

Xây dựng phương pháp đánh giá hiệu suất phytosome hóa của andrographolid

Vũ Bình Dương¹, Vũ Tiến Thăng^{1,2}, Nguyễn Hoàng Hiệp¹, Phạm Văn Hiến^{1*}

¹Trung tâm Nghiên cứu, Ứng dụng và Sản xuất thuốc, Học viện Quân y, 158A Phùng Hưng, phường Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

²Bệnh viện Quân y 110, Cục Hậu cần - Kỹ thuật, Quân khu 1, 7 Trần Lưu, phường Vũ Ninh, tỉnh Bắc Ninh, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/12/2025; ngày chuyển phản biện 9/12/2025; ngày nhận phản biện 6/2/2026; ngày chấp nhận đăng 13/2/2026

Tóm tắt:

Mục tiêu: Xây dựng phương pháp đánh giá hiệu suất phytosome hóa sử dụng trong bào chế phytosome chứa andrographolid (AG). **Phương pháp nghiên cứu:** Phytosome andrographolid (AG-P) được bào chế bằng phương pháp bốc hơi dung môi. Sử dụng kỹ thuật hòa tan chọn lọc trong các dung môi khác nhau để loại bỏ AG tự do. Khảo sát loại dung môi và thời gian siêu âm nhằm tối ưu điều kiện hòa tan AG dạng phytosome. Xác nhận cấu trúc phức hợp bằng phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR), phổ cộng hưởng từ proton (¹H-NMR), phổ nhiễu xạ tia X (XRD), phân tích nhiệt vi sai (DSC). **Kết quả:** Benzen được lựa chọn là dung môi hòa tan chọn lọc AG dạng phytosome mà ít hòa tan dạng andrographolid tự do. Thời gian siêu âm phytosome với dung môi chọn lọc là 60 phút. Với điều kiện trên, độ tan của AG dạng phytosome là 1495,18±24,66 µg/ml, cao hơn nhiều lần so với độ tan của AG dạng tự do (19,83±0,07 µg/ml). Các phân tích phổ thực nghiệm xác nhận sự hình thành liên kết giữa AG và phosphatidylcholine trong phytosome thu được. **Kết luận:** Đã xây dựng được phương pháp để đánh giá hiệu suất phytosome hóa trong bào chế AG-P. Phương pháp này đơn giản, dễ thực hiện và có ý nghĩa trong xây dựng công thức và quy trình bào chế các sản phẩm chứa AG-P.

Từ khóa: andrographolid, dung môi chọn lọc, hiệu suất phytosome hóa, phosphatidylcholine, phytosome.

Chỉ số phân loại: 1.4, 2.4, 3.4

Development of a method for evaluating the entrapment efficiency of andrographolide

Binh Duong Vu¹, Tien Thang Vu^{1,2}, Hoang Hiep Nguyen¹, Van Hien Pham^{1*}

¹Drug R&D Centre, Vietnam Military Medical University, 158A Phung Hung Street, Ha Dong Ward, Hanoi, Vietnam

²Military Hospital 110, Department of Logistics and Technical Services, Military Region 1, 7 Tran Luu Street, Vu Ninh Ward, Bac Ninh Province, Vietnam

Received 7 December 2025; revised 6 February 2026; accepted 13 February 2026

Abstract:

Objective: This study aimed to develop a method for evaluating the entrapment efficiency of andrographolide (AG) during the preparation of AG phytosomes (AG-P). **Methods:** AG-P was prepared using the solvent evaporation technique. A selective dissolution technique employing different solvents was used to remove free AG. The effects of solvent type and sonication time were investigated to optimise the dissolution conditions for AG in phytosome form. The formation of the AG-phosphatidylcholine complex was confirmed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR), X-ray diffraction (XRD), and differential scanning calorimetry (DSC). **Results:** Benzene was selected as the selective dissolution solvent for AG in phytosome form while exhibiting minimal solubility for free AG. The optimal sonication time of the phytosome in the selective solvent was 60 minutes. Under these conditions, the solubility of andrographolide in phytosome form was 1495.18±24.66 µg/ml, which was markedly higher than that of free AG (19.83±0.07 µg/ml). FT-IR, ¹H-NMR, XRD and DSC analyses confirmed the formation of a complex between AG and phosphatidylcholine in the obtained phytosome. **Conclusions:** A method for evaluating the entrapment efficiency of AG during the preparation of AG-P was successfully developed. This method is simple, easy to perform, and useful for the formulation development and production of AG-P-based pharmaceutical products.

Keywords: andrographolide, entrapment efficiency, phosphatidylcholine, phytosome, selective solvent.

Classification numbers: 1.4, 2.4, 3.4

*Tác giả liên hệ: Email: phamvanhien181288@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Andrographolid (AG) là diterpenoid chính của cây Xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees). Hoạt chất này có nhiều tác dụng sinh học như chống viêm, kháng virus, chống oxy hóa... [1, 2]. Tuy nhiên, AG có độ tan nước thấp (~46 mg/l), chuyển hóa mạnh và thải trừ nhanh nên sinh khả dụng đường uống thấp [3]. Để cải thiện sinh khả dụng do độ tan và tính thấm kém của dược chất, nhiều giải pháp như tạo hệ phân tán rắn, bào chế dưới dạng liposome, phytosome, vi nhũ tương, tạo hệ vi nhũ hoá, tạo hệ tiểu phân nano lipid rắn, tạo phức với β -cyclodextrin... đã được nghiên cứu [4, 5]. Trong đó, bào chế dưới dạng phytosome được coi là một trong các giải pháp với nhiều ưu điểm như quy trình bào chế đơn giản, tính tương hợp sinh học cao, an toàn, thân thiện môi trường, dễ nâng cấp quy mô [6-8]. Mặc dù vậy, mới chỉ có một số ít công bố về bào chế phytosome andrographolid.

Ngoài ra, trong nghiên cứu bào chế phytosome, hiệu suất phytosome hóa (hay còn gọi là hiệu suất bao nạp thuốc, entrapment efficiency) là thông số quan trọng để đánh giá sự hình thành phức hợp, ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng và hiệu quả sinh học của chế phẩm. Để đánh giá hiệu suất phytosome hoá, nhiều phương pháp đã được công bố như sử dụng màng thẩm tích, siêu ly tâm, siêu lọc hoặc sử dụng dung môi chọn lọc đều dựa vào sự khác biệt về đặc tính vật lý hoặc hóa học của dạng dược chất liên kết với phospholipid trong phytosome và dược chất ở dạng tự do để phân lập chúng ra khỏi hỗn hợp chứa cả hai dạng trên. Trong các phương pháp kể trên, sử dụng dung môi hòa tan chọn lọc được coi là phương pháp đơn giản, dễ áp dụng trong thực tế, đảm bảo tính chính xác và đặc hiệu cao. Hiện nay, chưa có các nghiên cứu về việc sử dụng dung môi hòa tan chọn lọc để đánh giá hiệu suất phytosome hóa trong bào chế phytosome andrographolid. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng phương pháp đánh giá hiệu suất phytosome hóa trong bào chế phytosome chứa andrographolid.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu - thiết bị

Chất chuẩn andrographolid (hàm lượng 97,8%; số kiểm soát (SKS): EC0122007; Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương). Nguyên liệu andrographolid dược dụng (hàm lượng 97%, Trung Quốc), phosphatidylcholine dược dụng (PC, hàm lượng 90%, Trung Quốc), ethanol (EtOH) (hàm lượng 96%, Việt Nam). Các dung môi acetonitril (Daejung, Hàn Quốc), methanol (Merck), nước cất 2 lần (Merck) đạt tiêu chuẩn phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC grade). Các hóa chất, dung môi

khác như benzen, toluen, dichloromethane, chloroform, aceton, acid acetic băng... đạt tiêu chuẩn nhà sản xuất. Thiết bị: Hệ thống HPLC Agilent e2659, đầu dò 2998 (Waters, Mỹ); cột sắc ký Inertsustain C18 (Nhật Bản), bếp khuấy từ gia nhiệt IKA CMAG HS4 (Malaysia); bể siêu âm Elmasonic S100H (Đức); thiết bị siêu âm đầu dò Noise Isolating Chamber 01D882 (Trung Quốc), cốc có mỏ, bình nón, bình cầu 3 cổ, ống nghiệm và các dụng cụ thí nghiệm khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bào chế phytosome andrographolid

Cân chính xác khoảng 1,0 g nguyên liệu andrographolid (AG) và 5,0 g phosphatidylcholine (PC) (tương ứng với tỷ lệ mol AG/PC=1/2) vào bình cầu 3 cổ. Thêm 200 ml EtOH 96%. Hỗn hợp được khuấy trộn liên tục trong 3 giờ ở nhiệt độ 60°C với tốc độ 50 vòng/phút để thực hiện phản ứng tạo phytosome. Sau đó, hỗn hợp được cô bốc hơi dưới áp suất giảm để loại bỏ dung môi và thu lấy phần phytosome rắn. Phytosome sau khi bào chế được bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Phương pháp định lượng AG trong phytosome bằng HPLC

Sử dụng phương pháp HPLC để định lượng AG trong phytosome với các điều kiện sắc ký như sau: Cột InertSustain C18 (4,6x150 mm, 5 μ m); đầu dò PDA bước sóng 223 nm; nhiệt độ cột 25°C; thể tích tiêm 10 μ l; pha động gồm acetonitril (ACN)/acid acetic băng 0,4% (30/70); tốc độ dòng 1,0 ml/phút [9]. Chuẩn gốc được pha trong MeOH. Chuẩn làm việc được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc trong Methanol (MeOH) để đạt các nồng độ trong khoảng 4-50 μ g/ml. Các mẫu thử được chuẩn bị như sau: Cân một lượng dư AG nguyên liệu hoặc mẫu phytosome AG vào các bình nón có nút mài, thêm khoảng 10 ml mỗi loại dung môi khảo sát gồm *n*-hexane, chloroform, diethyl ether, benzen, toluen, aceton, 1,4-dioxan, dichloromethane, ethyl acetate, propan-2-ol. Lắc siêu âm trong 30 phút. Sau đó, lọc qua màng lọc 0,22 μ m thu lấy dịch bão hòa. Hút 1,0 ml dịch lọc, pha loãng bằng MeOH đến nồng độ thích hợp trước khi định lượng HPLC.

2.2.3. Khảo sát dung môi hòa tan chọn lọc

Chuẩn bị các mẫu thử theo phương pháp đã được trình bày ở mục 2.2.2. Sử dụng đường chuẩn đã xây dựng để tính toán độ tan của AG ở dạng tự do và dạng phytosome hóa. Tiêu chí lựa chọn dung môi hòa tan chọn lọc: lựa chọn dung môi có khả năng hòa tan tốt AG dạng phytosome nhưng hòa tan kém AG tự do (hoặc ngược lại).

2.2.4. Khảo sát thời gian siêu âm phức hợp

Cân một lượng dư hỗn hợp phytosome AG-P thô đã bào chế được, thêm dung môi hòa tan chọn lọc đã khảo sát được ở trên để hòa tan phức hợp. Tiến hành siêu âm dịch phức hợp trong các khoảng thời gian lần lượt là: 10, 30, 60, 90 và 120 phút. Tiêu chí lựa chọn: lựa chọn thời gian siêu âm giúp hòa tan tối đa lượng AG liên kết PC trong phức hợp phytosome.

2.2.5. Chứng minh sự hình thành phytosome

Trong phương pháp sử dụng dung môi hòa tan chọn lọc để tách riêng AG ở dạng tự do và AG ở dạng phytosome, việc chứng minh sự hình thành của phytosome trong mẫu là rất quan trọng. Để chứng minh phần tách ra chính xác là AG ở dạng phytosome, chúng tôi tiến hành đánh giá các đặc tính lý hoá, thông qua các phương pháp phân tích phổ thực nghiệm. Cách làm như sau: Cân một lượng phytosome AG-P thô tương ứng 100 mg AG vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 70 ml benzen, siêu âm trong thời gian 60 phút để hòa tan phức hợp. Bổ sung dung môi tới vạch, lắc đều. Hỗn hợp trên sau đó được lọc qua màng 0,22 µm thu lấy dung dịch trong. Phần dịch được cô bốc hơi dung môi dưới áp suất giảm, thu được phytosome AG-P tinh khiết. Mẫu AG-P tinh khiết này được sử dụng để đo các phổ FT-IR, ¹H-NMR, XRD, DSC. Song song với mẫu phytosome AG tinh khiết, các mẫu nguyên liệu AG tự do, mẫu PC tự do và mẫu hỗn hợp vật lý (HHVL) với tỷ lệ AG/PC tương tự như trong mẫu phytosome AG-P được chuẩn bị và đo các phổ kể trên để có cơ sở so sánh.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê trên phần mềm Microsoft Excel 2013 và Origin 2024.

3. Kết quả

3.1. Kết quả xây dựng đường chuẩn định lượng AG trong phytosome

Xây dựng đường chuẩn của AG trong khoảng nồng độ 4-50 µg/ml. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ của AG.

Nồng độ chuẩn (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
3,91	131368
9,78	560508
19,56	1133661
29,34	1698897
39,12	2282046
48,90	2964251
Phương trình hồi quy: $y=61577x-83888$; $R^2=0,9989$	

Kết quả bảng 1 cho thấy, trong khoảng nồng độ khảo sát, có mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ của AG và diện tích pic thu được. Đường hồi quy thu được là đường thẳng $y=61577x-83888$ với hệ số tương quan $R^2=0,9989$. Vì vậy, khoảng nồng độ và đường hồi quy tuyến tính ở trên là phù hợp để định lượng AG trong phytosome.

3.2. Kết quả khảo sát lựa chọn loại dung môi

Khảo sát các loại dung môi để đánh giá khả năng hoà tan chọn lọc của AG dạng tự do và dạng phytosome. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Độ tan và mức tăng độ tan của AG dạng phức hợp so với AG nguyên liệu trong các dung môi khác nhau.

Dung môi	Mẫu	Độ tan AG (µg/ml) (n=3, $\bar{X} \pm SD$)	Tỷ lệ độ tan của AG dạng phức hợp/tự do (lần)
n-hexane	AG tự do	22,03±0,09	1,5
	AG-P	33,11±0,16	
Chloroform	AG tự do	189,56±0,29	6,9
	AG-P	1315,75±7,15	
Diethyl ether	AG tự do	59,33±0,33	22,8
	AG-P	1352,49±1,06	
Benzen	AG tự do	19,83±0,07	52,0
	AG-P	1030,24±8,86	
Toluen	AG tự do	22,07±0,42	45,0
	AG-P	992,93±4,29	
Aceton	AG tự do	4138,33±18,45	3,4
	AG-P	13992,15±28,10	
1,4 - dioxane	AG tự do	2141,87±6,84	1,9
	AG-P	3995,80±26,46	
Dichloromethane	AG tự do	364,79±3,07	6,5
	AG-P	2385,55±7,47	
Ethyl acetate	AG tự do	667,00±2,19	4,3
	AG-P	2856,56±26,86	
Propan-2-ol	AG tự do	4147,05±11,19	2,0
	AG-P	8359,27±23,51	

AG-P là andrographolid dạng phytosome; $p<0,05$.

Kết quả bảng 2 cho thấy, đối với các dung môi như n-hexane, 1,4-dioxan hoặc propan-2-ol, chênh lệch độ tan giữa AG tự do và AG dạng phytosome là không đáng kể, chỉ dao động trong khoảng từ 1,5 đến 2 lần. Điều này cho thấy, các dung môi này không có khả năng hòa tan chọn lọc giữa hai dạng AG tự do và phức hợp, do đó không phù hợp để sử dụng trong phương pháp đánh giá hiệu suất tạo phức. Trong khi đó, các dung môi như chloroform, dichloromethane và ethyl acetate thể hiện mức tăng độ tan ở mức trung bình, nhưng độ tan của AG ở cả hai dạng đều cao, làm giảm khả năng phân tách chính xác phần AG đã tạo phức. Đáng chú ý, ba dung môi gồm diethyl ether, toluen và đặc biệt là benzen cho thấy hiệu quả hòa tan chọn lọc rất rõ rệt, với độ tan AG dạng phytosome cao gấp từ 22,8 đến 52 lần so với AG tự do.

Benzen là dung môi cho kết quả tốt nhất, khi AG dạng phytosome có độ tan đạt khoảng 1030 µg/ml, trong khi AG tự do chỉ đạt khoảng 20 µg/ml. Mức chênh lệch cao này không chỉ giúp tăng độ đặc hiệu khi phân tách AG-phức khỏi hỗn hợp mà còn giảm thiểu nguy cơ sai số do AG tự do còn sót lại. Vì vậy, benzen được lựa chọn là dung môi tối ưu để áp dụng trong toàn bộ các khảo sát tiếp theo.

3.3. Kết quả khảo sát lựa chọn thời gian siêu âm

Khảo sát thời gian siêu âm của hỗn hợp phytosome AG thô sau khi bào chế được với dung môi benzen để phân lập AG dạng phytosome ra khỏi hỗn hợp. Kết quả được trình bày bảng 3.

Bảng 3. Nồng độ bão hòa của AG dạng phytosome so với AG nguyên liệu ở các thời gian siêu âm khác nhau.

Thời gian siêu âm (phút)	Nồng độ AG ($\mu\text{g/ml}$) ($n=3, \bar{X} \pm \text{SD}$)	Tỷ lệ độ tan của AG phức hợp/AG (lần)
<i>Mẫu phytosome AG (dạng phytosome hoá)</i>		
10	587,17 $\pm$ 8,59	29,6
30	1030,24 $\pm$ 8,86	52,0
60	1495,18 $\pm$ 24,66	75,4
90	1279,63 $\pm$ 21,28	64,5
120	1010,06 $\pm$ 14,34	51,0
<i>Mẫu nguyên liệu AG (dạng tự do)</i>		
	19,83 $\pm$ 0,07	-

Kết quả cho thấy, trong giai đoạn từ 10 đến 60 phút, độ tan của AG dạng phytosome tăng dần theo thời gian siêu âm, đạt cực đại ở thời điểm 60 phút với giá trị khoảng 1495 $\mu\text{g/ml}$.

Tuy nhiên, khi tiếp tục kéo dài thời gian siêu âm đến 90 và 120 phút, nồng độ AG trong dung dịch lại có xu hướng giảm xuống còn khoảng 1279 $\mu\text{g/ml}$ và 1010 $\mu\text{g/ml}$ tương ứng. Điều này được lý giải là do sự tác động kéo dài của sóng siêu âm có thể làm phá vỡ một phần cấu trúc liên kết giữa AG và PC trong phức hợp, chuyển AG trong phức hợp sang dạng tự do và kém tan trong benzen.

Như vậy, thời gian siêu âm 60 phút được xác định là tối ưu để đạt hiệu quả hòa tan chọn lọc cao nhất cho AG ở dạng phytosome mà không làm phá vỡ cấu trúc phức hợp.

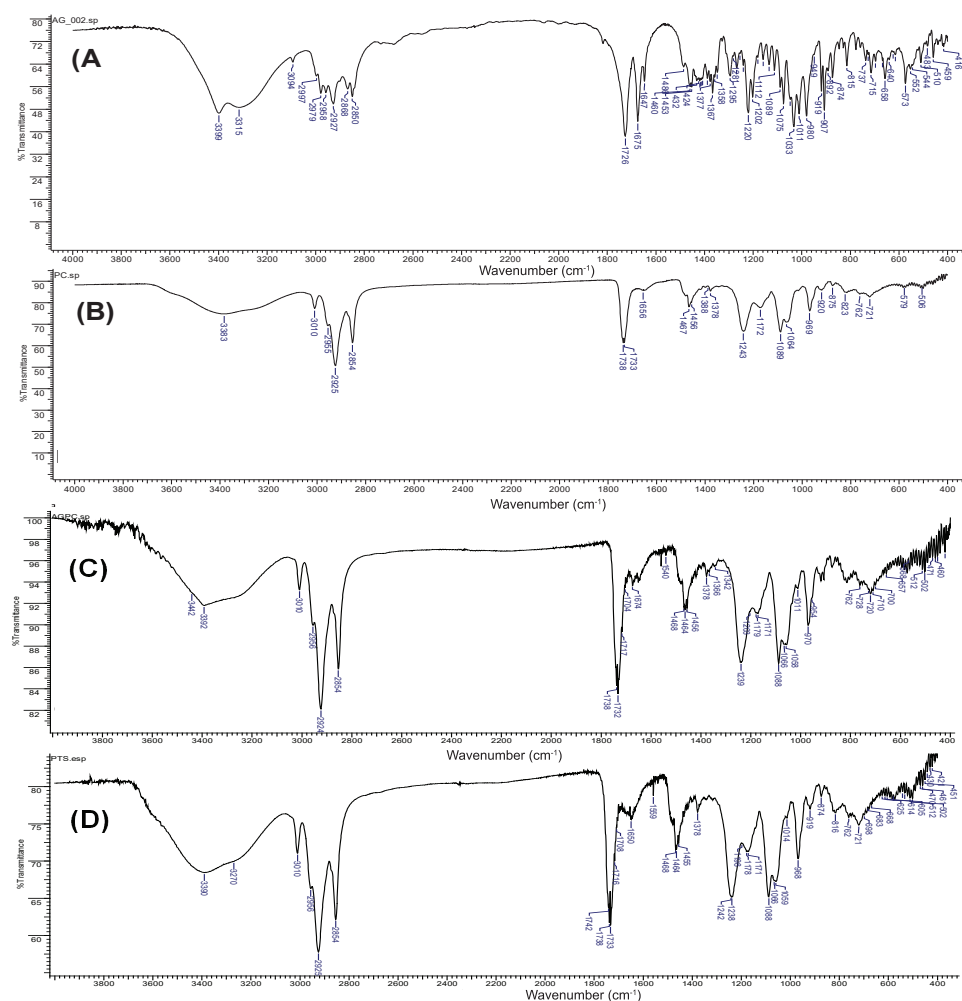
3.4. Kết quả chứng minh sự hình thành phytosome

Sự hình thành phytosome AG-P được chứng minh dựa trên các kết quả phân tích phổ thực nghiệm. Sau khi tách được AG dạng phytosome theo phương pháp sử dụng dung môi benzen để hoà tan bằng siêu âm trong 60 phút, mẫu được loại bỏ dung môi và thực hiện các phân tích phổ thực nghiệm.

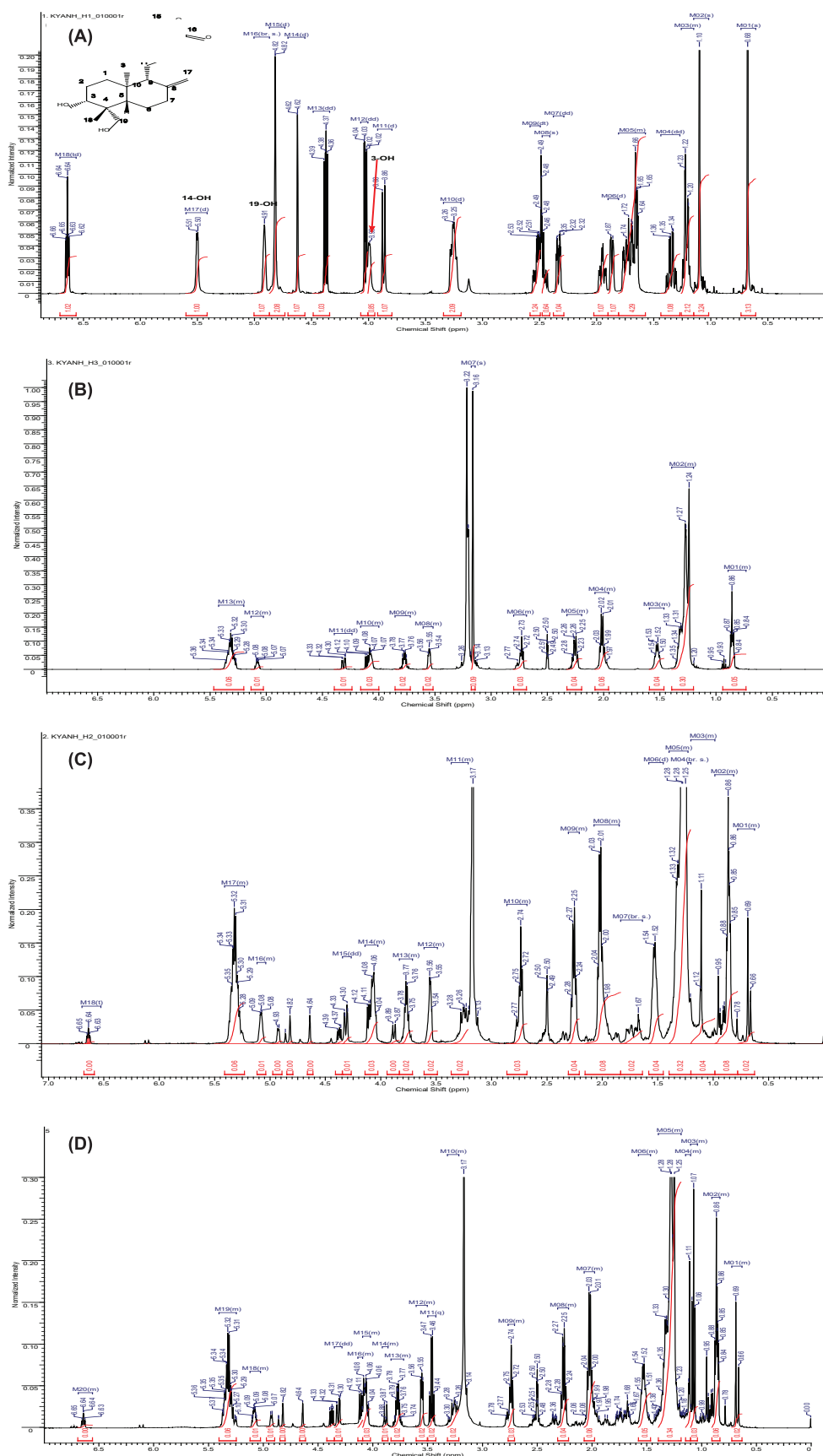
3.4.1. Kết quả phân tích phổ FT-IR

Kết quả phân tích FT-IR của các mẫu AG tự do, PC tự do, hỗn hợp vật lý của AG-PC và phytosome AG được trình bày trong hình 1.

Kết quả hình 1 cho thấy, phổ IR của nguyên liệu AG có các tín hiệu tương ứng với dao động của nhóm -OH tại 3399 cm^{-1} , nhóm C=O tại 1726 cm^{-1} và liên kết đôi C=C tại 1675 cm^{-1} . Phổ IR của nguyên liệu PC xuất hiện các tín hiệu của nhóm PO_2^- tại số sóng 1243 cm^{-1} , của nhóm C=O tại 1738 cm^{-1} và của chuỗi P-O-C tại 1064 cm^{-1} . Phổ IR của hỗn hợp vật lý AG-PC xuất hiện các tín hiệu tương ứng như trên của AG và PC. Phổ IR của AG-P



Hình 1. Phổ FT-IR: (A) AG, (B) PC, (C) HHVL, (D) AG-P.

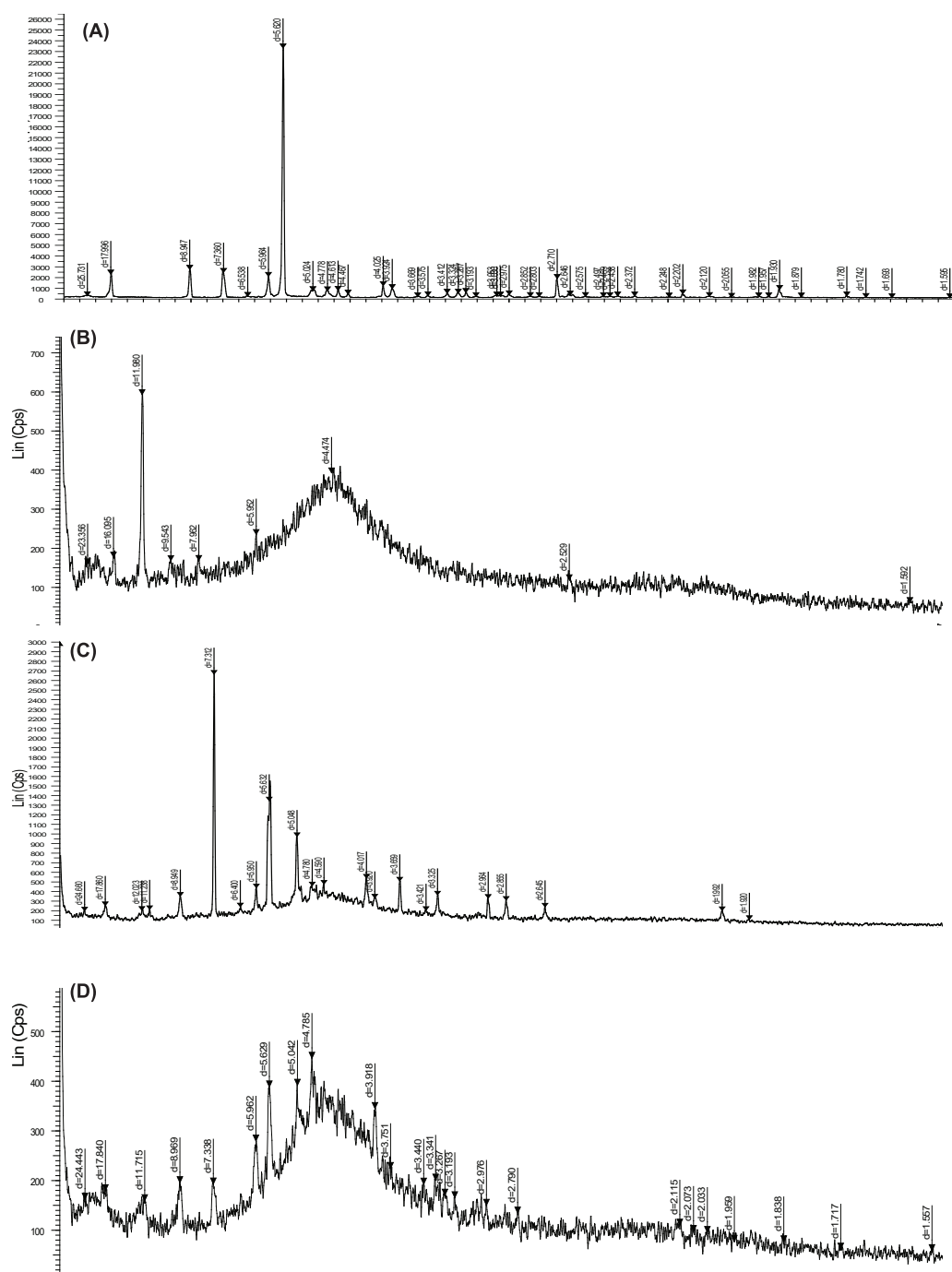


Hình 2. Phổ ¹H-NMR: (A) AG, (B) PC, (C) HHVL, (D) AG-P.

cho thấy, các tín hiệu của nhóm -OH đã có sự dịch chuyển về vị trí 3390 cm⁻¹ với đỉnh tù hơn. Ngoài ra, tín hiệu dao động của PC tại 1243 cm⁻¹ (PO₂), 1738 cm⁻¹ (C=O) và 1064 cm⁻¹ (P-O-C) đã lần lượt bị dịch chuyển về 1242 cm⁻¹ (PO₂), 1742 cm⁻¹ (C=O) và 1059 cm⁻¹ (P-O-C). Như vậy, trên phổ IR của phytosome AG-P đã có sự chuyển dịch số sóng nhóm -OH tự do của dược chất, nhóm C=O và PO₂⁻ của PC so với các thành phần AG và PC tự do. Điều đó cho thấy sự hình thành liên kết mới giữa các nhóm O-H tự do của dược chất và PO₂⁻ của PC. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu đã công bố [10].

3.4.2. Kết quả phân tích phổ ¹H-NMR

Kết quả phân tích phổ ¹H-NMR của các mẫu AG tự do, PC tự do, hỗn hợp vật lý và phytosome AG được trình bày trong hình 2. Trên phổ ¹H-NMR của AG có các proton đặc trưng của nối đôi -CH=CH₂ (δ=6,64 ppm), của nhóm 14-OH (δ=5,51 ppm), của nhóm 19-OH (δ=4,91 ppm) và 3-OH (δ=4,00 ppm). Phổ ¹H-NMR của PC xuất hiện các proton của các liên kết no aliphatic bão hòa -CH₂ và -CH₃ (δ=0,68-2,28 ppm), -N⁺(CH₃)₃ (δ=3,16-4,33 ppm) và chuỗi aliphatic không bão hòa (δ=5,07 - 5,36 ppm). Phổ ¹H-NMR của hỗn hợp vật lý AG-PC vẫn có các tín hiệu của các proton của AG và PC. Trong đó, tín hiệu proton ở δ=5,51 có cường độ thấp, khó quan sát. Các tín hiệu proton của nhóm 19-OH và 3-OH vẫn còn quan sát được với δ=4,93 ppm và δ=4,04 ppm.



Hình 3. Phổ XRD: (A) Andrographolid, (B) Phosphatidylcholine, (C) HHVL, (D) AG-P.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của phức hợp AG-PC ghi nhận sự biến mất của tín hiệu proton nhóm 14-OH ($\delta=5,51$ ppm). Hai tín hiệu proton của các nhóm hydroxy 19-OH và 3-OH bị kéo giãn. Riêng proton nhóm hydroxy 19-OH bị tách ra thành tín hiệu kiểu double và về vị trí $\delta=4,93-4,92$ ppm. Tương tác diễn ra mạnh nhất ở 14-OH ($\delta=5,5$ ppm). Điều này phù hợp về mặt tương tác hóa học trong nghiên

cứu được công bố trước đó [10, 11]. Ngoài ra, ở AG ở dạng phytosome, vẫn xuất hiện các tín hiệu proton aliphatic $-\text{CH}_2$ và $-\text{CH}_3$ của nhóm cholin trong phân tử PC, chứng tỏ phần đuôi của PC không tham gia liên kết tạo phức. Các kết quả trên cho thấy có sự hình thành liên kết giữa phân tử AG và PC trong phytosome AG-P.

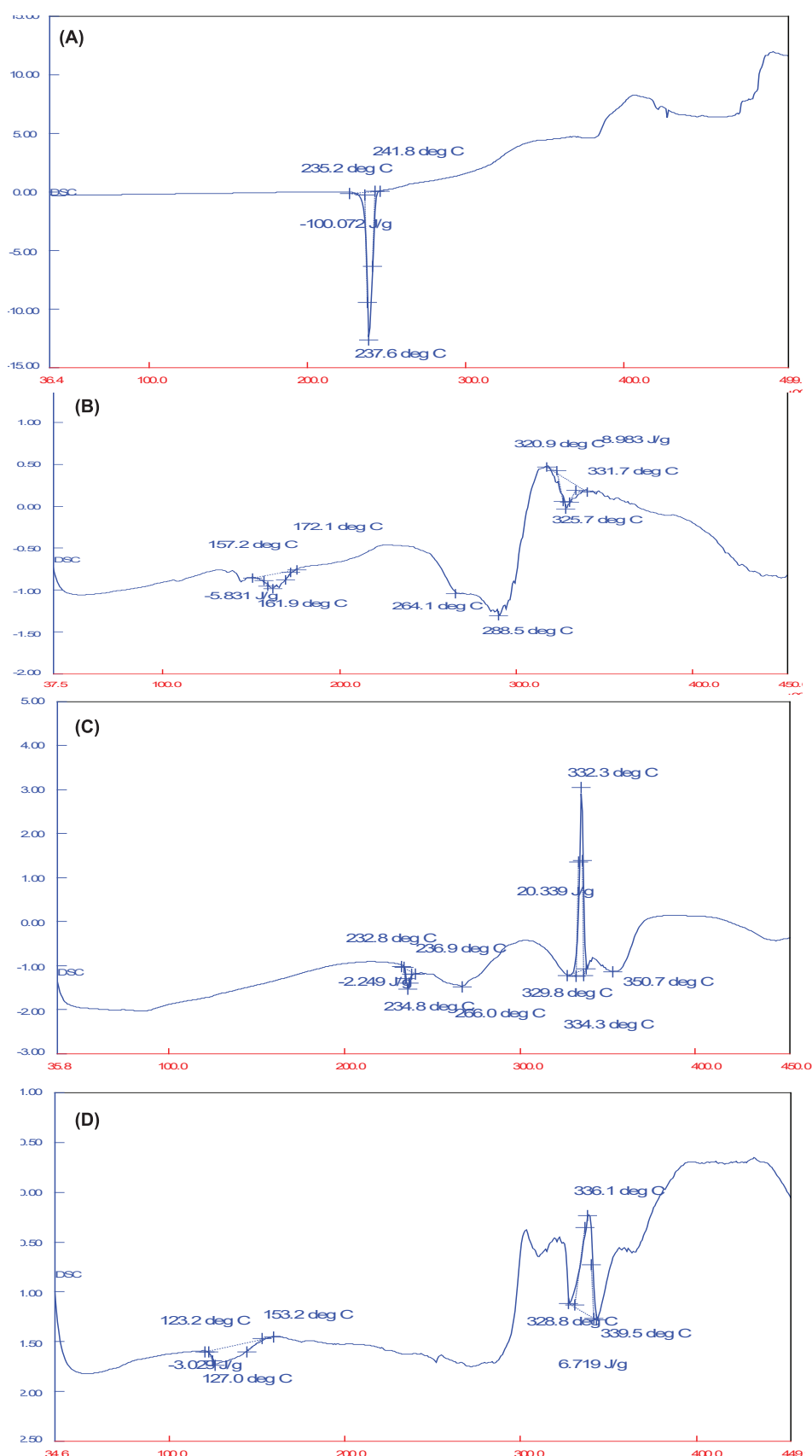
3.4.3. Kết quả phân tích phổ nhiễu xạ tia X

Kết quả phân tích XRD của các mẫu AG tự do, PC tự do, hỗn hợp vật lý của AG-PC và phytosome AG-P được trình bày trong hình 3. Phổ XRD của AG xuất hiện các đỉnh với 2θ tại 17,996; 8,947; 7,360; 5,964; 5,620; 2,710 chứng tỏ bản chất tinh thể của AG. Mẫu PC xuất hiện các đỉnh nhiễu xạ tại 23,356; 16,095; 11,980; 9,543; 7,962. Mẫu hỗn hợp vật lý AG-PC vẫn xuất hiện đỉnh nhiễu xạ tương ứng như trong phổ XRD của AG và PC. Trong khi đó, trên phổ đồ của phytosome AG-P không còn những đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của AG và PC, thay vào đó

là những đỉnh nhiễu xạ mới có đỉnh tù hơn. Điều này có thể là do AG trong mẫu phytosome AG-P đã chuyển sang trạng thái vô định hình.

3.4.4. Kết quả phân tích phổ DSC

Kết quả phân tích phổ DSC của các mẫu AG tự do, PC tự do, hỗn hợp vật lý của AG-PC và phytosome AG-P được trình bày trong hình 4.



Hình 4. Kết quả phân tích DSC: (A) AG, (B) PC, (C) HHVL, (D) AG-P.

Giản đồ nhiệt của AG xuất hiện pic thu nhiệt ở khoảng 237,6°C. Với mẫu nguyên liệu PC có 3 pic thu nhiệt ở khoảng 261,9°C; 264,1°C và 325,7°C. Giản đồ nhiệt của hỗn hợp vật lý AG-PC xuất hiện các pic tương ứng của AG và PC nhưng có sự dịch chuyển nhẹ với các pic thu nhiệt ở các vị trí 234,8°C; 266,2°C; 329,8°C. Trên giản đồ nhiệt của AG-P, các pic thu nhiệt của AG đã biến mất, thay vào đó, nhiệt độ chuyển pha giảm xuống còn 127,0°C. Điều này có thể giải thích do AG từ dạng tinh thể đã chuyển sang dạng vô định hình trong phức hợp.

4. Bàn luận

4.1. Xây dựng phương pháp đánh giá hiệu suất phytosome hoá bằng sử dụng dung môi hòa tan chọn lọc

Hiệu suất phytosome hoá (EE) là một chỉ tiêu chất lượng giúp đánh giá hiệu quả tạo phức hợp của hợp chất tự nhiên - phospholipid. Đây là thước đo quan trọng quyết định đến hiệu suất bào chế phytosome, do vậy cần xây dựng một phương pháp đánh giá chỉ tiêu này với tính chính xác cao, đơn giản, dễ thực hiện và có tính chọn lọc.

Có nhiều phương pháp đánh giá hiệu suất phytosome hoá đã được công bố như sử dụng siêu ly tâm, màng siêu lọc, màng thẩm tích hoặc sử dụng dung môi hoà tan chọn lọc. Mỗi phương pháp đều có các ưu, nhược điểm riêng. Phương pháp siêu ly tâm, màng siêu lọc, màng thẩm tích đều yêu cầu thiết bị/vật liệu tiên tiến, chi phí cao. Phương pháp siêu ly tâm có ưu điểm là thời gian thực hiện nhanh, khối lượng mẫu nhỏ nhưng có nhược điểm là độ nhớt

của mẫu ảnh hưởng đến tốc độ lắng của tiểu phân, khi ly tâm tốc độ cao có thể phá vỡ liên kết giữa phân tử dược chất và phospholipid, làm xuất hiện sai số trong đánh giá. Khi sử dụng màng siêu lọc và màng thẩm tích, nhược điểm lớn nhất là sự không đồng nhất về kích thước tiểu phân phytosome sau quá trình bào chế. Các tiểu phân có kích thước lớn khi đi qua lỗ lọc sẽ bị giữ lại, do đó ngăn cản sự di chuyển tiếp theo của các tiểu phân khác và sự khuếch tán dung môi. Vì vậy, việc đánh giá sẽ gặp sai số hệ thống.

Phương pháp sử dụng dung môi hòa tan chọn lọc dựa vào khác biệt về độ tan của hoạt chất ở trạng thái tự do và ở dạng phytosome trong dung môi để phân lập riêng rẽ hai dạng này khỏi hỗn hợp sau khi bào chế. Phương pháp này đơn giản, dễ thực hiện và ít sai số, do ảnh hưởng của kích thước tiểu phân hoặc độ nhớt của hệ phân tán, nhưng có nhược điểm là khó tìm được loại dung môi có tính hoà tan chọn lọc. Việc định hướng lựa chọn loại dung môi rất khó khăn do các đặc tính về lý hoá của phytosome bào chế được chưa được khẳng định. Do đó, trong quá trình thực hiện, cần phải khảo sát rất nhiều loại dung môi [11, 12].

Chúng tôi nhận định rằng, AG ở dạng tự do và ở dạng phytosome có tính chất lý hoá không tương đồng. Phytosome AG-PC được tạo ra do phản ứng tạo phức giữa dược chất và phospholipid. Bản chất của sự tạo phức này là nhờ liên kết giữa AG và PC, do đó sẽ làm thay đổi tính chất lý hoá của dược chất so với dạng tự do. Do đó, độ tan của AG ở dạng tự do và dạng phức hợp với PC trong phytosome là khác nhau đối với cùng một dung môi [11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá độ tan của AG ở dạng tự do và ở dạng phytosome với các dung môi khác nhau. Kết quả đã lựa chọn được dung môi benzen là dung môi phù hợp do khả năng hòa tan AG ở dạng phytosome lớn hơn nhiều lần so với dạng tự do. Benzen đảm bảo yếu tố hòa tan chọn lọc của phương pháp. Benzen hòa tan kém AG nguyên liệu ($19,83 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$) nhưng hòa tan tốt AG trong phức hợp ($1030,24 \pm 8,86 \mu\text{g/ml}$).

Về mặt lý hoá, có thể giải thích rằng, phân tử AG tự do có chứa nhiều nhóm -OH và lacton là các nhóm phân cực, có thể tạo ra các liên kết hydro nội phân tử. Điều này lý giải sự kém tan của AG tự do trong benzen. Sau khi tạo phức phytosome giữa AG và PC, theo thực nghiệm phân tích phổ IR, $^1\text{H-NMR}$ chúng tôi đã chứng minh ở trên, liên kết hydro được hình thành chủ yếu giữa nhóm -OH của AG với hợp phần phosphat của PC, đồng thời

chuỗi hydrocarbon dài của PC không tham gia vào liên kết, nên bao quanh hoạt chất và tạo bề mặt kỵ nước. Điều này giúp phytosome AG dễ tan trong benzen hơn AG tự do. Kết quả này tương tự với các nghiên cứu khác về bào chế phytosome [13]. Ngoài ra, AG tự do thường tồn tại ở dạng tinh thể, kém tan trong nhiều dung môi. Việc chuyển sang dạng vô định hình của AG trong phytosome AG-PC đã được chứng minh dựa trên phân tích phổ XRD và DSC trong nghiên cứu này cũng là một nguyên nhân để giúp tăng độ tan của AG trong các dung môi.

Để tạo thuận lợi cho quá trình hoà tan của AG dạng phytosome trong benzen, giúp hạn chế sai số, tăng độ chính xác cho phép đo, chúng tôi sử dụng siêu âm để hoà tan mẫu. H. Hashemzadeh và cs (2023) [14] đã chỉ ra rằng, sự hình thành phức hợp bền vững chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như: những tương tác phân tử giữa hoạt chất và phospholipid, độ linh hoạt trong cấu trúc hoạt chất, lực Van der Waals, khoảng cách giữa các phân tử hoạt chất và PC trước khi phản ứng. Vì vậy, trong phức hợp sẽ tồn tại cả liên kết hydro bền và lỏng lẻo tùy thuộc vào những yếu tố trên. Khi chịu tác động trong thời gian dài của sóng siêu âm, các liên kết yếu hơn trong phức sẽ đứt gãy trước, làm cho các hoạt chất rò rỉ ra ngoài, dẫn tới sai số trong đánh giá hiệu suất phytosome hoá. Trong nghiên cứu này, thời gian siêu âm để hoà tan mẫu phytosome AG-P được khảo sát và cho thấy, 60 phút là thời gian siêu âm phù hợp với khả năng hoà tan AG dạng phytosome tốt và hạn chế phá vỡ cấu trúc của phytosome.

Việc sử dụng dung môi hoà tan chọn lọc để đánh giá hiệu suất phytosome hoá trong bào chế phytosome AG là phương pháp dễ thực hiện và cho độ tin cậy tương đối tốt. Tuy nhiên, điểm hạn chế trong nghiên cứu này là sử dụng dung môi benzen không thân thiện môi trường và có độc tính cao, tiềm ẩn nguy cơ ảnh hưởng tới sức khoẻ và môi trường. Mặc dù đã khảo sát nhiều loại dung môi, nhưng nghiên cứu của chúng tôi chưa tìm ra được các dung môi thân thiện khác. Trong tương lai, cần thực hiện thêm các khảo sát về nhiều loại dung môi khác, có tính chất tương tự benzen (ví dụ như CO_2 siêu tới hạn) để hạn chế các nhược điểm này.

4.2. Chứng minh sự hình thành phytosome andrographolid

Để tăng tính thuyết phục cho việc sử dụng benzen là dung môi hoà tan chọn lọc, nhằm tách riêng phần AG liên kết với PC trong phytosome và AG ở dạng tự do trong hỗn hợp sau khi bào chế, nghiên cứu này thực hiện tinh

chế thu lấy phytosome tinh khiết để kiểm tra các tính chất vật lý và khẳng định cấu trúc liên kết của AG với PC trong phytosome bằng các phân tích phổ. Các mẫu đo được thực hiện song song với các loại mẫu AG, PC, hỗn hợp vật lý AG-PC và phytosome AG-P. Các kết quả về phân tích phổ IR, ¹H-NMR, XRD, DSC đều cho thấy, có sự khác biệt về các tín hiệu của mẫu AG tự do và mẫu phytosome AG-P tinh khiết. Điều này cho thấy, sử dụng benzen có thể tách được AG ở dạng phytosome ra khỏi hỗn hợp nhiều thành phần sau khi thực hiện phản ứng tạo phức.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp đánh giá hiệu suất phytosome hóa trong bào chế phytosome andrographolid bằng phương pháp sử dụng dung môi hòa tan chọn lọc. Benzen được xác định là loại dung môi phù hợp nhờ khả năng hòa tan chọn lọc andrographolid dạng liên kết với phosphatidylcholine trong phytosome mà không hòa tan AG dạng tự do. Thời gian siêu âm 60 phút cho hiệu quả hòa tan AG dạng phytosome tốt nhất, mà ít gây phá vỡ cấu trúc của phytosome. Kết quả phân tích phổ FT-IR, ¹H-NMR, XRD và DSC đã khẳng định sự hình thành của phức AG-PC và loại trừ sự hiện diện của AG tự do trong mẫu sau khi xử lý bằng phương pháp đề xuất. Phương pháp này đơn giản, dễ thực hiện, đảm bảo tính đặc hiệu và chính xác cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Y. Dai, Y. Wang, H. Dong, et al. (2019), "Overview of pharmacological activities of *Andrographis paniculata* and its major compound andrographolide", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **59**(Sup.1), pp.s17-s29, DOI: 10.1080/10408398.2018.1501657.

[2] S. Gupta, K.P. Mishra, L. Ganju (2017), "Broad-spectrum antiviral properties of andrographolide", *Arch. Virol.*, **162**(3), pp.611-623, DOI: 10.1007/s00705-016-3166-3.

[3] S.P. Adiguna, J.A. Panggabean, A. Atikana, et al. (2021), "Antiviral activities of andrographolide and its derivatives: Mechanism of action and delivery system", *Pharmaceuticals*, **14**(11), DOI: 10.3390/ph14111102.

[4] P. Khadka, J. Ro, H. Kim, et al. (2014), "Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability", *Asian J. Pharm. Sci.*, **9**(6), pp.304-316, DOI: 10.1016/j.ajps.2014.05.005.

[5] X. Zhang, H. Xing, Y. Zhao, et al. (2018), "Pharmaceutical dispersion techniques for dissolution and bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs", *Pharmaceutics*, **10**(3), DOI: 10.3390/pharmaceutics10030074.

[6] A. Raghav, M. Attri, H. Chaudhary (2025), "Review of phytosomes and ethosomes: Groundbreaking approaches for delivering the phytochemical components of plants", *Curr. Drug Deliv.*, **22**(6), pp.666-677, DOI: 10.2174/0115672018282264240218034853.

[7] A.R. Gaikwad, K.D. Ahire, A.A. Gosavi, et al. (2021), "Phytosome as a novel drug delivery system for bioavailability enhancement of phytoconstituents and its applications: A review", *J. Drug Deliv. Ther.*, **11**(3), pp.138-152, DOI: 10.22270/jddt.v11i3.4847.

[8] A. Pawar, S. Rajalakshmi, P. Mehta, et al. (2016), "Strategies for formulation development of andrographolide", *RSC Adv.*, **6**(73), pp.69282-69300, DOI: 10.1039/C6RA12161F.

[9] V.H. Pham, T.D. Nguyen, H.H. Nguyen, et al. (2023), "Development and validation of a high performance liquid chromatography method for the quantification of andrographolide in polymeric nanosystem", *Journal of Military Pharmaco-Medicine*, **48**, pp.116-128, DOI: 10.56535/jmpm.v48.462 (in Vietnamese).

[10] A. Mourya, A. Pathak, S. Verma, et al. (2023), "Computational and experimental therapeutic efficacy analysis of andrographolide phospholipid complex self-assembled nanoparticles against Neuro2a cells", *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1867**(2), DOI: 10.1016/j.bbagen.2022.130283.

[11] C. Chi, C. Zhang, Y. Liu, et al. (2020), "Phytosome-nanosuspensions for silybin-phospholipid complex with increased bioavailability and hepatoprotection efficacy", *Eur. J. Pharm. Sci.*, **144**, DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105212.

[12] L. Liu, J. Nie, L. Li (2023), "Phospholipid complexation for bioavailability improvement of albendazole: Preparation, characterization and *in vivo* evaluation", *AAPS PharmSciTech*, **24**(1), DOI: 10.1208/s12249-022-02497-1.

[13] R.G. Shriram, A. Moin, H.F. Alotaibi, et al. (2022), "Phytosomes as a plausible nano-delivery system for enhanced oral bioavailability and improved hepatoprotective activity of silymarin", *Pharmaceutics*, **15**, DOI: 10.3390/ph15070790.

[14] H. Hashemzadeh, M.Y.H. Bojd, M. Iranshahy, et al. (2023), "The combination of polyphenols and phospholipids as an efficient platform for delivery of natural products", *Sci. Rep.*, **13**(1), DOI: 10.1038/s41598-023-29237-0.