

Nghiên cứu bào chế Liposome Amphotericin B

Nguyễn Tuấn Quang^{1*}, Phạm Thị Minh Huệ²

¹Học viện Quân y

²Trường Đại học Dược Hà Nội

Ngày nhận bài 4.5.2015, ngày chuyển phản biện 6.5.2015, ngày nhận phản biện 1.6.2015, ngày chấp nhận đăng 8.6.2015

Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu bào chế Liposome Amphotericin B (AmB) theo 2 phương pháp: hydrat hóa film và pha loãng ethanol. Các thành phần chính dùng để bào chế bao gồm AmB, hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC), distearoyl phosphatidylglycerol (DSPG) và cholesterol. Từ kết quả nghiên cứu, đã lựa chọn được một số yếu tố công thức cũng như quy trình bào chế có hiệu quả cao nhất. Với phương pháp hydrat hóa film, đã lựa chọn được tỷ lệ dược chất/tổng lượng lipid là 9% mol; tỷ lệ HSPC/DSPG là 2/0,8; dung dịch hydrat hóa là đệm citrat pH = 5 và bào chế được Liposome AmB có kích thước tiểu phân (KTTT) = 228 nm, độ phân bố KTTT (PDI) = 0,189, hiệu suất Liposome hóa là 89,41%. Với phương pháp pha loãng ethanol, lựa chọn được tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước là 8/100, nhiệt độ phối hợp 2 pha là 60°C, tốc độ khuấy trộn 2 pha là 3900 vòng/phút cho quy trình bào chế; bào chế được Liposome AmB có KTTT = 190 nm, PDI = 0,136, hiệu suất Liposome hóa là 73,20%.

Từ khóa: bào chế, hydrat hóa film, Liposome Amphotericin B, pha loãng ethanol.

Chỉ số phân loại 3.4

STUDY ON PREPARATION OF LIPOSOME AMPHOTERICIN B

Summary

Liposome is prepared by two methods: thin film hydration and ethanol dilution with main ingredients including Amphotericin B (AmB), hydrogenated soybean phosphatidylcholine, distearoyl phosphatidylglycerol and cholesterol. By investigating and selecting, some factors belonging to formula and pharmaceutical procedure have been achieved. The result is that a suspension of Liposome AmB which is prepared has a small dimension (of about 200 nm), consistent distribution (PDI < 0.2) and high percentage of entrapment of Liposome (above 70%).

Keywords: ethanol dilution, Liposome Amphotericin B, preparation, thin film hydration.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

AmB là một thuốc điều trị nhiễm nấm toàn thân phổ rộng và có hoạt tính kháng nấm mạnh đã được sử dụng từ rất lâu. 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 phụ, đặc biệt là gây độc cho thận. Điều này càng trở nên trầm trọng ở những bệnh nhân nhiễm nấm xâm lấn toàn thân do suy giảm miễn dịch, ung thư.

Còn Liposome là một trong những hệ mang thuốc mới đang nhận được sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới nhờ có những ưu điểm nổi bật về khả năng mang thuốc, kiểm soát giải phóng thuốc và khả năng đưa thuốc tới cơ quan đích [1, 2].

Vì vậy, việc nghiên cứu bào chế Liposome AmB để ứng dụng trong các chế phẩm nhằm giúp kiểm soát giải phóng, tăng sinh khả dụng và làm giảm độc tính trên thận của AmB là vấn đề khoa học mang tính cấp thiết.

Nguyên liệu, đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu, thiết bị và dụng cụ nghiên cứu

- Nguyên liệu: AmB, hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC), distearoyl phosphatidylglycerol (DSPG), cholesterol, dinatri

*Tác giả chính: Tel: 0913311978

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 Mỹ (USP), tiêu chuẩn nhà sản xuất hoặc tinh khiết hóa học, acetonitril, methanol dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

- Thiết bị và dụng cụ: cân phân tích Satorius BP121S (Đức), hệ thống cất quay Rovapor R-210 (Đức), bể siêu âm Wise clean (Hàn Quốc), máy đồng nhất hoá CAT Unidrive X1000 (Đức), thiết bị đun/ép - Liposom extruder (Mỹ), thiết bị đun/ép cao áp EmulsiFlex-c5 (Canada), thiết bị lọc tiếp tuyến MicroKros Filter Modiles (Mỹ), hệ thống thiết bị phân tích kích thước Zetasizer nano ZS90 (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.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Liposome AmB.

Phương pháp nghiên cứu:

* Phương pháp bào chế Liposome AmB: dựa theo các tài liệu tham khảo [3], Liposome AmB được nghiên cứu bào chế với các thành phần chính gồm AmB, DSPG, HSPC, cholesterol theo phương pháp hydrat hóa film và phương pháp pha loãng ethanol [1, 2, 4]. Tiến hành khảo sát một số yếu tố thuộc về công thức và quy trình bào chế đến một số đặc tính của Liposome AmB.

* Phương pháp đánh giá Liposome AmB tạo thành và sau đông khô:

- Đo KTTT và độ đồng nhất: sử dụng phương pháp tán xạ ánh sáng động với thiết bị Zetasizer ZS90.

- Hình thái cấu trúc tiểu phân: sử dụng phương pháp chụp hiển vi điện tử truyền qua (TEM) với kỹ thuật nhuộm soi âm bản.

- Hiệu suất Liposome hóa: xây dựng quy trình định lượng AmB trong Liposome bằng phương pháp HPLC [5] và phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis ở bước sóng 405 nm. 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

Kết quả bào chế Liposome AmB theo phương pháp hydrat hóa film

Lựa chọn các điều kiện cho quy trình bào chế: đã tiến hành khảo sát và lựa chọn được các điều kiện của quá trình bào chế với hệ thống cất quay Rovapor R-210 (Đức) gồm: 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.

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/Cholesterol = 2/0,8/1,9; dung dịch hydrat hóa là glucose 5%. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của Liposome tạo thành được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: 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

Từ kết quả ở bảng 1 cho thấy, các mẫu từ A3 đến A9 có KTTT tương đối nhỏ và không khác biệt (256-266 nm), phân bố KTTT 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%). Vì vậy, mẫu A9 với 9% mol AmB/tổng lipid được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

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 là 9% mol, tỷ lệ cholesterol là 40% tổng lượng lipid, dung dịch hydrat hóa là dung dịch glucose 5%. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của Liposome tạo thành được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: 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

Từ kết quả ở bảng 2 cho thấy, mẫu A9-0,8 có hiệu suất Liposome hóa cao (87,16%), KTTP nhỏ (217 nm), phân bố KTTP (PDI = 0,208) trong khoảng hẹp hơn so với các mẫu còn lại nên được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

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. 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 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

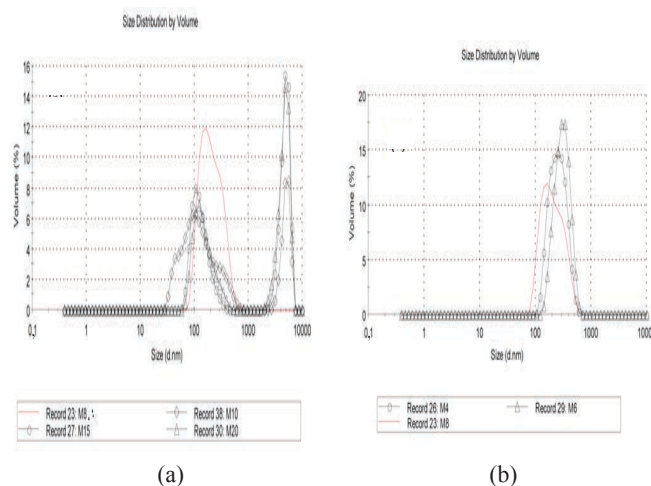
Từ kết quả ở bảng 3 cho thấy, các mẫu Liposome AmB có sự khác nhau khá lớn về KTTP (từ 228 đến 324 nm), PDI (từ 0,189 đến 0,351) và pH sau 3 tuần bảo quản (từ 2,88 đến 6,08). Trong đó, mẫu A9-0,8-3 dùng đệm citrat pH = 5 làm dung dịch hydrat hóa có KTTP nhỏ nhất (228 nm), phân bố KTTP đồng nhất (PDI = 0,189), hiệu suất Liposome hóa cao (89,41%) và ít có sự thay đổi pH sau 3 tuần bảo quản (0,12) được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả bào chế Liposome AmB theo phương pháp pha loãng ethanol

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước tới các đặc tính của Liposome: tiến hành nghiên cứu bằng cách cố định nhiệt độ phối hợp 2 pha là 60°C, tốc độ khuấy trộn 2 pha là 3900 vòng/phút. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của Liposome tạo thành được trình bày ở bảng 4 và hình 1.

Bảng 4: ảnh hưởng của tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước đến các đặc tính của Liposome AmB

Mẫu	Thể tích pha ethanol/pha nước (ml)	Z_{average} (d.nm)	PDI	H (%)
B4	4/100	235,1	0,120	69,21
B6	6/100	227,7	0,174	68,94
B8	8/100	204,3	0,120	73,53
B10	10/100	157,8	0,222	67,98
B15	15/100	194,2	0,278	Không đánh giá
B20	20/100	176,0	0,208	Không đánh giá



Hình 1: phân bố thể tích của các công thức có tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước trên 10/100 (a) và các công thức có tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước dưới 10/100 (b)

Từ kết quả ở bảng 4 cho thấy, các mẫu khảo sát đều tạo được Liposome AmB có KTTP tương đối nhỏ ($Z_{\text{average}} < 300$ nm) và đồng nhất (PDI < 0,3). Tuy nhiên, kết quả ở hình 1 lại cho thấy có sự khác biệt rõ ràng về phân bố KTTP giữa các công thức có tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước từ 10/100 trở lên và các công thức có tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước dưới 10/100. Các công thức với tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước từ 10/100 trở lên có tỷ lệ cao các tiểu phân kích thước lớn (>1000 nm) (nên không tiến hành đánh giá hiệu suất Liposome hóa); ngược lại, các công thức với tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước dưới 10/100 có tỷ lệ các tiểu phân kích thước nhỏ chiếm đa số, không xuất hiện các tiểu phân kích thước lớn (>1000 nm). Công thức B8 có hiệu suất Liposome hóa cao nhất (đạt 73,53%) trong các công thức có tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước dưới 10/100. Kết hợp với các tài liệu tham khảo [6-8], lựa chọn tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước là 8/100 để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ phối hợp 2 pha tới các đặc tính của Liposome: tiến hành nghiên cứu bằng cách cố định tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước

là 8/100, tốc độ khuấy trộn 2 pha là 3900 vòng/phút. 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 nhiệt độ phối hợp 2 pha đến các đặc tính của Liposome AmB

Mẫu	Nhiệt độ phối hợp 2 pha (°C)	Z _{average} (d.nm)	PDI	H (%)
B8-30	30	363,4	0,283	54,89
B8-45	45	230,3	0,142	71,02
B8-60	60	204,3	0,120	73,53
B8-75	75	239,3	0,216	67,47

Từ kết quả ở bảng 5 cho thấy, nhiệt độ có ảnh hưởng đến KTTT, phân bố KTTT và hiệu suất Liposome hóa của các mẫu Liposome AmB. Mẫu B8-60 cho KTTT nhỏ nhất (204,3 nm), độ đồng nhất cao nhất (PDI = 0,12), hiệu suất Liposome hóa cao nhất (73,53%). Kết hợp với tài liệu tham khảo [7], lựa chọn nhiệt độ phối hợp 2 pha là 60°C để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

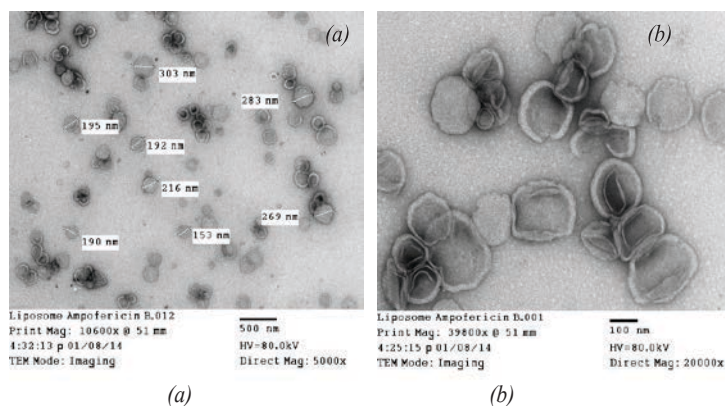
Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ khuấy trộn 2 pha tới các đặc tính của Liposome: tiến hành nghiên cứu bằng cách cố định tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước là 8/100 và nhiệt độ phối hợp 2 pha là 60°C. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của Liposome tạo thành được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6: ảnh hưởng của tốc độ khuấy trộn 2 pha tới các đặc tính của Liposome AmB

Mẫu	Tốc độ khuấy trộn 2 pha (v/ph)	Z _{average} (d.nm)	PDI	H (%)
B8-60-0	Không khuấy trộn	693,1	0,509	Không đánh giá
B8-60-39	3900	204,3	0,120	73,53
B8-60-69	6900	220,2	0,242	73,11
B8-60-99	9900	289,3	0,312	69,10

Từ kết quả ở bảng 6 cho thấy, công thức không kết hợp lực phân tán (B8-60-0) cho Liposome có KTTT rất lớn (693,1 nm), không đồng nhất (PDI = 0,509) và không tiến hành đánh giá hiệu suất Liposome hóa. Các công thức còn lại đều cho Liposome có KTTT tương đối nhỏ và độ đồng nhất cao. Trong đó, công thức B8-60-39 kết hợp lực khuấy trộn là 3900 v/ph tạo được Liposome có KTTT nhỏ nhất, độ đồng nhất cao nhất và hiệu suất Liposome hóa cao được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Mẫu Liposome AmB có công thức B8-60-39 được đem chụp TEM, kết quả ở hình 2 cho thấy Liposome AmB có 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).



Hình 2: hình ảnh chụp TEM cấu trúc (a) và KTTT Liposome AmB (b)

Kết luận

Đã tiến hành bào chế Liposome AmB theo 2 phương pháp: hydrat hóa film và pha loãng ethanol và lựa chọn được một số yếu tố thuộc về công thức cũng như quy trình bào chế.

- Với phương pháp hydrat hóa film: lựa chọn được tỷ lệ được chất/tổng lượng lipid là 9% mol; tỷ lệ HSPC/DSPG là 2/0,8; dung dịch hydrat hóa là đệm citrat pH = 5 và bào chế được Liposome AmB có KTTT = 228 nm, PDI = 0,189, hiệu suất Liposome hóa là 89,41%.

- Với phương pháp pha loãng ethanol: sử dụng hỗn hợp đồng dung môi DMA-ethanol để cải thiện độ tan của AmB và lựa chọn được tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước là 8/100, nhiệt độ phối hợp 2 pha là 60°C, tốc độ khuấy trộn 2 pha là 3900 vòng/phút cho quy trình bào chế. Bào chế Liposome AmB có KTTT = 190 nm, PDI = 0,136 và hiệu suất Liposome hóa là 73,20%.

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*, Trung tâm Thông tin - Thư viện, Trường Đại học Dược Hà Nội.
- [2] Lasic D.D (1995), *Handbook of biological physics, chapter 10, applications of Liposome*, Elsevier Science B.V, California.
- [3] Deepak Singodia, Ashwni Verma, et al (2012), "Investigations on feasibility of in situ development of AmB Liposomes for industrial applications", *Journal of Liposome Research*, **22**(1), pp.8-17.
- [4] Ray A (2012), "Liposome in Drug delivery system", *Asian J Res Pharm. Sci*, **2**(2), pp.41-44.
- [5] Italia J.L, Singh D, Ravi Kumar M.N.V (2009), "High-performance liquid chromatographic analysis of AmB in rat plasma using α -naphthol as an internal standard", *Analytica chimica acta*, **634**, pp.110-114.
- [6] Anastasia S Domazou and Pier Luigi Luisi (2002), "Size distribution of spontaneously formed Liposomes by the alcohol injection method", *Journal of Liposome research*, **12**(3), pp.205-220.
- [7] Miquel Pons, Merc Foradada and Joan Estelrich (1993), "Liposomes obtained by the ethanol injection method", *International Journal of Pharmaceutics*, **95**, pp.51-56.
- [8] Oselys Rodriguez Justo, Angela Maria Moraes (2011), "Analysis of process parameters on the characteristics of Liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume", *Chemical engineering research and design*, **89**, pp.785-792.