

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

BỘ Y TẾ

KHUU MỸ LỆ

**BÀO CHẾ HỆ TIỂU PHÂN NANO ARTEMISININ
VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG
DIỆT KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT TRÊN CHUỘT**

Chuyên ngành: Công nghệ dược phẩm và bào chế

Mã số: 62720402

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2017

Công trình được hoàn thành tại:

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Người hướng dẫn khoa học:

PGS. TS. HOÀNG MINH CHÂU

GS. TS. NGUYỄN MINH ĐỨC

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp trường họp tại

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

vào hồigiờ.....ngày.....tháng.....năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp TPHCM
- Thư viện Đại học Y Dược TPHCM

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Công nghệ nano được ứng dụng trong bào chế dược phẩm vì ưu điểm nổi trội như việc tạo nên tiểu phân nano bảo vệ hoạt chất, tăng tính thấm thuốc qua hàng rào sinh học và tránh hiện tượng đa đề kháng. Hoạt chất có thể là chất kháng ung thư, chống thải ghép hay diệt ký sinh trùng (KST),.... Trong số đó, phải kể đến thuốc điều trị sốt rét – đặc biệt là artemisinin (ART) và dẫn chất – vì chúng có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát bệnh. Đề tài bào chế hệ tiểu phân nano ART và đánh giá tác động diệt KST sốt rét trên chuột được thực hiện với các nội dung nghiên cứu sau:

- Đánh giá sự tương tác giữa hỗn hợp lipid và ART.
- Xây dựng công thức và quy trình bào chế hệ tiểu phân nano ART.
- Đánh giá tính chất của hệ tiểu phân nano ART.
- Đánh giá tác động diệt ký sinh trùng sốt rét của hệ tiểu phân nano ART trên chuột gây nhiễm *Plasmodium berghei*.

2. Tính cấp thiết của đề tài

ART và dẫn chất được đưa vào phác đồ điều trị sốt rét từ năm 2001. Hạn chế của ART do tính chất rất kém tan (thực tế không tan) trong nước và ít tan trong dầu. Năm 2015 có khoảng 214 triệu trường hợp mới mắc và 438.000 trường hợp tử vong do sốt rét. Ở nhiều khu vực, *P. falciparum* đề kháng lan rộng với cloroquin, quinin dẫn đến thất bại điều trị và tăng tỉ lệ tử vong. Một trong những nguyên nhân đề kháng là do hoạt chất kém tan, kém bền nên sinh khả dụng thấp hay thời gian bán thải ngắn khiến nồng độ thuốc không đạt yêu cầu điều trị. Trong khi đó, quá trình phát minh hoạt chất mới cần rất nhiều thời gian và chi phí, đến nay các nghiên cứu vẫn trong giai đoạn thử

nghiệm. Vì vậy, trong kế hoạch ngăn chặn sự đề kháng của KST sốt rét trên toàn cầu, WHO đã chọn cải tiến kỹ thuật là giải pháp được ưu tiên hàng đầu nhằm bảo vệ hiệu quả điều trị của ART và dẫn chất.

Giải pháp được quan tâm là ứng dụng công nghệ nano vào kỹ thuật bào chế. Khi đó, quá trình đến đích tác động của hoạt chất sẽ phụ thuộc vào kích thước, tính chất bề mặt của tiểu phân. Bào chế hệ tiểu phân nano lipid nhằm cải thiện độ tan và khả năng phân tán của ART trong môi trường để có thể sử dụng bằng đường uống hoặc tiêm tĩnh mạch, từ đó cải thiện sự hấp thu và sinh khả dụng cũng như kiểm soát quá trình phóng thích hoạt chất, tăng thời gian tác dụng của thuốc nhằm hạn chế sự đề kháng.

3. Những đóng góp mới của luận án

Đây là nghiên cứu đầu tiên ứng dụng công nghệ nano trong bào chế hệ tiểu phân nano ART tại Việt Nam. Phương pháp và kết quả nghiên cứu đã góp phần ứng dụng công nghệ nano trong bào chế dược phẩm với những đóng góp mới như sau:

- Đã xây dựng công thức và quy trình bào chế hệ tiểu phân nano ART bằng phương pháp đồng nhất hóa dưới áp suất cao nhiệt độ cao với áp suất 800 bar và 5 chu kỳ.
- Đã xác định được các đặc tính của tiểu phân nano ART, xây dựng tiêu chuẩn kiểm nghiệm sản phẩm và sơ bộ đánh giá hiệu lực diệt ký sinh trùng sốt rét trên chuột gây nhiễm *Plasmodium berghei*.

4. Bố cục luận án

Luận án gồm 146 trang: Mở đầu 2 trang, mục tiêu 1 trang, tổng quan tài liệu 33 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 22 trang, kết quả nghiên cứu 68 trang, bàn luận 17 trang, kết luận và đề nghị 3 trang. Luận án có 67 bảng, 41 hình, 4 sơ đồ, 162 tài liệu tham khảo

gồm 15 tài liệu tiếng Việt và 147 tài liệu tiếng Anh, 5 phụ lục (66 tiểu mục) thể hiện các kết quả thực nghiệm.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tình hình nghiên cứu và thành tựu của công nghệ nano

1.2. Khái niệm và phân loại tiểu phân nano trong ngành dược:

Khái niệm tiểu phân nano trong ngành dược, phân loại tiểu phân nano trong ngành dược, một số tiểu phân nano lipid ứng dụng trong bào chế dược phẩm.

1.3. Phương pháp bào chế hệ tiểu phân nano lipid: Theo nguyên lý từ trên xuống hoặc từ dưới lên gồm kỹ thuật cơ học, kỹ thuật nhũ hóa và kỹ thuật kết tủa.

1.4. Phương pháp phân tích tính chất của hệ tiểu phân nano lipid: Tính chất cảm quan của hệ tiểu phân nano lipid, kích thước và dãy phân bố kích cỡ tiểu phân, hình thể học của tiểu phân nano lipid, thế zêta của hệ tiểu phân nano lipid, sự nang hóa hoạt chất và phóng thích hoạt chất của hệ tiểu phân nano lipid.

1.5. Các tá dược dùng trong bào chế hệ tiểu phân nano ART: Compritol® 888 ATO, Labrafac™ PG, polysorbat 80, Simulsol™ 4000 P, Gelucire® 50/13, phosphatidylcholin.

1.6. ART và nghiên cứu ứng dụng trong điều trị sốt rét: ART, các nghiên cứu về bào chế và hiệu quả của ART trong điều trị sốt rét, tình hình đề kháng của ký sinh trùng sốt rét, ứng dụng công nghệ nano trong bào chế hệ tiểu phân nano ARTs.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Nguyên vật liệu: ART, Compritol® 888 ATO, Labrafac™ PG, Gelucire® 50/13, phosphatidylcholin, polysorbat 80, Simulsol™ 4000 P.

2.1.2. Hóa chất và dung môi: Acetonitril, methanol, natri lauryl sulfat.

2.1.3. Trang thiết bị: Cân phân tích Libror AEL-40SM và TE214S, máy ly tâm Centrifuge 80-1, máy phân tích nhiệt vi sai Q200, máy khuấy IKA®T25 digital Ultra-Turrax®, máy đồng nhất hóa APV-2000, KHV quang học, KHV điện tử truyền qua JEM-1400, máy đo kích thước hạt LA-920, máy ly tâm lạnh Z 36 HK, máy HPLC,...

2.1.4. Động vật thí nghiệm: Chuột nhắt trắng (đực và cái), chủng *Swiss albino* (Viện Pasteur TPHCM).

2.1.5. Ký sinh trùng: Chủng *Plasmodium berghei* kháng cloroquin.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Đánh giá sự tương tác giữa hỗn hợp lipid (Compritol® 888 ATO – Labrafac™ PG) và ART: Đánh giá nhiệt độ tan chảy, đỉnh chảy và enthalpy khi phân tích DSC.

2.2.2 Xây dựng công thức và quy trình bào chế hệ tiểu phân nano ART: Xây dựng công thức cơ bản của hệ tiểu phân nano ART, xây dựng kỹ thuật bào chế hệ tiểu phân nano ART, khảo sát hàm lượng ART phối hợp vào công thức bào chế hệ tiểu phân nano ART, khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến KTTP nano ART, thực nghiệm kiểm chứng công thức tối ưu.

2.2.3 Đánh giá tính chất của hệ tiểu phân nano ART

Đánh giá cảm quan của hệ tiểu phân nano ART (quan sát bằng mắt thường), kích thước và phân bố kích cỡ tiểu phân của hệ tiểu phân nano ART (phương pháp nhiễu xạ laser), khảo sát hình thể học của tiểu phân nano ART (TEM), xác định thế zêta của hệ tiểu phân nano ART (phép đo gió bởi Doppler laser).

Định lượng ART bằng HPLC [Cột C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), pha động CH₃CN – H₂O (68 : 32), detector UV – Vis, bước sóng phát

hiện 216 nm, tốc độ dòng 0,6 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μ l], phần trăm nang hóa (PTNH) và hiệu suất nang hóa (HSNH) của hệ tiểu phân nano ART (tách hoạt chất không nang hóa bằng kỹ thuật siêu lọc), phóng thích hoạt chất [phương pháp khuếch tán qua màng: Kẹp kín hai đầu của màng bán thấm (Spectra/Por[®] 1–3, MWCO 6000 – 8000) bằng kẹp nối và kẹp từ (Universal dialysis tubing closure, Spectrum) tạo túi thẩm tách. Định lượng ART bằng HPLC].

Xây dựng tiêu chuẩn của hệ tiểu phân nano ART, nâng cỡ mẫu bào chế hệ tiểu phân nano ART lên 1.000 g, theo dõi độ ổn định của hệ tiểu phân nano ART (điều kiện 6 ± 2 °C trong tủ lạnh và 30 ± 2 °C phòng đạt quy định vùng khí hậu IVb).

2.2.4 Đánh giá tác động diệt ký sinh trùng sốt rét của hệ tiểu phân nano ART trên chuột gây nhiễm *Plasmodium berghei*

Chọn chuột nghiên cứu: Chuột nhắt trắng (đực và cái), chủng *Swiss albino* khỏe mạnh, khoảng 5 tuần tuổi, trọng lượng 18 – 20 g, được cung cấp bởi Viện Pasteur TPHCM. *Chuẩn bị nguồn lây nhiễm P. berghei và gây nhiễm P. berghei cho chuột thí nghiệm:* Theo quy trình chuẩn của Viện Sốt Rét – Ký Sinh Trùng và Côn Trùng TPHCM. Tiêm 0,2 ml máu có 1×10^7 KST lấy từ chuột có KST sang chuột lành qua phúc mạc bụng. Chuột có mật độ KST 20 – 30% sẽ được chia ngẫu nhiên vào các lô nghiên cứu. *Đường dùng thuốc, liều dùng và thời gian dùng thuốc:* Lô 1 (chứng âm), chuột có KST uống hệ tiểu phân không chứa ART. Lô 2 – 5 (chứng dương), chuột có KST uống ART liều 100 mg/kg, 150 mg/kg, 170 mg/kg và 190 mg/kg cân nặng. Lô 6 – 9, chuột có KST uống trực tiếp hệ tiểu phân nano ART liều 100 mg/kg, 150 mg/kg, 170 mg/kg và 190 mg/kg cân nặng (tương ứng với 2 mg, 3 mg, 3,4 mg và 3,8 mg chế phẩm). Cho chuột uống 1

lần/ngày vào buổi sáng trong 7 ngày. Theo dõi 35 ngày. *Đánh giá hiệu quả của thuốc*: Mật độ KST, tỉ lệ giảm mật độ KST trong máu giữa các lô điều trị so với lô chứng âm, thời gian sống sót của chuột, thời gian sạch KST và thời gian duy trì tình trạng sạch KST trong máu.

2.2.5. Phân tích số liệu: Số liệu được xử lý thống kê bằng SPSS 22, phép kiểm Mann–Whitney hoặc ANOVA 1 yếu tố và biểu diễn dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn. $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tương tác của hỗn hợp Compritol® 888 ATO – Labrafac™ PG – ART
Chọn Compritol® 888 ATO – Labrafac™ PG (7 : 3) làm pha dầu. Lượng ART phối hợp vào công thức từ 20 mg đến hơn 100 mg/g lipid.

3.2. Kết quả xây dựng công thức và quy trình bào chế

3.2.1 Công thức cơ bản của hệ tiểu phân nano ART

Chọn tỉ lệ lipid 10% và tỉ lệ polysorbat 80 – Simulsol™ 4000 P (1 : 1).

3.2.2. Kỹ thuật bào chế hệ tiểu phân nano ART

Đồng nhất hóa bằng HPH, áp suất 800 bar và 1.000 bar 10 chu kỳ cho kích thước tiểu phân (KTTP) nhỏ nhất.

Bảng 3.20 Thông số KTTP sau khi tăng áp suất đồng nhất hóa

Thông số	Kết quả		
	800 bar 10 ck	1.000 bar 10 ck	1.100 bar 5 ck
Kiểu phân bố	Một đỉnh	Một đỉnh	Một đỉnh
Dãy PB (nm)	58 – 339	58 – 339	76 – 389
KTTPB (nm)	113,5 \pm 3,69	113,3 \pm 2,27	129,3 \pm 1,38

3.2.3. Hàm lượng ART phối hợp vào công thức bào chế hệ tiểu phân ART

Bảng 3.21 Tính chất của các hệ tiểu phân có hàm lượng ART khác nhau

Hàm lượng	0,3%	0,4%	0,5%	0,6%
KTTPB (nm)	114,6 \pm 1,95	116,4 \pm 3,12	114,6 \pm 1,75	115,8 \pm 2,84
HSNH (%)	92,44 \pm 0,105	94,59 \pm 0,086	95,87 \pm 0,078	96,55 \pm 0,053
Hàm lượng	0,7%	0,8%	0,9%	1%
KTTPB (nm)	115,9 \pm 2,71	118,8 \pm 1,96	118,2 \pm 1,39	122,1 \pm 2,48
HSNH (%)	97,11 \pm 0,097	97,46 \pm 0,015	96,94 \pm 0,054	96,55 \pm 0,062

Chọn ART 0,8% vì mẫu có KTTP nhỏ và HSNH cao nhất.

3.2.4. Kết quả khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng KTTT nano ART

Bảng 3.23 Ma trận bố trí thí nghiệm và kết quả

N	X ₀	X ₁	X ₂	Y _{uTB}
1	1	1	1	112,60
2	1	-1	1	130,57
3	1	1	-1	122,00
4	1	-1	-1	142,70
b _i	127	-9,67	-5,38	

Phương trình hồi quy thực nghiệm: $\hat{y} = 127 - 9,67x_1 - 5,38x_2 + 0,68 x_1x_2$

T_m của các hệ số b_i và T lý thuyết lần lượt là:

$$T_{b_0} = 182,8 \quad T_{b_1} = 13,9 \quad T_{b_2} = 7,7 \quad T_{b_{12}} = 1,0 \quad T_{t(0,05,5)} = 2,57 \quad T_{t(0,01,5)} = 4,03$$

Hệ số b₀, b₁ và b₂ có ý nghĩa, hệ số b₁₂ không có ý nghĩa. Phương trình hồi quy biểu thị mối liên quan giữa áp suất và số chu kỳ đồng nhất hóa đến kích thước là: $\hat{y} = 127 - 9,67 x_1 - 5,38 x_2$

Bảng 3.25 KTTT của thí nghiệm tiến đến vùng gần dừng

N	X ₁	X ₂	y _u	Dãy phân bố
X _{imin}	700	3		
5	750	4	117,1	58 – 389
6	800	5	118,7	58 – 339
7	850	6	115,6	58 – 339
8	900	7	116,2	58 – 339
9	950	8	113,9	58 – 339
10	1.000	9	112,6	58 – 339

Chọn điều kiện đồng nhất hóa là 800 bar và 5 chu kỳ.

3.2.5. Thực nghiệm kiểm chứng công thức bào chế tối ưu

KTTT khoảng 115 nm, không khác nhau so với lô tối ưu ($p < 0,05$).

Phương pháp bào chế hệ tiểu phân nano ART có tính lặp lại.

Bảng 3.26 Thông số KTTT của các lô kiểm chứng

Lô	Dãy PB (nm)	KTTT TB (nm)	d ₁₀ (nm)	d ₉₀ (nm)
1	58 – 339	115,2 ± 1,7	81,0 ± 0,3	160,3 ± 4,4
2	58 – 339	115,9 ± 2,29	81,1 ± 0,0	161,6 ± 5,0
TB	58 – 339	115,6 ± 1,8	81,0 ± 0,2	160,9 ± 4,3

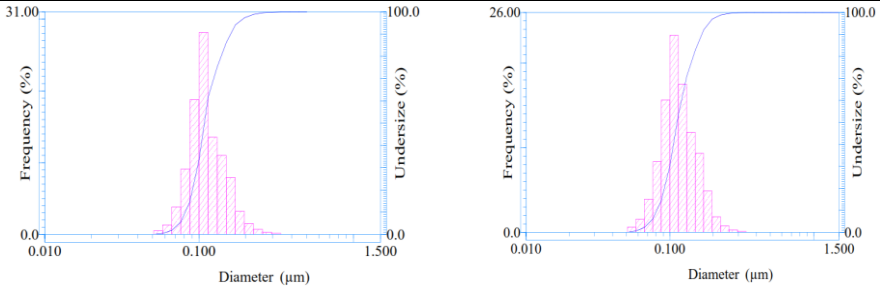
3.3. Kết quả đánh giá tính chất của hệ tiểu phân nano ART

Cảm quan của hệ tiểu phân nano ART: Các hệ tiểu phân dạng lỏng, đồng nhất và không tách lớp.

Kích thước và dãy phân bố kích cỡ tiểu phân

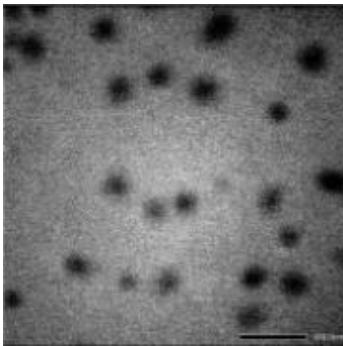
Bảng 3.28 Thông số kích thước của hệ tiểu phân nano ART

Thông số	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Trung bình
Kiểu phân bố	Một đỉnh	Một đỉnh	Một đỉnh	Một đỉnh
Dãy PB (nm)	58 – 339	58 – 339	58 – 339	58 – 339
KTTP (nm)	$115,9 \pm 3,10$	$119,9 \pm 1,97$	$120,1 \pm 1,87$	$118,7 \pm 2,64$
d_{10} (nm)	81,3	81,2	81,2	$81,2 \pm 0,058$
d_{90} (nm)	160,3	166,9	168,8	$165,3 \pm 4,46$

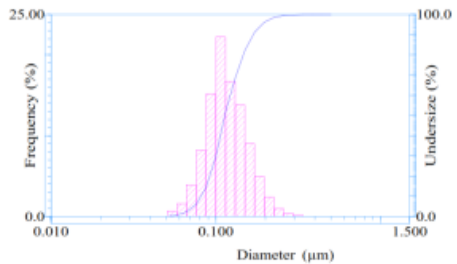


Biểu đồ 3.15 Biểu đồ phân bố kích cỡ của hệ tiểu phân nano ART

Hình thể học:



(a)



Hình 3.5 Hình ảnh tiểu phân nano ART chụp bằng TEM (x 50.000) (a)

Thế zêta: Thế zêta đo được là $|-15,1| \text{ mV} < |-30| \text{ mV}$

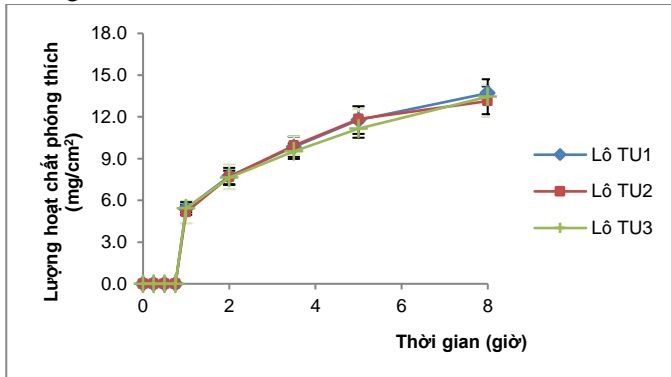
Định lượng ART bằng HPLC: Quy trình đạt yêu cầu tính đặc hiệu, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, độ đúng, khoảng tuyến tính 5 – 250 $\mu\text{g/ml}$.

Phần trăm nang hóa (PTNH) và hiệu suất nang hóa (HSNH):

Bảng 3.33 Hàm lượng % và hiệu suất nang hóa của tiểu phân nano ART

Lô	Hàm lượng ART (%)	PTNH (%)	HSNH (%)
1	99,70 ± 0,3	7,773 ± 0,002	97,51 ± 0,02
2	99,66 ± 0,65	7,772 ± 0,003	97,51 ± 0,03
3	99,56 ± 0,37	7,769 ± 0,002	97,46 ± 0,03
TB	99,64 ± 0,07	7,771 ± 0,07	97,49 ± 0,07

3.3.7. Phóng thích hoạt chất (PTHC):



Biểu đồ 3.10 Lượng hoạt chất phóng thích của tiểu phân nano ART

3.3.8. Tóm tắt tiêu chuẩn của hệ tiểu phân nano ART và quy trình bào chế

Bảng 3.35 Thành phần công thức bào chế hệ tiểu phân nano ART

Thành phần	Khối lượng (g)	
	Lô 100 g	Lô 1.000 g
ART	0,8	8
Compritol® 888 ATO	7,0	70
Labrafac™ PG	3,0	30
Polysorbat 80	1,0	10
Simulsol™ 4000 P	1,0	10
Nước cất vđ	100,0	1.000

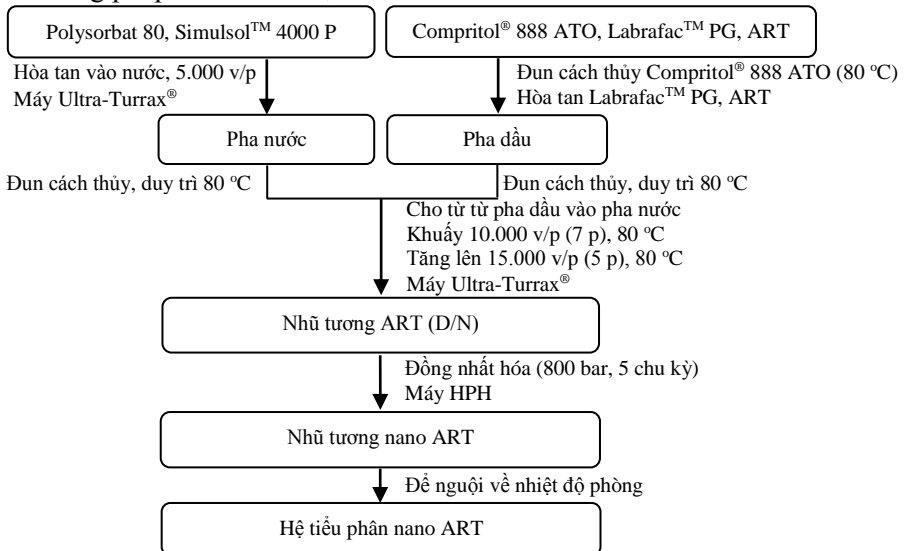
Bảng 3.36 Tiêu chuẩn nguyên liệu của công thức bào chế

Tên nguyên liệu	Tiêu chuẩn
Artemisinin	Đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam IV (2010)
Compritol® 888 ATO	Đạt tiêu chuẩn Dược điển Châu Âu 7.0 (2011)
Labrafac™ PG	Đạt tiêu chuẩn Dược điển Châu Âu 7.0 (2011)
Polysorbat 80	Đạt tiêu chuẩn Dược điển Châu Âu 7.0 (2011)
Simulsol™ 4000 P	Đạt tiêu chuẩn Dược điển Mỹ 34 (2011)

Bảng 3.37 Chỉ tiêu chất lượng của hệ tiểu phân nano ART

Chỉ tiêu	Yêu cầu
Cảm quan	Hệ tiểu phân đồng nhất, không kết bông, không tách lớp
Kích thước	
Dãy phân bố (nm)	58 – 339
KTTPTB (nm)	105 – 125
d_{10} (nm)	70 – 85
d_{90} (nm)	150 – 180
Hình thể học	Hình cầu, kích thước trong khoảng 58 – 339 nm
Thê zêta (mV)	$ -13,5 - -16,5 $
PTNH (%)	7,0 – 8,5
HSNH (%)	Không ít hơn 92%
PTHC (mg/cm²) sau 8 giờ	12 – 15

Phương pháp thử: Theo mục 2.2.3.



Sơ đồ 3.1 Sơ đồ quy trình bào chế hệ tiểu phân nano ART

3.3.9. Kết quả bào chế hệ tiểu phân nano cỡ mẫu 1.000 g

3.3.9.1. Công thức và quy trình bào chế: Thành phần công thức như bảng 3.35. Quy trình và thông số bào chế như sơ đồ 3.1 nhưng trong giai đoạn phối hợp pha dầu và pha nước, thời gian khuấy là 10 phút.

3.3.9.2. Đánh giá chất lượng của hệ tiểu phân nano ART lô nâng cấp

Cảm quan: Các hệ tiểu phân đều đồng nhất và không tách lớp.

Kích thước và dãy phân bố kích thước:

Bảng 3.38 Thông số KTTTP của hệ tiểu phân nano ART lô nâng cấp

Lô	Dãy PB (nm)	KTTTP (nm)	d_{10} (nm)	d_{90} (nm)
1	58 – 339	115,3 ± 2,67	78,1 ± 0,92	165,2 ± 4,05
2	58 – 339	116,3 ± 3,39	78,1 ± 0,58	165,6 ± 8,32
3	58 – 339	114,9 ± 4,15	79,4 ± 1,87	162,3 ± 5,04
TB	58 – 339	115,5 ± 0,73	78,5 ± 0,74	164,4 ± 1,81

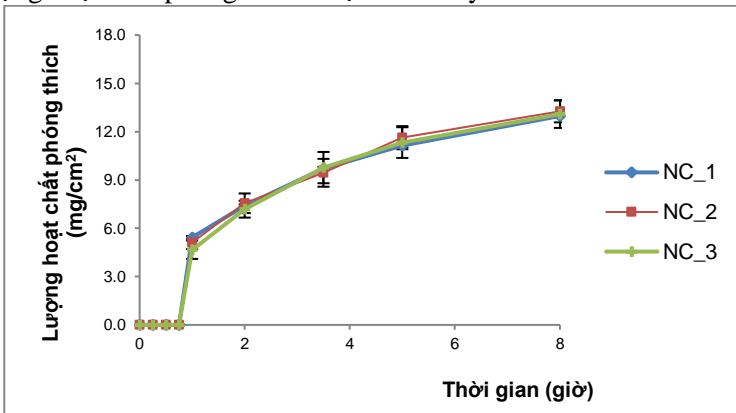
Hình thể học: Tiểu phân hình tròn, kích thước đồng đều.

Thế zêta: -14,5 mV

Bảng 3.39 Hàm lượng %, PTNH và HSNH của lô nâng cấp

Lô	Mẫu	Hàm lượng ART (%)	PTNH (%)	HSNH (%)
1	TB	99,50 ± 0,58	7,766 ± 0,004	97,45 ± 0,049
2	TB	99,86 ± 0,36	7,765 ± 0,004	97,43 ± 0,051
3	TB	99,48 ± 0,73	7,768 ± 0,003	97,48 ± 0,040
Hàm lượng (%)				99,62 ± 0,21
PTNH (%)				7,766 ± 0,002
HSNH (%)				97,45 ± 0,02

Lượng hoạt chất phóng thích được trình bày như Biểu đồ 3.23.



Biểu đồ 3.23 Lượng hoạt chất phóng thích của tiểu phân lô nâng cấp

3.3.9.3. Tóm tắt kết quả đánh giá tính chất của lô nâng cấp

Tính chất của hệ tiểu phân lô nâng cấp đạt yêu cầu tiêu chuẩn sản phẩm (bảng 3.41). Quy trình bào chế hệ tiểu phân nano ART đã được nâng lên 1.000 g.

Bảng 3.41 Tính chất của hệ tiểu phân lô nâng cấp

Chỉ tiêu	Yêu cầu	Kết quả
Cảm quan	Hệ tiểu phân đồng nhất, không kết bông, không tách lớp	Hệ tiểu phân đồng nhất, không kết bông, không tách lớp
Kích thước		
Dãy phân bố (nm)	58 – 339	
KTTPTB (nm)	105 – 125	115,5
d ₁₀ (nm)	70 – 85	78,5
d ₉₀ (nm)	150 – 180	164,4
Hình thể học	Hình cầu, kích thước trong khoảng 58 – 339 nm	Hình cầu, kích thước trong khoảng 58 – 339 nm
Thế zêta (mV)	-13,5 – -16,5	-14,5
PTNH (%)	7,0 – 8,5	7,77
HSNH (%)	Không ít hơn 92%	97,45
PTHC (mg/cm²) sau 8 giờ	12 – 15	13,11

3.3.9. Độ ổn định của hệ tiểu phân nano lipid

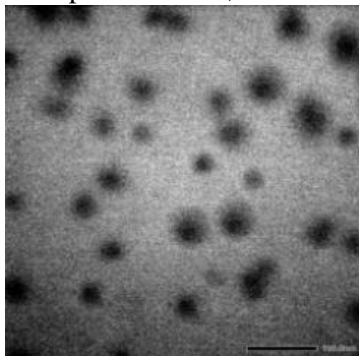
3.3.10.1. Độ ổn định của hệ tiểu phân nano không chứa ART

KTTP không khác nhau từ tháng 0 đến 15 ($p > 0,05$).

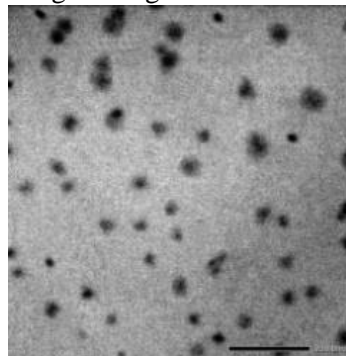
3.3.10.2. Độ ổn định của hệ tiểu phân nano ART ở $6 \pm 2^\circ\text{C}$

KTTP không khác nhau từ tháng 0 – 6 ($p > 0,05$), khác nhau từ tháng

7. Tiểu phân hình cầu, kích thước nằm trong khoảng 58 – 339 nm.



Hình ảnh 3.7. Hình ảnh tiểu phân sau 3 tháng ở $6 \pm 2^\circ\text{C}$ (x 30.000)



Hình ảnh 3.8. Hình ảnh tiểu phân sau 6 tháng ở $6 \pm 2^\circ\text{C}$ (x 30.000)

HSNH giảm không đáng kể từ tháng 0 đến tháng 6 (bảng 3.48).

Bảng 3.48 Các tính chất của tiểu phân nano ART ở 6 ± 2 °C

Lô	Tính chất	Tháng 0	Tháng 3	Tháng 6	Tháng 7	Tháng 9
NC1	Dãy phân bố	58 – 339	58 – 339	58 – 389	58 - 445	76 – 500
	KTTB (nm)	115,3 \pm 2,67	114,3 \pm 3,60	118,6 \pm 3,78	129,0 \pm 1,68	139,8 \pm 2,26
	d ₁₀ (nm)	78,1 \pm 0,92	78,8 \pm 1,90	79,3 \pm 1,44	82,1 \pm 1,08	97,9 \pm 0,25
	d ₉₀ (nm)	165,2 \pm 4,05	162,9 \pm 3,33	171,7 \pm 5,09	191,1 \pm 4,02	200,0 \pm 4,61
	HLHC (%)	99,50 \pm 0,58	99,12 \pm 0,19	95,88 \pm 0,96	92,67 \pm 1,62	87,74 \pm 0,66
	HSNH (%)	97,45 \pm 0,05	97,43 \pm 0,04	96,22 \pm 0,07	95,85 \pm 0,07	94,66 \pm 0,09
NC2	Dãy phân bố	58 – 339	58 – 339	58 – 389	58 - 389	51 – 500
	KTTB (nm)	116,3 \pm 3,39	116,5 \pm 0,25	117,7 \pm 2,22	126,7 \pm 2,82	133,1 \pm 9,78
	d ₁₀ (nm)	78,1 \pm 0,58	79,3 \pm 1,12	78,9 \pm 1,62	81,4 \pm 0,98	83,2 \pm 10,05
	d ₉₀ (nm)	165,6 \pm 8,32	165,9 \pm 1,18	165,9 \pm 7,98	186,5 \pm 6,75	206,7 \pm 23,67
	HLHC (%)	99,86 \pm 0,36	99,09 \pm 0,17	95,68 \pm 0,73	91,50 \pm 1,67	88,13 \pm 0,39
	HSNH (%)	97,43 \pm 0,05	97,39 \pm 0,04	96,30 \pm 0,07	95,71 \pm 0,02	94,71 \pm 0,04
NC3	Dãy phân bố	58 – 339	58 – 339	58 – 389	58 - 389	51 – 500
	KTTB (nm)	114,9 \pm 4,15	114,7 \pm 1,70	113,1 \pm 1,78	124,9 \pm 1,61	129,5 \pm 8,00
	d ₁₀ (nm)	79,4 \pm 1,89	79,4 \pm 1,44	77,9 \pm 0,40	80,0 \pm 2,44	83,6 \pm 12,53
	d ₉₀ (nm)	162,3 \pm 5,04	162,0 \pm 1,37	162,5 \pm 5,84	180,4 \pm 3,73	200,2 \pm 3,81
	HLHC (%)	99,48 \pm 0,73	98,94 \pm 0,59	96,17 \pm 1,18	93,40 \pm 1,89	87,75 \pm 0,87
	HSNH (%)	97,48 \pm 0,04	97,41 \pm 0,03	96,36 \pm 0,02	95,77 \pm 0,06	94,68 \pm 0,06

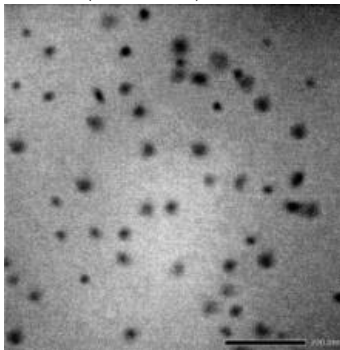
3.3.10.3. Độ ổn định của hệ tiểu phân nano ART ở 30 ± 2 °C

Kích thước và dãy phân bố kích cỡ tiểu phân không khác nhau từ tháng 0 đến 4 ($p > 0,05$), khác nhau ở tháng thứ 5 và 6 ($p < 0,05$).

Bảng 3.50 Giá trị p so sánh KTTP nano ART theo thời gian bảo quản với tháng 0 ở 30 ± 2 °C / $75 \pm 5\%$ RH

Tháng	3	4	5	6
Giá trị p	0,730	0,529	0,000	0,000

Ở tháng thứ 4, tiểu phân hình cầu, kích thước khá đồng đều và nằm trong khoảng 58 – 339 nm (Hình 3.9).



Hình 3.9. Hình ảnh tiểu phân sau 4 tháng, 30 ± 2 °C / $75 \pm 5\%$ RH (x 30.000)

Bảng 3.51 Tính chất của tiểu phân nano ART ở 30 ± 2 °C/ 75 ± 5 % RH

Lô	Tính chất	Tháng 0	Tháng 3	Tháng 4	Tháng 5	Tháng 6
NC1	Dãy phân bố	58 - 339	58 - 339	58 - 389	58 - 445	58 - 445
	KTTB (nm)	115,3 ± 2,67	115,2 ± 1,77	118,9 ± 2,62	126,2 ± 1,88	134,2 ± 6,95
	d ₁₀ (nm)	78,1 ± 0,92	79,1 ± 1,21	80,1 ± 0,36	79,0 ± 0,69	79,6 ± 0,55
	d ₉₀ (nm)	165,2 ± 4,05	163,6 ± 1,87	169,8 ± 6,17	185,6 ± 4,25	206,8 ± 15,90
	HLHC (%)	99,50 ± 0,58	98,45 ± 0,65	95,41 ± 1,30	93,30 ± 0,90	90,90 ± 0,58
	HSNH (%)	97,45 ± 0,05	97,39 ± 0,04	96,69 ± 0,04	95,79 ± 0,08	94,68 ± 0,10
NC2	Dãy phân bố	58 - 339	58 - 339	58 - 389	58 - 445	58 - 445
	KTTB (nm)	116,3 ± 3,39	112,6 ± 3,50	115,6 ± 2,84	123,6 ± 4,25	133,1 ± 3,80
	d ₁₀ (nm)	78,1 ± 0,58	78,0 ± 2,28	78,4 ± 2,33	78,1 ± 1,41	79,8 ± 0,76
	d ₉₀ (nm)	165,6 ± 8,32	160,2 ± 3,54	166,2 ± 1,76	185,0 ± 4,90	203,8 ± 8,14
	HLHC (%)	99,86 ± 0,36	98,40 ± 1,02	95,98 ± 0,88	94,18 ± 0,93	89,27 ± 1,06
	HSNH (%)	97,43 ± 0,05	97,39 ± 0,03	96,83 ± 0,06	95,97 ± 0,03	94,54 ± 0,08
NC3	Dãy phân bố	58 - 339	58 - 339	58 - 389	58 - 445	58 - 445
	KTTB (nm)	114,9 ± 4,15	114,2 ± 2,93	117,8 ± 1,07	125,6 ± 6,03	130,3 ± 2,10
	d ₁₀ (nm)	79,4 ± 1,89	78,7 ± 1,65	78,0 ± 0,06	79,7 ± 0,58	79,9 ± 0,50
	d ₉₀ (nm)	162,3 ± 5,04	162,3 ± 4,51	172,0 ± 2,98	186,7 ± 14,3	197,2 ± 4,43
	HLHC (%)	99,48 ± 0,73	98,51 ± 0,89	95,87 ± 1,57	93,43 ± 0,69	89,62 ± 1,22
	HSNH (%)	97,48 ± 0,04	97,41 ± 0,04	96,78 ± 0,06	95,86 ± 0,08	94,47 ± 0,08

3.4. Kết quả đánh giá tác động diệt ký sinh trùng sốt rét của hệ tiểu phân nano trên chuột nhiễm *P. Berghei*

- Mật độ KST trong máu giữa các lô điều trị bằng hệ tiểu phân nano ART liều 100 mg/kg, 150 mg/kg, 170 mg/kg, 190 mg/kg và lô chứng âm khác nhau đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), trừ ngày 1, chứng tỏ hệ tiểu phân nano ART có hiệu lực diệt KST sốt rét.

- Các lô điều trị bằng hệ tiểu phân nano ART liều 100 mg/kg, 150 mg/kg, 170 mg/kg và 190 mg/kg bắt đầu giảm mật độ KST từ ngày 2, duy trì đến ngày 35 với tỉ lệ giảm mật độ KST trong máu chuột từ 31% – 100%. Lô ART với liều tương tự bắt đầu giảm mật độ KST từ ngày 3. Ngày 2 và ngày 3, hệ tiểu phân nano ART liều 170 mg/kg và 190 mg/kg có tỉ lệ giảm mật độ KST cao hơn lô ART ($p < 0,05$).

Bảng 3.55 Thời gian sống sót của chuột lô chứng âm và các lô điều

trị (ngày 35)

Thời gian sống sót (ngày)	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 4	Lô 5	Lô 6	Lô 7	Lô 8	Lô 9
	13,4 ± 5,1	31,5 ± 3,7*	32,9 ± 3,4*	30,4 ± 7,5*	32,9 ± 3,4*	28,3 ± 8,2*	30,8 ± 5,9*	30,1 ± 6,6*	32,9 ± 3,4*

* Sự khác biệt giữa lô điều trị và chứng âm đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

- Hệ tiểu phân liều 150 mg/kg, 170 mg/kg và 190 mg/kg có thời gian sạch KST khác nhau so với lô ART ($p < 0,05$) với số ngày lần lượt là 3,1 ngày (so với 4,2 ngày), 2,80 ngày (so với 4,60 ngày) và 2,33 ngày (so với 4,60 ngày).

Bảng 3.56 Thời gian sạch KST trong máu chuột của các lô điều trị (ngày 35)

Liều (mg/kg)	Hệ tiểu phân nano ART (ngày) (1)	ART (ngày) (2)	p_{1-2}
100	3,40 ± 0,70	3,90 ± 1,20	0,818
150	3,10 ± 0,88	4,20 ± 1,48	0,019*
170	2,80 ± 0,42	4,60 ± 1,35	0,008*
190	2,33 ± 0,71	4,60 ± 1,17	0,012*

* Sự khác biệt giữa lô điều trị bằng hệ tiểu phân nano ART và lô chứng dương ART đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- Hệ tiểu phân liều 170 mg/kg và 190 mg/kg có số ngày duy trì khác nhau so với lô ART ($p < 0,05$) với số ngày lần lượt là 21,20 ngày (so với 7,40 ngày) và 24,11 ngày (so với 11,60 ngày).

Bảng 3.57 Thời gian duy trì tình trạng sạch KST trong máu chuột của các lô điều trị (ngày 35)

Liều (mg/kg)	Hệ tiểu phân nano ART (ngày) (1)	ART (ngày) (2)	p_{1-2}
100	8,20 ± 3,16	11,70 ± 10,04	0,271
150	16,70 ± 10,15	7,20 ± 5,01	0,053
170	21,20 ± 12,95	7,40 ± 5,50	0,001*
190	24,11 ± 10,12	11,60 ± 11,82	0,000*

* Sự khác biệt giữa lô điều trị bằng hệ tiểu phân nano ART và lô chứng dương ART đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Tương tác giữa hỗn hợp lipid (Compritol® 888 ATO – Labrafac™ PG) và ART

Nhiệt độ tan chảy của Compritol® 888 ATO khoảng 72 °C với đỉnh chảy rất nhọn và hẹp. Hỗn hợp Compritol® 888 ATO – Labrafac™

PG có nhiệt độ tan chảy thấp hơn và khoảng nhiệt độ tan chảy rộng hơn cũng như nhiệt độ bắt đầu tan chảy (onset temperature) thấp hơn. Có thể Labrafac™ PG được hòa tan hoặc phân tán trong Compritol® 888 ATO tạo nên hỗn hợp lipid có cấu trúc linh động hơn. Nhờ vậy, khả năng tải hoạt chất tăng lên và giảm trực xuất hoạt chất trong quá trình bảo quản. Bên cạnh đó, ART nguyên liệu có đỉnh chảy nhọn và hẹp ở khoảng 151 – 154 °C. Đỉnh này không xuất hiện trong hỗn hợp lipid – ART, có thể ART tan hoàn toàn và được phân tán trong hỗn hợp lipid. Khi đó, ART được phóng thích dần và hạn chế tiếp xúc với môi trường, giúp tiểu phân và hoạt chất ổn định hơn.

4.2. Công thức và quy trình bào chế hệ tiểu phân nano ART

4.2.1 Công thức cơ bản của hệ tiểu phân nano ART

Compritol® 888 ATO – este của glycerin và hỗn hợp di, mono, tri behenic acid – có vai trò tạo khung matrix trong bào chế hệ tiểu phân nano lipid với hiệu suất nang hóa cao vì là hỗn hợp lipid rắn và có chuỗi hydrocarbon dài. Labrafac™ PG – lipid lỏng với khung carbon trung bình – làm tăng độ tan của hoạt chất trong hỗn hợp lipid và giảm trực xuất hoạt chất nhờ tăng tính linh động trong cấu trúc của Compritol® 888 ATO. Đề tài chọn lipid 10% nhằm thu nhũ tương đạt yêu cầu về thể chất và phù hợp với điều kiện thiết bị nghiên cứu.

Công thức có 1,5% Gelucire® 50/13 tạo nhũ tương ổn định nhưng ở tỉ lệ thấp hoặc cao hơn, nhũ tương bị tách lớp. Do Gelucire® 50/13 có khả năng tự nhũ hóa, với tỉ lệ nhất định, tác dụng này được phát huy tối đa kết hợp với acid béo trong lipid tạo thành lớp màng kép giúp nhũ tương dễ hình thành và ổn định hơn. Khi phối hợp Gelucire® – phosphatidylcholin (2 : 1), kích thước tiểu phân nhỏ hơn so với công thức có 1,5% Gelucire® 50/13 ($p < 0,05$).

Phối hợp polysorbat 80 với Gelucire® 50/13 hay phosphatidylcholin, kích thước tiểu phân không khác nhau ($p > 0,05$) nhưng tỉ lệ tiểu phân ≤ 445 nm tăng lên gấp (gần) 2 lần. Polysorbat 80 làm giảm đáng kể kích thước tiểu phân ($p < 0,05$), tỉ lệ tiểu phân < 669 nm khoảng 82% (gấp đôi các mẫu trước đó). Điều này gợi ý rằng polysorbat 80 là chất diện hoạt có triển vọng cải thiện kích thước của tiểu phân ART. Có thể thấy loại và lượng chất diện hoạt có ảnh hưởng rất nhiều đến khả năng tạo nhũ tương và kích thước tiểu phân. Các mẫu bào chế dùng hỗn hợp polysorbat 80 – Simulsol™ 4000 P đã thu hẹp dãy phân bố và giảm kích thước tiểu phân còn 500 nm. Sự phối hợp chất diện hoạt đem lại hiệu quả nhũ hóa cao hơn, chứng tỏ polysorbat 80 – Simulsol™ 4000 P là hỗn hợp chất diện hoạt phù hợp cho pha dầu chứa hỗn hợp Compritol® 888 ATO – Labrafac™ PG.

4.2.2 Kỹ thuật bào chế hệ tiểu phân nano ART

HPH nhiệt độ cao làm giảm và đồng nhất hóa kích thước hệ tiểu phân nano ART rất hiệu quả. Với 500 bar 10 chu kỳ, tiểu phân có kích thước khoảng 158 nm, nhỏ hơn gần 3 lần kích thước của mẫu chưa đồng nhất hóa bằng HPH. Để tiếp tục giảm kích thước, có thể tăng nhiệt độ, áp suất hoặc chu kỳ đồng nhất hóa.

Nhiệt độ cao có thể gây bất lợi nếu máy HPH không có bộ phận ổn định nhiệt. Với lượng mẫu lớn, nếu qua nhiều chu kỳ, thời gian tiếp xúc với nhiệt kéo dài làm giảm chất lượng sản phẩm. Do đó, giải pháp tăng áp suất được lựa chọn. Ở 800 bar, một lần nữa kích thước tiểu phân có cải thiện rõ rệt. Các thông số đều nhỏ hơn mẫu đồng nhất hóa ở 500 bar. Áp suất 1.000 bar cũng có hiệu quả tương tự. Ở 1.100 bar, kích thước có xu hướng tăng lên trở lại, có thể do va chạm giữa các giọt nano mới hình thành hoặc sự bao phủ kém hiệu quả của

chất diện hoạt vì diện tích bề mặt quá lớn của các giọt lipid (kích thước càng nhỏ diện tích bề mặt càng lớn). Do đó, cần xác định áp suất và số chu kỳ đồng nhất hóa thấp nhất giúp giảm thời gian bào chế, giảm nhu cầu năng lượng và tránh hoạt chất tiếp xúc quá lâu với nhiệt nhưng vẫn thu được tiểu phân nm.

4.2.3 Hàm lượng ART phối hợp vào công thức bào chế hệ tiểu phân
Hiệu suất nang hóa tăng theo hàm lượng ART nhưng giảm ở mẫu chứa 9% và 10% ART. Có thể hiệu suất tăng theo tỉ lệ hoạt chất – lipid đến một giá trị cân bằng. Khi vượt quá khả năng chứa của lipid, hoạt chất bị đẩy ra khỏi tiểu phân và bám trên bề mặt tiểu phân hoặc khuếch tán ra môi trường. Điều này lý giải cho sự tăng kích thước của mẫu có 10% ART so với các mẫu còn lại ($p < 0,05$). Vì vậy, chọn tỉ lệ ART 8% nhằm tối ưu hiệu suất nang hóa.

4.2.4 Một số yếu tố ảnh hưởng đến kích thước của tiểu phân nano ART
Áp suất và số chu kỳ đồng nhất hóa có tương quan nghịch với kích thước tiểu phân. Tăng áp suất và chu kỳ làm giảm kích thước và ngược lại. Tuy nhiên, khi đã cân bằng, nếu tiếp tục tăng các thông số này thì quá trình đồng nhất hóa không hiệu quả. Cụ thể, kích thước tiểu phân tăng ở 1.100 bar. Có thể áp suất cao và thời gian tiếp xúc với nhiệt dài làm tăng năng lượng động học của tiểu phân nhỏ, chúng va chạm vào nhau khi bề mặt chưa được bao phủ hiệu quả nên bị kết tụ. Từ 800 bar (5, 10 chu kỳ) đến 1.000 bar (3 đến 10 chu kỳ), kích thước tiểu phân khoảng 115 nm. Ngoài hiệu quả, vấn đề tiết kiệm thời gian và năng lượng cũng cần được quan tâm. Vì vậy, chọn 800 bar 5 chu kỳ là thông số đồng nhất hóa hệ tiểu phân nano ART.

Kiểm soát nhiệt độ trong quá trình bào chế cũng là vấn đề quan trọng. Nhiệt độ cần đủ cao để hỗn hợp lipid luôn ở trạng thái tan chảy

và pha dầu đồng nhất nhằm đảm bảo hiệu quả đồng nhất hóa. Vì vậy, trong bào chế SLN, NLC với pha dầu là lipid rắn có nhiệt độ tan chảy cao, có thể đồng nhất hóa ở áp suất rất thấp và qua rất ít chu kỳ (500 bar, 3 chu kỳ) nhưng nhiệt độ đồng nhất hóa phải từ 75 °C – 90 °C hoặc cao hơn nhiệt độ chảy của lipid rắn từ 5 °C – 10 °C.

4.3. Tính chất của hệ tiểu phân nano ART

4.3.1 Kích thước và dãy phân bố kích thước tiểu phân nano ART

Kết quả từ nhiễu xạ laser cho biết thông tin về kích thước tiểu phân trong mẫu khảo sát, gồm dãy phân bố kích cỡ, tỉ lệ phần trăm của từng nhóm kích thước và kích thước tiểu phân trung bình. Tuy nhiên, phương pháp này không cung cấp thông tin về hình ảnh của tiểu phân. Hình ảnh khảo sát bằng TEM cho thấy tiểu phân có hình dạng đồng nhất với kích thước khoảng 100 nm và không có sự hiện diện của cấu trúc khác trong mẫu khảo sát. Kết quả này phù hợp với giá trị thu được từ nhiễu xạ laser (kích thước của tiểu phân nano ART khoảng 115 nm với dãy phân bố từ 58 – 339 nm). Như vậy, kết quả thu được từ hai phương pháp có sự tương đồng và đáng tin cậy.

4.3.2 Thế zêta của hệ tiểu phân nano ART

Đối với hệ tiểu phân ổn định nhờ lực đẩy tĩnh điện, thế zêta từ |30| mV, tối ưu là > |60| mV cho dự đoán hệ tiểu phân ổn định về phương diện vật lý trong thời gian bảo quản. Tuy nhiên, nguyên tắc này không phù hợp với hệ tiểu phân ổn định nhờ hiệu ứng không gian vì sự che phủ bề mặt đã làm giảm thế zêta của hệ. Thế zêta của hệ tiểu phân nano ART khoảng -15 mV nhưng hệ vẫn ổn định trong thời gian dài. Có thể bề mặt tiểu phân được che phủ bởi các nhóm PEG (polyethylen glycol), hiện diện trong chất diện hoạt tạo nên sự ngăn cách không gian giữa các tiểu phân và ngăn chúng kết tụ trở lại.

4.3.3 Hiệu suất nang hóa của hệ tiểu phân nano ART

Yếu tố ảnh hưởng quyết định đến hiệu suất nang hóa chính là độ tan của hoạt chất trong lipid tan chảy và tính chất của lipid. Hoạt chất cần tan tốt trong lipid tan chảy. Nếu pha dầu là hỗn hợp lipid rắn – lỏng thì mức độ liên kết trong cấu trúc của lipid rắn sẽ lỏng lẻo, tiểu phân có nhiều “không gian” để chứa hoạt chất hơn. Vì vậy, sử dụng hỗn hợp lipid rắn – lỏng để hòa tan ART là biện pháp nâng cao hiệu suất nang hóa. Hiệu suất nang hóa cao, hoạt chất được bảo vệ, hệ tiểu phân ổn định hơn do hạn chế sự hiện diện của hoạt chất tự do trong môi trường. Bằng phương pháp siêu lọc, đề tài đã xác định được hiệu suất nang hóa ART khoảng 97% do ART dễ tan trong LabrafacTM PG và hỗn hợp lipid tan chảy, thực tế không tan trong nước.

4.3.4 Phóng thích hoạt chất của hệ tiểu phân nano ART

ART trong tiểu phân được phóng thích chậm và lượng phóng thích tăng dần sau thời gian khảo sát. Trong khi đó, ART nguyên liệu khuếch tán rất nhanh vào môi trường trong giờ đầu tiên. Ở những giờ tiếp theo, lượng khuếch tán tiếp tục tăng cao. Hiện tượng này không xảy ra với tiểu phân nano ART. Có thể ART nguyên liệu ở dạng tự do nên nhanh chóng đi vào môi trường. Ngược lại, khi được phân tán trong lipid, ART cần có thời gian khuếch tán ra khỏi tiểu phân. Ngoài ra, vì được chứa trong tiểu phân nên ART được bảo vệ, hạn chế tiếp xúc với môi trường. Điều này rất có ý nghĩa đối với hoạt chất kém bền như ART.

4.3.5. Tính chất của hệ tiểu phân nano ART với cỡ mẫu bào chế 1.000 g

Tính chất tiểu phân của lô tối ưu và nâng cấp không khác nhau ($p > 0,05$), chứng tỏ quy trình bào chế có tính lặp lại và ổn định. Cỡ mẫu bào chế hệ tiểu phân nano ART đã được nâng lên 1.000 g với tỉ lệ

lipid là 10% và tỉ lệ chất diện hoạt là 2%. Khả năng nâng cở mẫu là yếu tố rất có ý nghĩa trong quá trình nghiên cứu, vì đó là cơ sở để tiến hành đánh giá hiệu quả điều trị và tiềm năng ứng dụng của sản phẩm.

4.3.5 Độ ổn định của hệ tiểu phân nano ART

Có một số cơ chế giải thích độ ổn định vật lý của tiểu phân nano trong môi trường nước. *Cơ chế thứ nhất*, tiểu phân ổn định nhờ lực đẩy tĩnh điện hình thành từ sự tích điện trên bề mặt tiểu phân (thuyết Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek, DLVO). *Cơ chế thứ hai* dựa vào sự cản trở không gian (steric stabilization) trên bề mặt tiểu phân hình thành từ đuôi thân nước của chất diện hoạt không ion hóa chứa nhóm ethylen oxid. Chúng được hấp phụ bằng cách gắn đầu kỵ nước lên phần thân dầu trên bề mặt tiểu phân, còn đuôi thân nước hướng vào môi trường tạo không gian ngăn cách các tiểu phân.

Ở 6 ± 2 °C, kích thước tiểu phân nano ART ổn định trong 6 tháng. Ở tháng 6, dãy phân bố bắt đầu mở rộng từ 339 nm đến 389 nm với tỉ lệ khoảng 0,2%. Đến tháng 9, kích thước tiểu phân tăng lên khoảng 138 nm và dãy phân bố mở rộng đến 600 nm. Từ tháng 6, hàm lượng % và hiệu suất nang hóa ART đều giảm. Điều này gợi ý rằng hiệu suất nang hóa giảm là một trong những dấu hiệu của sự tăng kích thước. Có thể ART tự do tăng lên đến một mức nào đó sẽ tụ lại hoặc bám dính lên bề mặt tiểu phân, khiến chúng kết tụ.

Ở 30 ± 2 °C / 75 ± 5% RH, kích thước tiểu phân ổn định trong 4 tháng và bắt đầu tăng ở tháng 5. Sự tăng kích thước đi kèm với việc mở rộng dãy phân bố. Có thể nhiệt độ cung cấp thêm năng lượng khiến lipid thay đổi trạng thái kết tinh và thay đổi sự sắp xếp phân tử của lipid trên bề mặt tiểu phân khiến chúng dễ kết tụ. Thời gian ổn định của hệ tiểu phân nano ART kéo dài hơn ở 6 ± 2 °C, nên chọn

điều kiện này để bảo quản hệ tiểu phân. Ngoài ra, hệ tiểu phân nano không chứa ART có kích thước ổn định đến 15 tháng, kéo dài hơn so với hệ tiểu phân nano ART do không có sự chuyển dịch hoạt chất từ pha dầu ra pha nước làm tăng tỉ lệ hoạt chất tự do trong môi trường.

4.4. Tác động diệt KST sốt rét của hệ tiểu phân nano ART trên chuột gây nhiễm *P. berghei*

Mật độ KST tăng trở lại vào ngày 21 nhưng phần trăm KST của tất cả các lô uống hệ tiểu phân nano ART vẫn thấp hơn ngày 1 từ 50% – 70%. Hệ tiểu phân nano ART liều 170 mg/kg và 190 mg/kg có tỉ lệ giảm mật độ KST > 30% bắt đầu từ ngày 2 và giảm mật độ KST cao hơn lô ART ($p < 0,05$) vào ngày 2 và ngày 3. Chứng tỏ tác động diệt KST sốt rét của hệ tiểu phân nano ART đến sớm hơn ART.

Hệ tiểu phân nano ART liều 150 mg/kg, 170 mg/kg và 190 mg/kg có ngày bắt đầu sạch KST sớm hơn lô ART ($p < 0,05$). Kết quả này phù hợp với kết quả đánh giá tỉ lệ giảm mật độ KST trong máu. Liều 170 mg/kg và 190 mg/kg có thời gian duy trì tình trạng sạch KST kéo dài hơn lô ART ($p < 0,05$). Các lô ART có hiện tượng dao động mật độ KST trong máu nhưng hiện tượng này không xảy ra đối với các lô hệ tiểu phân nano ART. Thực tế, ART có thời gian bán thải ngắn, khoảng 4 giờ theo đường uống. Sự dao động mật độ KST phản ánh nồng độ và hiệu quả điều trị của thuốc. Với đường uống, tiểu phân từ 20 – 500 nm được hấp thu xuyên bào qua đường tiêu hóa. Nếu kích thước lớn hơn, tiểu phân có thể không được hấp thu. Tiểu phân nano ART có kích thước khoảng 115 nm nên chúng nhanh chóng vượt qua rào cản của đường tiêu hóa và được hấp thu nhanh hơn. Ngoài ra, ART được tiểu phân bảo vệ nên có thể hấp thu nhiều hơn và đến đích nhanh hơn. Hiệu suất nang hóa cao cho thấy ART được chứa trong

lipid và phóng thích dần ra khỏi tiểu phân, có thể điều này làm kéo dài thời gian duy trì tình trạng sạch KST trong máu và thời gian sống sót của chuột. Những điều này góp phần tăng hiệu lực diệt KST và kéo dài thời gian tác dụng của hệ tiểu phân nano ART so với ART.

KẾT LUẬN

Theo nội dung đề ra, đề tài đã thu được kết quả như sau:

1. Đã xác định được sự tương tác giữa hỗn hợp Compritol® 888 ATO – Labrafac™ PG và ART. Kết quả của sự tương tác làm giảm nhiệt độ tan chảy của Compritol® 888 ATO, ART được hòa tan hoàn toàn và phân tán trong lipid.
2. Xây dựng được công thức và quy trình bào chế hệ tiểu phân nano ART. Thành phần công thức bào chế gồm 10% Compritol® 888 ATO – Labrafac™ PG (7 : 3), 2% polysorbat 80 – Simulsol 4000P (1 : 1), 0,8% ART và nước cất được bào chế bằng phương pháp HPH nhiệt độ cao với áp suất 800 bar và 5 chu kỳ.
3. Đã xác định được tính chất của hệ tiểu phân nano ART và từ đó xây dựng tiêu chuẩn kiểm định hệ tiểu phân nano ART.
 - 3.1. Đã đánh giá được các tính chất của hệ tiểu phân nano ART
 - Xác định được kích thước của tiểu phân ART bằng nhiễu xạ laser. Tiểu phân nano ART có kích thước trung bình khoảng 115 nm với dãy phân bố kích cỡ từ 58 – 339 nm. Hình ảnh và kích thước chụp từ TEM cho kết quả phù hợp với phương pháp nhiễu xạ laser.
 - Quy trình định lượng ART bằng HPLC đã được xây dựng và thẩm định. Kết quả cho thấy quy trình đạt yêu cầu phân tích.
 - Hàm lượng ART phối hợp vào công thức khoảng 8% so với lipid và hiệu suất nang hóa hoạt chất của tiểu phân khoảng 97%.
 - Lượng ART được phóng thích tăng dần theo thời gian.

3.2. Đã xây dựng được tiêu chuẩn kiểm định hệ tiểu phân nano ART.

3.3. Đã nâng cỡ mẫu bào chế lên 1.000 g.

Tính chất của lô tối ưu và nâng cấp không khác nhau ($p < 0,05$), cỡ mẫu bào chế hệ tiểu phân nano ART được nâng lên 1.000 g.

3.4. Đã theo dõi độ ổn định của hệ tiểu phân nano ART.

Xác định được độ ổn định của hệ tiểu phân nano ART ở $6 \pm 2^\circ\text{C}$ và $30 \pm 2^\circ\text{C} / 75 \pm 5\% \text{RH}$ lần lượt là 6 tháng và 4 tháng.

Xác định được độ ổn định của hệ tiểu phân không chứa ART. Kết quả cho thấy hệ tiểu phân không chứa ART ổn định đến tháng thứ 15.

4. Đã đánh giá tác động diệt KST sốt rét của hệ tiểu phân nano ART trên chuột gây nhiễm *P. berghei*.

Trong thử nghiệm *in vivo*, hệ tiểu phân nano ART có hiệu quả diệt KST sốt rét *P. berghei* với tỉ lệ giảm mật độ KST trong máu $> 30\%$ từ ngày 2 đến ngày 35. Lô điều trị bằng hệ tiểu phân nano ART (liều 150 mg/kg, 170 mg/kg và 190 mg/kg) có thời gian sạch KST nhanh hơn ART ($p < 0,05$) với số ngày lần lượt là 3,1 ngày (so với 4,2 ngày); 2,80 ngày (so với 4,60 ngày) và 2,33 ngày (so với 4,60 ngày) > Liều 170 mg/kg và 190 mg/kg có thời gian duy trì tình trạng sạch KST kéo dài hơn ART ($p < 0,05$) với số ngày lần lượt là 21,20 ngày (so với 7,40 ngày) và 24,11 ngày (so với 11,60 ngày).

KIẾN NGHỊ

Kết quả thu được là cơ sở khoa học cho việc ứng dụng công nghệ nano trong bào chế thuốc. Để hoàn thiện hơn và nâng cao triển vọng ứng dụng trong nghiên cứu sản xuất, cần khảo sát tiếp theo:

- Nghiên cứu hoàn thiện dạng bào chế cho sản phẩm.
- Thử nghiệm độc tính cấp và bán trường diễn của sản phẩm trên mô hình động vật.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Khuru Mỹ Lê, Trương Công Trị, Nguyễn Minh Cang, Hoàng Minh Châu, Nguyễn Minh Đức (2013), “Khảo sát thành phần công thức và thông số điều chế hệ phân tán nano artemisinin bằng phương pháp đồng nhất hóa dưới áp suất cao”, *Y học TP HCM* tập 17 phụ bản của số 4, tr. 295 – 302.
2. Khuu My Le, Truong Cong Tri, Lam Hoang Vu, Hoang Minh Chau, Nguyen Minh Duc (2013), “Physicochemical characterization of artemisinin-loaded lipid nanoparticles”, *Pharma Indochina* VIII, pp. 371 – 375.
3. Khuru Mỹ Lê, Trương Công Trị, Nguyễn Minh Cang, Hoàng Minh Châu, Nguyễn Minh Đức (2015), “Khảo sát độ tan và đánh giá sự tương tác của artemisinin với một số tá dược ứng dụng điều chế tiểu phân nano artemisinin”, *Y học TP HCM* phụ bản tập 19 của số 3, tr. 729 – 736.
4. Khuru Mỹ Lê, Trịnh Ngọc Hải, Trương Công Trị, Lê Thành Đồng, Hoàng Minh Châu, Nguyễn Minh Đức (2016), “Đánh giá tác dụng của hệ tiểu phân nano artemisinin trên chuột nhiễm *Plasmodium berghei*”, *Tạp chí Dược Liệu*, tập 21, số 6, tr.412 – 416.
5. Khuru Mỹ Lê, Trương Công Trị, Hoàng Minh Châu, Nguyễn Minh Đức (2017), “Khảo sát sự ảnh hưởng của áp suất và chu kỳ đồng nhất hóa lên kích thước tiểu phân nano artemisinin điều chế bằng phương pháp đồng nhất hóa áp suất cao”, *Y học TP HCM* phụ bản tập 21 của số 1, tr. 729 – 736.
6. Khuru Mỹ Lê, Trương Công Trị, Hoàng Minh Châu, Nguyễn Minh Đức (2017), “Nghiên cứu bào chế hệ tiểu phân nano lipid chứa artemisinin cỡ lô 1.000 g bằng phương pháp đồng nhất hóa áp suất cao”, *Y học TP HCM* phụ bản tập 21 của số 1, tr. 729 – 736.