

EVALUATION OF BIOAVAILABILITY OF NANOSELEN PREPARED FROM MEDICAL EXTRACTS ON AN EXPERIMENTAL MODEL

Nguyen Van Khoi¹, Lai Tran Linh Thao¹, Chu Van Men^{1*}, Hoang Tien Dat¹
Nguyen Viet Nhat Minh², Nguyen Tran Hung³, Ngo Dinh Nhan⁴, Ngo Hoang Yen Nhi⁴

¹Vietnam Military Medical University - 160 Phung Hung, Ha Dong district, Hanoi, Vietnam

²Institute of Chemistry - Material - 17 Hoang Sam, Cau Giay district, Hanoi, Vietnam

³Hoai Duc B High School - Ngai Cau village, An Khanh commune, Hoai Duc district, Hanoi, Vietnam

⁴Drug Administration, Ministry of Health - 138A Giang Vo, Ba Dinh district, Hanoi, Vietnam

Received: 11/5/2025

Revised: 12/5/2025; Accepted: 19/5/2025

ABSTRACT

We compared the bioavailability of nano-selenium prepared using green nanotechnology from herbal extracts with conventionally synthesized nano-selenium and raw selenium (non-nanoparticulated) in an experimental animal model. Blood samples containing selen were analyzed by atomic absorption spectroscopy, with the method validated according to ICH and AOAC guidelines. The validation results demonstrated that the analytical method exhibited high sensitivity, specificity, broad linear range, accuracy, precision, and excellent stability. This validated method was then applied to evaluate the bioavailability of selenium in both nano-selenium formulations and conventional selenium samples. The findings revealed that plasma-synthesized nano-selenium showed absorption efficiency comparable to that of green-synthesized nano-selenium, with both formulations demonstrating significantly higher bioavailability than conventional bulk selenium. These preliminary results suggest the promising potential of green nanotechnology for selenium nanoparticle synthesis compared to traditional preparation methods.

Keywords: Nanoselenium, medicinal extracts, bioavailability, atomic absorption spectroscopy.

*Corresponding author

Email: chuvanmen@vmmu.edu.vn **Phone:** (+84) 353212500 **Https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD8.2570**



ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG CỦA NANOSELEN BẢO CHẾ TỪ CAO CHIẾT DƯỢC LIỆU TRÊN MÔ HÌNH THỰC NGHIỆM

Nguyễn Văn Khởi¹, Lại Trần Linh Thảo¹, Chử Văn Mên^{1*}, Hoàng Tiến Đạt¹
Nguyễn Việt Nhật Minh², Nguyễn Trần Hùng³, Ngô Đình Nhân⁴, Ngô Hoàng Yến Nhi⁴

¹Học viện Quân y - 160 Phùng Hưng, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Hóa học - Vật liệu - 17 Hoàng Sâm, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Trung học phổ thông Hoài Đức B - thôn Ngãi Cầu, xã An Khánh, huyện Hoài Đức, Hà Nội, Việt Nam

⁴Cục Quản lý Dược, Bộ Y tế - 138A Giảng Võ, quận Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài: 11/5/2025

Ngày chỉnh sửa: 12/5/2025; Ngày duyệt đăng: 19/5/2025

TÓM TẮT

Chúng tôi so sánh nghiên cứu sinh khả dụng của nanoselen bảo chế bằng công nghệ xanh nano từ cao chiết dược liệu với nanoselen bảo chế theo phương pháp truyền thống và selen nguyên liệu (chưa được nano hóa) trên mô hình động vật thực nghiệm. Mẫu máu chứa selen được phân tích bằng phương pháp quang phổ hấp phụ nguyên tử, thẩm định theo hướng dẫn của ICH và AOAC. Kết quả thẩm định phương pháp phân tích cho thấy phương pháp có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, khoảng tuyến tính rộng, độ đúng, độ chính xác và độ ổn định cao. Phương pháp được áp dụng để đánh giá sinh khả dụng của selen trong các mẫu nanoselen và selen thường. Kết quả cho thấy nanoselen tổng hợp theo phương pháp plasma cho hiệu quả hấp thu tương đương với tổng hợp theo công nghệ xanh và cao hơn hẳn so với selen dạng nguyên liệu thông thường. Kết quả bước đầu cho thấy tiềm năng của phương pháp tổng hợp xanh nano áp dụng cho selen so với các phương pháp truyền thống.

Từ khóa: Nanoselen, dịch chiết dược liệu, sinh khả dụng, quang phổ hấp phụ nguyên tử.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Công nghệ nano được coi là một trong những lĩnh vực tiên phong hàng đầu trong khoa học trong thập kỷ qua. Các ứng dụng đa dạng và nhu cầu tăng nhanh của nó đã mở đường cho các biện pháp sáng tạo để tổng hợp các vật liệu nano chất lượng cao hơn. Trong giai đoạn đầu, các phương pháp tổng hợp truyền thống đã được sử dụng và chúng dựa vào cả hóa chất gây ung thư và năng lượng đầu vào cao để sản xuất vật liệu kích thước nano. Để giảm những tác hại và nhược điểm của phương pháp tổng hợp nano truyền thống, tổng hợp xanh được phát triển như là một phương pháp hiệu quả ngang bằng, nếu không muốn nói là hơn, so với tổng hợp truyền thống; nó cung cấp một cách tiếp cận bền vững đối với sản xuất vật liệu nano bằng cách sử dụng các nguyên liệu đầu vào có nguồn gốc tự nhiên và dựa vào các quy trình năng lượng thấp. Việc sử dụng gần đây các phân tử hoạt tính trong các hệ thống sinh học tự nhiên như vi khuẩn, nấm men, tảo và nấm bào cào kết quả thành công trong quá trình tổng hợp nhiều hệ thống hạt nano khác nhau. Vì vậy, việc tích hợp tổng hợp xanh vào nghiên cứu khoa học và sản xuất hàng loạt mang lại giải pháp tiềm năng cho những hạn chế của phương pháp tổng hợp truyền thống.

Selen (Se) phân bố trên vỏ trái đất nhưng với hàm

lượng trung bình nhỏ (khoảng 0,09 ppm), tồn tại trong đất, nước, trong thực vật và động vật. Selen được cung cấp cho cơ thể con người nhờ chế độ dinh dưỡng hằng ngày và qua một số loại dược phẩm có chứa selen. Một số loại thực phẩm chứa nhiều selen là: lúa mì - là cây có chứa selen nhiều nhất, tiếp sau đó là ngô, bắp cải, đậu hà lan, cà rốt, củ cải, cà chua, tỏi, các loại nấm, trong thịt động vật, đặc biệt là trong cá, tôm đồng, sò, hến. Đối với cơ thể con người, selen là nguyên tố vi lượng quan trọng, cần thiết từ 15-70 μg mỗi ngày. Selen có các tác động quan trọng tới sức khỏe con người, như sức khỏe tim mạch, ngăn ngừa thoái hóa thần kinh, chuyển hóa hormone tuyến giáp thích hợp, ngăn ngừa tiến triển ung thư và đáp ứng miễn dịch tối ưu [1]. Selen là một thành phần trong cấu trúc của trung tâm hoạt động của nhiều enzyme chống oxy hóa và các protein chức năng. Selen chủ yếu tồn tại ở hai dạng vô cơ, là selenite (SeO_3^{2-}) và selenate (SeO_4^{2-}) và 2 dạng hữu cơ, là selenomethionine ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$) và selenocysteine ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{Se}$) [2]. Cả hai dạng trên đều có thể là nguồn cung cấp selen tốt cho chế độ ăn uống [3]. Đất có chứa selenit và selenat dạng vô cơ mà thực vật tích tụ và chuyển đổi thành các dạng hữu cơ, chủ yếu là selenocystein và selenomethionin và các dẫn xuất methyl hóa của chúng. Hầu hết selen ở dạng selenomethionine trong mô của động vật và người, và

*Tác giả liên hệ

Email: chuvanmen@vmmu.edu.vn Điện thoại: (+84) 353212500 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD8.2570>

có thể được kết hợp không đặc hiệu với acid amin methionine trong protein cơ thể. Trong cơ thể người, protein chứa selen (selenoprotein) đóng vai trò quan trọng trong viêm mạn tính và khởi đầu các phản ứng miễn dịch, và do đó được coi là tác nhân chống ung thư tốt.

Khả năng chống ung thư của selen đã được xác định trên các dòng tế bào ung thư khác nhau. Mức độ selen đủ là rất quan trọng trong việc điều chỉnh các phản ứng miễn dịch quá mức và viêm mạn tính [4]. Hơn nữa, tác dụng chống oxy hóa của selen đã được chứng minh là có thể bảo vệ các tế bào thực bào và các mô xung quanh khỏi các gốc oxy hóa được tạo ra bởi chuỗi hô hấp của bạch cầu trung tính và đại thực bào trong quá trình thực bào [5]. Sự thiếu hụt selen ảnh hưởng tiêu cực đến hoạt động của các tế bào miễn dịch trong quá trình oxy hóa, gấp protein và thông lượng canxi [6]. Hiện nay các hệ được liệu dạng hạt nano cho thấy hứa hẹn khả năng truyền dẫn thuốc và bổ sung dinh dưỡng hiệu quả. Ví dụ cụ thể là các thực phẩm chức năng có hoạt tính sinh học, như omega-3, omega-6, các khoáng chất, vitamin, men vi sinh... được chế tạo ở dạng các chế phẩm nano, đã được nghiên cứu và có các ứng dụng thực tế. Một số ứng dụng của các dược chất ở dạng hạt nano đã được chấp nhận cho sử dụng trong y tế, trong khi đó nhiều loại khác hiện vẫn đang được nghiên cứu và phát triển. Hạt nanoselen được quan tâm cho phụ gia thực phẩm bởi theo một số nghiên cứu chúng có tính sinh khả dụng cao hơn và độc tính thấp hơn so với ở các dạng hợp chất vô cơ và hữu cơ, mà các hợp chất selen vô cơ có độc tính hơn so với các hợp chất hữu cơ. Các tính chất sinh học của hạt nanoselen phụ thuộc vào kích thước của chúng: kích thước càng nhỏ sẽ có hoạt tính càng cao. Kích thước ảnh hưởng tới sự hấp thu tế bào của hạt nanoselen. Ví dụ với sự hấp thu in vitro đối với hạt có kích thước 100 nm sẽ lần lượt cao hơn 2,5 và 6,0 lần so với các hạt có kích thước 1 μm và 10 μm .

Trong các nghiên cứu trước, chúng tôi đã hoàn thành việc xây dựng quy trình bào chế thành công nanoselen dạng plasma, dịch chiết nha đam và dịch chiết lá vối cho kích thước tiểu phân nano ổn định. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá sinh khả dụng của nanoselen so với selen thông thường để so sánh sự cải thiện khả năng hấp thu cũng như sinh khả dụng của selen dạng nano so với dạng thường, từ đó có các định hướng phát triển các sản phẩm nanoselen tiềm năng trong chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

- Selen dạng dung dịch phân tán với kích thước thông thường; selen nano được tổng hợp bằng phương pháp plasma; nanoselen tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp xanh sử dụng dịch chiết nha đam và lá vối, argon; acid HNO_3 , HClO_4 , HCl , NaBH_4 , NaOH .

- Thiết bị: máy ly tâm, máy quang phổ hấp thụ AAS, tủ lạnh bảo quản, kim công đầu tay.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định lượng selen trong máu

- Nguyên tắc: thành phần selen trong mẫu phân tích ở dạng dung dịch được chuyển sang dạng hợp chất hydrid thể khí nhờ phản ứng với hydrogen mới sinh do natriborohydrid (NaBH_4) tác dụng với acid hydrochloric. Hợp chất hydrid này được thổi liên tục bằng khí argon vào trong buồng nguyên tử hóa. Sử dụng năng lượng nhiệt của ngọn lửa đèn khí khi đốt cháy một hỗn hợp khí để nguyên tử hóa hợp chất hydrid đó, tạo ra các nguyên tử tự do của nguyên tố phân tích cho phép đo quang phổ hấp thụ nguyên tử. Phương pháp F-AAS với kỹ thuật hóa hơi hydrid hóa thường có độ nhạy cao, cho phép định lượng selen trong mẫu cỡ $\mu\text{g/L}$. Trong phép đo này, hệ thống thiết bị hấp thụ nguyên tử cần có thêm bộ phận tạo hydrid. Các điều kiện để tạo ra hợp chất hydrid là vấn đề quan trọng nhất và cần được tối ưu hóa nhằm thu được kết quả phân tích chính xác. Trong phương pháp phân tích selen sử dụng kỹ thuật này, selen trong mẫu phân tích sau khi vô cơ hóa phải ở dạng có mức oxy hóa +4 (H_2SeO_3), sau đó mới bị khử thành dạng hydrid (H_2Se) và nhiệt độ của ngọn lửa để nguyên tử hóa là 2000°C .

- Cách tiến hành: chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc gồm 1000 mg Se/L; từ dung dịch chuẩn gốc tiến hành pha loãng được dung dịch chuẩn trung gian có nồng độ 1 mgSe/l, 100 $\mu\text{gSe/L}$. Đường chuẩn được chuẩn bị theo dãy nồng độ 2 $\mu\text{gSe/L}$, 4 $\mu\text{gSe/L}$, 6 $\mu\text{gSe/L}$, 8 $\mu\text{gSe/L}$ và 10 $\mu\text{gSe/L}$ từ các dung dịch trung gian. Dung dịch pha loãng được sử dụng là HCl 6%.

- Chuẩn bị mẫu:

+ Lắc đều ampul chứa mẫu, lấy 0,5 mL máu vào ống phá mẫu, thêm vào đó 10 mL HNO_3 đặc (65%) và 4 mL HClO_4 (72 %) vào ống phá mẫu thì thấy khí nâu, mẫu sủi bọt nhẹ. Đậy nắp lại, ngâm qua đêm. Sau đó tiến hành phân hủy mẫu trên bếp điện cho khí nâu bay ra hết, nếu mẫu có màu vàng đậm thì thêm tiếp 2 mL HNO_3 65%, tiếp tục đun để khí nâu bay ra hết, tiến hành đun tiếp cho đến lúc khói trắng bay ra và dung dịch còn khoảng 1 mL thì ngưng.

+ Tiến hành khử Se (VI) thành Se (IV): mẫu sau khi xử lý thêm vào 10 mL HCl (1:1), đậy nắp và đặt vào bếp đun cách thủy ở nhiệt độ 80°C trong 20 phút rồi lấy ra để nguội và chuyển vào bình định mức 25 mL, định mức bằng dung dịch HCl 6% đến vạch mức.

- Đo mẫu: mẫu chuẩn và mẫu phân tích được tiến hành đo trên thiết bị quang phổ hấp thụ phân tử AAS contrAA700 của hãng Analytik Jena bằng phương pháp hydrua hóa (HGAAS).

- Thiết lập các thông số đo của thiết bị: sử dụng hệ thống hiệu chỉnh nền đối với hệ HGAAS, lựa chọn bước sóng 196,0 nm đối với selen.

Cài đặt các thông số hệ thống tạo hydrua: nhiệt độ hóa hơi 950°C , tốc độ dòng 25 NL/h, thể tích mẫu thêm vào 5 mL.

Xây dựng đường chuẩn selen trong khoảng nồng độ từ 2-10 µg/L. Để dựng đường chuẩn, đo độ hấp thụ của dung dịch chuẩn với các nồng độ khác nhau của các nguyên tố cần xác định và xác định đường chuẩn từ các kết quả đo lặp lại. Đảm bảo rằng xây dựng đường chuẩn trong dải tuyến tính. Đo trực tiếp dung dịch mẫu. Nếu độ hấp thụ của mẫu nằm ngoài đường chuẩn, thì phải tiến hành pha loãng thích hợp trước khi khử. Khi pha loãng, đảm bảo rằng nồng độ axit trong toàn bộ dung dịch mẫu phân tích với mẫu chuẩn là như nhau.

Tiến hành xây dựng lại đường chuẩn hoặc hiệu chỉnh lại đường chuẩn trước khi đo 1 lô mẫu mới.

Đối với mỗi lô mẫu máu, cần làm mẫu máu trắng và mẫu thêm chuẩn để tính hiệu suất thu hồi, tiến hành xử lý mẫu theo quy trình đã nêu.

Nồng độ selen trong máu được tính theo công thức:

$$C_{Se(\text{máu})} = C_{Se(\text{đường chuẩn})} \times \text{HSPL} \times \text{HSTH}$$

Trong đó: $C_{Se(\text{máu})}$ là nồng độ selen trong máu (µg/L), $C_{Se(\text{đường chuẩn})}$ là nồng độ mẫu đo được trên đường chuẩn (µg/L), HSPL là hệ số pha loãng mẫu, HSTH là hiệu suất thu hồi của quy trình phân tích.

2.2.2. Thẩm định phương pháp

- Khoảng tuyến tính và đường chuẩn: pha dãy dung dịch chuẩn selen trong mẫu trắng máu thỏ có nồng độ trong khoảng từ 2-10 µg/L. Tiến hành xử lý mẫu, đo độ hấp thụ sử dụng theo quy trình xây dựng.

Từ độ hấp thụ của selen thu được tại các nồng độ tương ứng, xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính giữa độ hấp thụ và nồng độ được chất trong mẫu. Đường chuẩn phải có hệ số tương quan $R^2 \geq 0,98$ và ít nhất 75% số điểm của đường chuẩn, bao gồm cả mẫu có nồng độ thấp nhất và mẫu có nồng độ cao nhất phải có độ đúng nằm trong khoảng từ 85-115%, riêng điểm thấp nhất của đường chuẩn cho phép sai số không quá 20%, đồng thời 4/6 điểm QC phải nằm trên đường chuẩn.

- Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): tiến hành xử lý mẫu, đo độ hấp thụ theo quy trình xây dựng với các điều kiện đã chọn đối với mẫu máu thỏ trắng và mẫu chuẩn selen trong máu thỏ trắng có nồng độ khoảng 20 mg/ml với 6 mẫu độc lập. Ghi lại độ hấp thụ của mẫu trắng và mẫu chuẩn. Xác định độ đúng của phương pháp bằng cách so sánh giá trị định lượng được (tính từ đường chuẩn) với giá trị thực pha được có trong mẫu.

Nồng độ được coi là giới hạn định lượng dưới của phương pháp nếu trên sắc ký đồ mẫu chuẩn ở nồng độ đó cho pic selen tách biệt với các pic tạp, có độ đúng từ 80-120%, độ chính xác $\leq 20\%$ và diện tích pic selen ≥ 5 lần diện tích của mẫu trắng.

- Độ đúng, độ chính xác: độ đúng (accuracy) là giá trị phản ánh độ sát gần của kết quả phân tích với giá trị thực của mẫu đã biết, xác định bằng so sánh giá trị định lượng được với giá trị thực có trong mẫu. Độ chính xác (precision) là giá trị phản ánh mức độ chụm giữa các

kết quả phân tích khi lặp lại quy trình phân tích nhiều lần trên cùng một mẫu thử đồng nhất, được biểu thị bằng giá trị CV (%). Độ chính xác bao gồm độ lặp lại trong ngày và độ lặp lại khác ngày. Độ lặp lại trong ngày xác định bằng độ lệch CV% giữa các giá trị định lượng của mỗi nồng độ phân tích trong cùng 1 ngày. Độ lặp lại khác ngày tính bằng độ lệch CV% giữa giá trị các lần định lượng của mỗi nồng độ được phân tích trong các ngày khác nhau.

Phân tích các mẫu QCs đã chuẩn bị đồng thời với đường chuẩn pha trong máu thỏ trắng trong cùng điều kiện (nồng độ định lượng được là nồng độ các mẫu QCs tính theo phương trình hồi quy của đường chuẩn thu được). Xác định nồng độ các mẫu QCs từ phương trình hồi quy thu được.

Tiến hành xử lý mẫu rồi phân tích theo quy trình đã được xây dựng. Mẫu phân tích là các lô mẫu QC bao gồm LQC, MQC và HQC, mỗi lô mẫu gồm ít nhất 5 mẫu độc lập có cùng nồng độ. Ghi lại kết quả độ hấp thụ thu được.

Độ đúng trong ngày được xác định bằng cách tính tỷ lệ % giá trị tìm thấy (tính theo đường chuẩn) so với giá trị thực pha được của các mẫu trong cùng 1 ngày. Độ đúng của phương pháp tại mỗi nồng độ phải nằm trong khoảng từ 85-115%.

Độ chính xác trong ngày thể hiện qua hệ số biến thiên (CV%) giữa giá trị các lần định lượng của mỗi nồng độ được phân tích trong cùng 1 ngày, yêu cầu giá trị CV phải $\leq 15\%$.

Độ đúng và độ chính xác khác ngày: tiến hành tương tự như xác định độ đúng và độ chính xác trong ngày. Tính giá trị tỷ lệ tìm thấy và CV của kết quả định lượng cho mỗi nồng độ trong ít nhất 3 ngày phân tích khác nhau. Giá trị CV phải $\leq 15\%$, độ đúng nằm trong khoảng 85-115%.

2.2.3. Phương pháp đánh giá sinh khả dụng của selen

- Lựa chọn thử nghiệm: thực hiện trên 48 cá thể thỏ, được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm, mỗi nhóm 12 con. Chọn cá thể thỏ đực khỏe mạnh, cân nặng $2,5 \pm 0,3$ kg/con, được theo dõi trước khi tiến hành thí nghiệm 1 tuần. Không cho thỏ ăn trong 12 tiếng trước thời điểm uống thuốc. Và chỉ được cho ăn sau 4 tiếng kể từ thời điểm uống thuốc. Thỏ được uống thuốc 1 liều 5 mL nồng độ 300 ppm selen dạng dung dịch phân tán (tương đương 0,75 mg/kg thể trọng). Nhóm đối chứng được cho uống cùng liều lượng selen thường cùng mức liều.

- Lấy mẫu máu: dùng kim vô khuẩn lấy máu tĩnh mạch rìa tai, mỗi lần lấy khoảng 0,5 ml máu. Lấy máu thỏ cho vào các ống ly tâm sạch đã đánh số có chứa các chất chống đông. Mẫu máu được lấy ngay trước khi cho thỏ uống thuốc (0 giờ) và sau khi uống thuốc 30 phút, 60 phút, 90 phút, 120 phút, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 12 giờ và 24 giờ.

- Bảo quản mẫu máu: sau khi lấy máu, mẫu máu được ly tâm tách huyết tương với tốc độ 5000 vòng/phút

trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Huyết tương được bảo quản lạnh -30°C cho đến khi tiến hành phân tích. Thời gian bảo quản huyết tương không quá 10 ngày. Thời gian giữa 2 đợt thử thuốc cách nhau 3 ngày.

- Phân tích hàm lượng selen trong mẫu máu theo phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử. Xác định các thông số dược động học của nanoselen:

+ C_{max} và T_{max} xác định trực tiếp từ các số liệu thực nghiệm thu được.

+ AUC_{0-t_n} xác định gần đúng bằng phương pháp hình thang, tính từ thời điểm 0 đến thời điểm t_n (điểm cuối cùng có thể xác định được bằng nồng độ thuốc trong máu của từng cá thể) theo công thức:

$$[AUC]_0^t = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{(C_i + C_{i+1}) \times (t_{i+1} - t_i)}{2}$$

Với C_i là nồng độ selen tại thời điểm lấy mẫu t_i .

$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t_n} + C_n/K_e$ với C_n là nồng độ selen tại thời điểm lấy mẫu cuối cùng và K_e là hằng số tốc độ thải trừ.

+ Đánh giá sinh khả dụng in vivo: đánh giá sinh khả dụng của dung dịch phân tán hạt nanoselen thông qua các thông số dược động học như C_{max} , $AUC_{0-\infty}$, MRT và T_{max} theo quy định và so sánh tương đối giữa 3 mẫu dung dịch phân tán hạt nanoselen khác nhau đã tổng hợp và nhóm đối chứng là selen thường.

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối, phương trình hồi quy, hệ số tương quan hồi quy được xác định bằng phần mềm Microsoft Excel 2010.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả xây dựng và thẩm định quy trình định lượng selen trong máu thỏ bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử

- Khảo sát phương pháp: để chọn nồng độ acid hydroclorid thích hợp cho phản ứng tạo dẫn xuất hydrid của selen, chúng tôi tiến hành pha các dung dịch HCl có nồng độ lần lượt là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 N làm môi trường phản ứng, đo độ hấp thụ của dung dịch chuẩn selen 15 ng/mL. Kết quả khảo sát như sau:

Bảng 1. Khảo sát nồng độ HCl

HCl (N)	Độ hấp thụ
1	0,0593
2	0,0632
3	0,0655
4	0,0680
5	0,0690
6	0,0679
7	0,0649

Như vậy, nồng độ HCl thích hợp là 5M.

- Chọn nồng độ natri borohydrat ($NaBH_4$): để có phản ứng tạo dẫn xuất hydrid của selen, ngoài chọn nồng độ HCl thích hợp còn phải có đủ nồng độ chất khử $NaBH_4$. Chúng tôi tiến hành pha các dung dịch $NaBH_4$ có nồng độ khác nhau: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 và 0,7%, đo độ hấp thụ của dung dịch selen chuẩn 15 ng/mL trong từng môi trường. Kết quả khảo sát thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Khảo sát nồng độ $NaBH_4$

$NaBH_4$ (%)	Độ hấp thụ
0,1	0,0618
0,2	0,0662
0,3	0,0675
0,4	0,0689
0,5	0,0679
0,6	0,0670
0,7	0,0642

Nồng độ $NaBH_4$ được chọn là 0,4%.

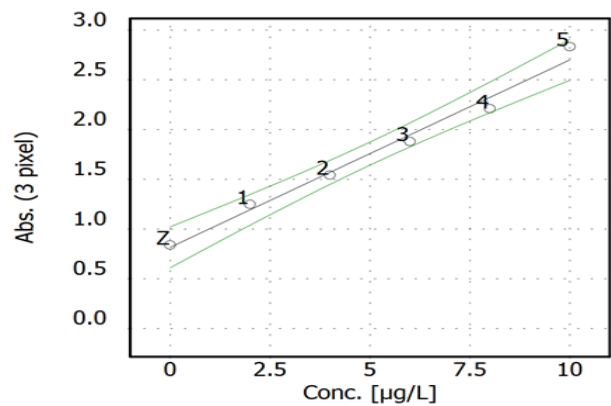
3.2. Kết quả thẩm định phương pháp

3.2.1. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Tiến hành đo độ hấp thụ của dãy dung dịch chuẩn selen đã pha bằng HG-AAS, mỗi phép đo lặp lại 3 lần, kết quả trung bình được thể hiện ở bảng 3. Lập đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa độ hấp thụ và nồng độ dãy chuẩn.

Bảng 3. Sự phụ thuộc của độ hấp thụ vào nồng độ selen

TT	Nồng độ ($\mu g/L$)	Độ hấp thụ (Abs)
1	0,0	0,840
2	2,0	1,248
3	4,0	1,542
4	6,0	1,879
5	8,0	2,210
6	10,0	2,832



Hình 1. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính của độ hấp thụ vào nồng độ selen

Qua đồ thị trên ta thấy khoảng tuyến tính của phép đo nằm trong khoảng từ 0 đến 10 $\mu g/L$.

3.2.2. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Ước lượng giới hạn định lượng của phương pháp xác định selen trong máu thỏ ở khoảng nồng độ 2 µg/L (thấp nhất). Số lần phân tích lặp lại mẫu thăm định là 7.

Bảng 4. Xác định LOD và LOQ

STT	Hàm lượng selen đo được (µg/L)	Giá trị trung bình (µg/L)	SD	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
1	1,9599	2,03	0,051	0,152	0,508
2	2,0136				
3	2,0211				
4	2,0967				
5	1,9965				
6	2,0327				
7	2,0982				

Từ bảng 4, áp dụng công thức tính LOD và LOQ sẽ có: $LOD = 3 \times SD = 0,152$ (µg/L) và $LOQ = 10 \times SD = 0,508$ (µg/L). Kết quả cho thấy phương pháp có giới

hạn phát hiện và giới hạn định lượng khá thấp: $LOD = 0,152$ µg/L và $LOQ = 1,04$ µg/L.

3.2.3. Độ đúng và độ chính xác

Độ thu hồi trung bình tại mức LOQ (theo AOAC giới hạn LOQ tại mức 100 ppb: 80-110%) là 91,3%. Độ lặp lại tính tại mức LOQ so với lý thuyết SDLT (tính theo ISO/TS 13530:2009) là 1,8.

Độ lặp: độ tái lặp và hiệu suất thu hồi của phương pháp được đánh giá cách nhau 8 ngày ở 3 dải nồng độ: thấp, trung bình, cao và so sánh đều đạt với tiêu chuẩn của AOAC. RSDr nằm trong khoảng 6-9% nhỏ hơn so với yêu cầu ($RSDr < 21\%$) và RSDr nằm trong khoảng 7-10% nhỏ hơn so với yêu cầu ($RSDr < 32\%$). Và hiệu suất thu hồi 98,76. theo tiêu chuẩn của AOAC là đạt ($80 < H\% < 110$).

Như vậy phương pháp xây dựng và thăm định đáp ứng được yêu cầu của ICH và AOAC.

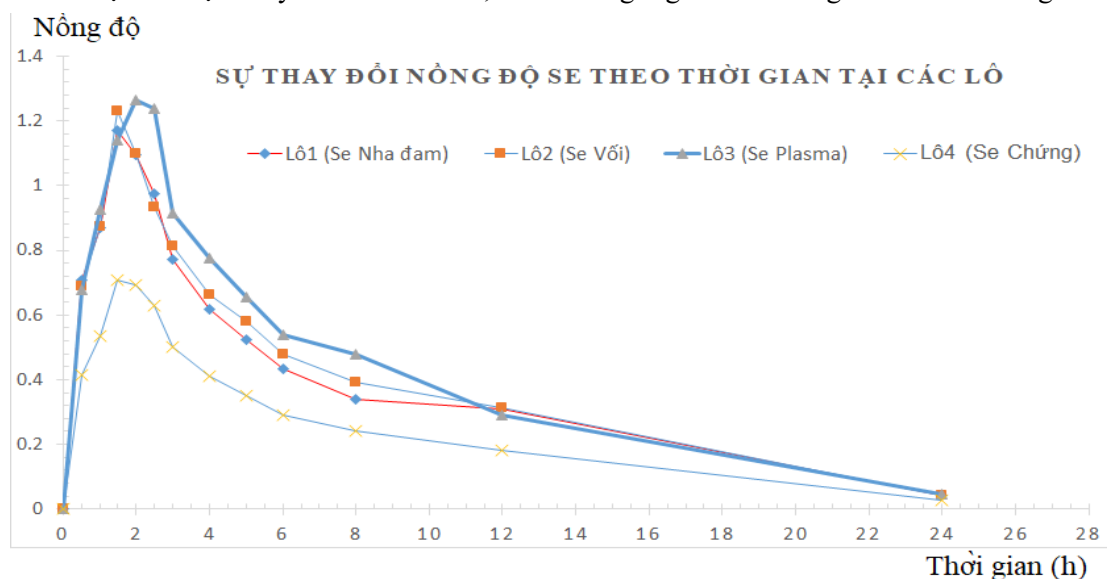
Áp dụng phương pháp phân tích selen trong máu các lô thỏ sau khi được cho uống selen.

Bảng 5. Các thông số dược động học của các mẫu thử nghiệm

Thông số	Tiểu phân selen plasma	Tiểu phân selen nha đam	Tiểu phân selen vối	Nhóm chứng
$t_{1/2}$ (giờ)	$4,90 \pm 0,56$	$4,56 \pm 1,25$	$5,10 \pm 0,58$	$6,30 \pm 0,06$
C_{max} (ng/ml)	$1,49 \pm 0,66$	$1,24 \pm 0,28$	$1,31 \pm 0,27$	$0,77 \pm 0,15$
T_{max} (giờ)	$1,83 \pm 0,44$	$1,79 \pm 0,40$	$1,67 \pm 0,44$	$3,58 \pm 0,79$
AUC_{0-24} (ng/ml.h)	$9,58 \pm 1,85$	$8,51 \pm 2,84$	$8,92 \pm 2,67$	$4,97 \pm 0,88$

Ghi chú: Giá trị được biểu thị qua số trung bình ± độ lệch chuẩn.

Như vậy, selen được hấp thụ trong vòng 0,5 đến 2 giờ đầu, chứng tỏ nanoselen là dạng dễ hấp thụ. Sau 2,5 giờ, cơ thể bắt đầu loại bỏ hoặc chuyển hóa selenium, và đến 24 giờ gần như không còn dấu vết trong máu.



Hình 2. Đường cong nồng độ thuốc trung bình theo thời gian sau khi thỏ uống các loại dung dịch phân tán hạt nanoselen

Giá trị C_{max} trong máu thỏ trung bình khi uống các mẫu dung dịch nanoselen dao động trong khoảng từ $1,24 \pm 0,28$ (ng/ml) đối với nanoselen nha đam đến $1,49 \pm 0,66$

(ng/ml) đối với nanoselen plasma, tuy vậy nhóm selen thường cho C_{max} thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm selen nano hóa.

Giá trị AUC_{0-24} khi uống nanoselen dao động trong khoảng từ $8,51 \pm 2,84$ (ng.h/ml) khi uống nanoselen nha đam đến $9,90 \pm 1,89$ (ng.h/ml) đối với nanoselen plasma và cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm selen thường $4,97 \pm 0,88$ (ng.h/ml). Như vậy, giá trị AUC_{0-24} có sự dao động. Thời gian lấy mẫu cuối cùng (24 giờ) đã thỏa mãn yêu cầu về đánh giá sinh khả dụng theo quy định của FDA.

Thời gian để đạt nồng độ cực đại trong máu thỏ T_{max} trung bình khi uống nanoselen plasma, nanoselen vôi và nanoselen nha đam lần lượt là $1,67 \pm 0,44$ giờ; $1,79 \pm 0,40$ giờ và $1,83 \pm 0,44$ giờ. T_{max} thuốc thử và thuốc chứng đều dao động từ 1-2 giờ, ngắn hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm selen thường $3,58 \pm 0,79$ giờ.

4. BÀN LUẬN

Về kết quả thẩm định phương pháp phân tích, đã tiến hành thẩm định phương pháp phân tích xây dựng được theo hướng dẫn của ICH một cách đầy đủ và đều đạt yêu cầu đối với tất cả các chỉ tiêu đã thẩm định: khoảng nồng độ tuyến tính; giới hạn định lượng dưới; độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày. Phương pháp đã xây dựng và khảo sát có khoảng nồng độ tuyến tính thích hợp (2-10 $\mu\text{g/L}$), đảm bảo phương pháp có đủ độ tin cậy với các mức nồng độ selen định lượng được ở các thời điểm lấy mẫu khác nhau trong cả quá trình khảo sát cũng như đánh giá sinh khả dụng.

Về kết quả đánh giá sinh khả dụng, thiết kế thời điểm lấy mẫu có ý nghĩa quan trọng để có thể ước lượng được C_{max} và bao phủ đường cong nồng độ thuốc trong máu thỏ theo thời gian đủ để ước lượng chính xác mức độ hấp thu, trong đó nên có ít nhất 1-2 điểm trước khi đạt đỉnh C_{max} (pha hấp thụ), 2 điểm xung quanh đỉnh và 3-4 điểm trong pha thải trừ. Tổng số điểm lấy mẫu nên từ 12-18 điểm. Thời gian lấy mẫu phải kéo dài từ 3-5 lần thời gian bán thải của thuốc và kéo dài đến khi nồng độ trong máu thấp hơn 1/10-1/20 đỉnh C_{max} . Các thời điểm lấy mẫu trong nghiên cứu này đã được thiết kế, phân bố hợp lý và đạt yêu cầu, phản ánh được toàn bộ các quá trình hấp thu, phân bố, chuyển hóa và thải trừ của thuốc, bao gồm: 1 điểm trước khi dùng thuốc, 3-4 điểm trước C_{max} , 2-3 điểm xung quanh C_{max} và 3-5 điểm ở pha thải trừ, thời điểm lấy máu cuối cùng 24 giờ sau khi uống thuốc là hợp lý. Sự khác biệt giá trị trung bình của các thông số dược động học của selen khi uống 3 dạng dung dịch phân tán hạt nanoselen là không có ý nghĩa thống kê và cao hơn rõ rệt so với nhóm selen thường. Đối với dạng bào chế tiêu phân selen nha đam và selen vôi, đây là dạng công thức bào chế kết hợp selen với dược liệu nhằm tận dụng đặc tính các tác nhân có trong dược liệu như các thành phần polyphenol nhằm biến đổi dạng oxy hóa của selen, cải thiện hoạt tính sinh học của selen. Bên cạnh đó, trong trạng thái oxy hóa thấp, selen dễ dàng được cải thiện chuyển hóa và hấp thu. Ứng dụng với tiêu phân selen nha đam, selen vôi, với các tác nhân có tính khử lớn trong quá trình sinh tổng hợp của nha đam và vôi, kết hợp với selen tạo thành dạng bào chế mới với sinh khả dụng tốt. Kết quả các thông số được

dược động của 3 dạng dung dịch phân tán hạt nanoselen cho thấy các loại hạt nanoselen đã tổng hợp có mức độ chuyển hóa và hấp thu qua màng tế bào để có mặt trong hệ tuần hoàn của động vật thí nghiệm. Khả năng hấp thu của 3 nhóm nanoselen tốt hơn nhiều so với selen thông thường. Do đó các kết quả này được xem là mở đầu về nghiên cứu sinh khả dụng của hạt nanoselen, cho thấy mức độ chuyển hóa, hấp thu và độc tính của chúng, là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo để có thể sử dụng hạt nanoselen trong các chế phẩm thuốc.

5. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng selen trong máu thỏ. Kết quả thẩm định phương pháp phân tích cho thấy phương pháp có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, khoảng tuyến tính rộng, độ đúng, độ chính xác và độ ổn định cao. Phương pháp được áp dụng để đánh giá sinh khả dụng của selen trong các mẫu nanoselen và selen thường. Kết quả cho thấy nanoselen tổng hợp theo phương pháp plasma cho hiệu quả hấp thu tương đương với tổng hợp theo công nghệ xanh và cao hơn hẳn so với selen dạng nguyên liệu thông thường. Kết quả bước đầu cho thấy tiềm năng của phương pháp tổng hợp xanh nano áp dụng cho selen so với các phương pháp truyền thống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Zhang J.S, Gao X.Y, Zhang L.D, Bao Y.P. Biological effects of a nano red elemental selenium. *BioFactors*, 2001, vol 15, 1, pp. 27-38, doi: 10.1002/biof.5520150103.
- [2] Sunde R.A. Selenium. In: Bowman B, Russell R, eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 9th ed. Washington, DC: International Life Sciences Institute, 2006:480-97.
- [3] Terry E.N, Diamond A.M. Selenium. In: Erdman J.W, Macdonald I.A, Zeisel S.H, eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 10th ed. Washington, DC: Wiley-Blackwell, 2012, 568-87.
- [4] Davis C.D. Selenium supplementation and cancer prevention. *Curr Nutr Rep*, 2012, 1: 16-23.
- [5] Laclaustra M, Navas Acien A, Stranges S, Ordovas J.M, Guallar E. Serum Selenium Concentrations and Hypertension in the US Population. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes*, 2009, vol 2, 4, pp. 369-376, doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.108.831552.
- [6] Huang Z, Rose A.H, Hoffmann P.R. The Role of Selenium in Inflammation and Immunity: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.*, 2012, vol 16, 7, pp. 705-743, doi: 10.1089/ars.2011.4145.
- [7] International Conference on Harmonization (ICH) Q2B. *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Published in the Federal Register, 2023.