



## Nghiên cứu bào chế curcumin dạng phytosome và dạng PEG hóa

Bùi Thanh Tùng\*, Nguyễn Thanh Hải, Phan Kế Sơn

*Khoa Y Dược, Đại học quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 08 tháng 02 năm 2018

Chỉnh sửa ngày 28 tháng 4 năm 2018; Chấp nhận đăng ngày 12 tháng 6 năm 2018

**Tóm tắt:** Curcumin có nhiều tác dụng dược lý quan trọng nhưng chưa được ứng dụng nhiều trên lâm sàng do sinh khả dụng thấp. Phytosome curcumin và PEG-CUR được nghiên cứu để tăng sinh khả dụng của curcumin. Phytosome curcumin được bào chế bằng phản ứng giữa curcumin và phosphatidylcholine. PEG-CUR được bào chế bằng phản ứng giữa curcumin và PEG. Phytosome curcumin và PEG-CUR được đánh giá hình thành liên kết thông qua kết quả phổ  $^1\text{H}$  NMR, FTIR and DSC. Một số đặc điểm hóa lý như thể zeta, độ phân bố kích thước, độ hòa tan và hàm lượng curcumin cũng được nghiên cứu. Hàm lượng curcumin trong phytosome curcumin là  $25,71 \pm 0,46\%$  và trong PEG-CUR là  $13,26 \pm 1,25\%$ . Phytosome curcumin có kích thước nano là 131,8 nm và thể zeta là -48,4 mV, trong khi đó PEG-CUR có kích thước tiểu phân là 96,3 nm và thể zeta là -44,5 mV. Phytosome curcumin và PEG-CUR có độ hòa tan cao hơn so với curcumin tự do trong một số môi trường khác nhau. Thí nghiệm *in vivo* cho thấy phytosome curcumin có tác dụng bảo vệ gan tốt hơn so với curcumin tự do. Phytosome curcumin làm giảm enzym gan, giảm lượng peroxy hóa lipid và tăng hoạt tính của enzym chống oxy hóa SOD, CAT, GPx tốt hơn so với curcumin trên gan chuột bị gây tổn thương do paracetamol liều cao. Ngoài ra, chúng tôi còn cho thấy PEG-CUR có tác dụng độc tính trên hai dòng tế bào ung thư HepG2 and HCT116 cao hơn nhiều so với curcumin tự do.

**Từ khóa:** Curcumin, phytosome, PEG hóa, độ tan, chống ung thư, bảo vệ gan.

### 1. Đặt vấn đề

Curcumin là hợp chất curcuminoid chính được chiết xuất từ củ Nghệ (*Curcuma longa*) [1]. Curcumin có khả năng hòa tan tốt trong aceton, ethanol và dimethyl sulfoxid, nhưng gần như không tan trong nước. Một số hợp chất

curcuminoid cũng có mặt trong thành phần củ nghệ [2]. Curcumin là hoạt chất tiềm năng có khả năng điều trị một số bệnh như vàng da, bệnh lý về gan, nhiễm khuẩn, xơ vữa động mạch, đục thủy tinh thể, bệnh thấp khớp, sỏi mật, viêm loét dạ dày, viêm ruột, trầm cảm và sa sút trí tuệ [3-7]. Tuy nhiên, curcumin mang những đặc điểm dược động học kém như: kém hấp thu, chuyển hoá nhanh và thải trừ khỏi cơ thể nhanh nên sinh khả dụng rất thấp [8]. Sinh khả dụng của curcumin thấp là do quá trình

\*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-904429676.

Email: [tungasia82@yahoo.es](mailto:tungasia82@yahoo.es)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4102>

chuyển hóa nhanh chóng, không tan trong nước và một số con đường chuyển hóa ở đường ruột, chủ yếu là do glucuronide hóa và sulfonate hoá [8]. Ngoài ra, curcumin có tốc độ chuyển hoá nhanh và thải trừ nhanh, bị thủy phân trong môi trường kiềm và dễ dàng phân huỷ khi gặp ánh sáng, nhiệt độ cao và điều kiện oxi hoá [8-10].

Có nhiều phương pháp được tiến hành nhằm tăng khả năng tan, tăng khả năng hấp thu và độ ổn định của curcumin với mục đích làm tăng sinh khả dụng của hợp chất này, trong đó có phương pháp tạo phytosome và PEG hóa. Phytosome là dạng bào chế áp dụng vào các hợp chất tự nhiên làm cho quá trình hấp thu tốt hơn, và làm tăng sinh khả dụng cho các hợp chất tự nhiên [11]. Phytosome là phức hợp được tạo thành bởi một phân tử phospholipid tự nhiên hay tổng hợp (phosphatidylcholin, phosphatidylethanolamin hay phosphatidylserine) phản ứng với một hợp chất tự nhiên có trong dịch chiết từ dược liệu [12]. Phytosome curcumin là sự kết hợp từ dịch chiết curcumin đã được chuẩn hóa với phosphatidylcholin-một hợp chất tự nhiên từ đậu nành, đã được chứng minh đem lại khả năng hấp thu cao (gấp khoảng 30 lần so với dạng curcumin đơn thuần) và nồng độ duy trì lâu hơn ở trong máu, giúp mang lại hiệu quả điều trị tốt hơn so với dạng curcumin thông thường [3]. Phức hợp phospholipid của curcumin cho kết quả nồng độ đỉnh trong huyết tương và giá trị diện tích dưới đường cong (AUC) ở chuột Wistar đực cao hơn gấp 5 lần so với nồng độ đỉnh trong huyết tương và giá trị AUC sau khi điều trị với phân tử curcumin tự do [13].

PEG hóa là kỹ thuật gắn đồng hoá trị các polymer poly (ethylene glycol) với các hoạt chất có tác dụng dược lý, là một trong những kỹ thuật đầy triển vọng để cải thiện hiệu quả điều trị của thuốc. PEG hóa hoạt chất có nhiều ưu điểm như: kéo dài thời gian tồn tại của thuốc trong cơ thể, làm giảm quá trình chuyển hóa của thuốc bởi các enzym trong cơ thể [14]. Các phân tử thuốc có tác dụng dược lý tiềm năng nhưng tính chất hoá lý kém nên cản trở quá trình hấp thu có thể sử dụng kỹ thuật PEG hóa để tăng sinh khả dụng. Mục đích PEG hóa để

giảm khả năng các hợp chất bị thủy phân do các enzym và thải trừ nhanh qua thận, giúp tăng thời gian bán thải và khả năng hòa tan trong nước của chất [15-16].

PEG-curcumin hóa là kết hợp curcumin với phần đuôi của chuỗi polyme thân nước của PEG [15]. Pandey và cộng sự đã bào chế PEG-curcumin hóa thành công, có độ tan cao trong nước và có tác dụng kích hoạt Nrf2, có khả năng tăng độ hòa tan và sinh khả dụng của curcumin [15]. Đặc biệt trong điều trị ung thư, PEG-curcumin hóa ức chế tăng sinh tế bào ung thư tuyến tụy hơn phân tử curcumin ban đầu. PEG-curcumin hóa ức chế giai đoạn phân bào và sự hình thành của các tế bào đa nhân bất thường.

## 2. Mục tiêu

- Xây dựng được quy trình bào chế curcumin dạng phytosome và PEG hóa.
- Xây dựng được tiêu chuẩn cơ sở của curcumin dạng phytosome và PEG hóa.
- Đánh giá được tác dụng chống oxy hóa của curcumin dạng phytosome và tác dụng trên một số dòng tế bào ung thư của curcumin dạng PEG hóa.
- Bào chế được viên nang cứng chứa curcumin dạng phytosome.

## 3. Phương pháp nghiên cứu

### 3.1. Phương pháp điều chế phytosome curcumin

Phương pháp tổng hợp phytosome curcumin được dựa trên các tài liệu tham khảo đã công bố trước đây, có thay đổi nhỏ cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [17-18]. Cân chính xác lượng của curcumin và phosphatidylcholine (theo các tỷ lệ mol khác nhau: 1: 1, 1: 2, 1: 4, tỷ lệ đã được lặp đi lặp lại ba lần) sau đó cho vào bình cầu 500 ml và thêm 150 ml dichloromethane vào. Hỗn hợp này được đun hồi lưu ở nhiệt độ không quá 40°C

trong vòng 2h. Ngoài ra chúng tôi tiến hành thay đổi điều kiện nhiệt độ (40°C, 50°C và 60°C) và thời gian đun hồi lưu (1h, 2h và 3h) để xem điều kiện nào cho hiệu suất tối ưu nhất. Sau đó tiến hành cô quay để loại dung môi và thêm 60 ml n-hexane và khuấy liên tục. Phức hợp curcumin-phosphatidylcholine được kết tủa, tiến hành lọc, và làm khô trong bơm chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi. Phức hợp curcumin-phosphatidylcholine đã được giữ trong lọ thủy tinh màu tối, tránh ánh sáng và bảo quản ở nhiệt độ phòng. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, lấy kết quả trung bình.

#### **Đánh giá phytosome curcumin tạo thành**

- Hình thái phytosome curcumin

Sử dụng phương pháp chụp hiển vi điện tử truyền qua (TEM) và kính hiển vi điện tử quét (SEM) với kỹ thuật nhuộm soi âm bản xác định hình thái của phytosome curcumin [18].

- Đo kích thước tiểu phân (KTTP)

Phân tán phytosome vào nước tinh khiết, sử dụng phương pháp tán xạ ánh sáng động với thiết bị NanoParticle SZ-100 (HORIBA Scientific). Đo kích thước tiểu phân trung bình Zaverage (d.nm), và phân bố KTTP thông qua chỉ số đa phân tán (PDI). Pha loãng phức hợp 100 lần bằng nước cất trước khi đo curcumin [18].

- Phương pháp phân tích năng lượng nhiệt vi sai (DSC)

Được thực hiện trên thiết bị phân tích nhiệt Mettler Toledo. Tiến hành đánh giá với các mẫu nguyên liệu curcumin, phosphatidylcholine và phytosome bào chế. Sử dụng đĩa nhôm chứa mẫu 40µl, đục thủng nắp, khối lượng mẫu khoảng từ 3 – 7mg. Nhiệt độ quét từ 25 – 250°C, tốc độ gia nhiệt 10°/phút. Trong quá trình thử, thổi khí nitrogen với lưu lượng 50 ml/phút [17; 18].

- Phương pháp đo quang phổ hồng ngoại IR

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FITR) được sử dụng để thu thập phổ hồng ngoại của curcumin, phosphatidylcholine và phytosome curcumin [18].

- Phương pháp đo phổ <sup>1</sup>H NMR

Các chất được đo phổ <sup>1</sup>H-NMR bằng cách hòa tan trong dung môi CDCl<sub>3</sub> và phân tích

bằng máy đo phổ <sup>1</sup>H-NMR spectrometer (Bruker Advance DRX-500, BrukerBioSciences Corporation, Billerica, MA, USA) tại tần số 500 MHz [18].

- Phương pháp tính độ hòa tan của Curcumin so với Phytosome curcumin

Chuẩn bị các dung dịch: Dung dịch HCl 0,1N; Dung dịch đệm phosphat pH 4,50,1M; Dung dịch đệm phosphat pH 6,8 0,1M;

#### **3.2. Phương pháp điều chế PEG-CUR hóa**

Phương pháp điều chế được dựa trên các tài liệu tham khảo và có thay đổi cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [19; 20]. Trộn lẫn 9 g PEG methyl ete acrylat cùng với 2,3 g 3- acid mercaptopropionic và 0,1 ml triethylamin trong 100 ml tetrahydrofuran khan. Sau đó khuấy hỗn hợp ở 25°C trong 24 h, trên máy khuấy từ. Sản phẩm tạo thành (A) đem kết tủa với ete khan dư. Hòa tan 5,6 g sản phẩm A, 2,2 g N, N'-dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 1,7 g curcumin và 0,1 g 4-dimethylaminopyridin trong 50 ml tetrahydrofuran và khuấy ở các điều kiện nhiệt độ (25°C, 40°C, 50°C) trong khoảng thời gian khác nhau (6h, 12h, 24 h) để tìm điều kiện cho hiệu suất cao nhất tạo PEG-Curcumin. Sau đó lọc sản phẩm và đem kết tủa trong ete khan dư và sấy khô ở điều kiện chân không ở 25°C. PEG-CUR hóa được giữ trong lọ thủy tinh màu tối, tránh ánh sáng và bảo quản ở nhiệt độ không quá 25°C.

#### **Phương pháp đánh giá tiêu chuẩn chất lượng của PEG-CUR**

##### *Xác định hiệu suất điều chế PEG – CUR hóa*

Xác định hiệu suất điều chế PEG-CUR dựa vào định lượng curcumin tự do dựa theo phương pháp được mô tả sau đây [17].

Xác định hàm lượng curcumin toàn phần:

Cân chính xác khoảng 50 mg PEG-CUR, hòa tan hoàn toàn bằng methanol trong bình định mức 50mL. Pha loãng bằng methanol đến nồng độ thích hợp, lọc qua màng 0,45 µm. Định lượng curcumin ( $m_{\text{cur toàn phần}}$ ) bằng phương pháp HPLC theo đường chuẩn đã xây dựng.

Xác định hàm lượng curcumin tự do:

Cân chính xác khoảng 50 mg PEG-CUR, phân tán trong nước tinh khiết với tỷ lệ 1:100 (kl/tt). Ly tâm với tốc độ 8000 v/phút, trong 30 phút, lọc lấy cặn hòa tan trong methanol, định lượng curcumin tự do ( $m_{\text{cur tu do}}$ ) bằng phương pháp HPLC theo đường chuẩn đã xây dựng. Từ đó, xác định hiệu suất PEG - curcumin theo công thức:

$$H(\%) = (m_{\text{cur toanphan}} - m_{\text{cur tu do}}) \times 100 / m_{\text{cur toanphan}}$$

Định lượng curcumin bằng cách sử dụng phương pháp HPLC với các điều kiện sắc ký như sau:

Điều kiện sắc ký:

Cột Agilent ZORBAX Eclipse Plus 95Å C18, kích thước cột 4.6 x 100 mm, đường kính hạt nhỏ 3,5 µm;

Pha động: Hỗn hợp acetonitril và nước cất theo tỷ lệ nước cất- acetonitril (70:30);

Tốc độ dòng 1 ml/phút;

Thể tích tiêm mẫu: 10 µl.

Detector PDA, bước sóng 425 nm.

*Xác định hàm lượng curcumin trong PEG – CUR hóa*

Pha dung dịch PEG-CUR trong metanol ở nồng độ 100 µg/mL. Sau đó được pha loãng với methanol đến nồng độ 10 µg/mL. Dung dịch được bảo quản ở 37°C trong 24 giờ [21; 22]. Lượng chất curcumin được xác định bằng phương pháp HPLC.

- Tính khối lượng của curcumin có trong PEG - CUR theo đường chuẩn đã xây dựng được.

- Hàm lượng curcumin trong PEG – Curcumin

$$HL = \frac{m_{\text{curcumin}} \times H}{m_{\text{PEG-curcumin}}} \times 100$$

Trong đó: H là hiệu suất điều chế của mẫu đem đo

$m_{\text{curcumin}}$ : là lượng curcumin định lượng được.

$m_{\text{PEG-curcumin}}$  là lượng đã cân.

*Xác định độ hòa tan của PEG-CUR hóa*

Chuẩn bị các dung dịch đệm: Dung dịch HCl 0,1N; Dung dịch đệm phosphat pH 4,5 0,1M:

- Dung dịch đệm phosphat pH 6,8 0,1M: Cho 50,3 ml dung dịch  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M và 49,7 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M vào bình định mức 1000ml, định mức bằng nước cất.

- Tiến hành đánh giá độ hòa tan của PEG-CUR trong các môi trường pH khác nhau. Được tiến hành theo phương pháp được mô tả trước đây [17; 18]. Xác định độ hòa tan của PEG - curcumin và curcumin tự do bằng cách thêm một lượng dư của mỗi mẫu vào 20 ml dung môi trong bình thủy tinh kín ở nhiệt độ 25°C. Các chất lỏng được lắc trong 24 h và ly tâm ở 5000 rpm trong 10 phút. Sau đó đem đi lọc, và 1 ml dịch lọc pha loãng với methanol. Mười µL dịch lọc được tiêm vào HPLC và phát hiện curcumin ở bước sóng 425 nm.

**Đánh giá đặc điểm hóa lý của PEG-CUR**

Hình thái PEG-CUR

Đo kích thước tiểu phân (KTTP)

Phương pháp phân tích năng lượng nhiệt vi sai (DSC)

Phương pháp đo quang phổ hồng ngoại IR

Phương pháp đo phổ  $^1\text{H}$  NMR

*3.3. Đánh giá tác dụng chống oxy hóa của curcumin phytosome*

Tiến hành gây độc tính gan bằng paracetamol được tiến hành tại Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội. Chuột được chia thành các nhóm khác nhau. Quy trình tiến hành thí nghiệm trên mô hình gây độc tính gan thực nghiệm bằng paracetamol được mô tả ở hình 1. Tất cả các chuột, trừ nhóm đối chứng sinh lý được tiến hành gây độc tính gan bằng cách cho uống paracetamol 1 lần/ngày trong 1 tuần.

- Nhóm I (nhóm chứng sinh lý): Chuột được chăm sóc bằng chế độ bình thường.

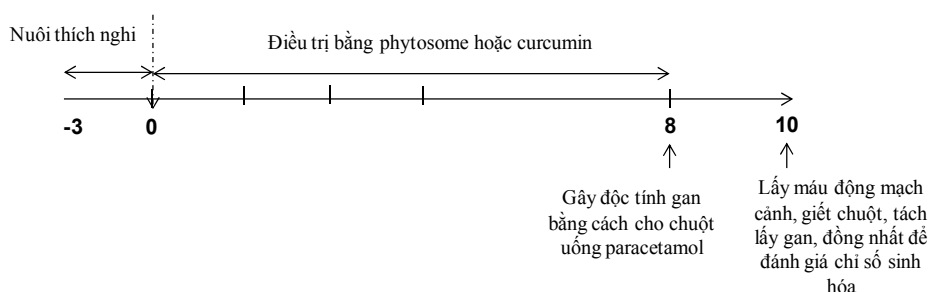
- Nhóm II (nhóm chứng bệnh, nhóm PAR): Chuột được gây độc tính gan bằng cách cho uống paracetamol (1 g/kg thể trọng) 1 lần duy nhất và được chăm sóc với chế độ bình thường, không có bất cứ điều trị nào.

- Nhóm III (Nhóm CUR): Chuột được điều trị bằng curcumin với liều 200 mg/kg thể trọng trong vòng 1 tuần và gây độc tính gan bằng cách cho uống paracetamol (1 g/kg thể trọng) vào ngày thứ 8.

- Nhóm IV (Nhóm Phyt 100): Chuột được điều trị bằng phytosome curcumin với liều tương đương 100 mg curcumin/kg thể trọng trong vòng 1 tuần và gây độc tính gan bằng cách cho uống paracetamol (1 g/kg thể trọng) vào ngày thứ 8.

- Nhóm V (Nhóm Phyt 100): Chuột được điều trị bằng phytosome curcumin với liều tương đương 200 mg curcumin/kg thể trọng trong vòng 1 tuần và gây độc tính gan bằng cách cho uống paracetamol (1 g/kg thể trọng) vào ngày thứ 8.

Vào ngày thứ 10, lấy máu động mạch cảnh của chuột, sau đó chuột bị giết và gan chuột được tách ra. Gan chuột được đồng nhất trong hệ đệm lạnh gồm (50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 8 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM ethylen glycol bis (2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid (EGTA); 0,5 mM EDTA; 0,01 mg/ml leupeptin; 0,01 mg/ml pepstatin; 0,01 mg/ml aprotinin; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) và 250 mM NaCl). Sau đó, ly tâm ở điều kiện (12000g, 4°C) trong 15 phút rồi thu lấy phần dịch nổi phía trên và bảo quản ở nhiệt độ -80°C đến khi phân tích.



Hình 1. Quy trình tiến hành thí nghiệm trên mô hình gây độc tính gan thực nghiệm bằng paracetamol.

Đánh giá các chỉ số sinh hóa:

+ Định lượng enzym AST, ALT: bằng Kit định lượng ALT, AST của hãng Human (Đức) cung cấp.

+ Đánh giá hoạt tính chống peroxide hóa lipid (LOP)

+ Đánh giá hoạt độ enzym Superoxide dismutase (SOD)

+ Đánh giá hoạt độ enzym Catalase (CAT)

+ Đánh giá hoạt độ enzym Glutathione peroxidase (GPx)

### 3.4. Đánh giá tác dụng trên một số dòng tế bào ung thư của curcumin dạng PEG hóa.

- Hai dòng tế bào ung thư đại tràng HCT116 và ung thư gan HepG2 nghiên cứu được cung cấp bởi trung tâm giống nuôi cấy Hoa Kỳ, ATCC (American type cell culture), lưu trữ trong nơơ lỏng, tại nhóm Nghiên cứu Ung thư học Thực nghiệm, bộ môn Sinh học Tế

bào, khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

- Sử dụng phương pháp MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2]-2,5 diphenyl tetrazolium bromid) để nghiên cứu độc tính tế bào. Nguyên tắc của phương pháp này dựa vào sự khử hợp chất MTT màu vàng thành dạng tinh thể formazan màu tím trong tế bào sống. Nồng độ formazan hình thành được đo bằng máy quang phổ ở bước sóng 500-600 nm. Quá trình khử xảy ra dưới sự xúc tác của enzym trong ty thể trong tế bào sống, theo đó hàm lượng của chất tạo ra tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống tham gia phản ứng.

### 3.5. Bào chế viên nang cứng chứa curcumin dạng phytosome

Phương pháp bào chế khối thuốc đóng vào nang:

- Phytosome curcumin có nhược điểm dẻo dính, tỷ trọng nhỏ, khả năng trơn chảy kém mà

trong công thức của khối bột đóng nang chiếm tỷ lệ khá cao do vậy nhằm giúp cho khối bột chảy đều vào nang để đảm bảo về khối lượng và hàm lượng dược chất chúng tôi tiến hành bào chế khối thuốc bằng phương pháp xát hạt ướt để khắc phục nhược điểm trên.

- Khối bột thuốc được bào chế bằng phương pháp xát hạt ướt theo quy trình như sau:

**Bước 1:** Các tá dược trơn: magnesi stearat, aerosil, natri lauryl sulfat được nghiền mịn và rây qua cỡ rây 180, Phytosome curcumin và các tá dược còn lại được nghiền và rây qua cỡ rây 180. Cân các nguyên liệu theo công thức.

**Bước 2:** Hòa tan PVP K30 trong ethanol để được dung dịch tá dược dính.

**Bước 3:** Trộn bột kép phytosome curcumin, Avicel PH 101, natri croscarmellose.

**Bước 4:** Thêm dung dịch PVP K30 vào khối bột trên, nhào trộn tạo thành khối ẩm.

**Bước 5:** Xát hạt qua rây 600. Sấy hạt ở nhiệt độ 50°C tới khi đạt hàm ẩm 2 - 3 %.

**Bước 6:** Sửa hạt qua rây 800.

- Lựa chọn cỡ nang số 0 với dung tích nang là 0,67ml. Hạt được đóng vào nang, sau đó thêm manitol để vừa đủ dung tích nang. Lượng manitol thêm vào được tính theo công thức sau:

$$M_{\text{manitol}} = (V_{\text{nang}} - m_{\text{hạt}} / d_{\text{hạt}}) \times d_{\text{manitol}}$$

Trong đó:  $M_{\text{manitol}}$ : Khối lượng manitol cần thêm vào (g)

$V_{\text{nang}}$  : Thể tích nang (ml)

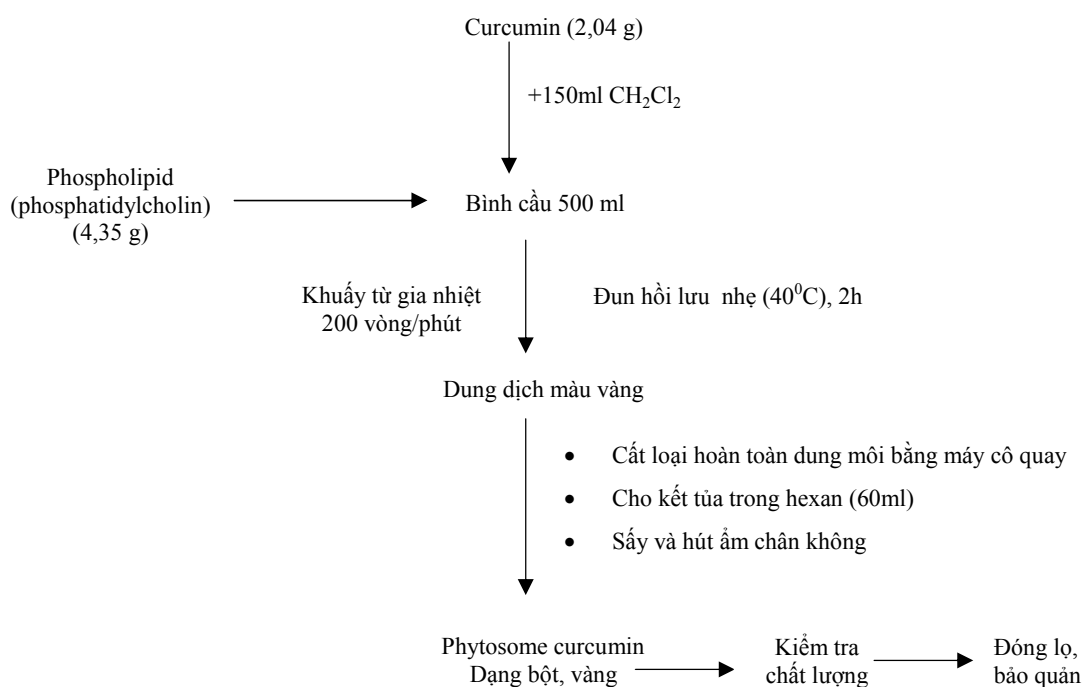
$m_{\text{hạt}}$  : Khối lượng của hạt (g).

$d_{\text{hạt}}, d_{\text{manitol}}$ : Lần lượt là khối lượng riêng của cốm và manitol (g/ml).

#### 4. Tổng kết kết quả nghiên cứu

##### 4.1. Sơ đồ bào chế phytosome curcumin

Phytosome curcumin (tỉ lệ mol curcumin:phospholipid (đạt tiêu chuẩn chất lượng nhà sản xuất) tương ứng: 1:1,) được bào chế theo sơ đồ sau:



Sơ đồ 1. Quy trình bào chế Phytosome Curcumin mề 6,39g.

### Hình thái và cấu trúc phytosome curcumin

Đã chụp được ảnh SEM (Scanning electron microscopy) và TEM (Transmission Electron Microscopy) của phytosome curcumin. Ảnh chụp SEM cho thấy bề mặt mẫu Phytosome curcumin sau khi bào chế mang các tiểu phân dạng hình cầu. Ảnh chụp TEM cho thấy các tiểu phân phytosome curcumin có hình cầu phân bố đồng đều.

#### Kích thước, thế Zeta

Đã đánh giá một số tiêu chuẩn vật lý của phytosome curcumin tạo thành: kích thước tiểu phân, PI, thế zeta thu được một số kết quả khả quan.

Bảng 1. Kích thước tiểu phân, chỉ số phân tán và thế zeta của phytosome curcumin

PI	Z-average (d,nm)	Thế Zeta mV
0,191	131,8	-48,4

Đánh giá phân tích được phổ quét nhiệt vi sai DSC, Phổ hồng ngoại IR và phổ <sup>1</sup>H-NMR của phức hợp phytosome -curcumin cho thấy sự hình thành liên kết giữa phosphatidylcholine và curcumin.

Độ hòa tan của Curcumin so với Phytosome curcumin.

Các mẫu phytosome được thử độ tan bão hoà trong môi trường pH khác nhau và trong n-octanol, so sánh với curcumin nguyên liệu và hỗn hợp vật lý curcumin- phosphatidylcholin. Curcumin nguyên liệu rất ít tan trong nước, nhất là ở pH 1,2, pH tăng, độ tan curcumin có xu hướng tăng lên. Độ tan của curcumin trong n-octanol cũng không cao, đó là các nhược điểm của nhiều hoạt chất từ tự nhiên nên sinh khả dụng qua đường uống hoặc dùng ngoài da đều hạn chế. Phytosome làm tăng độ tan của curcumin trong nước ở pH khác nhau và cả trong n-octanol, làm cho hoạt chất dễ khuếch tán vào màng, dễ dàng chuyển từ pha nước sang pha lipid, làm tăng sinh khả dụng.

### 4.2. Tiêu chuẩn cơ sở kiểm nghiệm của curcumin dạng phytosome

Dựa vào kết quả đạt được ở hoạt động 2:

#### Tính chất

Chế phẩm phải có màu vàng đồng nhất, không được có màu lạ

Cần khoảng 1g chế phẩm, trải đều trên một tờ giấy trắng mịn. Quan sát bằng mắt thường, dưới ánh sáng tự nhiên

#### Hình thái và cấu trúc phytosome curcumin

Ảnh chụp SEM cho thấy bề mặt mẫu Phytosome curcumin mang các tiểu phân dạng hình cầu.

Ảnh chụp TEM cho thấy các tiểu phân phytosome curcumin có hình cầu phân bố đồng đều.

#### Kích thước tiểu phân

Kích thước tiểu phân, chỉ số đa phân tán và thế zeta của phytosome curcumin.

PI	Z-average (d,nm)	Thế Zeta mV
<0,3	<300nm	Trị tuyệt đối >25

#### Phân tích nhiệt quét vi sai

Giản đồ nhiệt của phức Phytosome curcumin xuất hiện các pic mới với hiệu ứng thu nhiệt thấp hơn phosphatidylcholin.

#### Phổ hồng ngoại

Trên phổ hồng ngoại của dung dịch phytosome curcumin có các đỉnh hấp thụ mạnh đặc trưng cho liên kết hydro giữa curcumin và phosphatidylcholine

#### Phổ <sup>1</sup>H-NMR

Phytosome curcumin có các tín hiệu proton đặc trưng của curcumin và phosphatidylcholine.

#### Độ hòa tan của Phytosome curcumin

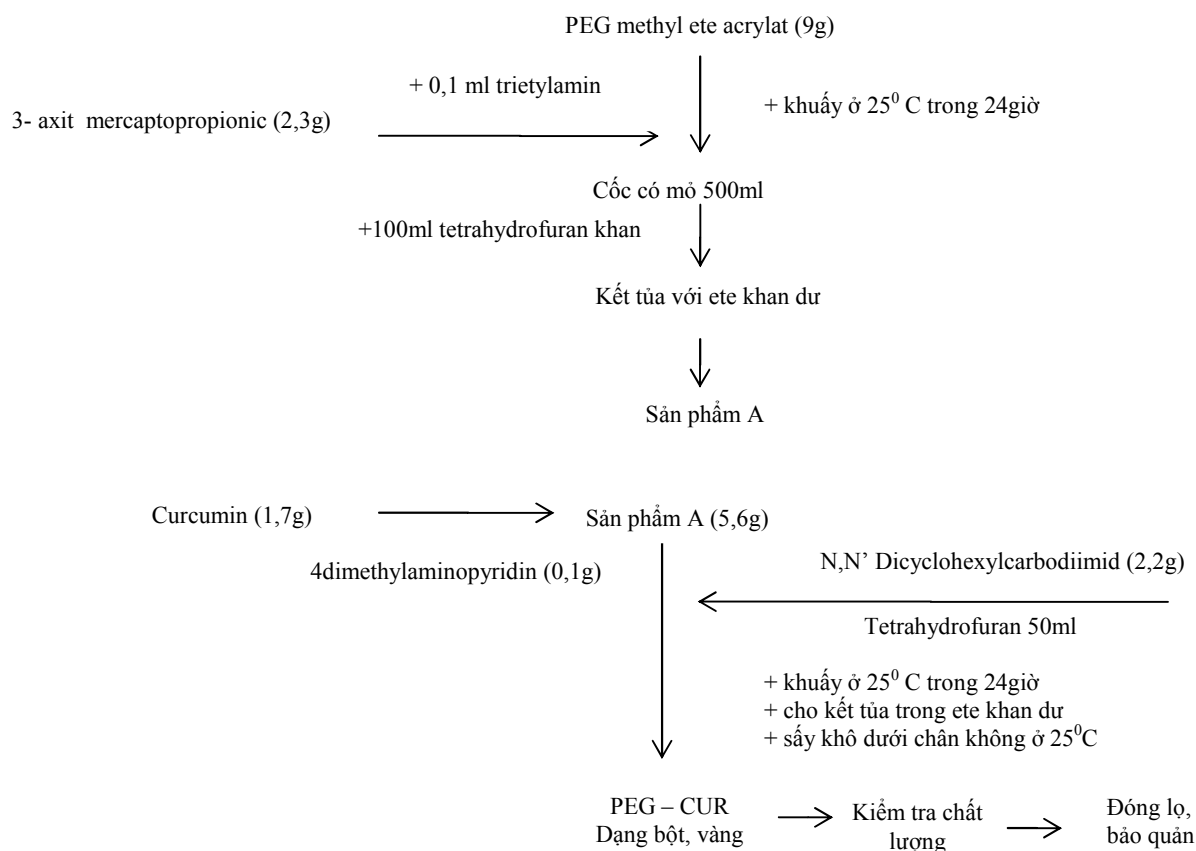
Độ tan trong nước của phytosome curcumin: 20,0-40,0 (µg/ml)

#### Bảo quản

Đựng trong lọ thủy tinh màu tối, tránh ánh sáng, ở nhiệt độ dưới 30°C.

### 4.3. Sơ đồ bào chế PEG-CUR

Qui trình điều chế PEG-CUR được tóm tắt như sau:



## Sơ đồ 2. Qui trình điều chế PEG-CUR.

Đánh giá PEG-CUR tạo thành  
 Tính chất cảm quan của PEG-CUR  
 Mẫu thu được sau khi sấy khô dưới chân không có màu vàng cam  
 Hình thái và cấu trúc PEG-CUR  
 Ảnh chụp SEM và TEM cho thấy các tiểu phân PEG-CUR có hình cầu  
 Kích thước, thế Zeta  
 Đánh giá một số tiêu chuẩn vật lý của PEG-CUR tạo thành: kích thước tiểu phân, PI, thế zeta thu được một số kết quả khả quan.

Bảng 2. Giá trị kích thước, chỉ số phân tán và thế zeta của PEG-CUR

Chỉ số phân tán	KTTP Z-average (nm)	Thế zeta mV
0,182	96,3	-44.5

Đánh giá phân tích được phổ quét nhiệt vi sai DSC, Phổ hồng ngoại IR và phổ  $^1\text{H-NMR}$

của PEG-CUR cho thấy sự hình thành liên kết giữa PEG và curcumin (được trình bày chi tiết trong báo cáo nội dung 2).

Độ hòa tan của Curcumin so với PEG-CUR  
 PEG-CUR làm tăng độ tan của curcumin trong nước ở pH khác nhau và cả trong n-octanol, do đó tăng hệ số phân bố D/N, làm cho hoạt chất dễ khuếch tán vào màng, dễ dàng chuyển từ pha nước sang pha lipid, làm tăng sinh khả dụng. Kết quả cho thấy số lần tăng độ tan của PEG-CUR so với curcumin cao nhất lên tới gần 10 lần trong môi trường n-octanol. Trong môi trường nước và dung dịch HCL 0,1N, độ tan của phytosome curcumin cũng tăng đến 5,5 lần và 6,2 lần, tương ứng. Ở hai môi trường dung dịch đệm phosphat pH 4,5 và pH 6,8 thì chỉ tăng hơn 2 và 3 lần.

*Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở kiểm nghiệm của curcumin dạng PEG hóa*



Dựa vào kết quả đạt được ở hoạt động 2, chế phẩm phải đạt các yêu cầu chất lượng sau:

Tính chất

Chế phẩm phải có màu vàng đồng nhất, không được có màu lạ

Hình thái và cấu trúc PEG-CUR

Ảnh chụp SEM cho thấy bề mặt mẫu PEG-CUR mang các tiểu phân dạng hình cầu.

Ảnh chụp TEM cho thấy các tiểu phân PEG-CUR có hình cầu phân bố đồng đều.

Kích thước tiểu phân

Kích thước tiểu phân, chỉ số đa phân tán và thế zeta của phytosome curcumin

PI	Z-average (nm)	Thế Zeta mV
<0,3	<300nm	Trị tuyệt đối >25

Phân tích nhiệt quét vi sai

Giản đồ nhiệt của phức hợp PEG-CUR xuất hiện các pic mới với hiệu ứng thu nhiệt thấp hơn PEG và curcumin.

Phổ hồng ngoại

Trên phổ hồng ngoại của dung dịch PEG-CUR có các pic hấp thụ bao gồm: pic của curcumin và một số dao động của PEG (chuỗi hydrocarbon của PEG)

Phổ <sup>1</sup>H-NMR

PEG-CUR có các tín hiệu proton đặc trưng của curcumin và PEG.

Độ hòa tan của PEG-CUR

Độ hòa tan của PEG-CUR trong nước > 25 (µg/ml)

Bảo quản

Đựng trong lọ thủy tinh màu tối, tránh ánh sáng, ở nhiệt độ dưới 30°C.

#### 4.4. Đánh giá được tác dụng chống oxy hóa của curcumin dạng phytosome

Tác dụng lên các enzym gan

Các enzym bao gồm AST và ALT là các enzym chính transaminase ở gan dùng để đánh giá các tổn thương gan [23]. Kết quả tác dụng lên các enzym gan của các nhóm nghiên cứu trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Tác dụng của phytosome curcumin lên các enzym gan, n=6.

Enzym	Chứng trắng	Nhóm PAR	Nhóm Cur 200	Nhóm Phyt 100	Nhóm Phyt 200
AST (IU/L)	38,24 ± 4,23	101,28 ± 11,25*	81,28 ± 12,27	47,25 ± 5,24 <sup>#</sup>	41,25 ± 5,32 <sup>#</sup>
ALT (IU/L)	31,12 ± 5,21	97,67 ± 11,84*	68,58 ± 14,45	42,15 ± 6,38 <sup>#</sup>	37,17 ± 3,25 <sup>#</sup>

Hoạt độ của hai enzym ALT và AST tăng có ý nghĩa thống kê trong nhóm PAR so với nhóm chứng. Khi chuột được điều trị với phytosome curcumin, hoạt độ của hai enzym này giảm đáng kể so với nhóm PAR. Với nhóm điều trị bằng curcumin, hoạt độ của hai enzym này có xu hướng giảm so với nhóm PAR nhưng không có ý nghĩa thống kê.

Hoạt tính chống peroxide hóa lipid (LOP) và hoạt độ các enzym chống oxy hóa: Catalase (CAT); Superoxide dismutase (SOD); Glutathione peroxidase (GPx).

Khả năng ức chế quá trình peroxy hóa lipid của các chất được đánh giá thông qua việc xác định hàm lượng malonyl dialdehyde (MDA) - sản phẩm của quá trình oxy hóa lipid màng tế bào.

Bảng 4. Ảnh hưởng của curcumin, phytosome curcumin đến hoạt tính chống peroxide hóa lipid (LOP) và hoạt độ của các enzym chống oxy hóa

Lô	MDA (nmol/mg protein)	SOD (đơn vị/mg protein)	CAT (đơn vị/mg protein)	GPx (đơn vị/mg protein)
Chứng trắng	0,52 ± 0,14	0,573 ± 0,09	298,87 ± 39,15	25,35 ± 3,27
Nhóm PAR	1,89 ± 0,15*	0,187 ± 0,08*	89,8 ± 13,19*	10,19 ± 2,32*
Nhóm Cur 200	1,61 ± 0,13	0,210 ± 0,07	129,8 ± 14,21	11,23 ± 3,18
Nhóm Phyt 100	1,42 ± 0,12 <sup>#</sup>	0,282 ± 0,10 <sup>#</sup>	165,15 ± 21,12 <sup>#</sup>	13,68 ± 2,72
Nhóm Phyt 200	1,28 ± 0,11 <sup>#</sup>	0,362 ± 0,12 <sup>#</sup>	196,12 ± 23,15 <sup>#</sup>	17,86 ± 4,54 <sup>#</sup>

Ghi chú: \*: p < 0,05 khi so sánh với chứng trắng, <sup>#</sup>: p < 0,05 khi so sánh với nhóm PAR

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng curcumin và phytosome curcumin làm tăng hoạt độ của các enzym chống oxy hóa SOD, CAT, GPx và giảm mức peroxyd hóa lipid ở các mô gan. Phytosome curcumin với mức liều tương đương với 100 mg curcumin và 200 mg curcumin/kg thể trọng làm tăng hoạt độ của các enzym chống oxy hóa và giảm lượng peroxy hóa lipid và các enzym gan AST, ALT có ý nghĩa thống kê so với nhóm PAR ( $p < 0,05$ ).

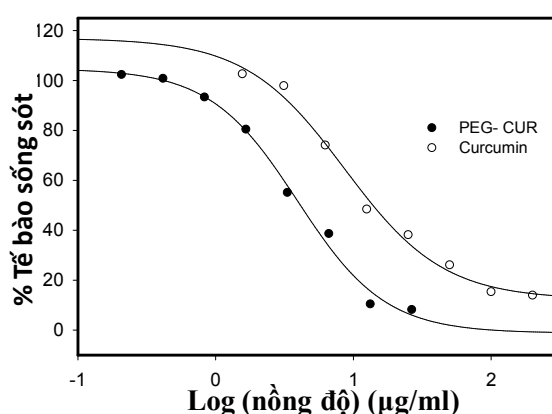
Trong khi đó, khi chuột được điều trị với curcumin ở mức liều 200mg/kg thể trọng, gấp đôi lượng curcumin so với phytosome curcumin ở mức liều tương đương 100 mg curcumin/kg thể trọng chỉ có xu hướng làm hoạt độ của các enzym chống oxy hóa và giảm lượng peroxy hóa lipid và các enzym gan AST, ALT mà chưa đạt mức có ý nghĩa thống kê so với nhóm PAR ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5. Đánh giá tác dụng trên một số dòng tế bào ung thư của curcumin dạng PEG hóa

Trên dòng HCT116

Bảng 5. Tỷ số tăng sinh (A%) và giá trị  $IC_{50}$  của hai chất PEG-CUR và Curcumin trên dòng tế bào HCT116

Dòng TB	HCT116 PEG-CUR		Curcumin	
[C $\mu$ g/ml]	A% (lần 1)	A% (lần 2)	A% (lần 1)	A% (lần 2)
ĐCDM	100	100	100	100
100	10,47	15,45	15,36	17,55
50	46,66	38,05	16,12	20,31
25	55,13	54,08	43,19	33,46
12,5	85,48	81,25	45,44	53,89
6,25	93,36	88,16	74,11	106,08
3,125	102,83	110,6802	97,90	114,09
	$IC_{50}=34,35 \pm 3,9 \mu\text{g/ml}$		$IC_{50}=14,49 \pm 1,8 \mu\text{g/ml}$	



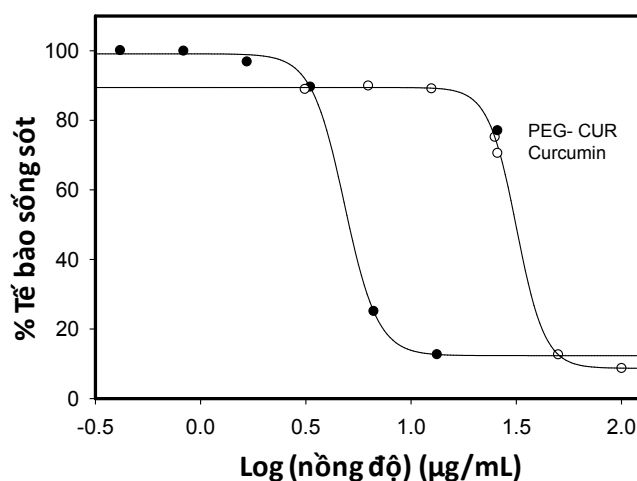
Hình 2. Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế tăng sinh tế bào HCT116 của Curcumin và PEG – CUR. Giá trị  $IC_{50}$  của Curcumin và PEG – CUR được tính dựa vào đồ thị và chuyển từ log [ $\mu\text{g/mL}$ ] sang  $\mu\text{g/mL}$ .

Tương ứng trên dòng HCT116 đối với hai chất **PEG-CUR** và **Curcumin** lần lượt,  $IC_{50}=34,35 \pm 3,9 \mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{50}= 14,49 \pm 1,8 \mu\text{g/ml}$ . Do hàm lượng curcumin trong PEG-CUR của

mẫu nghiên cứu là 13,26 %, nên  $IC_{50}$  của lượng curcumin tương ứng ức chế tế bào HCT116 chỉ là 4,55  $\mu\text{g/ml}$ .

Bảng 6. Giá trị tỷ số tăng sinh (A%) và giá trị  $IC_{50}$  của PEG-CUR trên dòng tế bào HepG2

Dòng TB [C $\mu$ g/ml]	HepG2			
	PEG-CUR		Curcumin	
	A% lần 1	A% lần 2	A% lần 1	A% lần 2
ĐCDM	100	100	100	100
100	12,705	5,290	8,758	10,832
50	25,156	27,765	12,674	19,815
25	89,635	79,964	75,211	56,627
12,5	96,893	85,810	89,142	81,433
6,25	99,976	88,090	89,973	107,471
3,125	100,162	96,302	89,000	106,972
	$IC_{50}=33,99 \pm 8,2 \mu\text{g/ml}$		$IC_{50}=28,61 \pm 3,25 \mu\text{g/ml}$	



Hình 3. Đáp ứng liều của PEG-CUR và curcumin trên dòng tế bào HepG2 nuôi cấy đơn lớp. Tương ứng trên dòng HepG2 đối với hai chất PEG-CUR và Curcumin lần lượt,  $IC_{50}=33,99 \pm 8,2 \mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{50}=28,61 \pm 3,25 \mu\text{g/ml}$ . Do hàm lượng curcumin trong PEG-CUR của mẫu nghiên cứu là 13,26 %, nên  $IC_{50}$  của lượng curcumin tương ứng ức chế tế bào HepG2 chỉ là 4,50  $\mu\text{g/ml}$ .

### Kết luận

Các kết quả nghiên cứu cho thấy PEG hóa-curcumin và phytosome curcumin làm tăng tác dụng dược lý của curcumin, có khả năng phát triển thành các sản phẩm như một thực phẩm chức năng hỗ trợ sức khỏe, điều trị bệnh. Sản phẩm phytosome curcumin và PEG hóa-curcumin tăng độ hấp thu so với curcumin và tăng hiệu quả điều trị của curcumin. Trong các nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi sẽ tiến hành đánh giá sinh khả dụng *in vivo* của phytosome curcumin và PEG-CUR để đánh giá ưu điểm

của dạng bào chế này so với curcumin tự do; đánh giá các hoạt tính sinh học khác của phytosome curcumin và PEG-CUR như: chống viêm, kháng khuẩn và đánh giá tác dụng ức chế tế bào trên các dòng tế bào ung thư khác và trên mô hình *in vivo*.

### Tài liệu tham khảo

- [1] Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Turmeric and curcumin: Biological

- actions and medicinal applications. *Current science* 87(1) (2004) 44.
- [2] Sasaki J, Kichida M. *Curcumin: Biosynthesis, Medicinal Uses and Health Benefits*. Nova Science (2012).
- [3] Dulbecco P, Savarino V. Therapeutic potential of curcumin in digestive diseases. *World journal of gastroenterology* : WJG 19(48) (2013) 9256.
- [4] Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences* 78(18) (2006) 2081.
- [5] Çıkrıkçı S, Mozioglu E, Yılmaz H. Biological activity of curcuminoids isolated from *Curcuma longa*. *Rec Nat Prod* 2(1) (2008) 19.
- [6] Weber WM, Hunsaker LA, Abcouwer SF, Deck LM, Vander Jagt DL. Anti-oxidant activities of curcumin and related enones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13(11) (2005) 3811.
- [7] Han S, Yang Y. Antimicrobial activity of wool fabric treated with curcumin. *Dyes and Pigments* 64(2) (2005) 157.
- [8] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics* 4(6) (2007) 807.
- [9] Kidd PM. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. *Altern Med Rev* 14(3) (2009) 226.
- [10] Jantarat C. Bioavailability enhancement techniques of herbal medicine: A case example of curcumin. *International J Pharmacy and Pharmaceutical Sci* 5((2013) 493.
- [11] Choubey A. Phytosome: a novel approach for herbal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2(4) (2011) 807.
- [12] Bhattacharya S. Phytosomes: the new technology for enhancement of bioavailability of botanicals and nutraceuticals. *International Journal of Health Research* 2(3) (2009) 225.
- [13] Giori A, Franceschi F. Phospholipid complexes of curcumin having improved bioavailability. *Google atents* (2007).
- [14] Pasut G, Sergi M, Veronese FM. Anti-cancer PEG-enzymes: 30 years old, but still a current approach. *Advanced drug delivery reviews* 60(1) (2008) 69.
- [15] Pandey MK, Kumar S, Thimmulappa RK, Parmar VS, Biswal S, Watterson AC. Design, synthesis and evaluation of novel PEGylated curcumin analogs as potent Nrf2 activators in human bronchial epithelial cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 43(1–2) (2011) 16.
- [16] Murphy CJ, Tang H, Van Kirk EA, Shen Y, Murdoch WJ. Reproductive effects of a pegylated curcumin. *Reproductive toxicology* 34(1) (2012) 120.
- [17] Phạm Thị Minh Huệ, Bùi Văn Thuần, Đặng Việt Hùng. Nghiên cứu bào chế phytosome curcumin. *Tạp chí dược học* 46(7) (2015) 14.
- [18] Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK. Curcumin–phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *International Journal of Pharmaceutics* 330(1–2) (2007) 155.
- [19] Murphy CJ, Tang H, Van Kirk EA, Shen Y, Murdoch WJ. Reproductive effects of a pegylated curcumin. *Reproductive Toxicology* 34(1) (2012) 120.
- [20] Tang H, Murphy CJ, Zhang B, Shen Y, Sui M, Van Kirk EA, *et al.* Amphiphilic curcumin conjugate-forming nanoparticles as anticancer prodrug and drug carriers: in vitro and in vivo effects. *Nanomedicine* 5(6) (2010) 855.
- [21] Wichitnithad W, Jongaroonngamsang N, Pummangura S, Rojsitthisak P. A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochemical Analysis* 20(4) (2009) 314.
- [22] Wichitnithad W, Nimmannit U, Callery PS, Rojsitthisak P. Effects of different carboxylic ester spacers on chemical stability, release characteristics, and anticancer activity of mono-PEGylated curcumin conjugates. *Journal of pharmaceutical sciences* 100(12) (2011) 5206.
- [23] Howell B, Siler S, Shoda L, Yang Y, Woodhead J, Watkins PB. A Mechanistic Model of Drug-Induced Liver Injury Aids the Interpretation of Elevated Liver Transaminase Levels in a Phase I Clinical Trial. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 3(2) (2014) 1.

## Preparing Phytosome Curcumin and PEG-CUR Complex

Bui Thanh Tung, Nguyen Thanh Hai, Phan Ke Son

*VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

**Abstract:** Despite curcumin's numerous pharmacological effects, it has been limitedly used in clinical practice due its low bioavailability. In this study, phytosome curcumin and PEG-CUR complex were prepared to increase their bioavailability. Phytosome curcumin was prepared by reaction between curcumin and phosphatidylcholine; PEG-CUR was prepared by reaction between curcumin and PEG. Phytosome curcumin and PEG-CUR were characterized by  $^1\text{H}$  NMR, FTIR and DSC analysis. The physicochemical parameters such as zeta potential, size distribution, solubility and curcumin content were also investigated. The amount of curcumin in phytosome curcumin was  $25.71 \pm 0.46\%$  and in PEG-CUR was  $13.26 \pm 1.25\%$ . Phytosome curcumin has the size of 131.8 nm and the zeta potential of -48.4 mV, while PEG-CUR has the size of 96.3 nm and the zeta potential of -44.5 mV. The solubility of phytosome curcumin and PEG-CUR in certain media was higher than that of free curcumin. The in vivo assay showed that phytosome curcumin had stronger hepatoprotective effect in comparison with free curcumin. The administration of phytosome curcumin effectively suppressed paracetamol-induced liver injury evidenced by a reduction in lipid peroxidation level, and elevated enzymatic antioxidant activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in mice liver tissues. The study results also show that the cytotoxicity effect of PEG-CUR was much greater than that of free curcumin in HepG2 and HCT116 cancer cell lines.

*Keywords:* Curcumin, phytosome, PEGylation, solubility, cytotoxicity, hepatoprotective.