



## Nghiên cứu tổng hợp và đặc trưng hệ nano Chitosan-Fucoidan-Curcumin

### Study on Preparation and Characterization of Chitosan-Fucoidan-Curcumin Nanoparticles System

Vũ Duy Hiến<sup>1,\*</sup>, Nguyễn Bình Dương<sup>1</sup>, Quàn Thị Thu Trang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Phòng Hóa Vô cơ, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

\*Email: [hienvdot@yahoo.com](mailto:hienvdot@yahoo.com)

#### ARTICLE INFO

Received: 19/01/2021

Accepted: 19/6/2021

Published: 15/10/2021

#### Keywords:

Cyclodextrin, Polyelectrolyte, Inclusions, Nanoparticles System

#### ABSTRACT

The chitosan-fucoidan-curcumin nanosystems was synthesized by a simple polyelectrolyte self-assembly method together with the inclusions of complex system. The process was carried out with ultrasonic assistant and heating stirring. This nanosystem was not degraded when passing through the stomach, it was effectively released in the intestine, increasing absorption and bioavailability. The parameters of chitosan, fucoidan, curcumin, cyclodextrin were investigated to achieve a concentration higher nano curcumin. The total amount of chitosan and fucoidan was 10%, 13%, 15%, 17%, and 20% of the total agents. The corresponding amounts of curcumin were such that chitosan, fucoidan, and curcumin remained constant at 30%. Cyclodextrin was added as 70%. The characteristics of the nanosystems have been determined by SEM, TEM, FTIR, and HPLC methods. As a result, the chitosan-fucoidan-curcumin nanosystems has been successfully synthesized, the nanoparticles have uniform sizes and are in the range of 30-100 nm. The maximum nano curcumin content is 15%. The suitable conditions of the reaction at 80°C, the content of chitosan 7.5%, fucoidan 7.5%, curcumin 15%, and cyclodextrin 70%.

#### Giới thiệu

Với tính năng tương thích sinh học và phân hủy sinh học cao, cùng với nguồn nguyên liệu dồi dào, các hoạt chất có nguồn gốc tự nhiên ngày càng được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là trong y sinh nhằm cải thiện và nâng cao sức khỏe cũng như chữa trị bệnh cho con người.

Hạn chế của một số hoạt chất tự nhiên là khả năng hấp thụ vào cơ thể kém, dễ bị phân hủy bởi dịch dạ dày, dẫn đến hiệu năng sử dụng chúng không đạt theo kỳ vọng mong muốn. Để tăng khả năng hấp thụ

vào cơ thể hay tăng tính sinh khả dụng của các hoạt chất này, các nhà khoa học đã sử dụng nhiều phương pháp khác nhau. Có thể hòa tan chúng vào một số chất béo, protein cùng với chất tạo nhũ hóa nhằm tạo ra các hệ vi nhũ tương. Phân tán các hoạt chất vào các polyme, monopolyme, chitosan, polysaccharit, casein, tạo liposome, mixell và thể phức vùi, tự lắp ráp polyelectrolyte...

Sản phẩm nhận được là các nanomedicine (thuốc nano) có kích thước nano mét, với khả năng hòa tan và phân tán tốt trong môi trường nước và dịch cơ thể. Việc lựa chọn giải pháp công nghệ và sử dụng các

chất mang trong quá trình tổng hợp nanomedicine cần phải đảm bảo sao cho các hoạt chất không bị biến tính, giữ nguyên trạng thái của hạt nano, các chất nền (chất mang) tương thích sinh học, không gây độc và không gây phản ứng phụ trong quá trình sử dụng.

Chitosan (CT) là một polysaccharit mạch thẳng thu được bằng cách deacetyl hóa chitin, được tìm thấy chủ yếu trong xương của động vật chân đốt và giáp xác. Chitosan được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật mô (thiết kế mô cấy), liệu pháp điều trị ung thư (phân phối thuốc), hỗ trợ cố định enzym, giảm cholesterol trong máu, đóng gói các hợp chất có hoạt tính sinh học. Với hoạt tính chống viêm, chitosan được ứng dụng rộng rãi trong y sinh để kháng khuẩn và chữa lành các vết thương. Chitosan có thể làm giảm đau trong việc xử lý vết thương, điều trị tại chỗ vết bỏng, trầy da, loét da và các vùng ghép da [1].

Fucoidan (FC) thuộc họ polysaccharid được phân lập từ một số loài tảo nâu và động vật không xương sống ở biển. Fucoidan có khả năng chống đông máu, kháng vi-rút, kháng u, chống viêm, chống oxy hóa, chống tăng sinh và điều hòa miễn dịch [2,3].

Sự kết hợp giữa fucoidan với chitosan là một giải pháp hữu hiệu, nhằm tạo ra chất nền (chất mang) trong quá trình phát triển các hạt nano. Tương tác giữa nhóm amin của chitosan và nhóm sulfat của fucoidan, cho phép hình thành các hạt nano và làm hạn chế quá trình giải phóng các hoạt chất ở dạng nano. Liên kết fucoidan-chitosan có tác dụng ngăn ngừa sự suy thoái các nanomedicine trong dạ dày và giải phóng chúng trong ruột [1,2].

Curcumin (CC) là một hợp chất polyphenol kỵ nước được chiết xuất từ củ nghệ, đã được sử dụng rộng rãi như các loại thuốc truyền thống ở Ấn Độ, Trung Quốc và Việt Nam. Đã có rất nhiều các nghiên cứu sâu rộng, về tính chất hóa lý và hoạt tính dược lý của curcumin trên những bệnh khác nhau. Chẳng hạn như ung thư, tim mạch, viêm ruột, viêm dạ dày, viêm da, làm lành vết thương, nhiễm HIV, bệnh Alzheimer, viêm khớp dạng thấp và bệnh tiểu đường. Với đặc tính trung hòa gốc tự do và chống oxy hóa, curcumin là một hoạt chất có khả năng hỗ trợ tích cực trong việc ngăn ngừa ung thư, gây mất cảm cho các tế bào khối u và bảo vệ cho các tế bào bình thường trong quá trình hóa trị - xạ trị [4].

Các kết quả nghiên cứu in-vitro quá trình giải phóng các nanomedicine đã chỉ ra rằng, sự có mặt của liên kết fucoidan-chitosan, làm cho các hạt nanomedicine không bị suy giảm chất lượng khi đi qua dạ dày và sau đó được giải phóng một cách hiệu quả ở ruột, làm

tăng khả năng hấp thụ và tính sinh khả dụng của chúng. Kết quả cũng cho thấy, hệ nano này ít gây độc tế bào, có khả năng phân phối hướng đích, khả năng bám dính niêm mạc cao và sự phóng thích có kiểm soát đến các tế bào biểu mô ruột [5].

Nội dung của bài báo này công bố một số kết quả nghiên cứu tổng hợp hệ nano chitosan-fucoidan-curcumin, bằng phương pháp tự lắp ráp polyelectrolyte (polyme điện ly) đơn giản kết hợp với hệ phức vùi được tạo thành bởi curcumin và cyclodextrin (CD).

## Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu

### Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng gồm: Fucoidan 80% (Công ty Cổ phần Fucoidan Việt Nam); Curcumin 98% (Công ty CP Tinh dầu và Chất thơm, Việt Nam); Chitosan 90% deacetyl hóa (ISF Chitin & Marine Products LLP, India); cyclodextrin 98% (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Japan); cồn thực phẩm 98% (Hóa chất Đức Giang, Việt Nam).

### Quy trình tổng hợp vật liệu

Quá trình phản ứng nano hóa được thực hiện trong môi trường siêu âm có khuấy và gia nhiệt, nhằm kết hợp các hạt nano curcumin với fucoidan và chitosan, thành hệ nano có hàm lượng curcumin cao nhất và cùng với các đặc tính cần hướng đến.

Các thông số thích hợp đã được khảo sát bằng thực nghiệm là tốc độ khuấy 300v/ph, nhiệt độ phản ứng (80°C), thời gian phản ứng (3 giờ) sẽ được sử dụng cho nghiên cứu này.

Các thông số cần khảo sát là nồng độ của chitosan, fucoidan, curcumin, CD đến hàm lượng curcumin và kích thước hạt nano được tạo thành. Chitosan và fucoidan được trộn đều với nhau, tổng lượng chitosan và fucoidan tính theo trọng lượng là 10%, 13%, 15%, 17% và 20% so với tổng các chất tham gia phản ứng nano hóa (chitosan, fucoidan, curcumin, CD).

Hàm lượng curcumin được khảo sát là 10%, 13%, 15%, 17% và 20%. Tổng lượng chitosan, fucoidan, curcumin luôn không đổi ở 30%. Lượng CD tham gia là 70% tổng các chất tham gia phản ứng nano hóa. Lượng CD cần chọn dư hơn so với lý thuyết, vì nguyên liệu CD luôn tồn tại khá nhiều phân tử bị lỗi, đường kính lỗ có thể nhỏ hơn đường kính của phân tử curcumin, làm cho curmin không thể vùi vào sâu trong lỗ được.

Đầu tiên, chuẩn bị lượng curcumin 98% theo kế hoạch thực nghiệm, rồi hòa tan vào cồn 98° theo tỷ lệ curcumin/cồn là 1/30, trong thiết bị phản ứng hồi lưu dung môi, tốc độ khuấy 300 vòng/phút, nhiệt độ 80°C. Hệ thiết bị được đặt trong bể siêu âm LSP-500-USA. Bổ sung CD theo tỷ lệ tương ứng và duy trì trong thời gian 1 giờ. Sau đó tiếp tục bổ sung hỗn hợp chitosan và fucoindan, duy trì phản ứng nano hóa trong 2 giờ tiếp theo.

Dung dịch sau phản ứng được đưa vào hệ cô đặc để đuổi dung môi. Khi lượng dung môi còn lại khoảng 30% so với lượng dung môi ban đầu, tháo lấy dung dịch đã cô rồi đưa vào tủ sấy chân không.

Sản phẩm sau sấy là khối rắn xốp, được nghiền mịn và xác định các đặc trưng như hàm lượng curcumin, kích thước hạt...

### Phương pháp nghiên cứu

Độ hòa tan của sản phẩm được đánh giá định tính bằng cách hòa tan vào nước cất có pH 6,8-7,4. Hệ nano đạt yêu cầu về độ tan khi dung dịch nhận được trong suốt, không vẩn đục hoặc tồn tại các hạt rắn lắng phía dưới.

Hình dạng và kích thước hạt của sản phẩm được xác định bằng phương pháp hiển vi điện tử quét (SEM) trên thiết bị S-4800 Nhật Bản và ảnh TEM trên thiết bị JEOL JEM 1010 Nhật Bản.

Đặc trưng nhóm phân tử của sản phẩm bằng phổ FTIR, trên máy Impact 410-Nicolet FTIR (Mỹ), theo phương pháp ép viên KBr.

Xác định hàm lượng curcumin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), trên thiết bị 1100 Agilent (Mỹ).

### Kết quả và thảo luận

#### Ảnh hưởng của nồng độ chất tham gia phản ứng

Ảnh hưởng của nồng độ chất tham gia phản ứng đến độ hòa tan và kích thước của hệ nano chitosan-fucoindan-curcumin được trình bày ở bảng sau:

	CT/FC (%)	CC (%)	CD (%)	Độ tan trong nước	K.thước (nm)
1	10	20	70	Đục	30-500
2	13	17	70	Đục	30-400
3	15	15	70	Trong suốt	30-100
4	17	13	70	Trong suốt	30-80

5      20      10      70      Trong suốt      20-60

Kết quả cho thấy với hàm lượng curcumin là 20%, hàm lượng chitosan/fucoindan 10%, khi pha sản phẩm nano vào nước, dung dịch không trong suốt. Các hạt tạo thành, thông qua ảnh SEM và TEM có hình thái không đồng đều và nhiều hạt có kích thước lớn, khoảng 30-500nm.

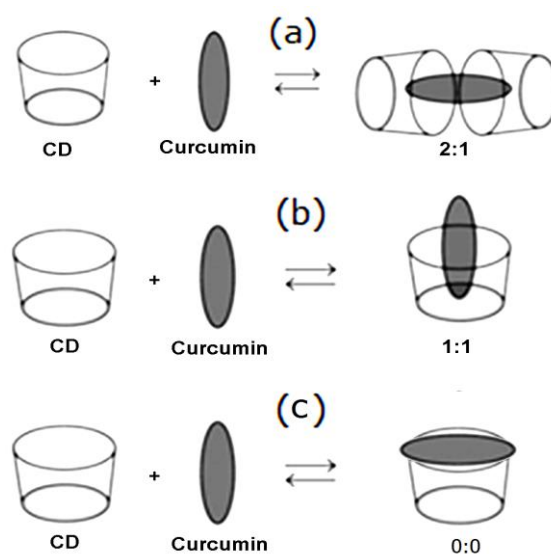
Hàm lượng curcumin giảm còn 17%, tương ứng với hàm lượng chitosan-fucoindan 13%, khi pha sản phẩm nano vào nước, dung dịch bớt đục hơn so với sản phẩm có hàm lượng curcumin 20%. Các hạt tạo thành có hình thái không đồng đều, kích thước hạt giảm nhưng vẫn tồn tại nhiều hạt có kích thước lớn, khoảng 30-400nm.

Khi giảm hàm lượng curcumin xuống 15%, kết quả cho thấy dung dịch trong suốt, hệ nano đã tan hoàn toàn. Kích thước hạt khá đồng đều và nằm trong khoảng 30-100nm.

Tiếp tục giảm hàm lượng curcumin xuống 13% và 10%, tương ứng với hàm lượng chitosan-fucoindan 17% và 20%, sản phẩm nhận được cũng tan tốt trong nước, kích thước hạt giảm dần như đã thấy ở bảng trên.

Mục tiêu ưu tiên là hàm lượng nano curcumin có trong sản phẩm ở mức cao nhất có thể, bởi đối tượng sử dụng curcumin làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe nhiều hơn, giá curcumin rẻ hơn nhiều so với fucoindan nên sẽ làm cho giá thành sản phẩm không quá cao.

Các tác giả [6] đã mô phỏng cơ chế tạo phức vùi giữa cyclodextrin và curcumin như hình 1. Từ cơ chế này, có thể lý giải được sự phụ thuộc giữa độ hòa tan của hệ nano vào hàm lượng curcumin.



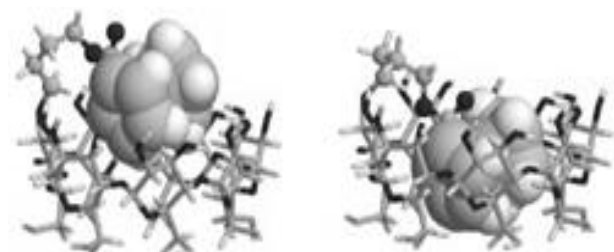
Hình 1: Sự hình thành thể phức vùi

CD là hợp chất tan trong nước, hình dạng nón cụt, có lỗ rỗng bên trong. Đường kính lỗ trong của CD là 7,8Å, với đặc tính kỵ nước. Cùng với đặc tính kỵ nước giống lỗ rỗng của CD, kết hợp đường kính nhỏ hơn (4,4Å) [6], nên curcumin có thể được vùi vào trong lỗ rỗng của CD. Nếu tính theo lý thuyết, thì 1 hoặc 2 phân tử CD sẽ tạo phức vùi (inclusions) với 1 phân tử curcumin.

Nếu 2 phân tử CD vùi 1 phân tử curcumin (hình 1a), thì thể phức vùi này sẽ tan hoàn toàn trong nước, cho dung dịch trong suốt có màu vàng đến màu nâu đỏ tùy môi trường pH.

Trong thực tế, sẽ luôn tồn tại trường hợp 1 phân tử CD vùi 1 phân tử curcumin (hình 1b) hoặc do các lỗ rỗng bị lỗi không vùi được các hạt curcumin tự do (hình 1c), sẽ làm cho dung dịch không trong suốt.

Mặt khác, curcumin nói chung hay những thể tồn tại của các phức tạo hạt nano curcumin nói riêng, thường không bền trong môi trường pH quá cao hoặc quá thấp. Quá trình tự lắp ráp polyelectrolyte bởi sự tương tác giữa nhóm amin của chitosan và nhóm sulfat của fucoidan tạo ra các polyme điện ly. Các polyme này bao bọc và lắp ráp với các hạt curcumin. Sau cùng, sẽ tạo ra những hạt nano đồng đều, phân tán tốt trong nước và bền trong môi trường pH thấp (hình 2).



Hình 2: Hệ nano chitosan-fucoidan-curcumin

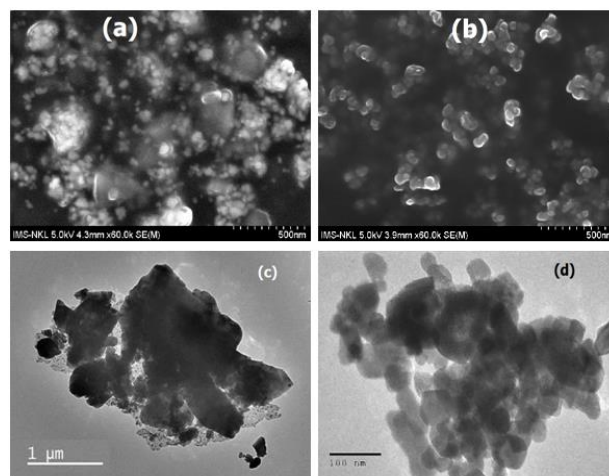
Hình 2 cho thấy, các hạt nano ở thể phức vùi được bao bọc bởi các polyme điện ly chitosan-fucoidan, tạo thành hệ nano chitosan-fucoidan-curcumin. Sự bao bọc này làm cho hệ nano bền vững hơn trong môi trường axit cao của dạ dày. Và cũng giúp cho các sản phẩm tạo thành tan tốt trong nước, đồng nghĩa với các hạt curcumin phân tán tốt trong nước.

#### Hình dạng và kích thước hạt (ảnh SEM và TEM)

Do giới hạn của bài báo, nên nội dung này chỉ nêu những ảnh đại diện đặc trưng nhất trong quá trình làm thực nghiệm.

Kết quả SEM và TEM cho thấy, khi hàm lượng curcumin là 17% và 20%, vẫn tồn tại các hạt có kích

thước lớn, khoảng 400-500nm (hình 3a, 3c). Xảy ra hiện tượng này là do lượng curcumin còn dư, không tạo phức vùi cũng như không được bao bọc bởi hệ chitosan-fucoidan. Các phân tử curcumin tự do sẽ tái kết tinh, tạo thành các tinh thể lớn.



Hình 3: Ảnh SEM (a,b) và TEM (c,d) của hệ nano chitosan-fucoidan-curcumin với hàm lượng curcumin 20% (a,c) và 15% (c,d)

Trên hình 3b và 3d có thể nhận thấy, các hạt nano có dạng gần giống hình cầu. Các biên hạt rất rõ ràng, chúng tỏ chúng phân bố rời rạc, không bị dính vào nhau. Khi hàm lượng curcumin giảm còn và dưới 15% các chất mang là chitosan, fucoidan và CD đủ để tạo phức vùi và bao bọc các hạt curcumin, làm cho chúng không thể kết tập thành các hạt lớn. Thể hiện trên hình 3b và 3d, kích thước các hạt nano nhỏ hơn 100nm và khá đồng đều.

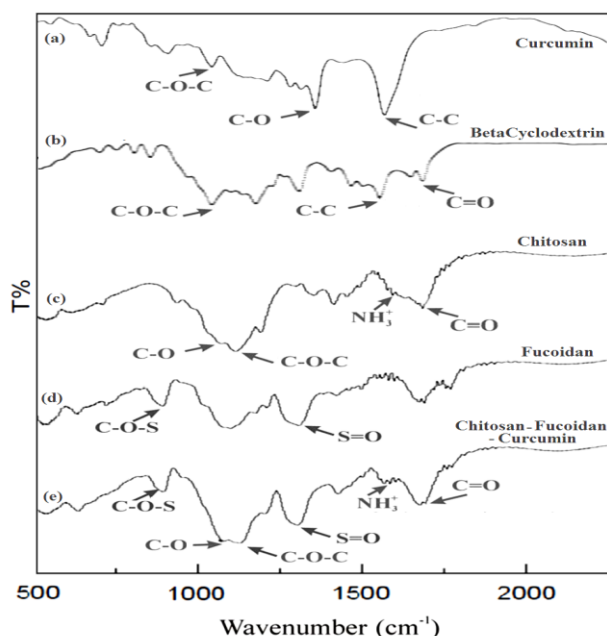
Kết quả cho thấy, hàm lượng tổng chitosan và fucoidan 15%, hàm lượng curcumin 15% và hàm lượng CD 70% là thích hợp nhất. Nếu tăng hàm lượng CD thì có thể làm tăng lượng phức vùi, đồng nghĩa với tăng hàm lượng curcumin lên cao hơn. Nhưng hệ phức vùi khá không bền trong môi trường axit của dạ dày. Do vậy, hàm lượng chitosan và fucoidan 15% là đủ để tạo hệ nano bền vững với dịch dạ dày.

#### Đặc trưng nhóm phân tử bằng phổ FTIR

Hình 4 hiển thị phổ FTIR của curcumin, CD, chitosan, fucoidan và hệ nano chitosan-fucoidan-curcumin.

Chitosan thể hiện các đỉnh đặc trưng của dao động uốn  $\text{NH}_3^+$  (nhóm amin proton) và  $\text{C}=\text{O}$  (nhóm cacbonyl) của amit thứ cấp tương ứng ở  $1560\text{ cm}^{-1}$  và  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Các đỉnh ở  $1150\text{ cm}^{-1}$  và  $1026\text{ cm}^{-1}$  cho thấy dao động kéo giãn  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  không đối xứng và dao động biến dạng  $\text{C}-\text{O}$  của chitosan. Các đỉnh đặc trưng của phổ fucoidan ở  $1160-1260\text{ cm}^{-1}$  và  $845\text{ cm}^{-1}$  có liên

quan đến sự kéo dài không đối xứng S=O và kéo dài C-O-S của các nhóm sulfat. Trong phổ của hệ nano (hình 4e), cả các đỉnh đặc trưng của chitosan và fucoidan đều có mặt, nhưng có sự chuyển dịch của nhóm C=O. Các liên kết được hình thành thông qua tương tác tĩnh điện do nhóm amin tích điện dương trên chitosan và nhóm sunfat tích điện âm trên fucoidan.

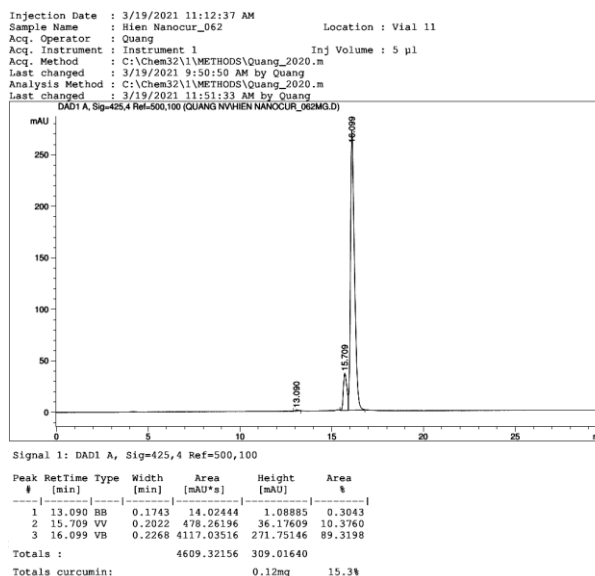


Hình 4: Phổ FTIR của beta cyclodextrin (a), curcumin (b), chitosan (c), fucoidan (d), hệ nano (e)

Dao động kéo dài vòng benzen của curcumin ở  $1627\text{ cm}^{-1}$  và dao động C-C của CD ở  $1510\text{ cm}^{-1}$  được thể hiện trong hình 4a. Phổ FTIR điển hình của CD đặc trưng ở dải  $1033\text{ cm}^{-1}$  được gán cho dao động kéo dài của C-O-C. Tất cả các đỉnh hấp thụ ở trên có thể được tìm thấy trên phổ FTIR của curcumin và CD (hình 4a, 4b). Tuy nhiên, các đỉnh đặc trưng C-O và C-C của curcumin tại phổ FTIR của hệ nano (hình 4e) hầu như không nhận thấy. Điều này có thể giải thích bằng sự lắp ráp polyelectrolyte giữa chitosan-fucoidan với curcumin và với hệ phức vùi CD-curcumin, tạo thành hệ nano chitosan-fucoidan-curcumin.

**Xác định hàm lượng curcumin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**

Hình 5 là phổ HPLC của hệ nano chitosan-fucoidan-curcumin tổng hợp theo tỷ lệ chitosan 7.5%, fucoidan 7.5%, curcumin 15% và CD 70%. Kết quả định lượng curcumin bằng HPLC là 15.3%. Kết quả này phù hợp với lượng curcumin đã tính toán và đưa vào phản ứng nano hóa.



Hình 5: Phổ HPLC của hệ nano chitosan-fucoidan-curcumin

**Kết luận**

Đã tổng hợp thành công hệ nano chitosan-fucoidan-curcumin, các hạt nano có kích thước đồng đều và nằm trong khoảng 30-100nm. Hàm lượng nano curcumin đạt tối đa là 15%.

Đã xác định được điều kiện thích hợp của phản ứng nano hóa là nhiệt độ  $80^{\circ}\text{C}$ , thời gian phản ứng 3 giờ, hàm lượng chitosan 7.5%, fucoidan 7.5%, curcumin 15% và CD 70%.

**Lời cảm ơn**

Đây là kết quả của đề tài KH&CN cấp cơ sở, mã số VHH.2021.11, do Viện Hóa học (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) tài trợ kinh phí.

**Tài liệu tham khảo**

1. T. C. Y. Leung, C. K. Wong, Xie Y, Mater. Chem. Phys. 121 (2010) 402-405. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.02.026>
2. O. Berteau, B. Mulloy, Glycobiology 13 (2003) 29-40. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg058>
3. Y. Liu, W. Yao, S. Wang, G. Di, Q. Zheng, A. Chen, J Nanosci Nanotechnol 14 (2014) 3844-3849. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8026>
4. M. Akram, A. A. Shahab-Uddin, K. H. A. N. Usmanhani, A. B. D. U. L. Hannan, E. Mohiuddin, M. Asif. Rom, J. Biol. – Plant Biol. Bucharest 55 (2010) 65-70.

5. Y. C. Huang, J. K. Chen, U. I. Lam, S. Y. Chen, *J. Poly. Res.* 21 (2014) 415.  
<https://doi.org/10.1007/s10965-014-0415-6>
6. R. Pushpalatha, S. elvamuthukumar, D. Kilimozhi, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 45 (2018) 45-53.  
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.03.004>