

Chế tạo vi cầu chitosan ứng dụng trong y sinh bằng phương pháp khâu mạng nhũ tương

- Từ Thị Trâm Anh
- Lê Văn Hiếu
- Hà Thúc Huy

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 23 tháng 12 năm 2016, nhận đăng ngày 30 tháng 10 năm 2017)

TÓM TẮT

Phương pháp khâu mạng nhũ tương được sử dụng để chế tạo vi cầu chitosan. Trong đó, ảnh hưởng của kỹ thuật chế tạo như tốc độ khuấy, tỉ lệ pha dầu trên pha nước (O/W), tỉ lệ pha dầu trên chất nhũ hóa Span80 (O/E), hàm lượng chất khâu mạng glutaraldehyde lên cấu trúc của sản phẩm được khảo sát. Cấu trúc và hình thái sản phẩm được phân tích bằng phương pháp quang phổ hồng ngoại (FT-IR), kính hiển vi quang học OTM, phương pháp tán xạ laser động (DLS). Kết quả phân tích cho thấy sản phẩm có dạng hình

cầu, với kích thước trung bình của vi cầu giảm nếu tăng tốc độ khuấy, tăng tỉ lệ O/W, giảm tỉ lệ O/E, hoặc tăng hàm lượng chất khâu mạng. Khi tốc độ khuấy là 6000 vòng/phút, tỉ lệ O/E=1,5, O/W=15, tỉ lệ mol giữa chitosan và glutaraldehyde R=1 thì kích thước trung bình của vi cầu là 2,40 μm , độ phân tán kích thước hẹp. Có thể sử dụng vi cầu chitosan để làm giá mang cho hệ dẫn truyền thuốc đúng mục tiêu nhờ vào tính đáp ứng pH của chúng.

Từ khóa: vi cầu chitosan, glutaraldehyde, khâu mạng nhũ tương

MỞ ĐẦU

Khi đưa vào cơ thể một lượng đáng kể, thuốc sẽ ảnh hưởng đến các mô và các cơ quan bình thường không mang bệnh, dẫn đến các tác dụng phụ nghiêm trọng. Một phương pháp hiệu quả để khắc phục vấn đề này là phát triển hệ thống phân phối thuốc đúng mục tiêu để nó nhả các loại thuốc và các hoạt tính sinh học tại những vị trí mong muốn. Điều này làm tăng hiệu quả điều trị của thuốc thông qua cải thiện ảnh hưởng của thuốc đến cơ thể và phân bố sinh học của thuốc. Hệ thống phân phối thuốc đúng mục tiêu bao gồm 3 phần: tác nhân trị liệu, tác nhân nhắm mục tiêu và hệ thống vận chuyển. Thuốc có thể kết hợp bằng cách hấp thụ thụ động hoặc liên kết hóa học vào hệ thống vận chuyển. Sự lựa chọn các phân tử vận chuyển rất quan trọng vì nó ảnh hưởng đáng kể đến tính chất của thuốc. Một loạt các vật liệu như các polymer tự nhiên hoặc tổng hợp, lipid và các dendrimer đã được sử dụng như

vật liệu vận chuyển thuốc. Trong đó, polysaccharide đã nhận được rất nhiều sự quan tâm do các tính chất vật lý và sinh học vượt trội của nó. Chitosan là một polysaccharide tự nhiên phổ biến được tìm thấy trong vỏ của động vật giáp xác như cua và tôm. Loại polymer này đã thu hút được sự quan tâm ngày càng nhiều trong dược phẩm và y sinh học ứng dụng do các tính chất hóa lý độc đáo của nó và một số tính chất có lợi như tương thích sinh học, phân hủy sinh học, độc tính thấp [1]. Do đó, chitosan được xem là một loại vật liệu tiềm năng trong hệ thống vận chuyển thuốc có mục tiêu [2, 3].

Vi cầu là các hạt rắn hình cầu có kích thước trong khoảng 1–1000 μm . Vi cầu chitosan có tính chất trương nở phụ thuộc vào pH nên khi sử dụng vi cầu chitosan làm hệ thống dẫn thuốc, chúng có khả năng làm giảm nồng độ của thuốc tại những vị trí không phải là mục tiêu cần chữa trị, đồng thời bảo vệ các loại thuốc có tính không ổn định

trước và sau khi tiêm, trước khi thuốc hoạt động tại vị trí mong muốn. Bên cạnh đó nó còn có khả năng điều khiển các hoạt động của thuốc trong cơ thể, được động học, phân phối đến mô và tương tác đến các tế bào của thuốc và có thể kiểm soát khả năng nhả thuốc [4]. Tính chất của vi cầu chitosan như hình dạng, kích thước, độ khâu mạng có ảnh hưởng lớn đến khả năng tải thuốc của hệ, vì vậy nghiên cứu này chủ yếu tập trung vào việc kiểm soát tính chất của sản phẩm vi cầu chitosan thông qua các thông số thực nghiệm trong quá trình chế tạo vi cầu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

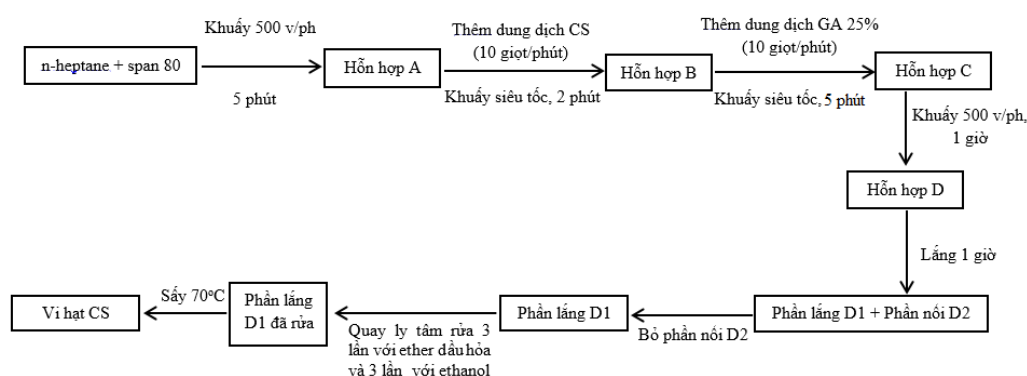
Vật liệu

Chitosan (CS) được mua từ công ty Chitoworld, KCN Tân Tạo, Q. Bình Tân, Tp. Hồ Chí Minh có DDA $\approx 90\%$, kích thước 90 mesh, hàm lượng tro 0,6 % được deacetyl hóa thêm trong phòng thí nghiệm để thu được chitosan có độ deacetyl hóa cao (HDGS) với DDA $\approx 99\%$, $M_n = 1,5848 \times 10^4$, $M_w = 3,0154 \times 10^4$, PI = 1,9027. Acetic acid (AcOH) (99,8 %, Trung Quốc), *n*-heptane ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$) (99 %, Trung Quốc), Span 80 ($\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_6$) (99,8 %, Trung Quốc), glutaraldehyde (99,9 %, Merck-Đức), ether dầu hỏa 60-90 (98 %, Trung Quốc), ethanol (99 %, Việt nam), acetone (99 %, Việt Nam).

Phương pháp

Chế tạo vi cầu chitosan bằng phương pháp khâu mạng nhũ tương

Quy trình chế tạo vi cầu chitosan bằng phương pháp nhũ tương được mô tả như trong Hình 1. Hệ nhũ tương đảo nước trong dầu được sử dụng trong nghiên cứu này gồm các thành phần như sau: pha nước (pha phân cực, W) là dung dịch chitosan trong acetic acid (4 %), pha dầu (pha kém phân cực, O) là *n*-heptane, chất tạo nhũ là Span80, chất khâu mạng là glutaraldehyde (GA). Đầu tiên, chitosan được hòa tan trong dung dịch acetic acid 4 % có pH=2, để tạo thành dung dịch chitosan. Tiếp theo cho m(g) chất tạo nhũ Span80 và 90 (g) pha dầu *n*-heptane vào cùng lúc trong 1 becher, rồi khuấy từ ở tốc độ 500 vòng/phút trong vòng 15 phút. Sau đó dung dịch được khuấy bằng máy khuấy siêu tốc ở tốc độ nhất định trong vòng 5 phút thu được hỗn hợp A, sau đó nhỏ giọt dung dịch chitosan vào hỗn hợp A với tốc độ 10 giọt/phút, sau khi cho hết chitosan thì khuấy thêm 2 phút rồi bắt đầu thêm m₂ (g) dung dịch glutaraldehyde 25 % với tốc độ 10 giọt/phút tiếp tục khuấy thêm 5 phút thu được hỗn hợp C. Sau đó hỗn hợp phản ứng được tiếp tục khuấy từ trong vòng 1 giờ thu được hỗn hợp D. Sau 1 giờ, đưa dung dịch D ra khỏi máy khuấy từ, để lắng trong vòng 1 giờ. Sau khi lắng gạn bỏ phần dung dịch D2 ở trên, thu phần lắng D1 được rửa và quay li tâm 3 lần trong ether dầu hỏa và 3 lần trong ethanol, cuối cùng cho phần D1 đã rửa vào đĩa petri và sấy ở 70 °C cho đến khi khối lượng không đổi, để thu được vi cầu CS [5].



Hình 1. Quy trình chế tạo vi cầu chitosan

Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ khuấy

Vi cầu chitosan được tổng hợp theo như quy trình được trình bày như trong Sơ đồ 1 với các

thông số phản ứng như trong Bảng 1, trong đó tốc độ khuấy được thay đổi với các giá trị là 500 vòng/phút, 1000 vòng/phút và 6000 vòng/phút.

Bảng 1. Số liệu thực nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tốc độ khuấy

Tên mẫu	Tốc độ khuấy (vòng/phút)	O/W	O/E	C _{cs} (%)	R=n _{cs} :n _{glu}
V500	500	15	1,5	2,00	1
V1000	1000	15	1,5	2,00	1
V6000	6000	15	1,5	2,00	1

Với n_{cs} là số mol mắc xích glucosamine và n_{glu} là số mol glutaraldehyde:

$$n_{cs} = \frac{m}{M} = \frac{2\% \cdot m_{dd}}{M} \quad (1)$$

Trong đó:

m: khối lượng chitosan (g)

m_{dd}: khối lượng dung dịch chitosan

M: khối lượng của 1 mắc xích glucosamine,

M=161 g

Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ O/E

Vi cầu chitosan được tổng hợp theo như quy trình được trình bày như trong Sơ đồ 1 với các thông số phản ứng như trong Bảng 2, trong đó tỉ lệ khối lượng O/E được thay đổi với các giá trị là 1,5, 2, 4, 6, 15 trong cùng điều kiện thí nghiệm.

Bảng 2. Số liệu thực nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ O/E

Tên mẫu	Tốc độ khuấy (vòng/phút)	O/W	O/E	C _{cs} (%)	R=n _{cs} :n _{glu}
MR1	6000	15	1,5	2,00	1
OE2	6000	15	2	2,00	1
OE4	6000	15	4	2,00	1
OE6	6000	15	6	2,00	1
OE15	6000	15	15	2,00	1

Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ O/W

Vi cầu chitosan được tổng hợp theo như quy trình được trình bày như trong Sơ đồ 1 với các thông số phản ứng như trong Bảng 3, trong đó tỉ

lệ khối lượng O/W được thay đổi với các tỉ lệ là 5, 10, 15 trong cùng điều kiện thí nghiệm.

Bảng 3. Số liệu thực nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ O/W

Tên mẫu	Tốc độ khuấy (vòng/phút)	O/W	O/E	C _{cs} (%)	R=n _{cs} :n _{glu}
OW5	6000	5	1,5	2,00	1
OW10	6000	10	1,5	2,00	1
MR1	6000	15	1,5	2,00	1

Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ $R=n_{cs}:n_{glu}$

Vi cầu chitosan được tổng hợp theo như quy trình được trình bày như trong Sơ đồ 1 với các

thông số phản ứng như trong Bảng 4, trong đó tỉ lệ mol $R=n_{cs}:n_{glu}$ được thay đổi giá trị từ 1, 2, 10.

Bảng 4. Số liệu thực nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ $R=n_{cs}:n_{glu}$

Tên mẫu	Tốc độ khuấy (vòng/phút)	O/W	O/E	C _{cs} (%)	R = $n_{cs}:n_{glu}$
MR1	6000	15	1,5	2,00	1
MR2	6000	15	1,5	2,00	2
MR10	6000	15	1,5	2,00	10

Phân tích sản phẩm

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR)

Cấu trúc của của chitosan thương mại và vi cầu chitosan được xác định bằng phương pháp phân tích phổ hồng ngoại. Các mẫu chitosan thương mại, sản phẩm MR1, MR2, MR10 được nghiền và ép viên với KBr theo tỷ lệ nhất định rồi phân tích FT-IR, phổ FT-IR được ghi nhận trên máy máy FT-IR -8400S – SHIMADZU.

Kính hiển vi quang học (OTM)

Cho 0,002 g vi cầu chitosan vào trong 3 mL dung dịch ethanol, siêu âm khoảng 20 phút để mẫu phân tán trong ethanol. Nhỏ dung dịch ethanol có chứa vi cầu chitosan lên lam kính, để bay hơi hết dung dịch sau đó sấy khô lam kính rồi quan sát trên kính hiển vi quang học LEICA để phân tích hình thái bên ngoài và kích thước của trên kính hiển vi quang học LEICA. Các mẫu được phân tích OTM như V500, V1000, V6000, OE1.5, OE2, OE4, OE6, OE15, OW5, OW10, OW15, MR1, MR2, MR10.

Phân tích tán xạ laser động (DLS)

Khoảng 0,02 g vi cầu chitosan được đánh siêu âm phân tán trong ethanol trước khi tiến hành phân tích DLS để xác định khoảng phân bố kích thước của vi cầu, quá trình phân tích được tiến hành trên máy DLS-LB550-HORIBA. Các mẫu được phân tích DLS gồm OE1.5, OE2, OW10, OW15, MR1, MR2, MR10.

Khả năng trương nở của vi hạt chitosan khâu mạch theo pH

Ngâm 0,02 g vi cầu chitosan cần khảo sát trong các dung dịch đệm phosphate có pH =5,6;

7,0 và 8,0 trong vòng 30 giờ sau đó đưa mẫu ra ngoài để lên giấy thấm để đảm bảo không còn dung dịch đệm, sau đó cân lại khối lượng, so sánh với khối lượng ban đầu để so sánh khả năng trương nở của vi cầu trong các môi trường pH khác nhau.

Công thức tính độ trương A (%):

$$A (\%) = \frac{m-m_0}{m_0} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó:

m là khối lượng hạt sau khi ngâm.

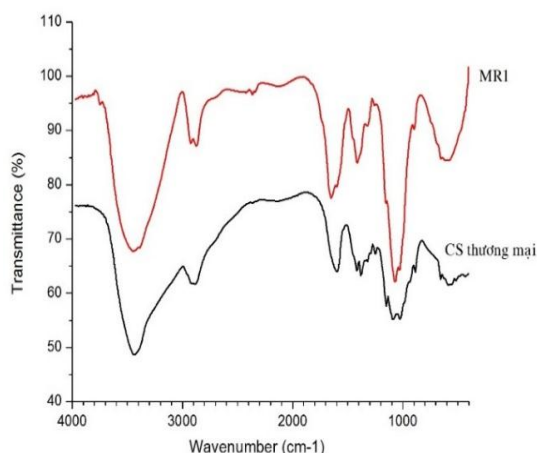
m_0 là khối lượng hạt ban đầu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Định danh sản phẩm

Kết quả phân tích FT-IR của chitosan thương mại và của sản phẩm MR1 được thể hiện ở Hình 2. Trong phổ FT-IR lần lượt của CS thương mại và vi cầu CS mũi xuất hiện ở số sóng $3429,3 \text{ cm}^{-1}$, $3448,8 \text{ cm}^{-1}$ tương ứng với dao động co giãn của nhóm -OH. Mũi ở $2923,9 \text{ cm}^{-1}$, $2924,1 \text{ cm}^{-1}$ tương ứng với dao động co giãn của liên kết C-H trong nhóm CH_2 , các mũi ở $2881,6 \text{ cm}^{-1}$, $2877,8 \text{ cm}^{-1}$, tương ứng với dao động đối xứng của C-H trong nhóm CH_2 . Mũi tại các số sóng $1602,8$ và $1604,8$ tương ứng với dao động biến dạng của liên kết -NH. Mũi tại các số sóng $1421,5$, $1411,9 \text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động biến dạng của liên kết C-H trong nhóm $-\text{CH}_2$. Mũi hấp thụ tại số sóng $1097,5$ và $1072,4 \text{ cm}^{-1}$ đặc trưng các dao động co giãn bất đối xứng của liên kết C-O-C. Mũi hấp thụ tại số sóng $1026,1 \text{ cm}^{-1}$ và $1031,8 \text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động co giãn đối xứng của liên kết C-O-C [6]. Nhóm azomethine -

N=CH- được đặc trưng bởi mũi hấp thu tại $1651,1\text{ cm}^{-1}$ chỉ có ở phổ FT-IR của mẫu MR1, trong phổ của chitosan thương mại không thấy sự xuất hiện đỉnh phổ trong khoảng số sóng này,



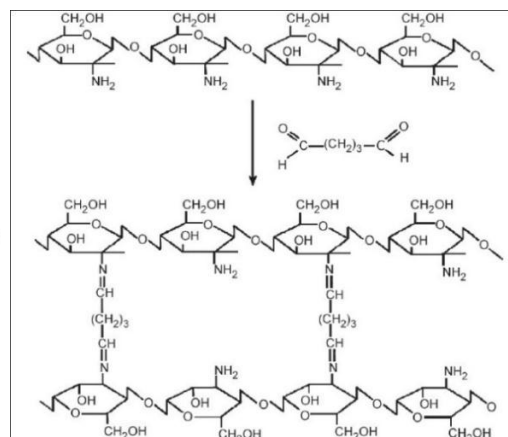
Hình 2. Phổ FT-IR của chitosan thương mại và của sản phẩm MR1

Phân tích TOM cho thấy sản phẩm có dạng hình cầu có kích thước trong khoảng 1-8 μm (Hình 4). Từ kết quả phân tích OTM và FT-IR cho thấy đã thành công trong việc chế tạo vi cầu chitosan khâu mạng bởi glutaraldehyde.

Ảnh hưởng của tốc độ khuấy

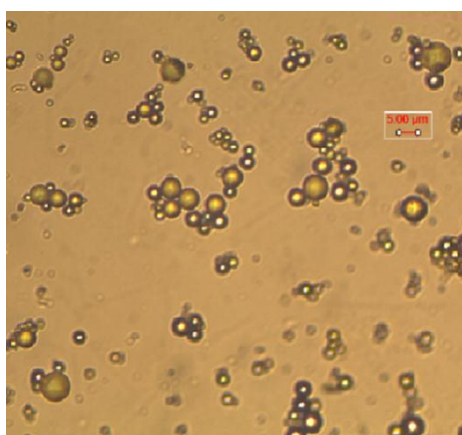
Ảnh OTM cho thấy khi thay đổi tốc độ khuấy, sản phẩm đều có dạng hình cầu (Hình 4, 5, 6). Ở tốc độ khuấy 6000 vòng/phút hạt có kích

chứng tỏ liên kết này là kết quả của phản ứng tạo liên kết ngang của nhóm amine trên mạch chitosan và nhóm carbonyl theo sơ đồ được biểu diễn trong Hình 3.

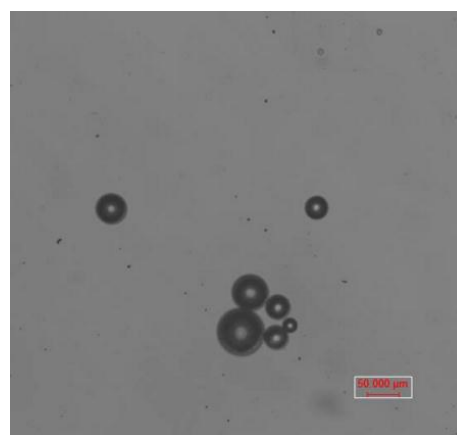


Hình 3. Sơ đồ phản ứng của chitosan và glutaraldehyde

thước nhỏ nhất (nhỏ hơn 10 μm), mẫu ở tốc độ khuấy 500 vòng/phút hạt có kích thước lớn nhất (lớn hơn 100 μm). Kích thước của hạt phụ thuộc vào tốc độ khuấy, tốc độ khuấy càng lớn thì kích thước hạt càng nhỏ. Như vậy với tốc độ khuấy ở 6000 vòng/phút sẽ cho hạt nhỏ hơn 10 μm , vì vậy chọn tốc độ khuấy là 6000 vòng/phút để khảo sát các mẫu tiếp theo.



Hình 4. Kết quả phân tích OTM của mẫu MR1

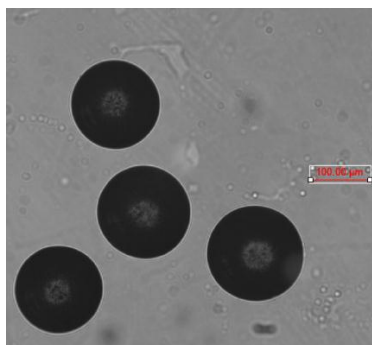


Hình 5. Kết quả phân tích OTM của mẫu V1000

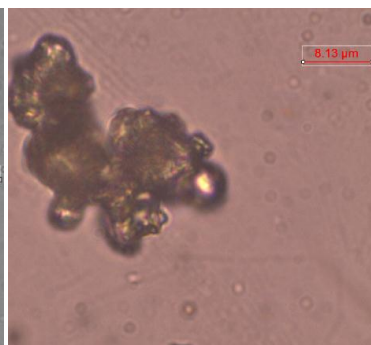
Ảnh hưởng của tỉ lệ O/E

Kết quả phân tích OTM cho thấy ở tỉ lệ O/E là 4, 6 và 15 (Hình 7, 8, 9) lượng chất tạo nhũ chưa đủ để nhũ hóa toàn bộ pha nước trong hệ, nên có một số mảng rắn không có dạng hình cầu. Các mẫu có tỉ lệ O/E là 1,5 và 2 (Hình 4, 10) có dạng hình cầu, kích thước tương đương nhau nên được phân tích DLS để xem xét kĩ hơn phân bố kích thước hạt trên toàn bộ mẫu và kích thước trung bình của vi cầu. Theo kết quả phân tích

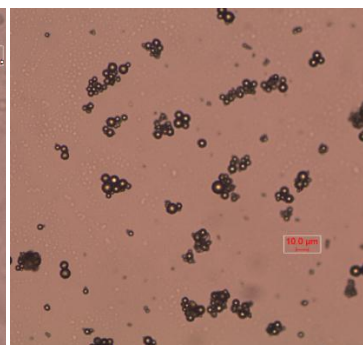
DLS mẫu MR1 tương ứng với tỉ lệ O/E là 1,5 (Hình 11) có kích thước hạt trung bình là 2,4052 μm , mẫu OE2 tương ứng với tỉ lệ O/E là 2 (Hình 12) có kích thước hạt trung bình là 2,7679 μm . Từ kết quả phân tích DLS cho thấy trong hai tỉ lệ trên thì tỉ lệ O/E là 1,5 có kích thước vi cầu có độ đa phân tán hẹp hơn và kích thước trung bình nhỏ hơn so với tỉ lệ 2. Vậy chọn điều kiện tỉ lệ O/E là 1,5 để tiếp tục tổng hợp những mẫu tiếp theo.



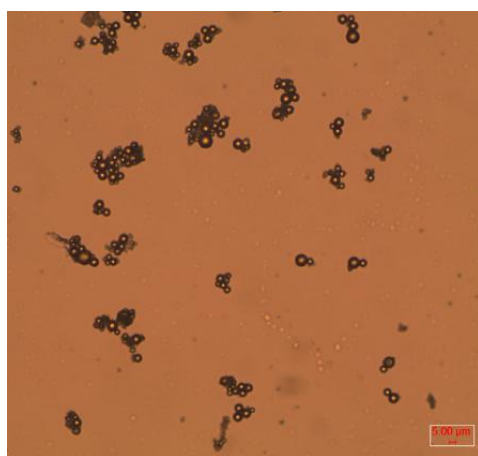
Hình 6. Kết quả phân tích OTM của mẫu V500



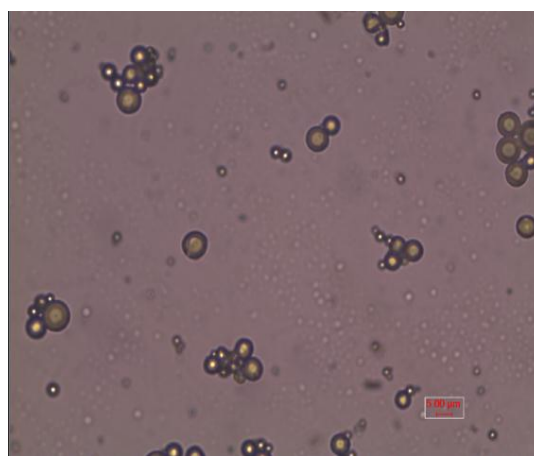
Hình 7. Kết quả phân tích OTM của OE15



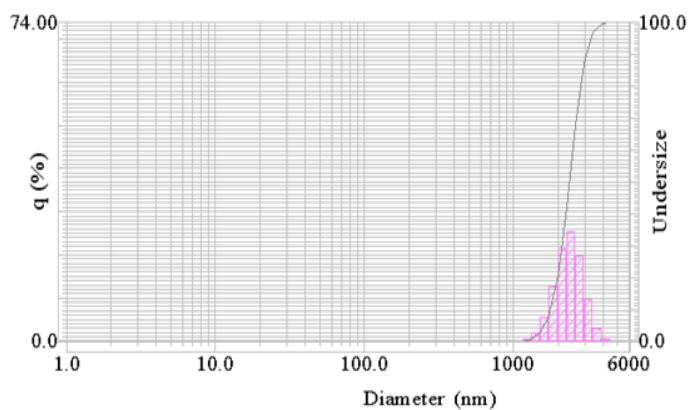
Hình 8. Kết quả phân tích OTM của OE6



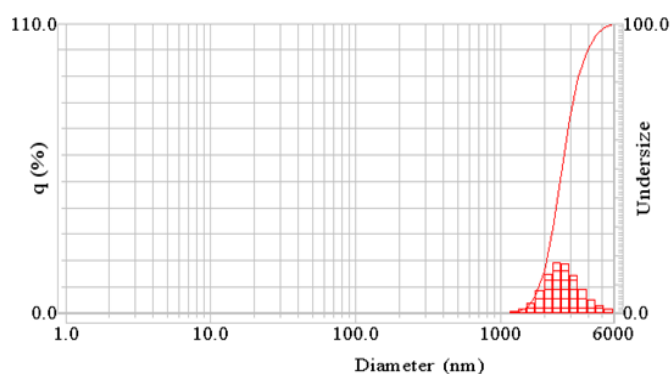
Hình 9. Kết quả phân tích OTM của OE4



Hình 10. Kết quả phân tích OTM của OE2



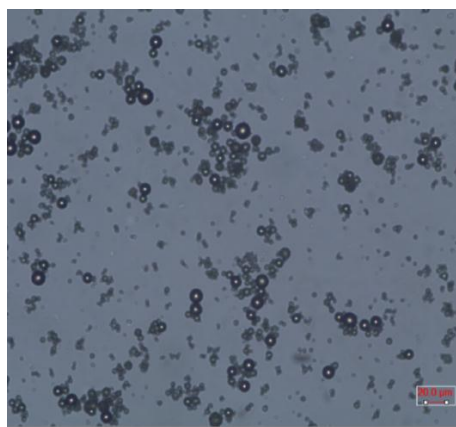
Hình 11. Kết quả phân tích DLS của mẫu MR1



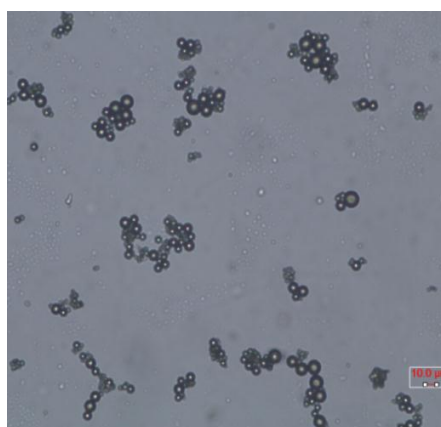
Hình 12. Kết quả phân tích DLS của mẫu OE2. Ảnh hưởng của tỉ lệ O/W

Theo kết quả phân tích OTM (Hình 4, 13, 14), khi cố định điều kiện thí nghiệm và thay đổi tỉ lệ O/W là 15, 10 và 5 sẽ cho hạt có dạng hình cầu, kích thước không chênh lệch nhiều. Nên ba

mẫu được phân tích DLS để xác định kích thước hạt trung bình và phân bố kích thước hạt trong toàn bộ mẫu.



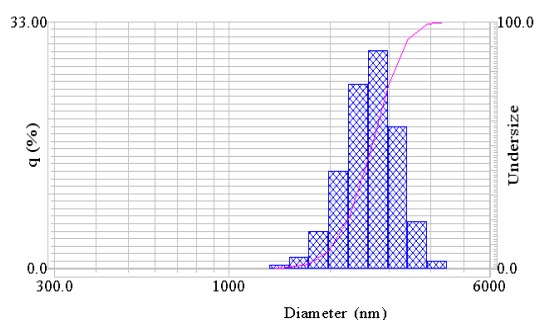
Hình 13. Kết quả phân tích OTM của mẫu OW10



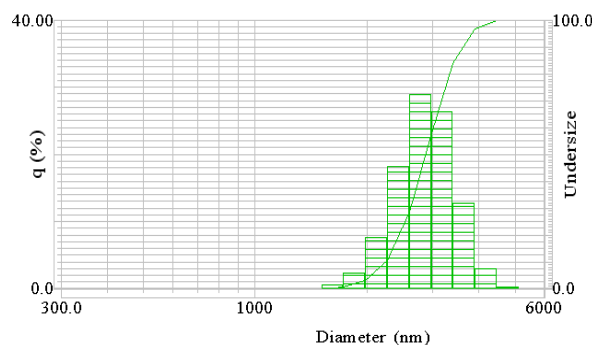
Hình 14. Kết quả phân tích OTM của mẫu OW5

Kết quả phân tích DLS trong Hình 11, 15 và 16 lần lượt tương ứng với các mẫu có tỉ lệ O/W là 15, 10 và 5. Mẫu OW5 tương ứng với tỉ lệ O/W là 5 có kích thước vi cầu trung bình là 2,8714 μm , mẫu OW10 tương ứng với tỉ lệ O/W là 10 có kích thước vi cầu trung bình là 2,6827 μm , mẫu MR1 tương ứng với tỉ lệ O/W là 15 có kích thước vi cầu trung bình là 2,4052 μm . Từ kết quả phân tích DLS có thể dễ dàng nhận thấy trong 3 mẫu trên, mẫu có tỉ lệ O/W là 15 có kích thước trung bình nhỏ nhất, độ đa phân tán hẹp hơn hai mẫu còn lại. Nguyên nhân là do khi tăng hàm lượng pha nước thì các giọt micelle sẽ dễ tập hợp lại tạo thành các giọt lớn hơn, từ đó tạo nên các hạt sau khi khô màng lớn hơn. Các giọt micelle dễ tập hợp là do khi tăng hàm lượng pha nước thì hàm lượng liên kết hydrogen liên phân tử tăng làm tăng độ nhớt của dung dịch, khoảng cách giữa các phân tử trong nhũ tương gần nhau hơn, lực kháng cự với dòng chảy lớn hơn. Do đó với cùng một lực xé (cùng tốc độ khuấy là 6000 v/p) thì hệ có hàm lượng pha nước càng lớn thì càng tạo thành hạt lớn. Kết quả này phù hợp với kết quả đã được công bố trong công trình của A.N. Ilia Anisa [7].

Kết quả phân tích OTM, DLS cho thấy với tỉ lệ O/W là 15, sản phẩm có kết quả phù hợp nhất, đây là tỉ lệ phù hợp để tổng hợp những mẫu tiếp theo.

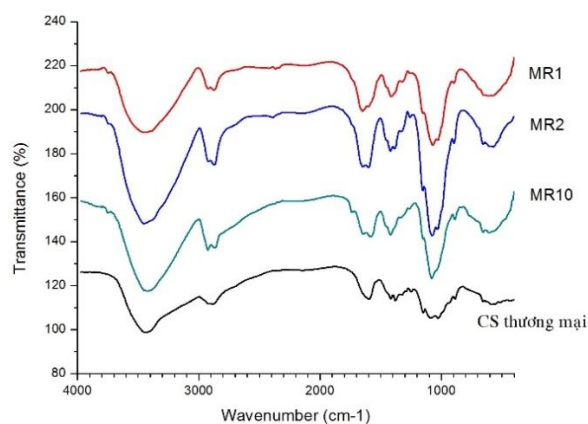


Hình 15. Kết quả phân tích DLS của mẫu OW10



Hình 16. Kết quả phân tích DLS của mẫu OW5 Ảnh hưởng của tỉ lệ $R = n_{\text{glu}}:n_{\text{CS}}$

Kết quả phân tích FT-IR của sản phẩm vi cầu chitosan trong các điều kiện tỉ lệ mol R khác nhau được thể hiện trong Hình 17. Phổ FT-IR của chitosan thương mại và các mẫu MR1, MR2, MR10 được so sánh trong Bảng 5. Đỉnh hấp thụ đặc trưng cho nhóm azomethine $-\text{N}=\text{CH}$ vẫn xuất hiện khi tỉ lệ R tăng đến 10.



Hình 17. Phổ FT-IR của mẫu MR10

Bảng 5. So sánh phổ FT-IR của MR1, MR2, MR10

Dao động	Số sóng (cm ⁻¹)			
	Chitosan thương mại	MR1	MR2	MR10
ν _{OH}	3429,3	3448,8	3448,8	3425,6
ν _{asCH2}	2923,9	2924,1	2916,4	2924,1
ν _{sCH2}	2881,6	2877,8	2870,1	2862,4
ν _{N=CH}	Không quan sát thấy	1651,1	1651,1	1643,4
δ _{N-H}	1602,8	1604,8	1604,8	1581,6
δ _{CH2}	1421,5	1411,9	1419,6	1419,6
ν _{asC-O-C}	1097,5	1072,4	1072,4	1080,1
ν _{sC-O-C}	1031,8	1026,7	1033,8	1041,5

Để hiểu rõ hơn ảnh hưởng của tỷ lệ mol R lên cấu trúc của vi cầu, độ khâu mạng được xác

định thông qua phổ FT-IR dựa trên tỉ lệ cường độ hấp thụ của hai đỉnh đặc trưng cho nhóm azomethine tại số sóng khoảng 1651 và đỉnh đặc trưng cho dao động bất đối xứng của C-O-C tại 1072 cm⁻¹ với công thức được đề xuất như sau:

$$K(\%) = \frac{A_{1651}}{A_{1072}} \times 100 \quad (3)$$

Trong đó:

K là độ khâu mạng (%).

A₁₆₅₁ là cường độ hấp thụ của đỉnh đặc trưng cho nhóm azomethine.

A₁₀₇₂ là cường độ hấp thụ của đỉnh đặc trưng cho dao động bất đối xứng của C-O-C.

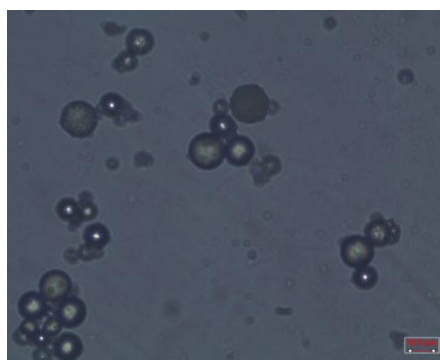
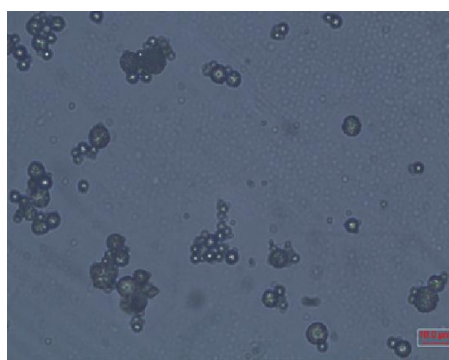
Kết quả tính toán độ khâu mạng đối với ba mẫu MR1, MR2, MR10 được thể hiện trong Bảng 6. Độ khâu mạng giảm khi tăng tỉ lệ R, do khi R tăng thì hàm lượng chất khâu mạng GA giảm.

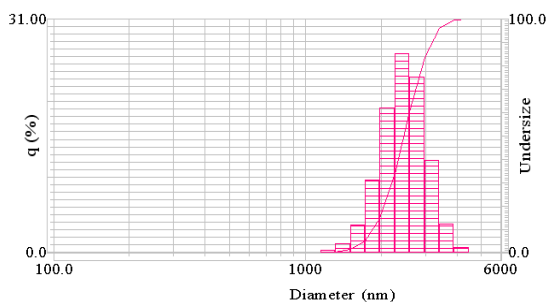
Bảng 6. Độ khâu mạng của ba mẫu MR1, MR2, MR10

	R	A ₁₆₅₁	A ₁₀₇₂	A ₁₆₅₁ /A ₁₀₇₂	K (%)
MR1	1	18,773698	33,3941373	0,56	56
MR2	2	25,6600408	55,8822398	0,46	46
MR10	10	13,1396489	33,7306084	0,39	39

Phân tích TOM của các mẫu khi tỉ lệ R là 1, 2, 10 lần lượt thể hiện trong Hình 4, 18, 19 cho thấy ở ba tỉ lệ, sản phẩm đều có dạng hình cầu. Dựa vào phân tích DLS của các mẫu trên (Hình 11, 20, 21), khi R là 1, vi cầu có kích thước trung bình là 2,4052 μm, khi R là 2, vi cầu có kích

thước trung bình là 2,5985 μm, và khi R là 3 thì vi cầu có kích thước trung bình là 2,9432 μm. Có thể thấy rằng mẫu tạo thành với tỉ lệ R là 1 có kích thước hạt trung bình nhỏ nhất và hạt phân bố kích thước hẹp. Như vậy theo xu hướng tăng dần R thì kích thước trung bình của vi cầu tăng.

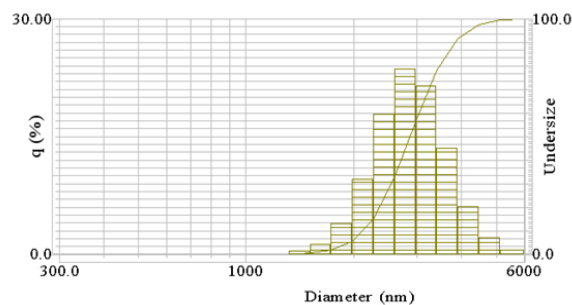
**Hình 18.** Kết quả phân tích OTM của mẫu MR2**Hình 19.** Kết quả phân tích OTM của mẫu MR10



Hình 20. Kết quả phân tích DLS của mẫu MR2

Khảo sát độ trương của vi cầu chitosan theo pH

Kết quả khảo sát độ trương của vi cầu chitosan trong điều kiện pH khác nhau được thể hiện qua Bảng 7. Độ trương của hạt vi cầu chitosan có tỉ lệ mol $R=1$ tăng dần khi giảm pH của môi trường là vì khi pH giảm các nhóm



Hình 21. Kết quả phân tích DLS của mẫu MR10

amine trên chitosan bị proton hóa, các mạch chitosan tích điện dương nhiều hơn nên đẩy nhau nhiều hơn dẫn đến độ trương lớn hơn. Cụ thể như tại pH = 8,0 độ trương là 38,85 % đến pH = 5,6 độ trương của hạt là 54,32 %. Đây là cơ sở giúp vi cầu chitosan trở thành ứng viên tiềm năng cho hệ thống dẫn truyền thuốc nhạy pH [8].

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ trương của vi cầu chitosan có tỉ lệ mol $R=1$ theo điều kiện pH

MR1	Khối lượng ban đầu	Khối lượng sau khi trương	Độ trương
pH = 5,6	0,0204 g	0,0446 g	54,32 %
pH = 7,0	0,0202 g	0,0439 g	53,98 %
pH = 8,0	0,0203 g	0,0332 g	38,85 %

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tổng hợp thành công vi cầu CS có kích thước trung bình 2,4052 μm bằng phương pháp khâu mạng nhũ tương với pha dầu là *n*-heptane, chất nhũ hóa Span80, và chất khâu mạng là glutaraldehyde. Kích thước và hình dạng của vi cầu bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như tốc độ khuấy, tỷ lệ O/E, tỷ lệ O/W, tỷ lệ $R=n_{\text{CS}}:n_{\text{glu}}$.

Từ kết quả phân tích OTM và DLS cho thấy kích thước vi cầu giảm khi tăng tốc độ khuấy, tăng hàm lượng Span80 hoặc giảm hàm lượng dung dịch CS. Kết quả quan sát OTM, FT-IR cho thấy khi tỷ lệ mol $R=10$ thì CS vẫn được khâu

mạng. Phân tích DLS cho thấy khi $R=1$, kích thước hạt nhỏ nhất và có độ đa phân tán hẹp.

Như vậy, đối với hệ khâu mạng nhũ tương như trong nghiên cứu này thì điều kiện để tạo được vi cầu CS có kích thước nhỏ, độ đa phân tán hẹp được xác định như sau: tốc độ khuấy là 6000 vòng/phút, tỷ lệ O/E = 1,5, tỷ lệ O/W = 15, nồng độ dung dịch CS ban đầu là 2 %, tỷ lệ $R=n_{\text{CS}}:n_{\text{glu}}=1$.

Vi cầu chitosan có độ trương tăng khi pH giảm nên vi cầu chitosan có khả năng ứng dụng làm chất mang thuốc phân phối thuốc đúng mục tiêu theo pH.

Preparation of chitosan microspheres by emulsion crosslinking method for biomedical application

- Tu Thi Tram Anh
- Le Van Hieu
- Ha Thuc Huy

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

The emulsion crosslinking method using glutaraldehyde as a crosslinking agent was exploited to prepare chitosan microspheres. Effects of preparation factors such as homogenization speed, oil/emulsifier ratio (O/E), oil/water ratio (O/W), crosslinker concentration on the structure of products were investigated. Structure and morphology of the obtained products were determined by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), Transmission Optical Microscope systems (TOM), and Dynamic Laser Scattering analysis (DLS). The results indicated that the obtained products were

spherical in shape. The average diameter of chitosan microspheres decreased with the increase of homogenization speed, O/W ratio, crosslinker concentration or decrease of O/E ratio. When homogenization speed is 6000 rpm, O/E =1.5, O/W=15, and molar ratio of chitosan to glutaraldehyde R=1, the average diameter of the chitosan microspheres was about 2.40 μm with a narrow size distribution. Chitosan microspheres are able to be used as a polymer matrix for targeted drug delivery systems due to their pH-responsive property.

Keyword: emulsion crosslinking, glutaraldehyde, chitosan microspheres

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1].M. Rinaudo, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 31, 603–632 (2006).
- [2].M. Dasha, R.M. Ottenbrite, Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, 36, 981–1014 (2011).
- [3].J.J. Wang, Z.W. Zeng, R.Z. Ziao, et al., Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 765–774, (2011).
- [4].S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 100, 5–28 (2004).
- [5].X. Zou, X. Zhao, L. Ye, Q. Wang, H. Li, Preparation and drug release behavior of pH-responsive bovine serum albumin-loaded chitosan microspheres, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 1389–1397 (2015).
- [6].Y. Shigemasa, H. Matsuura, H. Sashiwa, H. Saimoto, Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin, *International Journal of Biological Macromolecules*, 18, 237–242 (1996).
- [7].A.N. Ilia Anisa, A.H. Nour, Affect of viscosity and droplet diameter on water-in-oil (w/o) emulsions: An experimental study, *International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering*, 4, 2, 213–216 (2010).
- [8].K. Sato, K. Yoshida, S. Takahashi, J. Anzai, pH- and sugar-sensitive layer-by-layer films and microcapsules for drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 809–821 (2011).