

NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ LIPOSOME DOXORUBICIN

*Khánh Thị Nhi**; *Đào Thanh Tùng***; *Nguyễn Văn Lâm***
*Nguyễn Minh Chính**; *Phạm Thị Minh Huệ***

TÓM TẮT

Nghiên cứu bào chế và đánh giá đặc tính của liposome doxorubicin để bào chế thuốc tiêm doxorubicin nhằm giảm độc tính và tăng hiệu quả điều trị ung thư. Liposome doxorubicin được bào chế bằng phương pháp hydrat hóa film với các tá dược là phosphatidyl cholin, kết hợp với cholesterol. Hiệu suất liposome hóa của các mẫu bào chế đều trên 70%, ảnh hưởng bởi tỷ lệ lipid/dược chất và tỷ lệ phosphatidyl cholin/cholesterol. Liposome có cấu trúc nhiều lớp với kích thước từ 200 - 800 nm. Dược chất giải phóng chậm từ liposome ở pH 5,5 cao hơn ở pH 7,4.

* Từ khóa: Liposome doxorubicin; Phosphatidyl cholin.

PREPARATION OF DOXORUBICIN-LOADED LIPOSOME

SUMMARY

Liposomal doxorubicin administration could reduce toxicities associated with conventional doxorubicin use and increase tumor targeting efficiency. The objective of the study was to prepare and evaluate doxorubicin-loaded liposome with phosphatidyl choline (PC) and cholesterol (CHL) by the lipid film hydration method. The mean diameters of these liposome particles determined by dynamic light scattering ranged from 200 to 800 nm. The doxorubicin-loading efficiencies were 74 - 82%. In vitro data indicated that doxorubicin releasing from liposome in phosphate-buffered at pH 5.5 was faster than at pH 7.4.

* *Key words: Liposome doxorubicin; Phosphatidyl cholin.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cấu tạo liposome gồm một nhân nước được bao bọc bởi vỏ phospholipid, một hay nhiều lớp, có kích thước thay đổi từ hàng chục đến hàng nghìn nanomet. Dạng thuốc liposome có nhiều ưu điểm: có thể vận chuyển các dược chất tan trong nước, trong dầu và có thể thay đổi hoàn toàn đặc điểm dược động học của dược chất. Đồng thời, liposome còn có tác dụng bảo vệ dược chất trong quá trình vận chuyển trong cơ thể và giải phóng có kiểm soát các dược chất. Cấu trúc màng phospholipid của liposome tương

đồng với cấu trúc màng sinh học của cơ thể sống. Do vậy, liposome sẽ là chế phẩm y học có tính an toàn cao. Ưu điểm đặc biệt của liposome trong điều trị ung thư là thuốc phân bố nhiều vào khối u, hạn chế thuốc đến các mô lành gây độc. Vì thế, liposome được coi là dạng thuốc tại đích lý tưởng.

Trên thế giới, có một vài hãng dược phẩm sản xuất liposome doxorubicin và ứng dụng trong lâm sàng dưới dạng thuốc tiêm liposome (như doxil (Mỹ) hoặc caelyx và myocet (châu Âu) hay lipo-dox) để điều trị ung thư vú di căn và nhiều bệnh ung thư.

* Học viện Quân y

** Trường Đại học Dược Hà Nội

Phản biện khoa học: GS. TS. Nguyễn Liêm

PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

Tuy nhiên, các nghiên cứu trong nước về liposome chưa nhiều, chưa có cơ sở nào sản xuất dạng thuốc này. Vì vậy, nghiên cứu liposome doxorubicin là tiền đề quan trọng cho bào chế thuốc tiêm liposome doxorubicin. Chúng tôi tiến hành đề tài nhằm:

- *Bào chế liposome doxorubicin bằng phương pháp hydrat hóa film.*

- *Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới đặc tính của liposome.*

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PH- ƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên vật liệu và thiết bị.

** Nguyên vật liệu:*

Doxorubicin hydroclorid (USP 26), phosphatidyl cholin đậu nành (avanti polar lipids), cholesterol, cloroform, acid citric, natri hydroxyd, amoni sulphat kali dihydrophosphat, dinatri hydrophosphat, acid phosphoric, triton X 100 (octylphenolpoly (ethyleneglycolether)).

Tá dược và hóa chất đều đạt tiêu chuẩn dược dụng hoặc tinh khiết phân tích.

** Thiết bị:*

Hệ thống cất quay Rovapor R-210; màng thẩm tích Spectra/Por MWCO (Dalton) 12.000 - 14.000; hệ thống kính điện tử truyền qua (TEM) JEOL 1010; hệ thống thiết bị phân tích kích thước Zetasizer ZS90; máy siêu âm; máy quang phổ UV-VIS; máy đo pH; máy khuấy từ và các dụng cụ thông thường khác.

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Phương pháp bào chế liposome doxorubicin:*

Sử dụng phương pháp hydrat hóa film (phương pháp Bangham):

- Cân và hòa tan các lipid (soy phosphatidyl cholin, cholesterol) trong cloroform. Tiến hành cất quay ở nhiệt độ $40^{\circ}\text{C} \pm 2$ với tốc độ 50 vòng/phút. Hệ thống cất quay được nối hút chân không. Sau khi cloroform bay hơi hết, tiếp tục cất quay để dung môi bay hơi hoàn toàn, có thể thổi khí nitơ để loại hết dung môi. Thời gian cất quay tiến hành khoảng 12 giờ.

- Hydrat hóa bằng dung dịch đệm citrat có pH 3,5 - 4,0 trong bình cầu. Nhiệt độ hydrat hóa $50^{\circ}\text{C} \pm 2$, tốc độ quay của bình là 80 ± 5 vòng/phút. Thời gian hydrat hóa khoảng 2 giờ.

- Hỗn dịch liposome tạo thành được điều chỉnh pH đến 6,5 - 7,0 bằng dung dịch NaOH 30%.

- Cân chính xác một lượng doxorubicin hydroclorid cho vào cốc chứa hỗn dịch liposome đặt trên thiết bị khuấy từ, tốc độ 80 vòng/phút trong thời gian khoảng 2 giờ. Điều nhiệt cách thủy đến $50^{\circ}\text{C} \pm 2$.

- Liposome doxorubicin sau đó được đóng trong lọ thủy tinh tránh ánh sáng, bảo quản ở nhiệt độ $2 - 8^{\circ}\text{C}$.

** Phương pháp đánh giá liposome doxorubicin:*

- Kích thước tiểu phân và phân bố kích thước tiểu phân: sử dụng phương pháp nhiễu xạ ánh sáng động (DLS) với thiết bị Zetasizer ZS90. Pha loãng hỗn dịch liposome 200 lần bằng nước cất trước khi đo.

- Xác định cấu trúc liposome: chụp mẫu liposome doxorubicin bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Đưa mẫu sau khi xử lý lên lưới đồng 200 mắt đã phủ màng colloidion và carbon, để 5 phút, rửa và nhuộm bằng dung dịch urani acetat 1%. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua JEOL với điện áp 80 kV.

- Định lượng doxorubicin: bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 481 nm.

- Phương pháp đánh giá hiệu suất liposome hóa: hút 1 ml chế phẩm cho vào túi thẩm tích rồi treo túi trong bình nón chứa 50 ml dung dịch đệm phosphate pH = 5,5. Duy trì ở nhiệt độ 8 - 10°C trong 12 giờ. Lấy dung dịch bên ngoài túi thẩm tích đem đo mật độ quang ở bước sóng 233 nm. Tính hiệu suất liposome hóa theo công thức:

$$H = \frac{m_o - m}{m_o} \times 100$$

H: hiệu suất liposome hóa (%)

m, m_o: Khối lượng doxorubicin khuếch tán qua màng thẩm tích và khối lượng doxorubicin cho vào túi ban đầu.

- Phương pháp đánh giá khả năng giải phóng dược chất: hút 2 ml chế phẩm cho vào túi thẩm tích rồi treo túi trong bình nón

chứa 100 ml dung dịch đệm phosphate pH 5,5 hoặc pH 7,4. Khuấy từ ở tốc độ 50 vòng/phút và duy trì nhiệt độ mẫu ở 37°C. Hút dung dịch trong bình nón bên ngoài túi thẩm tích ở các thời điểm sau: 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 24 giờ.

Tiến hành đo mật độ quang các mẫu ở bước sóng 233 nm (pha loãng mẫu nếu cần) và tính tỷ lệ % doxorubicin giải phóng theo công thức:

$$\%GP = \frac{m_i}{m_o} \cdot 100; m_i = C_i \cdot 100 + \sum_{j=1}^{i-1} C_j \cdot 5$$

C_i, C_j: nồng độ doxorubicin ở dung dịch bên ngoài túi thẩm tích tại thời điểm i, j.

m_i, m_o: khối lượng doxorubicin giải phóng ở lần lấy mẫu thứ i và khối lượng doxorubicin tổng cộng đem thử.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

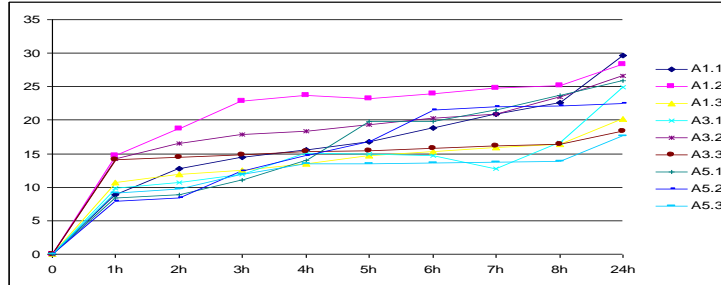
Liposome được bào chế với các tỷ lệ phosphatidyl và cholesterol khác nhau; tỷ lệ lipid và dược chất khác nhau (theo công thức ghi ở bảng 1).

Bảng 1: Các thông số của liposome doxorubicin.

CÔNG THỨC	SPC:CHL (mol:mol)	LIPID:DOX (mol:mol)	HÀM LƯỢNG DOX (mg/ml)	HIỆU SUẤT LIPOSOME HÓA (%)	KÍCH THƯỚC TRUNG BÌNH (nm)
A1.1	50:50	10:01	0,467	74	292,6
A1.2	50:50	5:01	0,917	76	415,5
A1.3	50:50	2,5:1	1,89	79	-
A3.1	70:30	10:01	0,456	82	649,9
A3.2	70:30	5:01	0,928	82	754,2
A3.3	70:30	2,5:1	1,921	81	-
A5.1	90:10	10:01	0,512	78	453,3
A5.2	90:10	5:01	0,827	75	564,9
A5.3	90:10	2,5:1	1,932	81	-

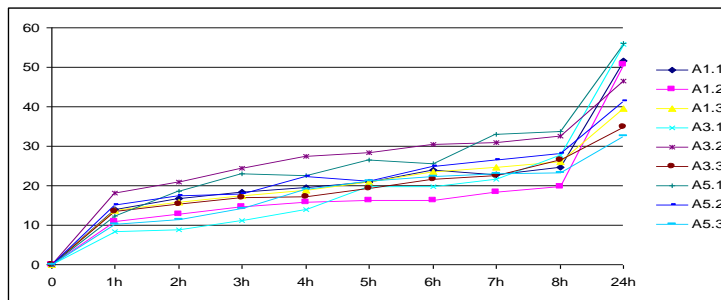
Công thức có tỷ lệ số mol phosphatidyl cholin/cholesterol là 70/30 cho hiệu suất cao hơn các công thức khác. Tỷ lệ mol lipid:doxorubicin không ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất liposome hóa (hiệu suất cao nhất 82%, thấp nhất 74%). Tất cả công thức đều có đặc điểm chung là phân bố kích thước tiểu phân khá rộng, mặc dù kích thước trung bình từ 293 - 754 nm.

Tiến hành đánh giá khả năng giải phóng dược chất doxorubicin theo phương pháp đã nêu.



Đồ thị 1: Giải phóng doxorubicin của liposome tại pH = 7,4.

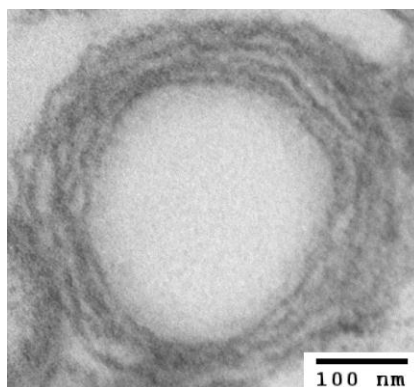
Tất cả mẫu liposome đều giải phóng chậm dược chất ở pH = 7,4 (sau 24 giờ chỉ giải phóng < 30% dược chất).



Đồ thị 2: Giải phóng doxorubicin của liposome tại pH = 5,5.

Ở pH 5,5, các mẫu liposome giải phóng dược chất chậm, nhưng lượng dược chất giải phóng sau 24 giờ cao hơn so với pH 7,4.

Kết quả chụp TEM (hình 1) cho thấy liposome tạo ra có cấu trúc nhiều lớp và kích thước lớn khá nhiều. Kết quả này phù hợp với kết quả đo phân bố kích thước liposome bằng DLS.



Hình 1: Hình ảnh chụp TEM của liposome doxorubicin công thức A3.2.

KẾT LUẬN

- Đã bào chế liposome bằng phương pháp tráng film, sử dụng phương pháp chênh lệch pH để đưa doxorubicin vào liposome.

- Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ lipid: doxorubicin và tỷ lệ lipid (soy phosphatidyl cholin:cholesterol) tới hiệu suất liposome hóa. Kết quả cho thấy, tỷ lệ lipid:doxorubicin không ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất liposome hóa. Tỷ lệ số mol soy phosphatidyl cholin/cholesterol là 70/30 cho hiệu suất liposome hóa cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Bolotin Elijah M, Cohen Rivka, Bar Liliana K. et al.* Ammonium sulfate gradients for efficient and stable remote loading of amphipathic weak bases into liposomes and ligandoliposomes. *Journal of Liposome Research*. 1994, 4 (1), pp.455-479.

2. *Gregoriadis Gregory.* Liposome technology third edition-entrapment of drugs and other materials into liposomes. Informa Healthcare USA, Inc. 2. 2006.

3. *Jesorka Aldo, Orwar Owe.* Liposomes: Technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical* 1. 2008, pp.801-832.

4. *Mayer Lawrence D, Tai Linda C.L, Bally Marcel B, Mitilenes George N, Ginsberg Richard S, Cullis Pieter R.* Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1990, 1025, pp.143-151.

5. *Mozafari Reza.* Liposomes: An overview of manufacturing techniques. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2005, 10, pp.711-719.

Tardi Paul G, Boman Nancy L, Cullis Peter R. Review liposomal doxorubicin. *Journal of Drug Target*. 1996, 4 (3), pp.129-140.