

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

BỘ MÔN BÀO CHẾ



HỘI NGHỊ KHOA HỌC BỘ MÔN BÀO CHẾ

BÁO CÁO KHOA HỌC

HÀ NỘI, THÁNG 4/2011

MỤC LỤC

Trang

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG GIẢI PHÓNG PIROXICAM TỪ HỖN DỊCH NANO.....	1
Nguyễn Thị Mai Anh	
NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN SỰ GIẢI PHÓNG DƯỢC CHẤT TỪ VIÊN PSEUDOEPHEDRIN 60 mg	9
Đinh Thị Hải Bình, Lê Thị Ngọc Diệp	
NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA HYDROXYPROPYL- β -CYCLODEXTRIN ĐẾN ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA PANTOPRAZOL	16
Phạm Xuân Chung	
NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG ITRACONAZOL TRONG CHẾ PHẨM VIÊN NANG BẰNG PHƯƠNG PHÁP VI SINH.....	25
Trần Trịnh Công	
VI CẦU KIỂM SOÁT GIẢI PHÓNG - KẾT DÍNH NIÊM MẠC VÀ ỨNG DỤNG TRONG CẢI THIỆN HẤP THU ACICLOVIR QUA ĐƯỜNG TIÊU HÓA.....	31
Vũ Thị Thu Giang, Phạm Thị Minh Huệ, Nguyễn Thu Hiền	
NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ NANO NHỮ TƯƠNG NHỎ MẮT DICLOFENAC VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG GIẢI PHÓNG DƯỢC CHẤT <i>IN VITRO</i> CỦA CHẾ PHẨM.....	40
Đặng Thị Hiền, Vũ Ngọc Mai, Nguyễn Trần Linh	
NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ VIÊN NÉN Captopril GIẢI PHÓNG KÉO DÀI BẰNG PHƯƠNG PHÁP DẬP NHIỀU LỚP	49
Hoàng Ngọc Hà, Phạm Thị Minh Huệ	
MÔ HÌNH THỬ GIẢI PHÓNG <i>IN VITRO</i> CỦA DẠNG THUỐC TỚI ĐÍCH GIẢI PHÓNG TẠI ĐẠI TRÀNG.....	59
Nguyễn Thu Quỳnh	
PREPARATION AND INVESTIGATION OF SELECTIVE ACCUMULATION AND PDT EFFECTIVENESS OF LIPOSOMES LOADED WITH PHOTODITAZIN	69
Trần Thị Hải Yến	
CHỈ MỤC TÁC GIẢ	73

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG GIẢI PHÓNG PIROXICAM TỪ HỖN DỊCH NANO

Nguyễn Thị Mai Anh

1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, bào chế thuốc dựa trên công nghệ nano đang là một trong những biện pháp đầy triển vọng được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng trong ngành dược. Công nghệ này được xem như đem lại cuộc cách mạng trong lĩnh vực phát triển thuốc do tạo ra được những chế phẩm mới, hệ dẫn thuốc mới đạt hiệu quả điều trị vượt trội trên những dược chất sẵn có. Những thành công nổi bật từ các thuốc nano có được là do những đặc điểm mới riêng biệt của của tiểu phân nano liên quan đến giải phóng và hấp thu dược chất. Tuy nhiên, cơ chế giải phóng dược chất từ hệ nano rất phức tạp và quá trình giải phóng phụ thuộc vào nhiều yếu tố: từ nguyên liệu, tá dược đến kỹ thuật bào chế. Do đó chúng tôi thực hiện đề tài: “*Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng giải phóng piroxicam từ hỗn dịch nano*”.

2. Đối tượng, nguyên liệu, phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu: piroxicam

2.2. Nguyên liệu: piroxicam (Px- Trung Quốc), tiêu chuẩn USP 30, Eudragid RS 100 và alcol polyvinic (PVA- Đức). Một số dung môi, hóa chất tinh khiết hóa học dùng cho bào chế và phân tích.

2.3. Thiết bị: Máy khuấy Braul 4185 (Séc), máy ly tâm Sigma 3-18 K Satorius (Đức), kính hiển vi điện tử quét FESEM Hitachi S-4800 (Nhật), kính hiển vi điện tử truyền qua JEM 1010 (JOEL), máy xác định phân bố kích thước hạt HORIBA LA-950, máy HPLC Spectra System Thermo, máy đo thể Zeta Phoremeter IV-CAD, RKIN ELME, hệ thống đánh giá giải phóng thuốc qua màng Hanson Research, màng polysulfon 0,45 μm , màng cellulose acetat Sartorius 0,45 μm . Một số thiết bị bào chế, kiểm nghiệm khác.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Chế tạo và đánh giá một số đặc tính của hệ nano piroxicam

Chế tạo hệ nano piroxicam bằng phương pháp nhũ hóa và bốc hơi dung môi sau đó đánh giá hình dạng, kích thước, cấu trúc tính chất điện bề mặt tiểu phân nano, xác định hàm lượng dược chất trong hệ nano [1]

Đông khô hỗn dịch nano với các thông số: đông lạnh - 70 $^{\circ}\text{C}$ trong 8 giờ, làm khô sơ cấp ở - 15 $^{\circ}\text{C}$, tốc độ gia nhiệt 0,5 $^{\circ}\text{C}$ / 1 phút, thời gian lưu 20 giờ, làm khô thứ cấp ở 30 $^{\circ}\text{C}$, tốc độ gia nhiệt 0,25 $^{\circ}\text{C}$ / 1 phút, thời gian lưu 8 giờ.

2.4.2. Bào chế hỗn dịch nano piroxicam

Hỗn dịch nano được bào chế bằng phương pháp phân tán. Khảo sát ảnh hưởng của các thành phần trong môi trường phân tán đến độ ổn định cấu trúc hóa lý của hỗn dịch dựa vào tốc độ sa lắng và hiện tượng kết tụ tiểu phân.

2.4.3. Đánh giá khả năng giải phóng dược chất

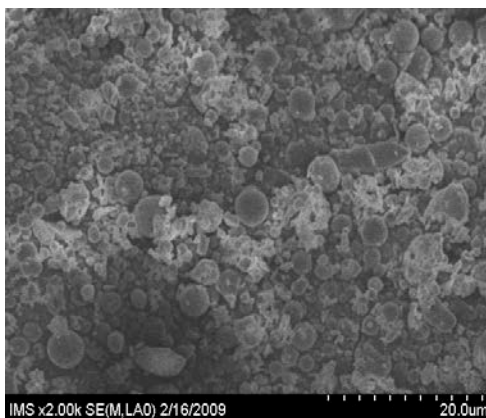
Các điều kiện cụ thể như sau:

Màng cellulose acetat, kích thước lỗ xốp 0,45 μm . Môi trường khuếch tán: dung dịch nước mắt nhân tạo (natri clorid 6,70g; calci clorid 0,08g; natri bicarbonat 2,00g; nước cất vừa đủ 1000ml [7]). Thể tích môi trường khuếch tán: 7ml. Nhiệt độ môi trường: $34^{\circ}\text{C} \pm 1$. Diện tích bề mặt khuếch tán: 0,8 cm^2 . Tốc độ khuấy: 400 vòng/phút. Lượng mẫu đem thử: 0,3 ml (tương ứng 1,5 mg dược chất). Lấy mẫu sau mỗi giờ, xác định lượng piroxicam giải phóng bằng phương pháp HPLC [1].

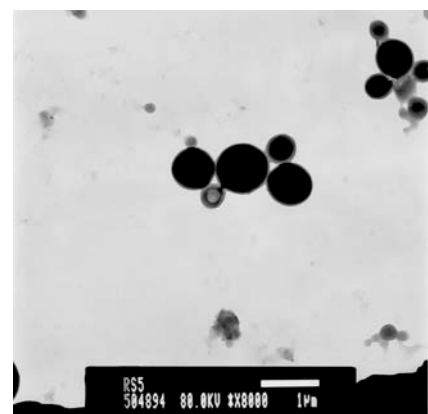
3. Kết quả và bàn luận.

3.1. Đông khô hệ nano hỗn dịch

Nhiều báo cáo khoa học cho rằng đông khô là giải pháp tối ưu để loại hết dung môi và tránh được hiện tượng kết tụ tiểu phân, ổn định cấu trúc hạt [2], [4]. Trong phạm vi nghiên cứu này, các tá dược tạo khung được sử dụng là glucose, sorbitol, manitol và PVA. Mẫu sau khi đông khô có cấu trúc bánh nguyên vẹn, thể chất xốp, độ xốp và kiểu xốp khác nhau chứa các tiểu phân hình cầu đều đặn, bề mặt nhẵn và đa số hạt có kích thước nhỏ hơn 1000 nm, cấu trúc hạt gồm hai phần: vỏ ngoài là polyme, nhân bên trong là dược chất (Hình 1).



(a)



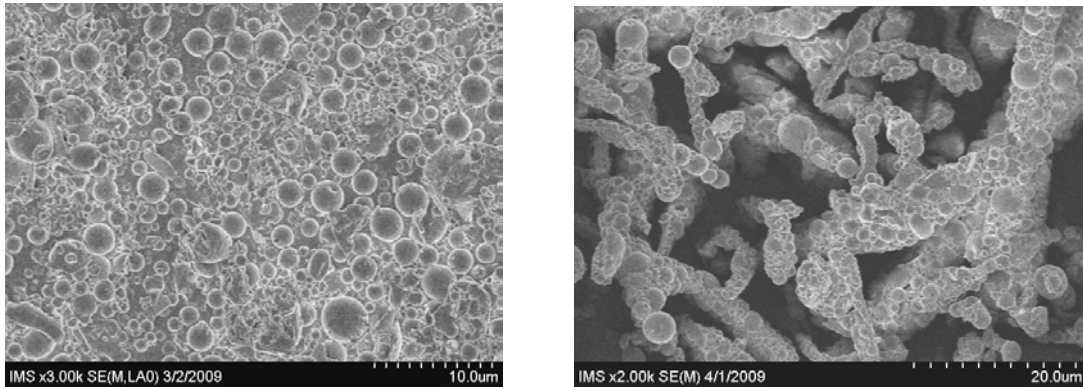
(b)

Hình 1: Hình dạng, cấu trúc các tiểu phân trong hệ nano

(a) Ảnh chụp từ kính hiển vi điện tử quét,

(b) Ảnh chụp từ kính hiển vi điện tử truyền qua

Phân tích hình ảnh chụp qua kính hiển vi điện tử quét (Hình 2) có thể nhận thấy: các tiểu phân dược chất được phân tán đều trên tá dược tạo khung, không kết dính nhau, phân tán dễ dàng trong nước, đặc biệt là các mẫu đông khô với manitol và PVA. Vì vậy PVA và manitol được lựa chọn cho những thí nghiệm tiếp theo.



(a)

(b)


Hình 2: Hình ảnh các tiểu phân trong hệ nano sau khi đông khô

(a): PE đông khô với manitol; (b): PE đông khô với PVA

3.2. Bào chế hỗn dịch nano

Hệ nano sau khi chế tạo được kiểm tra hàm lượng dược chất bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Hàm lượng Px trong hệ khoảng 12%. Các mẫu này được bảo quản ở nhiệt độ phòng (25-35°C, độ ẩm 40-70%). Sau 3 tháng, sản phẩm không có sự thay đổi về hình dạng, màu sắc của bánh đông khô, hàm lượng dược chất không thay đổi, dễ phân tán lại trong nước và soi dưới kính hiển vi không thấy có hiện tượng kết tụ tiểu phân. Hệ này được sử dụng làm nguyên liệu để bào chế hỗn dịch.

Với mục tiêu ban đầu là hạn chế đến mức tối đa hiện tượng kết tụ tiểu phân trong môi trường lỏng, hỗn dịch đã được nghiên cứu xây dựng công thức như sau:

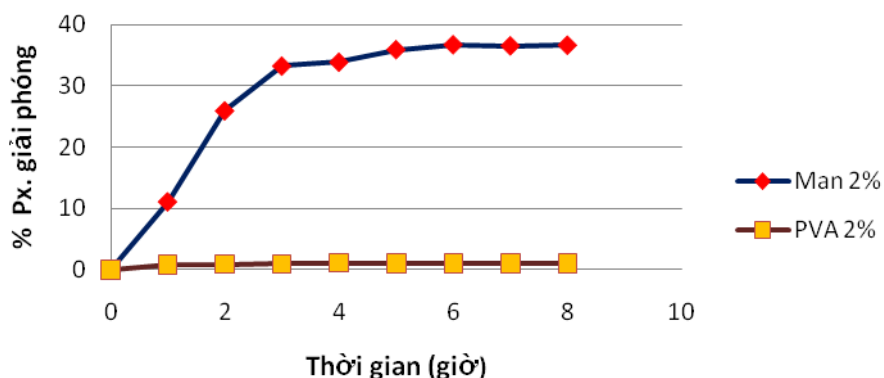
Nano piroxicam tương ứng với 0,5g piroxicam		
Acid citric monohydrat	0,2 g	
Natri hydroxyd	0,1 g	
Benzalkonium clorid	0,02 g	
Manitol	4,00 g	
Nước để pha tiêm vđ	100 ml	

Hình 3: Tiểu phân nano phân tán trong môi trường lỏng

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của một số thành phần trong công thức đến khả năng giải phóng dược chất từ hỗn dịch

3.3.1. Ảnh hưởng của nguyên liệu bào chế hỗn dịch đến khả năng giải phóng dược chất

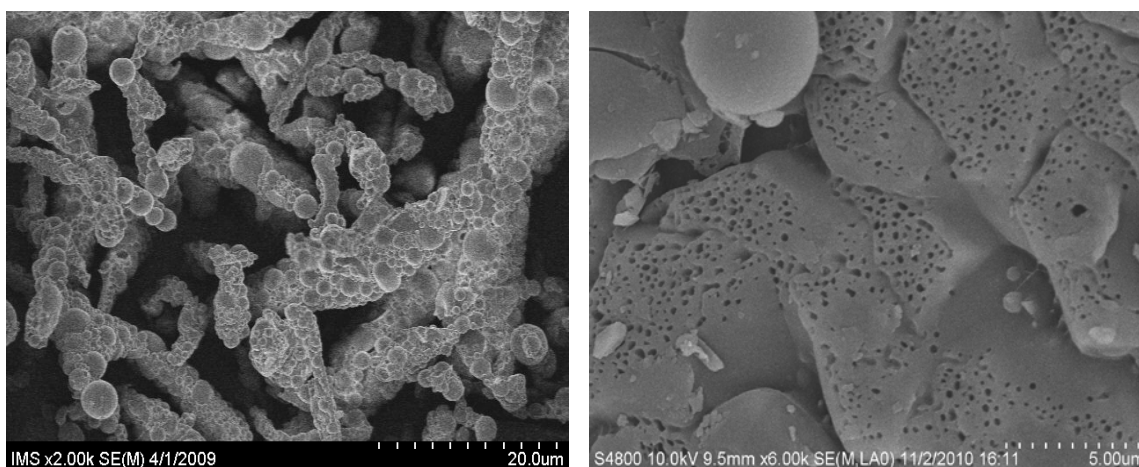
Bào chế hỗn dịch từ 2 nguyên liệu là hệ nano đông khô chứa manitol và hệ nano đông khô chứa PVA, đánh giá khả năng giải phóng dược chất từ hỗn dịch theo phương pháp trình bày ở mục 2.4.3. Kết quả thể hiện trên đồ thị giải phóng thuốc từ hỗn dịch qua màng cellulose acetat trong hình 4 cho thấy hỗn dịch bào chế từ hệ nano chứa PVA giải phóng dược chất rất ít.



Hình 4: Đồ thị giải phóng piroxicam từ hỗn dịch bào chế dựa trên 2 hệ nano với tá dược đông khô là manitol và PVA.

Mặt khác, khi quan sát nguyên liệu sau 6 tháng, bột đông khô chứa manitol không thay đổi thể chất và cấu trúc, trong khi đó bột đông khô chứa PVA giảm độ xốp, phân tán trong nước khó khăn hơn, phân tích hình ảnh chụp qua kính hiển vi điện tử quét nhận thấy cấu trúc khối bột thay đổi đáng kể (Hình 5). Như vậy, có thể nói PVA bị biến

đổi trong quá trình bảo quản hoặc có tương tác với lớp vỏ Eudragit bao quanh tiểu phân nano nên làm cản trở giải phóng dược chất. Do đó, hệ nano đông khô sử dụng tá dược tạo khung manitol được sử dụng để bào chế hỗn dịch trong những thí nghiệm tiếp theo.



(a)

(b)

Hình 5: Hệ nano đông khô chứa PVA

(a): ngay sau khi bào chế

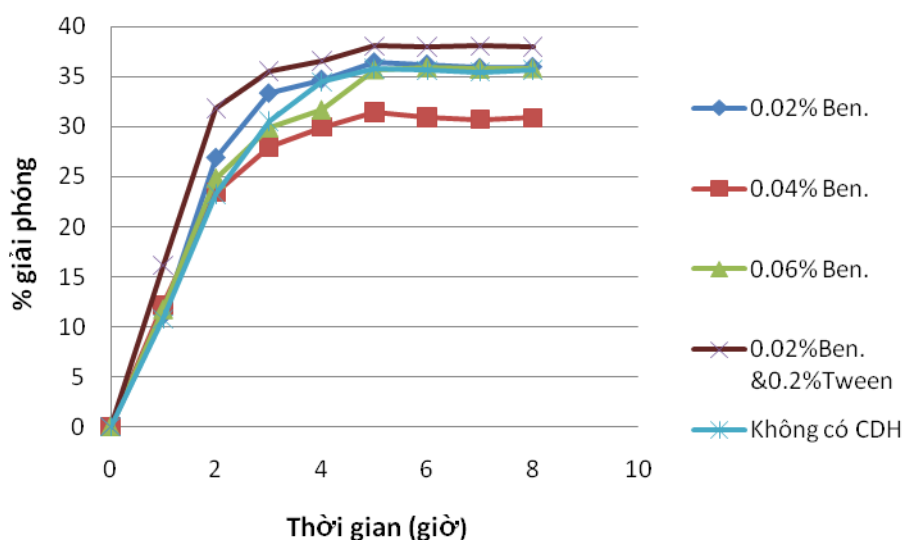
(b): sau 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng

3.3.2. Ảnh hưởng của chất điện hoạt đến khả năng giải phóng dược chất

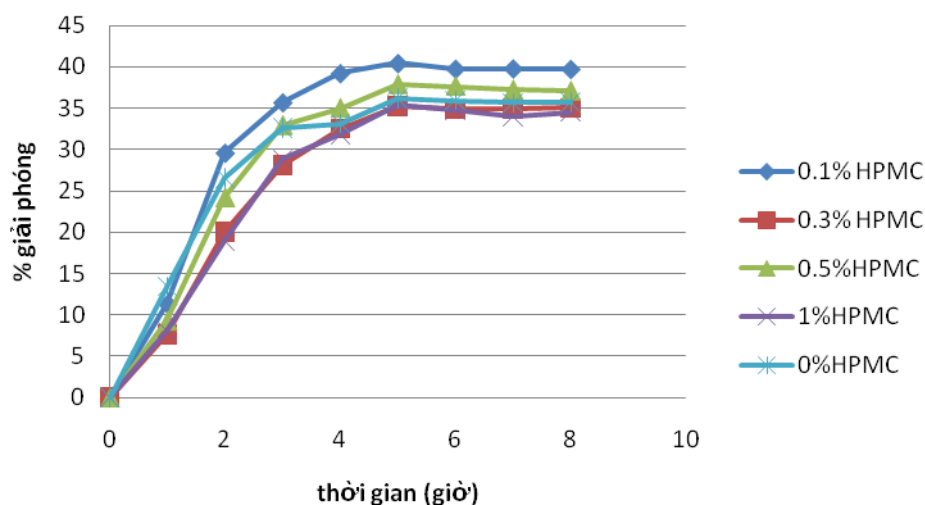
Với mục đích làm tăng khả năng thấm của dược chất qua màng, hỗn dịch nano được bào chế với một số tỷ lệ benzalkonium clorid (Ben.) khác nhau kết hợp với sử dụng Tween 80. Kết quả thử giải phóng cho thấy, tại những nồng độ Ben. Đã khảo sát (0,02%; 0,04%; 0,06%), lượng Px giải phóng từ các hỗn dịch nano qua màng cellulose acetat thay đổi không đáng kể. Khi kết hợp 0,02% Ben. với 0,2% Tween 80, khả năng giải phóng của dược chất tăng lên một chút (kết quả thể hiện ở đồ thị trên hình 6).

3.3.3. Ảnh hưởng của chất làm tăng độ nhớt đến khả năng giải phóng dược chất

Độ nhớt của môi trường phân tán là một trong những yếu tố quan trọng quyết định độ ổn định cấu trúc lý hóa của hỗn dịch và sinh khả dụng của thuốc nhỏ mắt. Trong nội dung của nghiên cứu này, hỗn dịch được bào chế với một số tỷ lệ HPMC khác nhau (0%; 0,1%; 0,3%; 0,5% và 1 %). Thực tế thử giải phóng thuốc từ hỗn dịch (hình 6) cho thấy: trong những mẫu đã khảo sát, Px được giải phóng từ hỗn dịch chứa 0,1 % HPMC là cao nhất, các hỗn dịch còn lại, kết quả thực nghiệm khác nhau không đáng kể, do đó nồng độ HPMC 0,1% được lựa chọn để bào chế hỗn dịch.



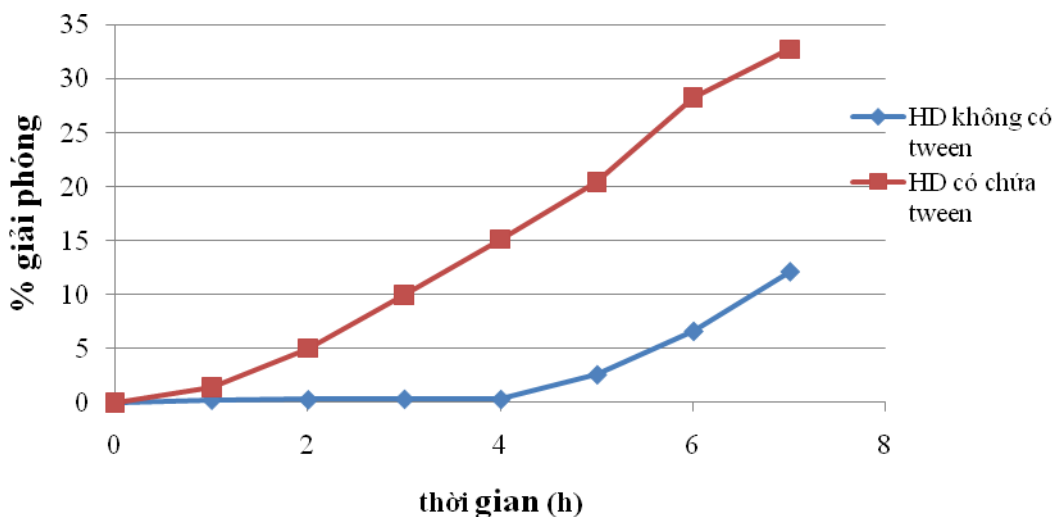
Hình 6: Đồ thị giải phóng piroxicam từ các hỗn dịch nano có nồng độ chất điện hoạt khác nhau



Hình 6: Đồ thị giải phóng piroxicam từ các hỗn dịch nano chứa nồng độ HPMC khác nhau

3.4. Đánh giá khả năng giải phóng dược chất qua màng sinh học

Giác mạc mắt thỏ được bóc tách cẩn thận trong vòng 1 giờ ngay sau khi thỏ chết, rửa sạch, ngâm trong nước muối sinh lý và dùng để thử giải phóng thuốc trong vòng 6 h để đảm bảo niêm mạc còn trong suốt và nguyên vẹn. Xác định lượng Px thẩm qua màng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.



Hình 7: Đồ thị giải phóng piroxicam qua giác mạc mắt thỏ bóc tách

Với kết quả thể hiện ở hình 7, lượng Px trong hỗn dịch chứa Tween 80 thẩm qua giác mạc cao gấp 3 lần so với hỗn dịch không chứa Tween 80. Có thể kết luận rằng: chất diện hoạt đã thể hiện rõ vai trò làm tăng tính thẩm của dược chất qua màng sinh học do làm thay đổi tính chất của màng.

4. Kết luận

Với các kết quả đã khảo sát ở trên, chúng tôi lựa chọn được công thức hỗn dịch nano giải phóng dược chất tương đối tốt với những thành phần như sau:

Nano piroxicam tương ứng với	0,5 g piroxicam
Acid citric monohydrat	0,2 g
Natri hydroxyd	0,1 g
Benzalkonium clorid	0,02 g
Tween 80	0,2 g
Manitol	4,00 g
Nước để pha tiêm vđ	100 ml

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Mai Anh và cộng sự, “Nghiên cứu bào chế và đánh giá một số đặc tính của hệ nano piroxicam”, *Tạp chí dược học* (2009), số 8/2009, trang 50-53.

2. Wassim Abdelwahed, “Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations”, *Adv. Drug Del. Rev.* (2006), 58, p. 1688–1713.
3. Khosro Adibkia et al, "Piroxicam nanoparticles for ocular delivery: Physicochemical characterization and implementation in endotoxin-induced uveitis", *J. Drug Target.* (2007), 15, 6, p.407-416,
4. Min Kyung Lee, “Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: Effect of freezing rate”, *J. Pharm. Sci.*, Inpress (2009), p.1-10.
5. Vikas Mittal, “Advanced polymer nanoparticles” (2011), CRC Press.
6. Ram N. Prajapati et al, "Dendimer-mediated solubilization, formulation development and in vitro, in vivo assessment of piroxicam", *Mol. Pharm.* (2009), 6, 3, p. 940 – 950.
7. Sultana Yasmin et al (2006), “Ion-Activated, Gelrite® - Based in Situ Ophthalmic Gels of Pefloxacin Mesylate: Comparison with Conventional Eye Drops”, *Drug Delivery*, 13, p 215 – 219.

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN SỰ GIẢI PHÓNG DƯỢC CHẤT TỪ VIÊN PSEUDOEPHEDRIN 60 mg

Đinh Thị Hải Bình, Lê Thị Ngọc Diệp

Đặt vấn đề

Pseudoephedrin có tác dụng co mạch làm giảm sung huyết, thường được kết hợp với một số hoạt chất khác để tăng hiệu quả điều trị bệnh viêm mũi dị ứng. Pseudoephedrin thường dùng dưới dạng muối sulfat hoặc hydroclrid, dễ tan trong nước, có thời gian bán thải ngắn (khoảng 5-8 giờ), nếu bào chế dưới dạng tác dụng kéo dài sẽ nâng cao được hiệu lực điều trị, giảm tác dụng không mong muốn. Để góp phần tạo ra dạng thuốc mới cho pseudoephedrin, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự giải phóng dược chất từ viên pseudoephedrin 60mg giải phóng dược chất có kiểm soát bào chế dưới dạng cốt hòa tan.

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu: pseudoephedrin sulfat, hydroxypropyl methyl cellulose 100K (HPMC 100K), lactose, magnesi stearat, talc đạt tiêu chuẩn dược dụng; các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

Thiết bị nghiên cứu: máy dập viên đo lực nén Pye Unicam, máy dập viên tâm sai KP - 2, máy thử độ hòa tan ERWKA DT 60 (Đức), máy đo độ cứng của viên nén ERWEKA TBH20 (Đức), máy đo quang UNICAM UV3000, máy đo độ trơn chảy ERWEKA GWF (Đức), máy đo tỷ trọng biểu kiến ERWEKA SVW, máy đo độ mài mòn ERWEKA TA10 và các thiết bị bào chế, phân tích khác.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp bào chế viên

Dược chất và tá dược được trộn đều. Rây qua rây 250 nm. Hỗn hợp bột đem dập trên máy dập viên Pye Unicam với chày có đường kính 8 mm. Khi khảo sát ở qui mô lớn hơn, viên được dập bằng máy dập viên tâm sai KP - 2. Đánh giá hỗn hợp bột trước khi dập viên: độ ẩm, độ trơn chảy, khối lượng riêng biểu kiến của bột, chỉ số nén của bột. Đánh giá một số chỉ tiêu viên nén: độ cứng, độ mài mòn, độ đồng đều khối lượng viên.

Thử nghiệm hòa tan

Sử dụng máy thử hòa tan ERWEKA DT60 với các thông số sau:

- Máy cánh khuấy, tốc độ khuấy 50 vòng/ phút
- Môi trường hòa tan: 900ml đệm pH 6,8
- Nhiệt độ môi trường: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$

- Thời gian thử 12 giờ, lấy mẫu định lượng sau 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 12 giờ. Xác định lượng pseudoephedrin hòa tan theo phương pháp đo quang tại bước sóng 266 nm

Thiết kế thí nghiệm

Bố trí thí nghiệm theo phương pháp hợp tử tại tâm với sự trợ giúp của phần mềm MODDE 5.0.

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Mô hình bào chế viên pseudoephedrin giải phóng dược chất có kiểm soát được lựa chọn trong nghiên cứu là dạng cốt hòa tan. Dựa vào các tài liệu tham khảo, để đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố tới sự giải phóng dược chất từ viên chúng tôi lựa chọn công thức cơ bản cho viên pseudoephedrin như sau:

Pseudoephedrin sulfat	60mg
HPMC 100K (mg)	thay đổi
Lactose (mg)	thay đổi
Magnesi stearat	3 mg
Talc	7 mg
Lực dập viên	thay đổi

Trong đó: HPMC 100K là tá dược tạo cốt, kiểm soát giải phóng pseudoephedrin theo cơ chế trương nở tạo thành hàng rào gel làm chậm tốc độ giải phóng dược chất. Lactose là tá dược độn giúp cho quá trình dập viên được dễ dàng hơn, viên đảm bảo độ bền cơ học, tan trong nước tạo kênh khuếch tán tăng giải phóng dược chất. Magnesi stearat, talc: tá dược trơn cải thiện độ trơn chảy của khối bột, chống dính chày cối, làm bề mặt viên bóng đẹp.

Khảo sát một số tính chất hỗn hợp bột trước khi dập viên

Độ ẩm: $2,54 \pm 0,20$ %.

Độ trơn chảy: $43 \pm 0,48$ (g/s). Bột trơn chảy tốt.

Khối lượng biểu kiến: $0,49 \pm 0,04$ (g/ml).

Chỉ số nén: chỉ số nén trung bình của bột là $15,9 \pm 1,4$ %.

Khảo sát một số tính chất của viên

- Cảm quan: viên hình trụ dẹt, màu trắng, cứng chắc, bề mặt bóng đẹp, cạnh và thành viên lành lặn.
- Độ mài mòn: độ mài mòn trung bình đạt $0,67 \pm 0,02$ %.
- Độ cứng: độ cứng trung bình khoảng $8,4 \pm 0,2$ kP.
- Độ đồng đều khối lượng: $365 \pm 9,15$ mg, tất cả các mẫu đều nằm trong khoảng cho phép ($\pm 7,5$ %).

- Hàm lượng dược chất trong viên: hàm lượng trung bình là $95,13 \pm 0,26\%$ so với hàm lượng lí thuyết.

Phương pháp bào chế dập thẳng có thể áp dụng được do khi trộn dược chất với các tá dược, bột tạo ra có độ trơn chảy và khả năng chịu nén tốt. Viên bào chế có đặc điểm chắc bền, bóng đẹp, không bị bong mặt, sứt cạnh. Do HPMC 100K rất dễ hút ẩm cho nên quá trình bào chế phải được thực hiện trong môi trường có độ ẩm thấp. Sự khác nhau về kích thước tiểu phân và điều kiện bào chế độ ẩm thấp dẫn tới việc tăng lực hút tĩnh điện giữa các tiểu phân, do đó khó trộn đồng nhất. Để khắc phục nhược điểm này, trong quá trình bào chế phải chú ý nhiều tới công đoạn nghiền và trộn bột vì nếu không phân bố đồng đều dược chất và tá dược đặc biệt là HPMC 100K thì sẽ ảnh hưởng rất lớn đến sự đồng đều giải phóng dược chất giữa các mẫu viên, các lô mẻ. Ngoài ra trong quá trình dập viên, để đảm bảo sự đồng nhất giữa các mẫu viên cần chú ý đến thời gian nén. Trong nghiên cứu này, thời gian cho tất các mẫu viên là 10 giây.

Thiết kế thí nghiệm và kết quả thực nghiệm

Qua tham khảo tài liệu và nghiên cứu sàng lọc nhận thấy các tá dược HPMC 100K, lactose và lực dập viên là những yếu tố ảnh hưởng nhiều đến sự giải phóng dược chất của viên, được lựa chọn làm biến đầu vào. Ký hiệu và các mức của biến độc lập trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: Ký hiệu và các mức của biến độc lập

Biến độc lập	Kí hiệu	Các mức mã hóa				
		- α	-1	0	1	A
HPMC 100K (mg)	X1	35	70	105	140	175
Lactose (mg)	X2	0	35	70	105	140
Lực dập viên (kg)	X3	500	1000	1500	2000	2500

Lựa chọn biến phụ thuộc là % giải phóng dược chất khỏi viên tại các thời điểm lấy mẫu, ký hiệu là Y_i (với $i = 1$ giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 10 giờ, 12 giờ).

Thiết kế thí nghiệm bằng phương pháp thiết kế hợp tâm nhờ phần mềm MODDE 5.0 thu được 16 thí nghiệm như sau:

Bảng 2: Bảng thiết kế thí nghiệm

Công thức	X1	X2	X3	Công thức	X1	X2	X3
CT1	-1	-1	-1	CT9	-2	0	0
CT2	1	-1	-1	CT10	2	0	0
CT3	-1	1	-1	CT11	0	-2	0
CT4	1	1	-1	CT12	0	2	0
CT5	-1	-1	1	CT13	0	0	-2

Công thức	X1	X2	X3	Công thức	X1	X2	X3
CT6	1	-1	1	CT14	0	0	2
CT7	-1	1	1	CT15	0	0	0
CT8	1	1	1	CT16	0	0	0

Tiến hành bào chế 16 công thức (mỗi mẻ 100 viên) và thử hòa tan theo phương pháp bào chế đã trình bày, kết quả thu được trong bảng 3.

Bảng 3: % dược chất giải phóng từ viên pseudoephedrin sulfat 60 mg của các công thức thực nghiệm

TN	% DC giải phóng tại i giờ						
	Y1	Y2	Y4	Y6	Y8	Y10	Y12
CT1	27,06	37,17	53,73	65,6	76,64	87,29	93,59
CT2	18,02	23,94	34,09	42,61	49,49	55,01	60,66
CT3	63,26	81,27	95,27	97,98	99,95	99,96	99,97
CT4	20,94	29,24	41,45	50,99	59,48	65,86	70,89
C5	25,15	35,57	48,44	59,38	68,94	75,72	82,79
CT6	15,86	21,19	29,45	37,68	42,86	47,88	52,96
CT7	66,12	85,47	96,63	98,2	99,52	99,95	99,98
CT8	19,25	25,86	38,95	47,79	55,67	61,92	67,77
CT9	80,37	86,56	99,44	99,33	99,39	99,65	100,04
CT10	16,34	23,41	34,7	42,83	49,52	56,22	62,9
CT11	19,22	28,25	41,23	51,28	60,63	68,66	76,21
CT12	68,79	76,56	86,27	93,47	99,4	99,31	99,27
CT13	32,01	41,04	54,88	63,78	71,6	79,11	86,73
CT14	18,13	26,5	39,27	50,13	58,83	65,24	72,17
CT15	15,2	23,34	35,54	45,72	53,55	61,32	68,5
CT16	15,74	22,7	35,21	46,23	53,69	60,79	68,07

Ảnh hưởng của các biến độc lập đến sự giải phóng dược chất từ viên

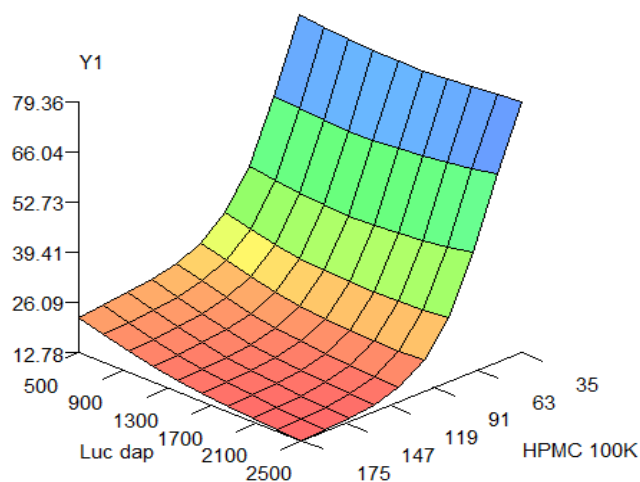
Xử lí số liệu bằng phần mềm INFORM 3.1. Từ đó đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố: HPMC 100K, lactose, lực dập đến quá trình giải phóng dược chất từ viên pseudoephedrin sulfat 60 mg giải phóng có kiểm soát thông qua giá trị R^2 của quá trình luyện mạng và phân tích mặt đáp. Các thông số của quá trình luyện mạng được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4: Các thông số của quá trình luyện mạng

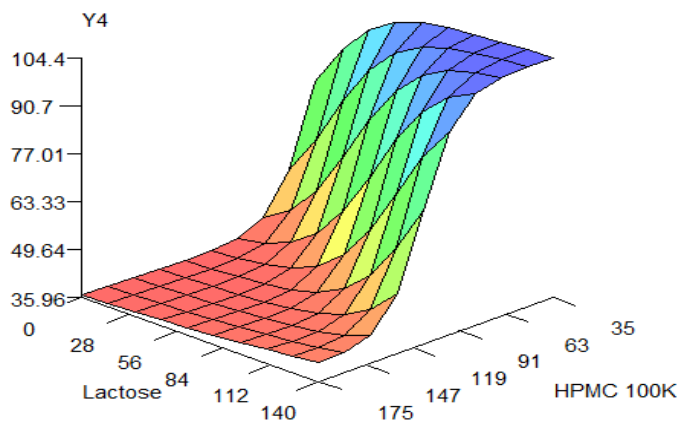
Biến phụ thuộc	Số lần luyện	R ² luyện
Y1	1000	99,6226
Y2	1000	97,845
Y4	1000	97,6655
Y6	1000	99,1094
Y8	1000	97,3281
Y10	1000	95,9082
Y12	1000	96,5942

Như vậy R² luyện > 95% chứng tỏ biến độc lập và biến phụ thuộc có quan hệ chặt chẽ với nhau.

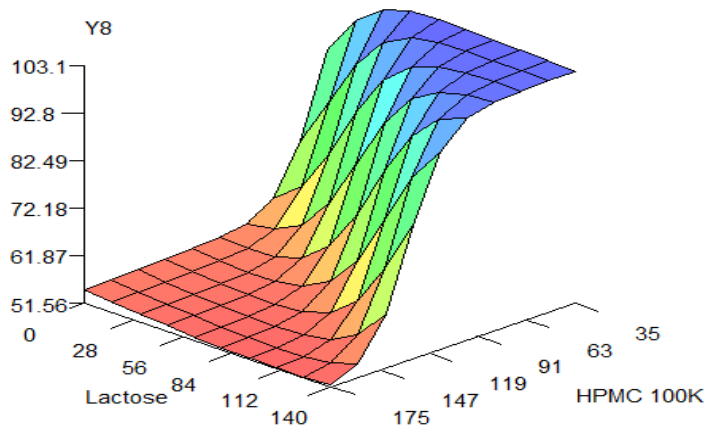
Ảnh hưởng của các biến độc lập đến giải phóng dược chất tại các thời điểm được thể hiện thông qua một số mặt đáp ở các hình sau:



Hình 1. Ảnh hưởng của HPMC 100K và lực dập viên (khối lượng lactose: 70 mg) đến sự giải phóng pseudoephedrin sulfat tại thời điểm sau 1 giờ



Hình 2. Ảnh hưởng của HPMC 100K và lactose (lực dập viên: 1500 kg) đến sự giải phóng của pseudoephedrin sulfat tại thời điểm sau 4 giờ



Hình 3. Ảnh hưởng của HPMC 100K và lactose (lực dập viên: 1500 kg) đến sự giải phóng của pseudoephedrin sulfat tại thời điểm sau 8 giờ

- *Ảnh hưởng của HPMC 100K*

Ảnh hưởng của lượng HPMC 100K đến % dược chất giải phóng thể hiện ở các mặt đập (hình 1., hình 2. và hình 3.): lượng HPMC 100K tăng, tỉ lệ giải phóng dược chất giảm ở tất cả các thời điểm. Tuy nhiên khi lượng HPMC tăng từ 147 mg đến 175 mg, tốc độ giải phóng của pseudoephedrin sulfat giảm chậm. Điều này có thể giải thích là do khi lượng HPMC 100K đạt đến một mức độ nhất định, lớp gel hình thành đã rất vững chắc, việc tăng tỉ lệ HPMC 100K chỉ làm giảm nhẹ sự giải phóng dược chất. Mặt khác, khi HPMC 100K giảm đến khoảng 60 mg thì giảm lượng HPMC 100K tốc độ giải phóng của pseudoephedrin sulfat giảm không đáng kể đặc biệt khi thời gian giải phóng dược chất tăng. Nguyên nhân có thể do HPMC 100K là tá dược thân nước có bản chất polyme, khi lượng HPMC 100K tăng, lớp gel tạo thành do trương nở sẽ dày hơn, làm dược chất khuếch tán ra ngoài môi trường giảm đi. Khi lượng HPMC 100K thấp thì lớp gel tạo thành ít, tác dụng kiểm soát giải phóng mất dần.

- *Ảnh hưởng của lactose*

Thay đổi lượng lactose ảnh hưởng đến tốc độ giải phóng dược chất do lactose tan trong nước tạo kênh khuếch tán. Khi lượng lactose thấp (từ 84 mg trở xuống), lactose hầu như không ảnh hưởng tới tốc độ giải phóng dược chất. Trong công thức lactose đóng vai trò là tá dược độn, giúp cho quá trình dập viên được dễ dàng hơn, viên đảm bảo độ bền cơ học đồng thời làm tăng khả năng giải phóng dược chất của viên.

- *Ảnh hưởng của lực dập viên*

Lực dập viên có ảnh hưởng đến sự giải phóng dược chất từ viên. Ở khoảng 1300 kg đến 2500 kg thì lực dập viên hầu như không ảnh hưởng đến tốc độ giải phóng dược chất khỏi viên. Nhưng lực dập viên ở khoảng từ 1300 kg đến 500 kg, tốc độ giải phóng dược chất tăng khoảng từ 16,62% lên 19,62% (ở thời điểm sau 2 giờ) có thể do lực dập viên thấp viên trở nên xốp hơn, do vậy làm tăng tốc độ rã của viên dẫn tới tăng tốc độ giải phóng hoạt chất.

Kết luận

Các yếu tố nghiên cứu: HPMC 100K, lactose và lực dập viên có ảnh hưởng nhất định đến sự giải phóng dược chất từ viên pseudoephedrin 60mg. Nguyên liệu tạo cốt HPMC 100K có vai trò chính trong việc kéo dài giải phóng dược chất được và thay đổi lượng của tá dược này có thể kiểm soát được sự giải phóng dược chất từ viên pseudoephedrin 60 mg.

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA HYDROXYPROPYL- β -CYCLODEXTRIN ĐẾN ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA PANTOPRAZOL

Phạm Xuân Chung

1. Đặt vấn đề

Pantoprazol (PTZ) là một chất thuộc nhóm benzimidazol. Cũng giống như các chất khác cùng nhóm, PTZ không bền, dễ bị phân hủy trong môi trường acid [1],[9] nên đã có nhiều biện pháp được áp dụng để làm tăng độ ổn định của chúng như: sử dụng tá dược kiềm [10] hoặc hỗn hợp tá dược kiềm [4], sử dụng các chất chống oxy hóa, bào chế dạng viên bao tan trong ruột [6],[7],[8],[9] hoặc dạng chế phẩm đông khô... Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của hydroxypropyl- β -cyclodextrin đến độ ổn định của chế phẩm đông khô PTZ.

2. Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

- Natri pantoprazol sesquihidrat, xuất xứ: Tây Ban Nha, đạt tiêu chuẩn Dược điển Châu Âu (EP6).

- Các tá dược: natri hydroxyd, manitol, arginin, dinatri EDTA (Trung Quốc), hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn nhà sản xuất.

- Các hóa chất tinh khiết phân tích: acetonitril, natri dihydrophosphat, dinatri hydrophosphat, dikali hydrophosphat và acid phosphoric (Merck), đạt tiêu chuẩn nhà sản xuất.

- Nút nhôm (Việt Nam), nút cao su (Đức), lọ thủy tinh trung tính (Đức), đạt tiêu chuẩn nhà sản xuất.

2.2. Thiết bị

- Máy đông khô LABCONCO.
- Máy lọc màng SATORIUS với màng lọc có kích thước 0,2 μ m.
- Máy đo pH Inonab pH 370.
- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao hiệu SHIMADZU 10AVP.
- Tủ sấy, tủ vi khí hậu CLIMACELL.
- Máy phân tích nhiệt vi sai SETARAM DSC131.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phân tích nhiệt vi sai (DSC)

Nghiên cứu tính chất nhiệt học và tương tác hóa lý của PTZ với tá dược, từ đó lựa chọn được các tá dược làm tăng tính ổn định của hoạt chất trong công thức chế phẩm đông khô PTZ bằng phương pháp phân tích nhiệt vi sai (DSC). Với các điều kiện:

- Tốc độ quét: 10⁰C/phút.

- Khoảng quét: 25 - 250°C.
- Mẫu chuẩn: nhôm hydroxyd.
- Môi trường: không khí.

2.3.2. Phương pháp đông khô

Bào chế chế phẩm đông khô PTZ 40 mg bằng phương pháp đông khô với các thông số:

- Đông lạnh: -70°C, thời gian: 6 giờ.
- Sấy sơ cấp: -15°C, thời gian: 20 giờ, tốc độ gia nhiệt: 0,5°C/1 phút.
- Sấy thứ cấp: +25°C, thời gian: 20 giờ, tốc độ gia nhiệt: 0,25°C/1 phút.

2.3.3. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Xác định hàm lượng PTZ và tỷ lệ tạp chất trong chế phẩm chế phẩm đông khô bằng phương pháp HPLC. Với các điều kiện:

- Pha động : Acetonitril và đệm phosphat pH7.
 - Cột HPLC: C18 (5 μ m) 4,6 x 150mm.
- Detector tử ngoại: bước sóng 290nm.
- Thẻ tích tiêm: 20 μ l.
- Tốc độ dòng: 1ml/phút.

2.3.4. Phương pháp lão hóa cấp tốc

Đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng của chế phẩm đông khô như: hình thức của bột đông khô; màu sắc, độ trong của dung dịch pha lại; hàm lượng PTZ, tỷ lệ tạp chất. Với các điều kiện:

- Cường bức: trong tủ 100°C.
- Trong tủ vi khí hậu: nhiệt độ 40°C \pm 2, độ ẩm 75 \pm 5%.
- Điều kiện phòng thí nghiệm: nhiệt độ 25°C – 35°C, độ ẩm 55% - 85%.

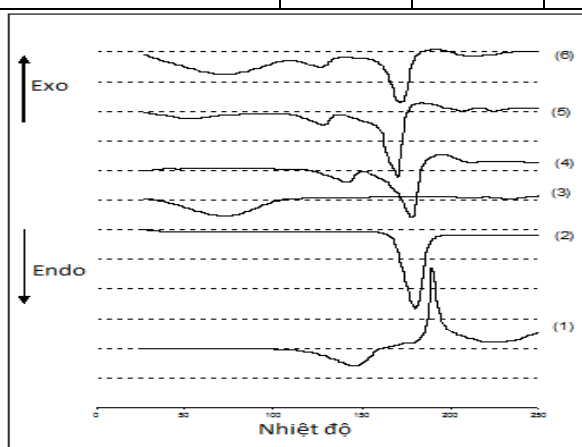
3. Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hydroxypropyl- β -cyclodextrin đến độ ổn định của PTZ

Đánh giá ảnh hưởng của hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -Cyd) đến độ ổn định của PTZ trong các hỗn hợp vật lý M1, M2, M3 gồm: PTZ, manitol và HP- β -Cyd bằng phương pháp DSC với các điều kiện được ghi ở phần 2.3.1. Kết quả được trình bày trong bảng 1 và hình 1:

Bảng 1: Thành phần hỗn hợp vật lý

Thành phần	M1	M2	M3
Manitol (mg)	120	120	120
PTZ (mg)	50	50	50
HP- β -Cyd (mg)		50	150
Tỷ lệ PTZ: HP- β -Cyd	1:0	1:1	1:3



Hình 1: Đường biểu diễn phân tích nhiệt vi sai (DSC) của PTZ (1), manitol (2), HP- β -Cyd (3), hỗn hợp M1 (4), M2 (5) và M3 (6).

hạn chế sự tiếp xúc của hoạt chất với môi trường xung quanh, tuy nhiên đây chỉ là hỗn hợp vật lý nên vẫn còn các phân tử PTZ tự do, trong quá trình gia nhiệt chỉ những phân tử PTZ tiếp xúc với HP- β -Cyd mới tạo phức hỗn hợp PTZ - HP- β -Cyd, hỗn hợp này bền vững với nhiệt hơn so với PTZ tự do trong khoảng nhiệt độ đã khảo sát, do đó cường độ pic chỉ giảm đi nhiều chứ không mất, đồng thời cường độ của pic cũng phụ thuộc vào tỷ lệ HP- β -Cyd có trong hỗn hợp.

Như vậy, trong hỗn hợp vật lý với manitol và HP- β -Cyd, PTZ bền vững với nhiệt hơn, tỷ lệ HP- β -Cyd có trong hỗn hợp càng lớn, PTZ càng bền vững. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của M.El-Badry và cộng sự về ảnh hưởng của tỷ lệ HP- β -Cyd trong hỗn hợp (omeprazol:HP- β -Cyd) đến độ ổn định của omeprazol (một chất trong nhóm benzimidazol)[6].

3.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của HP- β -Cyd đến độ ổn định của chế phẩm đông khô PTZ

Kết quả hình 1 cho thấy: Đường nhiệt của các hỗn hợp vật lý M2, M3 gồm PTZ, manitol, HP- β -Cyd có pic rộng trong khoảng 50-100°C (tương ứng với sự mất nước của HP- β -Cyd), một pic thu nhiệt mạnh khoảng 160-170°C (tương ứng điểm chảy của manitol), một pic tỏa nhiệt không đặc trưng khoảng 190°C (tương ứng nhiệt độ phân hủy của PTZ) có cường độ tương ứng (8mW và 21,4mW) thấp hơn so với pic tỏa nhiệt của PTZ trong hỗn hợp M1 (53mW) và PTZ tự do (130mW). Điều này có thể được giải thích như sau: HP- β -Cyd là tá dược có khả năng ổn định các hoạt chất không bền, do tạo ra các khung bao bọc xung quanh phân tử hoạt chất cho nên

Trên cơ sở kết quả thu được từ phương pháp DSC với hỗn hợp vật lý, tiến hành bào chế chế phẩm đông khô PTZ với mẫu CT233 có HP- β -Cyd và mẫu CT234 không có HP- β -Cyd. Mỗi mẻ đông khô 200 lọ theo cùng một quy trình.

3.2.1. Đánh giá bằng cảm quan và bằng phương pháp HPLC

Sản phẩm sau khi đông khô được theo dõi trong điều kiện cưỡng bức, cụ thể: Các mẫu được để trong tủ 100°C. Mỗi 2 giờ, kiểm tra hình thức, màu sắc của bánh thuốc; màu sắc, độ đục của dung dịch pha lại với 2,5ml nước cất pha tiêm; hàm lượng hoạt chất và tỷ lệ tạp chất được xác định bằng phương pháp HPLC. Kết quả được trình bày trong bảng 2 và 3:

Bảng 2: Ảnh hưởng của HP- β -Cyd đến hình thức bột và dung dịch pha lại của chế phẩm đông khô PTZ

Thời gian	Bột đông khô		Dung dịch pha lại	
	CT233	CT234	CT233	CT234
0 giờ	Hình bánh thuốc, trắng, mịn	Hình bánh thuốc, trắng, mịn	Trong, không màu	Trong, không màu
Sau 2 giờ	Hình bánh thuốc, trắng, mịn	Hình bánh thuốc, trắng, mịn	Trong, không màu	Trong, không màu
Sau 4 giờ	Hình bánh thuốc, trắng, mịn	Hình bánh thuốc, vàng, không mịn	Trong, không màu	Trong, màu vàng nhạt

Bảng 3: Ảnh hưởng của HP- β -Cyd đến độ ổn định của chế phẩm đông khô PTZ

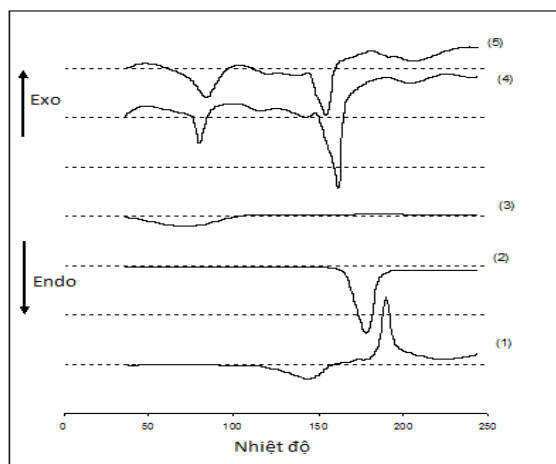
Thời gian	Hàm lượng (%) PTZ		Tỷ lệ (%) tạp chất	
	CT233	CT234	CT233	CT234
0 giờ	103,01	104,92%	0,06%	0,09%
Sau 2 giờ	99,51	99,05%	0,71%	1,32%
So sánh	Giảm 3,50%	Giảm 5,87%	Tăng 10,8 lần	Tăng 14,6 lần
Sau 4 giờ	97,96%	95,73%	1,56%	4,51%
So sánh	Giảm 5,05%	Giảm 8,19%	Tăng 26 lần	Tăng 50,1 lần

Kết quả bảng 3 cho thấy: sau 2 giờ để ở điều kiện cưỡng bức (nhiệt độ 100°C), hàm lượng PTZ trong

sản phẩm pha chế theo công thức 233 giảm ít hơn so với sản phẩm đông khô theo công thức 234 (3,05% và 5,87%), trong khi tỷ lệ tạp chất bị phân hủy cũng ít hơn (0,71% - tăng 10,8 lần và 1,32% - tăng 14,6 lần). Sau 4 giờ, tương ứng là (5,05% và 8,19%) và (1,56% - tăng 26 lần và 4,15% - tăng 50,1 lần).

3.2.2. Đánh giá bằng phương pháp DSC

Các sản phẩm đông khô theo công thức 233 và 234 được đánh giá bằng phương pháp DSC với các điều kiện được ghi ở phần 2.3.1. Kết quả được trình bày trong hình 2:



Hình 2: Đường biểu diễn phân tích nhiệt vi sai (DSC) của PTZ (1), manitol (2), HP- β -Cyd (3), bột đông khô của công thức 234 (4) và 233 (5)

Kết quả hình 2 cho thấy: Đường nhiệt của sản phẩm đông khô theo các công thức 233, 234 đều cho pic thu nhiệt tại khoảng từ 160-170°C tương ứng với nhiệt độ nóng chảy manitol (cường độ tương ứng là 90mW và -138mW) và ngay sau khi nóng chảy là một trạng thái tỏa nhiệt không đặc trưng (tương quan với nhiệt độ phân hủy của PTZ - 190°C) với cường độ tương ứng 34mW và 80mW, chứng tỏ sau khi đông khô PTZ không còn ở dạng tinh thể mà đã chuyển sang dạng vô định hình. Tuy nhiên, cường độ của các pic trên đường nhiệt của sản phẩm đông khô theo công thức 233 đều thấp hơn cường độ các pic tương ứng trên đường nhiệt của sản

phẩm đông khô theo công thức 234.

Như vậy, kết quả từ phương pháp DSC phù hợp với kết quả thu được từ phương pháp HPLC, cả hai phương pháp đều cho thấy bột đông khô theo công thức 233 bền vững với nhiệt hơn bột đông khô theo công thức 234, điều này chứng tỏ rằng HP- β -Cyd đã làm tăng độ ổn định với nhiệt của chế phẩm đông khô PTZ.

Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả trên thế giới về ảnh hưởng của HP- β -Cyd với một số chất trong nhóm benzimidazol [2],[3],[4],[6].

Từ kết quả thu được, các mẻ tiếp theo sử dụng HP- β -Cyd làm tá dược để ổn định chế phẩm đông khô PTZ.

3.3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ HP- β -Cyd đến độ ổn định của chế phẩm đông khô PTZ

Tiến hành đông khô với cùng một quy trình kỹ thuật các công thức có cùng tá dược kiềm, tá dược tạo khung, tá dược chống oxy hóa, nhưng sử dụng lượng HP- β -Cyd khác nhau:

Bảng 4: Khối lượng HP- β -Cyd sử dụng trong các công thức chế phẩm đông khô PTZ

Công thức	3061	3063	871	872	873	3182	2872	1971	1972	1973	1974	1975
Khối lượng HP- β -Cyd sử dụng (mg)	50	100	150	200	300	350	400	450	600	750	900	1050

3.3.1. Đánh giá bằng cảm quan và bằng phương pháp HPLC

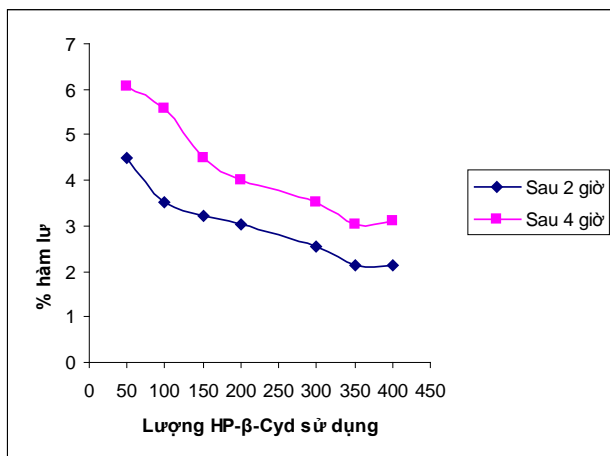
Về cảm quan

- Các mẫu pha chế theo công thức 1972; 1973; 1974; 1975 không đông lạnh, không thành hình bánh thuốc hoặc bánh thuốc có bề mặt không mịn, có tách lớp, không xộp (công thức 1971). Vì vậy, các sản phẩm sau đông khô theo các công thức này không tiến hành đánh giá các chỉ tiêu khác.

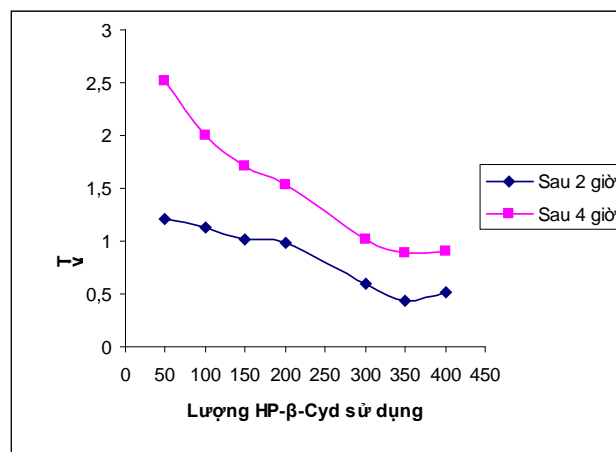
- Sản phẩm sau khi đông khô theo các công thức 3061; 3063; 871; 872; 873; 3182; 2872 có hình bánh thuốc đẹp, mịn, cho nên tiếp tục đánh giá các chỉ tiêu khác như hàm lượng hoạt chất, tỷ lệ tạp chất. Tiến hành lão hóa cưỡng bức với các điều kiện như ở phần 2.3.4. Kết quả được trình bày trong bảng 5 và hình 3:

Bảng 5: Hàm lượng (%) PTZ và tỷ lệ (%) tạp chất của chế phẩm đông khô PTZ trong các công thức

	Thời gian	CT3061	CT3063	CT871	CT872	CT873	CT3182	CT2872
<i>Hàm lượng (%) pantoprazol</i>	0 giờ	100,01	99,89	106,70	102,30	106,70	100,08	107,6
	Sau 2 giờ	95,51	96,38	103,49	99,28	104,14	97,95	105,55
	<i>So sánh (giảm %)</i>	4,50	3,51	3,21	3,02	2,56	2,13	2,15
	Sau 4 giờ	93,96	94,33	102,20	98,30	103,19	97,06	104,48
	<i>So sánh (giảm %)</i>	6,05	5,56	4,50	4,00	3,51	3,02	3,12
<i>Tỷ lệ (%) tạp chất</i>	0 giờ	0,12	0,13	0,12	0,12	0,09	0,08	0,09
	Sau 2 giờ	1,21	1,13	1,01	0,99	0,59	0,43	0,51
	<i>So sánh (lần)</i>	10,08	8,69	8,42	8,25	6,56	5,38	5,67
	Sau 4 giờ	2,51	2,00	1,71	1,53	1,01	0,89	0,91
	<i>So sánh (lần)</i>	20,92	15,38	14,25	12,75	11,22	11,13	10,11



(a)



(b)

Hình 3: Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của tỷ lệ tạp chất và độ giảm hàm lượng PTZ vào lượng HP-β-Cyd trong thành phần chế phẩm đông khô PTZ

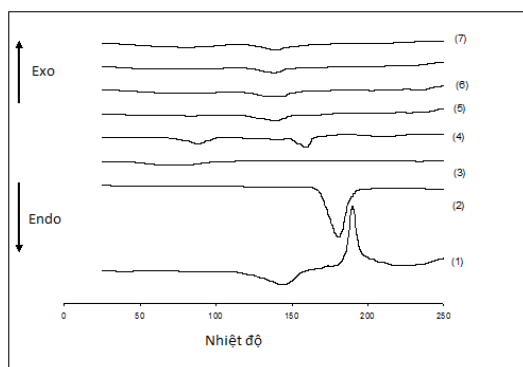
(a). Độ giảm hàm lượng PTZ sau 2 và 4 giờ

(b). Tỷ lệ tạp chất trong bột đông khô sau 2 và 4 giờ

Kết quả trên cho thấy với cùng thành phần trong công thức, độ ổn định của chế phẩm đông khô PTZ 40mg phụ thuộc vào lượng HP-β-Cyd sử dụng. Lượng HP-β-Cyd sử dụng càng nhiều độ ổn định của chế phẩm đông khô PTZ càng cao. Với lượng HP-β-Cyd sử dụng là 50mg/lọ, sản phẩm đông khô sau 2 giờ để ở nhiệt độ 100°C, hàm lượng PTZ trong sản phẩm pha chế theo công thức 3061 giảm (4,5%), tỷ lệ tạp chất (1,21% - tăng 10,08 lần), sau 4 giờ, tương ứng là (6,05%) và (2,51% - tăng 20,92 lần). Trong khi đó nếu lượng HP-β-Cyd sử dụng là 350mg/lọ, sản phẩm đông khô sau 2 giờ để ở nhiệt độ 100°C, hàm lượng PTZ trong sản phẩm pha chế theo công thức 3182 chỉ giảm (2,13%), tỷ lệ tạp chất (0,43% - tăng 5,38 lần), sau 4 giờ, tương ứng là (3,02%) và (0,89% - tăng 11,13 lần). Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng lượng HP-β-Cyd sử dụng trong công thức thì không những độ ổn định của chế phẩm đông khô PTZ không tăng (như sản phẩm bào chế theo công thức 2872) mà còn không đông khô được (như dung dịch pha chế theo các công thức 1972; 1973; 1974; 1975) hoặc hình thức xấu (không thành hình bánh thuốc, không xộp) như sản phẩm đông khô theo công thức 1971.

3.3.2. Đánh giá bằng phương pháp DSC

Các sản phẩm đông khô được đánh giá bằng phương pháp HPLC đồng thời cũng được đánh giá bằng phương pháp DSC với các điều kiện được ghi ở phần 2.3.1. Kết quả được trình bày trong hình 4:



Hình 4: Đường biểu diễn phân tích nhiệt vi sai (DSC) của PTZ (1), manitol (2), HP- β -Cyd (3), bột đông khô theo công thức 3061 (4), 871 (5), 873 (6) và 3182 (7).

Kết quả hình 4 cho thấy: Đường nhiệt của sản phẩm đông khô theo các công thức 3061; 871; 873; 3182 đều không có pic phân hủy của PTZ, tuy nhiên cường độ của các pic thu nhiệt khác nhau phụ thuộc vào lượng HP- β -Cyd có trong công thức, trong đó bột đông khô theo công thức 3182 (sử dụng HP- β -Cyd 350mg/lọ) có cường độ pic thấp nhất.

Như vậy, kết quả từ phương pháp DSC cũng phù hợp với kết quả thu được từ phương pháp HPLC, cả hai phương pháp đều cho thấy bột đông khô theo công thức 3182 sử dụng HP- β -Cyd 350mg/lọ bền

vững với nhiệt hơn cả, điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ HP- β -Cyd đến độ ổn định của PTZ trong hỗn hợp vật lý.

4. Kết luận

Từ những kết quả nghiên cứu, thực nghiệm thu được, rút ra một số kết luận:

- HP- β -Cyd làm tăng độ ổn định PTZ. Tuy nhiên, mức độ ổn định phụ thuộc vào lượng HP- β -Cyd có trong công thức. Trong nghiên cứu này, chế phẩm đông khô PTZ 40mg ổn định hơn cả khi sử dụng 350mg/lọ HP- β -Cyd.

- Kết quả đánh giá độ ổn định của chế phẩm đông khô PTZ bằng phương pháp HPLC phù hợp với kết quả từ phương pháp DSC.

Summary

Hydroxypropyl- β -cyclodextrin increase the stability of pantoprazole in lyophilized powder. However, the stability depends on the proportion of hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the formulation. The research indicates that, pantoprazole lyophilized powder is the most stability with hydroxypropyl- β -cyclodextrin 350mg/vial. The pantoprazole stability were evaluated by method DSC and HPLC.

A formulation consists of pantoprazole sodium sesquihydrate, sodium hydroxide, mannitol, disodium EDTA, hydroxypropyl- β -cyclodextrin with reasonable proportion and water for injection were improved. Pantoprazole lyophilized powder was prepared in laboratory scale, each batch comprised 200 vials.

Tài liệu tham khảo

1. A. Kristl (2009), *Acido-basic properties of proton pump inhibitors in aqueous solutions*, Drug Dev. Ind. Pharm., 35, p. 114-117.

2. Ana Figueiras et al (2007), *Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified beta-cyclodextrin*, Eur. J. Pharm. Biopharm., 67, p.531–539.
3. Ana Figueiras et al (2009), *In vitro evaluation of natural and methylated cyclodextrins as buccal permeation enhancing system for omeprazole delivery*, Eur. J. Pharm. Biopharm., 71, p. 339–345.
4. Ana Figueiras et al (2010), *The role of l-arginine in inclusion complexes of omeprazole with cyclodextrins*, AAPS PharmSciTech., 11, 1, p. 233-240.
5. Chantal Holvoet et al (2007), *Development of an omeprazole parenteral formulation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin*, Pharm. Dev. Technol., 12, p.327–336.
6. M.El-Badry et al (2010), *Effects of Kollicoat IR and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the dissolution rate of omeprazole from its microparticles and enteric-coated capsules*, Pharm. Dev. Technol., 15, 5, p.500-510.
7. R.P.Raffin et al (2007), *Gastro-resistant microparticles containing sodium pantoprazole: Stability studies and in vivo anti-ulcer activity*, The Open Drug J., 1, p. 28-35.
8. R.P.Raffin et al (2010), *Pharmacokinetics evaluation of soft agglomerates for prompt delivery of enteric pantoprazole-loaded microparticles*, Eur. J. Pharm. Biopharm., 74, p.275-280
9. T.Comoglu et al (2008), *Development and in vitro evaluation of pantoprazole-loaded micropheres*, Drug Del., 15, p. 295-298.
10. Wei He et al (2010), *Influences of sodium carbonate on physicochemical properties of lansoprazole in designed multiple coating pellets*, AAPS PharmSciTech., inpress.

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG ITRACONAZOL TRONG CHẾ PHẨM VIÊN NANG BẰNG PHƯƠNG PHÁP VI SINH

Trần Trinh Công

Đặt vấn đề

Itraconazol là một tác nhân kháng nấm, có hoạt tính phổ rộng, thuộc nhóm triazol. Viên nang itraconazol (ITZ) uống, hàm lượng 100mg, có sẵn trên thị trường Việt Nam: sporal (Janssen, sản xuất tại Thái Lan), itcon (Án Độ), Fungex (Liên doanh),... Khi hàm lượng ITZ thấp hơn so với ghi trên nhãn, hóa trị liệu sẽ không đạt hiệu quả điều trị, gây hại cho sức khỏe bệnh nhân.

Các nghiên cứu định lượng ITZ bằng phương pháp vi sinh (Bioassay) trước đây chủ yếu chủ yếu là xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng ITZ trong huyết thanh bằng Bioassay và HPLC, chưa thấy có ở chế phẩm viên nang. Phương pháp Bioassay có thể cho chúng ta biết các thay đổi nhỏ, tinh vi của dược chất, không thể chứng minh được bằng phương pháp hóa lý. Bioassay cho phép đánh giá hoạt lực của ITZ, một yếu tố quan trọng trong việc kiểm nghiệm kháng sinh.

Để xác định hoạt lực kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch có thể áp dụng mô hình đường thẳng song (*Parallel-line model*) [1, 4, 5, 6, 8] và mô hình đường chuẩn [2, 3].

Mục tiêu của phương pháp này là xây dựng và thẩm định một phương pháp vi sinh để xác định hoạt lực của ITZ trong các chế phẩm viên nang thương mại.

Nguyên liệu và phương pháp

Các thuốc thử và nguyên liệu: Chuẩn tham chiếu ITZ nhập khẩu từ Ấn Độ. Các viên nang cứng sporal (100mg) của hãng dược phẩm Janssen, sản xuất tại Thái Lan, mua ở ngoài thị trường. Nước cất 2 lần được dùng trong phân tích. Dimethylsulfoxid (DMSO) tiêu chuẩn phân tích, Trung Quốc.

Pha dung dịch chuẩn:

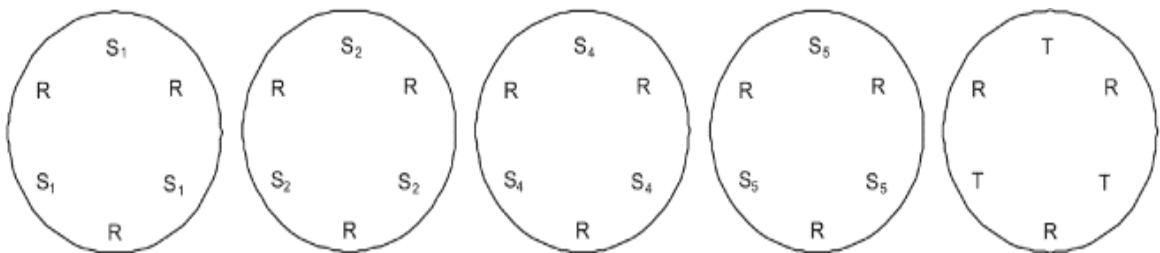
Dung dịch chuẩn mẹ 160 μ g/ml: cân chính xác 8mg chuẩn tham chiếu, pha vào bình định mức 50ml bằng DMSO. Pha tiếp bằng DMSO để được dung dịch 16 μ g/ml. Từ dung dịch này pha loãng bằng nước cất tiệt trùng để có dung dịch 1,6 μ g/ml, được dùng để pha loãng gấp đôi kế tiếp tới 0,1 μ g/ml.

Các nồng độ chuẩn: 1,6 (S1); 0,8 (S2); 0,4 (R: nồng độ tham chiếu); 0,2 (S4) và 0,1 (S5) μ g/ml.

Pha dung dịch thử gốc của viên nang 160 μ g/ml tương tự chuẩn tới nồng độ 0,4 μ g/ml (tương tự nồng độ tham chiếu R). Các nồng độ chuẩn và thử được pha ngay trước khi thử.

Chủng thử: *Candida albicans* ATCC 10231 được nuôi cấy trên môi trường thạch nghiêng SDA 2%, bảo quản ở 4°C. Trước khi sử dụng, cấy truyền chủng sang môi trường thạch nghiêng SDA mới, ủ ở 28°C, trong 24h. Sau giai đoạn này một lượng nhỏ nấm men được chuyển vào dung dịch nước muối sinh lý đã tiệt trùng và độ truyền qua (trên máy quang phổ UV-VIS 1900) được hiệu chỉnh tới 85%, ở λ 520nm (tương đương $1-5 \times 10^6$ CFU/ml) [2, 9]. Pha loãng tiếp hỗn dịch trong 15ml SDA (được đun chảy ở 45°C), để đạt được nồng độ cuối cùng $1-5 \times 10^5$ CFU/ml.

Các đĩa Petri kích thước 100 x 20mm, gồm một lớp nền (8ml môi trường SDA) được cho vào các đĩa trước khi thử để tạo sự quan sát dễ dàng vùng ức chế. Sau khi lớp nền đông rắn, lớp chủng (15ml) được rót lên bề mặt của lớp nền. Cho thạch đông rắn ở nhiệt độ phòng 10-15 phút. Sau đó đục các giếng đường kính 6mm ở 6 điểm trên đĩa Petri theo sơ đồ thử 5x1 (hình 1) [2, 3]. Năm đĩa Petri được dùng trong phép thử, tiến hành thử đồng thời nồng độ tham chiếu R với mỗi nồng độ chuẩn hoặc các nồng độ thử. 60 μ l của mỗi nồng độ chuẩn hoặc thử được cho vào các giếng riêng biệt. Các đĩa được ủ ở 28°C, 24h. Đo vòng ức chế bằng thước kẹp caliper (độ chính xác 0,01 mm). Các đĩa thử được lặp lại 3 lần (tương ứng với 15 đĩa trong mỗi lần thử), cho 9 kết quả đo của các nồng độ chuẩn S₁, S₂, S₄, S₅ và mẫu thử T. Nồng độ R được thử 45 lần để hiệu chỉnh các số liệu trong tất cả các đĩa.



Hình 1: Sơ đồ thử 5x1

Các điều kiện thực nghiệm đã nêu trên với các thông số sau:

- Thời gian ủ: 24h.
- Nhiệt độ ủ: 37°C.
- Nồng độ chủng $1-5 \times 10^5$ CFU/ml.

Hiệu chỉnh vùng ức chế (IZ_c) bằng nồng độ tham chiếu R

Trung bình của tất cả các lần đo của nồng độ R (trong tất cả các đĩa) được dùng để hiệu chỉnh các giá trị của các vùng ức chế trong mỗi đĩa riêng biệt. Để hiệu chỉnh số liệu thu được, ứng dụng phương trình (Lima *et al.*, 2009): $IZ_c = IZ + (R_A - R_s)$, trong đó:

- IZ_c : giá trị vùng ức chế được hiệu chỉnh.
- IZ : giá trị trung bình của vùng ức chế của mẫu chuẩn hoặc mẫu thử trong đĩa nghiên cứu.
- R_A : trung bình của các giá trị vùng ức chế của nồng độ R trong tất cả các đĩa (45 giá trị).
- R_S : trung bình của các giá trị vùng ức chế của nồng độ R, trong đĩa nghiên cứu (9 giá trị).

Phân tích số liệu bằng việc xây dựng đường chuẩn tỷ lệ giữa \log_{10} nồng độ itraconazol và đường kính vùng ức chế; phương trình đường cong đạt được bằng việc phân tích hồi qui.

Các nồng độ của dung dịch thử được xác định bằng phương trình đường chuẩn.

Thẩm định phương pháp

Phương pháp thử vi sinh đã được thẩm định bằng việc đánh giá độ tuyến tính, độ chính xác và độ đúng theo các bước được mô tả trong các hướng dẫn Q2 (R1) của IHC:

- *Độ tuyến tính*: 5 nồng độ chuẩn tham chiếu đã được thử (1,6; 0,8; 0,4; 0,2 và 0,1 $\mu\text{g/ml}$). Đường chuẩn tỷ lệ giữa \log_{10} nồng độ ITZ và ĐK (Đường kính) vùng ức chế đã được thiết lập. Các số liệu thu được qua phân tích hồi qui bằng phương pháp bình phương tối thiểu.

- *Độ chính xác*: độ chính xác trong ngày đã được đánh giá bằng phân tích số liệu của 6 lần lặp lại của các dung dịch ITZ ($n=6$), ở 100% của nồng độ thử (0,4 $\mu\text{g/ml}$). Tương tự, độ chính xác khác ngày được đánh giá vào 2 ngày tiếp theo ($n=12$). Nồng độ ITZ trong các mẫu viên nang và độ lệch chuẩn tương đối (R.S.D.) đã được tính toán.

- *Độ đúng*: Độ đúng: được xác định bằng việc thêm các lượng đã biết của chuẩn tham chiếu ITZ (0,1; 0,2 và 0,3 $\mu\text{g/ml}$) vào một dung dịch thử (0,2 $\mu\text{g/ml}$) vào đầu quá trình phân tích, tương đương với 75; 100 và 125% nồng độ thử (0,4 $\mu\text{g/ml}$). Mỗi mức độ thử được chuẩn bị 3 lần và được thử như mô tả ở trên. Xác định phần trăm tìm lại của ITZ.

Kết quả và thảo luận

Xây dựng phương pháp: trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng và thẩm định phương pháp thử vi sinh, để xác định hàm lượng ITZ trong chế phẩm viên nang. Sự chuẩn hóa các điều kiện thực nghiệm là yếu tố quan trọng để đạt được các kết quả lặp lại và đáng tin cậy: lớp nền, nhiệt độ thử (37°C), thời gian ủ (24h), chủng nấm thử (*C. albicans* ATCC 10231), nồng độ chủng (1-5x10⁵ CFU/ml). Thiết kế thực nghiệm sử dụng 6 giếng/đĩa như sơ đồ trên đã tạo ra độ lệch thấp hơn, do các vùng ức chế được hiệu chỉnh qua vùng ức chế R. Nồng độ chủng 1-5 x 10⁵ CFU/ml đã cho vùng ức chế sắc nét nhất, khi so sánh với các nồng độ chủng 10³ và 10⁴ CFU/ml hoặc lớn hơn (đã

cho các vùng ức chế không rõ nét). Các vùng ức chế thu được rõ nét trong điều kiện thử. Các giếng lặp lại 3 lần cho các ĐK (đường kính) vùng ức chế khác nhau trong phạm vi 1mm. Trung bình các giá trị vùng ức chế hiệu chỉnh của các nồng độ chuẩn là 20,0 (S1); 18,13 (S2); 15,13 (R); 13,25 (S4) và 11,18mm (S5). Đường chuẩn tỷ lệ đã được xây dựng với giá trị trung bình $r^2 = 0,9939$. DMSO ở nồng độ cuối cùng (10%) không ảnh hưởng tới sự phát triển của chủng *C. albicans* ATCC 10231.

Thẩm định phương pháp Bioassay

Độ tuyến tính: đạt được mối quan hệ tuyến tính ($r^2 = 0,9939$) giữa các nồng độ ITZ và ĐK vùng ức chế trong giải nồng độ nghiên cứu. Các dữ liệu phân tích hồi qui được trình bày ở bảng 1. Phương trình hồi qui tuyến tính đại diện cho ITZ là $y = 0,133x - 2,4642$.

Bảng 1: Các số liệu tuyến tính thu được của itraconazol

Thông số	Kết quả phân tích hồi qui
Hệ số hồi qui	0,9939
Độ dốc (slope)	0,133
Hệ số chắn (intercept)	-2,4642
Dải nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	0,10 - 1,6
Số điểm khảo sát	5

Độ chính xác: được thể hiện bằng độ lệch chuẩn tương đối (R.S.D.). Trong phép thử độ chính xác trong ngày ($n=6$), hàm lượng trung bình của ITZ là 103,38 % (R.S.D. = 3,2 %). Độ chính xác khác ngày ($n=12$), hàm lượng trung bình đạt được là 104,65% (R.S.D.= 3,85%). Các giá trị R.S.D. đạt được cho thấy phương pháp đạt độ chính xác yêu cầu (bảng 2).

Bảng 2: Hàm lượng của ITZ trong các mẫu viên nang Sporal xác định bằng phương pháp Bioassay ($n=6$)

Lần thử	Hàm lượng (%)
1	106,1
2	104,68
3	108,0
4	98,5
5	103,0
6	100,0
Gía trị trung bình	103,38
Độ lệch chuẩn	3,31
R.S.D. (%)	3,2

Độ đúng: được khảo sát bằng thực nghiệm bổ sung chất chuẩn, ở 3 mức nồng độ, lặp lại 3 lần (n=9). Phần trăm tìm lại thay đổi từ 104,3%-106,0% (bảng 4). Độ khám phá trung bình 104,9% đã đảm bảo độ đúng của phương pháp.

Bảng 4: Độ tìm lại của ITZ trong thực nghiệm bổ sung chuẩn đánh giá độ đúng của phương pháp

Mẫu	Nồng độ bổ sung (µg/ml)	Nồng độ tìm lại (µg/ml)*	% tìm lại
1	0,1	0,1055	105,5
2	0,2	0,209	104,5
3	0,3	0,310	103,3

* Trung bình của 3 lần xác định

Mặc dầu có sự khác biệt nhỏ ở nồng độ bổ sung 0,1%, nhưng các kết quả đã cho thấy phương pháp bioassay có đủ độ tin cậy. Các xí nghiệp dược phẩm có thể tiến hành áp dụng đồng thời với HPLC, khi xác định ITZ. Đây là một bước quan trọng cho việc kiểm tra hoạt lực của các chất hóa trị liệu kháng nấm, mặc dầu loại phương pháp thử này không có mặt trong các dược điển chính thức (DĐ Brazil 1988; DĐ Anh 2007; DĐ Mỹ 2007). Đối với các kháng sinh kháng khuẩn, các dược điển khuyến cáo thực hiện cả Bioassay và HPLC, do các phép thử này có tác dụng bổ sung cho nhau.

Bioassay có một vai trò quan trọng trong sản xuất và kiểm soát chất lượng các thuốc kháng sinh (Salgado *et al.*, 2006). Ngoài ra phương pháp này còn có chi phí thấp, đơn giản hơn so với HPLC trong việc xác định ITZ trong chế phẩm viên nang. Tuy nhiên tiềm năng được chấp nhận của phương pháp này cần được nghiên cứu kỹ thêm và so sánh các kết quả thu được với một phương pháp có độ chính xác cao hơn là HPLC.

Kết luận

Xác định hàm lượng ITZ trong chế phẩm viên nang, bước đầu đã cho thấy có độ tin cậy, khi sử dụng liều chủng $1-5 \times 10^5$ CFU/ml, chủng *C. albicans* ATCC 18804 và thời gian ủ 24h, ở 37°C, trên giải nồng độ 0,1-1,6 µg/ml.

Tài liệu tham khảo

1. Cardoso S.G. *et al.* (2000), *Microbiological assay for terbinafine hydrochloride in tablets and creams*, International Journal of pharmaceutics Vol. 203, p. 109-113
2. Lima P.M. *et al.* (2009), *Determination of ketoconazole in capsules by high-performance liquid chromatography and microbiological assay*, J. of AOAC international, Vol. 92, No. 4

3. Queiroz K.M. *et al.* (2009), *Comparison of microbiological assay and HPLC-UV for determination of fluconazole in capsules*, Brazilian J. of Pharm. Sciences, Vol. 45, No. 4
4. Schmidt C.A. *et al.* (2008), *Development and validation of an agar diffusion assay for determination of ceftazidime in pharmaceutical preparations*, J. of AOAC international vol. 91, No.1
5. Souza M.J. *et al.* (2007), *Development of a microbiological assay to determine the potency of ceftiofur sodium powder*, J. of AOAC international vol. 90, No. 6
6. Staub I. *et al.* (2005), *Microbiological assay of ketoconazole in shampoo*, Int. J. of Pharm., Vol. 292, p. 195-199.
7. Validation of analytical procedures (2005): *Text and methodology Q2 (R1)-CHR harmonized tripartite guideline*. International conference on harmonization of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for human use, p. 1-13
8. Vaucher L.C. *et al.* (2006), *Microbiological assay for the determination of teliothromycin in tablets*, J. of AOAC international, Vol. 89, No. 5

VI CẦU KIỂM SOÁT GIẢI PHÓNG - KẾT DÍNH NIÊM MẠC VÀ ỨNG DỤNG TRONG CẢI THIỆN HẤP THU ACICLOVIR QUA ĐƯỜNG TIÊU HÓA

Vũ Thị Thu Giang, Phạm Thị Minh Huệ, Nguyễn Thu Hiền

1. Đặt vấn đề

Đường uống là đường đưa thuốc vào cơ thể phổ biến nhất hiện nay. Tuy nhiên hấp thu thuốc qua đường tiêu hóa khá phức tạp, trong nhiều trường hợp cơ chế hấp thu chưa hoàn toàn sáng tỏ. Hấp thu thuốc thay đổi dọc theo đường tiêu hóa, thường giảm dần ở cuối đường tiêu hóa, chịu sự tác động của nhiều yếu tố. Thực tế thuốc thường được hấp thu chủ yếu ở một vùng nhất định trên đường tiêu hóa. Phần lớn các thuốc được hấp thu tương đối nhanh ở phần đầu ruột non, chậm và không hoàn toàn ở phần cuối đường tiêu hóa. Vì vậy kiểm soát giải phóng ở vùng hấp thu tối ưu trong đường tiêu hóa là một trong những cách cải thiện hấp thu và SKD của thuốc.

Vi cầu KSGP - KDNM có khả năng lưu giữ thuốc trên bề mặt niêm mạc đường tiêu hóa trong vùng hấp thu tối ưu nhờ đó góp phần cải thiện hấp thu thuốc qua đường tiêu hóa. Vì vậy bào chế hệ kiểm soát giải phóng thuốc kết dính niêm mạc (KSGP - KDNM) có thể là biện pháp tốt để cải thiện sinh khả dụng đường uống cho những thuốc có tính thẩm kém như aciclovir.

2. Đại cương về hệ kết dính sinh học

2.1. Khái niệm kết dính sinh học và kết dính niêm mạc

Thuật ngữ kết dính sinh học (KDSH) dùng để chỉ sự hình thành các liên kết giữa hai bề mặt sinh học hoặc giữa một bề mặt sinh học và một bề mặt tổng hợp. Trong các hệ KSGP – KDNM thuật ngữ này được dùng để chỉ sự kết dính giữa các polyme tự nhiên hay tổng hợp với các mô như niêm mạc đường tiêu hóa... Trong thực tế, các liên kết kết dính có thể được hình thành giữa polyme với lớp màng này hoặc màng tế bào hoặc kết hợp cả hai loại liên kết.

2.2. Cơ chế và quá trình kết dính sinh học

Cho đến nay, cơ chế KDSH chưa hoàn toàn sáng tỏ. Về cơ bản hầu hết các tác giả đều thống nhất sự KDSH xảy ra nhờ hai nhóm liên kết hóa học và vật lý.

- Liên kết hóa học: quan trọng và mạnh nhất là các liên kết đồng hóa trị hình thành giữa chuỗi polyme và các phân tử protein trên bề mặt tế bào biểu mô, tiếp theo là các liên kết ion và các liên kết hydro. Tuy nhiên các liên kết loại này thường gặp phải các rào cản mà các nhà nghiên cứu cần tính đến đó là (1) lớp màng nhày là rào cản polyme tiếp xúc trực tiếp với màng tế bào; (2) Lớp tế bào biểu mô thường bong ra theo chu kỳ 3 – 4 ngày; (3) Tương hợp về mặt sinh học chưa được nghiên cứu kỹ.

- Liên kết vật lý: là các tương tác phân tán đều các chuỗi polyme trong lớp chất nhày. Tốc độ khuếch tán vào lớp chất nhày phụ thuộc vào sự linh hoạt của chuỗi polyme và hệ số khuếch tán của cả hai thành phần polyme và chất nhày. Cường độ lực liên kết phụ thuộc vào mức độ thâm sâu của các chuỗi polyme, nước, thời gian tiếp xúc, chiều dài và mức độ linh hoạt của chuỗi polyme, lực hút van der Waal...

Quá trình KDSH xảy ra qua ba giai đoạn như sau:

- Polyme thấm ướt và trương nở để tiếp xúc với biểu mô sinh học.
- Polyme KDSH, chất nhày thấm và phân tán vào nhau.
- Hình thành các liên kết hóa học và vật lý.

2.3. Polyme kết dính sinh học

Yêu cầu đối với polyme KDSH:

Để có khả năng KDSH, các polyme cần có các tính chất sau:

- Có các nhóm chức hóa học có khả năng tạo liên kết hydro (carboxyl, hydroxyl, amid, sulfat)
- Mang điện tích bề mặt.
- Trọng lượng phân tử lớn.
- Các chuỗi polyme có tính linh hoạt cao.
- Sức căng bề mặt cho phép trải rộng bề mặt tiếp xúc với màng sinh học.

Một số polyme kết dính sinh học thường được sử dụng

Chitosan là sản phẩm kiềm hóa của polyme kitin có dồi dào trong tự nhiên, có thể tương hợp và phân hủy sinh học nên là một tá dược rất hữu dụng. Do có khối lượng phân tử lớn, chitosan không thấm qua tế bào hoặc vào được hệ tuần hoàn mà chỉ tương tác với các tế bào: KDSH mạnh, cải thiện hấp thu qua khe hở liên bào do nối lỏng liên kết chặt chẽ giữa các tế bào nhờ tương tác giữa nhóm amin mang điện tích dương của chitosan và các protein ở bề mặt mang điện tích âm của liên kết khe hở liên bào làm tăng hấp thu thuốc mà không gây hại cho tế bào [5], [7]. Chitosan còn có khả năng kiểm soát giải phóng thuốc kéo dài, bảo vệ dược chất khỏi tác động của các enzym như pepsin, trypsin trong dịch tiêu hóa [11]. Chính vì vậy chitosan được nhiều nhà khoa học quan tâm sử dụng trong các nghiên cứu cải thiện hấp thu dược chất qua đường tiêu hóa. Một số dẫn chất của chitosan như N-trimethyl chitosan (TMC) và chitosan- 4-thiobutylamidin (TBA)... là những chất có khả năng cải thiện hấp thu rất tốt cho các thuốc dùng theo đường uống. Nhiều nghiên cứu cho thấy dẫn chất chitosan thiol hóa như chitosan-TBA là polyme có khả năng KDSH mạnh hơn hẳn chitosan. Nguyên nhân cơ bản là do sự hình thành cầu nối disulfid giữa polyme và glycoprotein màng nhày. Ngoài ra, chitosan-TBA còn làm tăng vận chuyển qua khe kẽ tế bào khi kết hợp với

glutathion do chất này ức chế protein tyrosin phosphatase thông qua hình thành một liên kết disulfid với cystein của enzym dẫn tới rời lỏng liên kết giữa các tế bào. Đây chính là một cơ chế làm tăng hấp thu các chất thân nước có tính thấm kém qua kẽ tế bào. Các chitosan thiol hóa bám dính tốt trên niêm mạc dẫn tới glutathion lưu trên bề mặt tế bào nhiều hơn nên cải thiện hấp thu qua kẽ tế bào [6], [1].

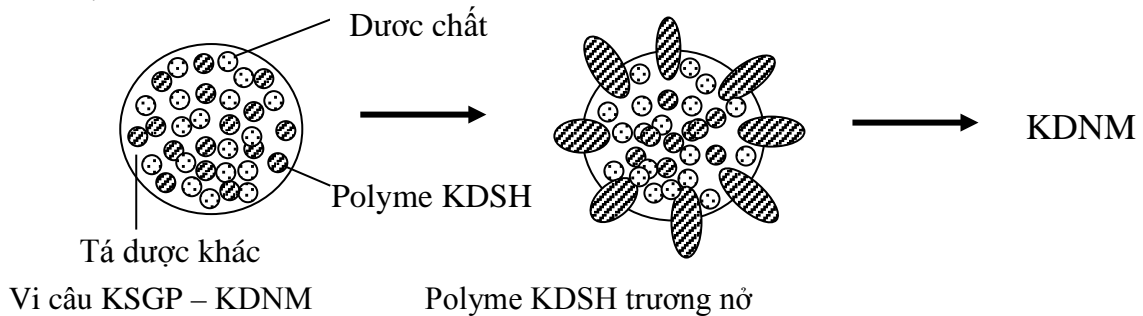
Carbomer (Polycarbophil, Carbopol): là một polyme của acid acrylic được liên kết chéo bởi các allyl ether của saccarose hoặc pentaerythritol. Các polyme này có khả năng trương nở mạnh, KDSH và tạo phức với ion Ca^{2+} ở thành ruột nên rời lỏng liên kết khe hở liên bào làm tăng hấp thu dược chất theo đường này. Ngoài ra Carbomer còn có khả năng ức chế hoạt tính của một số enzym trong đường tiêu hóa như trypsin và carboxypeptidase B nên hạn chế thủy phân các thuốc bản chất protein [5].

Dẫn chất cellulose: Bao gồm HPMC (hydroxy propylmethyl cellulose), HPC (hydroxy propyl cellulose)... Đây là các polyme thuộc nhóm hydrogel hay còn gọi là chất kết dính ẩm ướt vì chúng cần độ ẩm mới kết dính được. Ổn định khi khô, trương nở trong môi trường thân nước, các sợi liên kết chéo trong phân tử tạo thành cốt lưu trữ thuốc [8]

3. Vi cầu kiểm soát giải phóng thuốc và kết dính niêm mạc

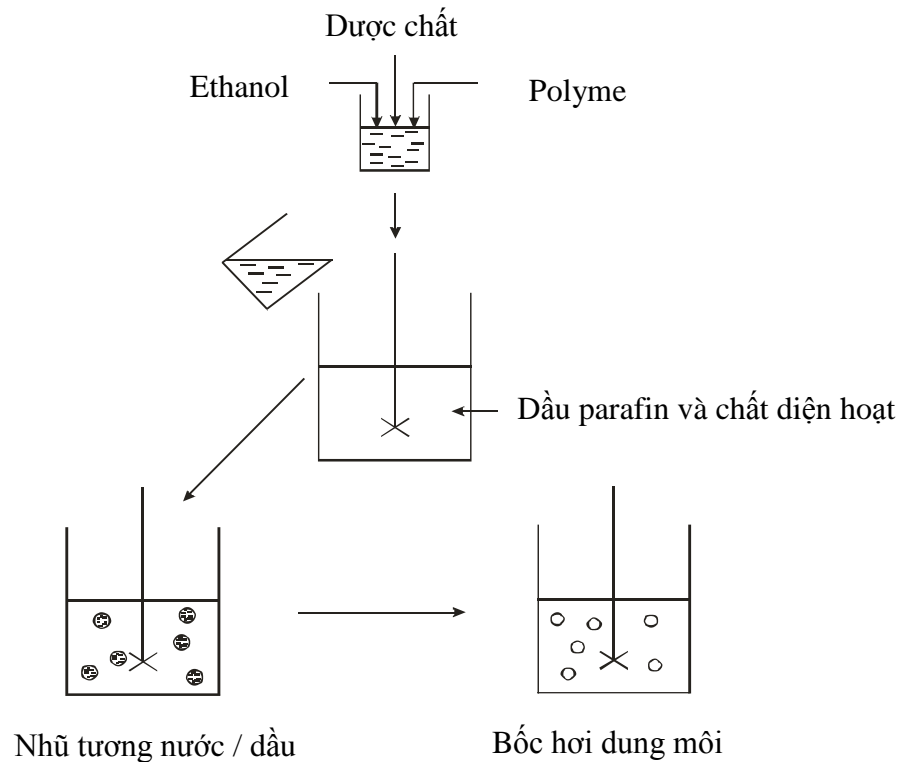
Vi cầu KSGP – KDNM là những tiểu phân có cấu tạo một khối đồng nhất giống như những cốt (matrix) mang thuốc. Chất mang dùng trong bào chế vi cầu thường là một hay hỗn hợp polyme có khả năng KSGP dược chất và KDSH.

Cơ chế kết dính niêm mạc của các vi cầu thuộc nhóm này được mô tả theo sơ đồ hình 1.



Hình 1. Cơ chế kết dính của vi cầu KSGP – KDNM

Trong hầu hết các nghiên cứu, vi cầu KSGP – KDNM được bào chế theo phương pháp bốc hơi dung môi theo sơ đồ hình 2.



Hình 2. Các bước bào chế vi cầu KSGP – KDNM theo phương pháp bốc hơi dung môi

4. Một số nghiên cứu bào chế vi cầu aciclovir KSGP – KDNM nhằm cải thiện hấp thu qua đường tiêu hóa

Trong hơn hai chục năm qua, ACV là thuốc được lựa chọn hàng đầu trong điều trị các bệnh do virus herpes simplex nhóm 1 và 2. Ngoài ra ACV còn có tác dụng trong điều trị các bệnh do nhiễm các virus Varicella-Zoster, Epstein-barr, Cytomegalo và ức chế virus viêm gan B. Tuy nhiên, do ít tan trong nước (1,3 mg/ml ở 25°C [4]) và lipid nên nhiều dạng bào chế của ACV không thể đảm bảo nồng độ thuốc thích hợp tại nơi điều trị [2]. Ngoài ra, ACV có tính thấm kém, thân dầu và có khối lượng phân tử thấp (< 300) nên được hấp thu chủ yếu qua khe hở liên bào [5], [7], chỉ chiếm một tỷ lệ rất nhỏ so với đường vận chuyển, thời gian lưu của thuốc tại vị trí hấp thu tối ưu là phần đầu đường tiêu hóa tới tá tràng, hồng tràng ngắn [3], [10] do đó SKD đường uống thấp và không ổn định (10 - 30%) [9]. Để cải thiện SKD của ACV, hướng nghiên cứu bào chế hệ KSGP – KDNM đường tiêu hóa chứa được một số nhà khoa học ứng dụng khá thành công.

Dhaliwal S. và cộng sự [3] đã nghiên cứu bào chế vi cầu kết dính niêm mạc duy trì giải phóng ACV ở dạ dày. Chitosan, chitosan thiol hóa, Carbopol 71G và Methocel

K15M được sử dụng làm polyme kết dính sinh học. Các vi cầu được bào chế bằng kỹ thuật liên kết chéo nhũ tương (emulsion-chemical crosslinking technique) với tác nhân liên kết chéo là glutaraldehyd. Nang gelatin chứa bột ACV có độ hòa tan *in vitro* sau 1 giờ là $90.5 \pm 3.6\%$ trong khi nang chứa vi cầu kết dính niêm mạc kéo dài quá trình giải phóng dược chất tới 12 giờ (78.8 ± 3.9). Kết quả đánh giá khả năng kết dính niêm mạc cho thấy vi cầu chitosan thiol hóa có thời gian lưu ở khu vực tá tràng và hồng tràng chuột tốt hơn cả (8.0 ± 0.8 h). Nghiên cứu dược động học trên chuột cho thấy các vi cầu kết dính sinh học có khả năng duy trì nồng độ ACV trong huyết tương ở mức có thể xác định được tới 24 giờ trong khi dung dịch ACV chỉ duy trì được 5 giờ. Vi cầu chitosan thiol hóa có khả năng cải thiện hấp thu nội trội hơn cả, AUC_{0-24} ($1,090 \pm 51$ ng h/ml) cao gấp gần 4 lần so với dạng dung dịch ACV (281 ± 28 ng h/ml). Như vậy kết quả nghiên cứu đã chứng tỏ việc kéo dài giải phóng dược chất từ các vi cầu kết dính niêm mạc đã cải thiện đáng kể SKD đường uống của ACV do kéo dài được thời gian lưu của thuốc ở phần trên đường tiêu hóa.

Vi cầu ACV kết dính niêm mạc sử dụng tá dược tạo cốt là EC và polyme kết dính niêm mạc là Carbopol 974P NF được Tao Y. và cộng sự [10] bào chế bằng phương pháp bốc hơi dung môi nhũ tương. Hình thái của vi cầu được quan sát bằng kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử quét. Nghiên cứu khả năng giải phóng *in vitro* và SKD đường uống của vi cầu ACV trên chuột cho thấy quá trình giải phóng dược chất bị tác động mạnh bởi pH môi trường và tỷ lệ Carbopol trong vi cầu. Tốc độ giải phóng ACV từ vi cầu trong môi trường pH 1,3 và 7,4 nhanh hơn hẳn trong môi trường pH 3,6. Trên 95% dược chất được giải phóng trong môi trường pH 1,3 và 7,4, chỉ có 75% ACV được giải phóng trong môi trường pH 3,6 sau 6 giờ, quá trình giải phóng dược chất tiếp tục kéo dài tới 12 giờ. Nguyên nhân có thể do khả năng tạo gel của Carbopol và độ tan của ACV thay đổi trong các môi trường pH khác nhau. Khi tỷ lệ Carbopol trong vi cầu tăng thì tốc độ giải phóng ACV trong môi trường pH 3,6 cũng tăng lên. EC được sử dụng với vai trò cốt kéo dài giải phóng dược chất nhờ thuộc tính không tan trong nước và tính thấm thấp còn Carbopol là polyme tan trong nước nên tạo thành các kênh thân nước bên trong vi cầu giúp dược chất khuếch tán ra ngoài làm tăng tốc độ giải phóng dược chất đồng thời là tác nhân kết dính sinh học lưu thuốc tại vị trí hấp thu. Kết quả nghiên cứu khả năng kết dính niêm mạc chứng tỏ vi cầu chế tạo đã kéo dài thời gian lưu thuốc trong đường tiêu hóa chuột. Nghiên cứu về các thông số dược động học cho thấy nồng độ nồng độ ACV trong huyết tương tương đối ổn định và kéo dài 8 giờ sau khi cho chuột uống vi cầu. Các thông số AUC_{0-t} và MRT của vi cầu ACV (6055.9 ng h/mL và 7.2 h) cao hơn hẳn so với hỗn dịch ACV (2335.6 ng h/mL và 3.7 h) ($P < 0.05$) chứng tỏ SKD của ACV tăng mạnh do vi cầu ACV kết dính niêm mạc đã kéo dài thời gian lưu thuốc trong đường tiêu hóa.

Tham khảo các nghiên cứu đi trước, chúng tôi đã nghiên cứu bào chế vi cầu ACV KSGP – KDNM theo phương pháp bốc hơi dung môi nhũ tương với thành phần công thức cơ bản như sau:

- Aciclovir
- Carbopol 934P (Cb): kết dính niêm mạc
- Ethylcellulose (EC): kiểm soát giải phóng
- Aerosil: chống dính
- Ethanol tuyệt đối (EtOH): dung môi pha nội
- Dầu parafin lỏng: pha ngoại
- Span 80: chất nhũ hóa

Vi cầu ACV được tiến hành bào chế theo phương pháp bốc hơi dung môi nhũ tương. Cb và EC được phân tán trong EtOH, ngâm trong 8 giờ để tạo gel đồng nhất. phân tán ACV và Aerosil vào gel tạo hỗn dịch đồng nhất. Hòa tan Span 80 vào dầu parafin sau đó rót nhanh hỗn dịch ACV/polyme vào dung dịch dầu parafin chứa chất nhũ hóa, kết hợp lực phân tán bằng máy khuấy ở tốc độ cao nhất 1000 vòng/phút với siêu âm trong 3 phút để tạo nhũ tương. Tiếp tục khuấy từ với tốc độ 900 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong vòng 12 giờ để bốc hơi EtOH. Gạn, lọc hút chân không thu được vi cầu. Rửa 3 lần bằng ether dầu hỏa để loại hết dầu parafin thừa. Làm khô vi cầu trong bình hút chân không trong vòng 12 giờ.

Tiến hành bào chế vi cầu ACV theo 12 công thức thể hiện trong bảng 1 (dầu parafin vừa đủ 500 ml).

Bảng 1. Công thức vi cầu ACV KDNM GPKD

Công thức	ACV (g)	EC (g)	Cb (g)	Aerosil (g)	EtOH (ml)	Span 80 (g)
CT1	2,25	3,36	1,12	0,10	50	12,50
CT2	2,25	3,75	0,75	0,10	50	12,50
CT3	2,25	3,92	0,56	0,10	50	12,50
CT4	2,25	4,05	0,45	0,10	50	12,50
CT5	3,00	3,75	0,75	0,10	50	12,50
CT6	1,80	3,75	0,75	0,10	50	12,50
CT7	2,25	3,75	0,75	0,10	40	12,50
CT8	2,25	3,75	0,75	0,10	60	12,50
CT9	2,25	3,75	0,75	0,05	50	12,50
CT10	2,25	3,75	0,75	0,14	50	12,50
CT11	2,25	3,75	0,75	0,10	50	15,00
CT12	2,25	3,75	0,75	0,10	50	10,00



Hình 3. Hình ảnh vi cầu bào chế theo công thức CT2

Kết quả khảo sát cho thấy vi cầu ACV bào chế theo 12 công thức có kích thước phân bố khá đều, trên 80 % vi cầu thu được có kích thước trong khoảng 0,60 – 1,18 mm. Hiệu suất chế tạo và tỷ lệ vi cầu hóa đều phụ thuộc vào thành phần công thức.

Các công thức bào chế đều cho hiệu suất tạo vi cầu và tỷ lệ vi cầu hóa trên 60 %. Tỷ lệ Cb/EC và trong công thức giảm từ 1/3 đến 1/9, hiệu suất chế tạo và tỷ lệ vi cầu hóa đều giảm xuống. Ngược lại, tỷ lệ ACV và EtOH tăng làm tăng hiệu suất chế tạo và tỷ lệ vi cầu hóa. Span 80 và Aerosil giảm làm giảm hiệu suất tạo vi cầu nhưng tỷ lệ vi cầu hóa lại tăng lên.

Đánh giá khả năng giải phóng *in vitro* của vi cầu bào chế trong môi trường nước cất. Kết quả thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Phần trăm giải phóng ACV từ vi cầu theo thời gian của 12 công thức

(n = 3)

Mẫu vi cầu	Phần trăm giải phóng ACV từ vi cầu theo thời gian							
	1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ	5 giờ	6 giờ	7 giờ	8 giờ
CT1	35,25	48,89	67,16	79,21	88,62	92,14	94,04	101,21
CT2	23,35	35,08	47,84	63,93	73,12	79,77	87,39	94,51
CT3	31,02	43,66	54,60	60,89	75,31	76,86	85,58	89,24
CT4	19,69	21,87	22,78	23,47	33,01	33,37	34,39	35,41
CT5	15,12	31,80	43,69	52,40	59,55	65,74	70,97	75,41
CT6	18,66	41,05	58,46	70,86	80,47	87,89	93,57	97,80
CT7	28,74	34,87	47,54	63,78	74,33	81,65	87,68	93,62
CT8	15,26	35,88	49,70	60,28	68,71	75,17	80,28	86,57

CT9	22,21	48,45	69,18	83,99	94,83	101,81	-	-
CT10	22,86	55,68	73,32	87,36	97,75	105,01	-	-
CT11	10,96	24,32	34,62	42,28	49,14	54,97	59,77	64,37
CT12	33,81	61,51	78,30	88,32	94,36	97,28	98,78	99,51

Mặc dù thành phần công thức khác nhau thì khả năng kiểm soát giải phóng dược chất khác nhau nhưng nhìn chung 12 mẫu vi cầu bào chế đều có khả năng giải phóng ACV kéo dài. Mẫu CT4 có tốc độ giải phóng chậm nhất, sau 8 giờ chỉ giải phóng được 35,41%. Nguyên nhân có thể do EC là polyme không tan trong nước, đóng vai trò chính kiểm soát giải phóng dược chất nên khi tỷ lệ EC tăng cao nhất thì tốc độ giải phóng dược chất chậm nhất. Các mẫu CT9 và CT10 có tốc độ giải phóng nhanh nhất, chỉ kéo dài quá trình giải phóng dược chất tới 6 giờ. Các mẫu vi cầu còn lại đều có khả năng kéo dài quá trình giải phóng ACV từ 8 đến trên 12 giờ.

Lựa chọn các mẫu vi cầu CT1, CT8, CT3 và CT4 có tỷ lệ các polyme Cb/EC lần lượt là 1/3, 1/5, 1/7 và 1/9 để đánh giá khả năng KDNM đường tiêu hóa trên 16 chuột cống đực cân nặng từ 300 – 350 g (để nhịn đói, cho uống nước tự do trong 24 giờ trước khi tiến hành thí nghiệm). Cho chuột uống 100 hạt vi cầu bằng ống xông và chiêu với 5 ml nước. Sau 2 hoặc 6 giờ gây chết chuột bằng ete và phẫu thuật để xác định tỷ lệ vi cầu còn kết dính trên niêm mạc dạ dày và ruột non. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Tỷ lệ vi cầu ACV KSGP – KDNM còn kết dính ở dạ dày và ruột non chuột sau khi uống (n = 2)

Thời gian	% vi cầu ACV còn lưu lại trên đường tiêu hóa chuột				
	Vị trí	CT1	CT8	CT3	CT4
Sau 2 giờ	Dạ dày	73	81	73	77
	Ruột non	0	0	0	0
	Tổng	73	81	73	77
Sau 6 giờ	Dạ dày	35	28	26	34
	Ruột non	41	60	46	44
	Tổng	76	88	82	78

Kết quả nghiên cứu cho thấy sau 2 giờ, trên 70% các mẫu vi cầu nghiên cứu đều vẫn kết dính hầu hết ở dạ dày và không tìm thấy vi cầu nào ở ruột non. Cho tới tận thời điểm 6 giờ sau khi uống, vẫn còn trên 25 % lượng vi cầu còn được kết dính trên niêm mạc dạ dày, trong đó mẫu CT1 có tỷ lệ còn lưu giữ trên niêm mạc dạ dày chuột lớn nhất (35%). Do hạn chế về số lượng chuột thí nghiệm, số lần lặp lại chưa nhiều nên sự khác biệt về khả năng KDNM giữa các mẫu vi cầu bào chế chưa có sự khác biệt rõ rệt. Tuy vậy tổng số vi cầu còn kết dính trên niêm mạc đường tiêu hóa tại vị trí hấp thu (dạ dày và ruột non) của các mẫu nghiên cứu đều trên 75 %.

Các kết quả nghiên cứu về khả năng giải phóng dược chất *in vitro* và KDNM đường tiêu hóa *in vivo* trên chuột đã chứng tỏ được khả năng KSGP ACV và kéo dài thời gian lưu của thuốc tại vị trí hấp thu tối ưu trên niêm mạc đường tiêu hóa của vi cầu bào chế.

Tài liệu tham khảo

1. Bernkop-Schnurch A., Guggi D., *et al.* (2004), "Thiolated chitosans: Development and *in vitro* evaluation of a mucoadhesive, permeation enhancing oral drug delivery system", *J Control Release*, 94(1), pp. 177-186.
2. Cortesi R., Esposito E. (2008), "Acyclovir delivery systems", *Expert Opin Drug Deliv*, 5(11), pp. 1217-1230.
3. Dhaliwal S., Jain S., *et al.* (2008), "Mucoadhesive microspheres for gastroretentive delivery of acyclovir: *In vitro* and *in vivo* evaluation", *AAPS J*, 10(2), pp. 322-330.
4. Luengo J., Aranguiz T., *et al.* (2002), "Preliminary pharmacokinetic study of different preparations of acyclovir with beta-cyclodextrin", *J Pharm Sci*, 91(12), pp. 2593-2598.
5. Merzlikine A., Rotter C., *et al.* (2009), "Effect of chitosan glutamate, carbomer 974p, and edta on the *in vitro* caco-2 permeability and oral pharmacokinetic profile of acyclovir in rats", *Drug Dev Ind Pharm*, 35(9), pp. 1082-1091.
6. Roldo M., Hornof M., *et al.* (2004), "Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: Synthesis and *in vitro* evaluation", *Eur J Pharm Biopharm*, 57(1), pp. 115-121.
7. Shah P., Jogani V., *et al.* (2008), "In vitro assessment of acyclovir permeation across cell monolayers in the presence of absorption enhancers", *Drug Dev Ind Pharm*, 34(3), pp. 279-288.
8. Sudhakar Y., Kuotsu K., *et al.* (2006), "Buccal bioadhesive drug delivery--a promising option for orally less efficient drugs", *J Control Release*, 114(1), pp. 15-40.
9. Sweetman S.C., *et a.* (2009), *Martindale 36*, Pharmaceutical Press, pp. 862-864, 911.
10. Tao Y., Lu Y., *et al.* (2009), "Development of mucoadhesive microspheres of acyclovir with enhanced bioavailability", *Int J Pharm*, 378(1-2), pp. 30-36.
11. Wu Z. H., Ping Q. N., *et al.* (2004), "Hypoglycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposomes after oral administration in mice", *Acta Pharmacol Sin*, 25(7), pp. 966-972.

NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ NANO NHŨ TƯƠNG NHỎ MẮT DICLOFENAC VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG GIẢI PHÓNG DƯỢC CHẤT *IN VITRO* CỦA CHẾ PHẨM

Đặng Thi Hiền, Vũ Ngọc Mai, Nguyễn Trần Linh

Tóm tắt

Nano nhũ tương diclofenac được bào chế bằng cách dùng siêu âm nhũ hóa pha dầu vào pha nước chứa dược chất, các chất diện hoạt, dung môi và chất làm tăng hấp thu. Sự ảnh hưởng của các thành phần tạo nên nano nhũ tương cũng như dạng tồn tại của dược chất (natri diclofenac hay acid diclofenac) tới hình thức bên ngoài, đặc tính hiển vi và khả năng giải phóng dược chất *in vitro* của nano nhũ tương đã được khảo sát. Thiết kế thí nghiệm cổ điển và mạng neural nhân tạo đã được sử dụng để phân tích dữ liệu. 22 mẫu nano nhũ tương đã được bào chế theo bảng thiết kế thí nghiệm. Loại và lượng các thành phần trong nano nhũ tương được lựa chọn độc lập. Phần trăm dược chất giải phóng tại thời điểm 1, 2, 3, 4, 5, 6 giờ được coi là các biến phụ thuộc. Sự thay đổi của các biến đầu vào ảnh hưởng có ý nghĩa tới hình thức bên ngoài, đặc tính hiển vi và khả năng giải phóng dược chất *in vitro* của nano nhũ tương.

Từ khóa: *diclofenac, nano nhũ tương, thiết kế thí nghiệm, mạng neural nhân tạo.*

Abstract

Diclofenac nanoemulsions were prepared by ultrasonification emulsifying oil phase into water phase containing active ingredient, surfactants, solvents and penetration enhancers. The influences of nanoemulsion components as well as derivatives of active ingredient (diclofenac sodium or diclofenac acid) on the appearance, microscopic properties and *in vitro* drug releases from nanoemulsions were evaluated. The classical experimental design and artificial neural network were used for data analysis. As model formulations, 22 kinds of nanoemulsions were prepared. The types and amounts of components were selected as independent variables. The percentages of active ingredient released at 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours were considered as dependent variables. The changes in the types and amounts of all components influenced significantly the release rates of active ingredient from nanoemulsions as well as their microscopic properties.

Keywords: *diclofenac, nanoemulsion, experimental design, artificial neural network.*

1. Đặt vấn đề

Nghiên cứu hệ cấp thuốc tại mắt là một trong những lĩnh vực hết sức hấp dẫn nhưng cũng đầy thách thức với các nhà bào chế. Các chế phẩm thuốc nhỏ mắt với các hệ cấp

thuốc thường dùng có sinh khả dụng thấp và hiệu quả điều trị chưa cao; để có hiệu quả đáp ứng điều trị, người bệnh phải nhỏ một liều thuốc lớn hoặc phải nhỏ nhiều lần mỗi ngày [2], [3], [4], [7].

Diclofenac là dẫn chất của acid phenylacetic thuộc nhóm thuốc chống viêm không steroid, ức chế chọn lọc COX – 2 hơn COX – 1, có tác dụng chống viêm, giảm đau và hạ sốt mạnh. Diclofenac dùng cho mắt trên thị trường mới chỉ có ở dạng dung dịch với nồng độ 0,1%, thuốc tác dụng trong thời gian rất ngắn, đạt nồng độ đỉnh trong điều trị khoảng 30 phút sau nhỏ và bị thải trừ hoàn toàn ra khỏi cơ thể trong 1 giờ vì vậy bệnh nhân ở mỗi chỉ định điều trị mỗi ngày phải nhỏ thuốc ít nhất 3-5 lần [1], [5].

Nano nhũ tương là một hệ cấp thuốc mới, được chứng minh là rất thích hợp dùng cho mắt; nó được hình thành bởi sự phân tán của dầu – nước, được ổn định bằng sự tham gia của chất diện hoạt, chất đồng diện hoạt [6], [8]. Với nhiều ưu điểm hơn dạng thuốc nhỏ mắt dung dịch thông thường, nano nhũ tương được lựa chọn trong thiết kế nghiên cứu của chúng tôi nhằm bào chế một dạng thuốc nhỏ mắt mới cho diclofenac có khả năng duy trì sự giải phóng thuốc hằng định trên giác mạc, kéo dài thời gian tác dụng của thuốc, thấm sâu hơn vào các lớp trong cấu trúc của mắt nhằm tăng hiệu lực điều trị và giảm số lần dùng thuốc mỗi ngày.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Acid diclofenac (Trung Quốc), Natri diclofenac (Trung Quốc), Tween 80 (Singapore), Cremophor EL (Singapore), Span 80 (Singapore), Isopropyl myristat (Singapore), Labrafac PG (Canada), Miglyol (BASF), Transcutol HP (Canada), Acid boric (Trung Quốc), Acid phosphoric (Merck), natri dihydrophosphat (Trung Quốc), dinatri hydrophosphat (Trung Quốc), acid citric (Trung Quốc), natri hydroxyd (Trung Quốc), Methanol (Merck), Glycerin (Trung Quốc), Nước cất (Việt Nam)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bào chế nano nhũ tương

- Pha nước: nước, glycerin, hệ đệm, các chất diện hoạt tan trong nước: đun nóng 70-75⁰C.

- Pha dầu: dầu, chất diện hoạt tan trong dầu, Transcutol HP, dược chất: đun nóng 65-70⁰C.

- Kết hợp 2 pha, siêu âm 5 phút.

- Lọc qua màng cellulose acetat 0,2 μ m.

2.2.2. Định lượng diclofenac có trong nano nhũ tương

Hàm lượng diclofenac giải phóng từ nano nhũ tương và dược chất có trong nano nhũ tương được xác định theo phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Hệ thống sắc ký bao gồm cột Alltech C8 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm); pha động là hỗn hợp methanol và dung dịch đệm phosphat pH 2,5 với tỷ lệ 75 : 25; thể tích tiêm mẫu: 20 μL, tốc độ dòng: 1mL/phút; detector mảng quang diod, bước sóng $\lambda = 276\text{nm}$.

2.2.3. Đánh giá mức độ giải phóng dược chất

Sử dụng hệ thống giải phóng thuốc qua màng Hanson Research, với điều kiện:

- Màng cellulose acetat 0,2 μm.
- Môi trường khuếch tán: dung dịch đệm phosphat pH 7,4.
- Thể tích môi trường khuếch tán: $V = 7\text{ mL}$.
- Nhiệt độ môi trường khuếch tán: 37°C .
- Diện tích bề mặt màng khuếch tán: $1,76\text{ cm}^2$.
- Tốc độ khuấy: 400 vòng/phút.
- Lượng mẫu đem thử: 1 ml (tương ứng với 1 mg natri diclofenac; 0,93 mg acid diclofenac)

Lấy mẫu: Trong 6 giờ, cứ mỗi giờ lấy mẫu 1 lần. Mỗi lần lấy 1 mL, đồng thời bổ sung thêm 1 mL môi trường khuếch tán mới. Mẫu lấy ra được đem phân tích ngay bởi hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao được mô tả ở mục 2.2.2.

2.2.4. Thiết kế thí nghiệm

Mô hình thiết kế thí nghiệm truyền thống và mạng neuron nhân tạo được sử dụng làm công cụ để xác định mức độ ảnh hưởng của các tá dược tới tỉ lệ giải phóng diclofenac. Dữ liệu được máy tính phân tích với sự trợ giúp của phần mềm MODDE 8.0 (Umetrics Inc., USA) và INFORM 3.2 (Intelligensys Ltd., UK).

2.2.5. Xác định hình thái, kích thước hạt nano nhũ tương

Dữ liệu được chụp hình bởi sự trợ giúp của máy TEM (Viện vệ sinh dịch tễ Trung ương).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng công thức thực nghiệm

Trong các nghiên cứu sơ bộ, đã xây dựng công thức nano nhũ tương với các thành phần cơ bản như sau: diclofenac (acid diclofenac, natri diclofenac: 0,1% (kl/kl), glycerin (5%) Tween 80 (hoặc Cremophor EL, Tween 80/Cremophor EL (1/1)), Span 80, Labrafac PG (hoặc isopropyl myristat), Transcutol HP, đệm borat (phosphat, citrat)

(vừa đủ 100% kl/kl). Các biến độc lập và khoảng biến thiên của nó được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Các biến độc lập

Thành phần	Khoảng biến thiên
Nồng độ Span 80	0,5 – 1,5 (%)
Loại chất diện hoạt thân nước	Tween 80 Cremophor EL Tween 80/Cremophor EL (1/1)
Nồng độ chất diện hoạt thân nước	3 – 5 (%)
Loại dung môi dầu	Labrafac PG Isopropyl miristat
Nồng độ dung môi dầu	3 – 5 (%)
Transcutol HP	1 – 2 (%)
Loại dung dịch đệm	Borat Phosphat Citrat
Nồng độ dung dịch đệm	0,1 – 0,2 M (vừa đủ 100 %)
pH	6,5 – 7,5

Các biến phụ thuộc là phần trăm diclofenac hoặc natri diclofenac được giải phóng sau 1, 2, 3, 4, 5, 6 giờ. Bảng thiết kế thí nghiệm cho bởi Modde 8.0 gồm 22 thí nghiệm (với mỗi thành phần hoạt chất khác nhau). Các thí nghiệm sau đó đã được tiến hành. Kết quả được phân tích bằng mạng neuron nhân tạo (tích hợp trong INFORM 3.2) nhằm đánh giá ảnh hưởng của các biến độc lập tới các biến phụ thuộc.

3.2. Kết quả và phân tích các yếu tố ảnh hưởng

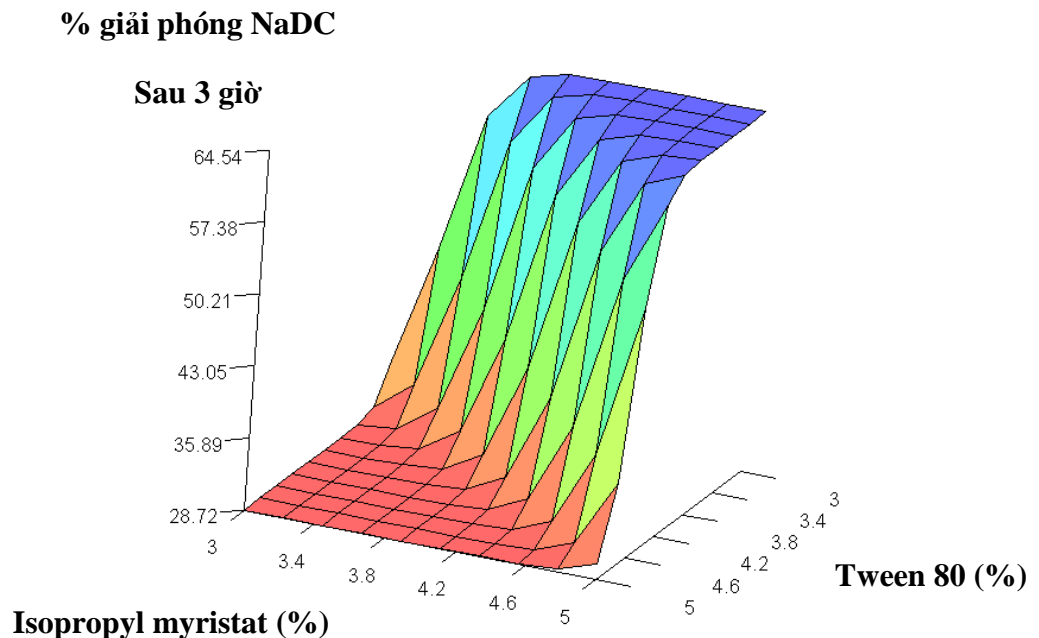
3.2.1. Độ bền của nano nhũ tương

Nano nhũ tương được bào chế theo phương pháp được mô tả trong mục 2.2.1. Tất cả các mẫu đều được kiểm tra độ bền bằng cách lược sôi mẫu trong 1 giờ và quan sát sự tách lớp (Bảng 2).

Bảng 2: Độ bền của nano nhũ tương

Mức độ	Sự tách lớp	Acid diclofenac (số mẫu)	Natri diclofenac (số mẫu)
1	Tách lớp hoàn toàn	5	5
2	Tách lớp chưa hoàn toàn (pha nước trong, pha dầu đục)	7	8
3	Tách lớp không hoàn toàn (pha dầu và nước đều đục)	8	6
4	Bền không bị tách lớp	2	4

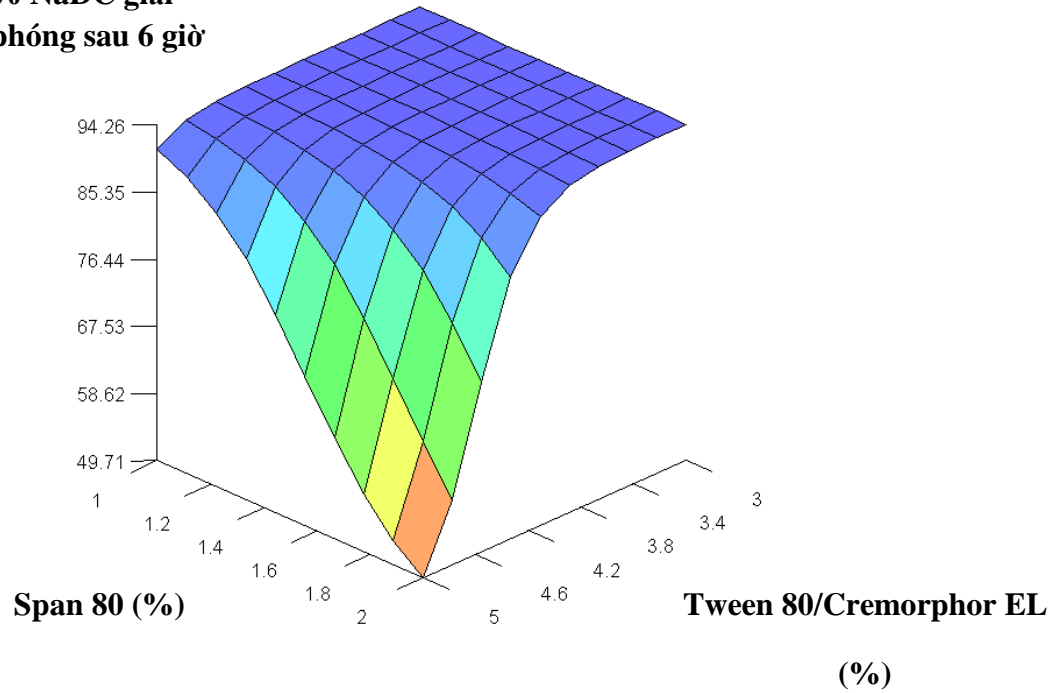
3.2.2. Ảnh hưởng của các thành phần và loại thành phần tới sự giải phóng của nano nhũ tương



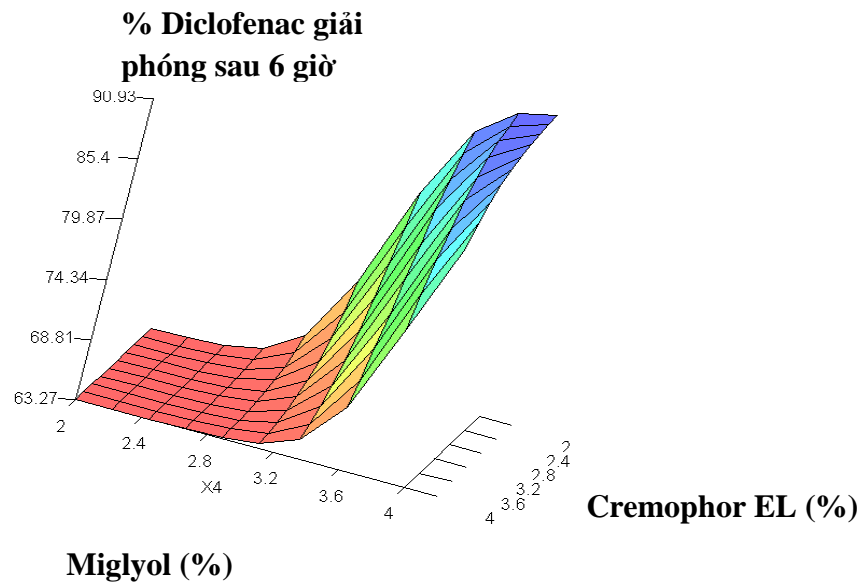
Hình 1. Ảnh hưởng của isopropyl myristat và Tween 80 tới mức độ giải phóng dược chất từ nano nhũ tương (Span 80 = 1,0%, Transcutol HP = 1,5%, đệm phosphat 0,15 M, pH = 7,0)

Hình 1 chỉ ra ảnh hưởng của Tween 80 và isopropyl myristat tới mức độ giải phóng dược chất từ nano nhũ tương. Nó cho thấy nếu loại dung môi pha dầu là isopropyl myristat tăng và lượng Tween 80 giảm thì sẽ làm tăng mức độ giải phóng. Hình 2 chỉ ra khi lượng chất diện hoạt thân nước giảm và lượng Span 80 giảm thì phần trăm dược chất giải phóng sau 6 giờ tăng. Điều này có thể thấy rằng với hoạt chất natri diclofenac có độ tan trong pha nước lớn hơn DC và bản thân nó cũng là một chất diện hoạt yếu giúp cho sự hình thành nano nhũ tương một cách dễ dàng do vậy khi tăng tỉ lệ Tween 80, Span 80 chỉ làm tăng độ nhớt của nano nhũ tương nên làm chậm tốc độ khuếch tán dược chất ra khỏi hệ.

**% NaDC giải
phóng sau 6 giờ**



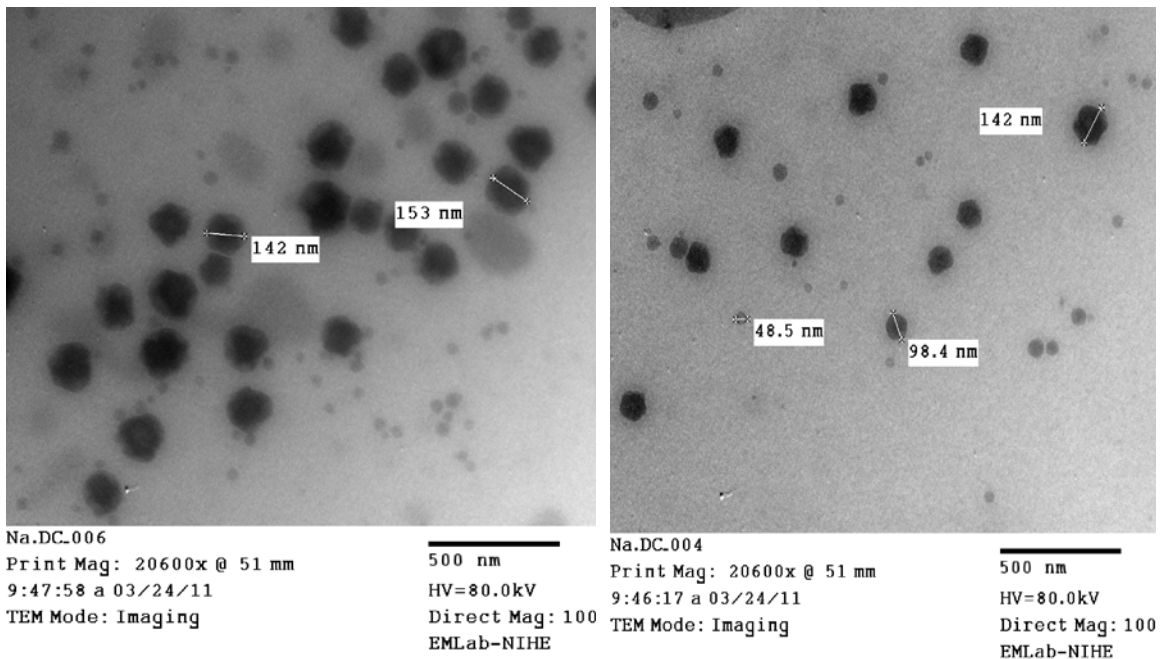
Hình 2: Ảnh hưởng của lượng chất diện hoạt thân nước và Span 80 tới phần trăm giải phóng dược chất sau 6 giờ (isopropyl myristat = 4,0%, Transcutol HP = 1,5%, đệm citrat 0,15 M, pH = 7,0)



Hình 3: Ảnh hưởng của Cremophor EL và Miglyol đến phần trăm giải phóng dược chất sau 6 giờ (Span 80 = 0,75%, Transcutol HP = 1,0%, citrat 0,15 M, pH 7,0)

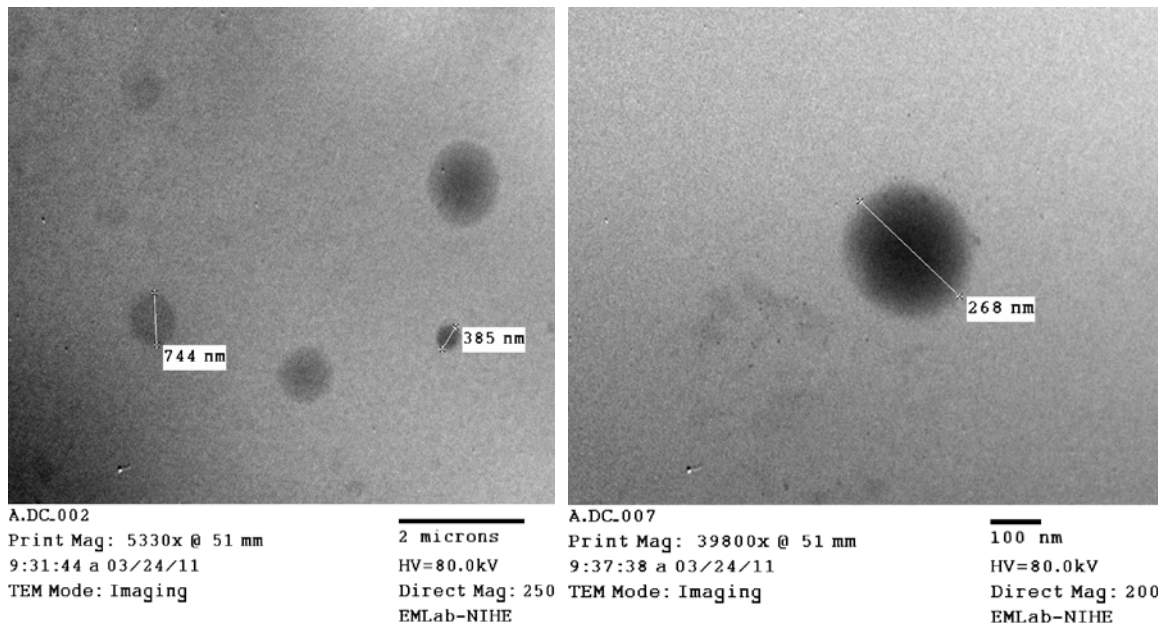
Nhận xét: khi lượng pha dầu tăng và lượng chất diện hoạt thân nước giảm thì phần trăm dược chất giải phóng sau 6 giờ tăng. Điều này có thể giải thích là do acid diclofenac thân dầu hơn so với natri diclofenac chính vì vậy nó phân tán phần lớn trong pha dầu của nano nhũ tương, vì vậy lượng pha dầu càng lớn càng hòa tan tối đa dược chất do đó lượng pha dầu tăng đương nhiên lượng dược chất giải phóng tăng; mặt khác chất diện hoạt thân nước ít có vai trò hỗ trợ trong việc hình thành nano nhũ tương chứa hoạt chất diclofenac mà chỉ làm tăng độ nhớt gây cản trở quá trình giải phóng dược chất ra khỏi hệ.

3.2.3. Xác định hình thái, kích thước hạt nano nhũ tương (TEM)



Hình 4. Ảnh chụp TEM của nano nhũ tương chứa natri diclofenac.

Cấu trúc nano nhũ tương có chứa hoạt chất natri diclofenac qua chụp TEM cho thấy có sự phân bố giọt đồng đều nhau và kích thước hạt nằm trong khoảng từ 20 – 250 nm. Điều này có thể cho thấy vai trò vừa là hoạt chất vừa là chất diện hoạt yếu của natri diclofenac, nó giúp phân tách các hạt nano nhũ tương nhờ lực đẩy ion vì thế các hạt tách rời hẳn nhau và có kích thước khá đồng đều.



Hình 5. Ảnh chụp TEM của nano nhũ tương chứa acid diclofenac.

Cấu trúc nano nhũ tương có chứa hoạt chất là acid diclofenac qua chụp TEM cho thấy có sự phân bố giọt không đồng đều nhau và kích thước hạt khá lớn nằm trong khoảng từ 100 – 1000 nm. Sự phân bố không đồng đều, số lượng các hạt tách rời nhau rất ít cho thấy tính thân dầu rất cao của hoạt chất, các chất diện hoạt với lực đẩy ion yếu không thể làm phân tách các giọt để tạo cấu trúc dạng hạt.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng khối lượng và các loại thành phần tham gia cấu trúc nano nhũ tương, loại nguyên liệu đầu vào của dược chất (muối natri hay dạng acid) đều ảnh hưởng tới tỉ lệ giải phóng của hoạt chất ra khỏi nhũ tương. Qua chụp TEM cho thấy nano nhũ tương chứa hoạt chất natri diclofenac cho kích thước hạt đồng đều nhau, nằm trong khoảng từ 20 – 250 nm phù hợp với khoảng kích thước giọt quy định của cấu trúc nano nhũ tương.

Tài liệu tham khảo

1. Chuasuwan B., Binjesoh, Polli J. E., Zhang H, Amidon G. L., Junginger H. E., Midha K. K., Shah V. P., Stavchansky S., Dressman J. B., Barends D. M. (2009), “Bioweiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Diclofenac sodium and diclofenac potassium”, *Journal of pharmaceutical sciences*, Vol 98, No 4, pp.1206 – 1219.
2. Chein Y. W., Cabana B. E., Mares S. E. (1982), “Ocular controlled release drug administration”, *Drugs and the pharmaceutical sciences*, Vol. 14, pp.13-55.

3. Hussein O. Ammar, Salama H. A., Ghorab M., Mahmoud A. A. (2009), "Nanoemulsion as a Potential Ophthalmic Delivery System for Dorzolamide hydrochloride", *AAPS PharmSciTech*, Vol 10, No3, pp. 808 – 819.
4. Hughes PM, Mitra AK (1993), "Overview of ocular drug delivery and iatrogenic ocular cytopathologies" , *Ophthalmic drug delivery systems*, p. 1-27.
5. Mims.com
6. Shah P, Bhalodia D, Shalat P (2010), "Nanoemulsion: A pharmaceutical review", *Sys Rev Pharm*, Vol 1, Issue 1, pp. 24-32.
7. Sieg JW, Robinson JR (1977), "Verhice effect on ocular drug bioavailability II: evaluation of pilocarpine", *J Pharm Sci*, 66; pp.1222 - 1228.
8. Sharma N, Bansal M, Visht S, Sharma PK, Kurkarni (2010), "Nanoemulsion: A new concept of delivery system", *Chronicles of Young Scientists*, pp. 2-6.

NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ VIÊN NÉN CAPTOPRIL GIẢI PHÓNG KÉO DÀI BẰNG PHƯƠNG PHÁP DẬP NHIỀU LỚP

Hoàng Ngọc Hà, Phạm Thị Minh Huệ

1. Đặt vấn đề

Captopril là một thuốc thuộc nhóm ức chế men chuyển được sử dụng tương đối phổ biến trong điều trị tăng huyết áp và suy tim sung huyết, có đặc điểm là dễ tan trong nước nhưng không bền trong môi trường kiềm [1].

Nghiên cứu bào chế viên captopril giải phóng kéo dài đã được thực hiện nhiều trong và ngoài nước như viên bao, cốt bán rắn, viên giải phóng theo nhịp, vi nang... [2].

Bào chế viên nhiều lớp thường được nghiên cứu với các mục đích kiểm soát giải phóng dược chất khác nhau như: viên 3 lớp giải phóng kéo dài theo động học bậc 0, hệ giải phóng nhanh/chậm, giải phóng theo mô hình sinh học... [3].

Đề tài nhằm mục tiêu nghiên cứu bào chế viên nén captopril 50 mg giải phóng kéo dài 12 giờ bằng phương pháp dập nhiều lớp.

2. Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, thiết bị

Nguyên liệu: Captopril (Trung Quốc), HPMC 4000 (JJ Degusca), gồm xanthan(XG) (Mỹ), ethyl cellulose (EC) (Trung Quốc), lactose (Trung Quốc), magnesi stearat (MgSt) (Trung Quốc). Các nguyên liệu đều đạt tiêu chuẩn USP/BP.

Thiết bị: Cân phân tích Satorius, cân kỹ thuật Satorius, máy đo pH, máy thử hòa tan tự động Vankel-Varian, máy dập viên tâm sai Korsch.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bào chế viên nén captopril

Viên captopril giải phóng kéo dài được bào chế với hàm lượng 50 mg.

Viên một lớp được bào chế bằng phương pháp dập thẳng.

Viên 3 lớp được dập thẳng với phương pháp như sau: Cho lần lượt lớp 1, 2 vào và nén nhẹ, cho lớp 3 vào và dập.

Sử dụng chày bằng, đường kính 8mm, độ cứng nằm trong khoảng 5-7 kP.

2.2.2. Thử độ hòa tan của viên captopril

Viên nén captopril được thử hòa tan với các điều kiện như sau: thiết bị cánh khuấy, tốc độ quay 50 vòng/phút, môi trường là 900 ml dung dịch HCl 0.01N, nhiệt độ

$37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 60 phút hút mẫu một lần, định lượng bằng phương pháp đo quang tại bước sóng 215nm.

2.2.3. Đánh giá động học giải phóng của viên captopril

Sử dụng phần mềm S-Plus 8.0, Excel 2007 để đánh giá động học giải phóng viên nén captopril theo các mô hình: động học bậc 0, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas. Sử dụng giá trị AIC (Akaike's Information Criterion) để đánh giá mức độ phù hợp với các mô hình động học.

Một số đặc điểm của các mô hình động học: [4]

Động học bậc 0: Tốc độ giải phóng dược chất không phụ thuộc nào nồng độ của nó.

$$Q_t = Q_o + K_o t$$

Động học Higuchi: Mô tả quá trình giải phóng dược chất bằng con đường khuếch tán.

$$Q_t = K_H t^{1/2}$$

Động học Hixson-Crowell: Mô tả giải phóng dược chất hòa tan khi có sự thay đổi diện tích bề mặt hay đường kính tiểu phân hay viên nén.

$$3\sqrt{Q_o} - 3\sqrt{Q_t} = K_{HC} \cdot t$$

Động học Korsmeyer-Peppas. Mô tả cơ chế giải phóng từ hệ cốt polymer khi cơ chế giải phóng chưa rõ ràng hay có nhiều cơ chế.

$$F = \left(\frac{M_t}{M} \right) = K_m t^n$$

Trong đó:

Q_t là tổng lượng dược chất giải phóng tại thời điểm t .

Q_o là lượng dược chất ban đầu.

t là thời gian.

K_o, K_H, K_{HC}, K_m lần lượt là hằng số động học bậc 0, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas.

Với động học Korsmeyer Peppas (Hệ hình trụ):

$n=0.45$: Giải phóng theo định luật Fick.

$0.45 < n < 0.89$: Vận chuyển bất thường hay không Fick.

$n \geq 0.89$: Vận chuyển theo trường hợp 2, mô hình động học bậc 0.

3. Kết quả và bàn luận

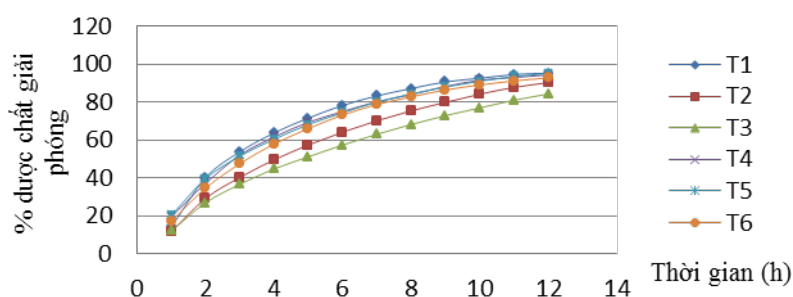
3.1. Ảnh hưởng của tá dược tạo cốt đến giải phóng dược chất từ viên một lớp

3.1.1. HPMC 4000 và XG

Để đánh giá ảnh hưởng của loại tá dược tạo cốt và lượng tá dược tạo cốt đến khả năng giải phóng dược chất, viên một lớp cốt HPMC 4000 hoặc XG được bào chế với thành phần như trong bảng 1.

Bảng 1: Công thức viên một lớp captopril cốt HPMC4000/XG

Mẫu	Captopril (mg)	HPMC4000 (mg)	XG (mg)	MgSt (mg)
T1	50	47		3
T2		95.5		4.5
T3		144		6
T4			47	3
T5			95.5	4.5
T6			144	6



Hình 1: % dược chất giải phóng từ các viên nén captopril có tỷ lệ HPMC 4000 và XG khác nhau

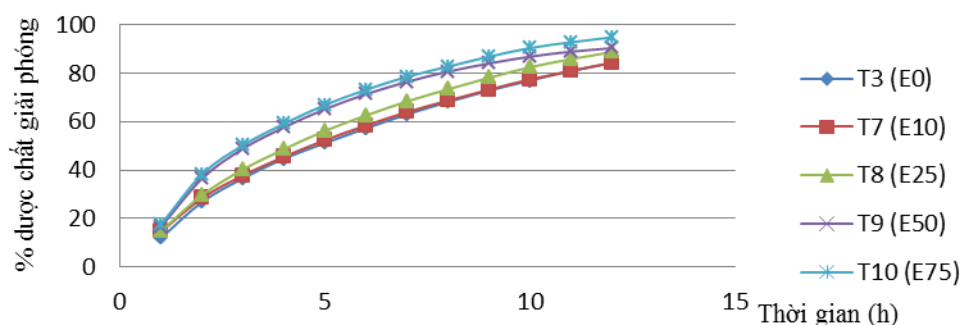
Ở tỷ lệ 1:1 thì không có sự khác biệt về giải phóng dược chất từ cốt HPMC 4000 với XG. Với tỷ lệ dược chất:tá dược 1:2, 1:3 thì HPMC 4000 kiểm soát giải phóng dược chất tốt hơn XG. Khi tăng dần tỷ lệ HPMC 4000 thì tốc độ và mức độ giải phóng dược chất đều giảm. Với XG thì lại không có sự thay đổi đáng kể về giải phóng dược chất khi dùng với các tỷ lệ khác nhau (hình 1).

3.1.2. Phối hợp EC với HPMC

Các công thức viên một lớp trên tuy đã sử dụng tỷ lệ HPMC 4000/XG khá cao nhưng giai đoạn đầu dược chất giải phóng nhanh nên tiến hành bào chế viên một lớp phối hợp HPMC 4000 với EC (bảng 2).

Bảng 2: Viên 1 lớp captopril cốt HPMC 4000 phối hợp EC

	Captopril (mg)	HPMC (mg)	EC (mg)	MgSt (mg)
T7 (E10)	50	129.9	14.4	6
T8 (E25)		108	36	
T9 (E50)		72	72	
T10 (E75)		36	108	


Hình 2: % dược chất giải phóng từ viên một lớp captopril cốt HPMC 4000 phối hợp EC

Khi thay HPMC bằng những lượng EC tăng dần thì tốc độ và mức độ giải phóng dược chất đều tăng. Nguyên nhân là do EC là một polymer sơ nước, không có khả năng hút nước, captopril rất dễ tan trong nước nên EC mài mòn nhanh khiến dược chất giải phóng nhanh (hình 2).

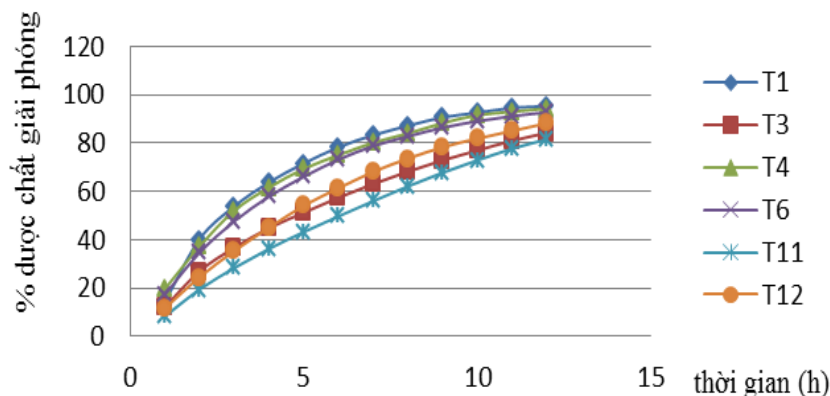
3.2. Nghiên cứu bào chế viên captopril giải phóng kéo dài bằng cách dập nhiều lớp

Do khả năng kiểm soát giải phóng dược chất của các công thức viên một lớp còn thấp mặc dù đã dùng tỷ lệ polymer khá cao nên tiến hành bào chế viên captopril giải phóng kéo dài bằng phương pháp dập nhiều lớp với công thức như trong bảng 3.

Bảng 3: Công thức viên ba lớp captopril cốt HPMC 4000/XG

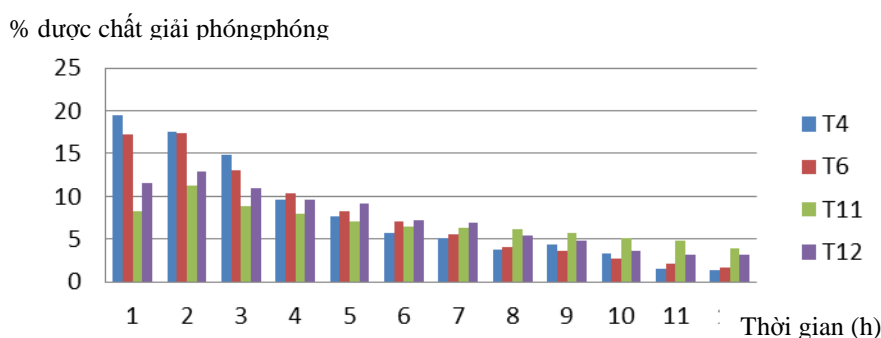
	Lớp	Captopril (mg)	HPMC (mg)	XG (mg)	MgSt
T11	1		48.5		1.5
	2	50	47		3
	3		48.5		1.5
T12	1			48.5	1.5
	2	50		47	3
	3			48.5	1.5

Trong trường hợp viên 3 lớp, do bề mặt trên và dưới của lớp giữa bị che bởi lớp polymer nên giai đoạn đầu được chất chủ yếu giải phóng từ cạnh bên của viên. Giai đoạn sau, khi lớp 1, 3 bị hydrat hóa và trương nở cho phép được chất giải phóng nhanh hơn (hình 3).



Hình 3: % được chất giải phóng từ viên nhiều lớp captopril cốt HPMC 4000/XG, so sánh với viên một lớp

Do XG có độ thân nước, mức độ và tốc độ hydrat hóa mạnh hơn HPMC 4000 [5] nên công thức T12 giải phóng được chất nhanh hơn công thức T11 (dù T1 và T4 giải phóng gần như nhau). Tuy nhiên lượng được chất giải phóng sau 12h giảm đáng kể so với viên 1 lớp cùng thành phần (tương ứng với mẫu T3 và T6). Nguyên nhân chính là do được chất tập trung ở lớp giữa nên quãng đường khuếch tán lớn hơn so với trường hợp viên 1 lớp.



Hình 4: % được chất giải phóng giữa các thời điểm từ viên nhiều lớp captopril cốt HPMC 4000/XG, so sánh với viên một lớp cùng thành phần

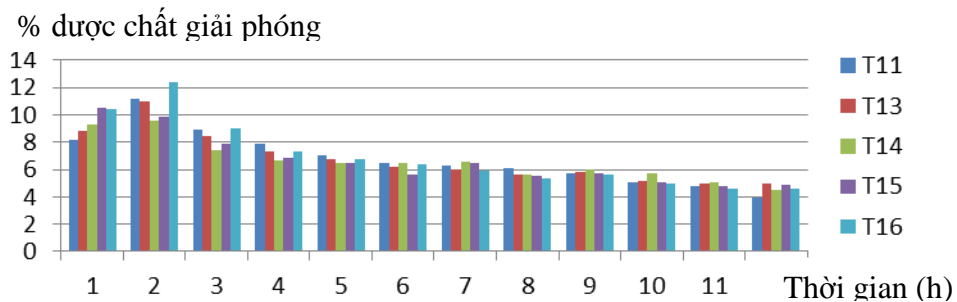
Bên cạnh đó, khi so sánh với viên 1 lớp cùng thành phần thì lượng được chất giải phóng giữa các thời điểm của viên 3 lớp đồng đều hơn (hình 4).

3.2.1. Ảnh hưởng của thành phần lớp giữa đến giải phóng dược chất

Để đánh giá ảnh hưởng của thành phần lớp giữa đến giải phóng dược chất, viên ba lớp có lớp 1, 3 giống công thức T11 được bào chế với thành phần lớp giữa như bảng 4.

Bảng 4: Thành phần lớp giữa viên ba lớp captopril với lớp ngoài giống nhau

	Captopril (mg)	HPMC (mg)	XG (mg)	EC	MgSt
T13	50	35.25	11.75		3
T14		23.5	23.5		
T15		11.75	35.25		
T16		0	47		
T17		35.25		11.75	
T18		23.5		23.5	
T19			35.25	11.75	

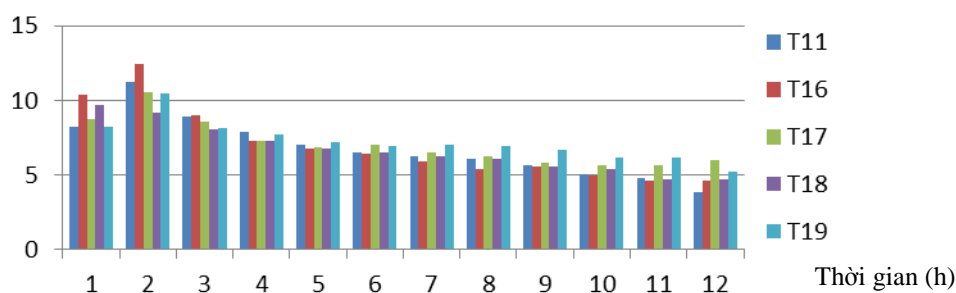


Hình 5: % dược chất giải phóng giữa các thời điểm từ viên ba lớp khi thay những tỷ lệ nhất định HPMC 4000 lớp giữa bằng XG.

Khi sử dụng lớp giữa với tỷ lệ khác nhau của HPMC và XG thì đặc điểm giải phóng dược chất của các viên không khác nhau nhiều, chủ yếu chỉ khác nhau ở 2 giờ đầu (do XG và HPMC 4000 trương nở khác nhau) (hình 5).

Khi thay những tỷ lệ khác nhau của tá dược tạo cốt lớp giữa bằng EC, kết quả hòa tan của các mẫu T17, T18, T19 như sau:

% dược chất giải phóng



Hình 6: % dược chất giải phóng giữa các thời điểm từ viên ba lớp khi có EC ở lớp giữa

Khi thay thế 25% cốt lớp giữa bằng EC (T17, T19) khả năng kiểm soát giải phóng dược chất là tốt nhất. Với trường hợp thay 50% cốt lớp giữa bằng EC (T18) thì kết quả cũng tự, tuy nhiên tổng lượng dược chất giải phóng đến thời điểm chỉ đạt khoảng 80%. Do EC là một polymer không tan trong nước, ở mặt bên của lớp giữa dược chất hòa tan nên EC bị mài mòn nhanh. Nhưng với hai mặt bị che bởi lớp 1 và 3 thì EC lại làm chậm quá trình thấm của môi trường vào lớp giữa, giảm tốc độ khuếch tán dược chất và do đó làm đồng đều giải phóng ở giai đoạn sau.

Như vậy vai trò của EC khi chiếm khoảng 25% tá dược lớp giữa không những có thể kiểm soát, làm đồng đều lượng dược chất giải phóng giữa các thời điểm mà còn làm tăng lượng dược chất giải phóng sau 12h (các công thức viên 3 lớp mà lớp 1,3 chỉ có HPMC và MgSt, không có EC lớp giữa sau 12h chỉ giải phóng được khoảng 80% còn công thức T17 85% đạt T19 đạt 86.65%).

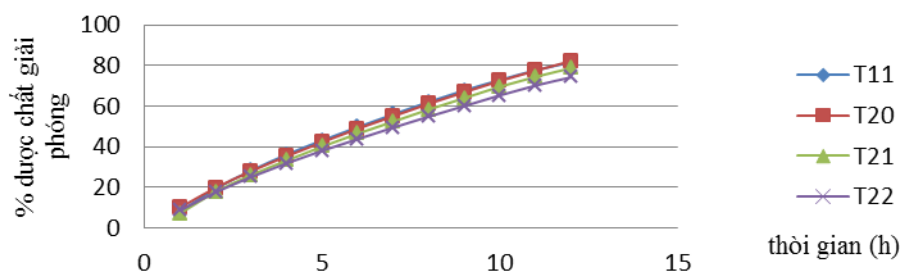
3.2.2. Ảnh hưởng của thành phần lớp ngoài đến giải phóng dược chất

a. Ảnh hưởng của EC

Bào chế viên 3 lớp có thành phần lớp trong giống như công thức T12, lớp ngoài thay những tỷ lệ nhất định HPMC 4000 bằng EC.

Bảng 5: Thành phần lớp ngoài phối hợp HPMC với EC

	HPMC (mg)	EC (mg)	MgSt (mg)
T20	43.65	4.85	1.5
T21	36.375	12.125	
T22	24.25	24.25	



Hình 8: % được chất giải phóng từ viên ba lớp captopril khi phối hợp HPMC với EC ở lớp ngoài

Trong khoảng 4h đầu, lượng dược chất giải phóng từ các mẫu không khác nhau nhiều. Tuy nhiên trong các giờ sau có sự khác biệt giữa các công thức.

Do lớp ngoài chỉ có EC, HPMC 4000, MgSt mà không có chất dễ tan trong nước (lactose, captopril) nên EC rất khó bị ăn mòn dẫn đến hệ quả là khả năng kìm hãm giải phóng dược chất tốt nhưng lại khiến cho lượng dược chất giải phóng sau 12h thấp (Trường hợp công thức T22 do lượng EC không nhiều nên đồ thị giải phóng không khác nhiều so với T12) (hình 8).

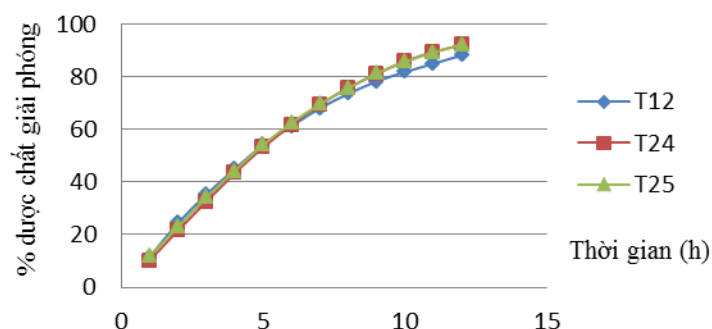
b. Ảnh hưởng của lactose

Bào chế các viên 3 lớp có thành phần lớp trong giống công thức T12 (50mg captopril, 47mg XG và 3% MgSt) và lớp ngoài như sau:

Bảng 6: Thành phần lớp ngoài khi phối hợp XG và lactose

	XG (mg)	Lactose (mg)	MgSt (mg)
T24	46.075	2.425	1.5
T25	43.65	4.85	

Kết quả hòa tan cho thấy bắt đầu khoảng từ giờ thứ 3-4 trở đi tỷ lệ dược chất giải phóng giữa các thời điểm cao hơn so với T12. Điều này có thể giải thích do lactose tan nhanh làm tăng các kênh dẫn nước trong các lớp 1 và 3 nên làm tăng giải phóng dược chất. Không những vậy tổng lượng dược chất giải phóng sau 12h cũng tăng đáng kể so với công thức T13 (hình 9).



Hình 9: % dược chất giải phóng từ viên ba lớp phối hợp XG lớp ngoài bằng những tỷ lệ lactose khác nhau

3.3. Đánh giá động học giải phóng dược chất

Với hầu hết các công thức quy luật giải phóng đều phù hợp với mô hình Korsmayer-Peppas với giá trị n nằm trong khoảng 0.45-0.89. Duy nhất chỉ có trường hợp viên 1 lớp cốt XG phù hợp với động học Higuchi (bảng 7).

Bảng 7: Tóm tắt phân tích động học các công thức

Mẫu	Zero		Hixson_Crowell	Korsmayer-Peppas		Higuchi
	R^2	AIC	AIC	n	AIC	AIC
T3	0.959	38.470	101.085	0.6341	24.082	38.2987
T6	0.898	66.405	105.443	0.53	67.858	38.907
T11	0.984	66.304	98.954	0.78	15.826	49.697
T12	0.952	46.678	102.404	0.672	33.377	45.96
T17	0.992	43.483	99.000	0.818	1.489	51.793
T19	0.995	42.560	99.360	0.8595	-0.343	54.606

4. Kết luận

Nghiên cứu cho thấy bào chế viên 3 lớp với thành phần EC khoảng 25% cốt lớp giữa có thể kiểm soát giải phóng dược chất dễ tan trong nước tương đối hằng định. Thành phần lớp ngoài thay đổi ảnh hưởng nhiều đến giải phóng dược chất, đặc biệt là ở giai đoạn sau.

Tài liệu tham khảo:

1. *Martindale 35 S.o.t.R.P.S.o.G. Britain, Editor. 2007, Pharmaceutical Press.*
2. Abubakr O. Nur, J.S.Z., *Recent progress in sustained/controlled oral delivery of captopril: an overview.* International journal of Pharmaceutics, 1999. 194: p. 139-146.

3. Shajahan Abdul, S.S.P., *A flexible technology for modified release of drugs: multi layered tablets*. Journal of Controlled Release, 2004. 97: p. 393-405.
4. Paulo Costa, J.M.S.L., *Review: Modeling and comparison of dissolution profiles*. European journal of pharmaceutical sciences, 2011. 13: p. 123-133.
5. Mohammad Mahiuddin Talukdar Corresponding Author Contact Information, A.M., Patrick Rombaut and Renaat Kinget, *Comparative study on xanthan gum and hydroxypropylmethyl cellulose as matrices for controlled-release drug delivery I. Compaction and in vitro drug release behaviour* International journal of Pharmaceutics, 1995. 129: p. 233-241.

MÔ HÌNH THỬ GIẢI PHÓNG *IN VITRO* CỦA DẠNG THUỐC TỚI ĐÍCH GIẢI PHÓNG TẠI ĐẠI TRÀNG

Nguyễn Thu Quỳnh

Test thử hòa tan là phương pháp được sử dụng nhiều nhất để đánh giá khả năng giải phóng của các dạng thuốc uống bao gồm cả dạng thuốc tới đích giải phóng tại đại tràng. Một bước phát triển hợp lý là sử dụng phương pháp thử hòa tan để đánh giá động học giải phóng, các tác động của thành phần công thức, qui trình sản xuất, pH và các đặc điểm của đường tiêu hóa đến đặc tính giải phóng của thuốc để làm sáng tỏ cơ chế giải phóng thuốc, đảm bảo sự sản xuất nhất quán giữa các lô mẻ, có thể thay thế thử *in vivo*. Điều này đòi hỏi phương pháp phải có sự khác biệt, độ lặp lại, độ chính xác và quan trọng hơn là phải tương tự môi trường đường tiêu hóa. Hiện nay, các test thử hòa tan thường áp dụng theo USP để đánh giá khả năng giải phóng của các dạng thuốc cải tiến dùng theo đường uống, tuy nhiên nhược điểm của phương pháp là chưa đánh giá chính xác một số dạng thuốc đường uống mới, nên việc thêm một số cải tiến vào test thử hòa tan USP là cần thiết.

Dạng thuốc giải phóng tại đích đại tràng nhằm nâng cao hiệu quả điều trị và giảm tác dụng phụ của thuốc nhờ làm tăng nồng độ thuốc tại vị trí đích. Bởi vậy dạng thuốc giải phóng tại đích đại tràng lý tưởng là bảo vệ dược chất không giải phóng tại dạ dày, ruột non, đảm bảo dược chất giải phóng hoàn toàn tại đại tràng. Điều này đòi hỏi phải thiết lập được cơ chế giải phóng thích hợp với các điều kiện cụ thể của môi trường đại tràng. Thông thường để đạt đến đích đại tràng thường áp dụng biện pháp nhằm giải phóng thuốc đúng vào thời điểm thuốc đến đại tràng, dùng polyme nhạy cảm pH, tiền thuốc hoặc các polyme bị phân hủy bởi vi sinh vật đại tràng, trong đó biện pháp giải phóng nhờ vi sinh vật là ưu việt hơn các phương pháp khác. Các polymer được sử dụng pectin, gôm xanthan, dextran, amylose, galactomanan. Bởi vì sự có mặt của vi sinh vật đại tràng là cơ chế chính cho sự giải phóng thuốc nên test hòa tan cần phải được thực hiện phù hợp điều kiện sinh thái đa dạng của đại tràng [8].

Một số đặc điểm đại tràng liên quan dạng thuốc:

Vi sinh vật đại tràng: Đại tràng người có khoảng 400 loài vi khuẩn với số lượng 10^{11} – 10^{12} CFU/ml. Một số chủng chủ yếu Bacteroides, Bifidobacterium, Eubacterium, Lactobacilus, ... Các chủng vi khuẩn này sản xuất enzyme thủy phân và enzyme khử hóa như glucosidase, gluconidase, β -D fucosidase, β -D galactosidase, nitroreductase, azoreductase, N- oxidase, sulfoxidase,... Các chủng vi khuẩn chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như chế độ ăn, bệnh tật, tuổi, thuốc.

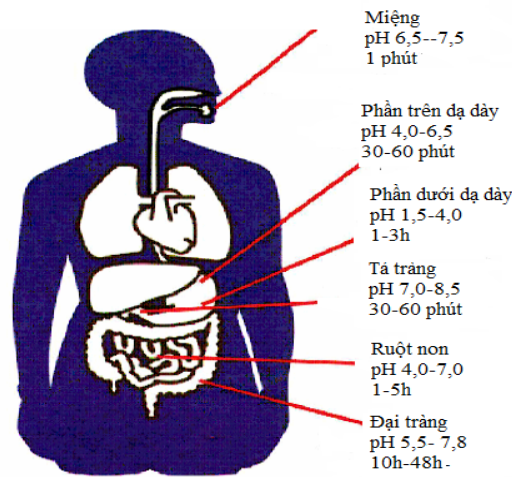
Vận động tại đại tràng: Sự vận động tại đại tràng có nhiều đặc điểm khác biệt so với dạ dày và ruột non do sự khác biệt của từng vùng và chức năng khác nhau.

Nước và điện giải: Đại tràng có khả năng hấp thu lớn: với 2 lít nước vào đại tràng thì có < 200 ml nước trong phân. Lưu lượng nhũ trấp từ ruột non xuống ruột già ở người khỏe mạnh khoảng 1–2 lít/giờ. Sự hấp thu nước và Na⁺ không đáng kể ở manh tràng. Sự hấp thu xảy ra ở nửa đầu đại tràng [1].

pH: Ở người, giá trị pH đại tràng khoảng 5,5–7,8. Trong đó pH ở đại tràng lên là 6,4±0,6; ở đại tràng ngang là 6,6±0,8 và ở đại tràng xuống là 7,0±0,7. Có nhiều yếu tố làm thay đổi pH các phần đại tràng như bệnh tật, chế độ ăn, thuốc [1].

1. Mô hình thử giải phóng invitro dựa trên cơ sở Tlag- pH

ĐẶC ĐIỂM THANG ĐƯỜNG TIÊU HÓA



Hình 1: Đặc điểm pH và thời gian lưu tại các phần khác nhau của đường tiêu hóa

Mô hình thường áp dụng test thử hòa tan USP, chuyên luận viên bao tan trong ruột có một số cải tiến. Ba môi trường thường được sử dụng: môi trường dạ dày, ruột non, đại tràng tương ứng pH dạ dày 1,2; 7,5 và 6,8. Thời gian của mỗi giai đoạn tương tự thời gian lưu giữ thuốc trong đường tiêu hóa: dạ dày 2h, ruột non 3h.

Ưu nhược điểm:

- Phương pháp đơn giản, dễ thực hiện.
- Phương pháp chỉ dựa vào thang pH và thời gian nên tương đối ổn định.
- Phương pháp không đặc hiệu với các thuốc giải phóng tại đại tràng sử dụng polyme bị phân hủy bởi vi sinh vật đại tràng hay các enzym tiêu hóa.

Để so sánh khả năng kiểm soát giải phóng của các polymer bao viên nén indomethacin, Vivek Ranjan Sinha và cộng sự đã tiến hành thử hòa tan theo USP 24 với các thông số:

- Môi trường: 750ml dung dịch HCl pH 1,2 trong 2h và 900ml dung dịch đệm phosphate pH 6,8 trong 22h tiếp theo.

- Nhiệt độ: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- Tốc độ khuấy: 75 vòng/phút [15].

S. K. Bajpai và cộng sự cũng đã tiến hành đánh giá khả năng giải phóng riboflavin từ gel bào chế được theo USP với các thông số như sau:

- Môi trường: 25ml đệm citrate pH 2,0 và 4,0; đệm phosphate pH 7,4
- Nhiệt độ: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- Tốc độ khuấy: 50 vòng/phút [4].

Jinhe và cộng sự tiến hành đánh giá khả năng giải phóng của viên nén đa thành phần chứa paracetamol theo USP sử dụng máy II và III [5].

Thông số	USP máy II	USP máy III
Môi trường	pH 1,2 trong 2h; pH 6,8 trong 4h; pH 5,0 trong 4h	pH 1,2 trong 2h; pH 6,8 trong 4h; pH 5,0 trong 4h
Nhiệt độ	$37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	$37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
Thể tích môi trường	900ml	250ml
Tốc độ khuấy	100 vòng/phút	50 vòng/phút

Anil Kumar trong nghiên cứu bào chế vi cầu trimetazidine giải phóng tại đại tràng với tá dược natri alginate đã sử dụng phương pháp thử giải phóng theo USP 23 với các thông số:

- Môi trường: 900 ml đệm pH 1,2 trong 2h; pH 7,4 trong 3h tiếp theo; cuối cùng đệm pH 6,8 trong 19h còn lại.
- Nhiệt độ: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- Thể tích mẫu: 5ml.
- Tốc độ khuấy: 50 vòng/phút [3].

I. Tomuta và cộng sự đã nghiên cứu đánh giá invitro và invivo của viên bao indomethacin giải phóng tại đại tràng với tá dược Eudragit đã sử dụng dược điển châu Âu để thử giải phóng invitro với các thông số:

- Môi trường: 900 ml đệm pH 1,2 trong 2h; đệm pH 6,8 trong 22h còn lại.
- Nhiệt độ: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- Thể tích mẫu: 5ml.
- Tốc độ khuấy: 50 vòng/phút [13].

2. Mô hình thử giải phóng invitro sử dụng T_{lag} - pH- vi sinh vật đại tràng.

Mô hình cũng dựa trên mô hình thử hòa tan theo USP chuyên luận viên bao tan trong ruột (pH, nhiệt độ, tốc độ khuấy, thời gian lấy mẫu) có thêm một số cải tiến về môi trường mô phỏng đại tràng là pH và vi sinh vật đại tràng.

Môi trường tương tự đại tràng thường sử dụng dịch đại tràng chứa vi sinh vật đại tràng chuột, lợn, người.

Ưu nhược điểm:

- Mô hình gần giống môi trường *in vivo* hơn so với mô hình T_{lag} -pH.
- Mô hình có tính đặc hiệu với dạng thuốc giải phóng tại đại tràng sử dụng tá dược bị phân hủy bởi vi sinh vật đại tràng.
- Phương pháp thực hiện phức tạp, tốn kinh phí.
- Sử dụng dịch đại tràng người thì liên quan đến y đức và khó chọn được người tình nguyện phù hợp yêu cầu.
- Thao tác cần chuẩn hóa, môi trường phải kỵ khí.

Yassin và các cộng sự đã sử dụng phương pháp thử giải phóng *in vitro* viên nén 5-fluorocil với tá dược chitosan dựa trên cơ sở USP, chuyên luận viên bao tan trong ruột có thêm môi trường mô phỏng đại tràng có điều kiện cụ thể như sau:

- Môi trường: 750ml HCl pH 1,2 trong 2h và đệm phosphat pH 7,2 trong 4h tiếp theo.
- Nhiệt độ: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- Tốc độ khuấy: 50 vòng/phút
- Thể tích mẫu: 5ml.

Môi trường đại tràng chuột: Chuột có trọng lượng 200-300g. Chuột bị giết bằng ether, mổ bụng chuột, bộc lộ đại tràng, thắt đại tràng thành các túi, cắt, chuyển túi vào môi trường đệm phosphate pH 7,0 trong môi trường khí NO_2 , pha loãng đến nồng độ 3%.

- Thể tích môi trường: 100ml.
- Tốc độ khuấy 80 vòng/phút.
- Thể tích mẫu 1ml.
- Định lượng các mẫu bằng HPLC [2].

Jenita và các cộng sự đã nghiên cứu bào chế viên nén bao mesalamin với tá dược locust bean gom đã sử dụng phương pháp thử *in vitro* với các thông số như sau:

- Môi trường: 900ml HCl 0,1N trong 2h; 900ml pH 7,4 trong 3h; 100ml pH 6,8 (4% dịch đại tràng chuột) trong 21h.

- Nhiệt độ 37⁰C

- Tốc độ khuấy 100 vòng/phút.

- Thể tích mẫu 1ml.

- Thời gian lấy mẫu: 2, 5, 6, 8, 12, 19, 21h [6].

Siew và các cộng sự trong nghiên cứu ảnh hưởng màng film amylose-ethylcellulose đến sự giải phóng dược chất 5-ASA từ pellet ở đại tràng đã sử dụng phương pháp thử giải phóng *in vitro* theo USP có thêm dịch đại tràng người:

- Môi trường: HCl pH 1,2 trong 3h; đệm phosphat pH 7,2 trong 3h tiếp theo.

- Nhiệt độ: 37⁰C ± 0,5⁰C

- Tốc độ khuấy: 100 vòng/phút.

- Môi trường đại tràng: 100ml mt dịch đại tràng người 10% trong đệm pH 7,2; sục khí CO₂ [12].

3. Mô hình thử giải phóng *in vitro* sử dụng T_{lag}- pH- enzym đại tràng.

Đây là mô hình cũng dựa trên cơ sở mô hình thử hòa tan của viên bao tan trong ruột theo USP (pH, nhiệt độ, tốc độ khuấy, thời gian lấy mẫu) và có thêm môi trường mô phỏng đại tràng là pH và enzym đại tràng.

Các enzym thường là galactomanase, chitosanase, pectinase.

Ưu nhược điểm:

- Mô hình đánh giá khả năng giải phóng *in vitro* gần với giải phóng *in vivo*.

- Mô hình có tính đặc hiệu hơn so với các mô hình trên.

- Phương pháp thực hiện phức tạp, tốn kinh phí.

- Thao tác thực hiện phải chuẩn hóa, môi trường phải kỵ khí.

- Động vật thí nghiệm phải được cho dùng cơ chất theo đúng qui chuẩn.

Y. S. R. Krishnaiah và cộng sự trong nghiên cứu bào chế viên nén metronidazol giải phóng tại đại tràng với tá dược gồm guar đã sử dụng phương pháp đánh giá giải phóng *in vitro* theo USP có sử dụng thêm enzyme đại tràng chuột:

- Môi trường: 900ml HCl 0,1M trong 2h; 900ml đệm phosphat pH 7,4 trong 3h; 100ml enzym đại tràng chuột.

- Nhiệt độ: 37⁰C ± 0,5⁰C

-Tốc độ khuấy: 100 vòng/phút.

Chuột có trọng lượng 105-115g, được cho ăn theo chế độ bình thường. Chuột được cho ăn 1ml hỗn dịch gồm guar 2% trong 7 ngày trước thử nghiệm, giết chuột bằng gây mê, mô bụng chuột, bóc lộ đại tràng, thắt thành túi, ngâm đệm phosphate pH 6,8 môi trường CO₂, cân trọng lượng từng túi, pha loãng vào đệm phosphate pH 6,8 được hỗn dịch 4% [7].

Patel và cộng sự khi tiến hành nghiên cứu bào chế viên nén mesalamin với tá dược pectin đã sử dụng phương pháp thử giải phóng *in vitro* theo USP có sử dụng enzyme đại tràng với các thông số cụ thể:

- Môi trường: 900ml HCl pH 1,2 trong 2h; 900ml đệm pH 7,4 trong 3h; 100ml mt enzym đại tràng chuột 19h còn lại.

- Nhiệt độ 37⁰C.

- Tốc độ khuấy 100 vòng/phút [11].

Min han và cộng sự trong nghiên cứu viên nang theophyllin giải phóng tại đại tràng đã sử dụng phương pháp thử giải phóng theo USP với các thông số:

- Môi trường: 900ml HCl pH 1,2 trong 2h; 900ml đệm phosphat pH 6,8 trong 1h; 900ml đệm phosphat pH 7,4 trong 2h; 900ml đệm phosphat pH 6,8 chứa galactomanase (từ nấm *aspergillus niger*) 40UI/l 13h còn lại.

- t⁰= 37⁰C.

- Tốc độ khuấy 100 vòng/phút.

- Thể tích mẫu 5ml [9].

Vikas Kumar khi nghiên cứu bào chế viên nén fluticasone với tá dược chitosan tiến hành thử giải phóng *in vitro* theo USP với các thông số như sau:

- Môi trường: dung dịch HCl pH 1,2 trong 2h; đệm phosphat pH 7,4 trong 3h; đệm phosphat pH 6,8 chứa 0,05 UI chitosanase 19h còn lại.

- t⁰= 37⁰C,

- Tốc độ khuấy 50 vòng/phút.

- Thể tích mẫu 5ml [14].

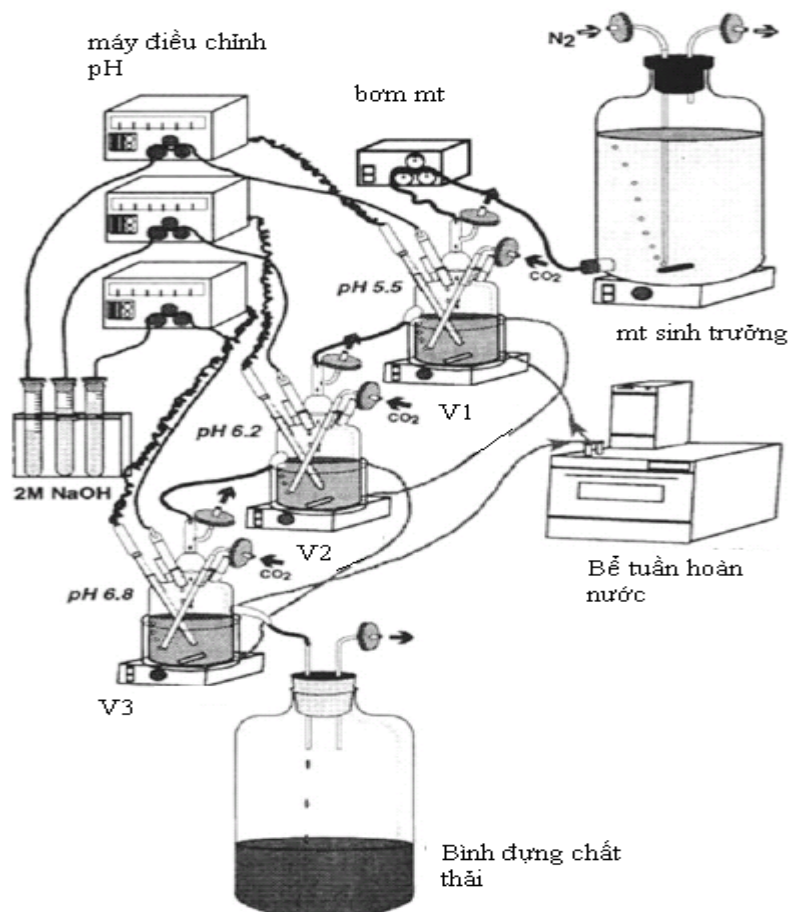
Murat Turkoglu và cộng sự trong nghiên cứu bào chế viên nén 5-ASA với tá dược pectin- HPMC đã sử dụng phương pháp thử giải phóng *in vitro* theo USP có một số cải tiến như sau:

- Môi trường: 500ml dung dịch HCl 0,1N trong 2h, 500ml đệm phosphat pH 6,8 trong 6h, sau 6h thêm 3ml dung dịch Pectinex (3000 FDU/ml) vào môi trường thử.

- $t^0 = 37^0\text{C}$.

- Tốc độ khuấy 50 vòng/phút [10].

1.4. Mô hình dựa trên cơ sở pH và enzym



Hình 2: Mô hình nuôi cấy vi sinh vật

Môi trường: $V_1 = 200\text{ml}$ có pH 5,5; $V_2 = 200\text{ml}$ có pH 6,2; $V_3 = 280\text{ml}$ có pH 6,8. Khuấy và giữ $t^0 = 37^0\text{C}$ và sục khí CO_2 . Mỗi môi trường được tiêm 100ml dung dịch 20% dịch phân của người hiến tặng. Để tạo đa dạng loài vi sinh vật, bình tăng trưởng chứa các loại pectin, gồm guar, xylan, inulin trong môi trường khí NO_2 , sau đó bơm vào bình V_1 và áp dụng tuần tự cho V_2 và V_3 . Sau đó bình nuôi cấy đc tháo bỏ và đánh gia hoạt lực enzym, thành phần vi khuẩn dựa trên cơ sở hóa học và đo lường vi sinh vật từ người chết đột ngột.

Số lượng và loài vi sinh vật được xác định bằng phương pháp FISH (fluorescent *in situ* hybridization) [8].

1.5. Phương pháp thử giải phóng *in vitro* dạng thuốc tới đích giải phóng tại đại tràng có sử dụng polyme bị phân hủy bởi vsv đại tràng.

Sử dụng thiết bị giỏ quay.

Môi trường: gồm 3 môi trường:

- 900ml dung dịch HCl 0,1N (pH 1,2) trong 2h.
- 900ml đệm phosphat pH 7,4 trong 3h tiếp theo.
- 900ml đệm phosphat pH 6,8 có enzym pectinase trong 19h tiếp theo.

Nhiệt độ: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

Tốc độ khuấy: 100 vòng/phút

Thời điểm lấy mẫu: 2h, 5h, 6h, 8h, 12h, 16h, 24h.

Thể tích mẫu: 5ml

Môi trường chứa enzym đại tràng:

- Chọn chuột lang (200-300g). Cho chuột ăn chế độ bình thường.
- Mỗi ngày cho chuột dùng 1ml dung dịch 2% pectin trong 7 ngày liên tục.
- Giết chuột bằng ether, mổ bụng chuột, bóc lộ đt chuột, thắt đại tràng chuột thành các túi.
- Nhúng túi vào mt đệm phosphat pH 6,8 đồng thời sục khí CO_2 . Mở túi, cân, pha loãng vào đệm phosphat pH 6,8 cho dc nồng độ cuối cùng 4%.
- Xác định nồng độ enzym pectinase:

Phương pháp đo độ nhớt với nhớt kế Borosil: Hút 2ml dung dịch enzyme thô 5% (w/v) phản ứng với 18ml Dung dịch pectin 1% ở pH 4,5 và nhiệt độ 40°C . Một đơn vị hoạt độ pectinase (UI) là lượng enzyme cần thiết làm giảm 10% độ nhớt của hỗn hợp chứa 180mg pectin dưới những điều kiện như trên.

Phương pháp đo quang: pectinase thủy phân pectin giải phóng acid galacturonic, định lượng acid này bằng quang phổ tử ngoại $\lambda = 235\text{nm}$. Một đơn vị enzym hoạt động làm tăng 0,01 độ hấp thụ/1 phút ở điều kiện pectin 0,5%; $t^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$, pH= 5,8.

$$\text{Pectinase Activity, U / mg} = \frac{\Delta A_{235} / \Delta t}{0.01 \times C \times V}$$

- Từ đó tính toán lượng enzym phù hợp cho vào môi trường thử giải phóng invitro.

Tài liệu tham khảo**Tiếng Việt**

1. Bộ môn Sinh lý học (2006), *Sinh lý học*, NXB y học, tập 1, tr. 353- 356.

Tiếng Anh

2. Alla Eldem Bakry Yassin et al. (2010), “New targeted-colon delivery system: in vitro and in vivo evaluation using X-ray imaging”, *Journal of Drug Targeting*, 18(1): 59–66
3. Anil Kumar et al. (2010), “Development of chronopharmaceutical drug delivery system of trimetazidine hydrochlorid for angina pectoris”, *Int.J.Drug Dev. & Res.*, 2(2), 371-378.
4. Bajpai.S.K et al. (2003), “Dynamic release of riboflavin from a colon targeted delivery device: an invitro study”, *Reactive & Functional Polymers*, 55, 197–210.
5. Jinhe Li et al. (2002), “In Vitro Evaluation of Dissolution Behavior for a Colon-Specific Drug Delivery System (CODES™) in Multi-pH Media Using United States Pharmacopeia Apparatus II and III”, *AAPS PharmSciTech*, 3(4) article 33.
6. Josephine Leno Jenita. J et al. (2010), “Formulation and evaluation of compression coated tablets of mesalamine for colon”, *International Journal of PharmTechResearch*, Vol. 2, No. 1, pp 535-541.
7. Krishnaiah.Y.S.R et al. (2002), “Studies on the development of oral colon targeted drug delivery systems for metronidazole in the treatment of amoebiasis”, *International Journal of Pharmaceutics* 236, 43–55.
8. Libo yang (2007), “Biorelevant dissolution testing of colon specific delivery systems activated by colonic microflora”, *Journal of Controlled Release*, 125, 77–86
9. Min Han et al. (2008), “In Vitro and In Vivo Evaluation of a Novel Capsule for Colon-Specific Drug Delivery”, *Journal of pharmaceutical sciences* 1002, 1-10.
10. Murat Turkoglu et al. (2002), “Invitro evaluation of pectin–HPMC compression coated 5-aminosalicylic acid tablets for colonic delivery”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 53, 65–73.
11. Patel Jayvadan et al. (2009), “Formulation and in-Vitro evaluation of mesalamine matrix tablets using chitosan for colonic drug delivery”, *Journal of Pharmacy Research*, 2(8), 1319-1323.

12. Siew.L.F et al. (2000), “The potential of organic based amylase- ethylcellulose film coatings as oral colon specific drug delivery systems”, *AAPS PharmSciTech* 1, article 22.
13. Tomuta. I et al. (2010), “Invitro- invivo evaluation of novel drug delivery system for colonic”, *Farmacia*, Vol. 58, 3.
14. Vikas Kumar et al. (2010), “Investigations on chitosan-carboxymethyl guar gum complexes interpolymer complexes for colon delivery of fluticasone”, *International Journal of Drug Delivery* 2, 242-250.
15. Vivek Ranjan Sinha et al. (2003), “Coating polymers for colon specific drug delivery: Acomparative invitro evaluation”, *Acta Pharm*, volume 53, 41–47.

PREPARATION AND INVESTIGATION OF SELECTIVE ACCUMULATION AND PDT EFFECTIVENESS OF LIPOSOMES LOADED WITH PHOTODITAZIN

Tran Thi Hai Yen

1. INTRODUCTION

Second-generation Russian photosensitizer Photoditazin based on an aqueous solution of di-N-methylglucamine salt of chlorin e6 actively studied recently for photodynamic therapy of (PDT) surface and intracavitary neoplasms. Photoditazin rapidly accumulates in the tumor (maximum accumulation occurs within 2-3 h [1]) and rapidly excreted (98% of the drug is excreted in two days [1]).

The purpose of this study was to obtain a new liposomal form Photoditazin, which would provide:

- Increase the selectivity of drug accumulation in tumor tissue compared with normal tissue;
- Increase the effectiveness of PDT using Photoditazin;

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Preparation of liposomes loaded with Photoditazin

Liposomes loaded with Photoditazin were prepared by Bangham method [2] using egg phosphatidylcholine (Lipoid) : cholesterol: distearoylphosphatidylethanolamine-polyethylene glycol 2000 (DSPE-PEG 2000 ammonium salt) (Avanti Polar Lipids) in molar ratio of 30:10:1. Tocopherol acetate (2 mol%) was added to protect the lipids against degradative processes.

The lipid film hydrated with Photoditazin solution at 37 ° C and constant stirring. The extrusion was performed through 200 nm polycarbonate membranes (Whatman) using Avanti Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., USA). Citrate buffer pH 5 were used to raise encapsulation of photoditazin in liposomes.

Vesicle size was measured by dynamic laser light-scattering measurements using Submicron Particle Sizer Nicomp-380. Liposomes were separated from untrapped photoditazin by gel filtration on column C 10/20 (Amersham Biosciences) with Sephadex G-50 sorbent and 0.15 M sodium chloride solution as eluent. The concentration of Photoditazin in liposomes was determined spectrophotometrically at wavelength of 662 ± 2 nm.

2.2. The study of tumor selectivity of liposomal photoditazin in mice

To study the pharmacokinetics of Photoditazin suspension in vivo Ehrlich tumor (ELD) cells were transplanted intramuscularly in the right hind paw of F1 mouse. Mice were divided into 2 groups (n = 3). Pharmacokinetic studies were performed at 4-5 days after tumor transplantation. The first group of mice received Photoditazin intravenously at a dose of 5 mg / kg in liposomal form, and the second - the same dose in aqueous solution.

Spectral fluorescent method with a fiber spectrum analyzer "LESA-01-Biospec" and He-Ne laser (Biospec, Russia) were used to assess the selective accumulation of photosensitizer. Measurements of fluorescence intensity was carried out at several points of the tumor, the data were averaged. Similarly assessed the fluorescence intensity of normal tissue in the contralateral area of the left paw.

Index of photosensitizer accumulation in tumor was estimated as the ratio between average intensity of fluorescence in tumor and normal tissue (under the assumption that the fluorescence intensity of the photosensitizer in a tissue is proportional to its content in tissue). Carrying out such measurements at various times, we had a curve to an index of Photoditazin accumulation when administered in both forms.

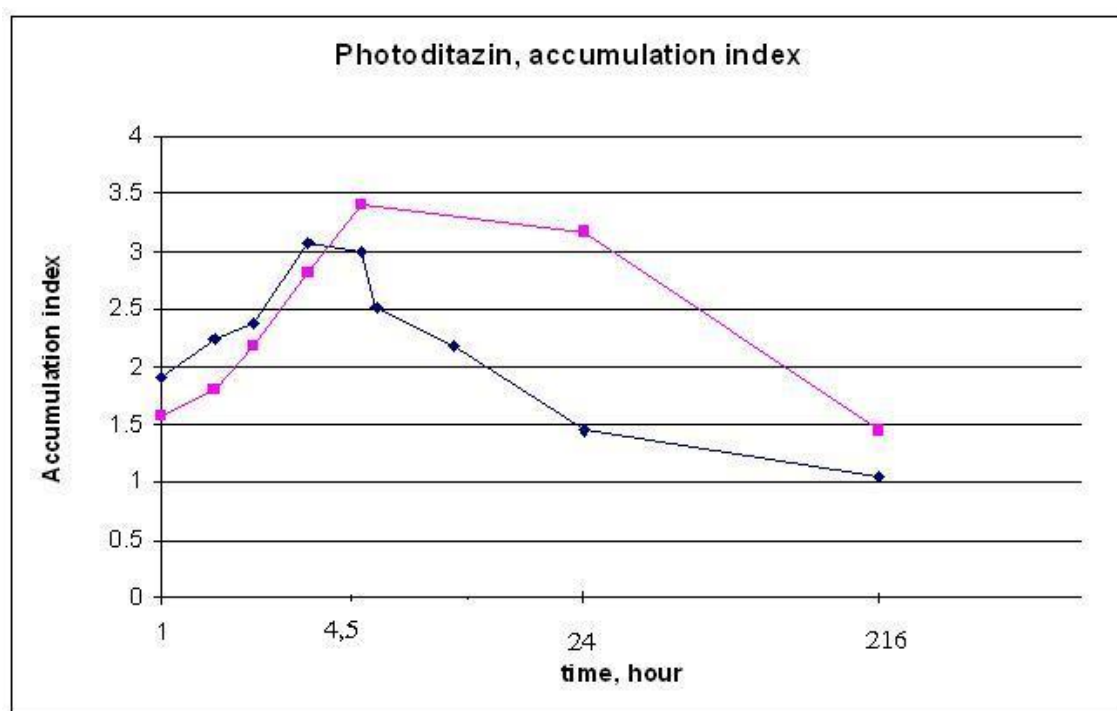


Fig. 1. Index Photoditazin accumulation in Ehrlich tumor (ELD) as compared with normal tissue when administered in doses of 5 mg / kg intravenous injection:

- 1 - in liposomal form;
- 2 - in aqueous solution.

2.3. The Study of the PDT effectiveness of Photoditazin liposomal dispersion on Ehrlich tumor in mice

Comparative studies of the therapeutic efficacy of the resulting liposomal dispersion and an aqueous solution Photoditazin performed in vivo in 3 groups of mice Balb / c (n = 7), as control (group 3) were used intact mouse. Ehrlich tumor (ELD) were transplanted intramuscularly in the leg, right hind paw of 0.1 ml of a suspension containing 5h105 cells. Treatment of mice started at 6 days after tumor transplantation, when the average tumor volume in groups of no more than 530 mm³. The first group of mice for 4,5 hours prior to irradiation was administered intravenously liposomal dispersion Photoditazin 5 mg / kg of animal body weight, the mice of the second group - the aqueous solution Photoditazin at the same dose. With PDT, the tumor was irradiated with a laser "LFD-01/670-Biospek (Biospek, Russia) with a wavelength of 671 nm and a power density of 260 mW/cm² for 20 minutes.

The effectiveness of PDT was evaluated by tumor growth inhibition (TGI, %) at different periods of observation. Inhibition of tumor growth was calculated by the formula:

$$TGI\% = (V_c - V_o) / V_c \times 100\%$$

where V_c - average tumor volume in the control group (mm³), V_o - the average tumor volume in the experimental group (mm³). The results are shown in Table 1.

Table 1. Effectiveness of PDT with Photoditazin liposomal dispersion on Ehrlich tumor in mice

Group	TGI, %					
	days after irradiation					
	4	8	11	15	18	23
Photoditazin aqueous solution	27	48	39	44	48	57
Photoditazin liposomes	36	58	61	76	83	86

3. RESULTS AND DISCUSSION

The method of liposomal Photoditazin preparation is developed. Incapsulation of Photoditazin in liposomes was $92,1 \pm 0,9\%$, the diameter of vesicles - 178 ± 10 nm. These sizes of pegylated liposomes are quite acceptable for a prolonged circulation in blood [3].

The results of biological studies indicate that liposomal Photoditazin increased 20% selective accumulation in tumors compared with normal tissue (Fig. 1). In the group

with Photoditazin aqueous solution significant effect is achieved only at the end of observation, TGI = 57%, while liposomal Photoditazin causes significant tumor growth inhibition already at 8 days after treatment (TGI = 58%) and reaches a maximum by 23 days, TGI = 86%.

REFERENCES

1. Ponomarev G.V., Tavrovskiy L.D., Zaretskiy A.M. et.al. *Photosensitizer and its way to obtain*. –Patent Russian federation PΦ №2276976, 27 may 2006 r.
2. Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. "Diffusion of Univalent Ions across the lamellae of Swollen Phospholipids", *J. Mol. Biol.* (1965) 13, 238-252
3. Awasthi V. D., Garcia D, Goins B. A. and Phillips W. T.. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. *Int J Pharm.* - 2003. – Vol.253(1-2) – p. 121-32.

CHỈ MỤC TÁC GIẢ

Đặng Thị Hiền, 40

Đinh Thị Hải Bình, 9

Hoàng Ngọc Hà, 49

Lê Thị Ngọc Diệp, 9

Nguyễn Thị Mai Anh, 1

Nguyễn Thu Hiền, 31

Nguyễn Thu Quỳnh, 59

Nguyễn Trần Linh, 40

Phạm Thị Minh Huệ, 31, 49

Phạm Xuân Chung, 16

Trần Thị Hải Yến, 69

Trần Trịnh Công, 25

Vũ Ngọc Mai, 40

Vũ Thị Thu Giang, 31