

NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ LIPOSOME DOXORUBICIN VÀ AMPHOTERICIN B BẰNG PHƯƠNG PHÁP HYDRAT HÓA FILM

PHẠM THỊ MINH HUỆ, NGUYỄN VĂN LÂM

Đại học Dược Hà Nội

NGUYỄN TUẤN QUANG

Học viện Quân y

Nghiên cứu bào chế liposome bằng phương pháp hydrat hóa film với các thành phần chính bao gồm doxorubicin/amphotericin B, phosphatidylcholine đậu tương được hydro hóa, distearoyl phosphatidylglycerol và cholesterol. Đã khảo sát được các yếu tố thuộc về công thức cũng như quy trình bào chế ảnh hưởng đến kích thước liposome tạo ra và hiệu suất gắn dược chất. Kết quả cho thấy, các liposome thu được có kích thước nhỏ (dưới 200 nm với doxorubicin và dưới 300 nm với amphotericin B), đồng nhất, đơn lớp (đơn vị chỉ số lượng điểm trên một inch vuông PDI <0,2) và tỷ lệ mang dược chất cao (trên 90% với doxorubicin và trên 85% với amphotericin B).

Từ khóa: liposome, doxorubicin, amphotericin B, hydrat hóa film.

STUDY ON PREPARATION OF LIPOSOME BY THIN FILM HYDRATION METHOD

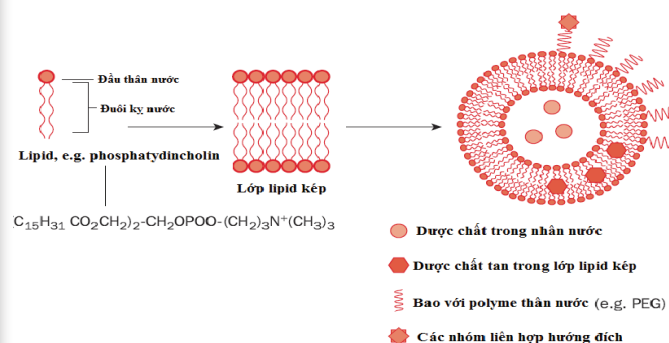
Summary

Liposome is prepared by thin film hydration method with main ingredients including doxorubicin/amphotericin B, hydrogenated soybean phosphatidylcholine, distearoyl phosphatidylglycerol and cholesterol. Some parameters belonging to the formula as well as the preparation procedure which affect the liposome size and the performance of drug entrapment have been investigated. The results have shown that the obtained liposome has had small dimensions (below 200 nm by doxorubicin and below 300 nm by amphotericin B), consistent distribution (PDI<0.2), and high percentage of drug entrapment (above 90% by doxorubicin and above 85% by amphotericin B).

Keywords: liposome, doxorubicin, amphotericin B, thin film hydration.

Đặt vấn đề

Liposome được phát minh năm 1965 bởi Alec Bangham và cộng sự tại một viện nghiên cứu ở Babraham, Cambridge [1]. Liposome là chất mang nhỏ, hình cầu, có cấu trúc gồm một nhân nước ở giữa được bao bọc bởi một vỏ lipid kép (hình 1).



Hình 1: mô tả cấu trúc liposome như một hệ mang thuốc

Dược chất có thể được gắn vào liposome ở khoang nước hoặc ở các lớp lipid, do vậy liposome mang được cả dược chất thân dầu và thân nước. Liposome có thể mang được các dược chất có khối lượng phân tử khác nhau như các phân tử dược chất nhỏ, protein, nucleotid, thậm chí các plasmid. Do

cấu trúc và đặc tính riêng, liposome được coi là hệ phân phối thuốc có khả năng phân huỷ sinh học, dung nạp và gắn với tổ chức đích [1, 3].

Doxorubicin là một kháng sinh anthracilin được phân lập từ *Streptomyces peuceitius* var. *caesius*, được đưa vào sử dụng trong lâm sàng từ thập kỷ 70 của thế kỷ trước để điều trị ung thư. Tuy nhiên, doxorubicin có độc tính rất cao, đặc biệt chèn ép tủy và gây độc tính trên tim.

Amphotericin B là một thuốc điều trị nhiễm nấm toàn thân phổ rộng và có hoạt tính kháng nấm mạnh đã được sử dụng trong lâm sàng. Tuy nhiên, hạn chế của dược chất này là hầu như không tan trong nước nên sinh khả dụng không cao và thuốc gây nhiều tác dụng không mong muốn, đặc biệt là gây độc cho thận. Vấn đề này càng trở nên trầm trọng ở bệnh nhân nhiễm nấm xâm lấn toàn thân do suy giảm miễn dịch, ung thư.

Mục tiêu của việc gắn các dược chất vào liposome là giảm độc tính đối với các cơ quan lành. Liposome có khả năng tránh đưa dược chất tới các vị trí có mạch hẹp như cơ tim. Vì vậy, việc nghiên cứu bào chế liposome mang các dược chất như doxorubicin và amphotericin B để ứng dụng trong các chế phẩm nhằm giúp kiểm soát giải phóng, tăng sinh khả dụng và làm giảm độc tính là vấn đề có tính khoa học và cấp thiết. Hơn nữa, 2 dược chất lựa chọn có đặc tính về độ tan khác nhau, doxorubicin dùng dưới dạng hydroclorid dễ tan trong nước, trong khi amphotericin B không tan trong nước. Để đưa 2 dược chất này vào liposome cần các cơ chế khác nhau, nghiên cứu còn nhằm mục tiêu phát triển kỹ thuật bào chế mới, chưa được triển khai trong nước, góp phần phát triển ngành công nghiệp dược phẩm Việt Nam.

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu, thiết bị và dụng cụ nghiên cứu

Nguyên liệu: Doxorubicin hydroclorid (DOX-USP), amphotericin B (AmB), phosphatidyl cholin đậu nành hydrogen hóa (HSPC-Lipoid, Đức); cholesterol (chol-Sigma Aldrich), distearoyl phosphatidylglycerol (DSPG), acid N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic (HEPES), dinatri hydrophosphat, dinatrisuccinat hexahydrat, kali dihydrophosphat, acid citric, acid succinic, lactose, sucrose, mannitol, natri hydroxyd, cloroform, ethanol, methanol, N,N-dimethylacetamid (DMA), natri EDTA và các hóa chất dung môi khác đạt tiêu chuẩn của Hội đồng Dược điển Hoa Kỳ (USP), tiêu chuẩn nhà sản xuất hoặc tinh khiết hóa học. Acetonitril, methanol dùng cho phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Thiết bị và dụng cụ: hệ thống cất quay Rovapor

R-210 (Buchi - Đức); bể siêu âm Wise clean (Hàn Quốc); máy đồng nhất hoá CAT Unidrive X1000 (Đức); thiết bị đùn/ép- liposome extruder (Mỹ); thiết bị đùn/ép cao áp EmulsiFlex-c5 (Avestin - Canada); túi thẩm tích spectra pore 4, 12-14kD (Spectrum laboratory - Mỹ); thiết bị lọc tiếp tuyến MicroKros Filter Modiles (Spectrum Labs - Mỹ); hệ thống thiết bị phân tích kích thước Zetasizer nano ZS90 (Malvern - Anh); hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC Aligent; máy đo quang Hitachi U-1800 (Nhật Bản); kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) JEOL 1010 (Nhật Bản); máy đông khô Labocono Freezone Triad 740030 (Mỹ); máy đo pH InoLab... và các dụng cụ, thiết bị khác.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp bào chế liposome doxorubicin: 1) Phương pháp hydrat hoá film lipid: hòa tan HSPC và chol trong cloroform. Tiến hành bốc hơi dung môi trên thiết bị cất quay ở nhiệt độ 40°C trong điều kiện chân không, tốc độ quay là 50 vòng/phút trong 12 h. Sau đó hydrat hóa lớp film lipid tạo thành với dung dịch đệm citrat 300 mM pH 4 (hoặc đệm amonisulfat 130 mM) ở 60°C. Hỗn dịch liposome tạo ra ở trên được đồng nhất hóa bằng cách nén qua màng polycarbonat với các kích thước khác nhau trên thiết bị phù hợp ở 55°C [2]. 2) Phương pháp đưa dược chất vào liposome: liposome đạt yêu cầu về kích thước tiểu phân (KTTP) sẽ được gắn DOX bằng cách dùng thiết bị lọc tiếp tuyến thay đệm citrat pH 4 hoặc đệm amoni sulfat bên ngoài liposome thành đệm Hepes pH 7,4. Nâng nhiệt độ của hỗn dịch liposome lên 50°C rồi hòa tan DOX vào để đạt hàm lượng 2 mg/ml và ủ trong 15 phút. Liposome doxorubicin được bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C.

Phương pháp bào chế liposome amphotericin B: liposome AmB được nghiên cứu bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film như doxorubicin với các thành phần chính gồm AmB, DSPG, HSPC, chol. Điều kiện hydrat hoá film: hệ thống cất quay Rovapor R-210 (Buchi - Đức); nhiệt độ cất quay: 40°C; tốc độ quay khi tráng film: 150 vòng/phút trong 30 phút đầu, 50 vòng/phút trong thời gian còn lại của quá trình; nhiệt độ hydrat hóa: 50°C; tốc độ quay khi hydrat: 200 vòng/phút. Hỗn dịch liposome tạo ra được đồng nhất hóa bằng cách nén qua màng polycarbonat với các kích thước khác nhau trên thiết bị phù hợp ở 55°C [2].

Phương pháp đánh giá liposome: 1) Đánh giá cấu trúc và hình thái liposome: sử dụng phương pháp chụp hiển vi điện tử truyền qua (TEM) với kỹ thuật nhuộm soi âm bản. 2) Đánh giá kích thước và phân bố kích thước của liposome: sử dụng kỹ thuật tán xạ ánh sáng động (DLS) với sự trợ giúp của thiết bị Zetasizer ZS90. Đánh giá đặc tính phân bố KTTP của hệ qua chỉ số đa phân tán (PDI), $Z_{average}$ đồ thị phân bố KTTP. 3) Đánh giá hiệu suất

liposome hóa: với liposome doxorubicin: sử dụng phương pháp thẩm tích, định lượng phần doxorubicin tự do sau khi thẩm tích, từ đó suy ra tỷ lệ dược chất được liposome hóa; với liposome amphotericin B: định lượng AmB trong mẫu liposome thô và trong mẫu liposome sau lọc tiếp tuyến hoặc sau khi đun ép qua màng. Hiệu suất liposome hóa (H) tính theo công thức:

$$H\% = \frac{\text{Hàm lượng AmB trong liposome sau lọc tiếp tuyến hoặc sau đun ép}}{\text{Hàm lượng AmB trong liposome thô}} \times 100\%$$

Kết quả và bàn luận

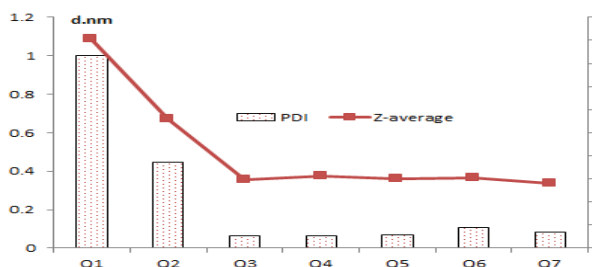
Bào chế liposome doxorubicin

Liposome sau khi bào chế phải đạt 2 tiêu chí cơ bản: kích thước dưới 200 nm và đồng nhất; hiệu suất liposome hoá cao.

Nghiên cứu làm giảm KТП của hệ: liposome được nén qua các lớp màng polycarbonat có kích thước lỗ lọc giảm dần với các quy trình khác nhau được cho bởi bảng 1 và hình 2. Kết quả cho thấy, phương pháp nén qua màng thực sự hiệu quả trong việc làm đồng nhất hóa hệ. Sau khi qua màng 100 nm, hệ đều có kích thước khoảng 150-170 nm và đơn phân tán.

Bảng 1: quy trình nén liposome qua màng

Quy trình	Cỡ màng				
	1.000 nm	400 nm	200 nm	100 nm	50 nm
Q1	10 lần	-	-	-	-
Q2	10 lần	10 lần	-	-	-
Q3	10 lần	10 lần	10 lần	10 lần	-
Q4	-	10 lần	10 lần	10 lần	-
Q5	-	10 lần	-	10 lần	-
Q6	10 lần	-	-	10 lần	-
Q7	-	10 lần	-	10 lần	10 lần



Hình 2: KТП của liposome đạt được sau mỗi quy trình nén ở bảng 1

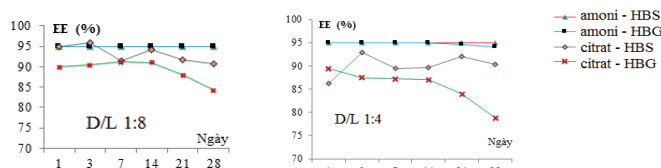
Phương pháp gắn DOX vào liposome được sử dụng là tạo chênh lệch pH ở 2 bên màng liposome. Vì thế, tỷ lệ dược chất/lipid (D/L) và hệ đệm sử dụng có ảnh hưởng lớn tới hiệu suất liposome hóa. Bảng 2 mô tả các tỷ lệ D/L và loại môi trường đệm được khảo sát.

Bảng 2: công thức liposome với tỷ lệ D/L và hệ đệm khác nhau

Công thức	PC (mg)	CHOL (mg)	DOX (mg)	PC:DOX (mol:mol)	Đệm bên ngoài	Đệm bên trong
CM142	100	30	20	4:1	HBS	Citrat
CM182	200	60	20	8:1	HBS	Citrat
CG142	100	30	20	4:1	HBG	Citrat
CG182	200	60	20	8:1	HBG	Citrat
AM142	100	30	20	4:1	HBS	Amoni sulfat
AM182	200	60	20	8:1	HBS	Amoni sulfat
AG142	100	30	20	4:1	HBG	Amoni sulfat
AG182	200	60	20	8:1	HBG	Amoni sulfat

(HBS: HEPES pha trong NaCl 0,9%. HBG: HEPES pha trong glucose 5%)

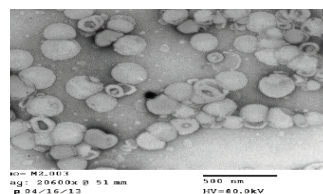
Ảnh hưởng của hệ đệm đến hiệu suất liposome hóa: hình 3 cho thấy, ở cả 2 tỷ lệ D/L được khảo sát, khi sử dụng hệ đệm amoni sulfat làm môi trường bên trong liposome sẽ cho hiệu suất liposome hóa rất cao (95%) và hiệu suất liposome hóa không phụ thuộc vào hệ đệm bên ngoài. Trong khi đó, khi sử dụng đệm citrat làm môi trường bên trong liposome thì hiệu suất liposome hóa lại phụ thuộc vào môi trường đệm bên ngoài, và hiệu suất liposome hóa sẽ cao hơn nếu sử dụng đệm bên ngoài là HEPES trong NaCl.



Hình 3: ảnh hưởng của tỷ lệ D/L và hệ đệm đến hiệu suất liposome hóa

Ảnh hưởng của tỷ lệ D/L đến hiệu suất liposome hóa: khi sử dụng đệm citrat, tỷ lệ D/L có ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất liposome hóa (tỷ lệ D/L 1/8 cho hiệu suất cao hơn) trong khi sử dụng đệm amoni sulfat thì hiệu suất liposome hóa không bị ảnh hưởng bởi yếu tố này.

Đánh giá hình thái liposome:



Hình 4: ảnh chụp TEM của liposome doxorubicin

Hình ảnh chụp TEM cho thấy, các liposome tạo ra có kích thước nhỏ trong khoảng 100-150 nm. Liposome tạo ra bằng phương pháp hydrat hóa film sau khi được nén qua màng 100 nm đã trở lên đồng nhất hơn và có cấu trúc đơn lớp.

Bào chế liposome amphotericin B

Vì dược chất không tan trong nước nên chúng được đưa vào lớp lipid của liposome.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ dược chất trong công thức đến các đặc tính của liposome: tiến hành nghiên cứu bằng cách cố định tỷ lệ tá dược HSPC/DSPG/Chol=2/0,8/1,9; dung dịch hydrat hóa là glucose 5% và thay đổi tỷ lệ % mol dược chất/tổng lượng lipid. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của liposome tạo thành được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: ảnh hưởng của tỷ lệ dược chất đến các đặc tính của liposome AmB

Công thức	AmB (μmol)	% mol AmB/ tổng lipid	Z _{average} (d.nm)	PDI	H (%)	Mức độ thay đổi H (%) sau 3 tuần bảo quản
A3	10,00	3	256	0,206	89,03	6,58
A5	16,67	5	266	0,276	92,36	7,68
A7	23,33	7	264	0,241	91,52	5,34
A9	30,00	9	260	0,269	87,65	3,13
A11	36,67	11	325	0,362	74,70	8,86

Các mẫu từ A3 đến A9 có KTTT tương đối nhỏ và không khác biệt (256-266 nm), phân bố tương đối đồng nhất (PDI <0,3). Trong đó, mẫu A9 có %mol dược chất cao nhất, mức độ thay đổi hiệu suất liposome hóa nhỏ nhất (3,13%) và được lựa chọn.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ phospholipid đến các đặc tính của liposome: tiến hành nghiên cứu bằng cách cố định tỷ lệ dược chất/tổng lượng lipid là 9 mol %, tỷ lệ cholesterol là 40% so với tổng lượng lipid, dung dịch hydrat hóa là dung dịch glucose 5% và thay đổi tỷ lệ phospholipid. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của liposome tạo thành được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4: ảnh hưởng của tỷ lệ phospholipid đến các đặc tính của liposome AmB

Công thức	HSPC/DSPG	Z _{average} (d.nm)	PDI	H (%)
A9-1	2/1	310	0,244	87,72
A9-0,8	2/0,8	217	0,208	87,16
A9-0,6	2/0,6	278	0,203	86,53

Mẫu A9-0,8 có hiệu suất liposome hóa cao (87,16%), KTTT nhỏ (217 nm), phân bố KTTT trong khoảng hẹp (PDI=0,208) hơn so với các mẫu còn lại và được lựa chọn.

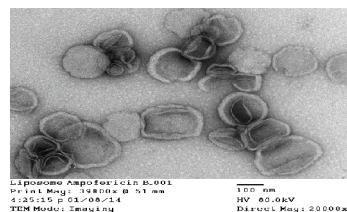
Nghiên cứu ảnh hưởng của dung dịch hydrat hóa đến các đặc tính của liposome: tiến hành nghiên cứu bằng cách cố định tỷ lệ AmB là 9 mol %, tỷ lệ cholesterol là 40% so với tổng lượng lipid, HSPC/DSPG=2/0,8 và thay đổi các loại dung dịch hydrat hóa. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của liposome tạo thành được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5: ảnh hưởng của dung dịch dùng hydrat hóa đến các đặc tính của liposome AmB

Công thức	Hệ đệm	pH sau bảo chế	pH sau bảo quản 3 tuần	Δ pH	Z _{average} (d.nm)	PDI	H (%)
A9-0,8-1	Glucose 5% pH 4,5	4,85	2,88	1,97	266	0,203	89,14
A9-0,8-2	Citrat pH 4	4,60	4,35	0,25	247	0,390	86,25
A9-0,8-3	Citrat pH 5	5,48	5,36	0,12	228	0,189	89,41
A9-0,8-4	Citrat pH 6	6,39	6,08	0,31	244	0,219	89,57
A9-0,8-5	Phosphat pH 5	4,57	4,46	0,11	297	0,351	85,15
A9-0,8-6	Succinat pH 5	4,78	4,74	0,04	324	0,244	85,74

Các mẫu liposome AmB có sự khác nhau khá lớn về KTTT (từ 228-324 nm), PDI (từ 0,189-0,351) và pH sau 3 tuần bảo quản. Mẫu A9-0,8-3 dùng đệm citrat pH=5 làm dung dịch hydrat hóa có KTTT nhỏ nhất (228 nm), phân bố KTTT đồng nhất (PDI=0,189), hiệu suất liposome hóa cao nhất (89,41%), ít có sự thay đổi pH sau 3 tuần bảo quản (0,12) và được lựa chọn.

Đánh giá hình thái liposome:



Hình 5: ảnh chụp TEM cấu trúc liposome AmB

Liposome AmB có dạng hình cầu, kích thước khá nhỏ, cấu trúc đa khoang, đa lớp nhưng số khoang, số lớp không nhiều (dưới 3 khoang/lớp trong 1 liposome).

Kết luận

Đã bào chế được liposome doxorubicin và amphotericin B bằng phương pháp hydrat hóa film. Đã khảo sát được các yếu tố thuộc về công thức cũng như quy trình bào chế ảnh hưởng tới kích thước liposome tạo ra và hiệu suất gắn dược chất. Liposome doxorubicin bào chế được có kích thước dưới 200 nm, đồng nhất, đơn lớp và tỷ lệ mang dược chất đạt trên 90%. Liposome AmB có kích thước dưới 300 nm, đồng nhất và tỷ lệ mang dược chất đạt trên 85%.

Tài liệu tham khảo

[1] Võ Xuân Minh, Phạm Thị Minh Huệ (2013), Kỹ thuật nano và liposome ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm, Nhà xuất bản Y học.
 [2] Gregoriadis G. (2007), Formating of large unilamellar vesicles by extrusion, Liposome Technology, Informa Healthcare USA, Inc, Volume I, p. 55-64.
 [3] Ray A. (2012), Liposome in Drug delivery system, Asian J Res Pharm. Sci, 2(2), pp. 41-44.