



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0004499

(51) **A01K 9/00; A61K 9/14; A61K 31/00**
2023.01

(13) **Y**

(21) 2-2024-00265

(22) 03/05/2024

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/07/2024 436

(73) Viện Hoá Học, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thanh Tâm (VN); Đào Đức Thiện (VN); Hoàng Mai Hà (VN); Hồ Thị Oanh
(VN); Nguyễn Thị Diệp (VN); Ngô Quốc Anh (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT NANO TETRANDRINE CÓ TÁC DỤNG KHÁNG UNG
THƯ VÀ HẠ HUYẾT ÁP**

(21) 2-2024-00265

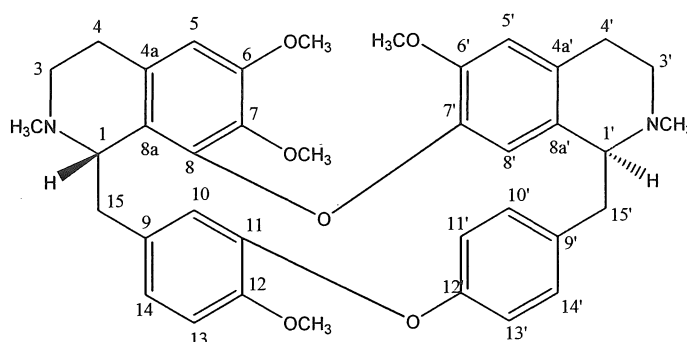
(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất nano tetrandrine có khả năng phân tán tốt trong nước, độ ổn định cao và kích thước hạt nằm trong khoảng 65-125 nm, bao gồm các bước: tạo ra hệ phân tán gồm chất hoạt động bề mặt là Tween 80, với tỷ lệ hàm lượng Tween 80: tetrandrine là 2:1; tạo ra hệ chất bao bọc vi nang là β -cyclodextrin trong nước; tạo ra hệ nano tetrandrine với hàm lượng tetrandrine nằm trong khoảng 5-15%, và cuối cùng tạo bột nano bằng phương pháp sấy phun. Sản phẩm nano tetrandrine có tác dụng kháng ung thư và hạ huyết áp hiệu quả, từ đó nâng cao ứng dụng của hệ hạt nano tetrandrine trong các lĩnh vực dược phẩm và thực phẩm chức năng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất nano tetrandrine có khả năng phân tán tốt trong nước, có hoạt tính gây độc tế bào ung thư và hạ huyết áp.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Tetrandrine là một bisbenzylisoquinoline alkaloid, dạng chất rắn màu trắng, có công thức phân tử là $C_{38}H_{42}O_6N_2$ với khối lượng phân tử là 622,76 g/mol, điểm nóng chảy 217-218 °C, độ quay cực $[\alpha]_D^{20}$ 252,4 (c 0,2; $CHCl_3$). Tetrandrine là phân tử kỵ nước, tan trong các dung môi hữu cơ như ete, diclometan, clorofom và hầu như không tan trong nước.



Cấu trúc hóa học của tetrandrine

Tetrandrine là một alkaloid không độc, được tìm thấy trong một số loài thuộc họ Menispermaceae như *Stephania cepharantha*, *Stephania japonica*, *Stephania rotunda*, *Stephania hernandifolia*, *Cyclea peltata*, *Cyclea barbata*, *Cocculus diversifolius*, *Cocculus japonicus*, *Cissampelos pareira* var. *hirsuta* ... Đặc biệt trong loài *Stephania tetrandra* hàm lượng của tetrandrine được xác định là hơn 1% so với trọng lượng rễ khô (Xu và cộng sự, 2021).

Ngay từ những năm 80 của thế kỷ trước, y học Trung Quốc đã sử dụng tetrandrine để chữa bệnh bụi phổi silic (silicosis) và bệnh thấp khớp. Hiện ở Nhật Bản và Trung Quốc đã sử dụng tetrandrine kết hợp với phương pháp bức xạ liều

thấp để chữa bệnh ung thư phổi. Ngoài ra, nó dùng để trị bệnh thấp khớp, đau dây thần kinh, các bệnh phổi và đường hô hấp do hít phải bụi silic. Tetrandrine đã được thử nghiệm lâm sàng để điều trị bệnh ung thư máu. Nó có thể được sử dụng dưới dạng đường uống hoặc đường tiêm. Theo khuyến cáo của nhà sản xuất tại Nhật Bản, liều dùng an toàn, không xảy ra phản ứng phụ là 200-300 mg/ngày (Xu và cộng sự, 2021).

Các nghiên cứu dược lý đã chỉ ra rằng tetrandrine thể hiện phổ hoạt tính đa dạng như kháng ung thư, hạ huyết áp, kháng viêm, giảm đau, chống xơ vữa mạch máu, chống trầm cảm, chống viêm khớp dạng thấp, chống béo phì, kháng khuẩn, kháng virus SARS-CoV-2, bảo vệ thần kinh và cải thiện trí nhớ (Luan và cộng sự, 2020; Mamontov và cộng sự, 2021; Bhagya và cộng sự, 2022). Tetrandrine có khả năng ngăn chặn và ức chế sự tạo u ung thư ở các giai đoạn khác nhau của nhiều loại ung thư như ung thư phổi, ung thư vú, ung thư gan, ung thư máu, ung thư xương, ung thư đại tràng, ung thư tuyến tiền liệt ... Trong đó, nó có khả năng ức chế mạnh các dòng tế bào ung thư phổi A549, SW1573/2R120; ung thư gan HepG2, Huh7 và Hep3B; ung thư vú MDA-MB-231, MCF-7, SUM-149 và SUM-159. Tetrandrine có tác dụng chống ung thư bằng cách ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư, chống sự hình thành mạch máu, ức chế sự xâm lấn và di căn của tế bào, kích thích quá trình chết theo chu trình, thúc đẩy quá trình tự thực bào, kiểm soát chu kỳ tế bào, chống hiện tượng đề kháng đa thuốc (MDR) và tăng nhạy xạ, làm cho các tế bào ung thư nhạy cảm hơn với tia bức xạ giúp tăng hiệu quả xạ trị (Luan và cộng sự, 2020).

Trong số các hoạt tính đáng quý khác của tetrandrine thì hoạt tính hạ huyết áp là rất đáng chú ý. Nhiều nghiên cứu chỉ ra tetrandrine có khả năng hạ huyết áp theo cơ chế chặn kênh canxi loại L và T (Liu và cộng sự, 1991; Rossier và cộng sự, 1993; Wang và cộng sự, 1995; Kwan và cộng sự, 2002; Bhagya và cộng sự, 2016). Ngoài ra, tetrandrine có tác dụng hạ huyết áp thông qua tác dụng giảm nồng độ của chất gây co mạch norepinephrine (Huang và cộng sự, 2016), ức chế các yếu tố gây kết tập tiểu cầu và co mạch như thromboxane B2 (TXB2),

thrombin- và axit arachidonic trên chuột thực nghiệm (Kim và cộng sự, 1999).

Mặc dù tetrandrine có nhiều hoạt tính sinh học đáng quý nhưng lại là hoạt chất có độ tan trong nước rất thấp, do vậy sinh khả dụng bị hạn chế. Để khắc phục nhược điểm này, các nhà khoa học đã sản xuất một số hệ nano tetrandrine khác nhau như nano lipid, nano liposom, nano polyme, nano polyme-lipid ... có khả năng phân tán tốt trong nước, cải thiện sự phân bố, tăng sinh khả dụng đồng thời tăng cường dược tính của hoạt chất.

Năm 2013, Zhao và cộng sự đã sản xuất hạt nano lipid được nạp tetrandrine bằng phương pháp pha đảo. Kết quả thu được sản phẩm có kích thước hạt nhỏ nhất là 40 nm, với hiệu suất bao gói là 93,9 %. Khả năng tan của sản phẩm nano này trong *n*-octanol tăng từ 8,34 $\mu\text{g/mL}$ lên 35,64 $\mu\text{g/mL}$. Sản phẩm này có khả năng phân tán rất tốt trong nước, với 25 % trong 1 giờ đầu và tăng lên 70 % trong 12 giờ tiếp theo. Kết quả thử nghiệm trên chuột cho thấy sự hấp thụ của nano tetrandrine là 208 % so với tetrandrine tinh khiết. Năm 2014, trong nghiên cứu của Xu và cộng sự, các tác giả đã sản xuất hệ nano polyme poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(ϵ -caprolactone) (PVP-b-PCL) để bao gói tetrandrine. Sản phẩm nano có đường kính trung bình 110 nm -125 nm với hiệu suất bao gói cao. Nhóm tác giả đã khẳng định khả năng gây chết dòng tế bào ung thư phổi A549 của sản phẩm nano này cao hơn so với tetrandrine tinh khiết. Nhóm nghiên cứu của Guo và cộng sự (2020) đã sử dụng natri croscarmelloza (CCS) và polyme D- α -tocopheryl polyetylen glycol 1,000 succinat (TPGS) kết hợp với trimetyl amoni chlorua chitosan thủy canh (hydroponically trimethyl ammonium chloride chitosan - HACC) để tổng hợp hai dạng hạt nano bao gói tetrandrine (Tet-CCS-NS và Tet-HACC-TPGS-NS). Các sản phẩm nano thu được có kích thước trung bình là $469,1 \pm 14$ nm và $157,3 \pm 5$ nm, điện thế zeta là $-29,4 \pm 0,26$ mV và $23,3 \pm 0,36$ mV; độ tan được cải thiện đáng kể tăng gấp 4-5 lần. Chúng được chứng minh có khả năng ức chế sự phát triển ở dòng tế bào ung thư phổi A549 theo cơ chế chết theo chương trình và tự thực bào. Tuy nhiên, hai sản phẩm này có hoạt tính ức chế sự phát triển của tế bào A549 là yếu hơn so với

tetrandrine tinh khiết (Guo và cộng sự, 2020). Mới đây, một hệ nano khác dựa trên lipid làm chất mang đã được công bố. Nhóm tác giả Fang và cộng sự đã sản xuất hạt nano liposom mang tetrandrine bằng phương pháp phun đông lạnh ethanol có kích thước hạt trung bình $65,57 \pm 1,60$ nm, điện tích bề mặt $-0,61 \pm 0,10$ mV và hiệu suất bao gói là $87,20\% \pm 1,30\%$. Sản phẩm nano này có độ bền tốt, khả năng hấp thụ cao, sự tương thích sinh học vượt trội và khả năng ức chế tế bào ung thư phổi tốt hơn so với tetrandrine tinh khiết (Fang và cộng sự, 2024).

Trong sáng chế số CN100386080C, bằng phương pháp siêu âm và phương pháp nhũ hóa, các tác giả Trung Quốc đã sản xuất sản phẩm nano lipid mang tetrandrine với chất mang là axit stearic và chất nhũ hóa phospholipid từ đậu nành. Sản phẩm thu được có kích thước hạt nhỏ, độ ổn định và hiệu suất bao gói cao. Nó được chứng minh là có khả năng hấp thụ tốt, tăng hoạt tính và không gây tác dụng phụ (Li và cộng sự, 2008). Năm 2016, trong sáng chế số CN105816433, Zhu và cộng sự đã sản xuất hệ nano copolyme kết hợp của axit polylactic và axit glycolic mang tetrandrine có kích thước hạt trung bình là 300-400 nm, trọng lượng phân tử trung bình của chất đồng trùng hợp axit polylactic – axit glycolic là 9000–10000, trong đó tỷ lệ khối lượng của axit lactic và axit glycolic nằm trong khoảng từ 85:15 đến 75:25. Sản phẩm có thể điều chỉnh được sự giải phóng tetrandrine, kéo dài thời gian tác dụng của thuốc, duy trì hiệu quả điều trị và giảm liều dùng. Nó có tác dụng tốt trên gan và thận (Zhu và cộng sự, 2016). Trong sáng chế số CN109394733, các nhà khoa học Trung Quốc đã đề cập đến việc sản xuất hạt nano tetrandrine PLGA được bao bọc trong màng tế bào hồng cầu và phân tích những ứng dụng của nó. Sáng chế chỉ ra rằng, các hạt nano PLGA tetrandrine được bao bọc trong màng tế bào hồng cầu khi đưa vào thuốc có tác dụng tăng khả năng phân tán trong nước của thuốc, giảm kích ứng, làm chậm quá trình giải phóng thuốc, cải thiện khả năng tương thích sinh học của hệ thống nạp thuốc và ngăn chặn các tác dụng phụ (Qiu và cộng sự, 2019).

Hiện nay nhiều thuốc nano được sử dụng để chữa nhiều căn bệnh như ung thư, tăng huyết áp, đái tháo đường, nhiễm trùng, chống viêm, giảm đau ... Thuốc

nano có nhiều ưu điểm hơn hẳn thuốc tiền thân của nó như tính tương thích cao, hấp thụ nhanh, đến đúng cơ quan đích, tác dụng kéo dài, ít tác dụng phụ. Những ưu điểm này của thuốc nano nhờ hệ thống vận chuyển của nó. Trong đó, hệ nano polyme là một trong những vật liệu phổ biến để tạo chất mang thuốc. Nano polyme được chú ý nhiều nhờ tính linh hoạt và đặc điểm có thể điều chỉnh thành phần hóa học của chúng.

Nhận thấy rằng, nhiều hạt nano tetrandrine đã được tạo ra bằng việc sử dụng nhiều chất mang khác nhau. Tuy nhiên, hiện chưa có công bố về việc sử dụng polyme β -cyclodextrin, một tá dược phổ biến trong dược phẩm để tạo hạt nano tetrandrine có hoạt tính kháng ung thư và tác dụng hạ huyết áp. Do vậy, nhóm tác giả giải pháp hữu ích đã đề xuất phương pháp sản xuất hạt nano tetrandrine dạng bột khô sử dụng β -cyclodextrin làm chất mang với quy trình sản xuất đơn giản, an toàn và dễ thực hiện. Hệ nano tetrandrine với chất mang β -cyclodextrin là khác biệt so với các sản phẩm đã biết khi được tạo ra theo định hướng sản xuất các sản phẩm có kích thước nano nên việc sử dụng các chất tham gia quá trình sản xuất và các điều kiện thực hiện như tốc độ khuấy, nhiệt độ, .v.v. được lựa chọn một cách phù hợp, đem lại hiệu quả phân tán hoạt chất cao và kích thước hạt nhỏ. Sản phẩm nano tetrandrine có độ bền cao, tăng khả năng phân tán trong nước và sinh khả dụng, đồng thời tăng cường được dược tính của hoạt chất.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là làm tăng tính sinh khả dụng của hoạt chất tetrandrine. Để đạt được mục đích này, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất nano tetrandrine có kích thước hạt nhỏ dưới 100 nm, phân bố đồng đều và có khả năng phân tán tốt trong nước. Quy trình này bao gồm các bước:

a) Chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho tetrandrine và chất hoạt động bề mặt Tween 80 theo tỷ lệ 1:2 (g/g) hoà tan hoàn toàn trong dung môi etanol, sử dụng máy khuấy từ với tốc độ khuấy 550 vòng/phút trong thời gian 2 giờ, thu được dung dịch trong suốt;

b) Chuẩn bị chất mang bằng cách hòa tan β -cyclodextrin trong nước cất

dưới điều kiện khuấy 500 vòng/phút trong thời gian 1,5 giờ;

c) Tạo hệ nano đồng nhất bằng cách bổ sung từ từ pha phân tán vào dung dịch chất mang. Quá trình này diễn ra trong điều kiện khuấy bằng máy khuấy từ, ở tốc độ 650 vòng/phút trong thời gian 3 giờ, sau đó tiếp tục siêu âm hỗn hợp trong 45 phút ở 60 °C để đạt được sự phân tán đồng nhất;

d) Tạo bột nano tetrandrine bằng cách chuyển hệ nano đồng nhất vào hệ thống thiết bị sấy phun, thu được bột nano mịn, tơi và có màu trắng.

Các tác giả giải pháp hữu ích đã thực hiện một số phương án thực nghiệm với quy trình sản xuất trên, các thực nghiệm được khảo sát với hàm lượng tetrandrine trong các hệ nano nằm trong khoảng 5 đến 15%, theo đó:

Theo phương án thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất nano tetrandrine với hàm lượng tetrandrine chiếm 5%;

Theo phương án thứ hai, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất nano tetrandrine với hàm lượng tetrandrine chiếm 10%;

Theo phương án thứ ba, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất nano tetrandrine với hàm lượng tetrandrine chiếm 15%;

Theo giải pháp hữu ích, chất hoạt động bề mặt được sử dụng trong quá trình sản xuất nano tetrandrine là Tween 80 với tỷ lệ hàm lượng chất hoạt động bề mặt: hoạt chất, tốt nhất là 2:1. Chất bao bọc vi nang được sử dụng là β -cyclodextrin. Các hệ nano tetrandrine thu được có khả năng phân tán tốt trong nước, kích thước hạt trung bình từ 65- 125 nm và có khả năng kháng ung thư và hạ huyết áp cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Giải pháp hữu ích sẽ được trình bày cụ thể và được hiểu rõ ràng hơn qua việc mô tả chi tiết giải pháp cùng với các hình vẽ minh họa kèm theo, trong đó:

Hình 1 là sơ đồ quy trình sản xuất nano tetrandrine;

Hình 2 là kết quả giản đồ phân bố kích thước hạt, khả năng phân tán trong nước và chỉ số phân tán PDI của các hệ nano tetrandrine;

Hình 3 là kết quả đánh giá tác dụng hạ huyết áp của nano tetrandrine;

Hình 4 là kết quả đánh giá khả năng ức chế tế bào ung thư của nano tetrandrine.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất nano tetrandrine được trình bày một cách chi tiết dưới đây.

a) Bước thứ nhất: Chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho tetrandrine và chất hoạt động bề mặt Tween 80 (Bảng 1) theo tỷ lệ 1:2 (g/g) hoà tan hoàn toàn trong dung môi etanol, sử dụng máy khuấy từ với tốc độ khuấy 550 vòng/phút trong thời gian 2 giờ, thu được dung dịch trong suốt.

Bảng 1. Thành phần các mẫu nano tetrandrine

Mẫu	Tetrandrine (g)	Tween 80 (g)	β -cyclodextrin (g)	Etanol (ml)	Nước cất (ml)	Hàm lượng tetrandrine (%)
TNP1	3	6	51	150	300	5
TNP2	6	12	42	150	300	10
TNP3	9	18	33	150	300	15

Với mục đích tạo ra các hạt tiểu phân chứa tetrandrine có kích thước nano và ổn định, các tác giả đã sử dụng chất hoạt động bề mặt là Tween 80 với tỷ lệ hàm lượng Tween 80: tetrandrine được xác định là 2:1. Việc lựa chọn chất hoạt động bề mặt không ion như Tween 80 với cấu trúc phân tử gồm một đầu thân dầu và đầu ưa nước giúp hợp chất có khả năng tạo liên kết với tetrandrine và hỗn hợp chất mang trong nước.

Ngoài ra, trong bước này, etanol được sử dụng làm dung môi hòa tan các hợp chất do nó có khả năng hòa tan tetrandrine và Tween 80 rất tốt, từ đó tạo pha phân tán tốt và tạo điều kiện để pha phân tán có thể tương hợp cao với chất mang β -cyclodextrin trong nước.

b) Bước thứ hai: Chuẩn bị chất mang bằng cách hòa tan β -cyclodextrin

(Bảng 1) trong nước cất dưới điều kiện khuấy 500 vòng/phút trong thời gian 1,5 giờ.

Tetrandrine khi được đưa vào cơ thể qua đường miệng, thì chỉ một phần nhỏ được hấp thu vào trong máu thông qua quá trình tiêu hóa, còn lại phần lớn hoạt chất bị đào thải ra khỏi cơ thể. Do đó, cần sản xuất hệ hạt nano chứa tetrandrine với kích thước nhỏ, cấu trúc có độ ổn định cao, không kết dính và có độ hòa tan cao. Theo đó, β -cyclodextrin được lựa chọn làm chất bao bọc vi nang cho quá trình sản xuất hệ hạt nano tetrandrine. Sự có mặt của chất mang này sẽ giúp quá trình tạo bột nano trở nên thuận lợi, dễ dàng, đạt hiệu quả cao đồng thời nâng cao độ bền cho tetrandrine trong hệ nano.

c) Bước thứ ba: Tạo hệ nano đồng nhất bằng cách bổ sung từ từ pha phân tán vào dung dịch chất mang. Quá trình này diễn ra trong điều kiện sử dụng máy khuấy từ với tốc độ khuấy 650 vòng/phút trong thời gian 3 giờ, sau đó tiếp tục siêu âm hỗn hợp trong 45 phút ở 60 °C để đạt được sự phân tán đồng nhất.

d) Tạo bột nano tetrandrine bằng cách chuyển hệ nano đồng nhất vào hệ thống thiết bị sấy phun, thu được bột nano mịn, tơi và có màu trắng.

Hệ nano tetrandrine tạo ra được phân tích, đánh giá các tính chất hóa lý và hoạt tính sinh học của sản phẩm.

i) Khả năng phân tán trong nước của các hệ nano tetrandrine

Các sản phẩm bột nano tetrandrine đã được đánh giá khả năng phân tán trong nước của chúng, kết quả thu được như trong Hình 2A. Sự tương hợp tốt giữa tetrandrine với chất hoạt động bề mặt Tween 80 và chất bao bọc vi nang β -cyclodextrin đã tạo hạt nano có khả năng phân tán rất tốt trong nước và không có dấu hiệu kết tụ sau nhiều ngày bảo quản ở nhiệt độ phòng.

ii) Sự phân bố kích thước hạt và chỉ số phân tán PDI của các hệ nano tetrandrine

Kích thước hạt trung bình, sự phân bố của các hạt nano và chỉ số phân tán của các mẫu sản phẩm bột nano tetrandrine được xác định bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động DLS, thực hiện trên máy *Litesizer*TM 500, Anton Paar, Áo.

Hình 2A và B là kết quả thể hiện sự phân bố kích thước hạt và chỉ số phân tán của các sản phẩm TNP1 (chứa 5% tetrandrine), TNP2 (chứa 10% tetrandrine) và TNP3 (chứa 15% tetrandrine).

Giản đồ phân bố kích thước hạt chỉ ra rằng, kích thước hạt trung bình của các hệ nano tetrandrine TNP1, TNP2 và TNP3 lần lượt là 65, 99 và 125 nm. Sự thay đổi kích thước hạt của các mẫu được cho là tỷ lệ thuận với hàm lượng tetrandrine có trong hệ nano. Điều đó có nghĩa hàm lượng hoạt chất được đưa vào hệ nano càng lớn thì kích thước hạt có xu hướng tăng. Kết quả chỉ số phân tán PDI (Hình 2B) cho thấy, các hạt nano TNP1 chứa 5% tetrandrine và TNP2 chứa 10% tetrandrine thể hiện sự phân bố hẹp, với chỉ số PDI đều dưới 0,2; cụ thể lần lượt là 0,182 và 0,193 trong khi đó, sự phân bố của các hạt nano TNP3 chứa 15% tetrandrine tương đối rộng, giá trị PDI là 0,252. Với mục tiêu sản xuất được sản phẩm nano đáp ứng tốt các tiêu chuẩn cơ sở đồng thời chứa hàm lượng hoạt chất cao hướng tới ứng dụng làm nguồn nguyên liệu trong các ngành dược phẩm và mỹ phẩm, nhóm tác giả đã lựa chọn sản phẩm nano tetrandrine TNP2 chứa 10% tetrandrine là đại diện cho các mẫu nano tetrandrine để đánh giá hoạt tính sinh học của sản phẩm như hạ huyết áp và gây độc tế bào ung thư.

iii) Đánh giá tác dụng hạ huyết áp của sản phẩm nano tetrandrine

Hiện nay, thuốc điều trị tăng huyết áp rất đa dạng và theo nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm nhóm chặn kênh canxi, nhóm ức chế men chuyển angiotensin, nhóm chặn beta giao cảm, nhóm lợi tiểu, nhóm chặn thụ thể angiotensin II ... Trong đó, thuốc ức chế men chuyển angiotensin (angiotensin converting enzyme, ACE) được ưu tiên sử dụng điều trị trên nhóm đối tượng bệnh nhân tăng huyết áp có kèm theo bệnh đái tháo đường vì tác dụng bảo vệ thận, hay bệnh suy tim, nhồi máu cơ tim. Angiotensin bản chất là một loại protein có tác dụng gây co thắt mạch máu và tăng huyết áp. Nhóm thuốc ức chế men chuyển giúp giảm huyết áp bằng cách làm giãn mạch, giảm sức cản ngoại biên, từ đó giảm áp lực lên thành mạch.

Trong giải pháp hữu ích này, tác dụng hạ huyết áp của sản phẩm nano

tetrandrine TNP2 được đánh giá thông qua khả năng ức chế men chuyển angiotensin bằng phương pháp đo quang phổ. Hoạt tính ức chế men chuyển angiotensin được thực hiện theo phương pháp của Touzy và cộng sự (2017). Cơ sở của phương pháp là dựa vào phản ứng của ACE với cơ chất Hippuryl-HistidylLeucine (HHL). Sản phẩm dipeptit HL giải phóng ra kết hợp với TNBS (2,4,6-trinitrobenzen sulfonat) tạo thành phức chất hấp thụ cực đại ở bước sóng 410 nm. Mẫu thử được pha trong DMSO ở các dải nồng độ từ 0,89→0,22 mg/mL, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần. Chất tham khảo là (+)-captopril có nồng độ 100 µg/mL.

Hỗn hợp phản ứng bao gồm: 35 µL đệm natri borat 0,05 M (pH 8,2), 35 µL mẫu, 20 µL cơ chất HHL 5 mM, và 10 µL men ACE. Mẫu và men ACE được ủ 10 phút ở 37 °C để thiết lập sự tiếp xúc tối ưu. Sau đó, bổ sung 20 µL cơ chất HHL 5 mM. Sau 30 phút ở 37 °C, ngưng phản ứng bằng cách bổ sung 50 µL HCl 1M, sau đó ngay lập tức bổ sung 100 µL pyridin và 50 µL benzensulfonylchlorua. Tiến hành đo quang tại $\lambda=410$ nm (multimode microplate reader Spark®, Männedorf, Switzerland).

Tỷ lệ % hoạt tính ức chế ACE được xác định theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ ức chế ACE (\%)} = \left[1 - \frac{\text{Abs (mẫu)} - \text{Abs (Blank)}}{\text{Abs ĐC(-)}} \right] \times 100 \pm \sigma$$

Độ lệch chuẩn σ tính theo công thức Duncan: $\sigma = \sqrt{(\sum(x_i - \bar{x})^2 / n - 1)}$

Giá trị IC_{50} là nồng độ hoạt chất (biểu thị bằng mg hoạt chất/mL) cần thiết để ức chế 50% hoạt tính ACE trong điều kiện thực hiện thí nghiệm.

Kết quả đánh giá tác dụng ức chế ACE cho thấy ở nồng độ 0,89 mg/mL sản phẩm nano tetrandrine TNP2 có khả năng ức chế ACE mạnh hơn so với tetrandrine tinh khiết với tỷ lệ ức chế lần lượt là 68,34 % và 29,88 % (Hình 3). Sản phẩm nano TNP2 được tiếp tục nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau để xác định giá trị IC_{50} . Kết quả cho thấy, nano tetrandrine có khả năng ức chế khá tốt men ACE với giá trị IC_{50} là 0,65 mg/mL. Như vậy, sản phẩm nano tetrandrine có hoạt tính hạ huyết áp tốt hơn so với tetrandrine tinh khiết khi khả năng ức chế 50 % sự phát triển của

men chuyển angiotensin tăng lên đáng kể, từ đó chứng minh hiệu quả của hệ nano sản xuất được.

iv) Đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư của sản phẩm nano tetrandrine

Hiện nay, việc sàng lọc và đánh giá các hoạt chất làm thuốc trong điều trị ung thư chủ yếu được thực hiện dựa trên tác dụng gây độc các dòng tế bào ung thư thực nghiệm. Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được sử dụng rộng rãi để phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*. Ưu điểm của các phép thử này là có thể thực hiện đơn giản, nhiều hợp chất hay nhiều nồng độ có thể được thử nghiệm nhanh chóng trên đĩa 96 giếng.

Trong giải pháp hữu ích này, hoạt tính gây độc tế bào của tetrandrine và sản phẩm nano tetrandrine TNP2 được thử nghiệm trên dòng tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư phổi A549 bằng phương pháp sulforhodamine B (Skehan và cộng sự, 1990). Phép thử dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) để tính hàm lượng protein tế bào tổng số đo được khi nhuộm thành phần protein của tế bào bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn vào phân tử protein, do vậy lượng tế bào càng nhiều (càng nhiều lượng protein) thì giá trị OD càng lớn. Các dòng tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) có thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamin, 10 mM axit 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinetsulfonic và 1,0 mM natri pyruvat, ngoài ra bổ sung 10 % huyết thanh phôi bò (fetal bovine serum, FBS). Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỷ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm ở điều kiện 37 °C, 5 % CO₂.

Đầu tiên tế bào được trypsin hóa để tác động làm rời tế bào và đếm ở trong buồng đếm sau đó điều chỉnh đến mật độ phù hợp với yêu cầu thí nghiệm và đưa 190 μ L tế bào vào đĩa 96 giếng thử nghiệm. Chất thử được pha trong DMSO 100 % thành dãy các nồng độ giảm dần sau đó chuyển vào các giếng của đĩa 96 giếng đã chuẩn bị tế bào ở trên. Giếng có tế bào ung thư nhưng

không có chất thử (190 μ L) + DMSO 1 % (10 μ L) sẽ được dùng làm đối chứng ngày 0. Ủ trong tủ ấm 37 °C trong 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng axit tricloacetic 20 % trong 1 giờ, nhuộm màu trong 15 phút bằng SRB 0,4 % rồi rửa 3 lần bằng axit axetic 1% và để khô ở nhiệt độ phòng. Sử dụng 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan SRB, lắc nhẹ 10 phút rồi đọc kết quả đo OD trên máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad) ở bước sóng 540 nm. Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ ức chế (\%)} = 100 - \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{ngày 0})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{ngày 0})} \times 100$$

Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10 - 2 - 0,4 - 0,08 μ g/mL được sử dụng như là chất đối chứng tham khảo. DMSO 1 % luôn được sử dụng như đối chứng âm (nồng độ cuối cùng trong giếng thử là 0,05 %). Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50 % sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

Kết quả sàng lọc sơ bộ tại nồng độ 100 μ g/mL cho thấy tetrandrine và nano tetrandrine TNP2 có khả năng ức chế đáng kể (>90 %) sự phát triển tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư phổi A549. Do đó, các chất này được tiếp tục thí nghiệm ở các nồng độ 20 μ g/mL, 4 μ g/mL và 0,8 μ g/mL (Hình 4). Kết quả chỉ ra rằng sản phẩm nano tetrandrine có khả năng ức chế dòng tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư phổi A549 tốt hơn tetrandrine tinh khiết với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,97 μ g/mL và 1,15 μ g/mL (IC_{50} của tetrandrine là 4,31 μ g/mL và 4,62 μ g/mL). Các nghiên cứu của nhóm tác giả giải pháp hữu ích cũng phù hợp với các nghiên cứu của Cheng và cộng sự (2000) và Wei và cộng sự (2016). Theo đó, khi thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào của tetrandrine trên hai dòng tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư phổi A549, các tác giả đã cho thấy tetrandrine có khả năng ức chế 50 % sự sinh trưởng của tế bào là 5,0 và 4,48 μ g/mL. Ngoài ra, sản phẩm nano tetrandrine TNP2 đã tăng cường được hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư phổi A549 tốt hơn hệ nano polyme tetrandrine theo công bố

của Guo và cộng sự (2020). Như vậy, sản phẩm nano tetrandrine TNP2 của giải pháp hữu ích đã cải thiện được độ tan, tăng khả năng phân bố và tăng cường được hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư phổi A549.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Sản xuất bột nano tetrandrine chứa 5% hoạt chất tetrandrine (hệ nano TNP1)

Chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho 3g tetrandrine và 6g chất hoạt động bề mặt Tween 80 hoà tan hoàn toàn trong 150 ml dung môi etanol, sử dụng máy khuấy từ với tốc độ khuấy ở tốc độ 550 vòng/phút trong thời gian 2 giờ, thu được dung dịch trong suốt;

Tạo dung dịch chất mang bằng cách hòa tan 51g β -cyclodextrin trong 300 ml nước cất dưới điều kiện khuấy ở tốc độ 500 vòng/phút trong thời gian 1,5 giờ.

Sau đó, hệ nano đồng nhất thu được bằng cách bổ sung từ từ pha phân tán vào dung dịch chất mang. Quá trình này diễn ra trong điều kiện khuấy bằng máy khuấy từ ở tốc độ 650 vòng/phút trong thời gian 3 giờ, tiếp tục siêu âm hỗn hợp trong 45 phút ở 60 °C để đạt được sự phân tán đồng nhất;

Cuối cùng, hệ nano đồng nhất được đưa vào hệ thống thiết bị sấy phun, thu được bột nano mịn, tơi và có màu trắng.

Bằng phương pháp đo phổ UV-Vis, các tác giả đã đối chiếu đỉnh đặc trưng của tetrandrine tinh khiết với phổ UV-Vis của nano tetrandrine hoàn toàn tương đồng. Điều này cho thấy sản phẩm bột nano tetrandrine thu được bằng quy trình theo giải pháp vẫn giữ được cấu trúc và hoạt tính của tetrandrine trong quá trình nano hóa.

Sản xuất hệ nano tetrandrine TNP1 với hàm lượng tetrandrine là 5% có ưu điểm ở chỗ, sự tương hợp tốt giữa tetrandrine với chất hoạt động bề mặt Tween 80 và chất mang β -cyclodextrin cho hệ nano có khả năng phân tán rất tốt trong nước, kích thước hạt trung bình nhỏ 65 nm và có chỉ số phân tán thấp 0,182.

Ví dụ 2: Sản xuất bột nano tetrandrine chứa 10% hoạt chất tetrandrine (hệ nano TNP2)

Quy trình sản xuất bột nano tetrandrine chứa 10% hoạt chất tetrandrine bao gồm các bước tương tự các bước như trong Ví dụ 1.

Thành phần hệ nano TNP2 bao gồm: 3g tetrandrine, 6g Tween 80 và 21g β -cyclodextrin. Nano tetrandrine TNP2 có kích thước hạt trung bình là 99 nm với sự phân bố hẹp và chỉ số phân tán là 0,193.

Sản phẩm nano tetrandrine được thử nghiệm hoạt tính ức chế men chuyển angiotensin, kết quả cho thấy hoạt tính ức chế men chuyển angiotensin với tỷ lệ ức chế đạt 68,34% ở nồng độ 0,89 mg/mL (giá trị IC_{50} là 0,65 mg/mL). Ngoài ra, nano tetrandrine cũng thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư mạnh trên hai dòng tế bào ung thư được thử nghiệm là HepG2 (dòng tế bào ung thư gan ở người) và A549 (dòng tế bào ung thư phổi ở người) với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,97 μ g/mL và 1,15 μ g/mL. Kết quả này được đánh giá là rất có ý nghĩa trong việc sử dụng nano tetrandrine để kháng ung thư.

Ví dụ 3: Sản xuất bột nano tetrandrine chứa 15% hoạt chất tetrandrine (hệ nano TNP3)

Quy trình sản xuất bột nano tetrandrine chứa 15% hoạt chất tetrandrine bao gồm các bước tương tự các bước như trong Ví dụ 1. Thành phần hệ nano TNP3 bao gồm: 3g tetrandrine, 6g Tween 80 và 11g β -cyclodextrin. Nano tetrandrine TNP3 có kích thước hạt trung bình là 125 nm với sự phân bố tương đối rộng và chỉ số phân tán là 0,252.

Hiệu quả của giải pháp hữu ích:

- Quy trình sản xuất nano tetrandrine đã thành công trong việc sản xuất bột nano tetrandrine có kích thước hạt trung bình nhỏ từ 65-125 nm, phân bố đồng đều và khả năng phân tán tốt trong nước mà vẫn giữ được cấu trúc, hoạt tính của tetrandrine trong quá trình nano hóa.

- Các chất hoạt động bề mặt và chất mang sử dụng trong quy trình sản

xuất nano tetrandrine có độ an toàn cao, không độc hại, ít tác dụng phụ, do đó hệ nano tetrandrine thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích có độ an toàn cao khi sử dụng.

- Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản, dễ thực hiện ở quy mô lớn và thân thiện với môi trường.

- Sản phẩm nano tetrandrine thu được từ giải pháp hữu ích đã được thử nghiệm và cho thấy có tác dụng kháng ung thư và hạ huyết áp, do đó sản phẩm có tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm và thực phẩm chức năng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất nano tetrandrine có tác dụng kháng ung thư và hạ huyết áp, bao gồm các bước:

a) Chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho tetrandrine và chất hoạt động bề mặt Tween 80 theo tỷ lệ 1:2 (g/g) hoà tan hoàn toàn trong dung môi etanol, sử dụng máy khuấy từ với tốc độ khuấy 550 vòng/phút trong thời gian 2 giờ, thu được dung dịch trong suốt;

b) Chuẩn bị chất mang bằng cách hòa tan β -cyclodextrin trong nước cất dưới điều kiện khuấy 500 vòng/phút trong thời gian 1,5 giờ;

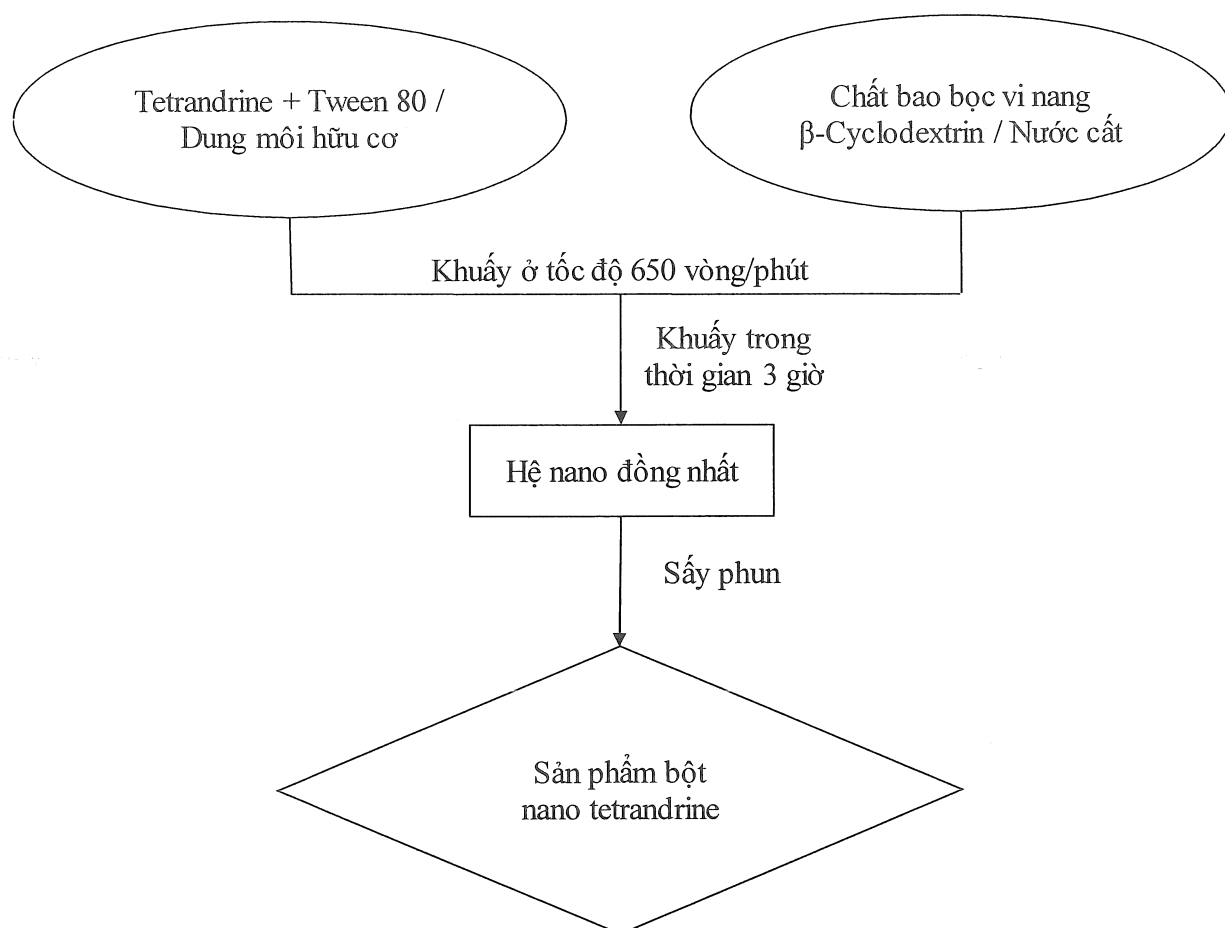
c) Tạo hệ nano đồng nhất bằng cách bổ sung từ từ pha phân tán vào dung dịch chất mang, quá trình này được thực hiện trong điều kiện khuấy bằng máy khuấy từ ở tốc độ 650 vòng/phút trong thời gian 3 giờ, sau đó tiếp tục siêu âm hỗn hợp trong 45 phút ở 60 °C để đạt được sự phân tán đồng nhất;

d) Tạo bột nano tetrandrine bằng cách chuyển hệ nano đồng nhất vào hệ thống thiết bị sấy phun, thu được bột nano mịn, tơi và có màu trắng.

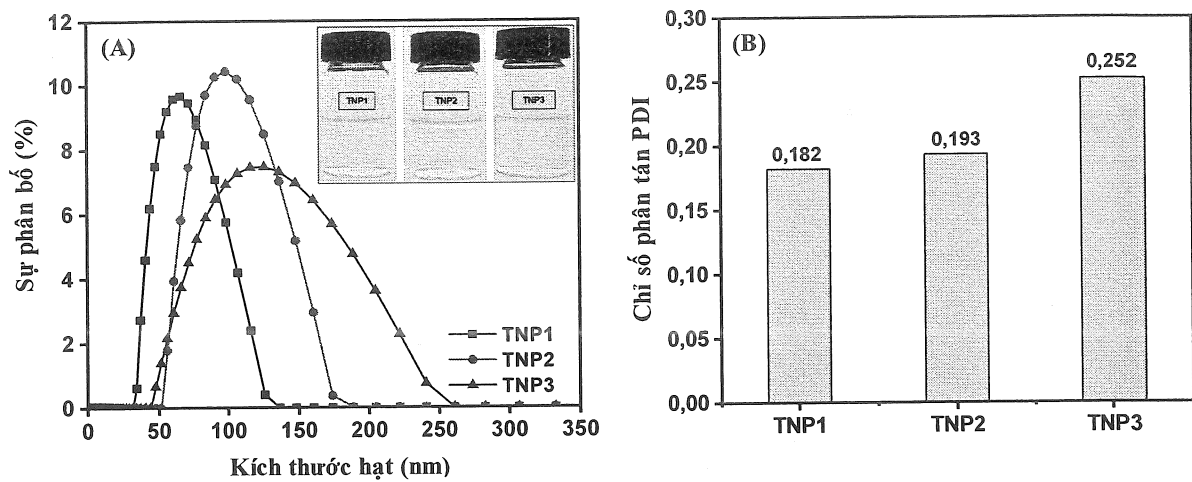
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt được sử dụng là Tween 80 và chất bao bọc vi nang được sử dụng là β -cyclodextrin.

3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hàm lượng tetrandrine trong hệ nano nằm trong khoảng 5-15% và tốt nhất là ở hàm lượng chứa 10% tetrandrine.

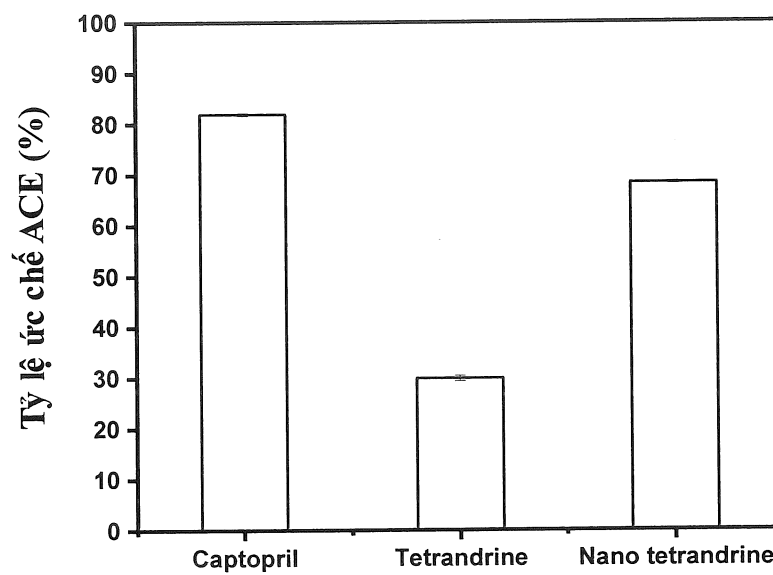
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó sản phẩm nano tetrandrine thu được có khả năng phân tán tốt trong nước, kích thước hạt trung bình từ 65-125 nm và có độ ổn định cao, sản phẩm nano tetrandrine có tác dụng hạ huyết áp thông qua khả năng ức chế men chuyển angiotensin với giá trị IC_{50} là 0,65 mg/mL và có tác dụng kháng ung thư cao, với nồng độ ức chế 50% sự phát triển của tế bào ung thư gan (HepG2) và ung thư phổi (A549) lần lượt là 0,97 μ g/mL và 1,15 μ g/mL.



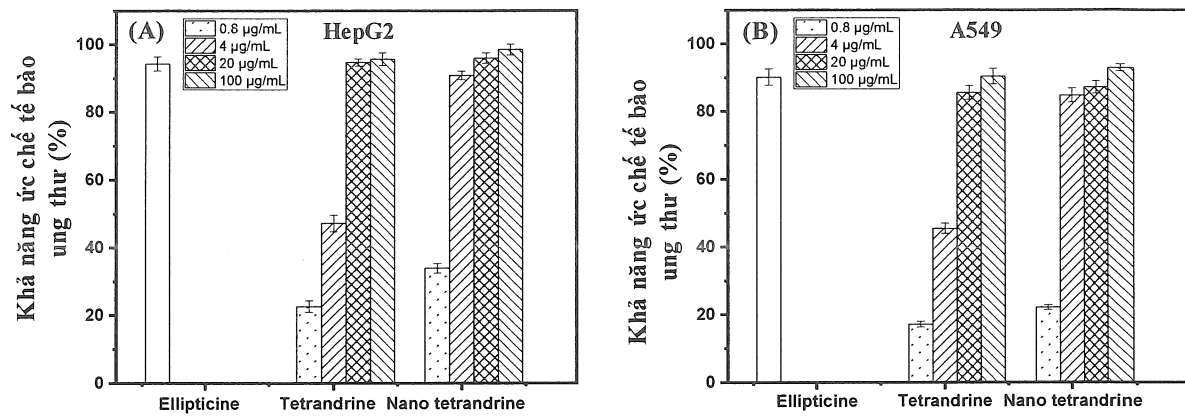
Hình 1. Sơ đồ quy trình sản xuất bột nano tetrandrine.



Hình 2. (A)- Biểu đồ phân bố kích thước hạt và khả năng phân tán trong nước; và (B)- Chỉ số phân tán PDI của các hệ nano tetrandrine.



Hình 3. Kết quả đánh giá tác dụng hạ huyết áp của nano tetrandrine



Hình 4. (A) Khả năng ức chế tế bào ung thư gan HepG2 và (B) khả năng ức chế tế bào ung thư phổi A549 của tetrandrine và nano tetrandrine.