

## NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VẬT LIỆU NANO CHITOSAN LÀM CHẤT HẤP PHỤ PROTEIN ỨNG DỤNG TRONG DẪN TRUYỀN THUỐC

Dương Thị Ánh Tuyết, Võ Quốc Khương, Phan Huê Phương, Nguyễn Thị Phương Phong

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 24 tháng 01 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 28 tháng 03 năm 2011)

**TÓM TẮT:** Trong bài báo này, hạt nano chitosan (CS)-tripolyphosphate (TPP) đã được nghiên cứu chế tạo làm chất hấp phụ protein ứng dụng trong dẫn truyền thuốc. Các yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt như: các tác chất tạo nối ngang, tỷ lệ CS/TPP, pH đã được khảo sát. Đặc tính hóa lý của hạt nano đã được đánh giá thông qua các kỹ thuật phân tích hóa lý khác nhau như: FT-IR, XRD, FE-SEM và TEM. Hiệu suất và khả năng hấp phụ protein của nano chitosan chế tạo được khá cao (96,41 % và 1,93 mg/mg) tại 0,5 mg hạt nano chitosan.

**Từ khóa:** Chitosan, Bovine serum albumin (BSA), Hạt nano.

### MỞ ĐẦU

Ngày nay, với sự phát triển trong lĩnh vực y tế và chăm sóc sức khỏe con người, nhiều công nghệ mới đã được sử dụng rộng rãi mà tiêu biểu là ứng dụng của công nghệ nano vào quá trình tổng hợp những chất dẫn thuốc mới.

Nhiều loại peptide và protein được ứng dụng làm thuốc vì khả năng chọn lọc cao và điều trị hiệu quả. Dẫn truyền thành công những thuốc protein này là chủ đề nghiên cứu trong nhiều năm nay của ngành dược.

Chitosan được sử dụng làm nguyên liệu điều chế hạt nano chitosan trong những năm gần đây vì những tính chất ưu việt của nó ở kích thước nano. Chitosan là dạng deacetyl hóa từ chitin, có cấu trúc polysaccharide, được tìm thấy ở loài động vật giáp xác, côn trùng và một vài loại nấm. Với nhiều tính năng như tính tương thích sinh học, phân hủy sinh học, bám dính màng và không độc hại, nó trở thành

nguyên liệu cho nhiều ứng dụng dược sinh học. Ngoài ra, chitosan còn có khả năng bám lên bề mặt niêm mạc và xâm nhập vào những tế bào biểu mô. Do đó, hạt nano chitosan trở thành hệ thống phân phối thuốc có tiềm năng lớn [1].

Với nguồn nguyên liệu chitin phong phú ở Việt Nam, chúng tôi thực hiện nghiên cứu chế tạo vật liệu nano chitosan. Đồng thời khảo sát khả năng hấp phụ protein của hạt nano chitosan ứng dụng trong dẫn truyền thuốc. Các kết quả sẽ được đánh giá bằng nhiều phương pháp phân tích hóa lý khác nhau như FT-IR, XRD, FE-SEM và TEM.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Hóa chất

Chitosan (DD 75 %) của Sigma-Aldrich; Sodium Tripolyphosphate (TPP) ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ), Trung Quốc; Glutaraldehyde, Merck; NaOH 96 %, Trung Quốc;  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 99,5 %, Trung

Quốc; Nước khử ion, Merck; Protein Bovine Serum Albumin (BSA); Thuốc thử Bradford.

#### **Thiết bị**

Máy sắc ký thẩm thấu gel GPC AGILENT 1100 Series; Máy đồng cơ TELSTAR LYOQUEST, Tây Ban Nha; Máy ly tâm UNIVERSAL 32R HETTICH ZENTRIFUGEN, Đức; Máy lắc HEIDOLPH PROMAX 1020, Đức; Máy quang phổ UV-Vis-NIR-V670, JACCO, Nhật; Máy FE-SEM JSM 7401F, Nhật; Máy TEM JEM-1400, Nhật. Máy nhiễu xạ tia X BRUKER XRD-D8 ADVANCE, Đức; Máy đo phổ IR BRUKER EQUINOX 55, Đức.

#### **Phương pháp**

##### ***Tổng hợp nano chitosan***

Dung dịch chitosan nồng độ 0,5 % (w/v) được pha trong acid acetic 1 % (v/v). Sau khi hòa tan, điều chỉnh pH của dung dịch chitosan bằng dung dịch NaOH 5N. TPP (hoặc glutaraldehyde) nồng độ 0,25 % (w/v) được pha trong nước khử ion. Nhỏ từ từ TPP (glutaraldehyde) vào dung dịch chitosan trong điều kiện khuấy từ tốc độ 1500 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Dung dịch sau phản ứng được ly tâm với tốc độ 17000 vòng/phút trong 30 phút thu hạt nano chitosan. Rửa hạt nano, lặp lại nhiều lần với nước khử ion rồi đông khô bằng máy đồng cơ ở nhiệt độ -80°C, áp suất 0,001 mBar trong 72 giờ. Mẫu được bảo quản ở 5°C trong tủ lạnh. Kích cỡ hạt nano được đánh giá thông qua ảnh FE-SEM.

##### ***Khảo sát khả năng hấp phụ protein***

Cho 1 ml dung dịch huyền phù nano chitosan có nồng độ lần lượt là 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml trộn với 1 ml dung dịch protein BSA nồng độ 1 mg/ml, lắc với tốc độ 250 vòng/phút ở nhiệt độ phòng, trong thời gian 60 phút. Sau đó tiến hành ly tâm hỗn hợp ở 17000 vòng/phút ở 4°C, 30 phút. Lấy phần dịch nổi xác định lượng protein còn lại theo phương pháp Bradford [2]. Hiệu suất hấp phụ (loading efficiency-LE) và khả năng hấp phụ (loading capacity-LC) của hạt nano được tính toán theo công thức sau:

$$LE (\%) = \frac{[(\text{Tổng lượng protein} - \text{lượng protein trong dịch nổi}) / \text{tổng lượng protein}] \times 100}{}$$

$$LC (\text{mg/mg}) = \frac{[(\text{Tổng lượng protein} - \text{lượng protein trong dịch nổi}) / \text{khối lượng hạt nano chitosan}]}{}$$

##### ***Xác định đặc tính hóa lý của hạt nano chitosan***

Đặc tính hóa lý của hạt được đánh giá thông qua ảnh TEM, giản đồ XRD (BRUKER XRD-D8 ADVANCE), phổ FT-IR (BRUKER EQUINOX 55).

#### **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

##### **Khảo sát quy trình chế tạo hạt nano chitosan**

##### ***Khảo sát ảnh hưởng của các phương pháp điều chế khác nhau***

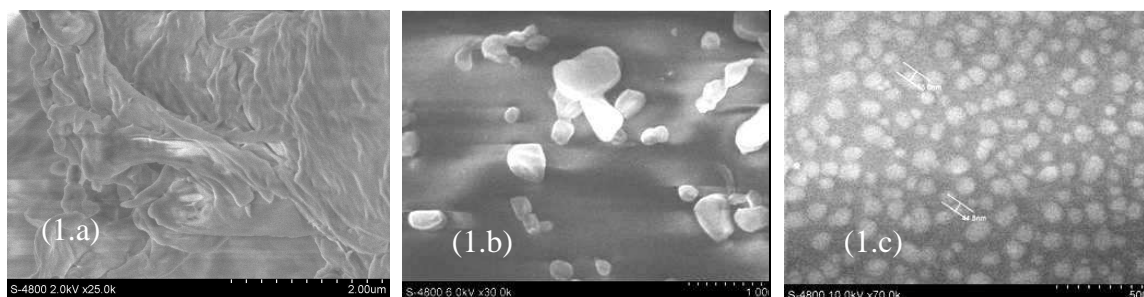
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các phương pháp điều chế khác nhau, phương pháp tạo nổi ngang, sử dụng tác chất glutaraldehyde

và phương pháp gel ion, sử dụng tác chất TPP

được trình bày trong Bảng 1.

**Bảng 1.** Đặc điểm hạt nano chitosan điều chế từ các phương pháp khác nhau

STT	Phương pháp	Phân bố kích thước (nm)	Kích thước trung bình (nm)
1	Phương pháp tạo nổi ngang	149,03-561,63	281,62
2	Phương pháp tạo gel ion	36,08-94,90	68,89



**Hình 1.** Ảnh FE-SEM của chitosan và nano chitosan trước và sau khi điều chế:

(1.a) Chitosan; (1.b) Phương pháp tạo nổi ngang; (1.c) Phương pháp tạo gel ion

Hình 1.a cho thấy hình dạng nguyên liệu chitosan ban đầu là từng lớp polymer với kích thước lớn. Phương pháp tạo nổi ngang với tác chất glutaraldehyde, hạt nano chitosan thu được có kích thước từ 149,03 nm-561,63 nm (kích thước trung bình là 281,62nm, Bảng 1, Hình 1.b). Phương pháp tạo gel ion với tác chất TPP, kích thước hạt nhỏ và đều hơn, phân bố từ 36,08 nm-94,90 nm (kích thước trung bình là 68,89nm, Bảng 1, Hình 1.c). Kích thước hạt nhỏ và phân bố khá đồng đều sẽ có tiềm năng lớn trong hấp phụ protein, thuốc.... Phương pháp tạo gel ion với tác chất tạo nổi TPP cũng là phương pháp đơn giản, rẻ tiền, hiệu quả cao và không độc hại nên được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

**Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ CS/TPP**

Trong phần này, ảnh hưởng của tỷ lệ CS/TPP được khảo sát nhằm tìm ra tỷ lệ thích hợp nhất để tạo hạt nano chitosan. Các tỷ lệ CS/TPP được khảo sát lần lượt là 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1.

Kết quả từ Hình 2 cho thấy, khi tăng tỷ lệ CS/TPP từ 3:1 đến 6:1, kích thước hạt giảm dần. Tuy nhiên, khi tỷ lệ CS/TPP tăng từ 6:1 đến 7:1, kích thước hạt tăng nhẹ trở lại. Ở tỷ lệ CS/TPP là 6:1, hạt thu được có dạng hình cầu và kích thước hạt nhỏ nhất.

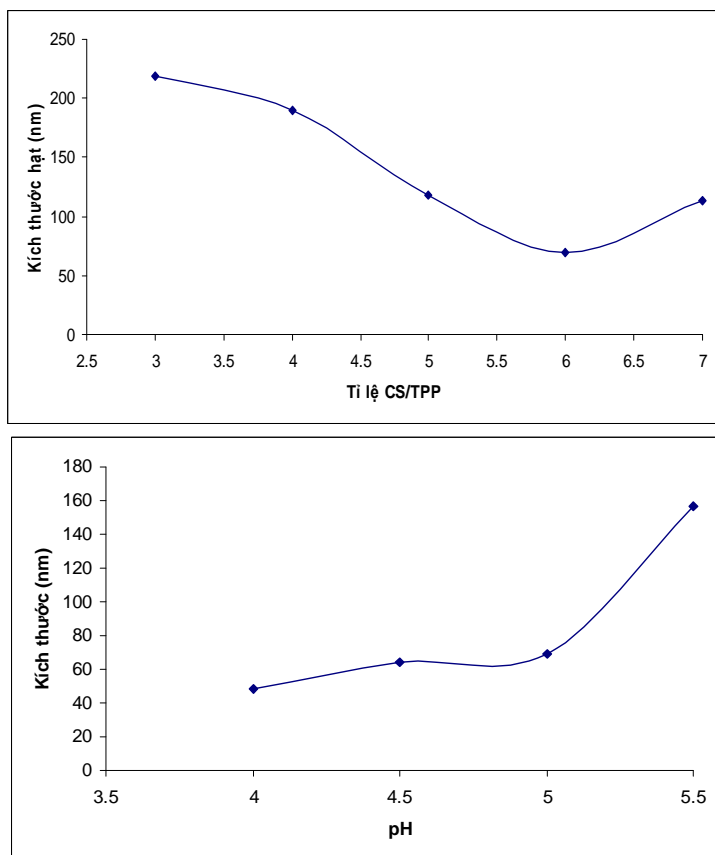
**Khảo sát ảnh hưởng của pH**

Chọn tỷ lệ CS/TPP là 6:1 để khảo sát pH. Các giá trị pH được khảo sát lần lượt là 4,0; 4,5; 5,0 và 5,5.

Kết quả từ hình 3 cho thấy, khi tăng pH từ 4,0 đến 5,5, kích thước hạt tăng dần. Kích

thước hạt nhỏ nhất (48,70 nm) thu được ở điều kiện pH là 4,0, tỷ lệ CS/TPP là 6:1. Có thể thấy rằng pH ít ảnh hưởng đến kích thước hạt trong khoảng từ 4,0 đến 5,0. Kích thước hạt tăng nhẹ khi pH tăng từ 4,0 đến 4,5. Kích thước hạt

không có sự thay đổi lớn trong khoảng pH từ 4,5 đến 5,0. Tuy nhiên, kích thước hạt tăng nhanh đột ngột trong khoảng pH từ 5,0 đến 5,5 cho thấy pH cao không thích hợp cho sự hình thành hạt có kích thước nhỏ.



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ CS/TPP đến kích thước hạt. Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến kích thước hạt.

### Khảo sát khả năng hấp phụ protein trên hạt nano chitosan

Trong phần này, chúng tôi cho 1 ml dung dịch huyền phù nano chitosan có nồng độ lần

lượt là 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 1,5 mg/ml và 2 mg/ml hấp phụ với 1 ml dung dịch protein BSA nồng độ 1 mg/ml, lắc 250 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong thời gian 60 phút.

Bảng 2. Số liệu khảo sát hiệu suất hấp phụ và khả năng hấp phụ protein

Nồng độ nano chitosan (mg/ml)	Hiệu suất hấp phụ (%)	Khả năng hấp phụ (mg/mg)
-------------------------------	-----------------------	--------------------------

0,25	62,14	2,49
0,5	96,41	1,93
1,0	70,00	0,70
1,5	57,45	0,38
2,0	56,14	0,28

Bảng 2 cho thấy khi nồng độ hạt nano chitosan tăng từ 0,25 mg/ml đến 0,5 mg/ml thì hiệu suất hấp phụ tăng từ 62,14 % đến 96,41 %. Khi nồng độ hạt nano chitosan tăng từ 0,5 mg/ml đến 2,0 mg/ml, hiệu suất hấp phụ lại giảm từ 96,41 % xuống 56,14 %. Điều này có lẽ là do hai nguyên nhân sau:

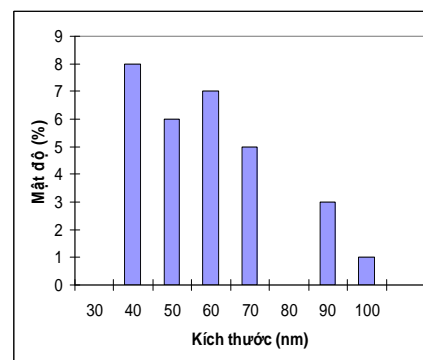
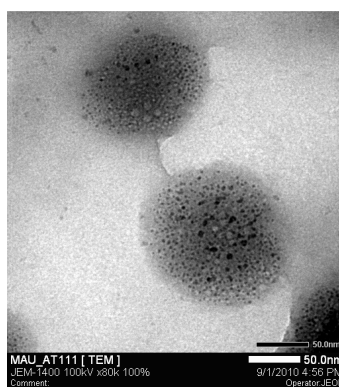
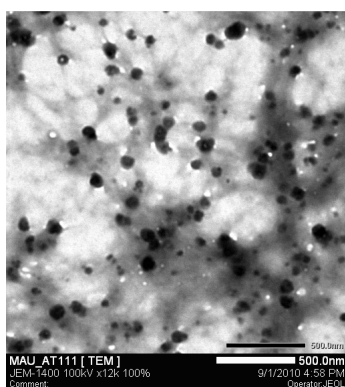
Thứ nhất, ở nồng độ hạt thấp, do ảnh hưởng của độ nhớt dung dịch là không đáng kể nên protein dễ dàng hấp phụ lên bề mặt hạt, dẫn đến hiệu suất hấp phụ protein tăng khi tăng nồng độ hạt. Ở nồng độ hạt cao, độ nhớt của dung dịch tăng lên đáng kể cản trở sự hấp phụ protein lên trên bề mặt hạt, dẫn đến hiệu suất hấp phụ protein giảm khi tiếp tục tăng nồng độ hạt nano chitosan.

Thứ hai, trong điều kiện thí nghiệm có tốc độ lắc mạnh, khi nồng độ hạt thấp, số lần va chạm giữa các hạt thấp. Khi nồng độ hạt càng tăng, số va chạm có hiệu quả giữa các hạt càng tăng. Kết quả là các hạt dính kết lại với nhau tạo thành tập hợp lớn hơn làm diện tích bề mặt hạt giảm dẫn đến hiệu suất hấp phụ protein giảm.

**Khảo sát đặc tính hóa lý của hạt nano chitosan**

**Khảo sát ảnh chụp TEM**

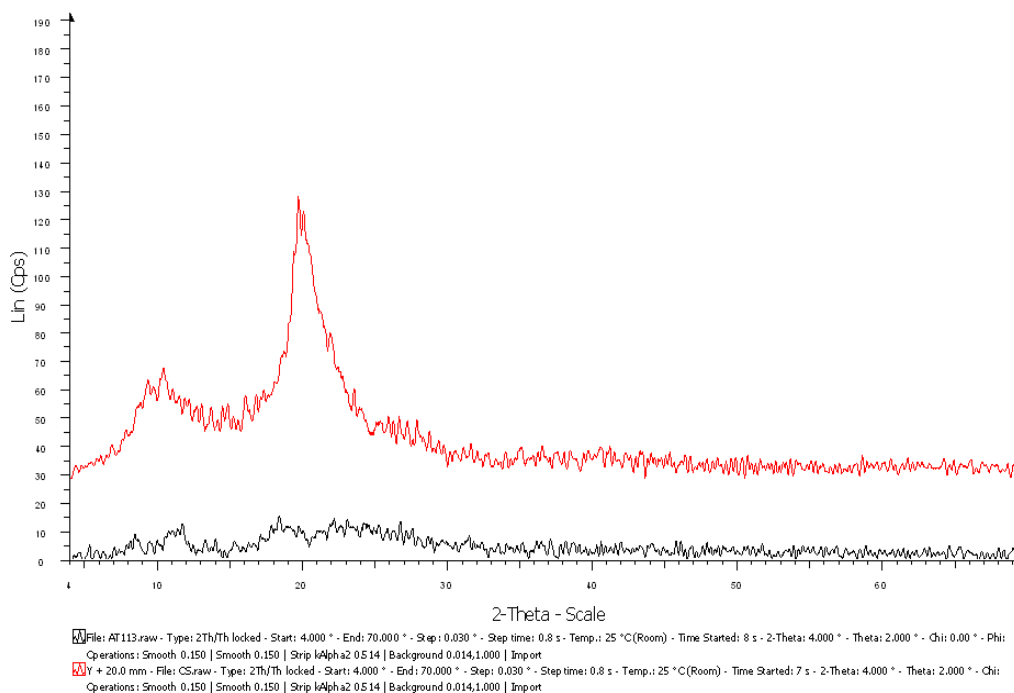
Hạt nano chitosan điều chế ở tỷ lệ CS/TPP là 6:1, pH là 4,0 được sử dụng để khảo sát kích thước và độ phân bố kích thước hạt.



**Hình 4.** Ảnh TEM và sự phân bố kích thước hạt nano chitosan điều chế ở pH=4,0; tỉ lệ chitosan/TPP là 6:1

Hình 4 cho thấy các hạt có dạng hình cầu, kích thước khá nhỏ, đồng đều và phân bố khá riêng lẻ, kích thước hạt trung bình là 54,01 nm và khoảng phân bố kích thước hạt là 31,65 nm-91,28 nm. Đặc biệt, hầu hết các hạt đều có kích thước từ 50 nm-60 nm. Dạng hình cầu của các hạt nano chitosan là dạng có hiệu quả nhất

#### Khảo sát giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD)



**Hình 5.** Giản đồ XRD của chitosan và nano chitosan

Mức độ tinh thể của nguyên liệu chitosan ban đầu và hạt nano chitosan được đánh giá thông qua giản đồ nhiễu xạ tia X của chúng. Giản đồ nhiễu xạ được đo trong khoảng 2 $\theta$  từ 4° đến 70°.

Giản đồ nhiễu xạ tia X của chitosan có hai mũi nhọn ở 2 $\theta$  là 10,5° và 20,0°, phù hợp với giản đồ nhiễu xạ của chitosan được công bố trong các tài liệu trước, cho thấy mức độ tinh

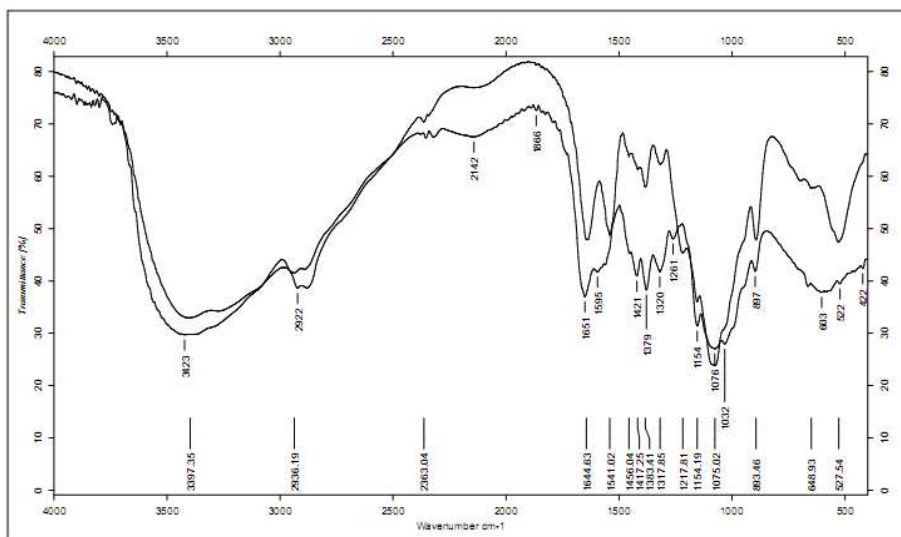
trong các ứng dụng của nano chitosan, đặc biệt trong các ứng dụng hấp phụ thuốc do bề mặt cầu có nhiều phương tiếp xúc với thuốc nhất. Kích thước hạt nhỏ và đồng đều thích hợp cho quá trình dẫn truyền thuốc qua niêm mạc và đảm bảo thuốc được phóng thích với tốc độ như nhau trong cơ thể.

thể cao của chitosan nguyên liệu. Tuy nhiên, không có mũi nào được tìm thấy trong giản đồ nhiễu xạ của hạt nano chitosan sau khi điều chế. Điều này cho thấy cấu trúc tinh thể của chitosan đã bị phá hủy sau khi tạo nối ngang với TPP [3] [4]. Sự phá hủy cấu trúc polymer đã cho thấy khả năng hấp phụ protein của các hạt nano chitosan như đã trình bày.

#### Khảo sát phổ hồng ngoại FT-IR

Khảo sát phổ FT-IR của chitosan, nano chitosan nhằm xác định cấu trúc hóa học của hạt nano. Đối với phổ của chitosan, mũi phổ ở  $3423\text{ cm}^{-1}$  tương ứng với dao động của nhóm  $\text{NH}_2$  và  $\text{OH}$  của chitosan. Mũi ở  $1651\text{ cm}^{-1}$  tương ứng với dao động của nhóm  $\text{CONH}_2$ . Mũi ở  $1076\text{ cm}^{-1}$  tương ứng với dao động của nhóm  $\text{C-O-C}$ . Đối với phổ của nano chitosan,

có sự dịch chuyển mũi từ  $3423\text{ cm}^{-1}$  sang  $3397\text{ cm}^{-1}$ . Mũi  $1651\text{ cm}^{-1}$  biến mất và hai mũi mới xuất hiện ở  $1645\text{ cm}^{-1}$  và  $1541\text{ cm}^{-1}$  là do liên kết giữa nhóm ammonium và phosphoric [3]. Do vậy, có thể kết luận nhóm ammonium của chitosan đã tạo nối ngang với TPP trong sản phẩm nano chitosan.



Hình 6. Phổ FT-IR của chitosan (đường dưới) và nano chitosan (đường trên)

## KẾT LUẬN

Chúng tôi đã chế tạo thành công hạt nano chitosan có dạng hình cầu, kích thước nhỏ và đồng đều qua ảnh chụp FESEM, TEM. Hiệu suất hấp phụ protein khá cao là 96,41 %. Đặc

tính hóa lý của hạt được đánh giá bằng nhiều phương pháp phân tích khác nhau như TEM, XRD và FT-IR khẳng định chitosan đã tạo nối ngang với TPP hình thành kích thước nano và cấu trúc tinh thể ban đầu của chitosan bị phá hủy sau khi tạo nối.

**STUDY ON PREPARATION OF CHITOSAN NANOPARTICLE AS PROTEIN  
DELIVERY CARRIER FOR DRUG DELIVERY APPLICATION**

**Duong Thi Anh Tuyet, Vo Quoc Khuong, Phan Hue Phuong, Nguyen Thi Phuong Phong**

University of Science, VNU-HCM

**ABSTRACT:** *This work investigates the polyanion initiated gelation process in fabricating chitosan (CS)-tripolyphosphate (TPP) nanoparticle intended to be used as protein delivery carrier. Variations in cross-linking agents, CS/TPP weight ratio and solution pH were investigated. The chitosan nanoparticles were characterized by several analytical techniques such as FT-IR, XRD, FE\_SEM and TEM. Finally, protein loading efficiency (LE) and protein loading capacity (LC) were investigated.*

**Key words:** *Chitosan, Bovine serum albumin (BSA), Nanoparticles*

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- [1]. H. Zhang, S. Wu, Y. Tao, L. Zang, Z. Su, *Preparation and characterization of water-soluble chitosan nanoparticles as protein delivery system*, Journal of Nanomaterials, 1-5 (2010).
- [2]. Q. Gan, T. Wang, *Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditons for efficient loading and release*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 59, 24-34 (2007).
- [3]. L. Qui, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu and X. Zou, *Preparation and activity of chitosan nanoparticles*, Carbohydrate Research, 339, 2693-2700 (2004).
- [4]. L. Qui, Z. Xu, *Lead sorption from aqueous solutions on chitosan nanoparticles*, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 251, 183-190 (2004).