

Phân tích nhiệt vi sai hoạt chất Paclitaxel với các tá dược lipid

Trương Công Trị¹, Đặng Thanh Long¹, Hà Diệu Ly²,
Nguyễn Quang Trị³, Nguyễn Lan Chi³, Dương Chí Toàn³

¹Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

²Viện Kiểm nghiệm thuốc TP Hồ Chí Minh

³Công ty cổ phần Dược Danapha - Nanosome

Ngày nhận bài 5.5.2015, ngày chuyển phản biện 8.5.2015, ngày nhận phản biện 12.6.2015, ngày chấp nhận đăng 15.6.2015

Trong nghiên cứu này, các tác giả khảo sát và đánh giá tương tác trên biểu đồ phân tích nhiệt vi sai DSC của hoạt chất Paclitaxel với các tá dược Phospholipon 90G và Montanox 80 PPI với mục tiêu khảo sát tính chất hóa lý của hoạt chất, tương tác hoạt chất - tá dược trước khi thiết lập công thức và xây dựng quy trình bào chế hệ phân tán nanoliposome Paclitaxel. Qua biểu đồ nhiệt DSC cho thấy, có sự tương tác giữa hoạt chất và hỗn hợp tá dược phospholipid - polyoxylglycerid, Paclitaxel hòa tan hoàn toàn trong các hỗn hợp tá dược ở tỷ lệ hoạt chất - tá dược (1:10, kl/kl). Các tương tác vật lý này ổn định sau 2 tuần bảo quản ở nhiệt độ thường. Kết quả khảo sát nhiệt vi sai DSC sẽ góp phần theo dõi tương tác vật lý dược chất - tá dược trong thiết kế phát triển các hệ phân tán nanoliposome trên nền tảng tá dược phospholipid - polyoxylglycerid.

Từ khóa: Paclitaxel, phân tích nhiệt vi sai, tá dược lipid.

Chỉ số phân loại 3.4

DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY OF PACLITAXEL WITH LIPID EXCIPIENTS

Summary

In this study, the DSC thermal curves of Paclitaxel and its mixture with Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI were performed to understand their interactions. Differential thermal analysis of samples were carried out using DSC Q20 (TA Instrument, USA) with a temperature range from 20°C to 350°C at the heating rate of 2°C to 15°C/min. This study showed that Paclitaxel existed at least two polymorphs by total signal pics of Paclitaxel on DSC thermal curves at the heating rate of 10°C/min. The DSC thermal curves of interactions among API - excipients demonstrated that Paclitaxel existed the completely soluble form in the mixture with Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI at the ratio of API - excipients (1:10, w/w). After two-week storage at room temperature, these interactions of API - excipients were still stable. The DSC curves of API - excipients showed that Paclitaxel interacted strongly with the mixture of Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI.

Keywords: differential scanning calorimetry, lipid excipients, Paclitaxel.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Paclitaxel là một trong các hoạt chất hiện đang được sử dụng rộng rãi trong các phác đồ điều trị nhiều bệnh ung thư như: ung thư biểu mô buồng trứng, ung thư vú, đầu, cổ và ung thư phổi [1, 2]. Tuy nhiên, Paclitaxel có nhiều tác dụng phụ, độc tính cao, rất kém bền, kém tan trong môi trường nước (<10 µg/ml) và tính thấm thấp nên giới hạn khả năng trị liệu của thuốc [3, 4]. Nang hóa Paclitaxel vào trong các giá mang liposome là một trong những hướng nghiên cứu đang được phát triển nhiều trên thế giới nhằm khắc phục những hạn chế trong trị liệu của Paclitaxel. Việc phát triển các thuốc nanoliposome Paclitaxel trên nền tảng các tá dược phospholipid và polyoxylglycerid đã và đang được quan tâm nghiên cứu trên thế giới [4-6]. Tại nước ta, hướng nghiên cứu nanoliposome chỉ mới được tiếp cận trong những năm gần đây. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả khảo sát và đánh giá tương tác trên biểu đồ nhiệt DSC của hoạt chất Paclitaxel với các tá dược Phospholipon 90G và Montanox 80

*Tác giả chính: Email: congtri1606@gmail.com

PPI với mục tiêu khảo sát tính chất hóa lý của hoạt chất, tương tác hoạt chất - tá dược trước khi thiết lập công thức và xây dựng quy trình bào chế hệ phân tán nanoliposome Paclitaxel.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Paclitaxel (99,9%) được cung cấp từ Fujian South Pharmaceutical, Trung Quốc; Phospholipon 90G được cung cấp từ Lipoid GMBH, Thụy Sĩ; Montanox 80 PPI được cung cấp từ SEPPIC, Pháp; các dung môi, hóa chất khác đều đạt tiêu chuẩn dược dụng của nhà sản xuất.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu khảo sát: cân các mẫu nguyên liệu (dược chất và tá dược). Hòa tan nguyên liệu trong ethanol. Làm bay hơi hoàn toàn ethanol qua hệ thống cô quay dưới áp suất giảm (Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik, Thụy Sĩ) ở nhiệt độ 50°C. Sấy khô mẫu khảo sát trong tủ sấy chân không (SL 1430D, Sheldon Manufacturing, Inc, Mỹ) ở nhiệt độ 45°C trong vòng 24 giờ.

Phân tích nhiệt vi sai: tiến hành phân tích nhiệt vi sai (DSC) trên thiết bị DSC Q20 (TA Instrument, Mỹ) với bộ chén - nắp Aluminum Tzero (chứa lượng mẫu khảo sát tối đa 3 mg). Mẫu khảo sát cân vào chén trên cân phân tích có độ chính xác 0,001 mg (Mettler Toledo, Thụy Sĩ). Tốc độ dòng khí nitơ là 50 ml/phút. Tiến trình nhiệt được cài đặt ở tốc độ nhiệt phù hợp với khoảng nhiệt độ khảo sát từ 20 đến 350°C. Thiết bị được hiệu chuẩn bằng indium chuẩn trước khi tiến hành khảo sát. Khảo sát DSC đối với các mẫu hoạt chất Paclitaxel (trước và sau khi xử lý qua ethanol), mẫu khảo sát tương tác hoạt chất - tá dược ở các tỷ lệ và mẫu khảo sát tương tác sau 2 tuần bảo quản ở nhiệt độ phòng.

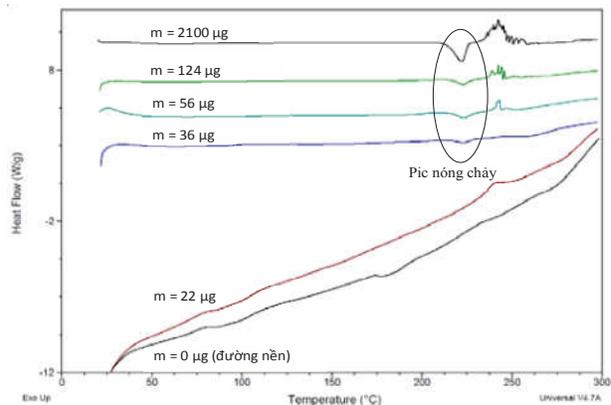
Kết quả và bàn luận

Phân tích nhiệt vi sai trên dược chất Paclitaxel

Chọn tốc độ nhiệt cho tiến trình DSC: khảo sát các tốc độ nhiệt 2°C/phút, 5°C/phút, 10°C/phút và 15°C/phút để lựa chọn tốc độ nhiệt tối ưu đối với Paclitaxel. Biểu đồ nhiệt ghi nhận được thể hiện có sự khác biệt ở các tốc độ khác nhau khi khảo sát trên mẫu Paclitaxel. Biểu đồ nhiệt ở tốc độ nhiệt 2°C/phút và 5°C/phút chỉ xuất hiện 2 pic: pic nóng chảy của Paclitaxel (ở khoảng 215-225°C) và pic phân hủy ngay sau pic nóng chảy. Ngoài pic nóng chảy và pic phân hủy, biểu đồ nhiệt ở tốc độ nhiệt là

10°C/phút và 15°C/phút còn có sự xuất hiện thêm 2 pic nhỏ hơn ở khoảng 50-90°C (pic khử dung môi solvate hóa) và 160-180°C (pic chuyển đổi pha rắn - rắn). Tốc độ nhiệt càng tăng độ phân giải pic sẽ càng giảm [7]. Do đó, tốc độ nhiệt phù hợp để khảo sát DSC đối với Paclitaxel là 10°C/phút.

Xác định giới hạn khối lượng Paclitaxel chứa trong chén mẫu DSC: tiến hành DSC trên thiết bị DSC Q20 (TA Instrument, Mỹ) với bộ chén - nắp Aluminum Tzero chứa lượng mẫu khảo sát tối đa 3 mg. Trong các mẫu khảo sát tương tác hoạt chất - tá dược, thông thường tỷ lệ hoạt chất nhỏ hơn rất nhiều so với tỷ lệ tá dược. Chính vì thế cần phải khảo sát DSC đối với Paclitaxel với các khối lượng cân nhỏ dần để tìm ra khối lượng nhỏ nhất có thể phát hiện rõ các pic chính (nóng chảy và phân hủy) trên biểu đồ nhiệt. Kết quả thể hiện trên các biểu đồ nhiệt hình 1 và bảng 1 cho thấy: với lượng mẫu khảo sát 36 µg vẫn xuất hiện rõ hai pic chính của Paclitaxel (pic nóng chảy ở 223,53°C và pic phân hủy xảy ra ở nhiệt độ cao hơn). Với lượng mẫu 22 µg, biểu đồ nhiệt gần giống với đường nền (chạy DSC với chén rỗng). Như vậy, giới hạn khối lượng có trong chén mẫu khảo sát để phát hiện các pic chính đối với Paclitaxel là 36 µg.



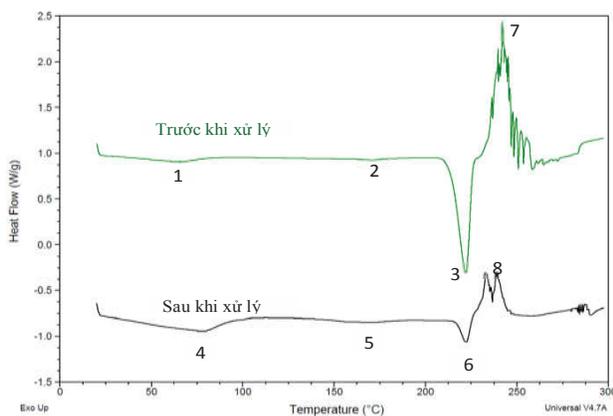
Hình 1: giới hạn phát hiện các pic trên DSC của Paclitaxel

Bảng 1: các thông số phân tích nhiệt trên biểu đồ nhiệt của Paclitaxel ở các khối lượng cân khác nhau tại pic nóng chảy của Paclitaxel

Khối lượng mẫu (µg)	2100	124	56	36	22
T _{pic} (°C)	222,04	223,21	223,55	223,53	-
Enthalpy (J/g)	57,04	16,34	21,36	10,11	-

Phân tích nhiệt DSC Paclitaxel trước và sau khi xử lý qua ethanol: Paclitaxel tan khá tốt trong ethanol. Chính vì thế, ethanol là dung môi thường được sử dụng để hỗ trợ hòa tan Paclitaxel trong nghiên cứu và phát triển các quy trình bào chế thuốc. Khảo sát

biểu đồ nhiệt DSC trước và sau khi xử lý qua dung môi ethanol để theo dõi sự biến đổi vật lý có thể xảy ra sau quá trình xử lý. Kết quả phân tích trên biểu đồ nhiệt của Paclitaxel trước và sau khi xử lý bằng ethanol không khác biệt giữa mẫu trước xử lý và sau khi xử lý được minh họa trên hình 2 và bảng 2. Biểu đồ nhiệt trước và sau khi xử lý đều có 2 pic chính là pic nóng chảy (pic 3, 6) và pic phân huỷ (pic 7, 8). Ngoài ra, trên các biểu nhiệt này đều có thêm 2 pic phụ là các pic 1, pic 2, pic 4 và pic 5. Pic 1 và pic 4 có khả năng hình thành do hiện tượng khử dung môi solvate hóa trên mẫu Paclitaxel. Pic 2 và pic 5 là do hiện tượng đa hình (polymorphism) thể hiện sự chuyển pha rắn - rắn theo các tài liệu nghiên cứu trước đây [8, 9]. Kết quả này chứng tỏ Paclitaxel có thể tồn tại ít nhất 2 dạng thù hình trong cấu trúc tinh thể kết tinh.



Hình 2: biểu đồ nhiệt của Paclitaxel trước và sau khi qua xử lý bằng ethanol (1),(4): khả năng pic khử dung môi solvate hóa; (2),(5): pic chuyển đổi pha rắn - rắn; (3),(6): pic nóng chảy; (7),(8): pic phân huỷ

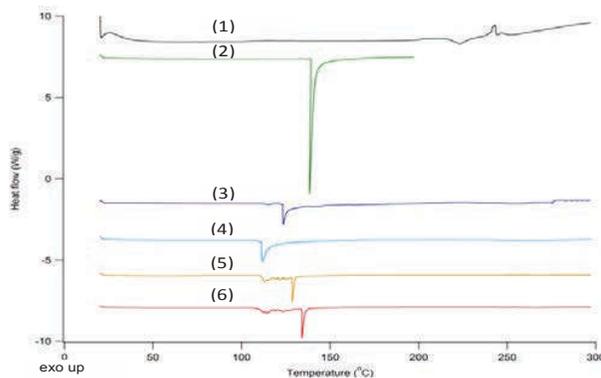
Bảng 2: các thông số trên biểu đồ nhiệt của Paclitaxel trước và sau khi xử lý bằng ethanol

Pic	1	2	3	4	5	6
T _{pic} (°C)	64,39	170,90	222,04	77,50	157,71	222,71
Enthalpy J/g)	10,46	4,60	57,04	41,18	6,45	9,60

DSC tương tác Paclitaxel với các tá dược lipid

Khảo sát biểu đồ nhiệt tương tác DSC giữa các tá dược chứng tỏ phospholipid (Phospholipon 90G) tương tác mạnh với polyoxyglycerid (Montanox 80 PPI). Tỷ lệ polyoxyglycerid càng cao thì nhiệt độ nóng chảy của phospholipid càng giảm. Qua thực nghiệm điều chế hệ phân tán nanoliposom, đề tài đã chọn tỷ lệ khối lượng phospholipid - polyoxyglycerid (2:1) và (1:2) làm hỗn

hợp tá dược để khảo sát tương tác với Paclitaxel. Khối lượng Paclitaxel của mẫu khảo sát tương tác với tỷ lệ khối lượng hoạt chất - tá dược (1:50) và (1:10) trong chén mẫu lần lượt là 59 và 273 µg. Kết quả khảo sát độ nhạy Paclitaxel trên chính thiết bị DSC-Q20 cho thấy, biểu đồ nhiệt thể hiện rõ pic nóng chảy của Paclitaxel ở lượng mẫu khảo sát 56 µg trong chén mẫu. Biểu đồ nhiệt hình 3 và các thông số ở bảng 3 cho thấy sự biến mất pic nóng chảy của Paclitaxel (ở khoảng 215-225°C) ở tất cả tỷ lệ phối hợp. Kết quả này thể hiện khả năng hoà tan hoàn toàn của Paclitaxel trong hỗn hợp tá dược phospholipid - polyoxyglycerid (1:2) và (2:1) theo tỷ lệ khối lượng. Ngoài ra, kết quả này một phần giúp dự đoán khả năng nang hoá Paclitaxel vào trong các giá mang nanoliposom hình thành từ phospholipid và polyoxyglycerid khi phát triển các dạng bào chế mới đi từ hoạt chất và các tá dược này.



Hình 3: biểu đồ nhiệt khảo sát tương tác giữa Paclitaxel và các tá dược

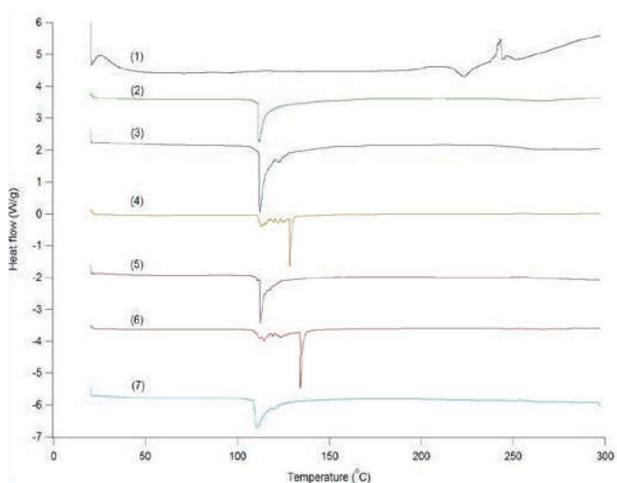
- (1) Paclitaxel 56 µg/chén mẫu; (2) Phospholipon 90G;
 (3) Paclitaxel + Phospholipon 90G, 59 µg Paclitaxel/chén mẫu;
 (4) Paclitaxel + Phospholipon 90G, 276 µg Paclitaxel/chén mẫu;
 (5) Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (1:2), 264 µg Paclitaxel/chén mẫu;
 (6) Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (2:1), 267 µg Paclitaxel/chén mẫu

Bảng 3: các thông số pic nóng chảy chính trên biểu đồ nhiệt tương tác giữa Paclitaxel và các tá dược lipid

Mẫu khảo sát	T _{pic} (°C)	Enthalpy (J/g)
Paclitaxel 56 µg/ chén mẫu	223,55	9,50
Phospholipon 90G	138,44	98,36
Paclitaxel + Phospholipon 90G, 59 µg Paclitaxel/chén mẫu	123,43	37,54
Paclitaxel + Phospholipon 90G, 276 µg Paclitaxel/chén mẫu	110,80	64,71
Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (1:2), 264 µg Paclitaxel/chén mẫu	128,41	36,13
Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (2:1), 267 µg Paclitaxel/chén mẫu	134,23	43,04

Độ ổn định của tương tác Paclitaxel và các tá dược lipid sau 2 tuần bảo quản

Khảo sát sự ổn định của các tương tác giữa Paclitaxel với hỗn hợp tá dược Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI ở các tỷ lệ (1:2) và (2:1) sau khi bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C, độ ẩm 65%) trong 2 tuần. Tỷ lệ hoạt chất - tá dược được khảo sát là (1:10), tương đương hàm lượng hoạt chất khoảng 273 µg trong chén mẫu. Khảo sát với tỷ lệ hoạt chất này để dễ dàng quan sát các pic của Paclitaxel nếu tương tác không bền. Biểu đồ nhiệt của mẫu khảo sát tương tác sau 2 tuần (hình 4) vẫn không thấy xuất hiện pic nóng chảy của Paclitaxel (ở khoảng 215-225°C). Điều đó có thể giải thích tương tác giữa Paclitaxel và các tá dược, hỗn hợp tá dược có tính ổn định sau 2 tuần khảo sát.



Hình 4: biểu đồ nhiệt khảo sát độ ổn định tương tác giữa Paclitaxel và các tá dược
(1) Paclitaxel 56 µg/chén mẫu;

(2) Paclitaxel + Phospholipon 90G, 276 µg Paclitaxel/chén mẫu;

(3) Paclitaxel + Phospholipon 90G, 276 µg Paclitaxel/chén mẫu sau 2 tuần;

(4) Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (1:2), 264 µg Paclitaxel/chén mẫu;

(5) Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (1:2), 264 µg Paclitaxel/chén mẫu sau 2 tuần;

(6) Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (2:1), 267 µg Paclitaxel/chén mẫu;

(7) Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (2:1), 267 µg Paclitaxel/chén mẫu sau 2 tuần

Kết luận

Qua biểu đồ nhiệt DSC cho thấy, có sự tương tác giữa hoạt chất và hỗn hợp tá dược phospholipid - polyoxyglycerid, Paclitaxel hòa tan hoàn toàn trong các hỗn hợp tá dược ở tỷ lệ hoạt chất - tá dược (1:10, kl/kl). Các tương tác vật lý này ổn định sau 2 tuần bảo quản ở nhiệt độ thường. Kết quả khảo sát nhiệt vi sai DSC sẽ góp phần theo dõi tương tác vật lý được chất - tá dược trong thiết kế phát triển các hệ phân tán nanoliposome trên nền tảng tá dược phospholipid - polyoxyglycerid.

Tài liệu tham khảo

[1] Bocci G, Paolo D.A, Danesi R (2013), "The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of Paclitaxel", *Angiogenesis*, **16**, 481-492.

[2] Huizing M.T and Sewberath V.H (1995), "Taxanes: a new class of antitumor agents", *Cancer Investigation*, **13**(4), 381-404.

[3] Jiaher T and Valentino J.S (2008), "Degradation of Paclitaxel and related compounds in aqueous solutions I: epimerization", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**(3), 1224-1235.

[4] Koudelka S, Turánek J (2012), "Liposomal Paclitaxel formulations", *J Control Release*, **163**(3), 322-334.

[5] Singla K.A, Garg A, Aggarwal D (2002), "Paclitaxel and its formulations", *International Journal of Pharmaceutics*, **235**, 179-192.

[6] Wei Y, Xue Z, Ye Y, Huang Y, Zhao L (2014), "Paclitaxel targeting to lungs by way of liposomes prepared by the effervescent dispersion technique", *Arch Pharm Res.*, **37**(6), 728-37.

[7] Craig M.D.Q and Lever T (2007), "Thermo Analysis for Pharmaceutical", *CRC Press*, USA, 1-53.

[8] Lee J.H, Gi U.S, Kim J.H, Kim Y, Kim S.H, Oh H and Min B (2001), "Preparation and Characterization of Solvent Induced Dihydrated, Anhydrous, and Amorphous Paclitaxel", *Bulletin Korean Chemistry Social*, **22**(8), 925-928.

[9] Liggins R.T, Hunter W.L, Burt H.M (1997), "Solid-state characterization of Paclitaxel", **86**(12), 1458-1463.