

Chế tạo nano berberin và đánh giá khả năng kháng nấm *Candida albicans*

Nguyễn Hữu Tuyền^{1*}, Phan Thị Kim Ngân¹, Mai Ngọc Tuấn Anh¹, Hoàng Thùy Dương¹, Lâm Hoàng Anh Thư¹,
Phạm Tiến Dũng¹, Phạm Thanh Hồng², Ngô Võ Kế Thành¹

¹Trung tâm Nghiên cứu triển khai, Khu Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Văn Lang

Ngày nhận bài 2/3/2020; ngày chuyển phản biện 5/3/2020; ngày nhận phản biện 3/4/2020; ngày chấp nhận đăng 20/4/2020

Tóm tắt:

Berberin là một alkaloid thực vật có tác dụng kháng khuẩn, kháng viêm, kháng ung thư, hạ đường huyết... Tuy nhiên, việc ứng dụng berberin trong dược phẩm vẫn còn hạn chế do ít tan trong nước và sinh khả dụng thấp. Trong nghiên cứu này, nhằm cải thiện sinh khả dụng và tăng tiềm năng ứng dụng của berberin trong dược phẩm; nano berberin được tạo ra bằng phương pháp nghiền quay với sự hỗ trợ của bi Zirconium. Tính chất hạt nano berberin tạo ra được khảo sát bằng phương pháp chụp FE-SEEM, TEM, DLS và XRD. Hoạt tính kháng nấm *Candida albicans* được đánh giá trong điều kiện invitro. Kết quả cho thấy, nano berberin được tạo ra với kích thước hạt trung bình khoảng 60 nm sau 120 giờ nghiền quay và nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) ghi nhận đối với nấm *Candida albicans* là 1024 µg/ml.

Từ khóa: berberin, *Candida albicans*, kháng sinh thực vật, phương pháp nghiền quay.

Chỉ số phân loại: 3.4

Fabrication of berberine nanoparticles and evaluation of antifungal activity on *Candida albicans*

Huu Tuyen Nguyen^{1*}, Thi Kim Ngan Phan¹, Ngoc Tuan Anh Mai¹, Thuy Duong Hoang¹,
Hoang Anh Thu Lam¹, Tien Dung Pham¹, Thanh Hong Pham², Vo Ke Thanh Ngo¹

¹Saigon Hi-Tech Park Research Laboratories

²Van Lang University

Received 2 March 2020; accepted 20 April 2020

Abstract:

Berberine is a plant alkaloid with antibacterial, anti-inflammatory, anti-cancer, and hypolipidemic activities, etc. However, the application of berberine in pharmaceuticals has still limited due to its less solubility in water and poor bioavailability. In this study, to improve the bioavailability and increase the potential application of berberine in medicine, berberine nanoparticles were fabricated by roll milling method with the support of zirconium balls. The characterisation of berberine nanoparticles was evaluated by Field-Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS) and X-ray Diffraction (XRD). The anti-*Candida albicans* activity was tested in-vitro. The results showed that the average particle size of berberine nanoparticles was about 60 nm after 120 hours roll milling and the minimal inhibitory concentration on *Candida albicans* was 1024 µg/ml.

Keywords: berberine, *Candida albicans*, plant antibiotics, roll milling method.

Classification number: 3.4

Đặt vấn đề

Ngày nay, bên cạnh việc nghiên cứu sử dụng các dược chất có nguồn gốc hóa tổng hợp thì việc nghiên cứu sử dụng các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên ngày càng được

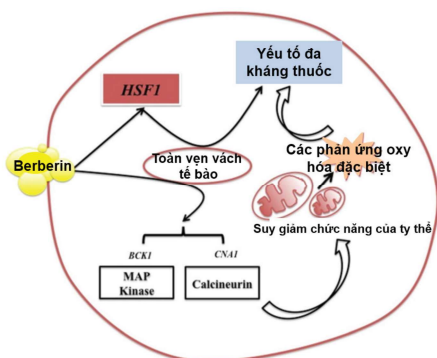
các nhà khoa học quan tâm. Berberin là một alkaloid thuộc nhóm isoquinoline có thể được chiết xuất dễ dàng từ thực vật hay tổng hợp hóa học. Trong tự nhiên, berberin được chiết xuất từ các loại cây thuộc chi *Berberis*, *Hydrastis canadensis*,

*Tác giả liên hệ: Email: tuyen.nguyenhuu@shiplabs.org

Coptis với hàm lượng khoảng 1,5-3% [1]. Berberin đã được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền, thường được dùng nhiều để trị các bệnh đường ruột, bệnh gan mật, bệnh ngoài da... Berberin đã thu hút được sự chú ý trong những năm gần đây do có tác dụng dược lý như chống ung thư, kháng virus, kháng khuẩn và chống viêm [2, 3]. Mặc dù có nhiều ưu điểm nhưng berberin bị hạn chế trong sử dụng lâm sàng do ít tan trong nước, khó hấp thu qua ruột và đặc biệt tính sinh khả dụng rất thấp (chỉ khoảng 5%) [4]. Hướng nghiên cứu bào chế berberin thành dạng kích thước nano có thể cải thiện độ tan, tốc độ hòa tan, từ đó nâng cao sinh khả dụng là hướng đi được quan tâm nghiên cứu hiện nay.

Trong dược liệu, có 2 phương pháp chính để tạo hạt nano thuốc: phương pháp từ dưới lên (bottom-up) và phương pháp từ trên xuống (top-down). Phương pháp bottom-up ít được sử dụng vì cần phải hòa tan dược liệu trong dung môi hữu cơ và khó phân bố được ở kích thước hẹp. Phương pháp top-down được sử dụng phổ biến hơn với các kỹ thuật như nghiền bi, đồng nhất hóa, đồng nhất hóa áp suất cao. Trong đó, kỹ thuật nghiền bi có nhiều ưu điểm như nghiền được hạt có kích thước tiểu phân bé, duy trì trạng thái vô khuẩn của nguyên liệu [5]. Đã có nhiều nghiên cứu chế tạo nano berberin với nhiều phương pháp khác nhau như: gắn berberin trên nano polymer, trên silica từ tính, trên lipid, gắn vào các dendrimer, graphene hay trên các nano vàng, nano bạc... [3] nhằm giúp tăng khả năng phân tán của chúng, tạo điều kiện cho cơ thể hấp thụ tốt hoạt chất berberin để phát huy hết tác dụng dược lý của chúng.

Candida albicans là mầm bệnh nấm cơ hội, đặc biệt quan sát thấy ở bệnh nhân suy giảm miễn dịch. *Candida albicans* chiếm 50-70% các trường hợp nhiễm nấm candida xâm lấn trong phần lớn các cơ sở lâm sàng [6]. Đối với *Candida albicans*, berberin tác động và làm suy giảm chức năng của ty thể, tạo các phản ứng oxy hóa đặc biệt, ảnh hưởng đến con đường toàn vẹn vách tế bào và các yếu tố phiên mã sức nhiệt HSF1 [7, 8], từ đó ức chế và tiêu diệt nấm (hình 1).



Hình 1. Các con đường tác động của berberin đến *Candida albicans* [8].

Đã có nhiều nghiên cứu được công bố với tiềm năng lớn của berberin trong việc kiểm soát và điều trị bệnh viêm nhiễm do *Candida albicans* gây ra [6, 7, 9]. Trên cơ sở đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm tạo sản phẩm berberin ở kích thước nano và đánh giá hiệu quả ức chế nấm *Candida albicans*, kết quả của nghiên cứu là tiền đề cho quá trình tạo các sản phẩm thương mại ứng dụng trong phòng và điều trị bệnh do nấm *Candida albicans* gây ra.

Đối tượng và phương pháp

Vật liệu

Nấm *Candida albicans* - thu nhận từ mẫu bệnh phẩm được cung cấp bởi Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh. Môi trường sử dụng nuôi cấy chủng nấm - Sabouraud: D-glucose 40 g, peptone 10 g, agar 20 g, nước cất vừa đủ 1 lít. Chính về pH 6,2.

Berberin 95% chuẩn dược phẩm được cung cấp bởi Công ty Cổ phần dược phẩm Vĩnh Kim - số 186 Định Công Hạ (Định Công, Hoàng Mai, Hà Nội).

Bi Zirconium: kích thước hạt 0,4-0,6 mm, 95% ZrO_2 , 5% Y_2O_3 . Độ cứng 1000 Hv. Tỷ lệ hạt cầu 95%.

Phương pháp chế tạo nano berberin

Nano berberin được chế tạo bằng phương pháp nghiền quay với bi Zirconium. Chuẩn bị hỗn dịch với 2,4 g berberine; 0,6 g tween 80; 3 g etanol tuyệt đối và nước cất vô trùng vừa đủ 60 g tổng khối lượng. Cho tiếp 120 g bi Zirconium vào lọ và đặt trên máy quay trục lăn ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 120 giờ. Mẫu được lọc loại bi và thu được hỗn dịch chứa berberin ở kích thước nano. Thu nhận nano berberin dạng bột bằng cách đông khô trong 48 giờ ở $-55^{\circ}C$ trong điều kiện chân không.

Phương pháp phân tích mẫu nano berberin

Các mẫu nano berberin được phân tích bằng phương pháp chụp ảnh FE-SEM (Hitachi S-4800, Nhật Bản) và TEM (JEM-1400, Nhật Bản): thực hiện bằng cách nhỏ giọt mẫu lưới đồng đường kính 3 mm, để khô ở nhiệt độ phòng và tiến hành phân tích ở điện thế 10 kV với FE-SEM và 100 kV với TEM.

Phương pháp DLS (Horiba SZ-100, Nhật Bản): trong phương pháp này, mẫu được pha loãng trong dung môi là nước và tiến hành phân tích ở góc 90° .

Mẫu bột nano berberin sau khi đông khô được phân tích XRD (Bruker D8-Advance, Đức) ở góc quét từ 4-40°.

Phương pháp xác định hàm lượng berberin trong mẫu nano berberin

Dựng đường chuẩn berberin: cân 10 mg bột nguyên liệu berberin (chuẩn HPLC - Sigma) hòa tan hoàn toàn trong 10 ml metanol. Từ dung dịch trên tiến hành pha loãng ra các nồng độ ở 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml và 0,025 mg/ml. Đo độ hấp thụ của dung dịch chuẩn tại bước sóng cực đại 430 nm với mẫu trắng là metanol, sử dụng cuvet thạch anh với độ dày 1 cm.

Đo nồng độ berberin trong mẫu nano berberin: hòa tan hoàn toàn lượng bột nano berberin sau đông khô trong 10 ml metanol. Lấy 1 ml dung dịch trên pha loãng trong 19 ml metanol (pha loãng 20 lần). Tiến hành đo độ hấp thụ của dung dịch nano berberin tương tự như dung dịch chuẩn.

Tính toán nồng độ berberin trong mẫu nano berberin sau khi đông khô:

$$C_{nano} = C_{mẫu đo} \times a$$

Trong đó: C_{nano} là nồng độ berberin trong mẫu nano berberin sau đông khô (mg/ml); $C_{mẫu đo}$ là nồng độ berberin trong mẫu đo tính được từ phương trình đường chuẩn berberin HPLC; a là hệ số pha loãng trong quá trình đo (a=20).

Tính toán hiệu suất thu nhận berberin từ mẫu nano berberin:

$$H = \frac{C_{nano}}{C_{nguyên liệu}} \times 100\%$$

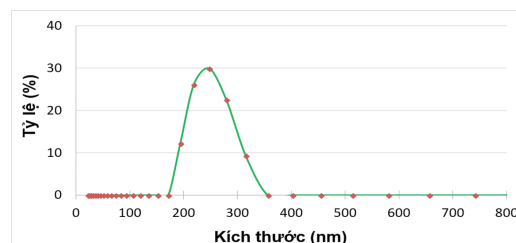
Trong đó: $C_{nguyên liệu}$ là nồng độ berberin ban đầu trước khi nghiền quay.

Phương pháp đánh giá khả năng kháng nấm *Candida albicans*

Khả năng kháng nấm *Candida albicans* của dung dịch nano berberin được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Chủng nấm bệnh được trải đều trên đĩa Sabouraud với nồng độ 10^6 cfu/ml. Dùng ống đục vô trùng (đường kính 5 mm) đục tạo các giếng trên đĩa (5 giếng/đĩa). Hút 100 μ l dịch nano berberin ở các nồng độ 512 μ g/ml, 1024 μ g/ml, 2048 μ g/ml, 4096 μ g/ml và 8192 μ g/ml cho vào giếng với đối chứng âm là nước cất vô trùng và đối chứng dương là nystatin 200 μ g/ml.

Kết quả và thảo luận

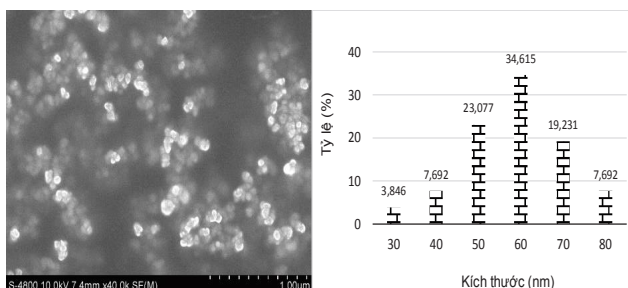
Chế tạo nano berberin



Hình 2. Kết quả DLS của mẫu nano berberin.

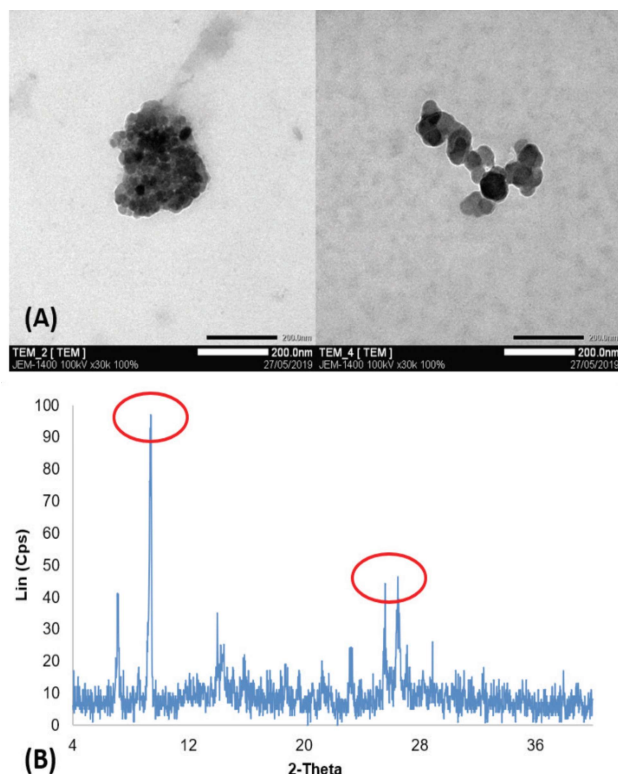
Kết quả DLS cho thấy ở nồng độ 4% berberin, quá trình va chạm với bi Zirconium tạo ra các hạt chủ yếu phân bố trong khoảng 180-300 nm (hình 2). Tiếp tục phân tích mẫu bằng phương pháp chụp FE-SEEM cho thấy kích thước hạt nano chủ yếu trong khoảng 50-70 nm (hình 3). Kích thước hạt nano berberin được ghi nhận trong phân tích DLS và FE-SEEM có sự khác biệt. Lý giải cho việc này là do phương pháp DLS thực hiện đo trong dung dịch và các hạt có kích thước khoảng 60 nm kết tụ lại với nhau tạo thành khối với kích thước khoảng 300 nm. Trong khi đó ở phương pháp FE-SEM, mẫu được sấy khô nên có thể quan sát được các hạt nano nhỏ trong khối kết tụ và có thể quan sát được các hạt nano rời.

Kết quả cho thấy, đã chế tạo thành công mẫu nano berberin với hàm lượng berberin ban đầu là 4%. So với một số nghiên cứu khác, phương pháp nghiền quay trong nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy hiệu quả tốt hơn trong quá trình tạo hạt berberin kích thước nano. Năm 2018, Sahibzada và cộng sự đã bào chế nano berberin bằng 2 phương pháp kết tủa bay hơi dung môi (EPN) và kết tủa bằng thay đổi dung môi (APSP). Kết quả cho thấy hạt nano berberin có kích thước tiểu phân là 71,53 và 102,62 nm (lần lượt đối với phương pháp EPN và APSP) [10]. Năm 2015, Wang và cộng sự sử dụng phương pháp đồng nhất hóa áp suất cao đã tạo được hạt nano berberin với kích thước trung bình khoảng 72,4 nm [11].



Hình 3. Kết quả FE-SEEM và đồ thị sự phân bố kích thước hạt của mẫu nano berberin.

Tiếp tục phân tích ảnh TEM (hình 4A), một lần nữa khẳng định kích thước hạt nano berberin ghi nhận trong phân tích DLS lớn là do chúng kết tụ lại với nhau. Kết quả đo XRD của mẫu (hình 4B) cho thấy xuất hiện peak có cường độ mạnh trong khoảng $9,5^\circ$ và các peak có cường độ yếu hơn trong khoảng $25,5^\circ$ và $26,5^\circ$. Kết quả này cho thấy mẫu nano berberin có cấu trúc tinh thể, điều này cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Sahibzada và cộng sự [10]; Zou và cộng sự [12].



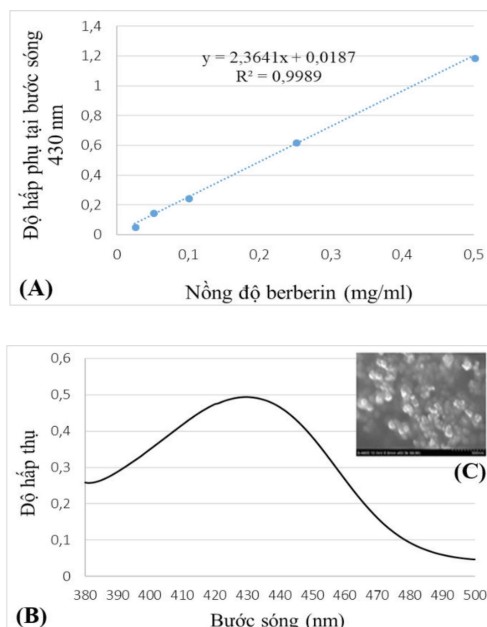
Hình 4. Kết quả chụp TEM (A) và giản đồ XRD (B) của mẫu nano berberin.

Hàm lượng berberin trong mẫu nano berberin

Phổ UV-Vis của mẫu nano berberin sau khi đông khô hòa tan lại trong metanol cho thấy sự hiện diện của đỉnh (peak) đặc trưng của berberin tại bước sóng 430 nm với độ hấp thụ là 0,49437 (hình 5B). Dựa vào phương trình nồng độ đường chuẩn của berberin chuẩn HPLC (hình 5A) suy ra hàm lượng berberin trong mẫu nano berberin đạt 1,1874 mg/ml trong mẫu đo (tương đương 23,748 mg/ml trong mẫu sau đông khô). So với ban đầu chế tạo từ nguyên liệu thô 4%, hiệu suất berberin có trong mẫu nano sau đông khô đạt 59,37%.

Mặt khác, ảnh FE-SEM ở hình 5C, được thực hiện bằng

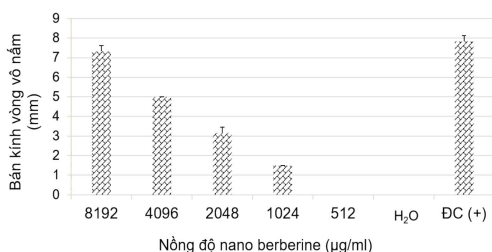
cách đo trực tiếp bột trên lưới đồng cho thấy trong mẫu bột sau khi đông khô vẫn tồn tại các hạt có kích thước khoảng 60 nm với hình dạng rõ ràng.



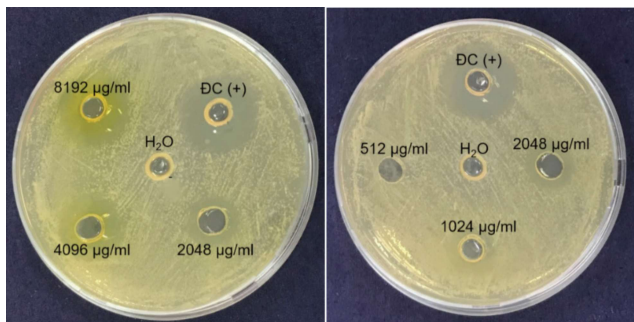
Hình 5. Mối tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ của dung dịch berberin chuẩn (A); phổ UV-Vis của mẫu nano berberin trong metanol (B) và ảnh FE-SEM bột nano berberin sau khi đông khô (C).

Hoạt tính kháng *Candida albicans* của mẫu nano berberin

Cơ chế tác động và giết chết tế bào nấm *Candida albicans* của berberin là làm suy giảm chức năng của ty thể, tạo các phản ứng oxy hóa tái hoạt hóa, ảnh hưởng đến con đường toàn vẹn vách tế bào và các yếu tố phiên mã sốc nhiệt HSF1 [7, 8]. Hạt nano berberin được bào chế trong nghiên cứu của Sahibzada và cộng sự đã ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm [10]. Ngoài ra, quá trình tạo hạt nano berberin còn được nhiều nhà nghiên cứu ứng dụng trong việc tạo các hệ thuốc ức chế phát triển của khối u [13], trong quá trình điều trị tiểu đường [14]... Hoạt tính và cơ chế kháng nấm *Candida albicans* của berberin và nano berberin đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu và công bố [6, 9, 15]. Trong nghiên cứu này, nano berberin cũng đã ghi nhận được hoạt tính kháng nấm *Candida albicans*. Kết quả cho thấy hoạt tính kháng nấm của nano berberin giảm dần theo nồng độ. Điều đó được thể hiện qua bán kính vòng vô nấm giảm từ $7 \pm 0,29$ mm ở nồng độ 8192 $\mu\text{g/ml}$ xuống $1,5 \pm 0,00$ mm ở nồng độ 1024 $\mu\text{g/ml}$. Ở nồng độ thấp (512 $\mu\text{g/ml}$) không ghi nhận vòng vô nấm. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được ghi nhận ở 1024 $\mu\text{g/ml}$ (hình 6 và 7).



Hình 6. Hoạt tính kháng nấm của nano berberin ở các nồng độ.



Hình 7. Vòng vô nấm trên đĩa môi trường thạch sabouraud.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chế tạo thành công nano berberin bằng phương pháp nghiền quay với bi Zirconium. Kết quả kiểm tra bằng các phân tích DLS, FE-SEM, TEM và XRD cho thấy hạt nano tạo ra có kích thước trung bình khoảng 60 nm. Kiểm tra hoạt tính sinh học cho thấy nano berberin ức chế mạnh sự phát triển của nấm *Candida albicans* với giá trị MIC ghi nhận tại nồng độ 1024 µg/ml. Dịch nano berberin tạo ra trong nghiên cứu này có tiềm năng ứng dụng tạo các sản phẩm sử dụng trong phòng và trị bệnh do nấm *Candida albicans* gây ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Q. Hou, W.J. He, Y.S. Wu, H.J. Hao, X.Y. Xie, and X.B. Fu (2019), "Berberine: A traditional natural product with novel biological activities", *Altern. Ther. Health. Med.*, PMID: 31634873.
- [2] A.H. Amin, T.V. Subbaiah, and K.M. Abbasi (1969), "Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action", *Can. J. Microbiol.*, **15**(9), pp.1067-1076.
- [3] E. Mirhadi, M. Rezaee, and B. Malaekhe-Nikouei (2018), "Nano strategies for berberine delivery, a natural alkaloid of Berberis", *Biomed. Pharmacother.*, **104**, pp.465-473.
- [4] Z. Wang, Y.S. Wang, Z.M. Chang, L. Li, Y. Zhang, M.M. Lu, X. Zheng, M. Li, D. Shao, J. Li, L. Chen, and W.F. Dong (2017), "Berberine-loaded Janus nanocarriers for magnetic field-enhanced therapy against hepatocellular carcinoma", *Chem. Biol. Drug Des.*, **89**(3), pp.464-469.

[5] V. Nekkanti, V. Venkateswarlu, and R. Pillai (2012), *Drug Nanoparticles - An Overview*, p.111-132.

[6] N. Zorić, I. Kosalec, S. Tomić, I. Bobnjarić, M. Jug, T. Vlajnić, and J. Vlajnić (2017), "Membrane of *Candida albicans* as a target of berberine", *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **17**(1), DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1773-5>.

[7] P. Lam, S.H.L. Kok, K.K.H. Lee, K.H. Lam, D.K.P. Hau, W.Y. Wong, Z. Bian, R. Gambari, and C.H. Chui (2016), "Sensitization of *Candida albicans* to terbinafine by berberine and berberrubine", *Biomedical Reports*, **4**(4), pp.449-452.

[8] S. Dhamgaye, F. Devaux, P. Vandeputte, N.K. Khandelwal, D. Sanglard, G. Mukhopadhyay, and R. Prasad (2014), "Molecular mechanisms of action of herbal antifungal alkaloid berberine, in *Candida albicans*", *PLoS One*, **9**(8), pe.104554.

[9] Y. ZhaoDan, D. Yan, J.-B. Wang, P. Zhang, and X. Xiao (2010), "Antifungal effect of berberine on *Candida albicans* by microcalorimetry with correspondence analysis", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **102**, pp.49-55.

[10] M.U.K. Sahibzada, A. Sadiq, H.S. Faidah, M. Khurram, M.U. Amin, A. Haseeb, and M. Kakar (2018), "Berberine nanoparticles with enhanced in vitro bioavailability: characterization and antimicrobial activity", *Drug Design, Development and Therapy*, **12**, p.303.

[11] Z. Wang, J. Wu, Q. Zhou, Y. Wang, and T. Chen (2015), "Berberine nanosuspension enhances hypoglycemic efficacy on streptozotocin induced diabetic C57BL/6 mice", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID: 239749.

[12] Q. Zou, Y. Li, L. Zhang, Y. Zuo, J. Li, and J. Li (2009), "Antibiotic delivery system using nano-hydroxyapatite/chitosan bone cement consisting of berberine", *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and The Korean Society for Biomaterials*, **89**(4), pp.1108-1117.

[13] Y.-C. Lin, J.-Y. Kuo, C.-C. Hsu, W.-C. Tsai, W.-C. Li, M.-C. Yu, and H.-W. Wen (2013), "Optimizing manufacture of liposomal berberine with evaluation of its antihepatoma effects in a murine xenograft model", *International Journal of Pharmaceutics*, **441**(1-2), pp.381-388.

[14] T. Wang, N. Wang, H. Song, X. Xi, J. Wang, A. Hao, and T. Li (2011), "Preparation of an anhydrous reverse micelle delivery system to enhance oral bioavailability and anti-diabetic efficacy of berberine", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **44**(1-2), pp.127-135.

[15] R. Iwazaki, E. Endo, T. Ueda-Nakamura, C. Nakamura, L. Garcia, and B. Filho (2010), "In vitro antifungal activity of the berberine and its synergism with fluconazole", *Antonie Van Leeuwenhoek*, **97**, pp.201-205.