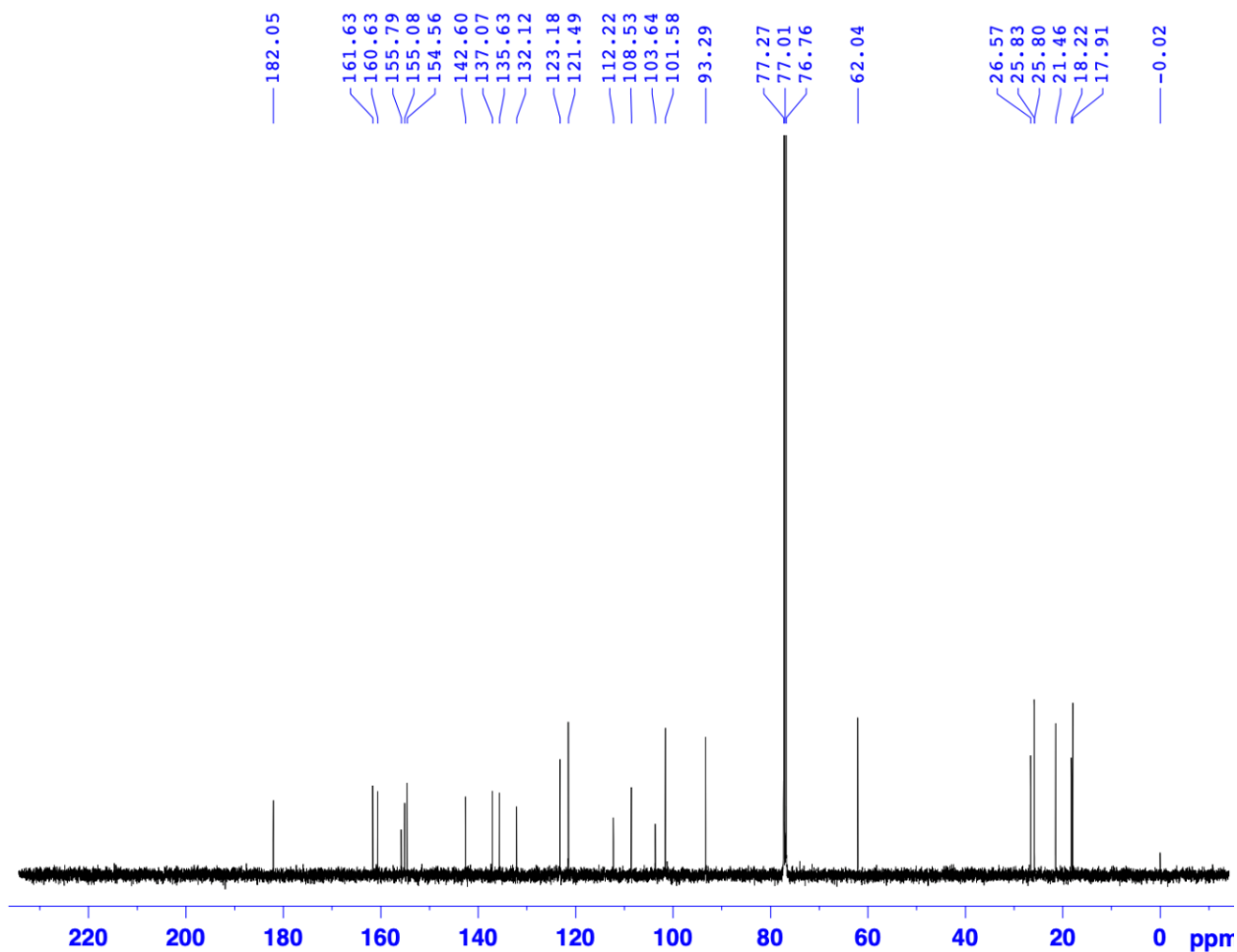
+ Kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

+  $\alpha$  – mangostin thu được có độ tinh khiết trên 98% (theo diện tích pick trong sắc đồ HPLC).

Kết quả từ 1000g bột vỏ măng cụt ban đầu, trải qua các công đoạn chiết xuất và phân lập đã thu được 18,6 g  $\alpha$  – mangostin, hiệu suất đạt được là 1,86%

**3.1.6. Xác định cấu trúc hoạt chất  $\alpha$ -Mangostin thu được**

Hợp chất  $\alpha$ -Mangostin là một xanthone thu được từ vỏ quả măng cụt dưới dạng vô định hình, màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 180-181<sup>0</sup>C, phù hợp với các giá trị đã được ghi nhận trong tài liệu tham khảo (181,6-182,6<sup>0</sup>C). Các phân tích chi tiết bằng các phương pháp phổ học khác như <sup>13</sup>C-NMR và <sup>1</sup>H-NMR đã cung cấp thông tin đầy đủ về cấu trúc của  $\alpha$ -Mangostin, cho phép xác định các nhóm chức và khung cấu trúc của hợp chất này.

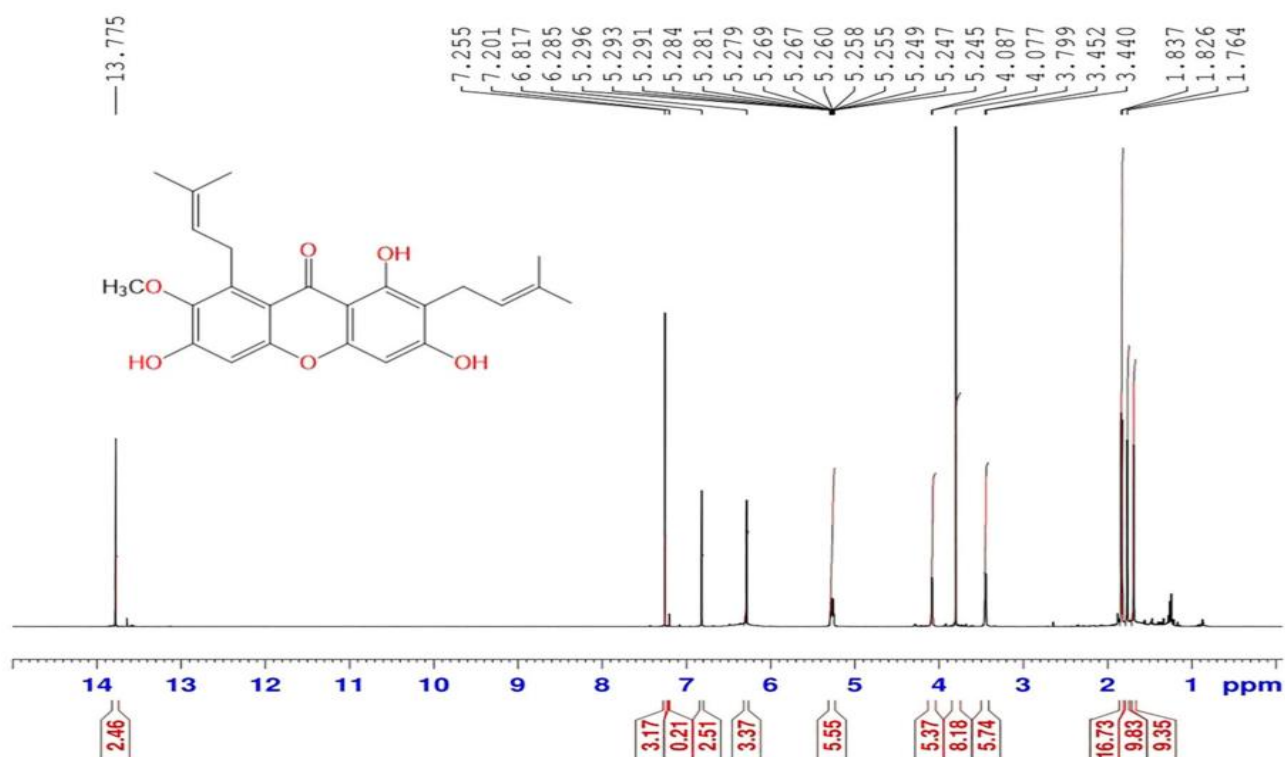
Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$ 

**Hình 3. 1: Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của  $\alpha$ -Mangostin trong dung môi  $\text{CDCl}_3$**

Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  cho biết trong phân tử có tổng cộng 24 carbon gồm năm nhóm methyl tại  $\delta_{\text{C}}$  25.8 (C-14), 18.2 (C-15), 17.9 (C-19), 25.8 (C-20) và 1 nhóm methoxy ( $\text{OCH}_3$ ) tại  $\delta_{\text{C}}$  62.0 ppm; 2 nhóm methylene tại  $\delta_{\text{C}}$  21.5 (C-11) và 26.6 (C-16); và 13 carbon bậc 4 tại  $\delta_{\text{C}}$  160.1 (C-1), 108.5 (C-2), 161.6 (C-3), 155.1 (C-4a), 155.8 (C-6), 142.6 (C-7), 137.1 (C-8), 112.2 (C-8a), 182.1 (C-9), 103.6 (C-9a), 154.6 (C-10a), 132.1 (C-13), 135.6 (C-18), trong đó có 1 nhóm carbonyl đặc trưng tại  $\delta_{\text{C}}$  182.1 (C-9).

### Phổ $^1\text{H-NMR}$

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  cho biết 2 tín hiệu của proton thơm dưới dạng singlet tại  $\delta_{\text{H}}$  6.29 (H-4) và 6.82 (H-5); 2 tín hiệu proton của nhóm 3-methylbut-2-enyl dưới dạng doublet tại  $\delta_{\text{H}}$  3.46 (d;  $J = 7.0$  Hz; H-11) và 4.09 (d,  $J = 6,5$  Hz; H-16); 2 tín hiệu dưới dạng multiplet của nhóm vinylic tại  $\delta_{\text{H}}$  5.30 (m, H-12 và H-17); 4 tín hiệu dưới dạng singlet của nhóm methyl tại  $\delta_{\text{H}}$  1.77 (H-14), 1.83 (H-15), 1.84 (H-19), 1.69 (H-20) và tín hiệu proton dưới dạng singlet của nhóm methoxyl tại  $\delta_{\text{H}}$  3.8 (-OCH<sub>3</sub>). Ngoài ra, còn có tín hiệu của 3 nhóm hydroxy dưới dạng singlet tại  $\delta_{\text{H}}$  13.77 (OH-1), 6.14 (OH-3), 6.30 (OH-6).



**Hình 3. 2: Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của  $\alpha$ -Mangostin trong dung môi  $\text{CDCl}_3$**

Phân tích dữ liệu phổ của  $\alpha$ -Mangostin kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo khẳng định hợp chất có tên gọi là  $\alpha$ -Mangostin có cấu trúc hóa học trong Hình 3.2 với các dữ liệu phổ được tóm tắt trong Bảng 3.5.

**Bảng 3. 5: Dữ liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$ -NMR của  $\alpha$ -Mangostin trong dung môi  $\text{CDCl}_3$** 

TT	$^1\text{H}$ ( $\delta_{\text{H}}$ ) (500MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$^{13}\text{C}$ ( $\delta_{\text{C}}$ ) (500MHz, $\text{CDCl}_3$ )	TLTK [36]
1		160.6	159.8
2		108.5	109.9
3		161.6	162.2
4	6.29 (s; 1H)	93.3	92.2
4a		155.1	154.1
5	6.82 (s; 1H)	101.6	101.8
6		155.8	156.8
7		142.6	143.3
8		137.1	136.3
8a		112.2	109.6
9		182.1	181.2
9a		103.6	109.9
10		154.6	154.5
11	3.46 (d; $J = 7,0$ Hz; 2H)	21.5	20.9
12	5.30 (m, 1H)	121.5	123.7
13		132.1	130.3
14	1.77 (s; $\text{CH}_3$ )	25.8	25.4
15	1.83 (s; $\text{CH}_3$ )	18.2	17.9

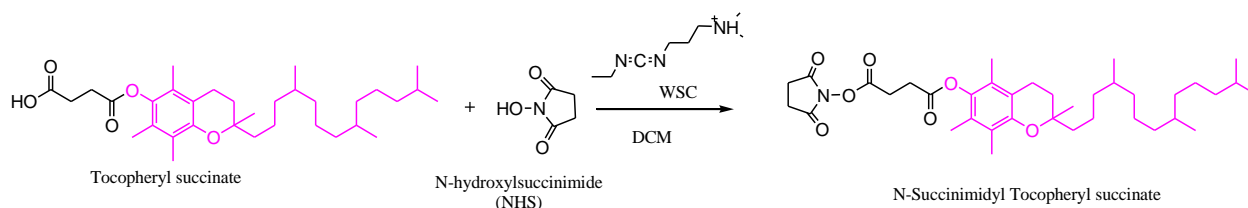
16	4.09 (d; $J = 6,5$ Hz, 2H)	26.6	25.5
17	5.30 (m; 1H)	123.2	122.5
18		135.6	
19	1.84 (s; CH <sub>3</sub> )	17.9	130.2
20	1.69 (s; CH <sub>3</sub> )	25.8	17.6
OCH <sub>3</sub> (7)	3.8 (s, 3H)	62.0	25.7
OH (1)	13.77 (s)		60.1
OH (3)	6.14 (s)		
OH (6)	6.3 (s)		

Kết quả nghiên cứu phổ cộng hưởng từ hạt nhân cho thấy sản phẩm thu được có các tín hiệu proton và cacbon phù hợp với dữ liệu phổ của hợp chất  $\alpha$  – mangostin.

### 3.2. Kết quả tổng hợp Polymer thay đổi điện tích

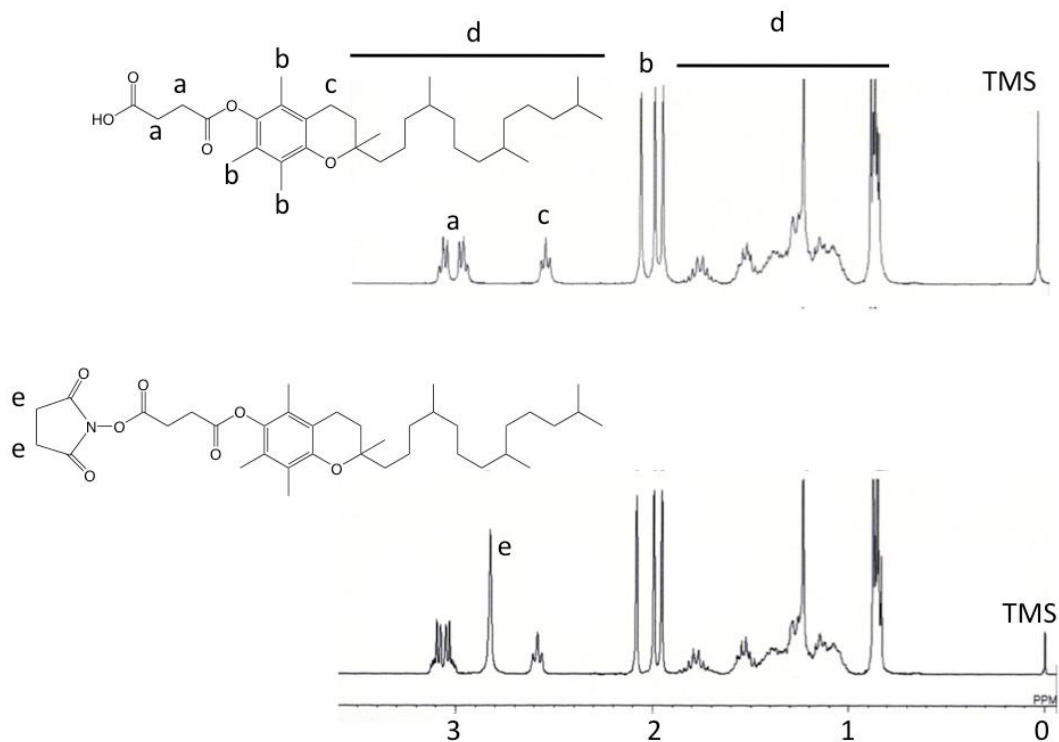
#### 3.2.1. Tổng hợp N- Succinimidyl Tocopheryl Succinate

N-Succinimidyl Tocopheryl succinate được tổng hợp bằng cách kết hợp Tocopheryl succinate và NHS trong sự hiện diện của WSC (EDC) trong dung môi DCM (Hình 3.3). Sản phẩm được xác định bằng phương pháp đo phổ <sup>1</sup>H-NMR trong CDCl<sub>3</sub> ở nhiệt độ 25°C.



**Hình 3. 3: Tổng hợp N-Succinimidyl Tocopheryl succinate**

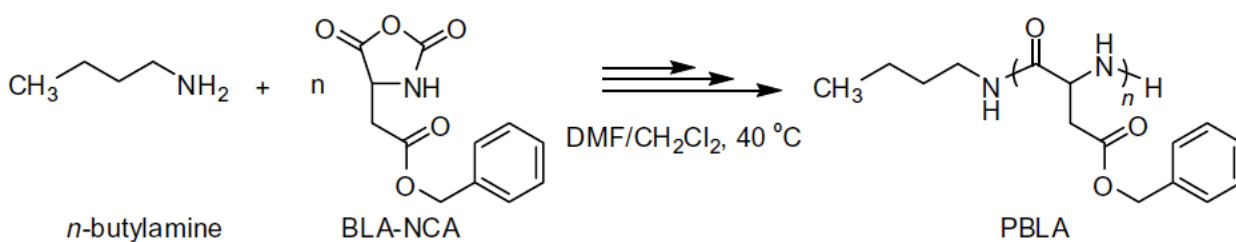
Đỉnh của nhóm ethylene thuộc vòng succinimide xuất hiện rõ ràng trong phổ <sup>1</sup>H-NMR. Việc so sánh tỷ lệ proton giữa các proton ethylene trong vòng succinimide và các proton methyl liên kết với nhóm phenyl của Tocopherol xác nhận tỷ lệ chuyển đổi nhóm carboxyl trong Tocopheryl succinate đạt 100%.



**Hình 3. 4:** Phổ <sup>1</sup>H-NMR của Tocopheryl succinate (A) và N-Succinimidyl Tocopheryl succinate (B) trong CDCl<sub>3</sub> ở 25°C

### 3.2.2. Tổng hợp PBLA

PBLA được tổng hợp thông qua quá trình polymer hóa mở vòng của BLA-NCA khởi đầu từ nhóm NH<sub>2</sub> của *n*-butylamine (Hình 3.5).

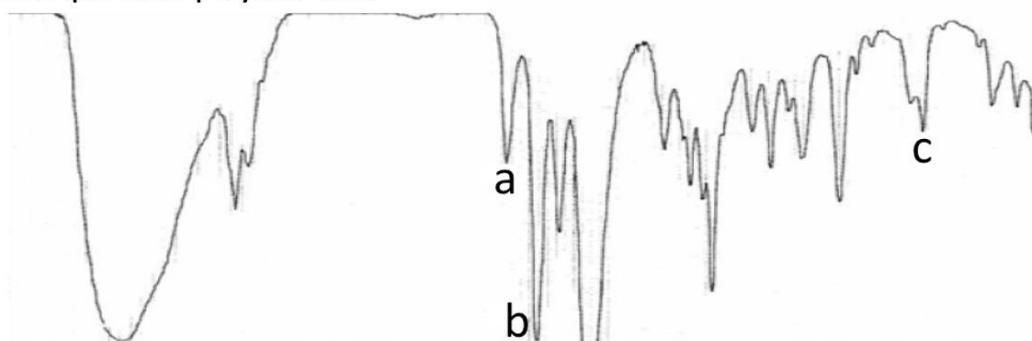


**Hình 3. 5:** Tổng hợp PBLA thông qua polymer hóa mở vòng của BLA-NCA

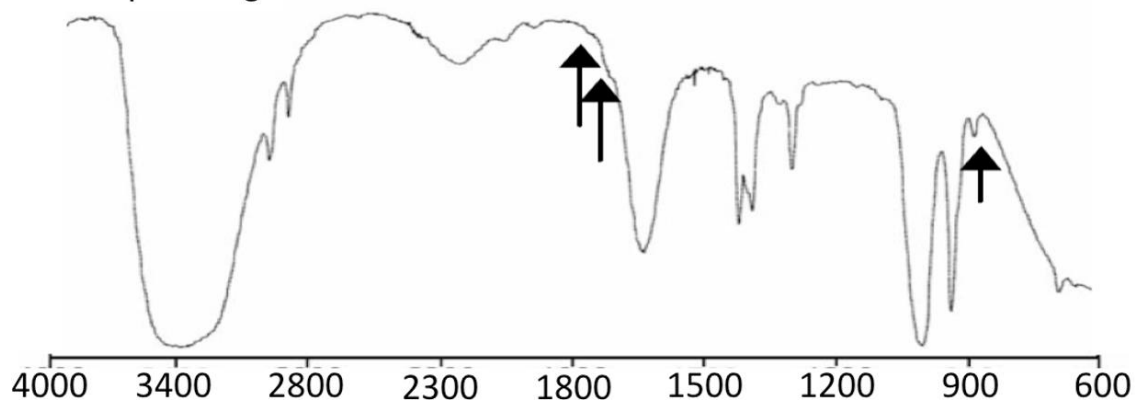


Quá trình polymer hóa được xác nhận bằng cách theo dõi sự biến mất của các đỉnh đặc trưng của NCA ( $1850\text{ cm}^{-1}$ : dao động không đối xứng của C=O;  $1780\text{ cm}^{-1}$ : dao động đối xứng của C=O;  $910\text{ cm}^{-1}$ : dao động của C=O) (Hình 3.6).

Bắt đầu quá trình polymer hoá:

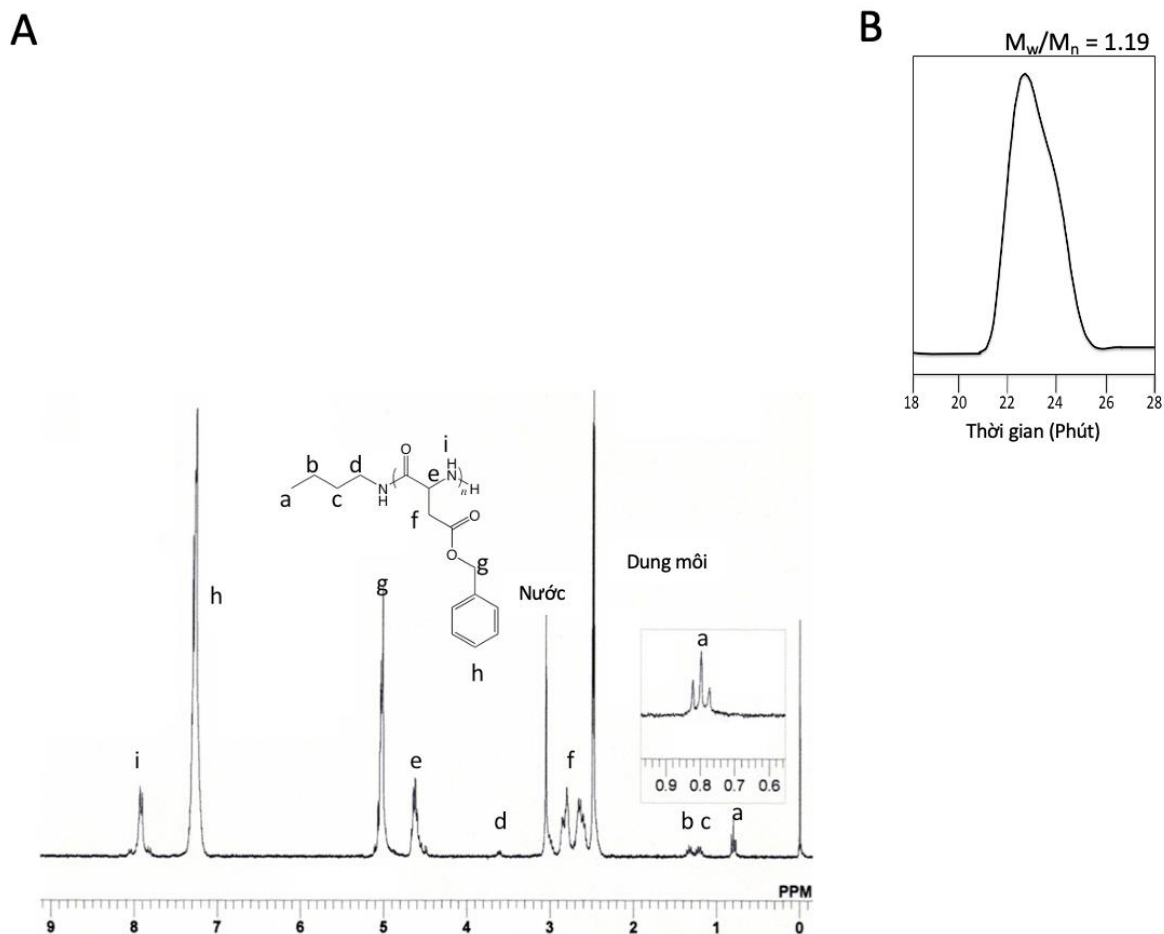


Kết thúc phản ứng:



**Hình 3. 6: Theo dõi quá trình polymer hóa thông qua các đỉnh đặc trưng của BLA-NCA bằng phép đo IR**

Độ polymer hóa của đoạn PBLA trong các copolymer PBLA được xác định là 20 bằng phép đo  $^1\text{H-NMR}$  trong  $\text{DMSO-d}_6$  ở  $80^\circ\text{C}$  thông qua so sánh tỷ lệ proton giữa các proton methyl trong nhóm butyl ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $\delta = 0,8\text{ ppm}$ ) và nhóm  $\alpha\text{-CH}$  ( $\text{COCHNH-}$ ,  $\delta = 4,7\text{ ppm}$ ) (Hình 3.7-A). Tính đơn phân tán của PBLA ( $\text{DP} = 20$ ) được xác nhận bằng phép đo NMP-GPC ( $M_w/M_n = 1,19$ ) (Hình 3.7-B).



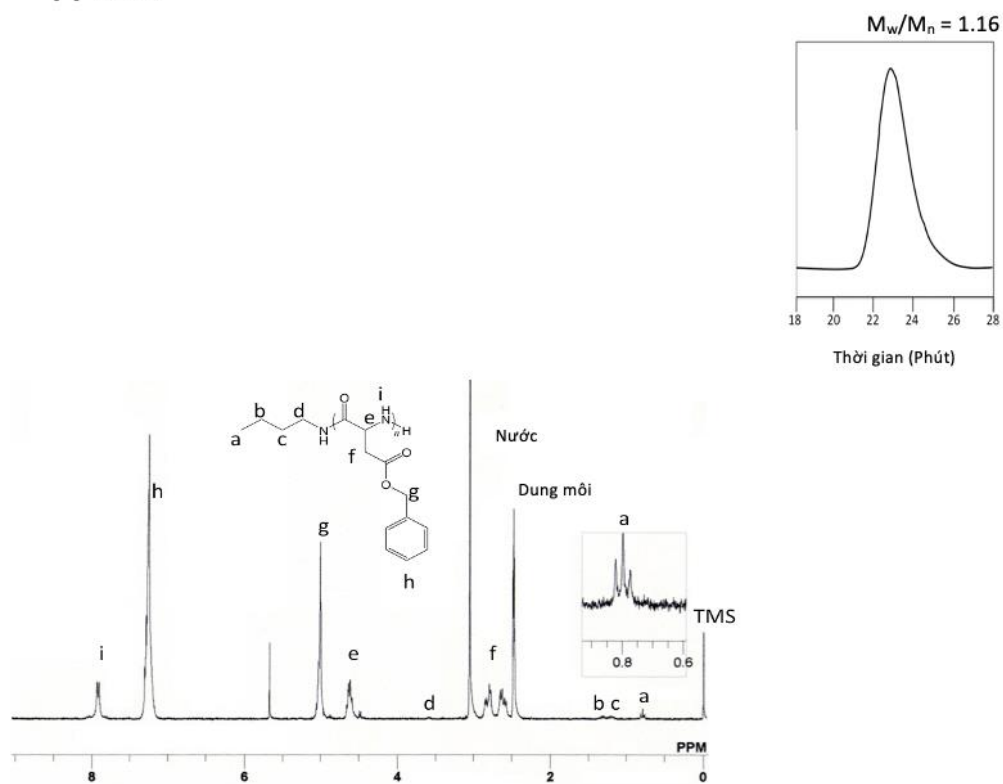
**Hình 3. 7:**(A) Phổ  $^1\text{H}$  NMR của PBLA (DP = 20) trong  $\text{DMSO-}d_6$  ở  $80^\circ\text{C}$  và (B) phép đo sắc ký thẩm thấu gel-GPC

Tương tự, các polyme PBLA-Toc với các mức độ polymer hóa khác nhau (DP = 32, 73, 106) được đặc trưng thông qua phép đo  $^1\text{H}$ -NMR và NMP-GPC (Hình 3.8).

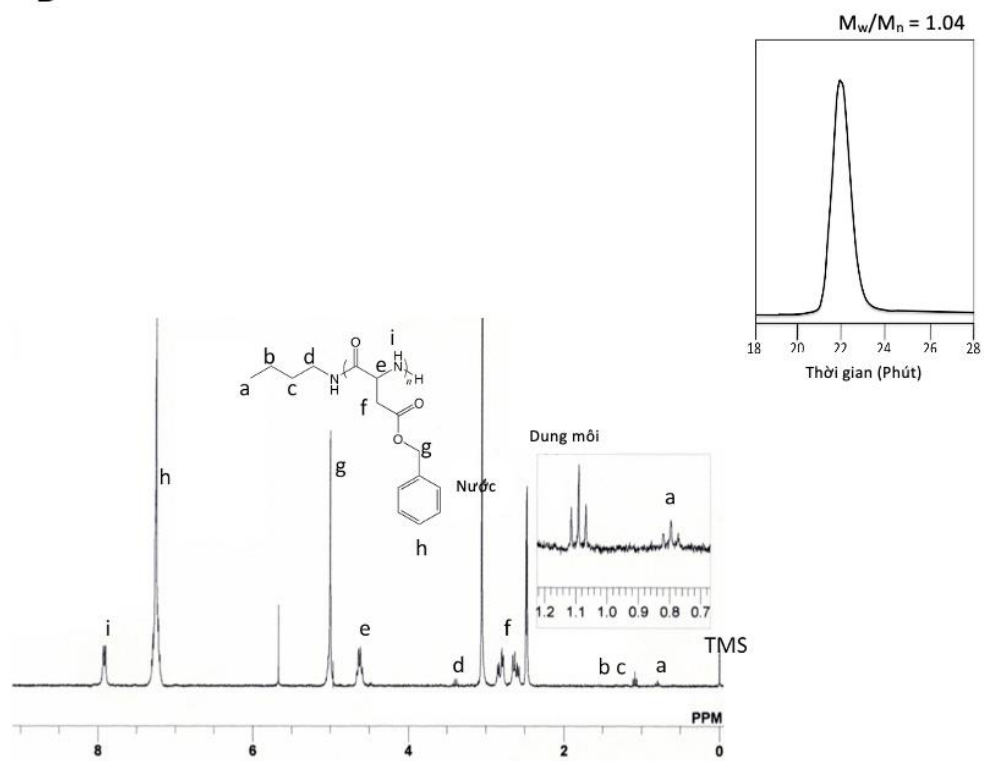
**Bảng 3. 6: Tổng hợp PBLA polymers**

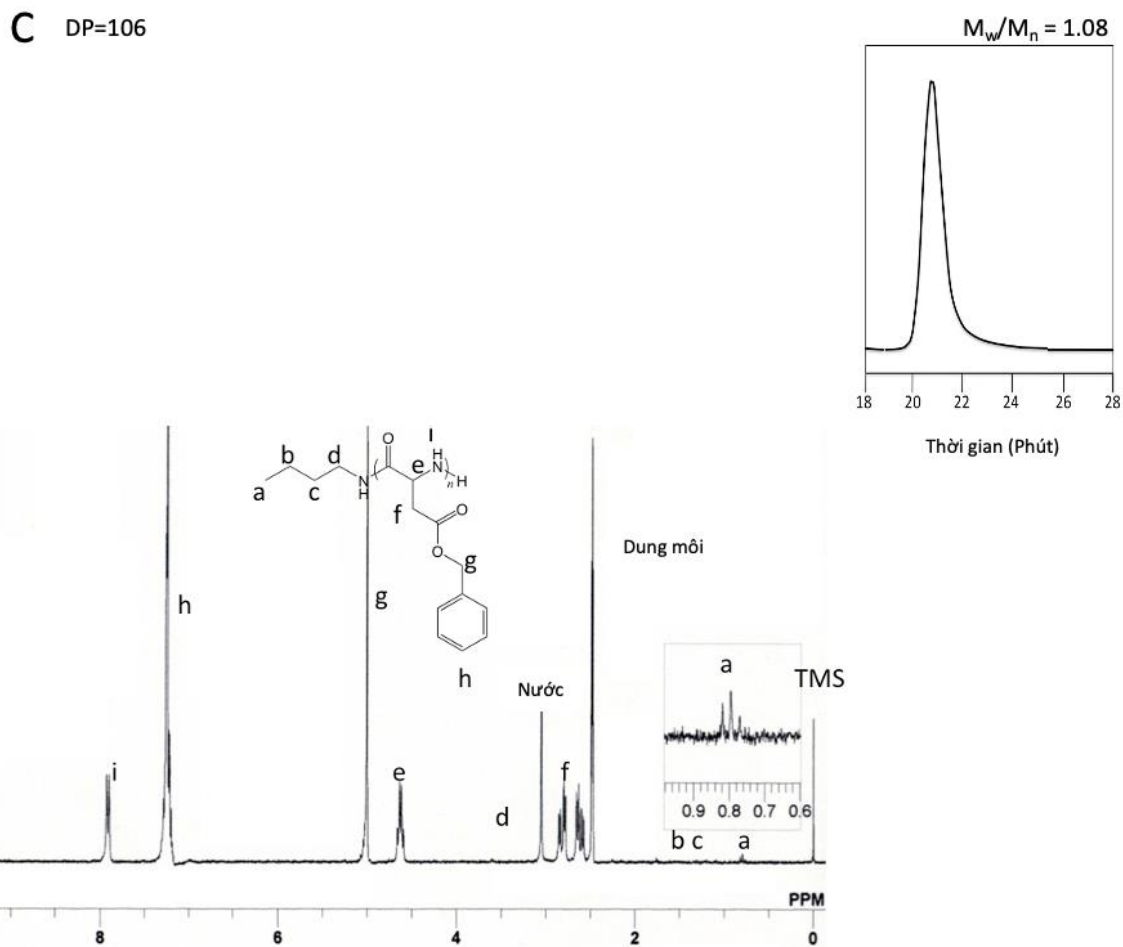
	DP			
Nguyên liệu	20	40	70	100
Kết quả	20	32	73	106
$M_w/M_n$	1.19	1.16	1.04	1.08

A DP=32



B DP=73

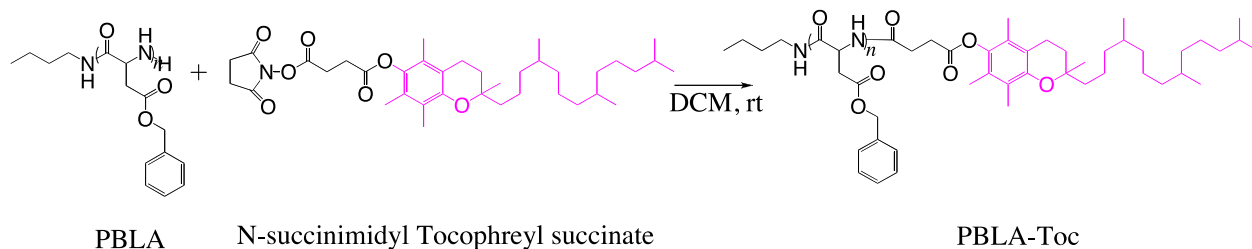




**Hình 3. 8:** Phổ  $^1\text{H}$  NMR của PBLA trong  $\text{DMSO-}d_6$  ở  $80^\circ\text{C}$  và phép đo sắc ký thẩm thấu gel-GPC với DP = 32 (A), DP = 73 (B), DP = 106 (C)

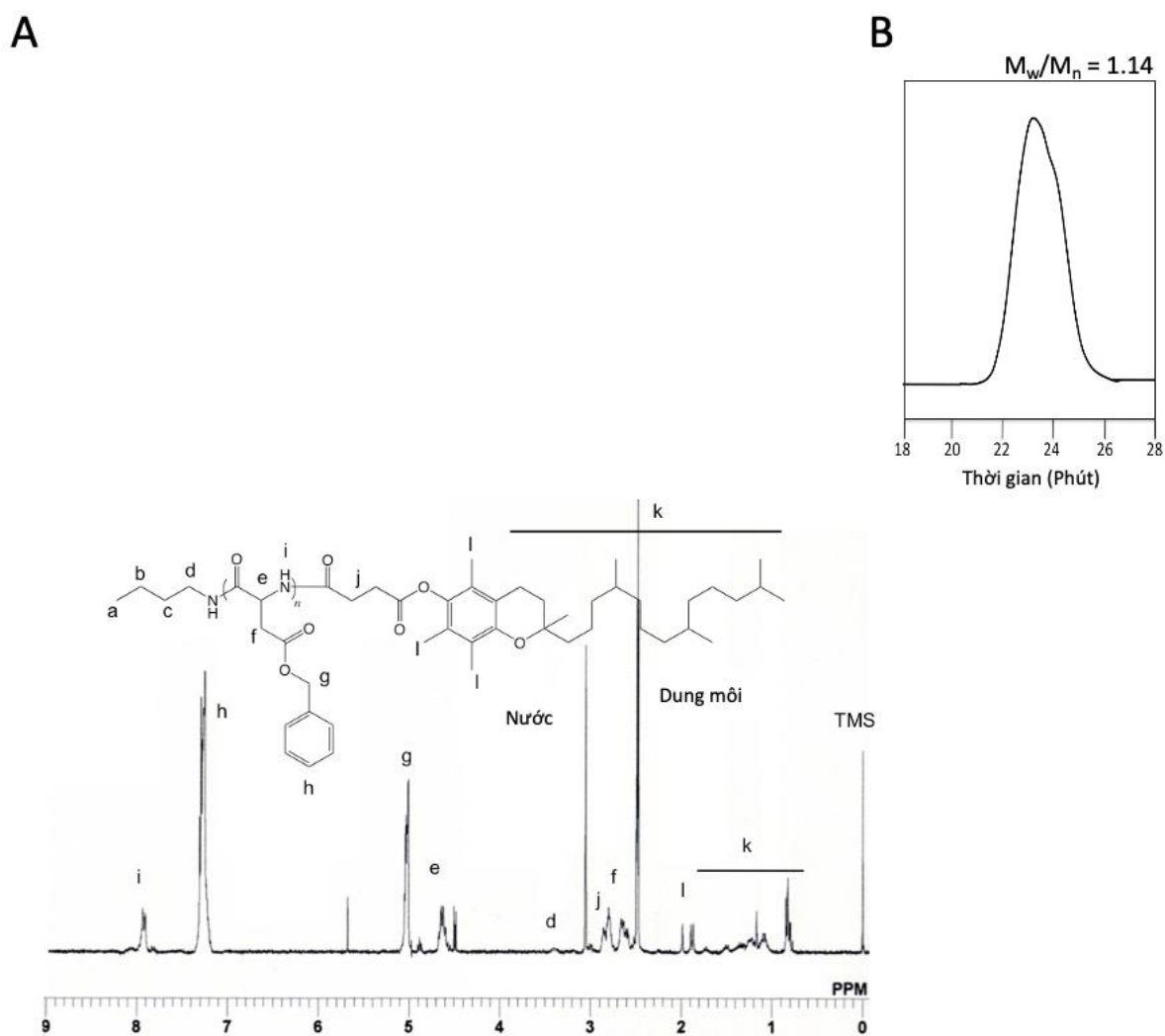
### 3.2.3. Tổng hợp PBLA -Toc

PBLA-Toc được tổng hợp thông qua liên kết amide giữa N-Succinimidyl Tocopheryl succinate và nhóm amine ở đầu chuỗi PBLA (Hình 3.9).



**Hình 3. 9:** Tổng hợp PBLA-Toc thông qua liên kết amide

Sản phẩm được xác định thông qua phổ  $^1\text{H-NMR}$ . Các đỉnh của nhóm Tocopheryl trong PBLA-Toc xuất hiện trong khoảng từ 0,8 – 2,1 ppm. Tỷ lệ chuyển đổi của nhóm amino đầu đỉnh  $\text{NH}_2$  của chuỗi PBLA được xác định dựa trên tỷ lệ mol tương đối giữa các proton methyl của Tocopheryl succinate ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$ ,  $\delta = 1,8 - 2,0$  ppm) và nhóm  $\alpha\text{-CH}$  ( $-\text{COCHNH}-$ ,  $\delta = 4,7$  ppm) trong phổ  $^1\text{H NMR}$  (Hình 3.10).



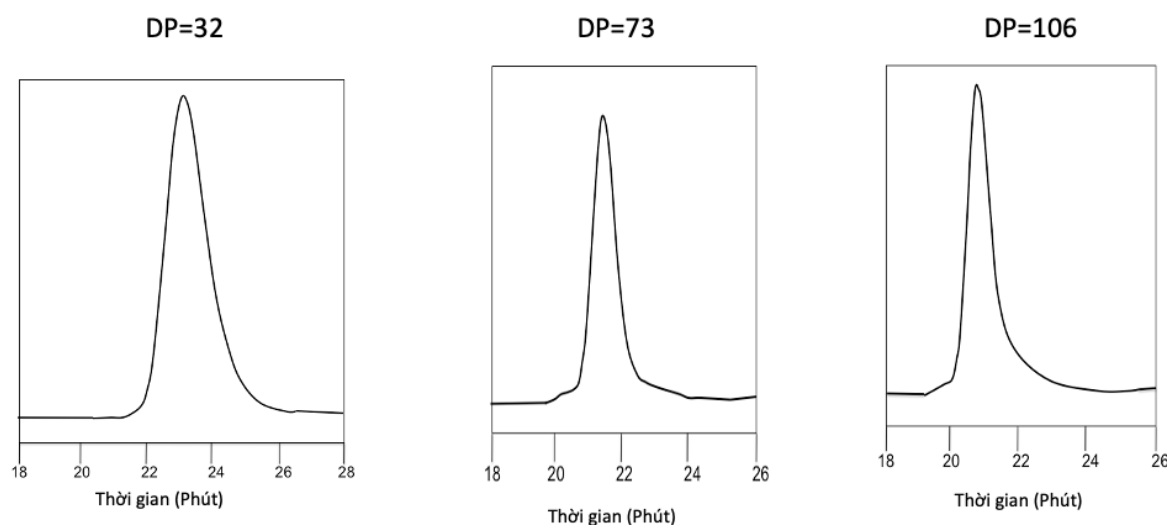
**Hình 3. 10: Phổ  $^1\text{H NMR}$  của PBLA ( $DP = 20$ ) trong  $\text{DMSO-d}_6$  ở  $80^\circ\text{C}$  (A) và phép đo GPC (B)**

Các polyme PBLA (DP = 32, 73, 106) được phản ứng với N-Succinimidyl Tocopheryl succinate trong cùng điều kiện với PBLA DP = 20. Khi so sánh khả năng liên kết của Tocopherol với đầu mút PBLA ở các mức độ polymer hóa khác nhau, tỷ lệ chuyển đổi giảm khi chuỗi polyme dài hơn (Bảng 3.7). Nguyên nhân là do cấu trúc cuộn ngẫu nhiên (random coil), nhóm amine đầu mút của các polyme có DP cao khó tương tác với nhóm N-hydroxysuccinate hoạt hóa của Tocopheryl succinate. Thời gian phản ứng lâu hơn là cần thiết để hình thành liên kết amide giữa PBLA và N-Succinimidyl Tocopheryl succinate.

**Bảng 3. 7: Tổng hợp PBLA-Toc**

	DP = 20	DP = 32	DP = 73	DP = 106
Tỷ lệ chuyển đổi (%)	81%	78%	73%	68%
$M_w/M_n$	1.14	1.15	1.08	1.12

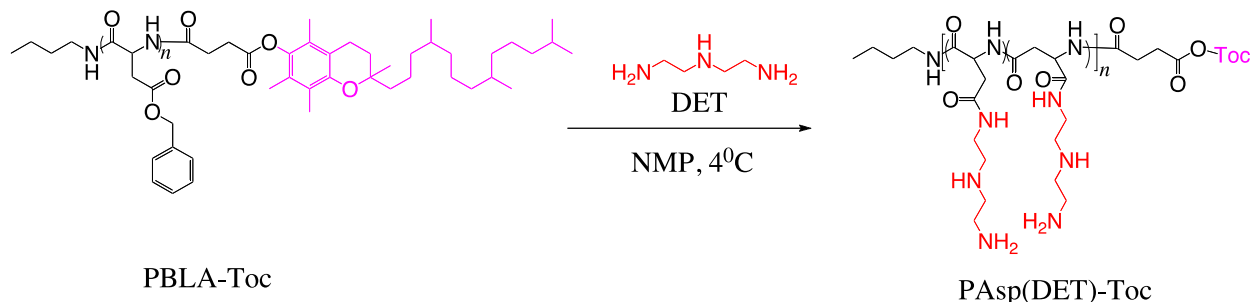
Phép đo NMP-GPC xác nhận rằng việc liên kết Tocopherol với chuỗi polyme PBLA không làm ảnh hưởng đến cấu trúc của polyme (Hình 3.11). Sự gia tăng khối lượng polyme là hợp lý do sự bổ sung nhóm Tocopherol vào đầu mút PBLA.



**Hình 3. 11: Phép đo sắc ký thẩm thấu gel-GPC của PBLA-Toc với các DP khác nhau (32, 73, 106)**

### 3.2.4. Tổng hợp PAsp(DET)-Toc

PBLA-Toc được thực hiện amin hóa bằng diethylenetriamine (DET) trong NMP trong điều kiện nhẹ. Phản ứng được mô tả trong Hình 3.12.

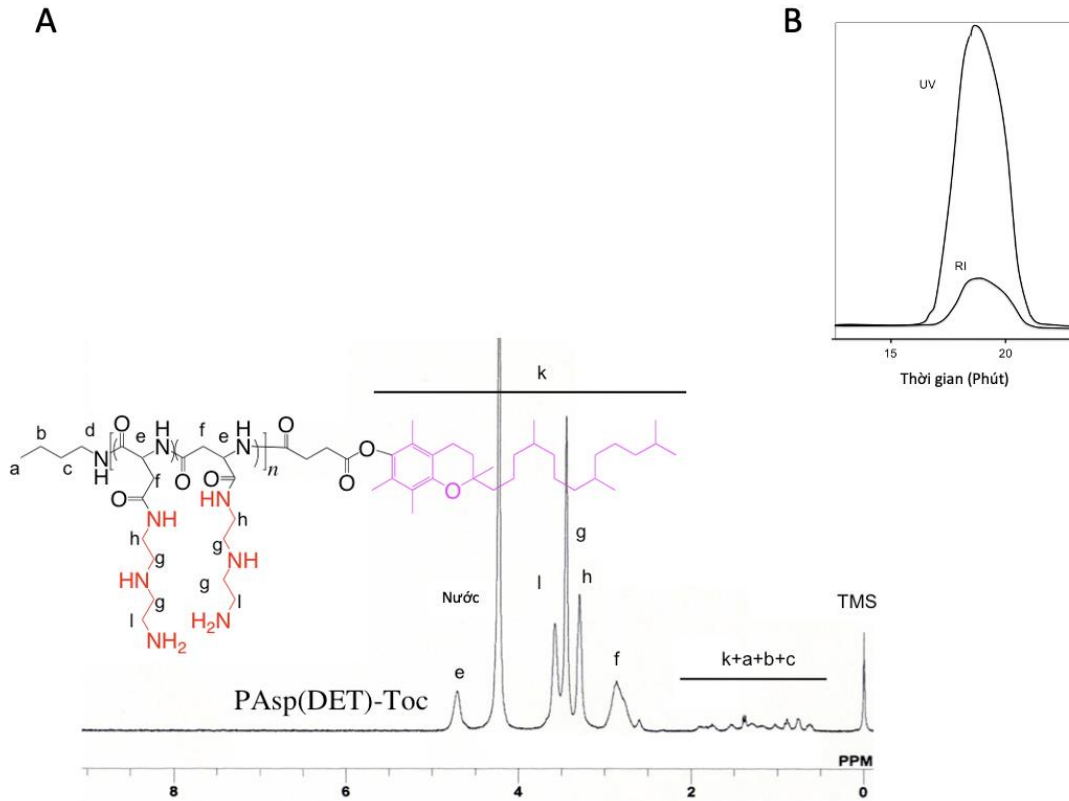


**Hình 3. 12: Tổng hợp PAsp(DET)-Toc thông qua phản ứng amin hóa với DET**

Một loạt các chuỗi nhánh cationic từ nền tảng PBLA duy nhất đã được chuẩn bị thông qua phản ứng amin hóa định lượng. Phản ứng bắt đầu bằng việc hoạt hóa nguyên tử nitơ trong chuỗi chính bởi một amin hoạt động như một base yếu, tạo liên kết hydro với proton của nhóm amide. Tiếp theo, nguyên tử nitơ được hoạt hóa sẽ tấn công nucleophile vào nguyên tử carbon của nhóm carbonyl trong chuỗi nhánh, tạo thành vòng succinimidyl. Sau đó, một amin tiếp tục tấn công nucleophile vào một trong hai nhóm carbonyl trong vòng succinimidyl, dẫn đến việc chuyển đổi hiệu quả thành dẫn xuất poly(aspartamide) N-thay thế. Do đó, phản ứng amin hóa định lượng không ảnh hưởng đến liên kết amide giữa PBLA và Tocopheryl succinate. Kết quả này cũng được xác nhận bởi phổ  $^1\text{H}$  NMR (Hình 3.13).

Phổ  $^1\text{H}$  NMR của PAsp(DET)-Toc cho thấy sự xuất hiện của các nhóm ethylene trong cấu trúc 1,2-diaminoethane (PAsp(DET):  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$ ,  $\delta = 3,2-3,6$  ppm), trong khi các đỉnh từ benzyl biến mất, chứng minh sự thay thế bằng DET đã diễn ra.

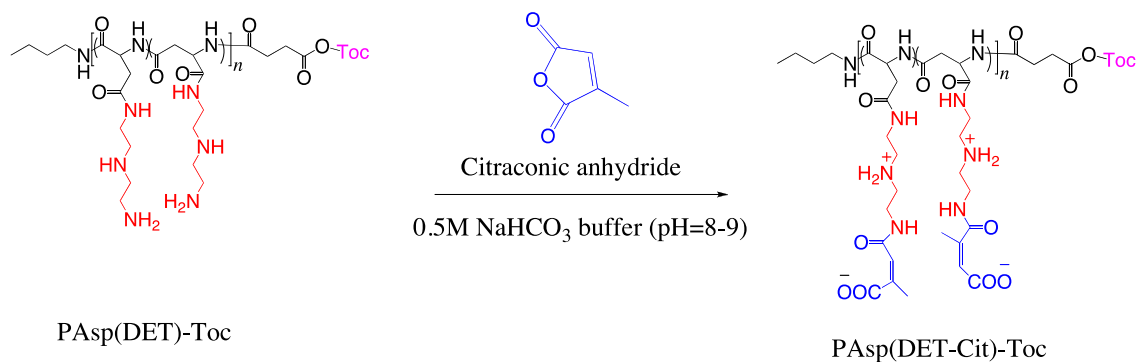
Từ biểu đồ HPLC, polyme PAsp(DET)-Toc không cho thấy sự phân hủy trong quá trình amin hóa bằng DET ở  $4^\circ\text{C}$ . Kết quả tương tự cũng thu được với các chuỗi PBLA có DP cao hơn, khẳng định rằng điều kiện phản ứng này phù hợp cho quá trình amin hóa PBLA-Toc.



**Hình 3. 13: Phổ <sup>1</sup>H NMR của PAsp(DET)-Toc (DP = 20) trong D<sub>2</sub>O ở 80°C (A) và biểu đồ HPLC (10 mM AcOH, nhiệt độ 25°C, pH 4,7, 2 mg/ml, phát hiện RI và UV) (B)**

### 3.2.5. Tổng hợp PAsp(DET-Cit) – Toc

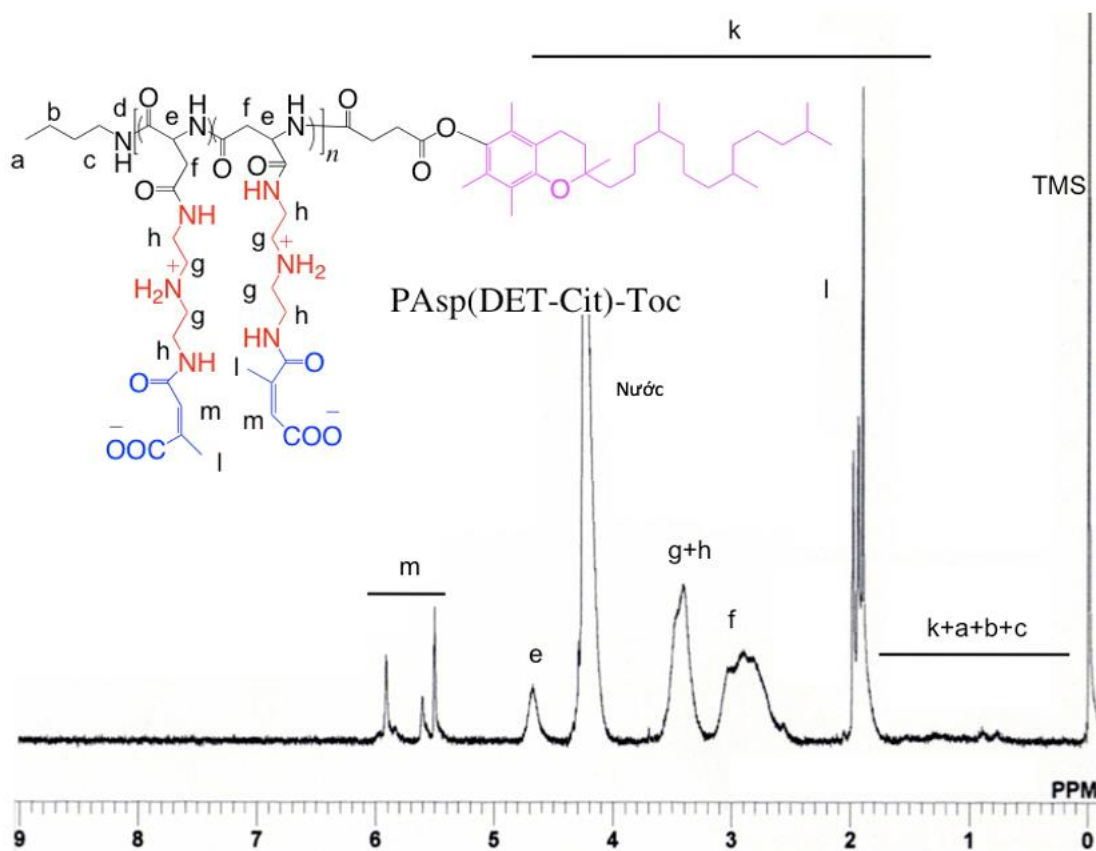
Phản ứng giữa PAsp(DET)-Toc và Citraconic anhydride được thực hiện trong dung dịch đệm NaHCO<sub>3</sub> 0.5M (pH = 8-9) (Sơ đồ 3.14).



**Hình 3. 14: Tổng hợp PAsp(DET-Cit)-Toc**



Sản phẩm được xác nhận bằng phổ  $^1\text{H}$  NMR. Nhóm methyl ( $\text{CH}_3\text{-}$ ,  $\delta = 1,9$  ppm) và nhóm methyne ( $-\text{CH}-$ ,  $\delta = 5,5\text{-}5,9$  ppm) của citraconic xuất hiện trong phổ  $^1\text{H}$  NMR (Hình 3.15). Các đỉnh của nhóm methyne được giải thích bởi cấu trúc liên kết đôi ( $\text{C}=\text{C}$ ) và sự liên kết của các nhóm CO khác nhau với DET.

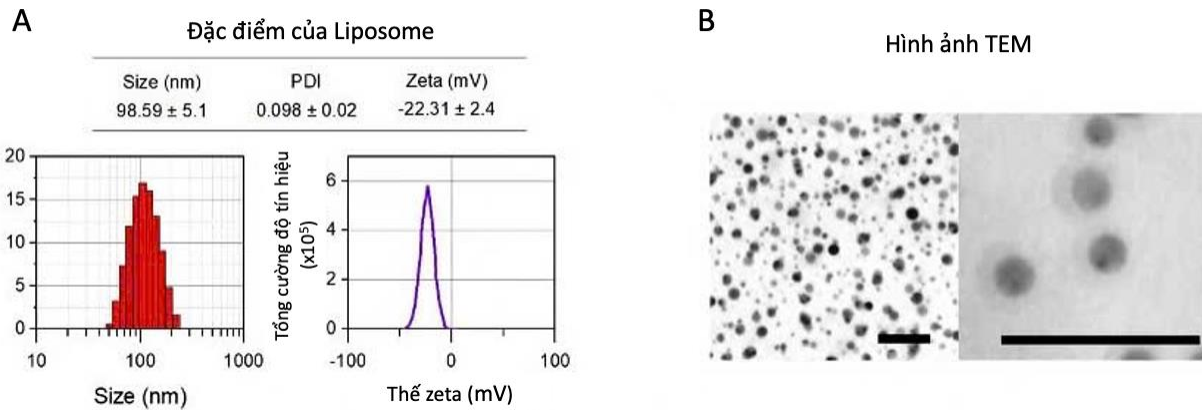


Hình 3. 15: Phổ  $^1\text{H}$  NMR của PAsp(DET-Cit)-Toc ( $DP = 20$ ) trong  $\text{D}_2\text{O}$  ở  $80^\circ\text{C}$

### 3.3. Tổng hợp và đặc điểm của CCP- Liposome

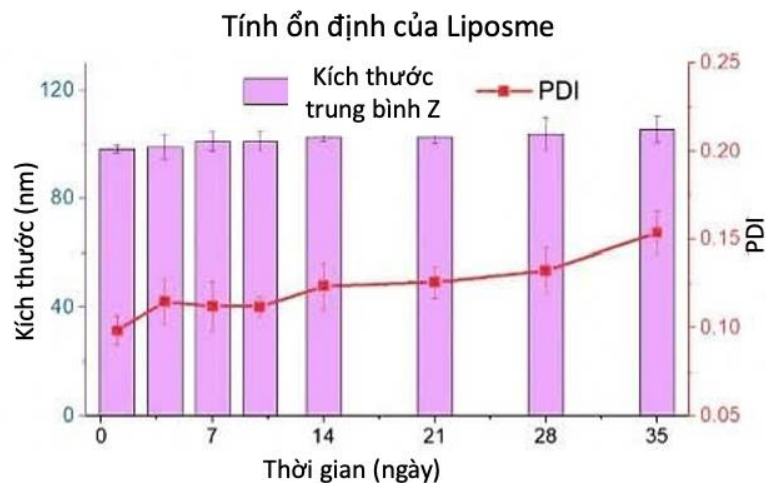
Phương pháp tán xạ ánh sáng động (**Dynamic Light Scattering - DLS**) được sử dụng để phân tích kích thước và tính chất bề mặt của CCP-liposome, trong khi kính hiển vi điện tử truyền qua (**Transmission Electron Microscopy - TEM**) được áp dụng để quan sát đặc điểm hình thái. Kết quả đo DLS cho thấy kích thước trung bình của các hạt CCP-liposome là  $98,59 \pm 5,1$  nm, với chỉ số đa phân tán (PDI) là  $0,098 \pm 0,02$  và thế zeta âm  $-22,31 \pm 2,4$  mV (Hình 3.16A). Quan sát qua TEM cho

thấy các hạt CCP-liposome có hình dạng cầu rõ ràng, thể hiện tính đồng nhất về mặt hình thái (**Hình 3.16B**).



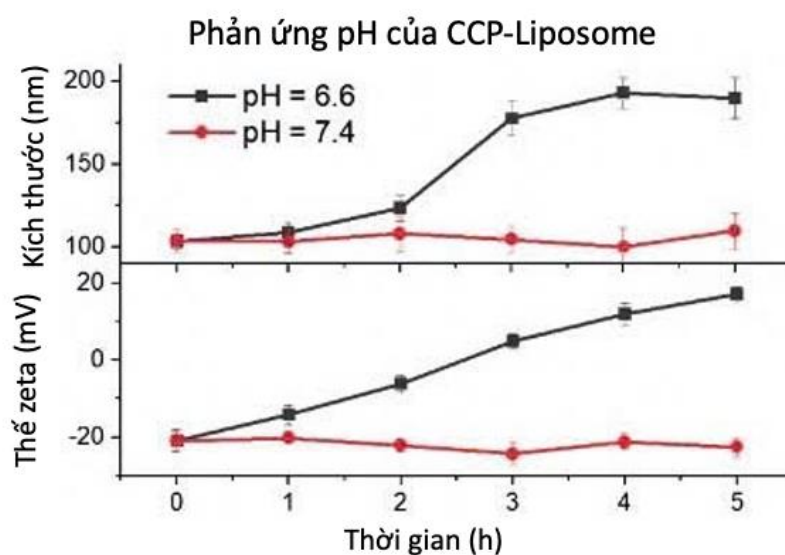
**Hình 3. 16:(A)** Phân bố điện tích bề mặt được thể hiện thông qua kích thước, PDI và thế zeta của CCP–liposome và **(B)** Hình ảnh CCP–liposome chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) ở các độ phóng đại khác nhau. Thanh tỷ lệ chỉ ra kích thước 500 nm

Để xác nhận tính ổn định, CCP–liposome đã trải qua phân tích kích thước trung bình và PDI trong vòng 35 ngày (**Hình 3.17**). Tính ổn định của liposome được chứng minh qua sự thay đổi không đáng kể về kích thước trung bình và PDI trong suốt thời gian quan sát 35 ngày.



**Hình 3. 17:** Đánh giá tính ổn định của CCP–liposome trong vòng 35 ngày bằng cách theo dõi sự thay đổi về kích thước trung bình và chỉ số đa phân tán (PDI).

Sự biến đổi giá trị thế zeta phản ánh đặc tính chuyển đổi điện tích của CCP-liposome được trình bày trong **Hình 3.18**. Tại pH 7,4, phức hợp CCP-liposome duy trì thế zeta ổn định khoảng -20 mV, cho thấy tính ổn định của hệ trong môi trường trung tính. Tuy nhiên, khi pH giảm xuống 6,6, thế zeta dần chuyển từ âm sang dương, do sự phân hủy của nhóm amide cis-aconitic trong cấu trúc polymer. Sau 2 giờ ủ tại pH 6,6, thế zeta đạt 0 mV và tiếp tục tăng lên giá trị dương. Ngược lại, ở pH 7,4, không quan sát thấy sự thay đổi nào về giá trị thế zeta, khẳng định tính ổn định của hệ trong môi trường trung tính.

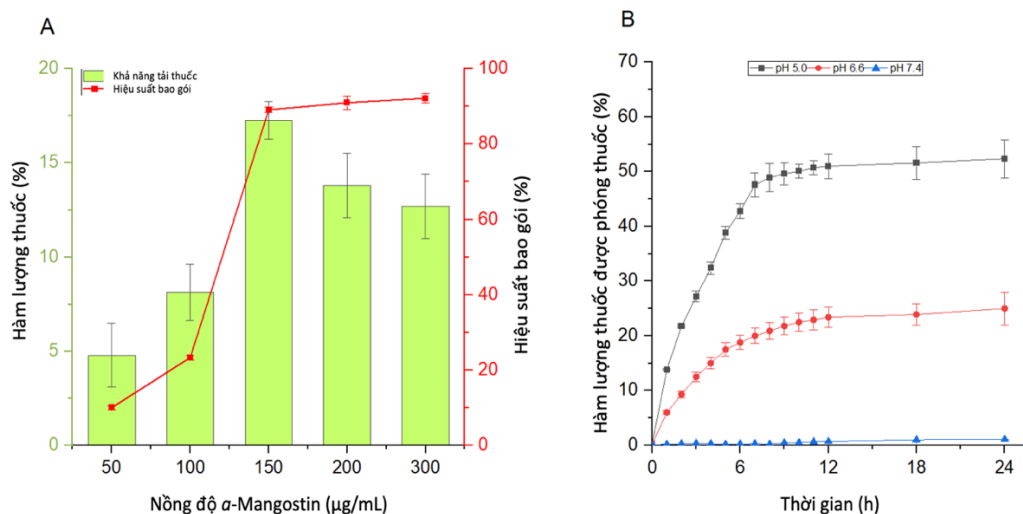


**Hình 3. 18:** Kiểm tra sự thay đổi kích thước và thế zeta của CCP-liposome trong các dung dịch có pH khác nhau trong khoảng thời gian 5 giờ. Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD) ( $n = 3$ ).

Ngoài ra, sự biến đổi kích thước đáng kể của phức hợp CCP-liposome cũng được kích hoạt bởi quá trình chuyển đổi điện tích. Như trong **Hình 3.18**, tại pH 7,4, phức hợp CCP-liposome duy trì kích thước ổn định khoảng 100 nm, cho thấy tính đồng nhất của các hạt trong môi trường trung tính. Tuy nhiên, khi pH giảm xuống 6,6, kích thước các hạt tăng đột ngột, hình thành các cụm lớn với đường kính gần 200 nm. Hiện tượng này có thể được giải thích bởi sự giảm lực đẩy tĩnh điện giữa các hạt, là kết quả của quá trình trung hòa điện tích một phần sau 1 giờ ủ, và hoàn toàn sau 2 giờ trong môi trường axit với pH 6,6.

### 3.4. Tỷ lệ giải phóng và hiệu suất bao gói của CCP-Liposome

Dung dịch sau thẩm tách được thêm một lượng dung dịch đệm mới tương đương để định lượng quá trình giải phóng dược chất từ CCP-liposome trong các khoảng thời gian xác định. Lượng  $\alpha$ -mangostin được giải phóng được đo bằng phương pháp quang phổ UV ở bước sóng 480 nm. Kết quả cho thấy hiệu suất tải thuốc đạt mức cao nhất, 17,4%, khi nồng độ  $\alpha$ -mangostin là 150  $\mu\text{g/mL}$  (**Đồ thị 3.5A**). Tuy nhiên, khi nồng độ tăng lên 200  $\mu\text{g/mL}$  và 300  $\mu\text{g/mL}$ , khả năng tải thuốc giảm còn 14,57% và 14%, tương ứng. Đặc biệt, ở nồng độ 150  $\mu\text{g/mL}$ , hiệu suất bao gói đạt gần 90%, cho thấy khả năng lưu giữ dược chất vượt trội trong hệ CCP-liposome.



**Đồ thị 3. 5: Biểu thị khả năng tải thuốc, hiệu suất bao gói và khả năng nhả thuốc của CCP-Liposome**

(A) Hàm lượng thuốc và hiệu suất bao gói.

(B) Hàm lượng thuốc được giải phóng của CCP-liposome chứa  $\alpha$ -mangostin.

Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD) ( $n = 3$ ).

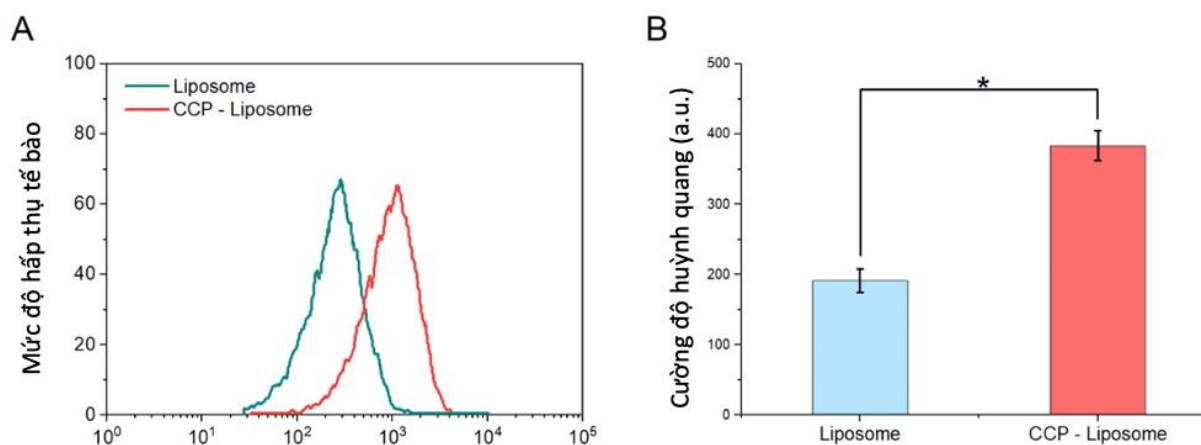
Đặc điểm giải phóng thuốc cho thấy sự phụ thuộc rõ rệt vào môi trường pH. Tại pH 7,4, tốc độ giải phóng  $\alpha$ -mangostin rất chậm và gần như không đáng kể (gần

0%) trong 24 giờ, chứng minh rằng thuốc được bao gói chặt chẽ trong CCP-liposome, điều này có lợi cho việc tuần hoàn trong cơ thể và giảm độc tính ngoài ý muốn. Ở môi trường pH 5,0, tốc độ giải phóng lại tăng đáng kể với một giai đoạn giải phóng nhanh ban đầu, đạt 50% sau 12 giờ và duy trì ổn định trong 24 giờ tiếp theo (**Đồ thị 3.5B**).

Hiện tượng giải phóng nhanh này có thể được giải thích bởi sự thủy phân pH của Cit-Toc tại pH 5,0, dẫn đến sự phá vỡ cấu trúc polymer và gia tăng khuếch tán được chất qua các hạt liposome trương nở. Những kết quả này cho thấy hệ CCP-liposome không chỉ hiệu quả trong việc bao gói mà còn có khả năng giải phóng thuốc có kiểm soát, phù hợp cho các ứng dụng điều trị hướng đích trong môi trường axit, như tại các khối u hoặc endosome.

### 3.5. Khả năng giải phóng thuốc khỏi thể nội bào (endosome)

Quá trình giải phóng thuốc nhanh chóng khỏi tiêu thể (lysosome) là rất cần thiết khi các hạt nano bị giữ lại bên trong lysosome sau quá trình nhập bào (endocytosis). Do đó, khả năng hấp thụ nội bào của các hạt nano và quá trình giải phóng thuốc đã được nghiên cứu.

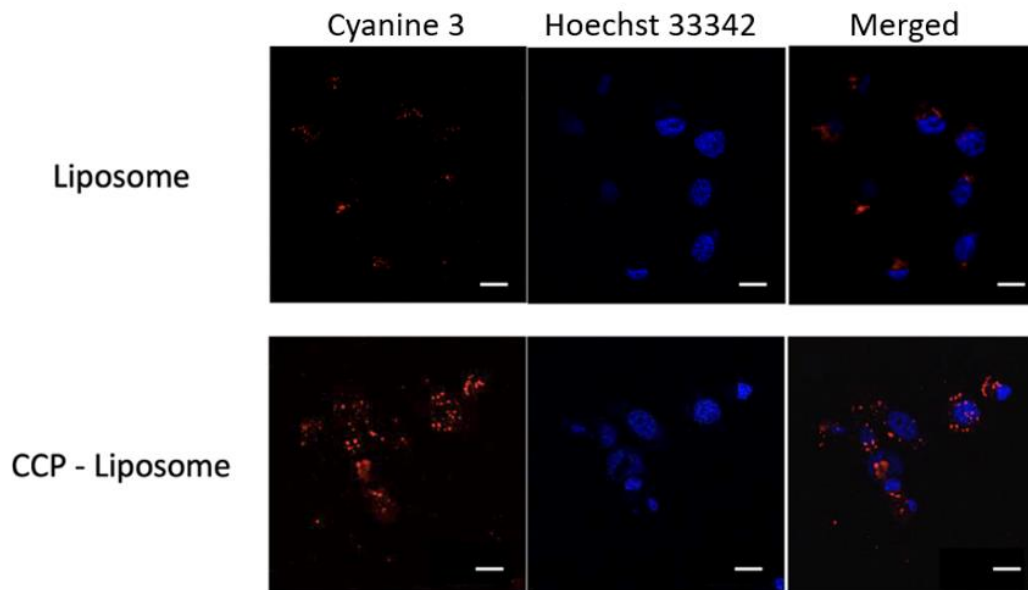


**Hình 3. 19: Khả năng giải phóng thuốc**

(A) Đỉnh huỳnh quang của liposome và CCP–liposome được hiển thị trên biểu đồ dòng tế bào (flow cytometry histogram).

**(B)** Cường độ huỳnh quang trong tế bào HepG2 được xử lý với liposome và CCP–liposome được định lượng. Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD), với  $n = 5$ ,  $P < 0,01$ .

Như thể hiện trong **Hình 3.19A**, cả liposome và CCP–liposome đều có khả năng xâm nhập vào tế bào. CCP–liposome cho thấy mức độ hấp thụ của tế bào cao hơn đáng kể so với các hạt liposome thông thường, cho thấy vai trò của CCP trên bề mặt trong việc tăng cường độ nhạy và hiệu quả tương tác của liposome với tế bào đích. Phân tích định lượng từ dữ liệu dòng tế bào cũng khẳng định kết quả này, như thể hiện trong **Hình 3.19B**.



**Hình 3. 20:** CLSM được sử dụng để theo dõi sự di chuyển nội bào của liposome và CCP–liposome. Cyanine 3 (màu đỏ) được sử dụng để hiển thị hình ảnh, trong khi nhân tế bào được nhuộm với Hoechst 33342 (màu xanh lam). Thanh tỷ lệ biểu thị kích thước 20  $\mu\text{m}$

Hình ảnh từ kính hiển vi đồng tiêu làm rõ hơn quá trình di chuyển của CCP-liposome và liposome vào trong tế bào. Sau 6 giờ ủ, tín hiệu huỳnh quang của CCP-liposome (màu đỏ) được quan sát rõ ràng trong tế bào HepG2, cho thấy sự xâm nhập hiệu quả của chúng vào bào tương. Ngược lại, tín hiệu huỳnh quang của liposome

thông thường chỉ phân bố ngẫu nhiên trên màng tế bào, không thể hiện sự xâm nhập sâu vào trong tế bào (**Hình 3.20**).

Những kết quả này cho thấy rằng sự gắn kết của **CCP** lên liposome không chỉ nâng cao khả năng tương tác với màng tế bào mà còn thúc đẩy quá trình hấp thụ nội bào, làm tăng hiệu quả vận chuyển thuốc đến đích trong tế bào.

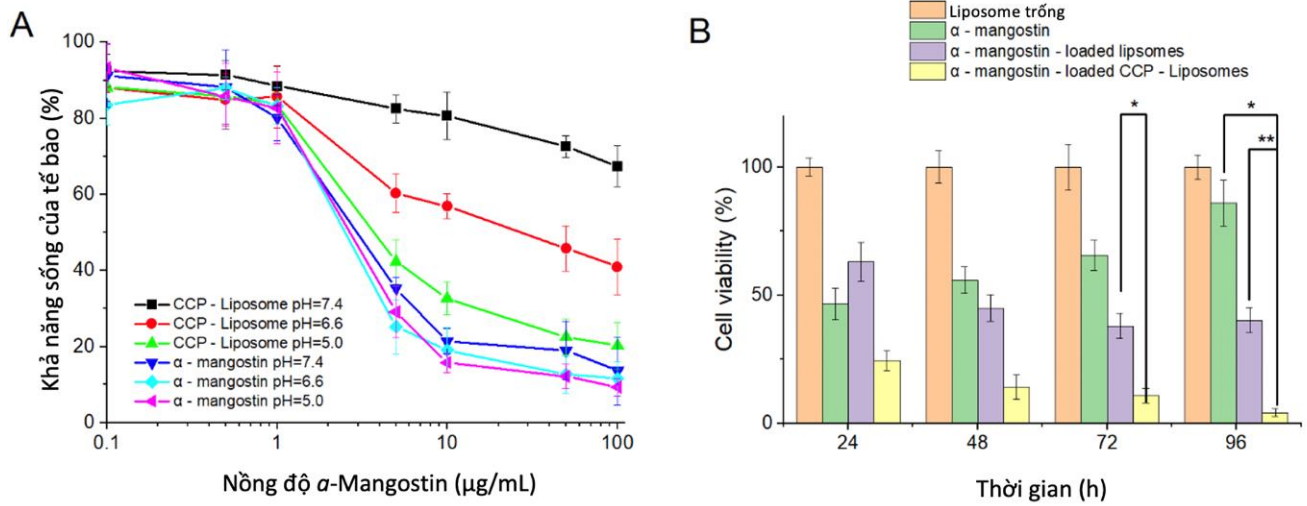
### **3.6. Độc tính tế bào *in vitro***

Độc tính tế bào của CCP–liposome chứa  $\alpha$ -mangostin được đo lường và so sánh với liposome chứa  $\alpha$ -mangostin và  $\alpha$ -mangostin tự do. Các tế bào được xử lý với các hợp chất hoạt tính và sản phẩm polymer trong 4 giờ trong các dung dịch đệm có giá trị pH khác nhau: 5,0; 6,6; và 7,4. Kết quả từ thử nghiệm MTT được thể hiện trong **Đồ thị 3.6**.

Sau 4 giờ xử lý, khả năng sống của tế bào khi được ủ với CCP–liposome chứa  $\alpha$ -mangostin trong dung dịch đệm pH 5,0 giảm đáng kể so với dung dịch pH 7,4 và 6,6 và gần tương đương với kết quả của  $\alpha$ -mangostin tự do (**Đồ thị 3.6A**). Kết quả này cho thấy có thể do môi trường axit thúc đẩy sự giải phóng  $\alpha$ -mangostin, dẫn đến độc tính tế bào cao hơn.

Ngoài ra, các mẫu này tiếp tục được kiểm tra trong các thí nghiệm theo thời gian (24–96 giờ xử lý). Liposome chứa  $\alpha$ -mangostin ban đầu ít hiệu quả hơn  $\alpha$ -mangostin tự do trên tế bào HepG2 sau 24 giờ. Tuy nhiên, sau 48 giờ, liposome chứa  $\alpha$ -mangostin giải phóng thêm được chất vào bên trong tế bào và do vậy độc tính tế bào cao hơn (**Đồ thị 3.6B**).

CCP–liposome chứa  $\alpha$ -mangostin thể hiện độc tính tế bào cao nhất so với các hệ liposome khác (liposome trống,  $\alpha$ -mangostin tự do và liposome chứa  $\alpha$ -mangostin). Kết quả này chứng minh rằng CCP–liposome chứa  $\alpha$ -mangostin không chỉ phân phối  $\alpha$ -mangostin hiệu quả hơn vào trong tế bào mà còn có khả năng bảo vệ hợp chất khỏi sự phân hủy trong endosome. Điều này khẳng định ưu thế vượt trội của hệ thống CCP-liposome trong việc cải thiện hiệu quả vận chuyển và hoạt tính của thuốc.



### **Đồ thị 3. 6: Khả năng sống sót của tế bào bệnh**

(A) Độc tính tế bào của  $\alpha$ -mangostin và CCP–liposome tải  $\alpha$ -mangostin trên dòng HepG2 trong thời gian ngắn (4 giờ) ở các điều kiện pH khác nhau (pH=5,0 , pH=6,6 và pH=7,4). Dải nồng độ  $\alpha$ -mangostin trong môi trường từ 0,1  $\mu\text{g/mL}$  đến 100  $\mu\text{g/mL}$ .

(B) Độc tính tế bào của CCP–liposome tải  $\alpha$ -mangostin theo thời gian (xử lý trong 24–96 giờ) với nồng độ  $\alpha$ -mangostin tương đương 5  $\mu\text{g/mL}$ .



## KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu được các kết quả sau:

Đã xây dựng quy trình chiết xuất và phân lập hợp chất  $\alpha$ -Mangostin ở điều kiện tối ưu: Nhiệt độ 45-50<sup>0</sup>C, thời gian 180 phút, công suất phát siêu 2,2 w/cm<sup>3</sup>, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu (ml/g): 5:1. Tiến hành phân lập hoạt chất  $\alpha$ -mangostin từ vỏ quả măng cụt theo quy trình tối ưu ta thu được hợp chất  $\alpha$ -Mangostin có độ tinh sạch là 98% với hiệu suất là 1,86%. Cấu trúc  $\alpha$ -mangostin được chứng minh bằng các dữ kiện phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều.

Đã tổng hợp thành công Polymer thay đổi điện tích (CCP) - một polyme có khả năng chuyển đổi điện tích (*charge-conversion property*), đã được tích hợp vào liposome nhằm tạo ra hệ thống CCP-liposome, giúp tăng cường hiệu quả vận chuyển thuốc đến tế bào HepG2. Liposome CCP có kích thước là  $98,59 \pm 5,1$  nm, chỉ số đa phân tán (PDI) là  $0,098 \pm 0,02$  và thế zeta âm  $-22,31 \pm 2,4$  mV.

Liposome CCP cho thấy hiệu suất nạp thuốc đạt 17,4% với nồng độ 150  $\mu$ g/mL  $\alpha$ -mangostin và giải phóng 50% thuốc trong môi trường axit sau 12 giờ. Phân tích hình ảnh huỳnh quang tế bào cho thấy PAsp(DET-Cit)-Toc có vai trò cho quá trình giải phóng khỏi thể nội bào (endosome) và liposome CCP chứa  $\alpha$ -mangostin có hoạt tính ức chế tế bào mạnh khi làm giảm tỷ sống sót của tế bào xuống còn 7% sau 96 giờ.

## KIẾN NGHỊ

Mặc dù có những tiến bộ đáng kể, nhưng để ứng dụng thực tế hóa hệ liposome chứa  *$\alpha$ -mangostin* trong điều trị ung thư, cần tiến hành thêm các nghiên cứu tiếp theo như thử nghiệm trên động vật và thử nghiệm lâm sàng. Việc này sẽ giúp đảm bảo ổn định và hiệu suất của hệ liposome, làm nền tảng cho các ứng dụng trong lĩnh vực y học và điều trị bệnh lý. Những nghiên cứu tiếp theo có thể tập trung vào điều chỉnh thành phần, kích thước, và mức độ chức năng của liposome để đạt được hiệu suất tốt nhất và đồng thời giảm tác động phụ có thể xuất hiện trong quá trình điều trị. Điều này đặt ra những thách thức, nhưng cũng mở ra nhiều cơ hội trong việc phát triển công nghệ này và cải thiện khả năng điều trị các loại ung thư khác nhau.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ**

1. Trang Thị Kiều Phan, Hoàng Huy Nguyễn, Xuân Thị Nguyễn, Tùng Văn Nguyễn, Linh Anh Dương, Linh Phương Nguyễn, Uyên Thu Phạm, Hồng  
Fabrication of a Charge - Conversion Polymer-Liposome for Enhancing  
Endosomal Escape of Drug Delivery System for  $\alpha$ -Mangostin, *Processes*,  
11(8), 1-16. Nhung Lê, Toàn Quốc Trần, Dương Thành Nguyễn, Dung Thùy  
Phạm, 2023.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Phong, N. T., Pham, T. H., Le, V. A.**, 2021, Thành phần hóa học và các ứng dụng y học của  $\alpha$ -mangostin trong vỏ măng cụt, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 20(6), tr. 45-53.
2. **Huỳnh Thị Như Quỳnh, Lê Quốc Anh, Nguyễn Thị Thu Hằng**, 2024, Ứng dụng dung môi ethanol để tối ưu hóa quy trình chiết xuất  $\alpha$ -mangostin từ vỏ măng cụt, *Tạp chí Hóa học Việt Nam*, 62(1), tr. 23-30.
3. **Chen, Y. Z., Wang, L. P., Zhang, J.**, 2019, Effects of  $\alpha$ -mangostin on breast cancer cells and its potential mechanisms, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145(8), tr. 1521-1531.
4. **Tan, S. H., Lim, K. J., Choo, A. S.**, 2018, Preclinical evaluation of  $\alpha$ -mangostin in tumor reduction in mice, *Experimental Oncology*, 40(4), tr. 304-310.
5. **Nguyen, T. T., Pham, Q. H., Tran, M. N.**, 2022, Challenges in the bioavailability of  $\alpha$ -mangostin and strategies for enhancement, *Pharmaceutical Sciences Review*, 12(3), tr. 58-67.
6. **Wang, X. H., Liu, R. T., Zhao, Q.**, 2021, Toxicity and resistance mechanisms of  $\alpha$ -mangostin in cancer treatment, *Asian Journal of Pharmacology*, 33(2), tr. 110-118.
7. **Zhou, H., Zhang, L., Chen, Q.**, 2016, AgNPs@MnO<sub>2</sub>-DOX-Apt nanosensors for targeted cancer therapy, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 12(8), tr. 1405-1416.
8. **Nguyen, P. T., Tran, V. H., Le, M. T.**, 2020, Advances in polymer-based drug delivery systems for cancer treatment, *Materials Science and Engineering: C*, 107(2), tr. 110215.
9. **Smith, A. M., Duan, N., Jones, M. T.**, 2020, Metallic nanoparticles in targeted drug delivery systems, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 28(4), tr. 102274.
10. **Choi, S. H., Kim, Y. J., Park, S. E.**, 2021, Natural polymer nanoparticles in drug delivery: Application and challenges, *Carbohydrate Polymers*, 260(1), tr. 117794.
11. **Lee, J. W., Park, K. S., Kim, H. J.**, 2019, Use of functionalized chitosan for enhanced tumor targeting, *International Journal of Biological Macromolecules*, 133(4), tr. 398-407.
12. **Fang, Y. H., Li, C. Z., Zhao, Y. H.**, 2020, Gold nanoparticles in cancer therapy and imaging, *Theranostics*, 10(2), tr. 921-932.
13. **Chen, W. X., Wang, L. T., Zhang, J. Y.**, 2021, Development of polymeric nanoparticles for drug delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(5), tr. 1972-1985.

14. **Tran, Q. H., Le, A. V., Nguyen, T. N.**, 2019, Graphene oxide and its biomedical applications, *Nanomedicine*, 14(4), tr. 563-576.
15. **Zhang, W., Wang, J., Chen, X.**, 2021, Graphene oxide in biomedical applications: A review, *Biomaterials Science*, 9(7), tr. 2208-2232.
16. **Fang, T. S., Xiao, J. H., Li, X. M.**, 2020, Advances in chitosan-based drug delivery systems, *Carbohydrate Polymers*, 229(1), tr. 115456.
17. **Wang, Y., Zhao, Z., Liu, Z.**, 2018, Functionalization of nanoparticles for enhanced drug delivery to cancer, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132(2), tr. 3-15.
18. **Tomalia, D. A., Naylor, A. M., Goddard, W. A.**, 1985, Starburst dendrimers: Molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter, *Angewandte Chemie International Edition*, 29(2), tr. 138-175.
19. **Lee, J. H., Yeo, Y.**, 2015, Controlled drug delivery: advances and challenges, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97(1), tr. 1-3.
20. **Tomalia, D. A., Christensen, J. B., Boas, U.**, 2012, Dendrimers, dendrons, and dendritic polymers: Discovery, applications, and the future, *Cambridge University Press*, Cambridge, Anh Quốc.
21. **He, H., Pham-Huy, L. A., Pham-Huy, C.**, 2017, Targeted delivery systems for cancer treatment, *Current Pharmaceutical Design*, 23(1), tr. 225-243.
22. **Zhang, W., Wang, J., Chen, X.**, 2021, Advances in dendrimer-based drug delivery systems, *Biomaterials Science*, 9(5), tr. 1804-1815.
23. **Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C.**, 1965, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *Journal of Molecular Biology*, 13(1), tr. 238-252.
24. **Torchilin, V. P.**, 2005, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(2), tr. 145-160.
25. **Allen, T. M., Cullis, P. R.**, 2013, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), tr. 36-48.
26. **Barenholz, Y.**, 2012, Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *Journal of Controlled Release*, 160(2), tr. 117-134.
27. **Feng, S. S., Chien, S.**, 2003, Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases, *Chemical Engineering Science*, 58(18), tr. 4087-4114.
28. **Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D. B., Papahadjopoulos, D.**, 1999, Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors, *Pharmacological Reviews*, 51(4), tr. 691-743.

29. **Batzri, S., Korn, E. D.**, 1973, Single bilayer liposomes prepared without sonication, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 298(4), tr. 1015-1019.
30. **Szoka, F., Papahadjopoulos, D.**, 1978, Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(9), tr. 4194-4198.
31. **Gabizon, A., Shmeeda, H., Barenholz, Y.**, 2016, Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: Review of animal and human studies, *Clinical Pharmacokinetics*, 42(5), tr. 419-436.
32. **Pandey, R., Khuller, G. K.**, 2005, Antitubercular inhaled therapy: liposome and nanoparticle-based drug delivery systems, *Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences*, 47(3), tr. 171-176.
33. **Allen, T. M., Hansen, C., Rutledge, J.**, 2004, Liposomes in targeted drug delivery, *Drug Delivery Reviews*, 56(1), tr. 69-86.
34. **Tan, S. H., Lim, K. J., Choo, A. S.**, 2018, Charge-conversion polymers for targeted drug delivery, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 14(8), tr. 1237-1245.
35. **Silverstein R. M., et al.**, 2015, Spectrometric Identification of Organic Compounds, 8th ed., John Wiley & Sons
36. **Liu, X., Zhang, J., & Wang, L.**, 2015, Characterization and structural identification of  $\alpha$ -mangostin using NMR spectroscopy, *Journal of Natural Products*, 78(10), 2439–2446

Article

# Fabrication of a Charge-Conversion Polymer—Liposome for Enhancing Endosomal Escape of Drug Delivery System for $\alpha$ -Mangostin

Trang Thi Kieu Phan <sup>1,2,3</sup>, Hoang Huy Nguyen <sup>2</sup>, Xuan Thi Nguyen <sup>2</sup>, Tung Van Nguyen <sup>2</sup>, Linh Anh Duong <sup>2</sup>, Linh Phuong Nguyen <sup>4</sup>, Uyen Thu Pham <sup>5</sup>, Hong Nhung Le <sup>1,6</sup>, Toan Quoc Tran <sup>1,6</sup>, Duong Thanh Nguyen <sup>1,5,\*</sup> and Dung Thuy Nguyen Pham <sup>7,8,\*</sup>

- 1 Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), 18 Hoang Quoc Viet St., Cau Giay Dist., Hanoi 10000, Vietnam; phantrang.2508@gmail.com (T.T.K.P.); nhungtin2k@gmail.com (H.N.L.); tranquoctoan2010@gmail.com (T.Q.T.)
  - 2 Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), 18 Hoang Quoc Viet St., Cau Giay Dist., Hanoi 10000, Vietnam; myphamvemb@gmail.com (H.H.N.); dtnlab.vast@gmail.com (X.T.N.); tungnv@igr.ac.vn (T.V.N.); dalinh@igr.ac.vn (L.A.D.)
  - 3 Vinmec Research Institute of Stem Cell and Gene Technology, Hanoi 10000, Vietnam
  - 4 School of Preventive Medicine and Public Health, Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung St., Dong Da Dist., Hanoi 10000, Vietnam; nplinh239@gmail.com
  - 5 Institute for Tropical Technology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), 18 Hoang Quoc Viet St., Cau Giay Dist., Hanoi 10000, Vietnam; phamuyenpjj@gmail.com
  - 6 Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), 18 Hoang Quoc Viet St., Cau Giay Dist., Hanoi 10000, Vietnam
  - 7 NTT Institute of Applied Technology and Sustainable Development, Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City 70000, Vietnam
  - 8 Faculty of Environmental and Food Engineering, Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City 70000, Vietnam
- \* Correspondence: ntduong182@gmail.com (D.T.N.); pntthuydung@ntt.edu.vn or pntdung@ntt.edu.vn (D.T.N.P.)



check for updates

Citation: Phan, T.T.K.; Nguyen, H.H.; Nguyen, X.T.; Van Nguyen, T.; Duong, L.A.; Nguyen, L.P.; Pham, U.T.; Le, H.N.; Tran, T.Q.; Nguyen, D.T.; et al. Fabrication of a Charge-Conversion Polymer—Liposome for Enhancing Endosomal Escape of Drug Delivery System for  $\alpha$ -Mangostin. *Processes* 2023, 11, 2344. <https://doi.org/10.3390/pr11082344>

Academic Editor: Roberta Campardelli

Received: 5 June 2023  
Revised: 26 June 2023  
Accepted: 12 July 2023  
Published: 4 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:**  $\alpha$ -Mangostin, which is a natural xanthone compound, inhibits the metastasis and survival of various cancer cell types. However, its therapeutic effectiveness is limited by low water solubility and very poor absorption. There are several studies that developed the drug delivery system for  $\alpha$ -mangostin, but they are still a remaining challenge. Drug delivery techniques are severely hampered by the breakdown of nanoparticles inside endosomes. The abrasive chemical environment in these compartments causes both the nanoparticles and the encapsulated  $\alpha$ -mangostin to degrade throughout the course of the voyage. Intracellular defenses against external materials refer to this collective mechanism. A pH-responsive liposome named PAsp(DET-Cit)-Toc, made of lipids and a charge-conversion polymer (CCP), has been created for the targeted transport of  $\alpha$ -mangostin in order to avoid this deteriorative outcome. The average hydrodynamic size of CCP-liposome particles is  $98.59 \pm 5.1$  nm with a PDI of  $0.098 \pm 0.02$  and a negative zeta potential of  $22.31 \pm 2.4$  mV. TEM showed the shape of the spherical CCP-liposomes.  $\alpha$ -Mangostin is successfully captured inside CCP-liposome and the loading yield reached the highest encapsulation efficiency of 83% with 150  $\mu$ g/mL of  $\alpha$ -mangostin. In the acidic condition of pH 5.0, an initial burst of  $\alpha$ -mangostin reached 50% after 6 h in buffer solution. CCP-liposomes could escape from endosomes even after 3 h, and almost 80% of CCP-liposomes escaped after 24 h. The cell ability of  $\alpha$ -mangostin-loaded-CCP-liposome incubated in buffer solutions of 5.0 decreased significantly and was close to free  $\alpha$ -mangostin. Our data proved that  $\alpha$ -mangostin-loaded CCP-liposome delivered more effectively  $\alpha$ -mangostin into cells and prevented the degradation of  $\alpha$ -mangostin inside cells, especially endosomal degradation.

**Keywords:** liposome; charge-conversion polymer;  $\alpha$ -mangostin; DDS

## 1. Introduction

The application of natural based-compound products is a promising therapy for disease treatment, especially cancer.  $\alpha$ -Mangostin is known as a xanthone derivate isolated from the pericarp of the mangosteen fruit of *Garcinia mangostana* Linn. Scientists' interest in this compound has grown as a result of its potent anticancer properties [1–4].  $\alpha$ -Mangostin has proved effective in several cancer types, such as human prostate carcinoma [5], lung adenocarcinoma cells [6,7], and breast adenocarcinoma [2,8]. Despite its potential biological and pharmacological capabilities in cancer treatment,  $\alpha$ -mangostin has certain limitations, including weak water solubility, which results in relatively poor absorption, limiting its anticancer effects [9,10]. In order to overcome this limitation, nanoparticles, or nanomaterials, were developed as a drug delivery system to reach high water solubility and biodistribution [10–12]. The diversity of nanoformulation drug delivery systems, such as nanomicelles, liposomes, and solid lipid nanoparticles, have been designed to ameliorate the limitation of  $\alpha$ -mangostin and increase its delivery to achieve better therapeutic outcomes [10].

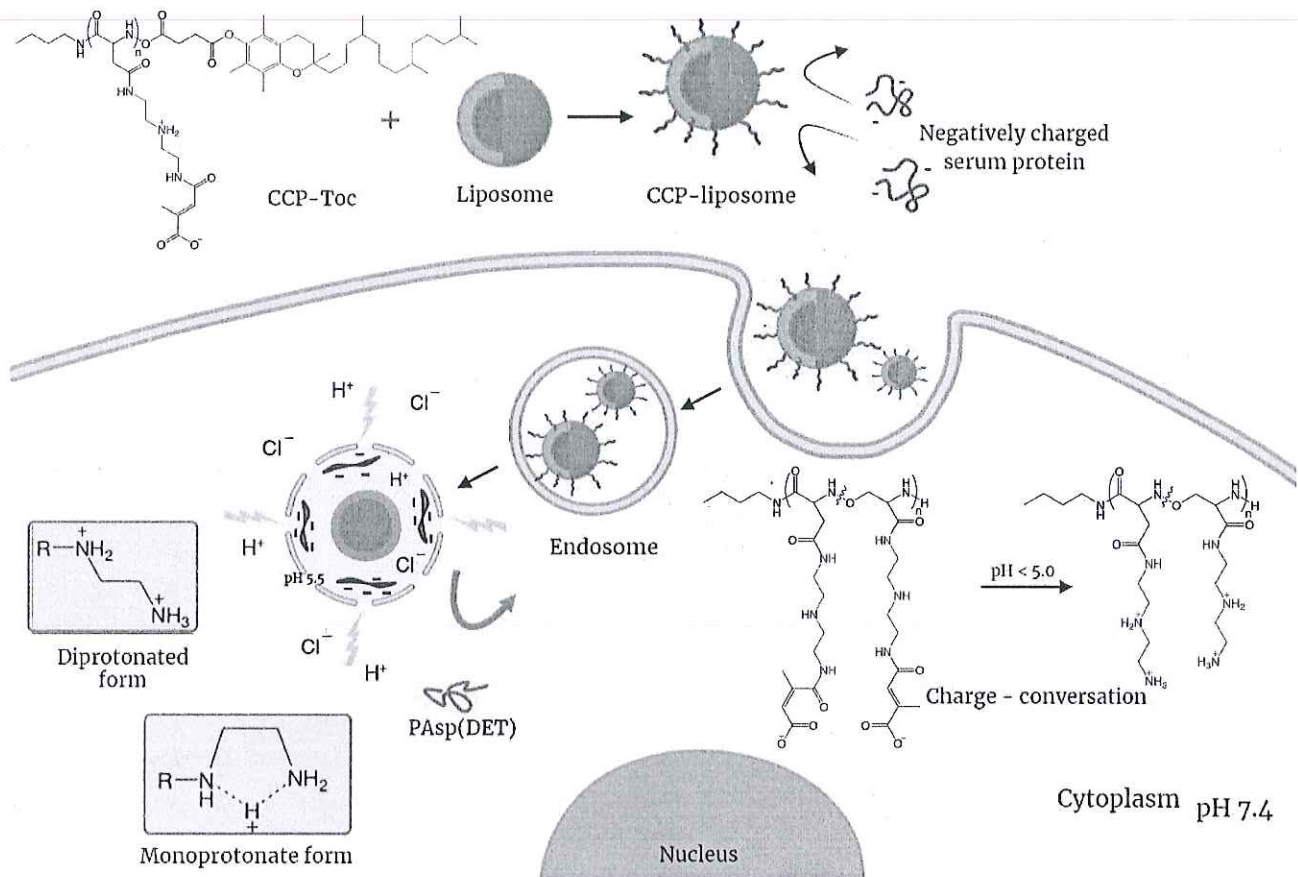
Liposomes are a revolutionary drug delivery system in several biomedical fields [13,14]. Liposomes exhibit various distinct benefits, including high biocompatibility, bioavailability, and degradability by stabilizing acquired molecules, overcoming hurdles to cell/tissue absorption, and enhancing drug/compound distribution to target areas in the body [15–17]. Therefore, liposomes can support protecting compounds from early inactivation, oxidation in the bloodstream, and upgrade aggregation in the tumor [13,18,19]. Recently, we have developed a liposome system that encapsulates  $\alpha$ -mangostin and is capable of releasing  $\alpha$ -mangostin to HepG2 cells [20]. Furthermore, the FDA has authorized various liposomal medications, including Myocet, Doxil, and Marqibo [21]. However, liposomes also encounter defense systems within cells with aims to recognize, neutralize and eliminate the invading foreign substances [13]. These barriers include the reticuloendothelial system, opsonization, and immunogenicity.

The liposome has a lipid bilayer structure, so it is easy to absorb into the membrane of cells and results in the release of the active compound into the extracellular fluid. In addition, the liposomes can interact with cells via receptor-mediated endocytosis, but it only permits vesicles of a maximum diameter of 150 nm, and liposomal content has the ability to endure the acidic environment of lysosomes. In addition, it is difficult for liposomes to escape endocytosis inside cells, in which endosomes fuse with liposomes leading to the degradation of liposomes via a low pH and the release of drugs [22–24]. For liposomes, early endosomes serve as a pivotal checkpoint that determines whether they will be recycled, excreted, or degraded. Liposomes have the potential to either evade the early endosome and progress further, leading to the formation of late endosomes, or they can become entrapped within the early endosome and subsequently merge with lysosomes to form endo-lysosome vesicles, resulting in their degradation [25]. As a result, in order to sustain their therapeutic effectiveness, drug-based liposome delivery systems must resist rapid breakdown and escape early endosomes.

Numerous studies have developed smart polymers that are responsive to environmental factors, including pH, temperature, and ionic strength. Additionally, pH-sensitive polymers have advanced to the point where they may include acetal, ester, and hydrazone into their acid-labile linkage, allowing the medication to be released from the endosome [26–28]. However, because these polymers have a positive charge, they are easily attached to molecules in blood arteries and are detected by the reticuloendothelial system throughout their circulation in the blood. Therefore, charge-conversion polymer (CCP) needs to possess negative charges at neutral pH conditions (blood or cytoplasm), and when entrapped by an endosome, CCP absorbed protons ( $H^+$ ) in the endosome environment to neutralize its negative charge at acidic pH (endosome or secondary lysosomes) result in endosome swell and burst [29,30]. Finally, the active compound will be released from the endosome.



In this research, we designed a drug delivery system including two main components (1) liposomes are composed of phospholipids and cholesterol as carriers; (2) CCP-Toc: a charge-conversion polymer, which has Toc side chains to bind to liposomes, this CCP-Toc supports liposome escape from endosomal degradation (Figure 1). This system applies to improve the limitation and delivery  $\alpha$ -mangostin and enhance its therapeutic performance for cancer treatment.



**Figure 1.** Schematic of endosomal escape mechanism of a charge-conversion polymer modified liposome.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

$\alpha$ -Mangostin, *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N,N*-dimethylformamide (DMF), dichloromethane (DCM), methanol (MeOH), diethylenetriamine (DET), and *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) were supplied by Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). The 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) was acquired from Sigma-Aldrich (Merck, Germany). Fuchs' approach was used to generate benzyl-L-aspartate *N*-carboxy-anhydride (BLA-NCA). [31]. Polycarbonate membrane filters were acquired from Whatman Inc. (Clifton, NJ, USA). Dioleoyl, palmitoyl-oleoyl, and dimyristoyl phosphatidyl ethanolamines (DOPE, POPE, and DMPE) were from Avanti-Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA). Carboxyfluorescein (CF), triton X-100, alpha-tocopheryl succinate ( $\alpha$ -TOS), chloroform, and phosphate-buffered saline (PBS) were obtained from Sigma-Aldrich. All other chemicals used were of analytical grade. The laser scanning confocal microscope TCS SP5 AOBS was acquired from Leica (Wetzlar, Germany).

## 2.2. Methods

### 2.2.1. Synthesis of Charge-Conversion Polymer PAsp(DET-Cit)-Toc

#### - Synthesis of *N*-Succinimidyl Tocopheryl Succinate

*N*-succinimidyl tocopheryl succinate was synthesized from tocopheryl succinate and *N*-hydroxysuccinimide with the presence of wet suck catalyst (WSC). Tocopheryl succinate (1.74 g, 3.28 mmol), NHS (0.38 g, 3.28 mmol), and EDC (0.64 g, 3.28 mmol) were dissolved in 50 mL DCM. The mixture was agitated at ambient temperature for a duration of 48 h under an argon atmosphere. Upon the completion of the reaction, the solution was rinsed with 100 mL of distilled water before the organic phase was extracted. With DCM, the aqueous phase was back-extracted twice in 50 mL each. After filtering, the mixed organic phase was dried with MgSO<sub>4</sub>. The substance was obtained as a yellow gel (1.9 g, 91% of the product) by isolating the product by solvent evaporation at decreased pressure. The conversion rate of carboxyl group in tocopheryl succinate was determined to be 100% from the peak intensity ratio of the ethylene groups in succinimide ring (–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–,  $\delta$  = 2.8 ppm) and methyl groups binding with pheryl of tocopherol ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C–,  $\delta$  = 1.9, 2.0, 2.1 ppm) in <sup>1</sup>H NMR spectrum (7.5 mg/mL, 25 °C).

#### - Synthesis of PBLA

*n*-Butylamine was used to ring-open polymerize the BLA–NCA, resulting in the synthesis of poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) (PBLA). BLA–NCA (2.49 g, 10 mmol) was collected and weighted inside an argon bag to prevent any contact with water and then dissolved in the mixture of DMF (10.0 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) at 40 °C. DCM was used to dilute *n*-butylamine (14.6 mg, 200 mmol) before introducing to the BLA–NCA solution. The polymerization was reacted for 48 h at 40 °C under argon. IR measurements were used to determine the end of polymerization.

The PBLA product was three times precipitated in ether (3 L) for purification. The resultant precipitate underwent filtering before being freeze-dried using benzene as the solvent. BLA unit has a polymerization degree of 20 based on <sup>1</sup>H NMR spectroscopy by comparing the ratio of the proton in methyl group (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–,  $\delta$  = 0.8 ppm) and the proton in benzyl group (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>–,  $\delta$  = 5.1 and 7.3 ppm) or the proton in  $\alpha$ -CH group (COCHNH–,  $\delta$  = 4.7 ppm). The monodispersity with  $M_w/M_n$  = 1.1 was confirmed by GPC measurement.

Similarly, PBLA polymers with various degrees of polymerization (DP = 32, 73, 106) were synthesized and characterized.

#### - Synthesis of PBLA–Toc

The conjugation of hydrophobic group  $\alpha$ -tocopherol to the end chain of a single platformed PBLA was prepared through the reaction of PBLA and *N*-hydroxysuccinimide-activated acid of tocopheryl succinate. Lyophilized PBLA (DP = 20;  $m$  = 150 mg, 0.0375 mmol) was dissolved in 10 mL DCM. The solution was then added to 50-folds of *N*-succinimidyl tocopheryl succinate (1.2 mg, 1.875 mmol) in 7 mL DCM. The solution was agitated at ambient temperature for a duration of 48 h under argon pressure. The product was collected by precipitation in 300 mL diethyl ether, followed by lyophilization to give white powder product (167.2 mg, 98%). The conversion rate of amine group in PBLA was calculated to be % from the peak intensity ratio of the methyl groups (CH<sub>3</sub>CH–,  $\delta$  = 1.8–2.0 ppm) and in  $\alpha$ -CH group (–COCHNH–,  $\delta$  = 4.7 ppm) in <sup>1</sup>H NMR spectrum (7.5 mg/mL, 80 °C). The monodispersity with  $M_w/M_n$  = 1.1 was confirmed by GPC measurement.

Similarly, PBLA–Toc polymers with various degrees of polymerization (DP = 32, 73, 106) were synthesized and characterized.

#### - Synthesis of PAsp(DET)–Toc

The aminolysis reaction of PBLA with DET under moderate anhydrous conditions was used to introduce amino groups into the PBLA side chain. Lyophilized PBLA–Toc (DP = 20,  $m$  = 150 mg, 0.65 mmol BLA) was dissolved in NMP (10 mL) (solution A). DET ( $V$  = 3.5 mL, 32.5 mmol, or 50 folds of BLA) was diluted in NMP (5 mL) (solution B). Both solutions

were cooled down to 4 °C before adding dropwise solution A into solution B. The reaction mixture was agitated at 4 °C for 4 h. The resulting solution was then neutralized gradually by 0.5 N HCl in a salt-ice system to control temperature below 2 °C. The neutralized solution was dialyzed in 0.01 N hydrochloric acid solution (4 times) and distilled water (1 time). The white powder, PAsp(DET)-Toc, was obtained as hydrochloric salt after lyophilization (mg, % yield). No benzyl peak was seen in <sup>1</sup>H NMR spectrum. The quantitative conversion of PBLA to PAsp(DET) by the aminolysis reaction was verified by <sup>1</sup>H NMR from the peak intensity ratio of the protons of the α-CH group (-COCHNH-, δ = 4.7 ppm) to the ethylene groups in the 1,2-diaminoethane (PAsp(DET): H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-, δ = 3.2–3.6 ppm) settled at the side chain. Similarly, PAsp(DET)-Toc polymers with various degrees of polymerization (DP = 32, 73, 106) were synthesized and characterized.

#### - Synthesis of PAsp(DET-Cit)-Toc

PBLA (DP = 20, m = 50 mg, 0.22 mmol Asp (DET)) was dissolved in 450 mL 0.5 M NaHCO<sub>3</sub> buffer (pH = 8.92). The solution was then added cis-Aconitic anhydride (m = 1.75 g, 11.1 mmol or 50 folds Asp(DET)) gradually. The reaction mixture was stirred at 4 °C for 4 h. The final solution was purified 3 times with distilled water through Amicon Ultra filler units (MWCO = 3000; Millipore, Billerica, MA, USA). The product was obtained after lyophilization as a white powder (67 mg, 78%). The conversion yield was calculated from the peak intensity ratio of the methyl groups (-OCOC(CH<sub>3</sub>)CH-, δ = ppm) and in α-CH group (-COCHNH-, δ = 4.7 ppm) in <sup>1</sup>H NMR spectrum (7.5 mg/mL, 80 °C).

Similarly, PAsp(DET-Cit)-Toc polymers with various degrees of polymerization (DP = 32, 73, 106) were synthesized and characterized.

#### 2.2.2. Preparation of Liposome

The film hydration process and subsequent extrusion were used for preparation of liposomes. In total, 0.3 mL of 0.01 M PAsp(DET-Cit)-Toc solution, 2.5 mL of 0.025 M DOPC stock solution, and 1 mL of 0.02 M α-Mangostin stock solution were mixed together in an Eppendorf tube using chloroform as the solvent. The mixture was vortexed for 2 min before being transferred to a flask with a flat bottom. Subsequently, the solvents were extracted from the mixture using a Rotavapor R-100 at 40 °C, 250 mBar, and a rotational speed of 2. In total, 3 mL distilled water was added to the mixture and sonicated at 40 °C for 30 s. The opaque suspension containing α-Mangostin-loaded-CCP-liposome and unencapsulated α-Mangostin was formed and dialyzed (MWCO = 14,000 Da, 2 L dH<sub>2</sub>O, 24 h) to remove unencapsulated α-Mangostin. Liposomes were extruded through 100 nm size polycarbonate membrane filters (30 times) (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA) to create vesicles with a comparatively consistent mean size. The mixture was pre-equilibrated in phosphate-buffered saline (pH 7.4) before detaching non-encapsulated α-mangostin by size exclusion chromatography (PD10 Sephadex<sup>®</sup> G- 25 M column). Blank liposomes (without α-mangostin and CCP) and CCP-liposomes (without α-mangostin) are synthesized with the same process without adding materials.

#### 2.2.3. Measurement of Dynamic Light Scattering (DLS)

To measure the size, the DLS instrument (Horiba, Japan) employs the principle of light scattering by particles in solution, allowing for the calculation of the hydrodynamic diameter of CCP-liposomes that were maintained at ambient temperature. Furthermore, the zeta potential, which reflects the surface charge and stability of the liposomes, was assessed using the electrophoretic mobility of the particles in an electric field.

#### 2.2.4. Drug Loading and Encapsulation Efficiency

The EE% and DL% were measured according to the previously described procedure [32]. Briefly, after water was removed, the CCP-liposome film was dissolved in 3.5 mL CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:3, v/v) and subjected to bath sonication for 2 min. Then, the resultant solution was diluted with 2.9 mL of CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:3, v/v) and measured absorbance at

243 nm using UV-Vis spectrophotometer (Hitachi U-2900, Tokyo, Japan) in comparison to a reference solution of  $\text{CHCl}_3$ / MeOH (1:3, *v/v*).

#### 2.2.5. Drug Release

$\alpha$ -Mangostin release from CCP-liposome behavior was determined by dialysis method.  $\alpha$ -angostin-loaded-CCP-liposome was first dissolved in dd-H<sub>2</sub>O and transferred to dialysis tubing (MWCO = 1400 Da), and immersed in phosphate buffer saline (0.1 M, pH 7.4) and acetate buffer (0.1 M, pH 5.0, 6.0), at a speed of 110 rpm, 37 °C. Each condition of samples was examined in triplicate. For time intervals, the determined volume of release medium was replaced with the same volume of the fresh buffer solution. The amount of  $\alpha$ -Mangostin release from CCP-liposome was calculated by measuring the absorbed intensity at 480 nm using a UV spectrophotometer.

#### 2.2.6. In-Vitro Uptake of CCP-Liposome by HepG2 Cells

Human hepatocellular carcinoma (Hep-G2) cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was cultured in DMEM containing 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin sulfate, 100 units/mL penicillin G, and 10% FBS in humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Further experiments were conducted using exponentially growing cells.

HepG2 cells were plated onto a 6-well plate ( $1 \times 10^6$  per well) containing 1 mL of DMEM for a flow cytometry study. The cells were allowed to attach to the plate under incubation at 5% CO<sub>2</sub> and 37 °C for 24 h. Then, CFPE-labeled liposomes at a final concentration of 2 g/mL were added to the cells, whereas the control group received liposome-free culture medium. After a 6-h incubation period, the cells were washed three times with cold PBS, trypsinized, and resuspended in 0.3 mL of PBS. The cell fluorescence intensity was measured by using Cytomics FC 500 cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) with excitation and emission wavelengths of 495 nm and 515 nm, respectively.

#### 2.2.7. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Each of the wells of a 6-well plate was plated with HepG2 cells ( $1 \times 10^5$  cells) on a cover slip. After 24 h, CFPE-labeled liposomes were added to each well and incubated for another 6 h. At 30 min before the conclusion of the incubation, LysoTracker Red with an excitation peak at 573 nm and an emission peak at 592 nm was applied to each well. The cells were then rinsed three times with cold PBS before being fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 15 min, followed by nuclei staining with Hofoor for 5 min. The cells were examined using TCS SP5 AOBS confocal microscopy system (Leica, Germany).

#### 2.2.8. Cytotoxicity Assay

HepG2 cells were cultured overnight at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> environment in 96-well plates with DMEM. The cytotoxicity of free drug, blank CCP-liposomes, and drug-loaded CCP-liposomes was assessed using an MTT test (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The absorbance at 570 nm of each well was measured using a Spectramax M5 Microtiter Plate Luminometer (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

#### 2.2.9. Endosomal Escape Property

HepG2 cells were immediately given CCP-liposomes and incubated in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Following Triton X treatment and 4% formaldehyde fixation, cells were stained for 30 min using Cyanine 3, which has a peak excitation wavelength at 555 nm and a peak emission wavelength at 569 nm, as well as Hoechst 33342 with an excitation peak at 352 nm and an emission peak at 454 nm. For fluorescence imaging, a Nikon A1 confocal laser-scanning microscope was employed. HepG2 was exposed to 105 cells/mL and suppressed for 1 h in order to conduct tests on the mechanisms behind cell uptake. For 30 min, Cyanine 3 and Hoechst 33342 were used to pre-treat the cells. Before repairing, LysoTracker Green with excitation/emission maxima of 504/511 nm was employed in the endosomal escape experiment. Using the colocalization threshold and coloc2 plugin in

ImageJ program, the level of colocalization was measured based on Pearson's correlation coefficient (R).

### 2.2.10. Statistical Analysis

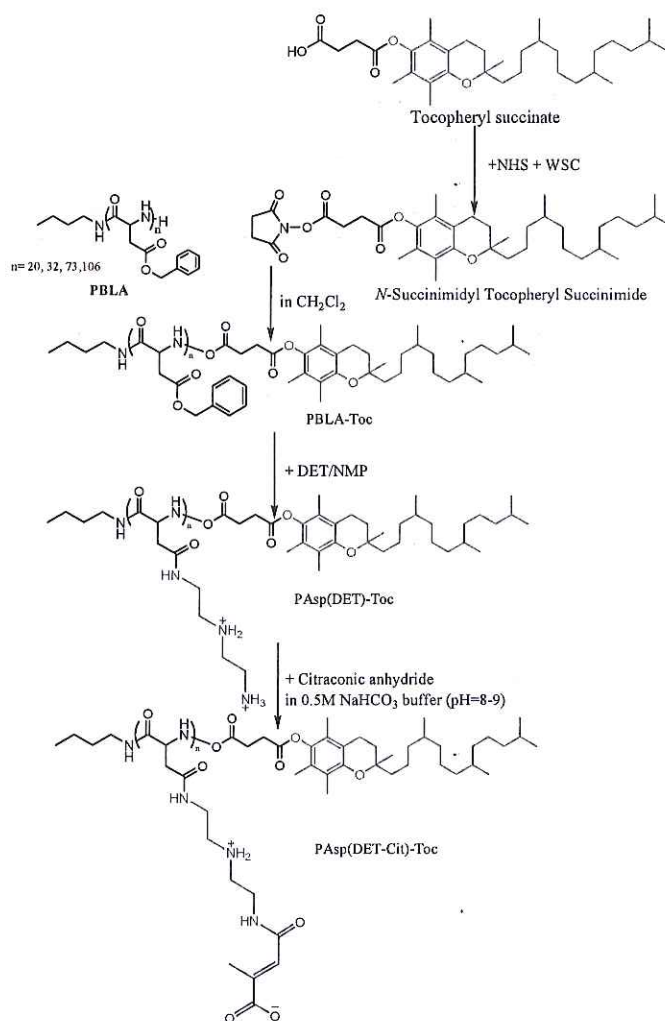
The data were analyzed using one-way ANOVA and StatPlus: mac LE software version v7.3.31 (Analystsoft Inc., Walnut, CA, USA), with  $* p < 0.05$  considered as statistical difference.

## 3. Results and Discussion

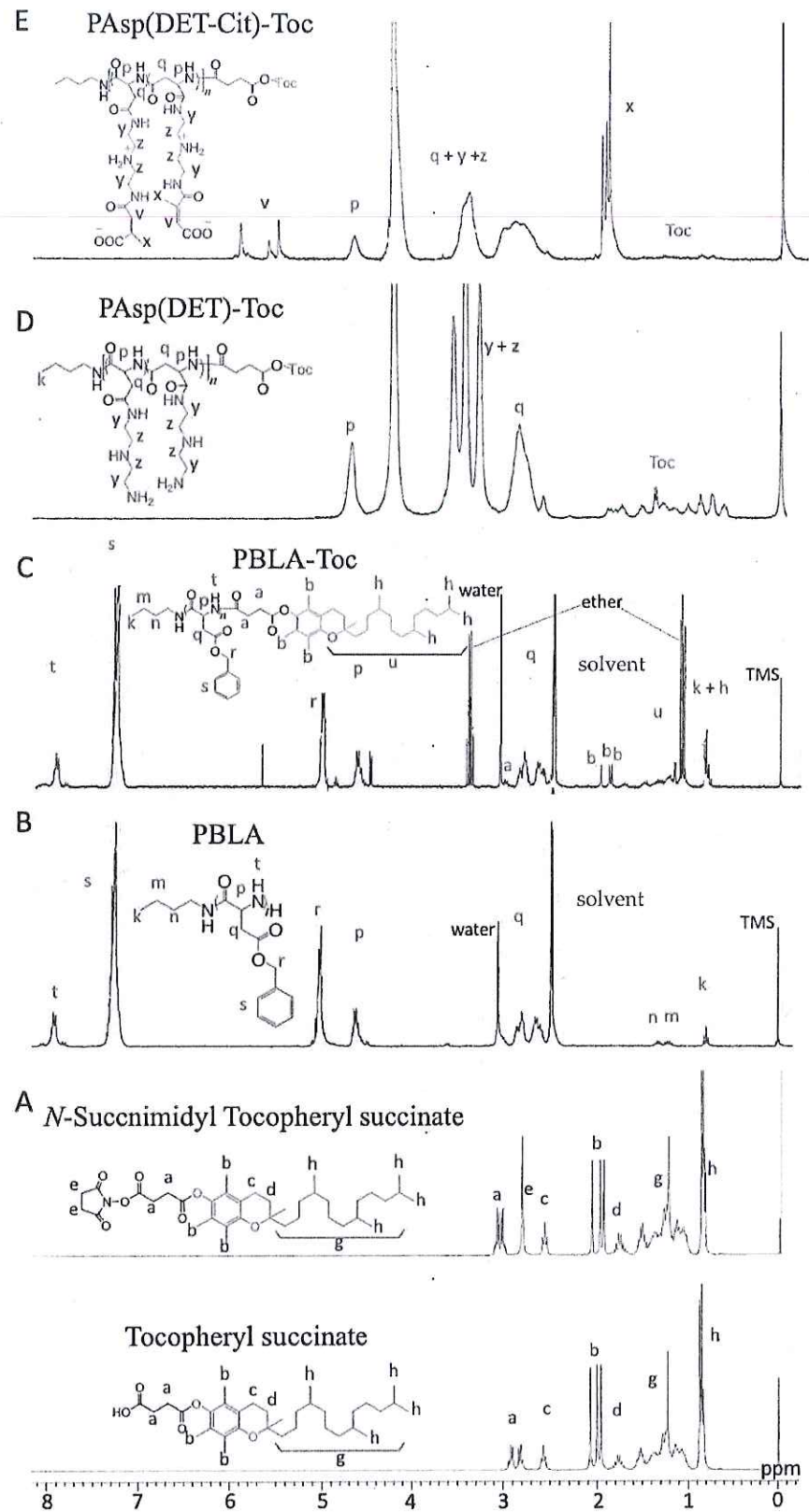
### 3.1. Synthesis of Charge-Conversion Polymer PAsp(DET-Cit)-Toc

#### 3.1.1. Synthesis of *N*-Succinimidyl Tocopheryl Succinate

The charge-conversion polymer Pasp(DET-Cit)-Toc was designed and synthesized following Scheme 1. First, *N*-succinimidyl tocopheryl succinate was synthesized by coupling tocopheryl succinate and NHS and with the presence of WSC (EDC) in the DCM (Scheme 1). The product was confirmed by  $^1\text{H}$  NMR measurement in chloroform- $d_3$  ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ ) at  $25^\circ\text{C}$  (Figure 2A). The peak of the ethylene group of the succinimide ring appeared clearly in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum. Comparing the proton ratio of ethylene protons in the succinimide ring and methyl protons bonding with the phenyl group of tocopherol confirmed the conversion rate of the carboxyl group in tocopheryl succinate to be 100%.



Scheme 1. Procedures of PAsp(DET-Cit)-Toc synthesis.



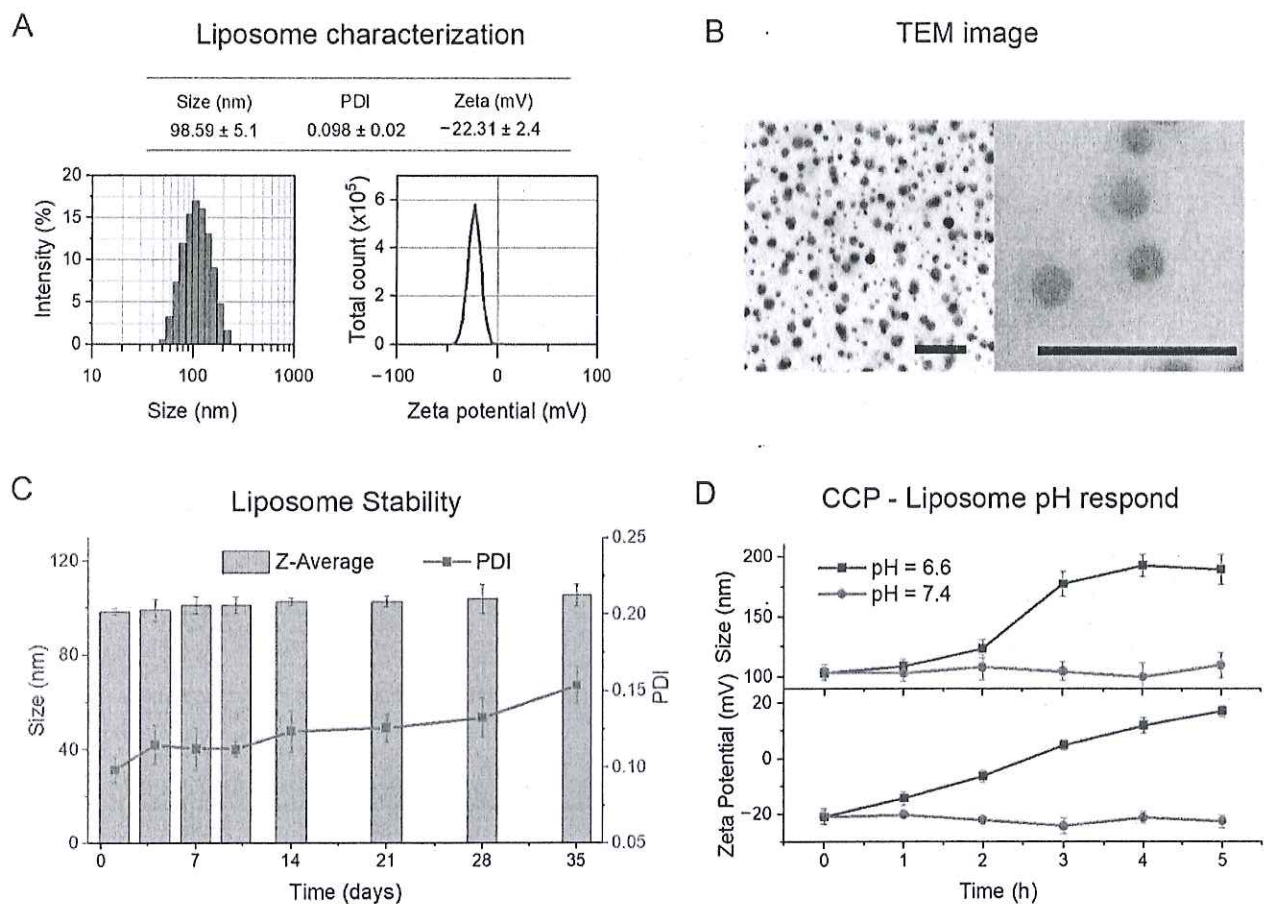
**Figure 2.** The  $^1\text{H}$  NMR spectra of (A) tocopheryl succinate and *N*-succinimidyl tocopheryl succinate (B) PBLA (C) PBLA-Toc (D) PAsp(DET)-Toc and (E) PAsp(DET-Cit)-Toc.

### 3.1.2. Synthesis of PBLA

Afterward, PBLA was synthesized by ring-opening polymerization of BLA-NCA triggered by the  $\text{NH}_2$  group of *n*-butylamine (Scheme 1). The polymerization was confirmed by monitoring specific peaks of NCA disappeared ( $1850\text{ cm}^{-1}$ : C=O asymmetric stretching;  $1780\text{ cm}^{-1}$ : C=O symmetric stretching;  $910\text{ cm}^{-1}$ : C=O deformation) (Figure 2B). The polymerization degree of PBLA segment in PBLA block copolymers was estimated as 20 by  $^1\text{H-NMR}$  measurements in  $\text{DMSO-}d_6$  at  $80\text{ }^\circ\text{C}$  comparing the proton ratios of the methyl protons in butyl group ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $\delta = 0.8\text{ ppm}$ ) and the  $\alpha$ -CH group ( $\text{COCHNH-}$ ,  $\delta = 4.7\text{ ppm}$ ) (Figure 2B). The monodispersity for PBLA ( $\text{DP} = 20$ ) was confirmed by NMP-GPC measurement ( $M_w/M_n = 1.19$ ).

### 3.1.3. Synthesis of PBLA-Toc

Similarly, PBLA-Toc polymers with different degrees of polymerization ( $\text{DP} = 32, 73, 106$ ) underwent characterization through  $^1\text{H-NMR}$  measurements and NMP-GPC (Figure 3C). The amide bond formed between *N*-succinimidyl tocopheryl succinate and the amine group at the end chain of PBLA was used to produce PBLA-Toc (Scheme 1). The product was confirmed by the  $^1\text{H NMR}$  spectrum. The peaks of the tocopheryl group in PBLA-Toc appeared at  $0.8\text{--}2.1\text{ ppm}$ . The conversion of distal end amino group  $\text{NH}_2$  of the PBLA chain was determined by calculating the relative molar ratio of methyl protons of tocopheryl succinate ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}_6-$ ,  $\delta = 1.8\text{--}2.0\text{ ppm}$ ) to  $\alpha$ -CH group ( $-\text{COCHNH-}$ ,  $\delta = 4.7\text{ ppm}$ ) in  $^1\text{H NMR}$  spectrum (Figure 3C).



**Figure 3.** Characterizations of CCP-liposome. (A) The surface charge distribution is indicated by the distribution of hydrodynamic size and zeta potential of CCP-liposomes. (B) TEM images of

CCP-liposomes taken at various magnifications. Scale bars indicate 500 nm. (C) Assessment of CCP-liposome stability over a 35-day period by monitoring changes in hydrodynamic size and polydispersity index (PDI) (D) Examination of size and zeta potential changes in CCP-liposomes across different pH solutions over a 5-h timeframe. Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). The variation in the zeta potential value depicted the charge-conversion characteristic of the CCP-liposome, as demonstrated in (D). The CCP-liposome complex exhibited a consistent zeta potential of approximately  $-20$  mV at pH 7.4. However, at pH 6.6, the zeta potential progressively transitioned from negative to positive as a result of the degradation of the cis-aconitic amide group in the polymer. The zeta potential value reached 0 mV after 2 h incubation at pH 6.6 and changed to a positive value. It showed no change of zeta potential in pH 7.4.

The PBLA polymers (DP = 32, 73, 106) reacted with *N*-succinimidyl tocopheryl succinate in the same condition as PBLA DP = 20. Comparing the conjugation of tocopherol to the distal end of PBLA with different degrees of polymerization, the conversion rate was decreased due to the longer polymer chain. Because of the random coil structure, the distal amine group of the polymers with higher DP is difficult to interact with *N*-hydroxysuccinate activated by tocopheryl succinate. A longer reaction time is required for amide bond formation of PBLA and *N*-succinimidyl tocopheryl succinate. In addition, The NMP-GPC measurement confirmed the conjugation of tocopherol to the PBLA polymer chain did not affect the polymer structure. The increase in polymer weight was reasonable due to the addition of the tocopherol group to the distal end of PBLA.

#### 3.1.4. Synthesis of PAsp(DET)-Toc

PBLA-Toc was aminolized by diethylenetriamine (DET) in the NMP under a mild condition. The reaction was described in Scheme 1. A range of cationic side chains derived from a single platformed PBLA was synthesized through a quantitative aminolysis reaction [33–35]. The process begins with the activation of the nitrogen atom in the main chain via the interaction of an amine as a weak base, in which hydrogen bonds with the proton of the amide group. Subsequently, the activated nitrogen attacks the carbon atom of the carbonyl group in the side chain, resulting in the formation of the succinimidyl ring. Then, an amine molecule attacks one of the two carbonyl groups inside the succinimidyl ring, resulting in the effective conversion of the ring into an *N*-substituted poly(aspartamide) derivative [36]. Therefore, a quantitative aminolysis reaction does not affect an amide bond through PBLA and tocopheryl succinate. This result was also confirmed by the  $^1\text{H}$  NMR spectrum (Figure 2D). The  $^1\text{H}$  NMR spectra of PAsp(DET)-Toc showed the appearance of the ethylene groups in the 1,2-diaminoethane (PAsp(DET):  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$ ,  $\delta = 3.2\text{--}3.6$  ppm), while the peaks from benzyl disappeared demonstrating substitution with DET proceeds.

#### 3.1.5. Synthesis of PAsp(DET-Cit)-Toc

Pasp(DET-Cit)-Toc was created by reacting PAsp(DET)-Toc with Citraconic anhydride in 0.5 M  $\text{NaHCO}_3$  buffer (pH = 8–9) (Scheme 1). The product was confirmed by the  $^1\text{H}$  NMR spectrum and characterized by HPLC (Water GPC). The methyl group ( $\text{CH}_3\text{C}-$ ,  $\delta = 1.9$  ppm) and the methine group ( $-\text{CH}-$ ,  $\delta = 5.5\text{--}5.9$  ppm) of citraconic appeared clearly in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum (Figure 2E). The group peaks of methine group were explained by the structure of the double bond ( $\text{C}=\text{C}$ ) and the binding of different CO groups to the DET. The conversion rate of PAsp(DET-Cit)-Toc was determined through the comparison of the proton intensity of methine protons of citraconic with the  $\alpha\text{-CH}$  group of the polymer chain. The production has also checked the degradation by HPLC.

### 3.2. Physical Characterizations of CCP-Liposome

The size, surface properties, and morphological features of the CCP-liposome were analyzed by DLS and TEM. DLS measurements revealed that the average hydrodynamic size of CCP-liposome particles was  $98.59 \pm 5.1$  nm, with a polydispersity index of  $0.098 \pm 0.02$

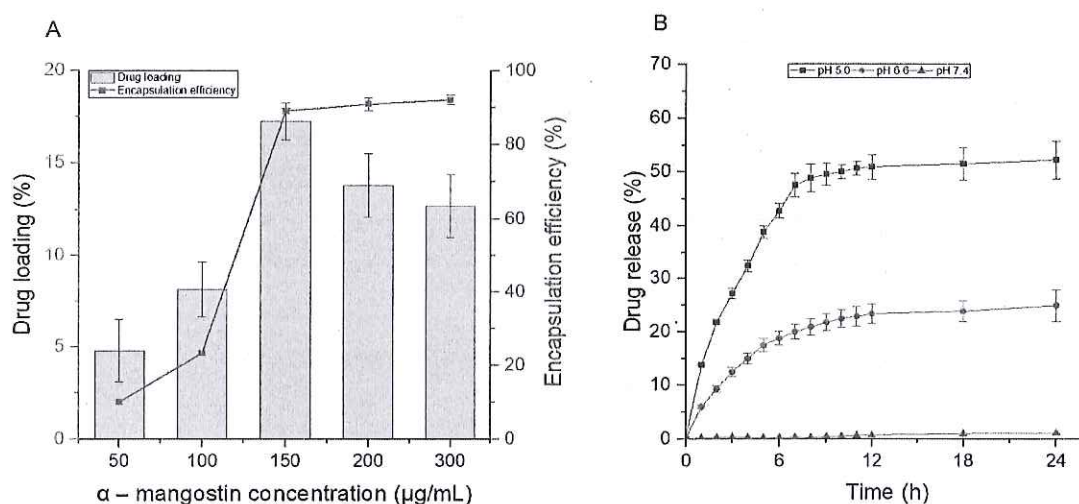


and a negative zeta potential of  $22.31 \pm 2.4$  mV. (Figure 3A). The spherical CCP-liposomes' shape has been observed using TEM (Figure 3B). To confirm its colloidal stability, CCP-liposome underwent a 35-day hydrodynamic size and PDI analysis (Figure 3C). The liposome's stability was demonstrated by the nominal changes in hydrodynamic size and PDI during the course of 35 days of observation.

In addition, the dramatic size change of the CCP-liposome complex also was induced by the charge conversion. As results showed in Figure 3D, at pH 7.4, the CCP-liposome complex remained around 100 nm in size. At pH 6.6, however, there was an instantaneous rise in their size. Large aggregates with diameters of almost 200 nm have developed. The aggravation was most likely caused by a decrease in repulsive forces as a result of partial charge neutralization after 1 h of incubation and total neutralization after 2 h at an acidic pH of 6.6.

### 3.3. The Release Rate and Encapsulation Efficiency of CCP-Liposome

The drug loading yield reached the highest capacity of 17.4% with 150  $\mu\text{g/mL}$  of  $\alpha$ -mangostin (Figure 4A). When the concentration of  $\alpha$ -mangostin increased to 200  $\mu\text{g/mL}$  and 300  $\mu\text{g/mL}$ , the drug loading capacity decreased to 14.57% and 14%, respectively. Moreover, with the  $\alpha$ -mangostin concentration of 150  $\mu\text{g/mL}$ , the encapsulation efficiency is nearly 90%.



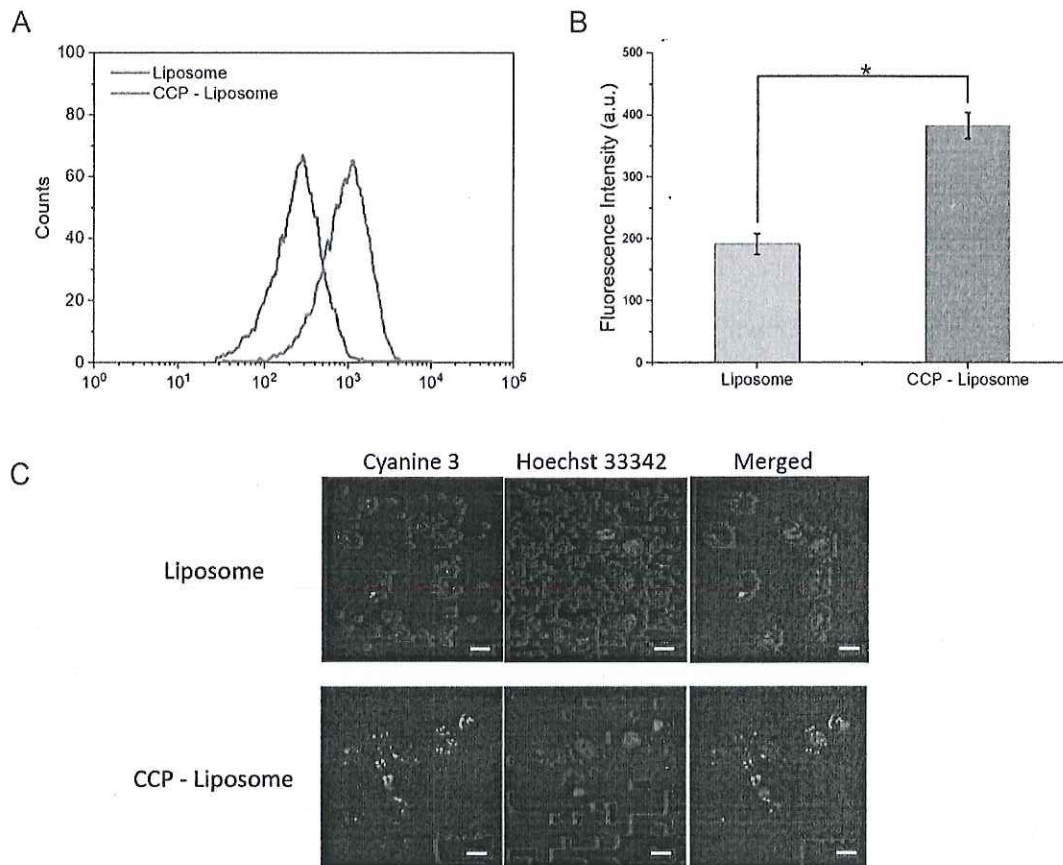
**Figure 4.** Characterizations of  $\alpha$ -mangostin CCP-liposome. (A) Drug loading and encapsulation efficiency; (B) Release profile of  $\alpha$ -mangostin CCP-liposome. Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

In terms of release profile, drug release at pH 5.0 was substantially quicker than at between pH 6.6 and 7.4, which was consistent with the qualitative results. The  $\alpha$ -mangostin release was slower at pH 7.4, and the drug release quantity was virtually 0% in 24 h, indicating that the drug may be well encapsulated in the CCP-liposome, which is beneficial for CCP-liposome circulation in vivo and also reduces cytotoxicity. In an acidic pH 5.0 solution, there was an early burst of  $\alpha$ -mangostin that reached 50% after 12 h and then remained stable for another 24 h (Figure 4B). It is most likely pH hydrolysis of Cit-Toc at pH 5.0, resulting in fast drug diffusion via swelling liposome particles.

### 3.4. Endosome Escape of CCP-Liposome

Rapid lysosomal drug release is indispensable, while nanoparticles are eventually entrapped inside the lysosome after endocytosis. Therefore, the intracellular uptake of nanoparticles and drug release were investigated. As shown in Figure 5A, both liposomes and CCP-liposomes were able to penetrate into cells. CCP-liposomes demonstrated a

much greater cellular absorption than liposome particles, indicating the presence of CCP on the surface of more sensitive liposomes. Furthermore, a quantitative examination of flow cytometry data revealed the same result (Figure 5B). The confocal images also indicated CCP-liposome and liposome cellular trafficking. After 6 h of incubation, CCP-liposome fluorescence (red) was clearly visible in HepG2 cells, whereas liposome fluorescence was haphazardly spread over the cell membrane (Figure 5C). According to the results of cellular uptake, CCP binding to liposome was conducive to liposome absorption into the cell.

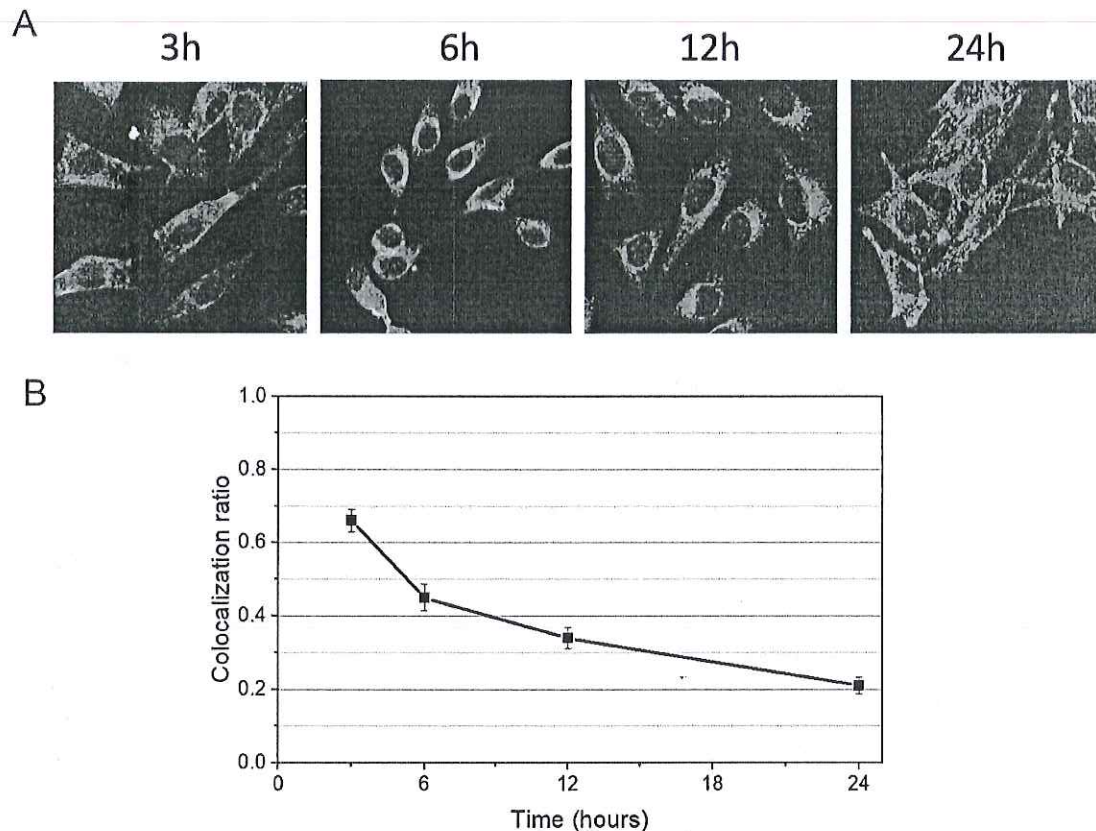


**Figure 5.** Cellular uptake of liposome and CCP-liposome on HepG2 cell. (A) The peak fluorescence of liposome and CCP-liposome shown on the flow cytometry histogram. (B) Fluorescence intensity in HepG2 cells treated with liposome and CCP-liposome was quantified. The values are presented as the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 5$ , \*  $p < 0.05$  considered as statistical difference). (C) Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was utilized to monitor the intracellular mobility of liposome and CCP-liposome. Cyanine 3 (red) was utilized for visualization, while the cell nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bars indicate 20  $\mu$ m.

The intracellular distribution of CCP-liposomes was studied using confocal laser scanning microscopy to validate the improved endosomal escape abilities of the charge-conversion liposomes. This study made use of cyanine-3-labeled liposomes, as seen in Figure 6A. Upon release of the CCP-liposomes from acidic vesicles within the cells, the fluorescence signal transitions from yellow to red. In Figure 6A, CCP-liposomes could escape from endosomes even only after 3 h and almost 80% of CCP-liposomes escaped after 24 h. The confocal images also showed cells changed from the yellow color to almost red inside the cell after 24 h. Figure 6B summarizes the quantitative assessments of the CLSM images. As a result, the co-localization of pDNA with PAsp(DET-Aco) in the CLSM pictures should be identified as yellow. At 4 h, the yellow pixels were clearly visible inside

the cells, suggesting CCP-liposome absorption into cells in their intact state. The yellow pixels diminished with time, but the red pixels rose. The rate of liposome co-localization with PAsp(DET-Cit)-Toc was estimated by counting the yellow and red pixels as follows:

$$\text{Co-localization rate} = \frac{\text{number of yellow pixels}}{\text{number of yellow and red pixels}}$$



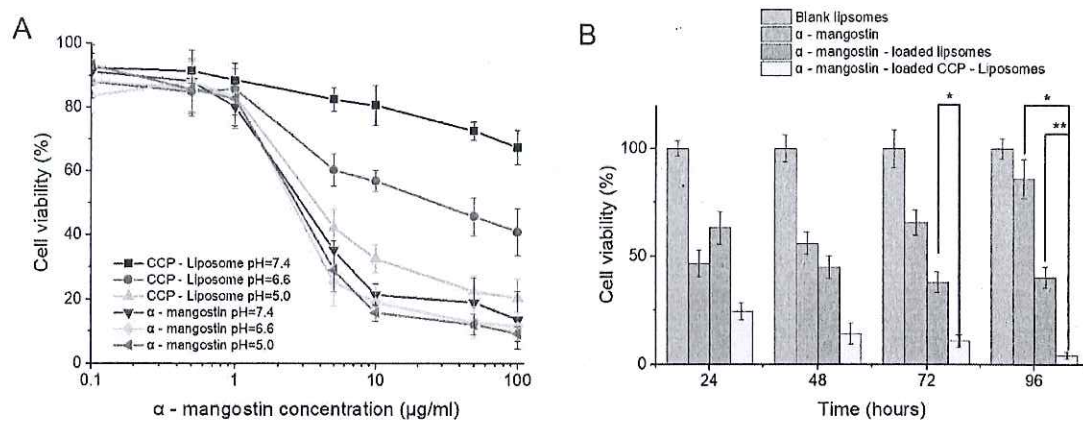
**Figure 6.** CCP-liposome endosomal escape in a HepG2 cell. (A). The color cyanine 3 (red) was utilized. Hoechst 33342 (blue) was used to stain the cell nuclei, while LysoTracker Green (green) was used to stain the late endosome and lysosome. (B) Quantitative investigation of CCP-Liposome co-localization at each time point of CLSM observation. Scale bars represent 20  $\mu\text{m}$ .

The quantitative result in Figure 6B clearly showed a steady decline in the co-location rate of liposome with PAsp(DET-Cit)-Toc (CCP-liposome) over time. This finding implies that PAsp(DET-Cit)-Toc internalized with liposomes might revert to PAsp(DET) in acidic endosomal compartments. Eventually, regenerated PAsp(DET) in di-protonated form is expected to be released from the polyplexes, probably by affecting the integrity of the endosomal membrane, as described in prior research [37]. Compared with the study of Kingshuk Dutta et al., only the charge-converting pAsp(DET) polyplexes showed efficient endosomal escape after 24 h and reported releasing  $\approx 80\%$  of encapsulated particles [38].

### 3.5. In Vitro Cytotoxicity

The cytotoxicity of  $\alpha$ -mangostin-loaded CCP-liposome was measured and compared to  $\alpha$ -mangostin-loaded-liposome and  $\alpha$ -mangostin only. The cells were exposed to active compounds and polymer products for 4 h in different buffer solutions of pH values 5.0, 6.6, and 7.4. MTT assay showed the results in Figure 7. After 4 h of treatment, the cell ability of  $\alpha$ -mangostin-loaded-CCP-liposomes incubated in pH 5.0 buffer solutions reduced much more than that incubated in pH 7.4, 6.6 buffer solutions and was close

to free  $\alpha$ -mangostin (Figure 7A). In addition, these samples were continued to examine in time course experiment (24–96 h culture). Blank liposomes had no toxicity to cancer cells.  $\alpha$ -mangostin-loaded liposomes had less effective on HepG2 cells than  $\alpha$ -mangostin only in 24 h treatment, but after 48 h,  $\alpha$ -mangostin-loaded liposomes released more  $\alpha$ -mangostin inside cells and caused more cytotoxic (Figure 7B).  $\alpha$ -mangostin-loaded CCP-liposomes presented the most cytotoxicity compared to the other group. This result proved that  $\alpha$ -mangostin-loaded CCP-liposome delivered more effectively  $\alpha$ -mangostin into the cell and prevented the degradation of  $\alpha$ -mangostin inside cells, especially endosomal degradation. In the Lei Jiang et al. study, the introduction of paclitaxel (PTX) into charge conversional liposomes resulted in enhanced cytotoxicity in both lung cancer A549 cells and drug-resistant lung cancer A549/Taxol cells, surpassing the effects observed with free PTX and PTX-loaded traditional liposomes [39].



**Figure 7.** Cytotoxicity effects of  $\alpha$ -mangostin,  $\alpha$ -mangostin-loaded CCP-Liposome on HepG<sub>2</sub> cells in (A) 4 h of culture with different pH buffer and  $\alpha$ -mangostin concentration from 0.1 to 100  $\mu\text{g/mL}$  and (B) from 24 to 96 h of culture with  $\alpha$ -mangostin concentration of 5  $\mu\text{g/mL}$ . Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ , \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  considered as statistical difference).

#### 4. Conclusions

In this research, we are continuing to modify and improve the  $\alpha$ -mangostin-based-liposome-delivery system for obtaining the ideal therapeutic effects of  $\alpha$ -mangostin. It was effectively packaged with liposomes and showed effective cytotoxicity against HepG<sub>2</sub> cells in our prior work [20]. However, liposomes face endosomal degradation and then decrease drug delivery efficiency. To circumvent this constraint, PAsp(DET-Cit)-Toc, which has a charge-conversion property, was merged into liposomes to create the CCP-liposome, which has improved drug transport efficiency toward HepG<sub>2</sub> cells. DLS analysis revealed that this CCP-liposome drug loading yield reached the highest encapsulation efficiency of 17.4% with 150  $\mu\text{g/mL}$  of  $\alpha$ -mangostin. In an acidic environment, the CCP-liposome swelled and erupted, releasing the encapsulated drug into the cytoplasm that reached 50% after 12 h. Furthermore, confocal pictures increased the involvement of PAsp(DET-Cit)-Toc to the endosomal escape of CCP-Liposomes via the charge-conversion process. Furthermore,  $\alpha$ -mangostin-loaded CCP-liposomes presented the worst cell viability of 7% after 96 h compared to other groups in the cytotoxicity test. The terminal group of PAsp(DET-Cit)-Toc can be used to conjugate multiple ligands and offer active targeted drug delivery in the future.

**Author Contributions:** D.T.N. and T.Q.T. conceptualization. T.T.K.P. and D.T.N. conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper. T.T.K.P., D.T.N., L.P.N., U.T.P., H.H.N., X.T.N., T.V.N. and L.A.D. performed the experiments, analyzed the data. D.T.N., T.T.K.P. and H.N.L. contributed to do experiments and revised the manuscript. D.T.N.P.

contributed to writing-review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research is funded by Graduate University of Science and Technology under grant number GUST.STS.ĐT2020-SH11.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors gratefully acknowledge the support from the Vietnam Academy of Science and Technology.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Tsai, S.Y.; Chung, P.C.; Owaga, E.E.; Tsai, I.J.; Wang, P.Y.; Tsai, J.L.; Yeh, T.S.; Hsieh, R.H. Alpha-mangostin from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) pericarp extract reduces high fat-diet induced hepatic steatosis in rats by regulating mitochondria function and apoptosis. *Nutr. Metab.* **2016**, *13*, 88. [CrossRef]
2. Kritsanawong, S.; Innajak, S.; Imoto, M.; Watanapokasin, R. Antiproliferative and apoptosis induction of alpha-mangostin in T47D breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2016**, *48*, 2155–2165. [CrossRef]
3. Ovalle-Magallanes, B.; Eugenio-Perez, D.; Pedraza-Chaverri, J. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.): A comprehensive update. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *109*, 102–122. [CrossRef]
4. Shan, T.; Ma, Q.; Guo, K.; Liu, J.; Li, W.; Wang, F.; Wu, E. Xanthones from mangosteen extracts as natural chemopreventive agents: Potential anticancer drugs. *Curr. Mol. Med.* **2011**, *11*, 666–677. [CrossRef]
5. Hung, S.H.; Shen, K.H.; Wu, C.H.; Liu, C.L.; Shih, Y.W. Alpha-mangostin suppresses PC-3 human prostate carcinoma cell metastasis by inhibiting matrix metalloproteinase-2/9 and urokinase-plasminogen expression through the JNK signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1291–1298. [CrossRef] [PubMed]
6. Shih, Y.W.; Chien, S.T.; Chen, P.S.; Lee, J.H.; Wu, S.H.; Yin, L.T. Alpha-mangostin suppresses phorbol 12-myristate 13-acetate-induced MMP-2/MMP-9 expressions via alphavbeta3 integrin/FAK/ERK and NF-kappaB signaling pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Cell Biochem. Biophys.* **2010**, *58*, 31–44. [CrossRef] [PubMed]
7. Phan, T.K.T.; Shahbazzadeh, F.; Pham, T.T.H.; Kihara, T. Alpha-mangostin inhibits the migration and invasion of A549 lung cancer cells. *PeerJ* **2018**, *6*, e5027. [CrossRef] [PubMed]
8. Li, P.; Tian, W.; Ma, X. Alpha-mangostin inhibits intracellular fatty acid synthase and induces apoptosis in breast cancer cells. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 138. [CrossRef]
9. Li, L.; Brunner, I.; Han, A.R.; Hamburger, M.; Kinghorn, A.D.; Frye, R.; Butterweck, V. Pharmacokinetics of alpha-mangostin in rats after intravenous and oral application. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55* (Suppl. S1), S67–S74. [CrossRef]
10. Wathoni, N.; Rusdin, A.; Motoyama, K.; Joni, I.M.; Lesmana, R.; Muchtaridi, M. Nanoparticle Drug Delivery Systems for alpha-Mangostin. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2020**, *13*, 23–36. [CrossRef] [PubMed]
11. Xu, S.; Olenyuk, B.Z.; Okamoto, C.T.; Hamm-Alvarez, S.F. Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: Rationale and advances. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 121–138. [CrossRef] [PubMed]
12. Cerqueira, B.B.; Lasham, A.; Shelling, A.N.; Al-Kassas, R. Nanoparticle therapeutics: Technologies and methods for overcoming cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *97*, 140–151. [CrossRef]
13. Sercombe, L.; Veerati, T.; Moheimani, F.; Wu, S.Y.; Sood, A.K.; Hua, S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 286. [CrossRef] [PubMed]
14. Daraee, H.; Etemadi, A.; Kouhi, M.; Alimirzalu, S.; Akbarzadeh, A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2016**, *44*, 381–391. [CrossRef]
15. Hua, S.; Wu, S.Y. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 143. [CrossRef]
16. Ding, B.S.; Dziubla, T.; Shuvaev, V.V.; Muro, S.; Muzykantov, V.R. Advanced drug delivery systems that target the vascular endothelium. *Mol. Interv.* **2006**, *6*, 98–112. [CrossRef]
17. Metselaar, J.M.; Storm, G. Liposomes in the treatment of inflammatory disorders. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2005**, *2*, 465–476. [CrossRef] [PubMed]
18. Das, S.S.; Hussain, A.; Verma, P.R.P.; Imam, S.S.; Altamimi, M.A.; Alshehri, S.; Singh, S.K. Recent Advances in Liposomal Drug Delivery System of Quercetin for Cancer Targeting: A Mechanistic Approach. *Curr. Drug Deliv.* **2020**, *17*, 845–860. [CrossRef]
19. Li, M.; Du, C.; Guo, N.; Teng, Y.; Meng, X.; Sun, H.; Li, S.; Yu, P.; Galons, H. Composition design and medical application of liposomes. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *164*, 640–653. [CrossRef]
20. Trang Phan, T.K.; Tran, T.Q.; Nguyen Pham, D.T.; Nguyen, D.T. Characterization, Release Pattern, and Cytotoxicity of Liposomes Loaded With  $\alpha$ -Mangostin Isolated From Pericarp of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Natural. Prod. Commun.* **2020**, *15*, 1934578X20974559. [CrossRef]
21. Rommasi, F.; Esfandiari, N. Liposomal Nanomedicine: Applications for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Nanoscale Res. Lett.* **2021**, *16*, 95. [CrossRef] [PubMed]
22. Fanciullino, R.; Ciccolini, J. Liposome-encapsulated anticancer drugs: Still waiting for the magic bullet? *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 4361–4371. [CrossRef] [PubMed]

23. Torchilin, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 131–135. [CrossRef]
24. Bozzuto, G.; Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 975–999. [CrossRef] [PubMed]
25. Canton, I.; Battaglia, G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2718–2739. [CrossRef]
26. Bae, Y.; Nishiyama, N.; Fukushima, S.; Koyama, H.; Yasuhiro, M.; Kataoka, K. Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: Tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 122–130. [CrossRef]
27. Huang, H.; Li, Y.; Sa, Z.; Sun, Y.; Wang, Y.; Wang, J. A smart drug delivery system from charge-conversion polymer-drug conjugate for enhancing tumor therapy and tunable drug release. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 485–490. [CrossRef]
28. Sun, H.; Guo, B.; Li, X.; Cheng, R.; Meng, F.; Liu, H.; Zhong, Z. Shell-sheddable micelles based on dextran-SS-poly(epsilon-caprolactone) diblock copolymer for efficient intracellular release of doxorubicin. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 848–854. [CrossRef]
29. Gallon, E.; Matini, T.; Sasso, L.; Mantovani, G.; Arminan de Benito, A.; Sanchis, J.; Caliceti, P.; Alexander, C.; Vicent, M.J.; Salmaso, S. Triblock Copolymer Nanovesicles for pH-Responsive Targeted Delivery and Controlled Release of siRNA to Cancer Cells. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1924–1937. [CrossRef]
30. Selby, L.I.; Cortez-Jugo, C.M.; Such, G.K.; Johnston, A.P.R. Nanoescapology: Progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9*, e1452. [CrossRef]
31. Harada, A.; Kataoka, K. Formation of Polyion Complex Micelles in an Aqueous Milieu from a Pair of Oppositely-Charged Block Copolymers with Poly(ethylene glycol) Segments. *Macromolecules* **1995**, *25*, 5294–5299. [CrossRef]
32. Tang, J.; He, J.; Yang, C.; Mao, Y.; Hu, T.; Zhang, L.; Cao, H.; Tong, A.; Song, X.; He, G.; et al. Antitumor Effects of MsurvivinT34A-CaPi Complex-Embedded PLGA Nanoparticles in Combination with Doxil in Mice. *J. Nanopart. Res.* **2014**, *16*, 2682. [CrossRef]
33. Lee, Y.; Fukushima, S.; Bae, Y.; Hiki, S.; Ishii, T.; Kataoka, K. A protein nanocarrier from charge-conversion polymer in response to endosomal pH. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5362–5363. [CrossRef]
34. Bae, Y.; Jang, W.D.; Nishiyama, N.; Fukushima, S.; Kataoka, K. Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 242–250. [CrossRef]
35. Koide, A.; Kishimura, A.; Osada, K.; Jang, W.D.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. Semipermeable polymer vesicle (PICsome) self-assembled in aqueous medium from a pair of oppositely charged block copolymers: Physiologically stable micro-/nanocontainers of water-soluble macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5988–5989. [CrossRef]
36. Fan, J.; Borguet, Y.P.; Su, L.; Nguyen, T.P.; Wang, H.; He, X.; Zou, J.; Wooley, K.L. Two-Dimensional Controlled Syntheses of Polypeptide Molecular Brushes via N-Carboxyanhydride Ring-Opening Polymerization and Ring-Opening Metathesis Polymerization. *ACS Macro Lett.* **2017**, *6*, 1031–1035. [CrossRef]
37. Sanjoh, M.; Hiki, S.; Lee, Y.; Oba, M.; Miyata, K.; Ishii, T.; Kataoka, K. pDNA/poly(L-lysine) Polyplexes Functionalized with a pH-Sensitive Charge-Conversional Poly(aspartamide) Derivative for Controlled Gene Delivery to Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 1181–1186. [CrossRef]
38. Dutta, K.; Das, R.; Medeiros, J.; Kanjilal, P.; Thayumanavan, S. Charge-Conversion Strategies for Nucleic Acid Delivery. *Adv. Funct. Mater.* **2021**, *31*, 2011103. [CrossRef] [PubMed]
39. Jiang, L.; Li, L.; He, X.; Yi, Q.; He, B.; Cao, J.; Pan, W.; Gu, Z. Overcoming drug-resistant lung cancer by paclitaxel loaded dual-functional liposomes with mitochondria targeting and pH-response. *Biomaterials* **2015**, *52*, 126–139. [CrossRef]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.