

Điều chế và phân tích tính chất hệ phân tán nanoliposome paclitaxel

Nguyễn Quang Trị^{1*}, Nguyễn Lan Chi¹, Dương Chí Toàn¹,
Trương Công Trị², Nguyễn Thị Ánh Nguyệt², Lê Quan Nghiệm², Nguyễn Minh Đức²

¹Công ty Cổ phần Dược Danapha-Nanosome

²Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 1/2/2016, ngày chuyển phản biện 4/2/2016, ngày nhận phản biện 29/2/2016, ngày chấp nhận đăng 18/3/2016

Trong nghiên cứu này, công thức nanoliposome chứa 90 mg paclitaxel đã được lựa chọn để thực hiện điều chế với 4 g phospholipid, 2 g polyoxylglycerids và 0,6 g cholesterol. Hệ phân tán nanoliposome paclitaxel được điều chế bằng phương pháp hydrat hóa lớp màng phim lipid kết hợp với phương pháp phân tán sỏi bột. Việc giảm kích thước hạt được thực hiện bằng quá trình đồng nhất hóa dưới áp suất cao (HPH).

Các tính chất hóa lý của hệ phân tán nanoliposome paclitaxel đã được nghiên cứu, phân tích về kích thước, phân bố kích cỡ tiểu phân, hình thể học, thế zeta, khả năng nang hóa hoạt chất, hàm lượng hoạt chất, thử nghiệm giải phóng hoạt chất, độ ổn định của hệ phân tán nanoliposome. Kích thước trung bình của tiểu phân nanoliposome paclitaxel là $171,4 \pm 3,9$ nm và chỉ số đa phân tán PDI là $0,07 \pm 0,02$.

Các hình ảnh TEM đã cho thấy, tiểu phân nanoliposome paclitaxel tạo thành hình cầu có cấu trúc dạng SUV hoặc LUV, kích thước nhỏ hơn 500 nm, thấy khá rõ lớp màng lipid kép bao bọc xung quanh tiểu phân nanoliposome. Hệ phân tán nanoliposome paclitaxel có sự ổn định về mặt hóa học và vật lý theo thời gian bảo quản ở nhiệt độ 4-8°C ít nhất 90 ngày, đồng thời đã cải thiện đáng kể tính tan và bảo vệ hoạt chất paclitaxel tránh sự phân hủy trong môi trường nước.

Từ khóa: hydrat hóa lớp màng phim lipid, nanoliposome, paclitaxel.

Chỉ số phân loại 3.4

Đặt vấn đề

Paclitaxel là hoạt chất được phân lập từ vỏ cây thông đỏ *Taxus brevifolia*, sử dụng nhiều trong các phác đồ điều trị ung thư vú, ung thư buồng trứng và ung thư phổi [1, 2]. Tuy nhiên, paclitaxel có độc tính cao, rất kém bền và kém tan (<10 µg/ml) trong môi trường nước [3, 4]. Để khắc phục các hạn chế trên, hướng nghiên cứu nhiều triển vọng hiện nay là nang hóa hoạt chất paclitaxel vào trong các giá mang nanoliposome để đưa thuốc vào bên trong cơ thể. Liposome là hệ tiểu phân phân tán dạng túi, cấu tạo bởi một hoặc nhiều lớp màng lipid kép của các phân tử lưỡng tính, bao quanh một lõi chứa nước. Với cấu trúc đặc biệt này, liposome có khả năng nang hóa paclitaxel giúp tăng tính tan, bảo vệ hoạt chất tránh sự phân hủy và tăng tính thấm thuốc qua các hàng rào sinh học. Ngoài ra, liposome có khả năng kiểm soát sự giải phóng hoạt chất và hướng đích tác dụng. Liposome được điều chế trên nền tảng các tá dược phân hủy sinh học và tương thích sinh học nên rất an toàn khi sử dụng và giảm độc tính cũng như các tác dụng phụ của thuốc [4-7]. Trên thế giới, hệ phân tán

liposome được điều chế bằng nhiều phương pháp khác nhau như: hydrat hóa lớp màng phim lipid, bốc hơi pha đảo, tiêm dung môi và phân tán sỏi bột [4-7]. Ở nước ta, nghiên cứu về liposome ứng dụng trong ngành dược chỉ mới ở giai đoạn tiếp cận ban đầu. Chính vì thế, đề tài hướng đến nghiên cứu hệ phân tán nanoliposome paclitaxel có kích thước trung bình nhỏ hơn 200 nm và đây phân bố kích thước hẹp trên nền tảng các tá dược phospholipid và polyoxylglycerid đạt tiêu chuẩn dùng cho đường tiêm nhằm hướng đến nang hóa các hoạt chất điều trị ung thư kém tan, kém bền và đưa thuốc vào cơ thể bằng đường tiêm.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Paclitaxel (99,9%) được cung cấp từ Fujian South Pharmaceutical, Trung Quốc; paclitaxel chuẩn (100,2%) theo tiêu chuẩn châu Âu được cung cấp từ Council of Europe-EDQM CS, Pháp; phospholipid được cung cấp từ Lipoid GmbH, Đức; polyoxylglycerid được cung cấp từ SEPPIC, Pháp; cholesterol được

*Tác giả liên hệ: Tel: 0511.3757676

Preparation and analysis of the properties of paclitaxel nanoliposomes

Summary

In this study, the nanoliposomal formulations containing 90 mg paclitaxel were made from 4 g of phospholipids, 2 g of polyoxylglycerids, and 0.6 g of cholesterol. They were prepared using thin film hydration method in combination with the effervescent dispersion technique. The particle size reduction was achieved by high pressure homogenization (HPH). The properties of the nanodispersions had been investigated regarding size analysis, zeta potential measurement, drug payload, morphology, stability, and in vitro dissolution. The paclitaxel nanoliposomes had the size of 171.4 ± 3.9 nm with a unimodal narrow distribution and the polydispersity index (Pdl) of 0.07 ± 0.02 . The TEM images of paclitaxel nanoliposomes demonstrated the formation of small unilamellar vesicles (SUV) or large unilamellar vesicles (LUV). The encapsulation efficiency of paclitaxel was nearly 100%. The paclitaxel-loaded nanoliposomes had a good in vitro release compared with coarse paclitaxel suspensions. The zeta potential was from -1 mV to -4 mV, suggesting a steric stabilization. The paclitaxel nanoliposomes were physically and chemically stable at least 90 days at 4-8°C. The results confirmed that nanoliposomes improved the solubility and the chemical stability of paclitaxel considerably.

Keywords: nanoliposome, paclitaxel, thin film hydration method.

Classification number 3.4

cung cấp từ Brenntag, Đức. Các tá dược phospholipid và polyoxylglycerid đạt tiêu chuẩn nhà sản xuất dùng cho đường tiêm và các dung môi, hóa chất khác đều đạt tiêu chuẩn dược dụng của nhà sản xuất.

Phương pháp nghiên cứu

Định lượng paclitaxel bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC): định lượng paclitaxel trên hệ thống HPLC Shimadzu LC-10AD với cột Kyatech C18 (250 x 4,6 mm), cỡ hạt 5 µm. Pha động là acetonitril-nước (51:49, v/v). Phát hiện bởi detector SPD-M10AVP ở bước sóng phát hiện 227 nm. Thể tích tiêm mẫu là 30 µl. Tốc độ dòng là 0,7 ml/phút. Mẫu được pha trong dung môi methanol, rồi lọc qua màng lọc Milipore 0,22 µm trước khi bơm mẫu vào hệ thống HPLC. Quy trình định lượng được thẩm định về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng.

Điều chế nanoliposome paclitaxel: cân các thành phần nguyên liệu gồm paclitaxel, phospholipid, polyoxylglycerid và cholesterol theo công thức bào chế. Hòa tan hoàn toàn các thành phần vào 50 ml ethanol tuyệt đối, khuấy bằng máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng tạo dung dịch lipid. Cô quay dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 45-50°C, loại dung môi hữu cơ hình thành lớp phim lipid bám trên thành dụng cụ. Sấy lớp phim lipid dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 45-50°C trong 24 giờ bằng tủ sấy chân không để loại hoàn toàn dung môi. Thêm 50 g dung dịch acid citric 5% vào bình cô quay, cô quay ở nhiệt độ 45-50°C trong 30 phút để hydrat hóa lớp phim lipid. Phân tán đều hệ phân tán sau hydrat hóa vào ly thủy tinh chứa sẵn 43,31 g dung dịch natri hydrocarbonat 5% vừa phân tán vừa khuấy với tốc độ 15.000 vòng/phút bằng thiết bị Ultra-Turrax (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Đức) trong 15 phút. Tiếp tục cho hệ phân tán thu được qua máy đồng nhất hóa dưới áp suất cao (HPH, APV 2000, Đức) ở áp suất 800 bar, qua 5 chu kỳ. Đóng chai, dán nhãn và bảo quản mẫu ở nhiệt độ 4-8°C.

Phân tích tính chất hệ phân tán nanoliposome paclitaxel tạo thành: nanoliposome paclitaxel tạo thành được phân tích các chỉ tiêu: tính chất cảm quan; quan sát dưới kính hiển vi quang học (CH20, Olympus, Nhật); đo kích thước tiểu phân bằng phương pháp khuếch tán ánh sáng và đo thế zeta bằng phép đo gió bởi Doppler laser (NanoZS 90, Malvern, Pháp); quan sát hình thể học dưới kính hiển vi điện tử truyền

qua TEM (JEM 1400, JEOL, Nhật); xác định hiệu suất nang hóa bằng phương pháp siêu ly tâm 20.000 vòng/phút kết hợp siêu lọc qua bộ kit Microcon 3000 Da (Millipore, Mỹ) và khảo sát khả năng giải phóng hoạt chất qua màng thẩm tách Spectra/Por MWCO 6-8.000 Da (Divbio Science Europe, Hà Lan) trong môi trường natri laurylsulfat 1%.

Đánh giá độ ổn định vật lý: liposome được bảo quản ở điều kiện 4-8°C trong ngăn mát tủ lạnh, đánh giá độ ổn định sau 3 tháng dựa trên tính chất cảm quan, kích thước tiểu phân đo bởi phương pháp khuếch tán ánh sáng (NanoZS 90, Malvern, Pháp) và định lượng hàm lượng paclitaxel theo thời gian bằng phương pháp HPLC.

Kết quả và bàn luận

Thẩm định quy trình định lượng paclitaxel bằng phương pháp HPLC

Quy trình định lượng bằng phương pháp HPLC đạt tính tương thích hệ thống về thời gian lưu của pic (khoảng 24 phút), các hệ số đối xứng, độ lệch chuẩn tương đối RSD = 0,121% của 6 lần tiêm mẫu chuẩn và RSD = 0,227% của 6 lần tiêm mẫu thử. Trên các sắc ký đồ HPLC, phương pháp thể hiện tính đặc hiệu cao với thời gian lưu của pic paclitaxel trong mẫu thử và thử thêm chuẩn tương đương thời gian lưu của pic paclitaxel trong mẫu chuẩn, đồng thời dung môi, pha động và mẫu trắng không có pic trùng với pic của paclitaxel. Phương trình hồi quy tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của các mẫu chuẩn có dạng $y = 46,363x + 2,191$ với khoảng nồng độ tuyến tính từ 0,75-51 µg/ml và $R^2 = 0,9998$. Quy trình định lượng paclitaxel bằng phương pháp HPLC đạt yêu cầu về độ lặp lại với RSD = 1,28%. Phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ đúng với tỷ lệ phục hồi trung bình là 100,19% và RSD = 0,65%.

Nghiên cứu điều chế hệ phân tán nanoliposome paclitaxel

Sau khi nghiên cứu tối ưu hóa các thành phần công thức và các thông số kỹ thuật để tạo ra các giá mang nanoliposome chưa nang hóa paclitaxel ổn định sau 3 tháng bảo quản ở 4-8°C (các công thức bào chế được trình bày trong bảng 1). Hệ phân tán điều chế từ công thức 1 và 2 có kích thước trung bình nhỏ hơn 200 nm với kiểu phân bố 1 đỉnh và dãy phân bố kích thước hẹp ($PdI < 0,25$), có cấu trúc tiểu phân hình cầu dạng SUV hoặc LUV khi quan sát dưới TEM.

Bảng 1: các công thức bào chế giá mang nanoliposome chưa nang hóa paclitaxel

Thành phần	Công thức 1	Công thức 2
Phospholipid	2 g	4 g
Polyoxylglycerid	4 g	2 g
Cholesterol	0,6 g	0,6 g
Dung dịch acid citric 5%	50 g	50 g
Dung dịch NaHCO ₃ 5% vd	100 g	100 g

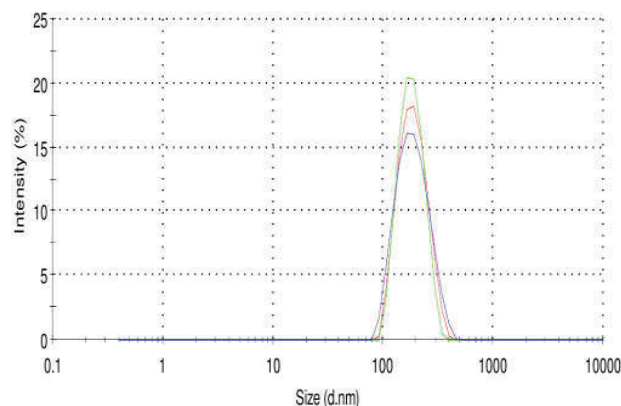
Từ hai công thức trên, đề tài tiến hành nang hóa paclitaxel với hàm lượng đưa vào mỗi công thức lần lượt 60, 90, 120 và 150 mg. Kết quả cho thấy, công thức 2 với tỷ lệ phospholipid-polyoxylglycerid (2:1) nang hóa paclitaxel có độ ổn định tốt hơn so với công thức 1. Công thức 1 nang hóa paclitaxel sau 1 tuần có hiện tượng tách lớp, trong khi đó công thức 2 nang hóa paclitaxel vẫn ổn định tốt. Ở công thức 2, với hàm lượng paclitaxel 60 mg và 90 mg, hệ phân tán thu được quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại 1.600 lần cho thấy các tiểu phân nhỏ hình cầu, đều và khá đồng nhất. Trong khi đó, công thức 2 khi nang hóa 120 mg và 150 mg paclitaxel quan sát dưới kính hiển vi thấy có nhiều tinh thể kết tinh hình kim của paclitaxel xuất hiện. Do đó, hàm lượng paclitaxel phối hợp vào công thức 2 được chọn là 90 mg. Dựa trên công thức 2 nang hóa 90 mg paclitaxel, đề tài tiến hành điều chế 3 mẫu, mỗi mẫu 100 g để phân tích tính chất hóa lý và theo dõi độ ổn định của sản phẩm ở 4-8°C trong điều kiện tránh ánh sáng.

Phân tích tính chất hóa lý hệ phân tán nanoliposome paclitaxel

Tính chất: hệ phân tán nanoliposome paclitaxel lỏng, màu trắng đục, đồng nhất, không có xảy ra các hiện tượng kém bền như: kết bông, nổi kem, sa lắng và tách pha. Ngoài ra, hệ phân tán nanoliposome paclitaxel rất dễ dàng phân tán hoàn toàn vào trong môi trường nước.

Kích thước và phân bố kích cỡ tiểu phân: hệ phân tán có kích thước tiểu phân phân bố kiểu 1 đỉnh với dải phân bố hẹp nằm trong vùng từ 80-500 nm. Kích thước trung bình của tiểu phân nanoliposome paclitaxel là $171,4 \pm 3,9$ nm và chỉ số đa phân tán PdI là $0,07 \pm 0,02$ (hình 1).

Hình thể học: quan sát dưới TEM (hình 2), tiểu phân nanoliposome paclitaxel tạo thành hình cầu có cấu trúc dạng SUV hoặc LUV, kích thước nhỏ hơn 500 nm, thấy khá rõ lớp màng lipid kép bao bọc xung quanh tiểu phân nanoliposome.



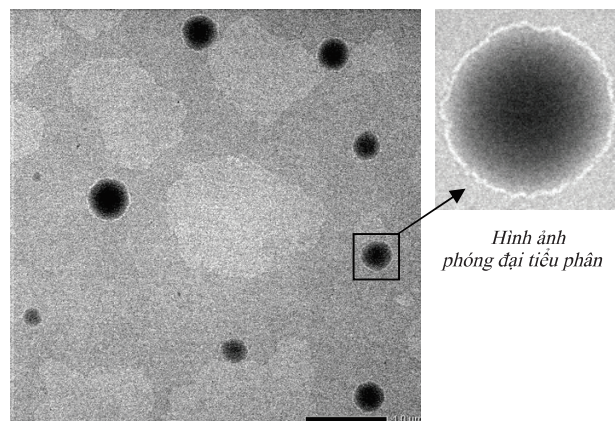
Hình 1: kích thước và phân bố kích cỡ hệ phân tán nanoliposome paclitaxel

Thế zeta: giá trị thế zeta đo được ở các mẫu đều rất thấp ($-3,46 \pm 2,41$ mV) so với khoảng giá trị cần đạt được để tạo ra sự ổn định tĩnh điện học khi trị tuyệt đối thế zeta lớn hơn 30 mV. Tuy nhiên, khi theo dõi mẫu trong thời gian bảo quản ở nhiệt độ $4-8^{\circ}\text{C}$, hệ tiểu phân vẫn ổn định. Như vậy, hệ phân tán nanoliposome paclitaxel ổn định nhờ hiệu ứng cản trở không gian bề mặt của lớp PEG linh động thân nước có trong tá dược polyoxylglycerid bao phủ trên bề mặt tiểu phân.

Khả năng nang hóa hoạt chất: định lượng hoạt chất tự do trong dịch lọc bằng phương pháp HPLC sau khi siêu ly tâm kết hợp siêu lọc, tín hiệu pic của paclitaxel rất thấp so với nồng độ thấp nhất trong khoảng tuyến tính ($0,75 \mu\text{g/ml}$). Điều này chứng tỏ paclitaxel được nang hóa gần như hoàn toàn trong giá mang nanoliposome.

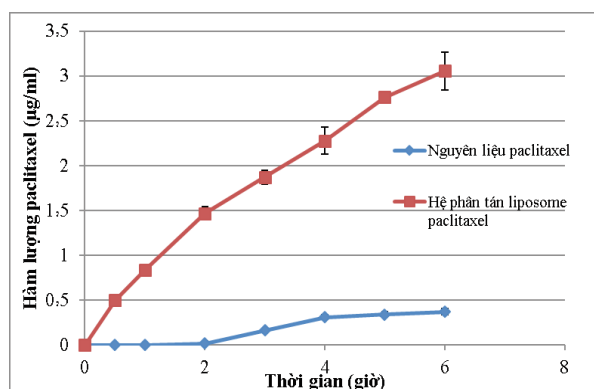
Hàm lượng hoạt chất: hàm lượng hoạt chất paclitaxel trong hệ phân tán nanoliposome định lượng bằng phương pháp HPLC: $88,25 \pm 1,13$ mg/100 g mẫu.

Thử nghiệm giải phóng hoạt chất: sự phóng thích hoạt chất của hệ phân tán nanoliposome paclitaxel được khảo sát trong môi trường natri laurylsulfat 1%. Quá trình giải phóng hoạt chất trong hệ phân tán nanoliposome paclitaxel không xảy ra hiện tượng chậm phóng thích (lag-time) hoặc phóng thích ào ạt (burst-effect) trong thời gian đầu. Trong khoảng thời gian từ 1 giờ đến 6 giờ, sự giải phóng hoạt chất gần như tuyến tính ($R^2 = 0,979$) thể hiện quá trình phóng thích có kiểm soát (hình 3). So với mẫu hỗn dịch paclitaxel, khả năng giải phóng hoạt chất ở hệ phân tán liposome paclitaxel tăng nhiều. Điều này có thể giải thích do hệ liposome phân tán dễ dàng trong môi trường, còn hỗn



Hình 2: hình ảnh quan sát dưới TEM của hệ phân tán nanoliposome paclitaxel ở thang đo 1

dịch paclitaxel rất khó phân tán và sa lắng dưới đáy của màng phóng thích.



Hình 3: sự giải phóng hoạt chất của hệ phân tán nanoliposome paclitaxel và hỗn dịch paclitaxel

Độ ổn định của hệ phân tán nanoliposome

Tính chất, kích thước và phân bố kích cỡ: sau 3 tháng bảo quản ở nhiệt độ $4-8^{\circ}\text{C}$ và tránh ánh sáng, hệ phân tán lỏng đồng nhất, màu trắng đục, không xảy ra các hiện tượng kém bền. Kích thước trung bình $173,2 \pm 2,6$ nm, dải phân bố kích cỡ hẹp một đỉnh với $\text{PDI} = 0,09 \pm 0,04$, kích thước thay đổi không đáng kể so với thời điểm ban đầu.

Hàm lượng paclitaxel: hàm lượng paclitaxel trong hệ phân tán nanoliposome paclitaxel giảm không đáng kể, còn $96,24 \pm 0,40\%$ so với ban đầu sau 3 tháng ở nhiệt độ $4-8^{\circ}\text{C}$, tránh ánh sáng. Điều này chứng tỏ, hệ phân tán liposome paclitaxel đã cải thiện đáng kể độ ổn định hóa học của paclitaxel ở điều kiện phân tán trong môi trường nước. Cơ chế ổn định có thể giải thích nhờ sự bao phủ của các chất hoạt động bề mặt xung quanh tiểu

phân liposome paclitaxel và sự định vị của paclitaxel bên trong lớp màng lipid kép của nanoliposome.

Kết luận

Hệ phân tán nanoliposome paclitaxel được điều chế bằng phương pháp hydrat hóa lớp màng phim lipid kết hợp với phương pháp phân tán sủi bọt và giảm kích thước bằng đồng nhất hóa dưới áp suất cao. Hệ phân tán có kích thước trung bình dưới 200 nm với dãy phân bố kích thước hẹp phù hợp, điều chế từ các thành phần tá dược phospholipid và polyoxylglycerid đạt tiêu chuẩn dùng cho đường tiêm IV. Hệ nanoliposome paclitaxel ổn định theo thời gian bảo quản ở nhiệt độ 4-8°C sau 3 tháng. Hệ phân tán nanoliposome paclitaxel đã cải thiện đáng kể tính tan và bảo vệ hoạt chất paclitaxel tránh sự phân hủy trong môi trường nước.

Tài liệu tham khảo

- [1] G. Bocci, D.A. Paolo, R. Danesi (2013), "The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel", *Angiogenesis*, **16**, pp.481-492.
- [2] M.T. Huizing and V.H. Sewberath (1995), "Taxanes: a new class of antitumor agents", *Cancer Investigation*, **13**(4), pp.381-404.
- [3] T. Jiaher and J.S. Valentino (2008), "Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions I: epimerization", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**(3), pp.1224-1235.
- [4] S. Koudelka and J. Turánek (2012), "Liposomal paclitaxel formulations", *J Control Release*, **163**(3), pp.322-334.
- [5] K.A. Singla, A. Garg, D. Aggarwal (2002), "Paclitaxel and its formulations", *International Journal of Pharmaceutics*, **235**, pp.179-192.
- [6] Y. Wei, Z. Xue, Y. Ye, Y. Huang, L. Zhao (2014), "Paclitaxel targeting to lungs by way of liposomes prepared by the effervescent dispersion technique", *Arch Pharm Res.*, **37**(6), pp.728-737.
- [7] X. Xu, L. Wang, H.Q. Xu, X.E. Huang, Y.D. Qian, J. Xiang (2013), "Clinical Comparison between Paclitaxel Liposome (Lipusu®) and Paclitaxel for Treatment of Patients with Metastatic Gastric Cancer", *Journal of Cancer Prevention*, **14**, pp.2591-2594.