

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP VÀ ĐẶC TRƯNG NANO RUTIN

STUDY ON PEPARATION AND CHARACTERIZATION OF RUTIN NANOPARTICLES

Vũ Duy Hiến^{1*},
Quản Thị Thu Trang¹, Nguyễn Bình Dương¹

DOI: <https://doi.org/10.57001/huih5804.50>

TÓM TẮT

Nano rutin được tổng hợp bằng phương pháp tạo phức vùi với cyclodextrin, một phần rutin tự do sẽ được tạo micelle cùng với casein. Hệ nano này không bị suy giảm khi đi qua dạ dày, nó được giải phóng một cách hiệu quả ở ruột, làm tăng khả năng hấp thụ và sinh khả dụng. Các thông số cần khảo sát là hàm lượng rutin, cyclodextrin và casein để tạo ra hệ nano có hàm lượng rutin cao nhất, kích thước nhỏ hơn 100nm và phân tán tốt trong nước. Hàm lượng rutin khảo sát theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng là 10%, 13%, 15%, 17% và 20%. Lượng casein không thay đổi với giá trị 5% trọng lượng. Lượng CD tham gia tương ứng lần lượt là 85%, 82%, 80%, 78% và 75%. Các đặc tính của hệ nano đã được xác định bằng các phương pháp SEM, FTIR, HPLC và DSC. Kết quả là đã được tổng hợp thành công hệ nano rutin, các hạt nano có kích thước đồng đều và nằm trong khoảng 30 - 100nm. Hàm lượng nano rutin thích hợp là 15%, cyclodextrin 80%, casein 5%. Điều kiện thích hợp của phản ứng là nhiệt độ 80°C, thời gian phản ứng là 3 giờ, tốc độ khuấy 200 - 300 vòng/phút.

Từ khóa: Rutin, Cyclodextrin, Casein, hệ phức vùi, hạt nano.

ABSTRACT

Nanorutin has been synthesized by the method for inclusion complex formation of cyclodextrin the inclusion complexation method with cyclodextrin, a part of free rutin that will form micelles together with casein. This nanorutin is not degraded by gastric passage and is effectively released in the intestine, increasing absorption and bioavailability. The parameters were investigated including rutin, cyclodextrin, and casein content to create a nanosystem with the highest content of rutin, particle size smaller than 100 nm, and good dispersion in water. Surveyed rutin content was 10%, 13%, 15%, 17% and 20% by weight. The casein was 5% constant. The number of participating CDs is 85%, 82%, 80%, 78% and 75%, respectively. The nanosystem was evaluated for its physico-chemical and thermal characteristics using SEM, FTIR, HPLC, and DSC methods. As a result, the rutin nanosystem has been successfully synthesized, the nanoparticles have uniform size (30 - 100nm). The appropriate nanorutin content is 15% rutin, 80% cyclodextrin, 5% casein. Optimum reaction conditions for nanorutin synthesis is at 80°C for 3 hours, stirring speed of 200 - 300 rpm .

Keywords: Rutin, Cyclodextrin, Casein, inclusion complex, nanoparticles.

¹Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Email: hienvdot@gmail.com

Ngày nhận bài: 06/9/2022

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 16/10/2022

Ngày chấp nhận đăng: 27/10/2022

CHỮ VIẾT TẮT

RU: Rutin

CD: Cyclodextrin

CS: Casein

SEM: Hiển vi điện tử quét

FTIR: Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier

HPLC: Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

DSC: Phân tích nhiệt vi sai

1. GIỚI THIỆU

Rutin (quercetin-3-rhamnosyl glycoside, RU) là một flavonoid thu được từ các bộ phận hoa, lá hoặc rễ của một số loài cây. Theo các tài liệu đã công bố, có trên 50 loài thực vật chứa rutin, trong đó hoa hòe chứa nhiều rutin hơn cả, hàm lượng rutin trong hoa hòe cao gấp 4 đến 5 lần những loài cây khác có chứa rutin [1].

Rutin trích ly từ hoa hòe (*Sophora japonica* L.), tồn tại ở dạng tinh thể hình kim. Tinh thể có màu vàng nhạt, vàng xanh, có vị hơi đắng, thường chứa ba tinh thể nước, điểm nóng chảy ở 161 - 178°C. Rutin hòa tan trong metanol, pyridin, dung dịch kiềm và nước sôi và hầu như không hòa tan trong nước lạnh, cloroform, cacbon disunfua, ete, benzen và ete dầu mỏ. Phân tử rutin có chứa nhóm -OH, là chất phân cực mạnh, do đó có thể tách chiết bằng cồn, nước nóng hoặc hỗn hợp cồn nước [2].

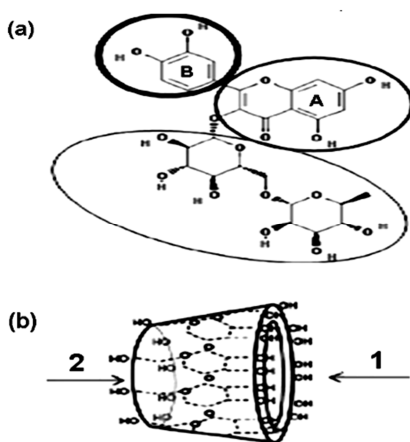
Là sản phẩm hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học và dược lý cao, nhiều nghiên cứu đã chứng minh rutin có khả năng làm tăng sự bền vững của thành mao mạch, chống oxy hóa, chống viêm nhiễm, chống ung thư và khối u, kháng khuẩn, giảm hen suyễn, giảm cholesterol và có khả năng phòng ngừa bệnh thần kinh...[3]. Ngoài ra, bằng phương pháp phân tích kết nối phân tử của rutin, cho thấy hoạt chất này có khả năng ức chế các protein quan trọng của SARS-CoV-2 [4].

Tuy nhiên, việc sử dụng rutin trong các lĩnh vực dược phẩm và thực phẩm chức năng ít hiệu quả, do khả năng hòa tan kém, dễ bị phân hủy trong dịch thể người dẫn đến sinh khả dụng thấp.

Để tăng khả năng hấp thụ vào cơ thể hay tăng tính sinh khả dụng của hoạt chất này, các nhà khoa học đã sử dụng nhiều phương pháp khác nhau. Có thể hòa tan rutin vào các 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, polysaccharide, casein, tạo

liposome, micelle hoặc inclusions (phức vùi)... 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 mang tương thích sinh học, không gây độc và không gây phản ứng phụ trong quá trình sử dụng.

Cyclodextrin (CD) là hợp chất tan trong nước, phân tử dạng hình nón cụt, có lỗ rỗng bên trong. Đường kính lỗ trong của CD là 7,8Å (hình 1b). Điểm đặc biệt của CD là có thể liên kết với một số hợp chất tan hoặc không tan trong nước bởi các nhóm -OH bên ngoài và nhóm kỵ nước bên trong lỗ rỗng, tùy thuộc điều kiện pH, nhiệt độ, dung môi [5]...



Hình 1. Cấu trúc phân tử của RU (a) và CD (b)

Casein (CS) là thành phần chính của sữa, bao gồm các axit amin proline (axit amin không thiết yếu). Ở trong môi trường nước, CS hòa tan kém dưới dạng các hạt huyền phù, được gọi là micelle casein. Micelle casein có dạng hình cầu, bề mặt của nó có tính ưa nước. Phần bên trong của khối cầu được liên kết với nhau bằng các ion canxi và là tương tác kỵ nước. Do có tính chất này, CS là hợp chất được sử dụng khá hiệu quả trong quá trình tạo các hạt nano [6].

Việc đưa vòng A của rutin vào môi trường của CD được cho là nguyên nhân gây ra các tương tác siêu phân tử của nó với cyclodextrin. Một phần cấu trúc của hợp chất rutin tương tác theo cách không cộng hóa trị với các nguyên tử của mặt trong của CD theo hướng 1, tạo ra hệ phức vùi. Phần còn lại sẽ tương tác cộng hóa trị với nhóm -OH bên ngoài của CD theo hướng 2 (hình 1b) [7].

Thực tế cho thấy, tương tác giữa CD và RU là liên kết thuận nghịch. Nếu không có giải pháp hạn chế sự phá vỡ liên kết này, RU sẽ tự giải phóng thành các hạt tự do khi tồn tại lâu trong môi trường nước. Mặt khác, luôn tồn tại các lỗ rỗng của CD bị lỗi, do vậy các hạt RU sẽ không vùi hoàn toàn vào các lỗ rỗng. Sự có mặt của các RU tự do sẽ làm cho dung dịch không trong suốt.

Việc bổ sung một lượng nhất định CS, sẽ có tác dụng tạo ra các micelle giữa CS và lượng nhỏ RU tự do, giúp cải

thiện chất lượng của các nanomedicine, cụ thể là sản phẩm nano RU-CS.

Với những phân tích về ưu điểm và khả năng đáp ứng cao của nano rutin cho mục đích y sinh đã nêu, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tổng hợp và đặc trưng nano rutin.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng gồm: Rutin 95% của Việt Nam; beta casein, cyclodextrin nhập từ Pháp; cồn 98° là cồn thực phẩm của Việt Nam.

2.2. 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 rutin với cyclodextrin và casein, thành hệ nano có hàm lượng rutin cao nhất có thể, cùng với các đặc tính cần hướng đến.

Các thông số thích hợp đã được khảo sát bằng thực nghiệm là nhiệt độ phản ứng 80°C, thời gian phản ứng 3 giờ, hàm lượng CS 5% sẽ được sử dụng cho nghiên cứu này.

Các thông số cần khảo sát là ảnh hưởng của hàm lượng của CD và RU đến hàm lượng và kích thước hạt nano rutin được tạo thành. Hàm lượng RU được khảo sát là 10%, 13%, 15%, 17% và 20%, so với tổng các chất tham gia phản ứng nano hóa (RU, CD và CS). Lượng CD tham gia tương ứng lần lượt là 85%, 82%, 80%, 78% và 75%. 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 RU, làm cho RU không thể vùi vào sâu trong lỗ được.

Đầu tiên, chuẩn bị lượng RU 95% theo kế hoạch thực nghiệm, rồi hòa tan vào cồn 98° theo tỷ lệ RU/cồn là 1/20, trong thiết bị phản ứng hồi lưu dung môi, tốc độ khuấy 200 - 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 5% CS, duy trì phản ứng nano hóa trong 2 giờ tiếp theo.

Tắt siêu âm, tiếp tục khuấy và gia nhiệt 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 RU, kích thước hạt, đặc trưng nhóm phân tử và hành vi nhiệt...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Độ hòa tan của sản phẩm được đánh giá định tính bằng cách hào 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.

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 RU bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), trên thiết bị 1100 Agilent (Mỹ).

Hành vi nhiệt của sản phẩm được xác định bằng thiết bị phân tích nhiệt vi sai (DSC) Labsys Evo1600 Setaram (Pháp).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. 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 RU-CD được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ chất tham gia phản ứng đến độ hòa tan và kích thước của hệ nano RU-CD

STT	RU (%)	CD (%)	CS (%)	Độ tan trong nước	Kích thước (nm)
1	10	85	5	Trong suốt	20 - 60
2	13	82	5	Trong suốt	20 - 80
3	15	80	5	Trong suốt	30 - 100
4	17	78	5	Đục	30 - 400
5	20	5	Đục	30 - 500	

Kết quả cho thấy với hàm lượng RU là 20%, hàm lượng CD tương ứng 75%, CS 5%, khi pha sản phẩm nano vào nước, dung dịch không trong suốt. Các hạt tạo thành, thông qua ảnh SEM có hình thái không đồng đều và nhiều hạt có kích thước lớn hơn 100nm (hình 2a).

Hàm lượng RU giảm còn 17%, tương ứng với hàm lượng CD 78%, khi pha sản phẩm nano vào nước, dung dịch bột đục hơn so với sản phẩm có hàm lượng RU 20%. Các hạt tạo thành có hình thái không đồng đều, kích thước hạt giảm nhưng vẫn tồn tại nhiều hạt có kích thước khá lớn.

Khi giảm hàm lượng RU giảm xuống 15%, kết quả cho thấy dung dịch trong suốt, hệ nano đã tan hoàn toàn.

Tiếp tục giảm hàm lượng rutin xuống 13% và 10%, tương ứng với hàm lượng CD 82% và 85%, sản phẩm nhận được cũng tan tốt trong nước, như đã thấy ở bảng 1.

Mục tiêu ưu tiên là hàm lượng nano RU có trong sản phẩm ở mức cao nhất có thể, đồng thời với kích thước hạt RU nhỏ hơn 100nm, khả năng phân tán tốt trong nước, ít tồn tại các hạt RU tự do làm cho dung dịch không trong suốt.

Việc bổ sung lượng nhỏ (5%) casein với mục đích tạo micelle với những hạt RU tự do, không có tương tác siêu phân tử với CD. Bởi tỷ lệ nhỏ so với tổng lượng RU và CD, nên những hiệu ứng tạo ra bởi sự có mặt của CS là khó phát hiện bằng một số phương pháp đo.

3.2. Hình dạng và kích thước hạt (ảnh SEM)

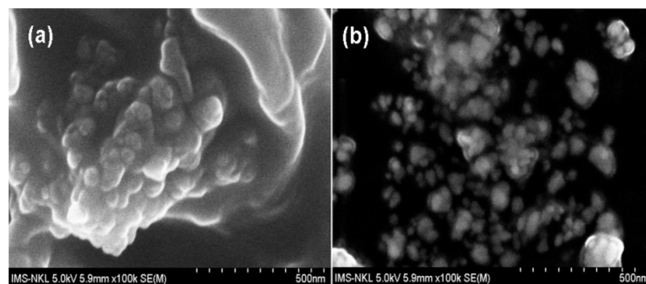
Hình 2 là ảnh SEM của sản phẩm nano rutin tổng hợp được với hàm lượng RU 17% (hình 2a) và 15% (hình 2b).

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 cho thấy, khi hàm lượng RU là 17% và 20%, vẫn tồn tại các hạt có kích thước lớn, khoảng 200 - 400nm, biên hạt không rõ ràng (hình 2a). Sảy ra hiện tượng này là do lượng RU còn dư, không tạo phức vùi cũng như không

tạo micelle với CS. Các phân tử rutin tự do sẽ tái kết tinh, tạo thành các tinh thể lớn.

Khi hàm lượng RU giảm còn và dưới 15%. Trên hình 2b có thể nhận thấy, các hạt nano có dạng gần giống hình cầu, các biên hạt rất rõ ràng, chứng tỏ chúng phân bố rời rạc, không bị dính vào nhau. Chất mang là CD đủ để tạo liên kết siêu phân tử, lượng CS đủ để tạo micelle với RU phát sinh tự do, làm cho chúng không thể kết tập thành các hạt lớn. Thế hiện trên hình 2b, kích thước các hạt nano nhỏ hơn 100nm và khá đồng đều.

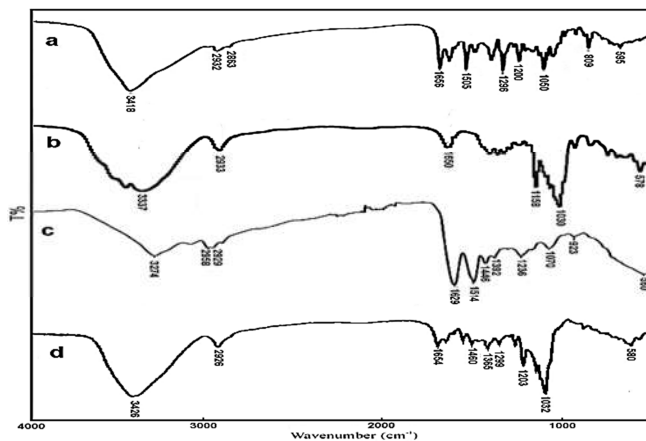


Hình 2. Ảnh SEM của nano rutin

Như vậy, hàm CS 5%, hàm lượng CD 80% và hàm lượng RU 15% và là thích hợp nhất. Nếu tăng hàm lượng RU vượt quá đến 17% thì có thể làm tăng lượng phức vùi, đồng nghĩa với tăng hàm lượng RU lên cao hơn. Nhưng hệ phức vùi khá không bền trong môi trường nước hoặc môi trường axit của dạ dày, dẫn đến làm giảm chất lượng của hệ nano.

3.3. Đặc trưng nhóm phân tử bằng phổ FTIR

Hình 3 là phổ FTIR của rutin (a), cyclodextrin (b), casein (c) và nano rutin có hàm lượng RU 15% (d). Có thể nhận thấy sự thay đổi rõ rệt về vị trí, cường độ và chiều rộng của các dải trong vùng 560 - 1200cm⁻¹ và dải có cực đại ở 3426cm⁻¹ của hệ RU-CD (hình 3d) so với các dải tương ứng của nguyên liệu ban đầu là RU, CD và CS (hình 3a,b,c). Những thay đổi trong vùng 560 - 1200cm⁻¹, liên quan đến dao động co giãn của liên kết C-C, C-O và dao động lắc của các liên kết C-H trong rutin. Đối với CD (hình 3b), sự dịch chuyển của các dải có cực đại 1030cm⁻¹ và 11588cm⁻¹ liên quan đến sự kéo giãn của các liên kết C-C, C-O và dao động lắc của các liên kết C-H. Dịch chuyển này tương ứng với điểm cực đại 1032cm⁻¹ và 1203cm⁻¹ của hệ nano RU-CD (hình 3d).



Hình 3. Phổ FTIR của rutin (a), cyclodextrin (b), casein (c) và nano rutin (d)

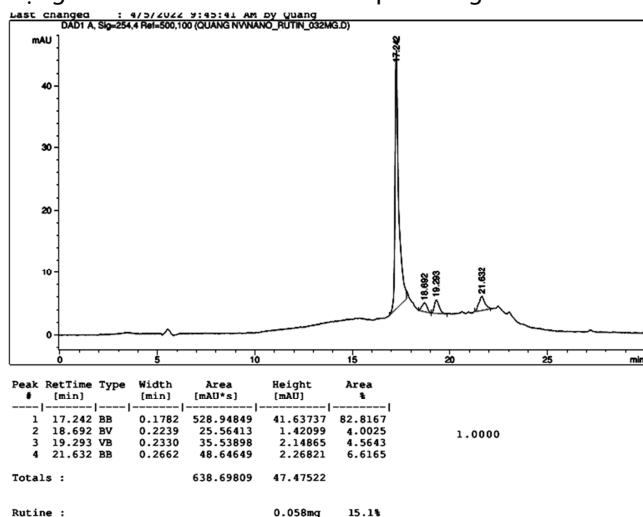
Trong phạm vi bước sóng 2500 - 3000cm⁻¹, những thay đổi phổ FTIR của hệ nano RU-CD không rõ rệt. Ở vùng này, các dao động kéo giãn đối xứng và phản đối xứng tạo ra bởi liên kết C-H của RU và CD ít bị ảnh hưởng bởi tia hồng ngoại, do các liên kết này nằm trong lỗ rỗng của phân tử CD.

Các liên kết cộng hóa trị O-H...O trên bề mặt của phân tử CD, CS với RU có sự kéo giãn. Điều này được thể hiện qua sự dịch chuyển từ vùng 3274cm⁻¹ của CS, 3337cm⁻¹ của CD và 3418cm⁻¹ của RU đến 3426cm⁻¹ của hệ nano RU-CD.

Từ những đặc trưng FTIR trên hình 3 cho thấy, không có phản ứng hóa học nào xảy ra giữa các chất tham gia quá trình nano hóa.

3.4. Xác định hàm lượng rutin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

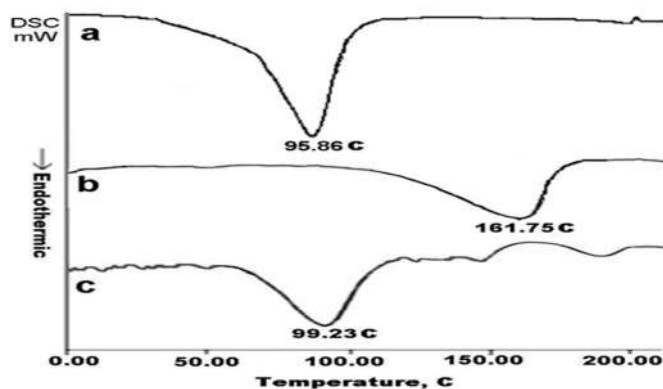
Hình 4 là phổ HPLC của hệ nano RU-CD tổng hợp được hợp theo tỷ lệ RU 15%, CD 80% và CS 5%. Kết quả định lượng RU bằng HPLC là 15,1%. Kết quả này phù hợp với lượng RU đã tính toán và đưa vào phản ứng nano hóa.



Hình 4. Phổ HPLC của nano rutin

3.5. Đặc trưng nhiệt DSC

Hình 5 là giản đồ phân tích nhiệt vi sai của CD (hình 5a), RU (hình 5b) và hệ nano RU-CD (hình 5c). Quá trình thu nhiệt xảy ra bởi sự nóng chảy của CD ở 95,86°C, RU ở 161,75°C và hệ nano RU-CD ở 99,23°C.



Hình 5. Giản đồ DSC của CD (a), RU (b) và hệ nano RU-CD (c)

Có thể nhận thấy, nhiệt độ nóng chảy của hệ RU-CD giảm rõ rệt so với nhiệt độ nóng chảy của RU và cao hơn nhiệt độ nóng chảy của CD. Nếu RU và CD là hỗn hợp cơ học, thì trên giản đồ DSC của hỗn hợp sẽ xuất hiện 2 đỉnh thu nhiệt tại 95,86°C và 161,75°C. Trên giản đồ DSC của hệ nano RU-CD chỉ tồn tại một đỉnh thu nhiệt ở 99,23°C, chứng tỏ các phức chất (hệ nano) đã được tạo thành bởi các liên kết cộng hóa trị và liên kết tương tác Van Der Waals.

4. KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu, khảo sát và phân tích đặc trưng của các mẫu RU, có thể đưa kết luận, đã tổng hợp thành công nano rutin phù hợp với mục tiêu đã đề ra.

Các hạt nano RU có kích thước đồng đều và nằm trong khoảng 30 - 100nm. Hệ nano có thành phần rutin 15%, cyclodextrin 80% và casein 5%.

Điều kiện thích hợp của phản ứng nano hóa là nhiệt độ 80°C, thời gian 3 giờ, tốc độ khuấy 200-300 vòng/phút.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là kết quả của đề tài Khoa học & Công nghệ cấp cơ sở, mã số VHH.2022.09, do Viện Hóa học (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) tài trợ kinh phí.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Sofic E., Copra Janicijevic A, Salihovic M, Tahirovic I, Kroyer G., 2010. Screening of medicinal plant extracts for quercetin-3rutinoside (rutin) in Bosnia and Herzegovina. Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries, Vol.2, Issue 2, P.97-102
- [2]. L. Paniwnyk, et al., 2001. The extraction of rutin from ower buds of *Sophora japonica*. Ultrasonics Sonochemistry 8, 299-301.
- [3]. Evangeline Papageorge, George Lee Mitchell, 1949. The Effect of Oral Administration of Rutin on Blood, Liver and Adrenal Ascorbic Acid and on Liver and Adrenal Cholesterol in Guinea Pigs: One Figur. The Journal of Nutrition, Vol.37, Issue 4, 531-540.
- [4]. Fazlur Rahmana, Shams Tabreza, Rahat Alia, Ali S.Alqahtanib, 2021. Molecular docking analysis of rutin reveals possible inhibition of SARS-CoV-2 vital protein. Journal of Traditional and Complementary Medicine, Vol.1, Issue 2, 173-179
- [5]. Debby M., Yvan V.H., 2020. Cyclodextrin. in Handbook of Analytical Separations, Chapter 9.5.2.2
- [6]. Cornelis G. de K., Thom H., Volker S. U, Andrei V. P., 2012. Casein micelles and their internal structure. Advances in Colloid and Interface Science 171-172 (2012) P.36-52
- [7]. Magdalena P., Mikołaj M., Hanna P., Daria S.P., Kornelia L., 2015. Complex of Rutin with β-Cyclodextrin as Potential Delivery System. Plos One, DOI:10.1371/journal.pone.0120858.

AUTHORS INFORMATION

Vu Duy Hien, Quan Thi Thu Trang, Nguyen Binh Duong

Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology