

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO HỖN DỊCH CHITOSAN VỚI THUỐC XỊT MŨI TỪ LOÀI HOA NGŨ SẮC ĐỊNH HƯỚNG TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH VIÊM XOANG

STUDY ON PREAPRATION OF THE MIXTURE BETWEEN CHITOSAN AND NASAL SPRAYS MADE FROM IDENTITY FLOWER AGERATUM CONYZOIDES L. AS A METHOD OF SINUSITIS TREATMENT

Nguyễn Tuấn Anh*, Nguyễn Thị Hương,
Nguyễn Thị Thanh Hằng, Hoàng Thị Hà

TÓM TẮT

Chitosan là một polyme tự nhiên thu được bằng deacetyl hóa chitin. Các phân tử chitosan có đặc tính hóa lý tốt như các hệ thống phân phối thuốc. Nó là chất polysaccharide an toàn sinh học, không độc, tương thích sinh học và phân hủy sinh học. Các phân tử chitosan với kích thước có kiểm soát và sự phân bố kích thước hẹp thu được qua quá trình gelat hóa ion giữa CS và natri tripolyphosphate (TPP). Trong bài báo này, chúng tôi đã sử dụng H_2O_2 cắt ngắn mạch chitosan và dùng TPP để tạo các liên kết ngang. Chitosan cấu trúc phù hợp chỉ thu được khi tỷ lệ khối của chitosan/TPP là 6:3. Ở tỷ lệ này khi tạo hỗn dịch với thuốc xịt mũi có khả năng kháng khuẩn, đặc biệt đối với các khuẩn quan trọng trong đường mũi: *E. coli*, *M. catarrhalis*, *S.aureus*.

Từ khóa: Chitosan, nano chitosan, natri tripolyphosphate (TPP).

ABSTRACT

Chitosan is a natural polymer obtained by chitin deacetylation. Chitosan molecules have good physicochemical properties like drug delivery systems. It is bio-safe, non-toxic, biocompatible and biodegradable polysaccharide. Chitosan molecules have a controlled size and a narrow size distribution is obtained through ionization gelation between CS and sodium tripolyphosphate (TPP). In this paper, we have used H_2O_2 chitosan short circuit and used TPP to create cross-linking. Suitable structural chitosan is only obtained when the mass ratio of chitosan / TPP is 6:3. At this rate, when creating a suspension with nasal spray, it is antibacterial, especially for important bacteria in the nasal route: *E. coli*, *M. catarrhalis*, *S.aureus*.

Keywords: Chitosan, chitosan nanoparticles, sodium tripolyphosphate (TPP).

Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

*Email: anhnt@hau.edu.vn

Ngày nhận bài: 20/02/2019

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 24/4/2019

Ngày chấp nhận đăng: 25/4/2019

1. MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, một số công trình khoa học trên thế giới đã tập trung nghiên cứu sử dụng tuyến đường mũi để làm hệ thống cung cấp thuốc vào bộ phận quan

trọng trên cơ thể con người (như: vùng não bộ) thay thế cho các phương pháp như uống hay tiêm (con đường máu). Thời gian lưu trú và quá trình giải phóng thuốc từ khoang mũi của con người là những vấn đề quan trọng để khai thác tối ưu khả năng trao đổi thuốc bằng tuyến đường mũi, đây là một vấn đề khó.

Cung cấp thuốc bằng tuyến đường mũi là một kỹ thuật mới nổi và mới được lựa chọn thậm chí tốt hơn để so với việc vận chuyển thuốc trực tiếp đến não bộ thông qua sự trao đổi chất [1]. Tokumistu và cộng sự [2,3], đã tạo hỗn dịch giữa thuốc với chitosan bằng cách thêm chất nhũ hóa và khuấy trộn ở tốc độ cao để tạo ra chất nhũ hóa, hình thành hỗn dịch sử dụng đường mũi để phân phối thuốc hiệu quả. Tương tự, họ đã thêm dung dịch NaOH vào chất nhũ hóa, khuấy ở tốc độ cao và tạo ra chất nhũ hóa mới. Hai chất nhũ hóa sau đó được trộn, khuấy và ly tâm, các giọt nhũ tương kết lại tạo ra hạt nanochitosan với kích thước 426,28nm. Ở Việt Nam, số lượng công trình nghiên cứu về vấn đề này còn rất ít và chưa đầy đủ, đặc biệt là việc tạo hỗn dịch giữa thuốc và chitosan, sử dụng đường mũi để cung cấp hỗn dịch vào cơ thể người.

Mục đích của nghiên cứu này là làm nổi bật vai trò của chitosan trong việc cung cấp thuốc trong khoang mũi kết hợp với thuốc xịt mũi chữa bệnh viêm xoang (Việt Nam). Nhóm nghiên cứu thêm natri tripolyphosphate (TPP) vào chitosan là một giải pháp để tạo ra liên kết ngang giữa các phân tử phản ứng giữa các nhóm amino tự do của chitosan và các cation TPP. Trước khi tạo liên kết ngang, chitosan được tiến hành oxy hóa bằng H_2O_2 với các hàm lượng khác nhau. Hỗn dịch sau đó được đem đi thử độ kháng khuẩn đối với các khuẩn thông dụng trong đường mũi như: *E. coli*, *M. catarrhalis*, *S.aureus*.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất

Chitosan (CS) (độ deaxetyl hoá >75 – 85%, $1,61 \times 10^5$ Da) (hãng Aldrich sản xuất). Natri tripolyphosphate, kali dichromate và axit axetic loại AR được sử dụng mà không

cần thanh lọc thêm. H₂O₂, MgCl (Osaka, Japan). Thuốc xịt mũi từ loài hoa ngũ sắc (*Ageratum conyzoides* L.) (Viện Dược liệu, Việt Nam). Axit axetic (CH₃COOH) 1% được pha từ axit axetic 99,5% (Trung Quốc); Etanol (Trung Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chế tạo chitosan trọng lượng phân tử thấp

Đầu tiên 2 gam chitosan được hòa tan trong 100 ml HCl 0,1M và khuấy trong 45 phút. Sau đó, H₂O₂ đã được thêm vào một trong năm nồng độ (4%; 6%; 8% và 10%). Hỗn hợp được gia nhiệt và khuấy ở 65°C cho 2 giờ rồi lọc chân không. Phần cặn trên được trung hòa bằng nước cất, sấy và cân. Ethanol được thêm vào dung dịch thấp hơn, được để lại trong 24 giờ kết tủa, sau đó lọc, sấy khô và cân. Chitosan trọng lượng phân tử thấp được tạo ra tan trong nước, được ký hiệu là CS4 CS6, CS8 và CS10 [4, 5].

Tiếp theo 0,5g chitosan (CS4, CS6, CS8 và CS10) đã được hòa tan trong 1000 ml axit axetic 2% và khuấy 25 phút. Sau đó, 100ml mỗi dung dịch được thêm vào 40 ml TPP (0,2; 0,3; 0,4 và 0,5 g/L), khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng thu được dung dịch màu vàng trắng đục và ly tâm ở tốc độ cao [4, 5]. Chitosan sau khi chế tạo có khối lượng phân tử thấp (LWCS- low-molecular-weight chitosan) tạo hỗn dịch với thuốc xịt mũi.

2.2.2. Tạo hỗn dịch nanochitosan với thuốc xịt mũi

Thuốc xịt mũi hoa ngũ sắc và chitosan (LWCS)/TPP ở tỷ lệ khảo sát, được khuấy trên máy khuấy từ trong 90 phút cho đến khi hỗn hợp đạt đồng nhất, sau đó cho vào rung siêu âm trong vòng 45 phút. Độ nhớt của hỗn dịch đo ở 25°C bằng cách sử dụng nhớt kế Ostwaid (Đức).

2.2.3. Xác định khả năng kháng khuẩn



Hình 1. Chuẩn bị các đĩa thạch

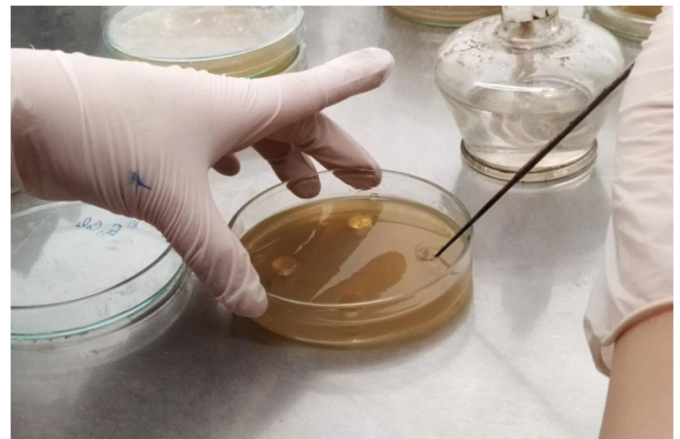


Hình 2. Chuẩn bị các chủng vi khuẩn kiểm định

Phương pháp: Thử hoạt tính ức chế vi khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (hình 1). Phương pháp thử hoạt tính ức chế vi khuẩn (Phương pháp của Hadacek et al., 2000), được đo tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Chủng vi khuẩn kiểm định: *Escnerichia coli* ATCC 25922; *Staphylococcus aureus* ATCC 12222 và *Moraxella catarrhalis* ATCC 49143 (hình 2).

Hình 3 là hình ảnh công tác khoan các giếng và nhỏ mẫu thử hoạt tính ức chế vi khuẩn.



Hình 3. Khoan các giếng và nhỏ mẫu

3.KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát độ nhớt

Sau khi xử lý chitosan bằng H₂O₂, cho thấy trọng lượng phân tử và độ nhớt của chitosan giảm và tiếp tục giảm khi thêm H₂O₂ (bảng 1). Đây là quá trình bẻ gãy mạch phân tử chitosan bởi H₂O₂, oxy hóa các nhóm OH và NH₂ thành nhóm COOH. Do đó, khối lượng phân tử của chitosan (L) giảm khi thể tích H₂O₂ tăng (bảng 1).

Bảng 1. Trọng lượng phân tử, độ nhớt và phân tích nguyên tố của chitosan (L)

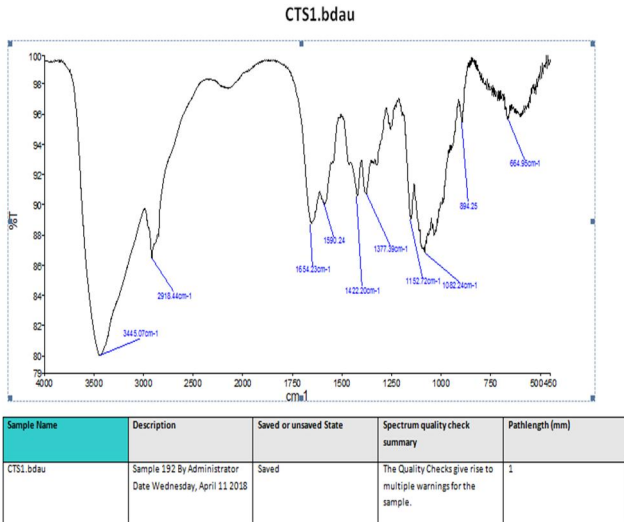
TT	Mẫu	H ₂ O ₂ (ml)	μ (ml/g)	Mv
1	CS4	4	301,257	242,450
2	CS6	6	167,465	127,301
3	CS8	8	69,750	81,245
4	CS10	10	21,090	17,365

Tỷ lệ LWCS/TPP cho kết quả phù hợp là 6:3.

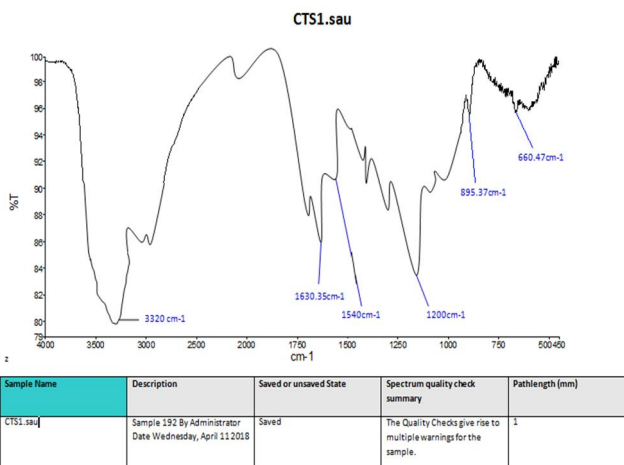
3.2. Khảo sát phổ hồng ngoại (FT-IR) của nanochitosan

Phổ (a) (hình 4) của chitosan ban đầu, peak 3438cm⁻¹ tương ứng dao động của nhóm NH₂ và OH. Peak 1960cm⁻¹ tương ứng với nhóm NH₂. Phổ (b) (hình 5) của chitosan ta thấy peak 1654cm⁻¹ biến mất và peak 1630cm⁻¹ và 1540cm⁻¹ xuất hiện là do liên kết giữa nhóm ammonium và phosphoric.

Từ đó có thể kết luận, nhóm ammonium của chitosan đã tạo nối ngang với TPP trong sản phẩm chitosan-TPP. Mặc dù vậy, cường độ các mũi phổ chitosan đều biểu hiện trong phổ chitosan-TPP nhưng yếu hơn, không mạnh và sắc nét như trong phổ của chitosan.



Hình 4. Phổ FT-IR của chitosan ban đầu



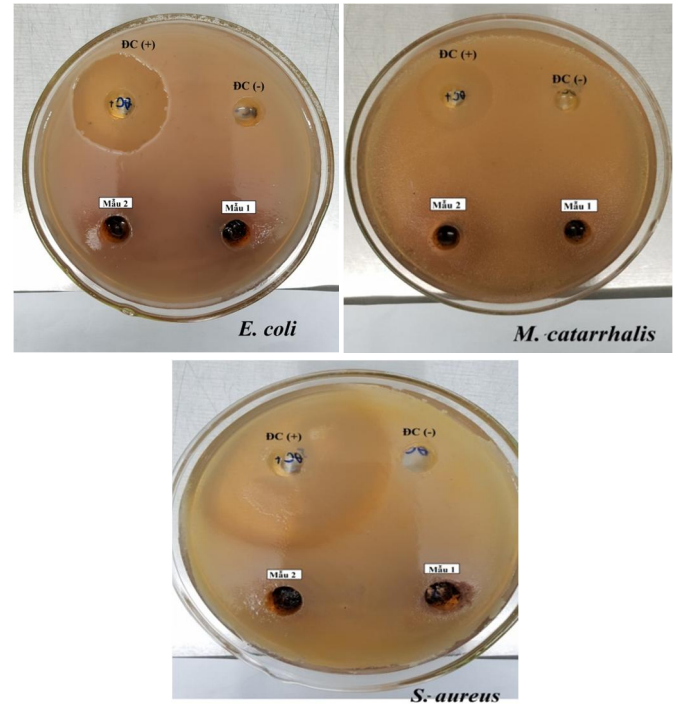
Hình 5. Phổ FT-IR của chitosan-TPP

Tín hiệu nhóm	CTS	Nanochitosan
O-H	3445	3320
C-H	2918	2954
Amide I	1654	1630
Amide II	1590	1540

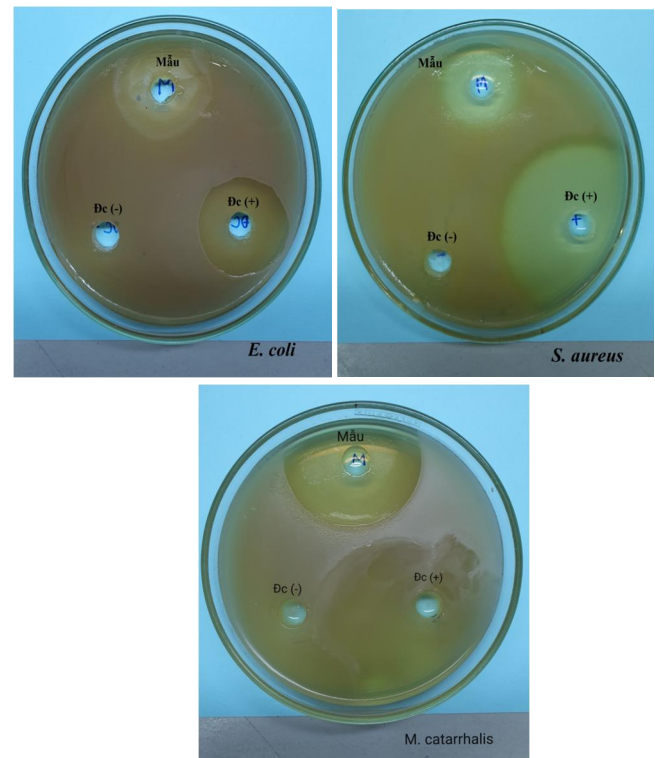
3.3. Khả năng kháng khuẩn của hỗn dịch chitosan với thuốc xịt mũi từ loài Ngũ sắc (*Ageratum conyzoides* L.) định hướng trong điều trị bệnh viêm xoang

Trước tiên kiểm tra đối chứng Đc(+) và Đc(-) của các đĩa kiểm nghiệm đều thấy đã đạt yêu cầu có thể đọc tiếp kết quả mẫu thử nghiệm. Trong đó Mẫu 1 là dịch thuốc Agerhinin ban đầu, Mẫu 2 là hỗn dịch thuốc với chitosan. Từ hình 6 ta thấy, Mẫu 1 không có khả năng kháng khuẩn vì không thấy xuất hiện vòng vô khuẩn ở cả 3 chủng vi khuẩn kiểm định. Dịch thuốc Agerhinin ban đầu không có khả năng kháng khuẩn. Mẫu 2 không xuất hiện vòng vô khuẩn với chủng vi khuẩn *E.coli* và *S.aureus* (không có khả năng kháng hai loại vi khuẩn này). Nhưng ở mẫu kiểm định với khuẩn *M.catarrhalis* mẫu 2 xuất hiện vòng vô khuẩn nhưng kích thước vòng vô khuẩn là 1mm. Từ hình 7 có thể thấy,

vòng vô khuẩn xuất hiện rõ nét ở cả ba chủng vi khuẩn điều đó cho thấy mẫu thử chitosan-LWCS/Thuốc xịt mũi *Ageratum conyzoides* L có khả năng kháng được cả ba chủng vi khuẩn thử nghiệm là *E.coli*, *M.catarrhalis*, *S.aureus*.



Hình 6. Mẫu thử hỗn dịch chitosan/*Ageratum conyzoides* L với vi khuẩn: *E. coli*; *M. catarrhalis* và *S. aureus* (Mẫu 1: Dịch thuốc Agerhinin; Mẫu 2: Hỗn dịch thuốc Agerhinin/chitosan chưa cắt ngắn mạch)



Hình 7. Mẫu thử hỗn dịch chitosan - LWCS/Thuốc xịt mũi *Ageratum conyzoides* L với vi khuẩn: *E. coli*; *M. catarrhalis* và *S. aureus*

4. KẾT LUẬN

Nhóm nghiên cứu đã phân hủy chitosan thành chitosan có khối lượng phân tử thấp bằng cách sử dụng H_2O_2 nồng độ khác nhau nhằm mục đích cắt mạch và sau đó điều chế chitosan với nồng độ khác nhau của TPP. Chúng tôi đã thu được kết quả sau đây: Sự hình thành của chitosan phụ thuộc vào nồng độ TPP; khi TPP với nồng độ thấp hoặc cao, nó không phản ứng với chitosan để tạo thành phân tử chitosan có kích thước nhỏ; Chitosan cấu trúc phù hợp chỉ thu được khi tỷ lệ khối lượng của chitosan/TPP phù hợp là 6:3; Ở tỷ này khi tạo hỗn dịch với thuốc xịt mũi có khả năng kháng khuẩn, đặc biệt đối với các khuẩn quan trọng trong đường mũi: *E. coli*, *M.catarrhalis*, *S.aureus*. Điều đó chứng tỏ rằng quá trình cắt mạch bằng H_2O_2 và tạo liên kết ngang khi bổ sung TPP là thành công ở một mức độ nhất định.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội đã tạo điều kiện thuận lợi để hoàn thành công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. J. S. Paun, A. A. Bagada, M. K. Raval, 2010. *Nasal Drug Delivery - As An Effective Tool For Brain Targeting - A Review*. International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences/1 (2).
- [2]. Tokumitsu,H., Ichikawa,H., Fukumori,Y., 1999. *Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer Preparation by emulsion-droplet coalescence technique and characterization*. Iran. J. Pharmaceut. Res., 16, 1830–1835.
- [3].Janes, K.A., Fresneau, M.P., Marazuela, A., 2001. *Chitosan nanopartides as delivery systems for doxonibicin*. J. Contr. Rel., 73, 255–267.
- [4]. Kuo-Shien Huang, Yea-Ru Sheu & In-Chun Chao, 2009. *Preparation and Properties of Nanochitosan*. Polymer-Plastics Technology and Engineering, 48:12, 1239-1243, DOI: 10.1080/03602550903159069.
- [5]. Hui-Chia Yang, Wen-Hong Wang, Kuo-Shien Huang, Min-Hsiung Hon, 2010. *Preparation and application of nanochitosan to finishing treatment with anti-microbial and anti-shrinking properties*. Carbohydrate Polymers 79, 176–179.

AUTHORS INFORMATION

Nguyen Tuan Anh, Nguyen Thi Huong, Nguyen Thi Thanh Hang, Hoang Thi Ha

Faculty of Chemical Technology, Hanoi University of Industry