

# Ảnh hưởng của những thông số kỹ thuật trong phương pháp hydrat hóa màng phim lipid lên kích thước tiểu phân liposome piroxicam

Lê Thanh Diễm<sup>1\*</sup>, Trịnh Thị Thu Loan<sup>2</sup>, Trần Văn Thành<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Công ty Dược phẩm Imexpharm

<sup>2</sup>Khoa Dược, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 7/8/2017; ngày chuyển phản biện 11/8/2017; ngày nhận phản biện 13/9/2017; ngày chấp nhận đăng 19/9/2017

## **Tóm tắt:**

Piroxicam là một thuốc kháng viêm thuộc dẫn chất oxicam thường được chỉ định trong điều trị bệnh viêm đa khớp, cứng khớp... Tuy nhiên, tác dụng phụ trên hệ tiêu hóa là rất lớn, đặc biệt tình trạng loét dạ dày tá tràng. Vì vậy dạng liposome piroxicam được bào chế bằng phương pháp hydrat hóa màng phim lipid sẽ giúp làm giảm tác dụng phụ của piroxicam. Có nhiều thông số kỹ thuật ảnh hưởng đến sự hình thành liposome như nhiệt độ cô quay, thời gian cô quay, lượng lipid, nhiệt độ hydrat hóa và thời gian hydrat hóa. Do đó để xây dựng quy trình bào chế liposome, các thông số kỹ thuật trong quá trình bào chế được khảo sát để đánh giá sự ảnh hưởng và xác định các thông số kỹ thuật bào chế phù hợp. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu liposome được khuấy tốc độ cao với thiết bị Ultra Turrax có kích thước tiểu phân và dãy phân bố kích thước giảm rõ rệt; siêu âm giúp kích thước tiểu phân nhỏ hơn và phân bố hẹp hơn. Thời gian siêu âm càng dài thì phân bố kích thước càng hẹp, kích thước tiểu phân càng giảm.

**Từ khóa:** Hydrat hóa màng phim, liposome, piroxicam.

**Chỉ số phân loại:** 3.4

## **Đặt vấn đề**

Liposome đã được ứng dụng trong mỹ phẩm từ những năm 70 và dược phẩm vào những năm 90 của thế kỷ trước. Hiện nay, nhiều thuốc có cấu trúc liposome đã được công bố và ứng dụng trong điều trị qua cả 3 đường uống, tiêm và dùng ngoài. Dạng bào chế liposome có những ưu điểm so với dạng bào chế truyền thống như phù hợp sinh lý cơ thể, có thể mang cả dược chất thân nước lẫn thân dầu, bảo vệ hoạt chất tránh tác động lý hóa của môi trường, tác dụng đặc hiệu trên đích sinh học. Riêng đối với thuốc dùng ngoài, liposome có ưu điểm làm tăng khả năng thẩm qua da của hoạt chất [1-4].

Piroxicam là một thuốc kháng viêm thuộc dẫn chất oxicam có tác dụng kháng viêm, giảm đau, hạ sốt, thường được chỉ định trong điều trị bệnh viêm đa khớp, cứng khớp... Sinh khả dụng tuyệt đối của piroxicam trên 90% sau khi dùng liều duy nhất đường uống, nhưng tác dụng phụ trên hệ tiêu hóa là rất lớn, đặc biệt tình trạng loét dạ dày tá tràng. Vì vậy, để ứng dụng các cải tiến mới trong kỹ thuật bào chế dược phẩm và tăng cường hấp thu thuốc qua da nhằm giảm tác dụng phụ của piroxicam, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu là bào chế được liposome piroxicam bằng phương pháp hydrat hóa màng phim lipid. Tuy nhiên, kích thước tiểu phân liposome cũng như hiệu suất bắt giữ hoạt chất phụ thuộc rất nhiều vào các thông số kỹ thuật. Việc giảm kích thước tiểu phân liposome và tăng

hiệu suất tải hoạt chất sẽ giúp hệ trị liệu đạt hiệu quả tốt hơn và do đó có thể làm giảm độc tính. Từ lý do đó, đề tài tiến hành đánh giá ảnh hưởng của các thông số kỹ thuật lên hiệu quả điều chế hệ liposome tải piroxicam.

## **Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu**

### ***Nguyên liệu và thiết bị***

Piroxicam (Trung Quốc) tiêu chuẩn USP 31, piroxicam chuẩn (Viện Kiểm nghiệm thuốc TP Hồ Chí Minh), phospholipon 90G (Đức) tiêu chuẩn USP 32, cloroform (Pháp) tiêu chuẩn BP 2010, dinatri hydrophosphat (Trung Quốc) tiêu chuẩn USP 31, natri dihydrophosphat (Trung Quốc) tiêu chuẩn USP 31.

Kính hiển vi (KHV) quang học Olympus CX21-FS1 (Nhật), KHV điện tử truyền qua Jem-1400 (Nhật), máy đo quang phổ UV-Vis UV 1800 (Nhật), máy cô quay chân không 1 lít Buchi R210S (Thụy Sĩ), máy đo phân bố kích thước hạt Horiba LA-920 (Nhật), máy đồng nhất hóa Ultra Turrax IKA-T25 (Đức), máy siêu âm đầu dò Sonic VCX-130PB (Mỹ), máy phân tích nhiệt vi sai (DSC) Mettler Toledo DSC (Thụy Sĩ).

### ***Phương pháp nghiên cứu***

***Khảo sát các thông số kỹ thuật trong quá trình bào chế liposome piroxicam:*** Liposome piroxicam được bào chế bằng phương pháp tạo màng phim và hydrat hóa màng phim

\*Tác giả liên hệ: Email: lethanhdiem@gmail.com

# Impact of technical parameters in thin-film lipid hydration method on the particle size of piroxicam liposomes

Thanh Diem Le<sup>1\*</sup>, Thi Thu Loan Trinh<sup>2</sup>, Văn Thanh Tran<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Imexpharm Pharmaceutical Company

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city

Received 7 August 2017; accepted 19 September 2017

## Abstract:

Piroxicam is an oxycam-induced anti-inflammatory drug commonly prescribed for the treatment of arthritis, rheumatism... However, side effects in the gastrointestinal tract are very high, especially in peptic ulcer disease. Thus, piroxicam liposomes formulated by lipid film hydration method will reduce the side effects of piroxicam. There are many technical parameters that influence liposome formation such as spin speed, rotation time, lipid content, hydration temperature, and hydration time. Therefore, in order to establish the liposome preparation process, technical parameters during the preparation process were investigated to assess their effects and determine the appropriate preparation parameters. The results showed that liposomes which were stirred with high speed had small size and narrow distribution; ultrasound made the size smaller and the distribution narrower. The longer the ultrasound duration was applied, the narrower the size distribution and the smaller the size of the liposomes were.

**Keywords:** Liposome, piroxicam, thin-film hydration.

**Classification number:** 3.4

(phương pháp Bangham). Có nhiều thông số kỹ thuật ảnh hưởng đến sự hình thành liposome như nhiệt độ cô quay, thời gian cô quay, lượng lipid, tỷ lệ lipid và cloroform, nhiệt độ hydrat hóa và thời gian hydrat hóa. Do đó để xây dựng quy trình bào chế liposome, các thông số kỹ thuật trong quá trình bào chế được khảo sát để đánh giá sự ảnh hưởng và xác định các thông số kỹ thuật bào chế phù hợp.

Nhiệt độ cô quay và nhiệt độ hydrat hóa [5, 6]: Phospholipon 90G được sử dụng để bào chế liposome piroxicam. Nhiệt độ chuyển pha và nhiệt độ nóng chảy hoàn toàn của phospholipon 90G được xác định bằng thiết bị DSC Mettler Toledo DSC. Từ đó xác định nhiệt độ cô quay và nhiệt độ hydrat hóa. Nhiệt độ cô quay và nhiệt độ hydrat hóa phải cao hơn nhiệt độ chuyển pha và thấp hơn nhiệt độ nóng chảy hoàn toàn của phospholipon 90G.

Tỷ lệ lipid và cloroform: Lượng phospholipon 90G và thể tích dung môi được khảo sát sao cho lớp phim hình thành sau khi cô quay phải mỏng, phân tán liên tục và không có bọt khí. Việc đánh giá tính chất của lớp phim dựa vào cảm quan.

Các thông số khác của quá trình cô quay: Các thông số như tốc độ quay của máy khi tạo lớp phim và khi hydrat hóa, thời gian cô quay, thời gian hydrat hóa... sẽ được xác định qua thực nghiệm bằng cách dựa vào chất lượng lớp phim và khả năng phim phân tán đều khi được hydrat hóa.

*Phương pháp giảm kích thước tiểu phân liposome:* Liposome sau khi được bào chế theo phương pháp Bangham thường có kích thước lớn và phân bố kích thước không đồng đều, do đó phải giảm kích thước liposome. Trong nghiên cứu này, liposome piroxicam sau khi được bào chế sẽ được giảm kích thước bằng thiết bị Ultra Turrax và máy siêu âm đầu dò.

Khảo sát tốc độ và thời gian khuấy những mẫu liposome chưa mang hoạt chất bằng thiết bị Ultra Turrax, từ đó đánh giá sự ảnh hưởng của tốc độ khuấy và thời gian khuấy đến kích thước tiểu phân và phân bố kích thước tiểu phân liposome.

Mẫu liposome sau khi được khuấy bằng thiết bị Ultra Turrax sẽ được tiếp tục giảm kích thước bằng máy siêu âm đầu dò (Prope Sonicator). Thể tích mẫu siêu âm, công suất của máy và độ sâu của thanh siêu âm trong mẫu được giữ cố định. Thời gian siêu âm được khảo sát thông qua việc xác định kích thước tiểu phân và phân bố kích thước tiểu phân.

*Phương pháp bào chế liposome piroxicam:* Liposome piroxicam được bào chế theo các bước sau:

a/ Hòa tan phospholipon 90G, piroxicam trong cloroform trong bình quả lê.

b/ Cô quay ở nhiệt độ, tốc độ quay phù hợp để tạo thành màng lipid bám trên thành bình. Tiếp tục cô quay để dung môi bay hơi hoàn toàn.

c/ Cho dung dịch đậm vào bình với nhiệt độ và thời gian hydrat hóa, tốc độ quay phù hợp tạo liposome piroxicam.

d/ Khuấy liposome bằng máy Ultra Turrax với tốc độ và thời gian phù hợp.

e/ Siêu âm bằng máy siêu âm đầu dò với thời gian siêu âm phù hợp.

f/ Mẫu liposome được để ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ.

g/ Bảo quản liposome ở nhiệt độ 2-8°C trong lọ thủy tinh kín, tránh ánh sáng.

**Phương pháp đánh giá tính chất liposome:**

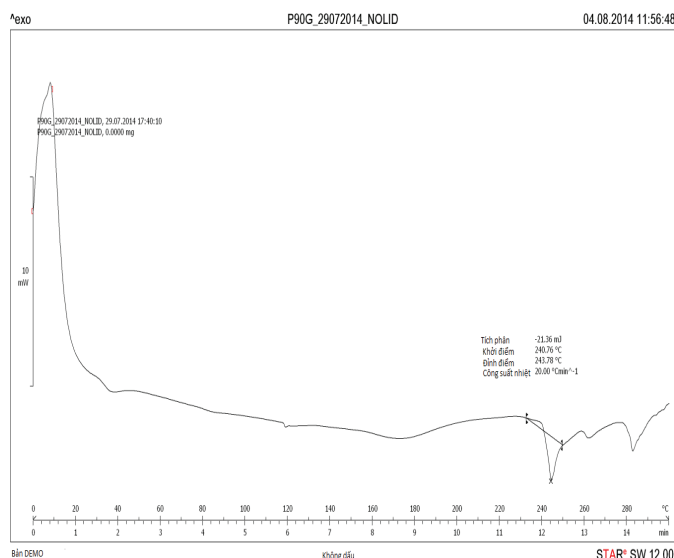
**Cảm quan:** Quan sát bằng mắt dưới ánh sáng tự nhiên hỗn dịch liposome phải đồng nhất có màu vàng, không có hiện tượng kết bông, nổi kem, lắng cặn.

**Kích thước, phân bố kích thước tiểu phân:** Kích thước và phân bố kích thước tiểu phân liposome được xác định bằng phương pháp tán xạ laser. Mẫu được cho vào bộ phận tiếp nhận, sau đó cài đặt các thông số trên máy đo kích thước tiểu phân như sau: 1) Tốc độ trộn mẫu: Mức 5, tốc độ siêu âm (mức 3 trong thời gian 1 phút); 2) Môi trường phân tán: Nước cất.

## Kết quả và bàn luận

**Kết quả khảo sát các thông số kỹ thuật trong quá trình bào chế liposome piroxicam**

**Nhiệt độ cô quay và hydrat hóa:** Kết quả DSC cho thấy, khoảng nhiệt độ từ 231°C trở lên phospholipon 90G bị chảy hoàn toàn và có thể bị phân hủy hoặc bị oxy hóa. Nhiệt độ chuyển pha của phospholipon 90G có thể từ 30 đến 50°C (hình 1). Vì vậy nhiệt độ cô quay được xác định là 40°C và nhiệt độ hydrat hóa là 45°C.



**Hình 1. Phổ quét nhiệt vi sai của phospholipon 90G.**

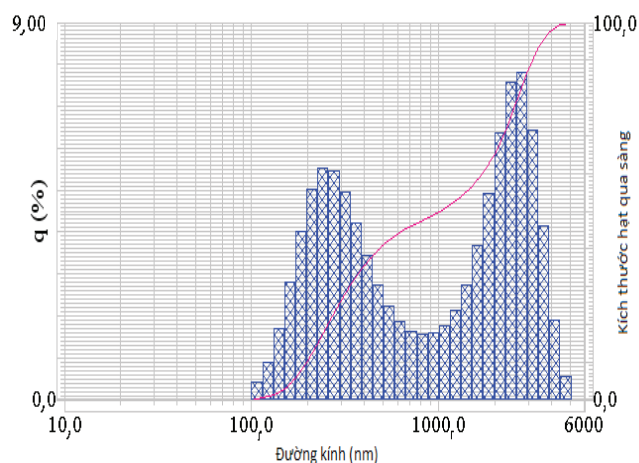
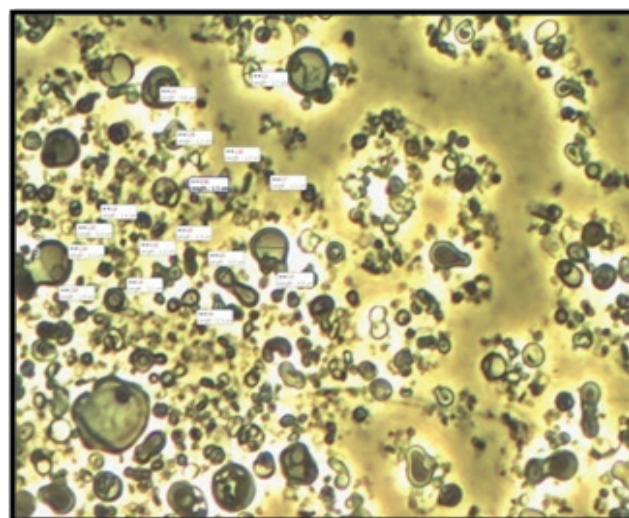
**Tỷ lệ lipid và cloroform:** Màng phim được tạo với lượng phospholipon 90G tăng dần so với dung môi cloroform, kết quả cho thấy với tỷ lệ phospholipon 90G/cloroform là 1.000 mg/50 ml cho lớp phim mỏng, phân tán liên tục trên thành bình, đáp ứng yêu cầu để được hydrat hóa tạo liposome.

**Các thông số khác của quá trình cô quay:** Các thông số khác của quá trình cô quay như thời gian cô quay và thời gian hydrat hóa, tốc độ quay của máy được xác định qua thực nghiệm, đảm bảo tạo lớp phim mỏng, phân tán liên tục trên thành bình và phân tán đều trong dung dịch đệm khi được hydrat hóa.

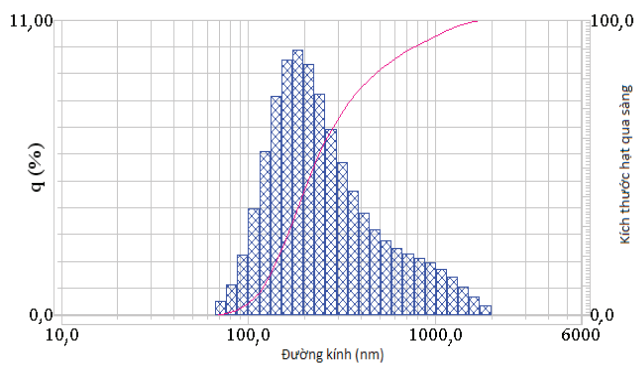
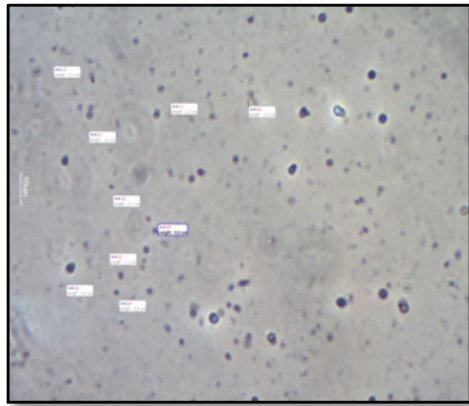
Kết quả khảo sát cho thấy thời gian cô quay phù hợp là 2 giờ và thời gian để lớp phim được phân tán hoàn toàn trong dung dịch đệm là 1 giờ, tốc độ cô quay và tốc độ hydrat hóa lần lượt ở mức 5 và 8.

**Kết quả về phương pháp giảm kích thước tiểu phân liposome**

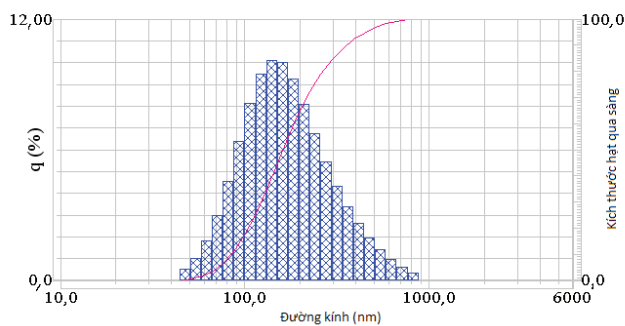
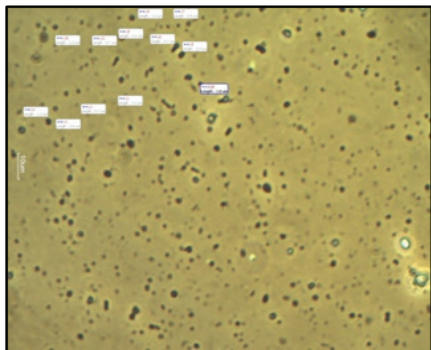
**Kết quả khảo sát tốc độ khuấy của thiết bị Ultra Turrax:** Sự ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến kích thước tiểu phân và phân bố kích thước tiểu phân được đánh giá trong thời gian 15 phút ở các tốc độ 10.000, 15.000 và 19.000 vòng/phút. Kết quả được minh họa từ hình 2 đến hình 5 và bảng 1.



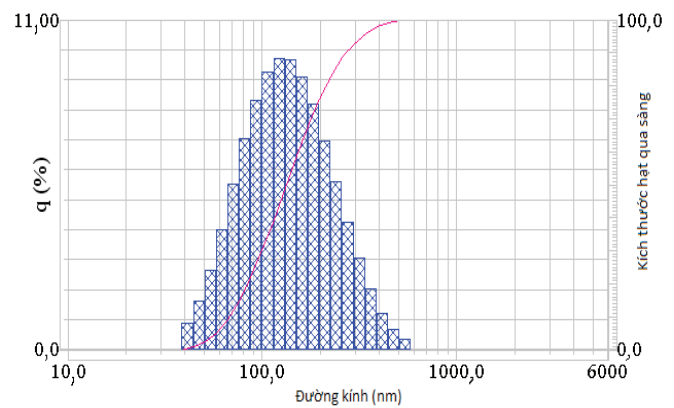
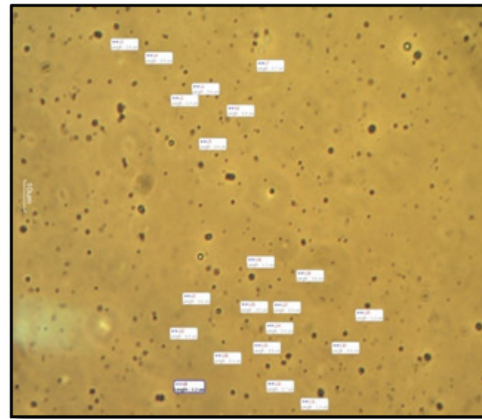
**Hình 2. Hình chụp kích thước tiểu phân trên KHV quang học vật kính 100x và biểu đồ phân bố kích thước của liposome chưa được khuấy giảm kích thước.**



Hình 3. Hình chụp kích thước tiểu phân trên KHV quang học vật kính 100x và biểu đồ phân bố kích thước của liposome được khuấy tốc độ 10.000 vòng/phút.



Hình 4. Hình chụp kích thước tiểu phân trên KHV quang học vật kính 100x và biểu đồ phân bố kích thước của liposome được khuấy tốc độ 15.000 vòng/phút.



Hình 5. Hình chụp kích thước tiểu phân trên KHV quang học vật kính 100x và biểu đồ phân bố kích thước của liposome được khuấy tốc độ 19.000 vòng/phút.

Bảng 1. Phân tích biểu đồ phân bố kích thước tiểu phân của liposome được khuấy với tốc độ khác nhau.

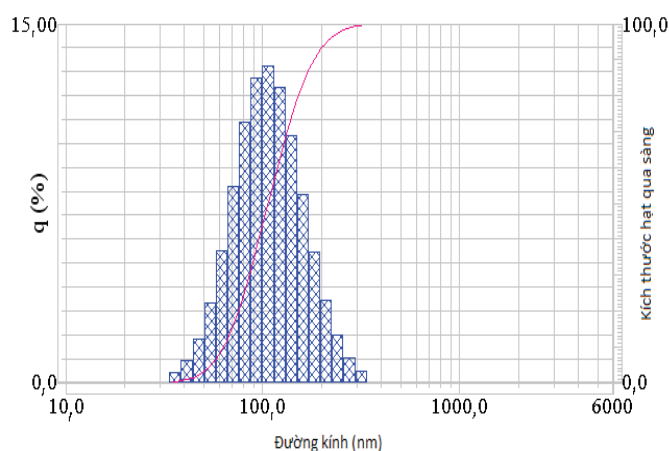
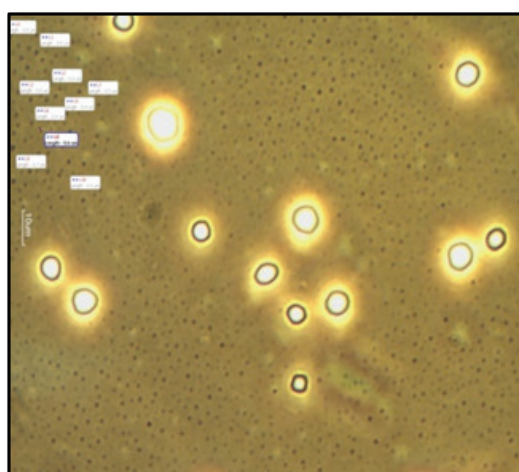
| Tốc độ khuấy (vòng/phút) | 0.000        | 10.000      | 15.000     | 19.000     |
|--------------------------|--------------|-------------|------------|------------|
| Kiểu phân bố             | 2 đỉnh       | 1 đỉnh      | 1 đỉnh     | 1 đỉnh     |
| Dãy phân bố              | 114,5-5122,3 | 76,2-1980,8 | 50,7-877,3 | 44,3-583,9 |
| $D_{50}$ (median)        | 1006,5       | 223,1       | 160,9      | 133,1      |
| $D_{mean}$ (mean)        | 1408,2       | 335         | 196,3      | 154,6      |
| $D_m$ mode               | 2753,3       | 184         | 140,9      | 122,9      |

Kết quả bảng 1 cho thấy, mẫu liposome không được khuấy tốc độ cao có dãy phân bố kích thước tiểu phân rộng, kích thước tiểu phân lên đến hàng  $\mu\text{m}$  và có hai đỉnh phân bố, do đó mẫu liposome không đạt kích thước và phân bố kích thước mong muốn. Các mẫu liposome được khuấy tốc độ cao với thiết bị Ultra Turrax có kích thước tiểu phân và dãy phân bố kích thước giảm rõ rệt. Trong đó mẫu liposome được khuấy với tốc độ 19.000 vòng/phút có kích thước và

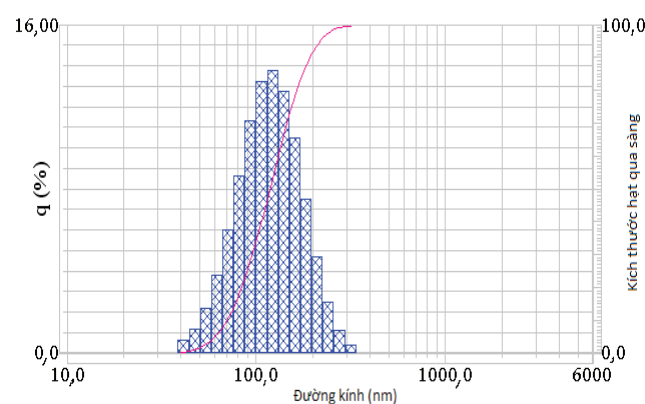
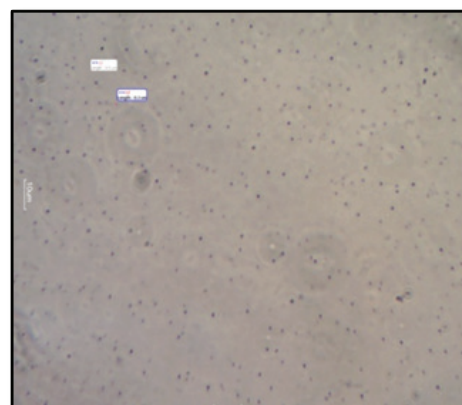
phân bố kích thước tiểu phân nhỏ nhất so với các mẫu còn lại. Vì vậy tốc độ khuấy 19.000 vòng/phút được lựa chọn để giảm kích thước liposome. Tuy nhiên, kết quả cho thấy sự phân bố kích thước tiểu phân liposome vẫn còn khá rộng, do đó mẫu liposome sau khi được khuấy tốc độ cao sẽ tiếp tục được khuấy siêu âm để các tiểu phân có kích thước lớn tiếp tục được phá vỡ và tái tạo lại liposome có kích thước nhỏ hơn.

### Kết quả khảo sát thời gian siêu âm

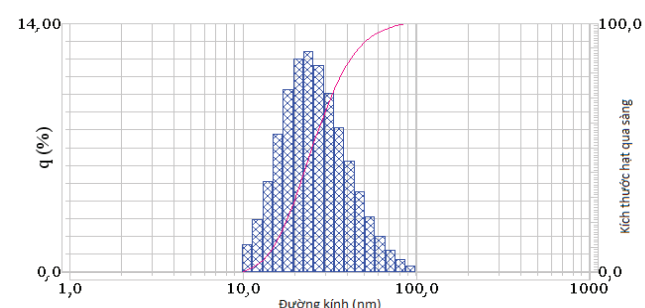
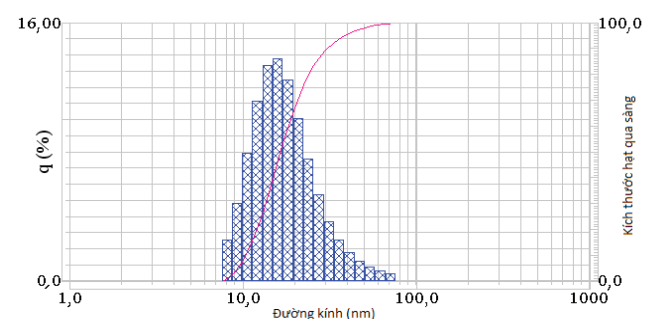
Mẫu liposome sau khi được khuấy tốc độ 19.000 vòng/phút trong 15 phút bằng thiết bị Ultra Turrax sẽ được tiếp tục giảm kích thước bằng thiết bị siêu âm đầu dò. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian siêu âm được minh họa trong hình 6 đến hình 8 và bảng 2.



Hình 6. Hình chụp kích thước tiểu phân trên KHV quang học vật kính 100x và biểu đồ phân bố kích thước tiểu phân sau 3 phút siêu âm.



Hình 7. Hình chụp kích thước tiểu phân trên KHV quang học vật kính 100x và biểu đồ phân bố kích thước tiểu phân sau 6 phút siêu âm.



Hình 8. Biểu đồ phân bố kích thước tiểu phân sau 12 phút (trên) và 15 phút (dưới) siêu âm.

Kết quả của hình 6, 7 và 8 cho thấy, siêu âm giúp kích thước tiểu phân nhỏ hơn và phân bố hẹp hơn. Thời gian siêu âm càng dài thì phân bố kích thước càng hẹp, kích thước tiểu phân càng giảm; tỷ lệ % các tiểu phân có kích thước hàng trăm nm giảm theo thời gian siêu âm. Tuy nhiên, khi siêu âm từ 12 phút trở lên xuất hiện những tiểu phân liposome có kích thước dưới 20 nm, điều này có thể do các liposome đã bị phân hủy tạo thành các mảng lipid kép. Vì vậy thời gian siêu âm 6 phút được chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.

**Bảng 2. Kết quả phân tích biểu đồ phân bố kích thước tiểu phân của liposome được khuấy siêu âm với thời gian khác nhau.**

| Thời gian                | 0 phút     | 3 phút     | 6 phút     | 12 phút  | 15 phút  |
|--------------------------|------------|------------|------------|----------|----------|
| Kiểu phân bố             | 1 đỉnh     | 1 đỉnh     | 1 đỉnh     | 1 đỉnh   | 1 đỉnh   |
| Dãy phân bố              | 44,3-583,9 | 44,3-445,2 | 38,7-339,3 | 11,4-100 | 8,7-76,2 |
| D <sub>50</sub> (median) | 133,1      | 118,1      | 104,6      | 25,2     | 16,5     |
| D <sub>mean</sub> (mean) | 154,6      | 125,8      | 121,5      | 28,6     | 19,2     |
| D <sub>m</sub> mode      | 122,9      | 122,3      | 93,7       | 24       | 15,9     |

## Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các thông số kỹ thuật bào chế bằng phương pháp hydrat hóa màng phim đã được khảo sát đều ảnh hưởng đến kích thước tiểu phân liposome piroxicam. Từ kết quả nghiên cứu, công thức liposome piroxicam cơ bản và các thông số kỹ thuật được xác định như sau:

## Thành phần công thức

|                                            |        |
|--------------------------------------------|--------|
| Piroxicam                                  | 0,25 g |
| Phospholipon 90G                           | 1 g    |
| Cloroform                                  | 50 ml  |
| Dung dịch đệm pH 7,4 (hydrat hóa lớp phim) | 50 ml  |

## Thông số kỹ thuật

|                                            |                  |
|--------------------------------------------|------------------|
| Nhiệt độ cô quay                           | 40°C             |
| Thời gian cô quay                          | 2 giờ            |
| Tốc độ cô quay                             | mức 5            |
| Nhiệt độ hydrat hóa                        | 45°C             |
| Thời gian hydrat hóa                       | 1 giờ            |
| Tốc độ hydrat hóa                          | mức 8            |
| Tốc độ khuấy trên thiết bị Ultra Turrax    | 19.000 vòng/phút |
| Thời gian khuấy trên thiết bị Ultra Turrax | 15 phút          |
| Thời gian siêu âm                          | 6 phút           |

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. Banerjee (2001), "Liposomes: Applications in medicine", *Journal of Biomaterials applications*, **16**, pp.3-21.
- [2] S. Clerc, Y. Barenholz (1995), "Loading of amphipathic weak acid into liposome in response to transmembrane calcium acetate gradients", *Biochem. et Biophys. Acta*, pp.257-265.
- [3] J.S. Dua, A.C. Rana, A.K. Bhandri (2010), "Liposome: methods of preparation an application", *International Journal of Pharmaceutical Studies and Researchs*, **3**, pp.14-20.
- [4] R. Koynova, M. Caffrey (1998), "Phase and phase transitions of the phosphatidylcholines", *Biochimica et Biophysica Acta*, **1376**, pp.91-145.
- [5] Carla Caddeo, Mari Manconi, Donatella, et al. (2012), "The role of Labrasol in the enhancement of the cutaneous bioavailability of Minoxidil in phospholipid vesicles", *Research J. Pharm. and Tech.*, **5**, pp.1563-1569.
- [6] L.A. Meure, N.R. Foster, F. Dehghani (2008), "Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes", *Pharmaceutical Sciences Technology*, **9(3)**, pp.798-809.